بررسی مولکولی اثر پروبیوتیک بر ژن papG در سویه‌های مختلف E. coli جدا شده از عفونت ادراری

رومینا رضایی[۱]، **رودابه بهزادی اندوهجردی*[۲]**، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی[۳]

[۱]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه ژنتیک، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳]گروه میکروبیولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲

چکیده

عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشرشیاکلی یکی از شایع ترین عفونت‌های اکتسابی در ایران است. در مطالعه‌ی حاضر با توجه به این فرضیه که ژن ویرولانس *papG* در این ارگانیسم عامل مهمی در پاتوژنیسیته و بویژه اتصال به سلول‌های اپیتلیال می‌باشد ، لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان دسته‌ای از پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در بدن دارند و در برخی موارد درمانی، مفید هستند. هدف از این مطالعه، بررسی مولکولی فعالیت *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 برروی انواع سویه‌های *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* جداسازی شده با روش PCR از عفونت ادراری می‌باشد. سویه مورد نظر *E. coli* از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شده و با تست‌های افتراقی شناسایی شده است. سویه مورد نظر *papG* با روش PCR بررسی شد، سپس گونه‌هایی با ژنوتایپ‌های مثبت، جداسازی شده و اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* به روش رقت‌سازی و انتشار دیسک در محیط مایع، بررسی شد. اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* در باکتری اشرشیاکلی در آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بررسی شد که از ۴۰ نمونه باکتری جدا شده از ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری گرفته شده است. همچنین، نتایج تست آنتی‌بیوتیکی از رقت ۱تا ۱۰ به‌صورت هاله عدم رشد با ابعاد 9 cm مشاهده شد. این نتایج نشان داده که باکتری جدا شده به آنتی‌بیوتیک مورد نظر مقاوم نشده و درمان آنتی بیوتیکی در مورد این سویه جواب میدهد .همچنین پروبیوتیک بکار رفته، دارای نقش درمانی بوده و باعث بهبود عفونت ادراری می‌شود.

واژگان کلیدی: آمپی‌سیلین، اشرشیاکلی *(E.coli)* ، پروبیوتیک، ژن ویرولانس *papG*، عفونت دستگاه ادراری، *لاکتوباسیلوس کازئی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یوروپاتوژنیک

* rahabehzadi@yahoo.com

مقدمه

اشرشیاکلی[۲] به‌طور اختصار *E. Coli*، نوعی باکتری گرم منفی غیرهوازی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در جانوران خونگرم و خونسرد وجود دارد. بیشتر سویه‌های اشرشیاکلی بی‌ضرر هستند(۱).باکتری *Escherichia coli* جزئی از فلور طبیعی روده است، اما برخی مواقع این باکتری با تهاجم به سایر بافت‌ها، ایجاد بیماری می‌کند(۲). برخی از سروتیپ‌ها مانند O157: H7 موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند. اشرشیاکلی مهم ترین عامل عفونت دستگاه ادراری می‌باشد که حدود ۹۰ ٪ عفونت‌های ادراری در زنان جوان را به خود اختصاص می دهد(۳). عفونت مجاری ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت های باکتریایی است و دومین عفونت شایع باکتریایی است و از علل عمده مراجعه بیماران به بیمارستان ها می‌باشد. به طوری‌که سالیانه در آمریکا ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت ادراری مبتلا و سالیانه ۶ میلیون دلار صرف درمان آن شده است(۴). با توجه به مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در مقابل داروهای آنتی‌بیوتیکی یکی از راه‌های درمانی آن‌ها غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها است(۵). بررسی فعالیت پروبیوتیک برگونه‌های باکتری به‌خصوص در عفونت ادراری مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته است و استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده (پروبیوتیک) جایگزینی امیدوار کننده برای پیشگیری و درمان عفونت‌های مکرر دستگاه ادراری می‌باشد (۴).

