

Phenotypic and genotypic investigation of the co-cultivation of intestinal probiotic lactobacilli on the amount of biofilm production in *Shigella typhi*

Moseib Gol Mohammadi¹, Mahnaz Mohammadi²

¹ Senior Expert, Department of Biotechnology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

Abstract

Background: Diarrhea is one of the most important causes of death in the world. *Shigella* is one of the causes of diarrheal diseases. Global studies have also shown that the prevalence of this bacterium as well as the resistance in *Shigella* are strongly increasing. Also, the resistance of *Shigella* species to third generation cephalosporins is increasing. The purpose of this study was to investigate the effect of *Lactobacillus plantarum* probiotics on the survival rate and also to investigate the expression of surface factors related to survival and bacterial biofilm.

Materials and methods: In this study, a sample of *Shigella* bacteria was prepared according to ATCC standard from Pasteur Institute of Iran and *Lactobacillus plantarum* isolated from dairy products was used. Samples were freshly cultured in culture medium. Then the effect of *Lactobacillus plantarum* on *Shigella* was co-cultured in 96-well plates in the presence of 1% glucose. After 24 hours RNA extraction and cDNA synthesis were performed and the survival and expression of the genes for the production of binding factors and bacterial biofilm were evaluated by Real Time technique.

Results: This study showed that the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* could significantly reduce the population of *Shigella* bacteria and also significantly reduced the expression of genes related to BSSS and OSPE 2 binding factors.

Conclusion: The results of this study showed that *Lactobacillus plantarum* could have an effect on the control and recovery process of *Shigella* bacteria.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, *Shigella*, Biofilm, Probiotic.

Cited as: Gol Mohammadi M, Mohammadi M. Phenotypic and genotypic investigation of the co-cultivation of intestinal probiotic lactobacilli on the amount of biofilm production in *Shigella typhi*. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(2): 146-154.

Correspondence to: Mahnaz Mohammadi

Tel: +98 9127669588

E-mail: m-mohamadi@iiu.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-3376-2162

Received: 1 Aug 2023; **Accepted:** 5 Nov 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی

دوره ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۴۶ تا ۱۵۴

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی اثر همکشتی لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک روده‌ای بر روی میزان تولید بیوفیلیم در شیگلا تایفی

مصیب گل محمدی^۱، مهناز محمدی^۲^۱ کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های اسهالی یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان هستند. شیگلا یکی از عوامل بیماری‌های اسهالی است که شیوع این باکتری و همچنین مقاومت در شیگلا به شدت در حال افزایش است. همچنین، مقاومت گونه‌های شیگلا به سفالوسپورین-های نسل سوم رو به افزایش است. هدف از این مطالعه بررسی میزان تاثیر پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی میزان بقا و همچنین بررسی بیان فاکتورهای سطحی مربوط به بقا و بیوفیلیم باکتری بود.

روش بررسی: نمونه باکتری شیگلا به صورت استاندارد ATCC از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و از لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از روده استفاده شد. نمونه‌ها به صورت کشت‌های تازه در محیط‌های کشت تهیه شد سپس میزان تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی شیگلا به صورت همکشتی در پلیت‌های ۹۶ خانه در حضور ۱ درصد گلوکوز انجام شد. پس از ۲۴ ساعت استخراج RNA و سنتز cDNA انجام و میزان بقا و بیان ژن‌های تولید فاکتورهای اتصال و بیوفیلیم باکتری توسط تکنیک ریل تایم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که همکشتی لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث کاهش جمعیت باکتری شیگلا شود و همچنین به شکل معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای اتصال BSSS و OSPE 2 شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌تواند در روند کنترل و بهبودی باکتری شیگلا تاثیر داشته باشد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شیگلا، بیوفیلیم، پروبیوتیک.

مقدمه

درمان‌های اولیه پزشکی در دسترس نباشد، معمولاً خود محدود شوند است. این بیماری در کشورهای در حال توسعه، در بین کودکان شایع است و اکثراً در مهد کودک‌ها، زندان‌ها، پادگان‌ها وجود دارد (۲).

شیگلا باعث بروز عوارض گوناگونی مثل اختلالات الکترولیتی (هیپرناترمی)، هیپوگلیسمی و هیپوکلسمی، تشنج، سندروم همولیتیک اورمیک، مگا کلون توکسمیک، پرتونیت، آرتريت، میوکاردیت و مننژیت بخصوص در بیماران دچار سوء تغذیه و نقص ایمنی می‌شود.

