Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 34, No. 2, Summer 2024 **ORIGINAL ARTICLE**

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

***Moseib Gol Mohammadi*[1], *Mahnaz Mohammadi*[2]**
[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*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]

[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

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@iiau.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

Original Article

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی اثر همکشتی لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک روده‌ای برروی میزان تولید بیوفیلم در شیگلا تایفی

مصیب گل محمدی[۱] ، مهناز محمدی[۲]

[۱] کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی ، 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 ازعوامل 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 فاکتور های سطحی مربوط به بقا و بیوفیلم 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. نمونه ها به صورت کشت های تازه در محیط های کشت تهیه شد سپس میزان تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتارم 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 اتصالی و بیوفیلم 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 اتصالی 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، بیوفیلم، پروبیوتیک.*

مقدمه

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 درمان های اولیه پزشکی در دسترس نباشد، معمولا خود محدود شونده است. این بیماری در کشورهای در حال توسعه، در بین کودکان شایع است و اکثرا در مهد کودک‌ها، زندان‌ها، پادگان‌ها وجود دارد (۲).

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

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

آدرس نویسنده مسئول: اسلامشهر، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر ، مهناز محمدی (**email**: m-mohamadi@iiau.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-3376-2162
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۱۴

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

روده انسان تکثیر پیدا می‌کند و موجب آسیب به بافت روده انسان شده، در نتیجه منتهی به اسهال خونی می‌گردد (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 کولون می‌شود و حجم مدفوع تغییر می‌کند و در نتیجه بیماربه صورت متناوب دچار اسهال خونی و مخاطی می‌شود.
شیوع عفونت‌های شیگلایی به دلیل دوز پایین بیماری‌زایی 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 می‌شود (۴).
در دهه ۱۹۸۰ مطالعات انجام شده توسط Sansonetti و همکارانش بیانگر وابستگی قدرت تهاجمی شیگلا به یک پلاسمید ویرولانس ۲۱۰-۲۳۰kb به نام Invasion plasmid (pINV) بود؛ در پی انتقال این پلاسمید به ایشریشیا کلی K12 باعث تغییر ژنومی اشریشیا کلی به شیگلا شد و جدایه‌های 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 بیماری‌زایی نقش دارند. پلاسمید ویرولانس در تمامی جدایه‌های شیگلا مشاهده شده است. و همه ژن‌های مورد نیاز برای ورود به سلول‌های میزبان در ناحیه ۳۲ کیلو بازی یافت شده است. این ژن‌ها یک سیستم ترشحی نوع ۳ را کد می‌کنند. این سیستم مانند یک سوزن عمل کرده و پروتئین‌های افکتور را از سیتوپلاسم باکتری به سلول میزبان منتقل می‌کند. پروتئین‌های افکتور شکل گیری یک رافل غشایی غنی از اکتین بر روی غشا سلولی میزبان را وساطت می‌کنند. باکتری توسط مکانیسمی شبیه به فاگوسیتوزیس وارد سلول میزبان می‌شود. ژن‌های mxi و spa سیستم ترشحی نوع ۳ را کد می‌کنند که محصولات ژن ipa یعنی پروتئین‌های Ipa را وارد سلول میزبان می‌کند. ژن‌های دیگر نیز در نقاط مختلف پلاسمید ویرولانس 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 ویرولانس در باکتری‌های گرم منفی توانایی تولید بیوفیلم است. بیوفیلم جمعیتی از سلول‌های باکتری هست که در ابتدا با نیروی واندروالسی به طور سست به سطوح بی‌جان یا، بافت زنده متصل می‌شود و سپس با تولید پلی‌مرهای خارج سلولی و ایجاد ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی موجب اتصال برگشت ناپذیر سلول‌ها به سطوح می‌شوند. توسعه بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی شده و می‌تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه شود. در محیط‌های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می‌شوند (۷). بیوفیلم تولید شده بطور اولیه سبب محافظت باکتری از سیستم ایمنی بدن میزبان یعنی جلوگیری از فاگوسیته شدن باکتری توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌شود. همچنین بیوفیلم مانع از ورود آنتی بیوتیک ها به محیط باکتری‌هایی که درون بیوفیلم قرار گرفته‌اند می‌شود بدین طریق جدای از کسب ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری تولید کننده بیوفیلم مانع از ورود مستقیم آنتی بیوتیک به محیط اطراف باکتری می‌شود و عدم کارایی آنتی بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌ها می‌شود.
در واقع تولید بیوفیلم سبب مزمن شدن بیماری می‌شود. تولید بیوفیلم در افرادی که دارای اعضای مصنوعی پروستتیک، شنت های مغزی نخاعی، کاتتر و یا اجسام خارجی دیگر هستند سبب چسبیده وکلونیزه شدن باکتری بروی سطوح و به عنوان یکی از عوامل کمک کننده ایجاد بیماری در فرد می‌شود. امروزه مشخص شده که این باکتری قدرت تشکیل بیوفیلم بروی سطوح دارد. افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در کنار بیماری‌زایی در عفونت‌های بیمارستانی و ایجاد بیوفیلم 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 می‌تواند باعث مهار رشد باکتری شیگلا و همچنین کاهش بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای اتصال و تولید بیوفیلم 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 تست‌های لازم برای جهت تست مقاومت به اسید، صورت گرفت. نمونه‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت بی هوازی انکوبه گردید. شناسایی مورفولوژیکی باکتری با استفاده از تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه و رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۴/۶و ۵ درصد حجمی- وزنی کلریدسدیم در