با توجه به طیف وسیع باکتری‌ها یکی از دغدغه‌های بیولوژیست‌ها و میکروبیولوژیست‌ها یافتن نوع مفید و بی‌ضرر باکتری‌ها و شناسایی نوع بیماری‌زا و مفید آن است که یکی از اهداف اصلی این پژوهش نیز می‌باشد. در این پژوهش با انجام تحقیق در باکتری اشرشیاکلی با استفاده از ژن مورد نظر(*papG*) میزان بیماری‌زا بودن آن بررسی شده است(۲). هدف اصلی در این تحقیق دست‌یابی به درمان عفونت‌های ادراری ناشی از *E.coli* و گونه‌های مقاوم آن به آنتی‌بیوتیک ها است (۶).پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که طی مصرف توسط میزبان، اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. امروزه به‌دلیل شیوع سویه‌های مقاوم در بین عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری، محققین به‌دنبال راه جایگزین و موثرتری هستند. یکی از این راه‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان برخی عفونت‌ها است(۷). بنابراین، شناسایی دقیق اثرات و رفتار آن‌ها در راستای ارتقاء سلامت جامعه بسیار ارزشمند می‌باشد. بیش از یک میلیون نفر، از بیماری التهابی روده، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون رنج می‌برند. با توجه به وجود گونه‌های مختلف غیربیماری‌زا و بیماری‌زای باکتری اشرشیاکلی.در جانوران به‌خصوص در انسان، تحقیقات زیادی توسط محققان حوزه پزشکی و دارویی در مورد این باکتری انجام شده است و یافتن نوع مفید و بی‌ضرر و شناسایی نوع بیماری زا و مضر آن یکی از دغدغه‌های اصلی دانشمندان در سال های اخیر می‌باشد. این مسئله با روش‌های مختلف تشخیص و شناسایی بیولوژی گونه‌های مختلف از جمله روش‌های کشت سلولی و روش‌های تشخیص توالی ژنوم بررسی شده است(۸-۶). تحقیقات گسترده‌ای در یافتن تمایز گونه‌های این باکتری و نوع فعالیت آنها انجام شده است. اما بررسی فعالیت پروبیوتیک گونه‌های مختلف باکتری در درمان عفونت‌ها به‌خصوص عفونت ادراری کمتر مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است (۶). با توجه به گستره وسیع این باکتری در این زمینه به بررسی مولکولی فعالیت پربیوتیک بر روی سویه پاتوژن جداشده با روش PCR از عفونت‌های ادراری و کشت سلولی پرداخته شده است (۳).

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.CTB.REC.1401.017 می باشد. برای مطالعه حاضر، ۴۰ نمونه‌ی ادراری از آزمایشگاه بیمارستان ناجا امام سجاد(ع) بخش میکروبیولوژی جمع‌آوری شد. سپس کلونی‌های باکتریایی جمع‌آوری شده از نظر ویژگی‌های فنوتیپی کلونی (رنگ کلونی، شکل کلنی و...) ارزیابی شدند و باسیل‌های گرم منفی با کلونی‌های صورتی رنگ در محیط کشت مکانکی آگار (باکتری‌های غیر تخمیری در این محیط بی‌رنگ می باشند) و نیز کلونی‌هایی که دارای جلای

[2] *Escherichia coli*

فلزی[3] در محیط EMB بودند، به‌عنوان سویه‌های یوروپاتوژن[4] *E. Coli* انتخاب شدند. برای حصول اطمینان از صحت انتخاب کلونی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی ذیل در مورد هر یک از کلونی‌های مورد نظر به‌صورت جداگانه انجام شدند:

۱) کشت کلونی‌ها در محیط TSI برای تست باکتری از نظر تخمیر قندها (گلوکز، لاکتوز، سوکروز)، تولید H2S و تولید گاز

۲) تست مصرف سیترات در محیط سیمون سیترات

۳) تست تحرک باکتری (Motility) در محیط SIM

۴) تست اندول با استفاده از معرف کواکس

۵) تست متیل رد (MR) و تست ووگز- پروسکوئر (VP)