شیگلاها، باسیل‌های گرم منفی، غیر متحرک و عضوی از خانواده بزرگ باکتری‌های روده‌ای هستند که فقط در انسان و نخستین سانان بیماری‌زا هستند. این باکتری در سلول‌های

سالانه ۵ میلیون مورد مرگ و میر ناشی از گاستروانتریت در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد که حداقل ده درصد این موارد به دلیل دیسانتری ناشی از شیگلا است. بیش از ۱۶۵ میلیون مورد بیماری و یک میلیون مرگ و میر مربوط به شیگلا در سال در سرتاسر دنیا گزارش می‌شود (۱). این بیماری، به جز در مواردی که بیمار دارای نقص ایمنی باشد یا

آدرس نویسنده مسئول: اسلامشهر، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، مهناز

محمدی (email: m-mohamadi@iaau.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-3376-2162

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۱۴

روده انسان تکثیر پیدا می کند و موجب آسیب به بافت روده انسان شده، در نتیجه منتهی به اسهال خونی می گردد (۳). بیماری زایی در نتیجه هجوم یا نفوذ باکتری به مخاط کلون همراه تخریب بافت پوششی و ایجاد یک کولیت و در نهایت در اثر التهاب حاد در لامینا پروپریا منجر به زخم شدن مخاط روده با از دست رفتن خون و آزاد شدن عناصر التهابی و موکوس به درون لومن روده است. این شرایط مانع از جذب آب در کلون می شود و حجم مدفوع تغییر می کند و در نتیجه بیمار به صورت متناوب دچار اسهال خونی و مخاطی می شود. شیوع عفونت های شیگلایی به دلیل دوز پایین بیماری زایی این باکتری و همچنین انتقال راحت آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده به این باکتری، باعث ایجاد بیماری گوارشی در انسان می شود (۴).

در دهه ۱۹۸۰ مطالعات انجام شده توسط Sansonetti و همکارانش بیانگر وابستگی قدرت تهاجمی شیگلا به یک پلاسمید ویروولانس ۲۳۰-۲۱۰ kb به نام Invasion plasmid (pINV) بود؛ در پی انتقال این پلاسمید به ایشیریشیا کلی K12 باعث تغییر ژنومی ایشیریشیا کلی به شیگلا شد و جدایه های تغییر یافته توانایی تهاجم به سلول های هلا (Hela) را کسب کردند (۵). مطالعات بعدی حاکی از آن بود که لوکوس های کروموزومی متعددی نیز در روند بیماری زایی نقش دارند. پلاسمید ویروولانس در تمامی جدایه های شیگلا مشاهده شده است. و همه ژن های مورد نیاز برای ورود به سلول های میزبان در ناحیه ۳۲ کیلو بازی یافت شده است. این ژن ها یک سیستم ترشحی نوع ۳ را کد می کنند. این سیستم مانند یک سوزن عمل کرده و پروتئین های افکتور را از سیتوپلاسم باکتری به سلول میزبان منتقل می کند. پروتئین های افکتور شکل گیری یک رافل غشایی غنی از اکترین بر روی غشا سلولی میزبان را وساطت می کنند. باکتری توسط مکانیسمی شبیه به فاگوسیتوزیس وارد سلول میزبان می شود. ژن های mxi و spa سیستم ترشحی نوع ۳ را کد می کنند که محصولات ژن ipa یعنی پروتئین های Ipa را وارد سلول میزبان می کند. ژن های دیگر نیز در نقاط مختلف پلاسمید ویروولانس وجود دارد که در بیان سیستم ترشحی نوع ۳ و یا در بقا و گسترش درون سلولی ارگانیسم نقش دارند (۶). یکی دیگر از فاکتورهای ویروولانس در باکتری های گرم منفی توانایی تولید بیوفیلیم است. بیوفیلیم جمعیتی از سلول های باکتری هست که در ابتدا با نیروی واندروالسی به طور سست به سطوح بی جان یا، بافت زنده متصل می شود و سپس با