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

محیط کشت MRS مایع) انجام پذیرفت و در نهایت با 16srRNA PCRصحت 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 بیوشیمیای برای تایید آن انجام شد.

روش‌های ژنوتیپی تشخیص حضور ژنهای تولید کننده بیوفیلم

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 درآب 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 ازکلنی 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 سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا کاملا خشک شود. سپس رنگ آمیزی با رنگ کریستال ویوله 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 چاهک‌ها افزوده و جذب نوری را در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت گرفت. سویه‌هایی که متوسط جذب نوری آنها بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (TSB حاوی ۱٪ گلوکز) باشد از نظر تولید بیوفیلم به عنوان مثبت در نظرگرفته شد.

تفسیر آزمون

نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم (غیر چسبنده)، نمونه-های با OD بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه‌های با OD بین ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان بیوفیلم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه های با OD بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 می‌گردد. روش کار به این صورت انجام گرفت که به تعداد سویه‌های مورد مطالعه (۲۰ سویه) لوله آزمایش برداشته و در آنها مقداری سرم فیزیولوژی ریخته شد. با سواپ 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 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 درنظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن میکروپلیت‌ها، از روی ۳ چاهک مربوط برداشته و در ویالهای 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 غلظت‌های مختلف پروبیوتیک بر باکتری *شیگلا*، روش رنگ‌آمیزی تست بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 تجهیزآزما انجام شد.

سنجش کمیت و خلوص RNAهای استخراج شده

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

جدول ۱. توالی پرایمر ژن های BSSS و۲ OSPE و ۱۶srRNA

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

جدول ۲. تست نرمالیتی داده‌های 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 ۱vs.dos ۲	-۰/۹۰۲۶	۰/۵۷۹۶تا -۲/۳۸۵	No	Ns	۰/۲۸۱۵	A-B
Dos ۱vs.dos ۳	-۲/۸۲۸	-۱/۳۴۶ تا -۴/۳۱۰	Yes	**	۰/۰۰۱۳	A-C
Dos ۱vs.control	-۱۸/۵۰	-۱۷/۰۲ تا -۱۹/۹۸	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	A-D
Dos ۲vs.dos ۳	-۱/۹۲۵	-۰/۴۴۳۱ تا -۳/۴۰۷	Yes	*	۰/۰۱۳۵	B-C
Dos ۲vs.control	-۱۷/۶۰	-۱۶/۱۱ تا -۱۹/۰۸	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	B-D
Dos ۳vs.control	-۱۵/۶۷	-۱۴/۱۹ تا -۱۷/۱۵	Yes	****	<۰/۰۰۰۱	C-D

بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده بـه وسـیله دسـتگاه نانو دراپ سنجیده شد. این دستگاه آلودگی نمونه به پروتئین را بـا اندازه گیری نسبت جذب نوری RNA در طول موجهـای ۲۶۰ بـه ۲۸۰ نانومتر مشخص می کند. آلودگی با موادی مانند فنل و دیگر ترکیباتی که در هنگام استخراج RNA مـورد اسـتفاده قـرار مـی-گیرند نیز با سنجش نسبت جذب نـوری در طـول مـوج ۲۶۰ بـه ۲۳۰ صورت می گیرد. نمونه های دارای نسبت جذب نـوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تـا ۲/۲ و نسـبت جـذب نـوری ۲۶۰ بـه ۲۳۰ نانومتر بین ۱/۷ تا ۱/۹ جهت سنتز cDNA مناسب هستند.

تهیه cDNA از RNA استخراج شده

ساخت cDNA از RNAهای استخراج شـده، بـا اسـتفاده از کیـت سنتز cDNA با Cat No: YT4500، از شرکت یکتا تجهیز آزما بـه صورت زیر انجام شد.