۶) تست اوره آز

در نهایت تعداد ۴۰ ایزولهٔ یوروپاتوژن *E. coli* که واکنش مربوط به آن‌ها در مورد هر یک از تست‌های مذکور به شرح زیر بودند (جدول ۱)، به‌عنوان سوش‌های یوروپاتوژن *E. coli* انتخاب شده و برای انجام تحقیقات بعدی نگهداری شدند. نگهداری ایزوله‌های بالینی *E. coli* به این صورت انجام شده که ابتدا مقادیر مناسب و کافی از کلونی‌های باکتریایی را در کنار شعله و با استفاده از آنس استریل برداشته شد. سپس، در محیط نگهدارنده TSB، تلقیح شدند. این محیط‌ها قادرند رشد سوش‌ها را به مدت طولانی تأمین کنند. بعد از تلقیح باکتری به نسبت ۱۵٪ گلیسرول به محیط اضافه شد و نمونه‌ها به فریزر ۷۰ °C- انتقال داده شد. نمونه ادراری روی محیط کشت EMB (آگار) کشت خطی داده و در لوله‌های افتراقی ریخته شد تا با بررسی جلاء فلزی به وجود *E. coli* پی برده شود. سپس روی پلیت‌های آماده شده از نمونه‌ها (۴۰ عدد) روی پلیت‌ها، کشت خطی داده شد. پس از کشت، نمونه‌ها به انکوباتور منتقل شد و ۲۴ h زمان برای تشکیل کلنی‌ها داده شد. پس از ۲۴ h از انکوباتور خارج شد و به یخچال غیر استریل منتقل شد.

جدول ۱. تست‌های تشخیصی باکتری

تست TSI	اسید/اسید
تولید گاز	+/--
H2S	--
مصرف سیترات	--
تحرک باکتری	+/--
اندول	+
متیل رد	+
وژز پروسکوئر	-
اوره آز	-

[3] Methalic Sheen

[4] Escherichia coli europathogenI

در ادامه کارمحیط کشت مایع ساخته شد و کلنی‌های تشکیل شده روی محیط کشت جامد در محیط کشت مایع هینتون براث کشت داده شد. ابتدا gr ۳/۳۹ محیط کشت هینتون براث به عنوان محیط کشت مغذی وزن شد و در cc ۳۰ آب مقطر حل شد. مقدار cc ۵ از این محلول در فالکون ۱۵ ریخته شد و گرم‌خانه گذاری شد. پس از h ۲۴ به شیک انکواتور منتقل و h ۲۴ نیز در آنجا گرم‌خانه گذاری شد. در مرحله‌ی بعد استخراج DNA انجام شد است. پس از استخراج DNA، برای انجام PCR طراحی پرایمر اختصاصی انجام شد. طراحی پرایمر نامناسب می‌تواند منجر به عدم تکثیر قطعه مورد نظر درPCR، تولید کم محصول PCR و یا از سوی دیگر منجر به تولید غیر اختصاصی محصولات PCR شود. در این پژوهش برای طراحی پرایمر ابتدا توالی ژن مورد مطالعه به فرمت FASTA از بانک‌های توالی اسیدنوکلئیک به‌دست آمد. تمامی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از نرم افزار Gene runner طراحی شده است. برای تخصیص دادن پرایمرهای طراحی شده، توالی فوق در پایگاه اطلاعاتی NCBI، BLAST، بررسی شده و میزان همپوشانی و واکنش متقاطع سایر ژن‌ها و ارگانیسم‌ها بررسی شد. سپس سنتز پرایمر به شرکت پیشگام سفارش داده شد. مخلوط واکنش شامل پرایمر (Forward و Revers) ، آب دوبار تقطیر(DDW) ، Master Mix و در نهایت DNA هدف اضافه شد و برای انجام مراحل کار نمونه های مورد نظر به همراه کنترل های مثبت و منفی گذاشته شد. برای انجام مراحل کار در هر میکروتیوب µl ۱۲/۵ از Master Mix، µl ۰/۵ از هر کدام از پرایمرهای Reverse و Forward و µl ۲ DNA نمونهٔ(Template) مورد نظر وارد شد. لازم به ذکر است که در هر سری از تست‌های PCR، نمونه های مورد نظر به علاوه کنترل مثبت و کنترل منفی (جهت اطمینان از نبود آلودگی درتست) به همراه نمونه‌های مجهول PCR داده شد. سپس، مخلوط PCR حاوی DNAهای مجهول و DNAهای کنترل، در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. این مقادیر به گونه‌ای مخلوط شده‌اند تا به حجم مورد نظر رسیدند. پس از تهیه بافر، مقدار ml ۵۰، داخل ارلن ریخته شده و روی هیتر قرار داده شد. بعد از تهیه بافر، ابتدا gr ۱ پودر آگارز وزن شده و سپس µl ۴۰ (مایکرولیتر) بافر TBE 1X در ارلن اندازه‌گیری شد. در ادامه کار پودر آگارز و بافر درون بشر ریخته شد و روی هیتر قرار داده شد. ارلن از روی شعله برداشته شده و سپس به دمای حدود °C ۴۵-۴۰ رسید. سپس به مقدار µl 1 به آن Safe Stain اضافه شد. سپس دو طرف Tray (سینی مخصوص ژل) با قالب‌های کناری مخصوص بسته شد و شانه‌ها در محل مخصوص خود قرار داده شد. (شانه حدود mm ۱ از سطح Tray بالاتر است) و ژل به آرامی و با دقت داخل سینی مخصوص ریخته شد به طوری که حبابی تشکیل نشود، و ژل به‌طور یکنواخت (با ضخامت حدود mm ۴) در سطح Tray پخش شد. سینی را به همراه ژل در داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد. مقدار µl ۷ و µl ۱ بافر مخصوص را با هم مخلوط کرده و به آرامی و با دقت در داخل چاهک‌های ژل آگارز تزریق شد. دستگاه را در ولتاژ ۸۵ تنظیم نموده بعد از گذشت min ۴۵ و رسیدن نمونه‌ها به نزدیکی چاهک دوم جریان الکتریسیته قطع شد و ژل برداشته شد. سپس، ژل با استفاده از نور UV دستگاه ترانس لومیناتور باندهای DNA بررسی شد.در چاهک اول هم مارک قرار داده شد.