تولید پلی مرهای خارج سلولی و ایجاد ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی موجب اتصال برگشت ناپذیر سلول ها به سطوح می شوند. توسعه بیوفیلیم باعث مقاومت باکتری نسبت به درمان های آنتی بیوتیکی شده و می تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه شود. در محیط های بیمارستانی بیوفیلیم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می شوند (۷). بیوفیلیم تولید شده بطور اولیه سبب محافظت باکتری از سیستم ایمنی بدن میزبان یعنی جلوگیری از فاگوسیت شدن باکتری توسط ماکروفاژها و نوتروفیل ها می شود. همچنین بیوفیلیم مانع از ورود آنتی بیوتیک ها به محیط باکتری هایی که درون بیوفیلیم قرار گرفته اند می شود بدین طریق جدای از کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری تولید کننده بیوفیلیم مانع از ورود مستقیم آنتی بیوتیک به محیط اطراف باکتری می شود و عدم کارایی آنتی بیوتیک ها بر روی باکتری ها می شود.

در واقع تولید بیوفیلیم سبب مزمن شدن بیماری می شود. تولید بیوفیلیم در افرادی که دارای اعضای مصنوعی پروستتیک، شنت های مغزی نخاعی، کاتتر و یا اجسام خارجی دیگر هستند سبب چسبیده و کلونیزه شدن باکتری بروی سطوح و به عنوان یکی از عوامل کمک کننده ایجاد بیماری در فرد می شود. امروزه مشخص شده که این باکتری قدرت تشکیل بیوفیلیم بروی سطوح دارد. افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی در کنار بیماری زایی در عفونت های بیمارستانی و ایجاد بیوفیلیم به یک نگرانی عمومی در حوزه سلامت عمومی تبدیل شده است (۸،۹). هدف از این مطالعه، بررسی استفاده از باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، که می تواند باعث مهار رشد باکتری شیگلا و همچنین کاهش بیان ژن های مربوط به فاکتورهای اتصال و تولید بیوفیلیم باکتری شود، به عنوان درمان حمایتی بود.

مواد و روشها

در این مطالعه از لاکتوباسیلوس پلانتاریوم استاندارد ATCC استفاده شد. برای کشت، باکتری را در محیط MRS مایع کشت دادیم و تست های لازم برای جهت تست مقاومت به اسید، صورت گرفت. نمونه ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت بی هوای انکوبه گردید. شناسایی مورفولوژیکی باکتری با استفاده از تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه و رشد در غلظت های مختلف نمک (۴/۶ و ۵ درصد حجمی - وزنی کلرید سدیم در

محیط کشت MRS مایع انجام پذیرفت و در نهایت با 16srRNA PCR صحت باکتری تایید شد.

جداسازی نمونه شیگلا

در این مطالعه برای مطالعه ی تاثیر پروبیوتیک بر روی باکتری شیگلا از سوش استاندارد شیگلا فلکسنری (PTCC 1234) استفاده می گردد. تهیه شده از انیستیتو پاستور تهران استفاده شد و تست های بیوشیمیایی برای تایید آن انجام شد.

روش های ژنوتیپی تشخیص حضور ژنهای تولید کننده

بیوفیلیم

برای انجام این تست به محیط TSB و MRS تازه حاوی ۱٪ گلوکز نیاز است. ابتدا محیط TSB، MRS و محلول گلوکز را به مقدار معین در آب مقطر حل کرده و سپس با نسبت معین از محلول گلوکز به محیط TSB و MRS اضافه نموده تا غلظت نهایی به ۱٪ برسد. ابتدا نمونه ها را در محیط جامد کشت داده و به مدت ۲۰ ساعت انکوبه شد. سپس از کلنی های تک رشد کرده بر روی محیط جامد به ۱۰ میلی لیتر محیط مایع TSB و MRS حاوی ۱٪ گلوکز تلقیح کرده به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس کدورت را به نیم مک فارلند رسانده و از سوسپانسیون تهیه شده ۲۰۰ میکرولیتر داخل چاهک های میکروپلیت ریخته و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس فاز رویی هر چاهک را بیرون ریخته و چاهک ها را چهار مرتبه با PBS شست و شو داده شد. در مرحله بعد پلیت ها را به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار می دهیم تا کاملاً خشک شود. سپس رنگ آمیزی با رنگ کریستال وایوله به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس رنگ موجود در چاهک ها را بیرون ریخته پلیت را توسط آب شست و شو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاوی اتانول ۷۰٪ و ایزوپروپیل الکل ۱۰٪ به چاهک ها افزوده و جذب نوری را در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت گرفت. سوبیه هایی که متوسط جذب نوری آنها بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (TSB حاوی ۱٪ گلوکز) باشد از نظر تولید بیوفیلیم به عنوان مثبت در نظر گرفته شد.