انجام Real-time PCR و بررسـی بیـان ژن هـای BSSS و۲ OSPE

برای انجام واکنش Real-time PCR از دستگاه qiagen مدل rotor gen 6000 به منظـور بررسـی بیـان ژن هـای BSSS و *16srRNA* OSPE 2 پس از اثردهی پروبیوتیـک بـر بیـوفیلم بـاکتری *شـیگلا* استفاده شد. در این واکنش از کیت آزمایشـگاهی SYBR Green qPCR MasterMix 2X، بـا Cat No: YT2551 از شـرکت یکتـا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا توالی پرایمر این ژن ها به کمک نـرم افزار Gene Runner طراحی شدند (جدول ۱). لازم به ذکـر اسـت که در این مطالعه از *16srRNA* به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

آنالیز آماری نتایج

با توجه به نوع داده‌ها و همچنین با توجه به نرمـال بـودن داده‌هـا بـرای آنـالیز داده هـا از تسـت Ordinary one-way ANOVA استفاده شد و در تست تعقیبی از تست Tukey's استفاده شد.

یافته‌ها

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

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

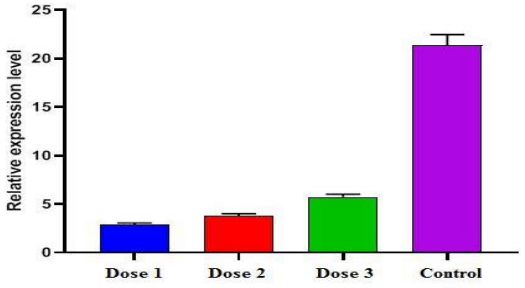
جدول ۵. تست Ordinary one-way ANOVA داده های بیان ژن OSPE2

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

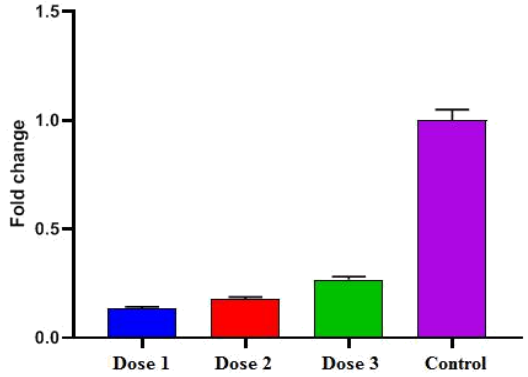
آزمون کمّی تولید بیوفیلم برای هر نمونه سه بار تکرار شد و در مرحله آخر جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader (BITEC) قرائت شد. جدایه‌هایی که جذب نوری آنها در این طول موج بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (محیط TSB و MRS حاوی ۱ ٪ گلوکز بود، از نظر تولید بیوفیلم مثبت در نظر گرفته شد. نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم (غیر چسبنده)، نمونه‌های با OD بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه‌های با OD بین ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان بیوفیلم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه‌های با OD بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی شدند. در این آزمایش تعداد جدایه *شیگلا* مورد ارزیابی قرار گرفت که تولید کننده ضعیف بیوفیلم 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 RNAهای استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد.

نتایج بررسی بیان ژن *۱۶srRNA* 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 (نمودارهای۱ تا ۴). با توجه به نوع داده‌ها و همچنین با توجه به نرمال بودن داده ها برای آنالیز داده‌ها از تست Ordinary one-way ANOVA استفاده شد و در تست تعقیبی از تست Tukey's استفاده شد (جدول‌های ۲ تا ۵).

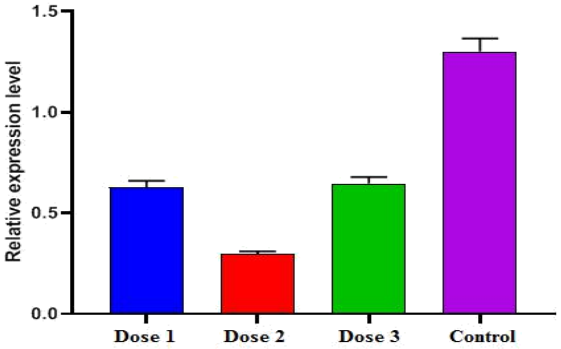
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]



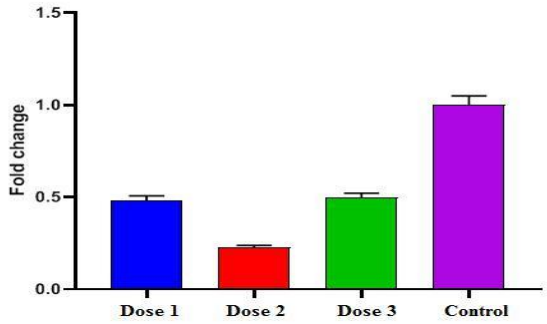
نمودار ۱. بیان ژن نسبی relative expression level