سوش *لاکتوباسیلوس کازئی* از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از تهیه محیط‌کشت MRS براث طبق دستورالعمل شرکت سازنده، باکتری مورد نظر در ml ۲۰ محیط کشت MRS مایع تلقیح شد. سپس به مدت h ۴۸ در شرایط بی‌هوازی و در دمای °C ۳۷ قرار گرفت. پس از رشد کامل باکتری، محیط‌کشت با دور rpm ۱۰۵ به مدت min ۲ سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت به‌دست آمده جمع‌آوری شد. برای اطمینان از عدم حضور باکتری در سوپرناتانت، از فیلتر سر سرنگی µm ۰/۲۴ استفاده شد و سوپرناتانت از این فیلتر عبور داده شد.

در ابتدا از باکتری‌های موردنظر(Double Positive- Double Negative) در محیط‌کشت مولر هینتون براث کشت تازه تهیه شد. سپس مقداری از هر باکتری در سرم فیزیولوژی استریل حل شد تا کدورتی برابر با 0.1 .OD= تهیه شود که برابر با نیم مک فارلند است. از سوی دیگر، رقت های مختلفی از سوپرناتانت (۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۲/۵و ۱۰ ٪) با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث در حجم ml ۱ تهیه

شد. در انتها به هر یک از نمونه‌ها حجمی از باکتری موجود در سرم فیزیولوژی اضافه شد که میزان باکتری‌ها برابر با 10^5 باکتری در ml بود و در دمای 37 °C قرار داده شدند. همچنین یک گروه کنترل مثبت (محیط کشت به همراه باکتری) و یک گروه کنترل منفی (محیط کشت و ماده مورد تست) در نظر گرفته شد. بعد از 24 h کدورت باکتری‌ها بررسی شد و نمونه‌هایی که در آن کدورت رشد باکتری مشاهده نشد برای تعیین MIC ثبت شد. سنجش تاثیر مواد بر روی رشد باکتری ها یکی از مهمترین آزمون‌های میکروبیولوژی می‌باشد.