تفسیر آزمون

نمونه های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلیم (غیر چسبنده)، نمونه های با OD بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلیم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه های با OD بین ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان بیوفیلیم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه های با OD بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلیم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

برای اینکه متوجه شویم که چه غلظتی از پروبیوتیک مورد مطالعه، روی باکتری شیگلا تأثیر گذاشته و چه غلظتی از آن بر بیوفیلیم باکتری اثر داده شود ابتدا مقدار MIC پروبیوتیک به دست آورده شد. اولین چاهک با کمترین غلظت از پروبیوتیک که باکتری شیگلا در آن رشد نکرده است به عنوان MIC آن پروبیوتیک در نظر گرفته شد. محیط مورد استفاده برای انجام آزمون MIC، محیط کشت MHB و MRS است و سوسپانسیون باکتری با غلظتی معادل غلظت ۱ مک فارلند تهیه می شود. به این صورت که ابتدا سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند را آماده کرده و سپس به اندازه ۱ رقیق می گردد. روش کار به این صورت انجام گرفت که به تعداد سوبیه های مورد مطالعه (۲۰ سوبیه) لوله آزمایش برداشته و در آنها مقداری سرم فیزیولوژی ریخته شد. با سواب استریل کمی از کلنی باکتری در سرم فیزیولوژی زده تا کدورت آن به کدورت محلول نیم مک فارلند برسد. در یک لوله فالکون ۵ ml از محیط کشت MHB ریخته و بعد از ۵۰ L از سوسپانسیون باکتری اضافه شد تا غلظت ۱ مک فارلند به دست آید. سپس پروبیوتیک با غلظت یک مکفارکند در لیتر تهیه شد. پس از آن رقت سازی به روش Serial dilution صورت گرفت. سپس، استخراج DNA توسط کیت روش (یکتا تجهیز آزما) و بررسی کیفیت DNA استخراج شده، انجام گرفت.

اثردهی غلظت MIC از پروبیوتیک بر باکتری شیگلا

برای باکتری، ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن میکروپلیت ها، از روی ۳ چاهک مربوط برداشته و در وبالهای RNase free وارد شد. مشخصات محتویات هر ویال را روی آن ها یادداشت کرده و برای انجام مرحله استخراج RNA در فریزر -۷۰ نگهداری شد. در این مرحله به منظور بررسی چگونگی اثر غلظت های مختلف پروبیوتیک بر باکتری شیگلا، روش رنگ آمیزی تست بیوفیلیم انجام گرفت. سپس با استفاده از دستگاه Elisa Reader، جذب نوری (OD) به دست آمد. در نهایت با محاسبه میزان ODC و رابطه آن با OD، میزان اثرگذاری پروبیوتیک بر قدرت تشکیل بیوفیلیم شیگلا و یا عدم تشکیل آن مشخص شد. فرآیند استخراج RNA از سوسپانسیون باکتری های تیمار شده با پروبیوتیک، به وسیله کیت استخراج RNA با Cat No: YT9080 از شرکت یکتا تجهیز آزما انجام شد.

سنجش کمیت و خلوص RNAهای استخراج شده

جدول ۱. توالی پرایمر ژن های BSSS و OSPE و ۱۶srRNA

Name	Forward or Reverse	Sequence (۵'→۳')	Lengh
OSPE2	F	CCCTTGCTTCCACAAACACA	140
	R	CAACGTTTTTCGTCCGGTTGG	
BSSS	F	CCTGCTCGGACTTATTTGGGGT	112
	R	CGCTCGTAGGGTGGGACATC	
16srRNA	F	CGCGACGGACAACAGAATACACTCCATC	67
	R	ATGTTCAAAAGCATGCCATATCTGTG	

جدول ۲. تست نرمالیتی داده های بیان ژن BSSS

Shapiro-wilk test				
W	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
P value	>۰/۹۹۹۹	>۰/۹۹۹۹	>۰/۹۹۹۹	>۰/۹۹۹۹
Passed Normality Test (alpha=0/05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns

جدول ۳. تست Ordinary one-way ANOVA داده های بیان ژن BSSS

Tukeys multiple comparisons Test	Mean Diff	۹۵٪/CI of Diff.	Sig	Summary	Adjusted P Value	P Value
Dos ۱ vs. dos ۲	-۰/۹۰۲۶	۰/۵۷۹۶ تا -۲/۳۸۵	No	Ns	۰/۲۸۱۵	A-B
Dos ۱ vs. dos ۳	-۲/۸۲۸	-۱/۳۴۶ تا -۴/۳۱۰	Yes	**	۰/۰۰۱۳	A-C
Dos ۱ vs. control	-۱۸/۵۰	-۱۷/۰۲ تا -۱۹/۹۸	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	A-D
Dos ۲ vs. dos ۳	-۱/۹۲۵	-۰/۴۴۱ تا -۳/۴۰۷	Yes	*	۰/۰۱۳۵	B-C
Dos ۲ vs. control	-۱۷/۶۰	-۱۶/۱۱ تا -۱۹/۰۸	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	B-D
Dos ۳ vs. control	-۱۵/۶۷	-۱۴/۱۹ تا -۱۷/۱۵	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	C-D

برای انجام واکنش Real-time PCR از دستگاه qiagen مدل rotor gen 6000 به منظور بررسی بیان ژن های BSSS و 16srRNA OSPE 2 پس از اثردهی پروبیوتیک بر بیوفیلم باکتری شیگلا استفاده شد. در این واکنش از کیت آزمایشگاهی SYBR Green qPCR MasterMix 2X، با Cat No: YT2551 از شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا توالی پرایمر این ژن ها به کمک نرم افزار Gene Runner طراحی شدند (جدول ۱). لازم به ذکر است که در این مطالعه از 16srRNA به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

آنالیز آماری نتایج

با توجه به نوع داده ها و همچنین با توجه به نرمال بودن داده ها برای آنالیز داده ها از تست Ordinary one-way ANOVA استفاده شد و در تست تعقیبی از تست Tukey's استفاده شد.

یافته ها

بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده به وسیله دستگاه نانو دراپ سنجیده شد. این دستگاه آلودگی نمونه به پروتئین را با اندازه گیری نسبت جذب نوری RNA در طول موجهای ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مشخص می کند. آلودگی با موادی مانند فنل و دیگر ترکیباتی که در هنگام استخراج RNA مورد استفاده قرار می گیرند نیز با سنجش نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ صورت می گیرد. نمونه های دارای نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر بین ۱/۷ تا ۱/۹ جهت سنتز cDNA مناسب هستند.

تهیه cDNA از RNA استخراج شده

ساخت cDNA از RNA های استخراج شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA با Cat No: YT4500، از شرکت یکتا تجهیز آزما به صورت زیر انجام شد.

انجام Real-time PCR و بررسی بیان ژن های BSSS و OSPE

جدول ۴. تست نرمالیتی بیان ژن OSPE2

Shapiro-wilk test				
W	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
P value	>۰/۹۹۹۹	۰/۹۹۹۹>	۰/۹۹۹۹>	۰/۹۹۹۹>
Passed Normality Test (alpha=0/05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	Ns

جدول ۵. تست Ordinary one-way ANOVA داده های بیان ژن OSPE2

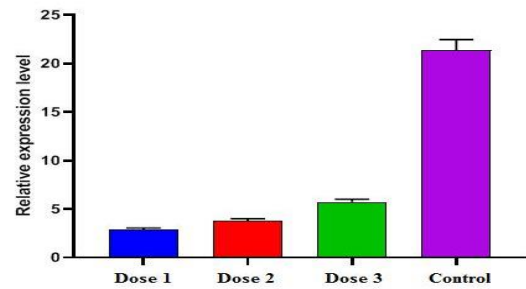
Tukeys multiple comparisons Test	Mean Diff	%۹۵ CI of Diff	Sig	Summary	Adjusted P Value	P Value
Dos ۱ vs.dos ۲	-۰/۳۳۳۳	۰/۳۸۵ تا ۰/۲۲۸۰	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	A-B
Dos ۱ vs.dos ۳	-۰/۰۱۷۷۶	۰/۰۸۷۶۰ تا -۰/۱۲۲۹	No	Ns	۰/۹۴۷۳	A-C
Dos ۱ vs.control	-۰/۶۷۲۸	-۰/۵۶۷۶ تا -۰/۷۷۸۱	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	A-D
Dos ۲ vs.dos ۳	-۰/۳۵۰۹	-۰/۲۴۵۷ تا ۰/۴۵۶۲	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	B-C
Dos ۲ vs.control	-۱/۰۰۶	۰/۹۰۰ تا -۱/۱۱۱	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	B-D
Dos ۳ vs.control	-۰/۶۵۵۲	۰/۵۴۹۹ تا ۰/۷۶۰۴	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	C-D