نمودار ۲. بیان ژن نسبی Fold chang



نمودار ۳. بیان ژن نسبی relative eXpression level



نمودار ۴. بیان ژن نسبی Fold change

بحث

بیماری‌های اسهالی باکتریایی جزو بزرگ‌ترین مشکلات بهداشت عمومی هستند. بر اساس برآورد WHO سالانه ۵/۴ بیلیون نفر در جهان مبتلا به بیماری‌های اسهالی می‌شوند که در سال ۲۰۰۲ از این تعداد ۸/۱ میلیون مورد مرگ گزارش گردیده است و تقریبا ۹۹درصد این موارد در کشورهای در حال توسعه بوده است. در میان پاتوژن‌های باکتریایی گونه‌های جنس شیگلا معمول‌ترین و مهم‌ترین ایزوله‌های جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال هستند؛ ۵ تا ۱۵ درصد تمامی موارد اسهال در سراسر جهان با عفونت‌های شیگلایی مرتبط هستند که از این میان ۱/۱ میلیون مورد مرگ را شامل می‌شوند؛ دو سوم تمام این مرگ و میرها درکودکان زیر ۵ سال رخ می-دهند. از درمان‌های بسیار متداول این عفونت‌ها تجویز آنتی بیوتیک است (۱۰،۱۱). با توجه به استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها و افزایش شیوع مقاومت در کشور، شکست‌های درمانی برای بیماران و متخصصین بسیار هزینه‌بر و دردسر ساز است. با استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌توان بسیاری از درمان‌های آنتی بیوتیکی را متوقف کرد و در طولانی مدت با تغییر سبک تغذیه‌ای می‌توان از ایجاد و پیشرفت این عفونت های روده‌ای به خصوص شیگلوزیس جلوگیری کرد. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مهاری لاکتوباسیلوس پلانتاریوم بر روی میزان تولید بیوفیلم در شیگلا بود تا بتوان با انجام مطالعات در سطح گسترده‌تر، روش‌های درمانی جایگزین آنتی‌بیوتیک تراپی را برای کمک به بخش درمانی مشخص کرد (۱۲،۱۳).

گونه‌ها مختلفی از باکتری به عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند که شایع‌ترین آنها مربوط به گونه لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم هستند. امروزه مزیت کاربرد پروبیوتیک‌ها در بیماری‌های سیستمیک، به ویژه دستگاه گوارش باعث مهار باکتری‌های مضر روده شده و التهاب روده را کاهش و همچنین باعث تعدیل فلورمیکروبی روده می‌شوند (۱۴،۱۵). با توجه به شیوع بالای این باکتری و افزایش مقاومت انتی بیوتیکی آن نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در بالین، درمان‌های حمایتی می‌توانند بسیار کمک کننده باشند. استفاده از پروبیوتیک‌ها یکی از راهکارهای جدید برای درمان‌های حمایتی و حتی استفاده به عنوان درمان جایگزین در بسیاری از انواع بیماری‌ها است. برای مثال در مطالعه‌ای که شکری و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در ایران انجام دادند، نشان دادند که سوش‌های پروبیوتیک که از لبنیات جداسازی شده است می‌تواند اثر ضد بیوفیلمی و ضد باکتریایی علیه سویه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا داشته باشد. همچنین آنها نشان دادند که بعد از همکشتی باکتری با پروبیوتیک‌ها

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

هیچ باکتریوسینی تولید نشد و بیوفیلم تشکیل شده تحمل کمی در برابر تغییرات pH داشت (۱۶،۱۷). همچنین در دیگر مطالعه ای که تیئن و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در فرانسه بر روی سلول‌های اپی تلیال آلوده شده با شیگلا که با لاکتوباسیلوس کازئی 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 Xu ۲۰۱۶ 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 اپیتیال می‌تواند بیشتر رخ دهد که در واقع در ساعات ۱۲ الی ۲۴ ساعت بعد از آلوده شدن فرد به باکتری می باشد. 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 فاکتور های اتصالی را به شکل معنی‌داری کاهش دهند (۲۱). در مطالعه‌ای که علمداری و همکارانش در سال ۲۰۱۸ بر روی تاثیر مهاری لاکتو باسیلوس‌ها بر روی ویبریوکلرا و شیگلا انجام دادند نشان دادند که همکشتی 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 می-توانند 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 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 احتمالا 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 می نماییم.

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]

[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-01-31]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.6.7]

[DOI: 10.61186/iau.34.2.146]