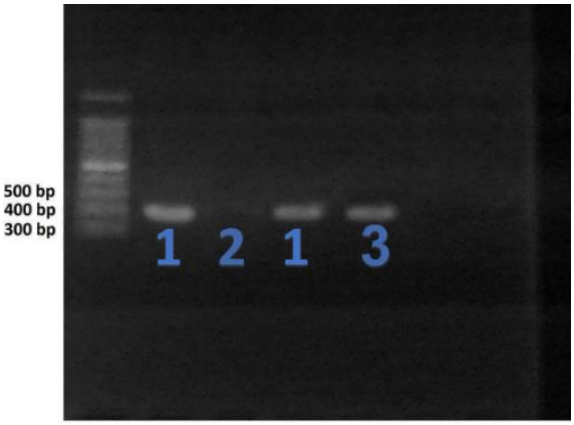
تاثیرات، ممانعت از رشد باکتری‌ها، تاثیر آنتی‌باکتریال نامیده می‌شود که به‌طور عمده این تاثیر در داروهای آنتی بیوتیک مشاهده شده است. از آزمون‌های آنتی‌بیوگرام برای بررسی اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها، به صورت روتین در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی استفاده می‌شود تا اثر بخش ترین آنتی‌بیوتیک برای باکتری انتخاب شود. آنالیز آنتی بیوگرام یا آنتی‌باکتریال، مطالعه میزان اثربخشی آنتی‌بیوتیک ها یا سایر ترکیبات ضدمیکروبی برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها است. این توانایی را می‌توان با استفاده از روش‌های رقت‌سازی در لوله یا کشت میکروارگانیسم در پلیت مطالعه کرد. مبانی آنتی باکتریال بر پایه دو اصطلاح میکروب شناسی MIC و MBC می‌باشد: منظور از MI ، غلظتی از یک آنتی‌باکتریال است که می‌تواند رشد باکتری را در محیط آزمایشگاهی مهار کند. اصطلاح MBC ، حداقل غلظتی از دارو است که باکتری‌ها را از بین می‌برد. در این مرحله، حساسیت میکروبی هر یک از ایزوله‌های بالینی اشرشیاکلی نسبت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ارزیابی شده است. پس از تهیه سوپرناتانت کشت ۴۸ ساعته باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، 40 µl از رقت‌های (۱ ، ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸) از سوپرناتانت به دیسک‌های مخصوص آنتی‌بیوگرام خالی اضافه شد. همچنین یک دیسک آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت 4 µg در دیسک تهیه شد و این دیسک به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس، در محیط کشت مولر هینتون آگار از باکتری تازه کشت داده شده (با کدورت OD= 0.1 در سرم فیزیولوژی استریل) با سوآپ استریل به‌صورت انبوه کشت داده شد. سپس دیسک‌های آغشته به نمونه مورد آزمایش و آمپی‌سیلین با فاصله‌های مناسب در محیط آگار قرار داده شدند و به مدت 24 h در انکوباتورر 37 °C انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شد. در مورد تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، وجود و یا عدم وجود ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از مبتلایان به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد (ع) ناجا بخش میکروبیولوژی و اثر پروبیوتیک بر روی باکتریهای ایزوله شده از آزمون‌های آماری استفاده شد.. برای ارزیابی‌های آماری از test-t نرم‌افزار Pism Graphpad نسخه ۶ استفاده شد و تمامی داده‌ها به‌صورت دو به دو با یکدیگر مقایسه شدند. در سویه بالینی و سویه استاندارد اشرشیاکلی، درحضور پادزیست (باکتری پروبیوتیک) نسبت به عدم حضور پادزیست قطر هاله عدم رشد معنی‌داری مشاهده شد. این موضوع در حالی می باشد که تفاوت معنی‌داری در میان تمامی سویه‌های بالینی در مقایسه با سویه استاندارد مشاهده نشد و این تفاوت تنها در میان چندسویه بالینی نسبت به گروه استاندارد مشاهده شد که این موضوع می‌تواند با تفاوت‌های میان سویه‌های بالینی در برخی از ویژگی‌ها مرتبط باشد.