نتایج بررسی بیان ژن *16srRNA* با استفاده از تکنیک سایبر گرین Real-time PCR انجام گرفت. بدین منظور، در این پژوهش ژن *16srRNA* به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. منحنی ذوب ژن *16srRNA* تک قله شد. تک پیک بودن این منحنی نشان دهنده اختصاصی بودن محصول PCR است. برای بیان ژن BSSS با استفاده از روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت و منحنی ذوب، منحنی استاندارد و نمودار تکثیر، این ژن بررسی شد. هم چنین بیان ژن OSPE2، مورد سنجش قرار گرفت و منحنی ذوب، منحنی استاندارد و نمودار تکثیر این ژن بررسی شد (نمودارهای ۱ تا ۴). با توجه به نوع داده ها و همچنین با توجه به نرمال بودن داده ها برای آنالیز داده ها از تست Ordinary one-way ANOVA استفاده شد و در تست تعقیبی از تست Tukey's استفاده شد (جدول های ۲ تا ۵).

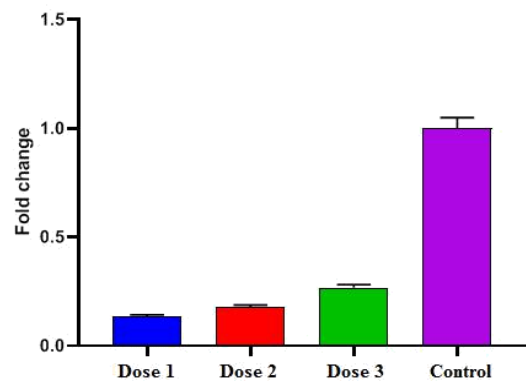
آزمون کمی تولید بیوفیلیم برای هر نمونه سه بار تکرار شد و در مرحله آخر جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader (BITEC) قرائت شد. جدایه هایی که جذب نوری آنها در این طول موج بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (محیط TSB و MRS حاوی ۱٪ گلوکز بود، از نظر تولید بیوفیلیم مثبت در نظر گرفته شد. نمونه های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلیم (غیر چسبنده)، نمونه های با OD بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلیم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه های با OD بین ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان بیوفیلیم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه های با OD بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلیم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی شدند. در این آزمایش تعداد جدایه شیگلا مورد ارزیابی قرار گرفت که تولید کننده ضعیف بیوفیلیم شناسایی شدند. بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. نتیجه بررسی نسبت جذب نوری RNA در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰، ۲/۲ و بالاتر بود. بنابراین از RNA های استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد.

بیماری های اسهالی باکتریایی جزو بزرگترین مشکلات بهداشت عمومی هستند. بر اساس برآورد WHO سالانه ۵/۴ بیلیون نفر در جهان مبتلا به بیماری های اسهالی می شوند که در سال ۲۰۰۲ از این تعداد ۸/۱ میلیون مورد مرگ گزارش گردیده است و تقریباً ۹۹ درصد این موارد در کشورهای در حال توسعه بوده است. در میان پاتوژن های باکتریایی گونه های جنس شیگلا معمول ترین و مهم ترین ایزوله های جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال هستند؛ ۵ تا ۱۵ درصد تمامی موارد اسهال در سراسر جهان با عفونت های شیگلایی مرتبط هستند که از این میان ۱/۱ میلیون مورد مرگ را شامل می شوند؛ دو سوم تمام این مرگ و میرها در کودکان زیر ۵ سال رخ می دهند. از درمان های بسیار متداول این عفونت ها تجویز آنتی بیوتیک است (۱۰،۱۱). با توجه به استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها و افزایش شیوع مقاومت در کشور، شکست های درمانی برای بیماران و متخصصین بسیار هزینه بر و دردسر ساز است. با استفاده از پروبیوتیک ها می توان بسیاری از درمان های آنتی بیوتیکی را متوقف کرد و در طولانی مدت با تغییر سبک تغذیه ای می توان از ایجاد و پیشرفت این عفونت های روده ای به خصوص شیگلوزیس جلوگیری کرد. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مهار لاکتوباسیلوس پلانتاریوم بر روی میزان تولید بیوفیلیم در شیگلا بود تا بتوان با انجام مطالعات در سطح گسترده تر، روش های درمانی جایگزین آنتی بیوتیک تراپی را برای کمک به بخش درمانی مشخص کرد (۱۲،۱۳).