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام پرایمر	توالی (۵' به ۳')	اندازه (bp[1])
papG	F: CTACTATAGTTCATGCTCAGGTC	470 bp
	R: CTGACATCCTCCAACATTATCGA	

جدول ۳. اطلاعات مرتبط با بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه

جنسیت	مرد	۲۳ درصد
	زن	۷۷ درصد
وضعیت بیماران	مراجعه کننده دارای بیماری	۷۱ درصد
	مراجعه کننده بدون علائم بیماری	۲۹ درصد
سن بیماران	زیر ۴۰ سال	۳۷ درصد
	بالای ۴۰ سال	۶۳ درصد



شکل ۱. نتایج PCR: چاهک ۱، نمونه مثبت برای ژن *papG*؛ چاهک ۲، نمونه کنترل منفی؛ چاهک ۳ نمونه کنترل مثبت

نتایج

از اسفند ۱۳۹۹ تا بهمن ۱۴۰۰ تعداد ۴۰ ایزوله بررسی شده و از این تعداد، ۴۰ ایزوله *اشرشیاکلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی جدا شده است. نمونه‌گیری مستمر در طی چند ماه از آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد (ع) ناجا بخش میکروبیولوژی، بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه کننده انجام شده است (جدول ۳)

شناسایی باکتری

در این پژوهش از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) برای شناسایی حضور ژن‌های مورد نظر استفاده شده است. همچنین، از روش کشت سلولی نیز برای تایید نتایج استفاده شده است. توالی و مشخصات پرایمرها مورد نظر با استفاده از مقالات و متون علمی به‌دست آمده است و از آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شده است. با استفاده از DNA الگو و Master Mix پرایمرهای forward و reveres با کمک دستگاه PCR و با برنامه دمایی مناسب توالی مورد نظر تکثیر شده و سپس با روش الکتروفورز و ژل آگار به شناسایی آن‌ها پرداخته شده است.

از اطلاعات بانک ژنی NCBI نیز در صورت نیاز استفاده شده است.

نتایج آزمایش‌های مولکولی

وجود ژن *papG* در سویه‌های اشرشیا کلی با تکنیک PCR بررسی شد(شکل ۱). سوش استاندار E. coli(کنترل مثبت)ATCC25922 به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. نتایج PCR نشان داد که از ۴۰ سویه اشرشیاکلی ایزوله شده، ۸ سویه پس از PCR ژن *papG* در ژل آگارز باند واضح نشان داده‌اند.

نتایج آزمون کشت باکتری‌های پروبیوتیک

در آزمون کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، میانگین قطرهاله عدم رشد اشرشیاکلی یوروپاتوژن توسط *لاکتوباسیلوس کازئی*[1] mm ۹ بود ، اما بر روی شاهد mm ۱۹ بود. همچنین، اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* برروی اشرشیاکلی یوروپاتوژن در حالتی که از کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده، به مراتب کمتراز حالت مشابه در آنتی بیوگرام‌ها بوده است. در آزمون بررسی اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت، بررسی کدورت لوله‌ها در نمونه‌های یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی نشان داده است که میانگین حداقل غلظت مهارکننده رشد سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کمتر از ۹ است. اما این مقدار بر روی شاهد بیشتر از ۱۹ است. بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که در روش انتشار دیسک، اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها در سطح معناداری به رقت وابسته است. در رقت های بالاتر باکتری پروبیوتیک، قطر هاله عدم رشد کوچکتر شده است(جدول ۵).

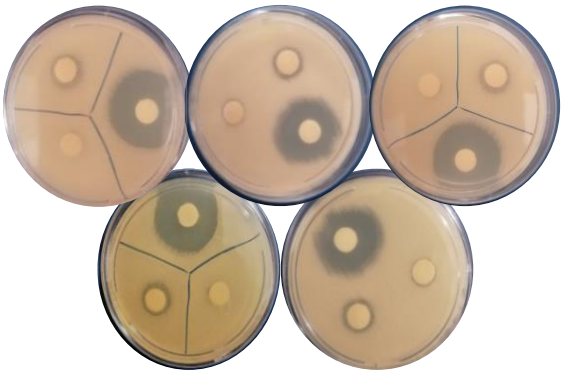
جدول ٤. درصد نتایج به‌دست آمده تست‌های MIC و MBC[2]