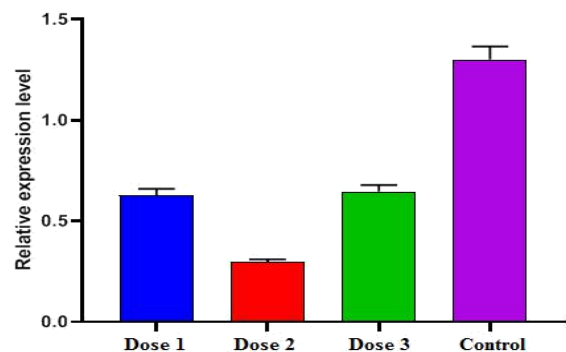
گونه ها مختلفی از باکتری به عنوان پروبیوتیک معرفی شده اند که شایع ترین آنها مربوط به گونه لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم هستند. امروزه مزیت کاربرد پروبیوتیک ها در بیماری های سیستمیک، به ویژه دستگاه گوارش باعث مهار باکتری های مضر روده شده و التهاب روده را کاهش و همچنین باعث تعدیل فلور میکروبی روده می شوند (۱۴،۱۵). با توجه به شیوع بالای این باکتری و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی آن نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در بالین، درمان های حمایتی می توانند بسیار کمک کننده باشند. استفاده از پروبیوتیک ها یکی از راهکارهای جدید برای درمان های حمایتی و حتی استفاده به عنوان درمان جایگزین در بسیاری از انواع بیماری ها است. برای مثال در مطالعه ای که شکری و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در ایران انجام دادند، نشان دادند که سوش های پروبیوتیک که از لبنیات جداسازی شده است می تواند اثر ضد بیوفیلیمی و ضد باکتریایی علیه سویه های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا داشته باشد. همچنین آنها نشان دادند که بعد از همکشتی باکتری با پروبیوتیک ها



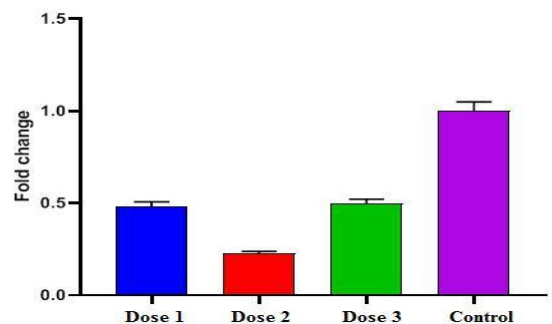
نمودار ۱. بیان ژن نسبی relative expression level



نمودار ۲. بیان ژن نسبی Fold change



نمودار ۳. بیان ژن نسبی relative expression level



نمودار ۴. بیان ژن نسبی Fold change

بر روی تاثیر مهاری لاکتو باسیلوس‌ها بر روی ویبریوکلا و شیگلا انجام دادند نشان دادند که همکشی این باکتری‌ها با پروبیوتیکی مثل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند نقش محافظت کننده و مهاری داشته باشد. هم چنین این مطالعه نشان داد که این پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث کاهش تهاجم باکتری‌ها شوند و بیان ژن‌های مربوط به تهاجم را به شکل معنی‌داری کاهش دهند (۲۲). نتایج این مطالعه نیز تایید کننده آن بود که پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌توانند باعث کاهش بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای اتصالی و بیوفیلم شیگلا شوند.

این مطالعه با هدف بررسی بیشتر استفاده از باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان درمان حمایتی برای این باکتری نشان داد که استفاده از این پروبیوتیک می‌تواند باعث مهار رشد باکتری شیگلا و همچنین کاهش بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای اتصال و تولید بیوفیلم باکتری شود که در نتیجه آن احتمالاً می‌تواند پاسخ درمانی را بهبود بخشد و به عنوان یک درمان حمایتی در کنار داروهای تجویزی پزشک مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، برگرفته از پایان نامه‌ای با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1398.319 است که تمام منشور اخلاقی در آن رعایت و در دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفته است. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری کردند، اعلام می‌نمایم.

هیچ باکتریوسینی تولید نشد و بیوفیلم تشکیل شده تحمل کمی در برابر تغییرات pH داشت (۱۶،۱۷). همچنین در دیگر مطالعه‌ای که تیئن و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در فرانسه بر روی سلول‌های اپی تللیال آلوده شده با شیگلا که با لاکتوباسیلوس کاژئی مجاورت داده شده اند نشان دادند که وجود این پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث کاهش القای تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش بیان ژن‌های تولید کننده ادهسین شیگلا شده است. نتایج این مطالعه هم توانست همانند مطالعه تیئن و همکارانش نشان دهد که بعد قرار گیری این باکتری در مجاورت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم میزان بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای اتصالی و بیوفیلم باکتری نیز به شکل معنی‌داری کاهش یافته است (۲۰-۱۸). در دیگر مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ Xu و همکارانش در کشور چین بر روی تولید بیوفیلم شیگلا انجام دادند، نشان دادند که این باکتری می‌تواند فنوتیپ‌های غیر معمولی از بیوفیلم را به واسطه تولید انواع LPS تولید کند. آنها نشان دادند که تولید نوع خشن LPS یا نوع deep-rough که در آن جز داخلی قسمت مرکزی یا Core فقط دارای قند kdo است می‌تواند تولید فاکتورهای اتصالی را چندین برابر افزایش داده و اتصال محکم‌تری را با سلول برقرار کنند. این روند در مراحل ابتدایی اتصال باکتری به سلول اپیتلیال و پس از لیز سلول اپیتلیال می‌تواند بیشتر رخ دهد که در واقع در ساعات ۱۲ الی ۲۴ ساعت بعد از آلوده شدن فرد به باکتری می‌باشد. در این مطالعه نشان داده شد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌توانند در مدت ۲۴ ساعت بعد از هم کشتی با باکتری شیگلا میزان بیان ژن‌های مربوط به تولید فاکتورهای اتصالی را به شکل معنی‌داری کاهش دهند (۲۱). در مطالعه‌ای که علمداری و همکارانش در سال ۲۰۱۸

REFERENCES

1. Nelson MR, Shanson DC, Hawkins DA, Gazzard BG. Salmonella, Campylobacter and Shigella in HIV-seropositive patients. AIDS (London, England) 1992; 6:1495-8.
2. Dinari G, Hale TL, Austin SW, Formal SB. Local and systemic antibody responses to Shigella infection in rhesus monkeys. J Infect Dis 1987;155:1065-9.
3. Takeda Y. Shiga and Shiga-like (Vero) toxins. Bacterial toxins and virulence factors in disease 1995;21:313.
4. Hannu T, Mattila L, Siitonen A, Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis attributable to Shigella infection: a clinical and epidemiological nationwide study. Ann Rheum Dis 2005 ;64:594-8.
5. Ashkenazi S, Levy I, Kazaronovski V, Samra Z. Growing antimicrobial resistance of Shigella isolates. J Antimicrob Chemother 2003 ;51:427-9.
6. Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of Shigella effectors. Nat Rev Microbiol 2008;6:11-6.
7. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 2002;295:1487.

8. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
9. Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2016;82:1881-8.
10. Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* 2004;42:5849-53.
11. Nguyen TV, Le PV, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:816-9.
12. Kosek M, Yori PP, Pan WK, Olortegui MP, Gilman RH, Perez J, et al. Epidemiology of highly endemic multiply antibiotic-resistant shigellosis in children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics* 2008;122:e541-9.
13. Fuller R. Probiotics: the scientific basis. Springer Science & Business Media; 2012. [eBook]
14. Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FC, Velloso MDS, Fuchs BB, et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling* 2018;34:212-225.
15. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2008;35:897-905.
16. Rostamzad A. Molecular epidemiology of *Shigella sonnei* isolated from clinical cases in Tehran using RAPD-PCR method. *Glob Adv Res J Med Sci* 2015;4:207-12.
17. Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The Inhibition Effect of *Lactobacilli* Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018;10:34-42.
18. ien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:1228-37.
19. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 2008;46:58-61;144-51.
20. Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int dairy J* 1999;9:53-61.
21. Xu D, Zhang W, Zhang B, Liao C, Shao Y. Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. *PeerJ* 2016;4:e2178.
22. Alamdary SZ, Bakhshi B, Soudi S. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* interaction with intestinal epithelial cells: A comparison between invasive and non-invasive bacteria. *PLoS One* 2018;13:e0196941.