+	+	-	-
MIC	MBC	MIC	MBC
12.5%	25%	12.5%	20%
12.5%	25%	12.5%	20%
15%	20%	12.5%	25%
12.5%	25%	10%	25%
12.5%	25%	12.5%	25%

جدول ۵. قطر هاله عدم رشد به mm

نمونه	1	1/2	1/4	1/8	آمپی سیلین
1	10	5	0	0	20
2	9	6	0	0	20
3	9	0	0	0	18
4	9	0	0	0	19
5	9	0	0	0	19

[1] *Lactobacillus casei*



شکل ۲. نتایج فعالیت مهارکنندگی پروبیوتیک برروی سویه و هاله‌های عدم رشد

نتایج تست‌های MBC-MIC

در روش تست MIC-MBC که شامل رقت های مختلفی از سوپرناتانت (۲۵٪، ۲۰٪، ۱۵٪، ۱۲/۵٪ و ۱۰٪) تهیه شده از باکتری پروبیوتیک بودند، به صورت مستقیم از این رقت ها برای انجام تست استفاده شد و سویه لاکتوباسیلوس کازئی که با غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه شده بودند بعد از حدود ۲۴ ساعت انکوباسیون بررسی شدند (جدول ۴).

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی

گزارش تست دیسک دیفیوژن

همانطور که درشکل ۲ مشاهده می شود اثر مهاری با کتری E.coli بر روی ۵ نمونه جدا شده از بیمار به همراه یک دیسک آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت µg ۴ در دیسک تهیه شده و این دیسک به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

قطره هاله عدم رشد ایجاد شده به صورت جداگانه مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت که در رنج mm ۱۰-۰ گزارش شد. سپس قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شدند که در جدول ۵ قابل مشاهده است.

بحث ونتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه در مورد شیوع ژن‌های مورد نظر، این طور می‌توان نتیجه گرفت که شیوع این ژن‌ها در بین بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری بالا می‌باشد و روش PCR یک ابزار کارآمد برای تشخیص سریع و شناسایی عوامل بیماریزایی عفونت ادراری در اشرشیاکلی است. در عین حال در این مطالعه موثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله‌های مورد مطالعه ایمی پنم می‌باشد، اما در صورت تجویز بیش از حد، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز ممکن است رخ بدهد. عفونت دستگاه ادراری از نظر شیوع، پس از عفونت تنفسی، در مرتبه دوم قرار دارد از نظر مراجعین بزرگسال به پزشک، در مرتبه اول قرار دارد با توجه به سهولت ابتلای به عفونت ادراری و عوارض بسیار خطرناک آن از قبیل: نارسایی کلیه، عفونت خون، زایمان زودرس که در صورت عدم تشخیص و درمان ممکن است اتفاق بیفتد، اهمیت تشخیص و درمان عفونت ادراری، مشخص می‌شود. در بسیاری از امراض عفونی از جمله عفونت ادراری لازم است پزشک قبل از آغاز درمان به شناخت قطعی عامل عفونت و همچنین تعیین حساسیت عامل باکتریایی موجود به عوامل آنتی‌بیوتیکی، مبادرت نماید. هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن *papG* در سویه‌های اشرشیاکلی O157: H7 جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری در بیماران مراجعه کننده بوده است. به‌دلیل محدود بودن تعداد نمونه‌ها و محدودیت در اندازه‌گیری نمونه‌ها نمی توان از آن برای یک نتیجه‌گیری آماری وسیع استفاده کرد و همچنین با در نظر گرفتن عوارض و مرگ و میر ناشی از

باکتری‌های بیماری‌زا ، مخمرها و ویروس‌ها مردم اغلب نگران میکروب‌های عمومی هستند. با این وجود در حال حاضر مجموعه‌ای از شواهد نشان می‌دهد که باکتری پروبیوتیک می‌تواند به سلامت انسان کمک کند (۹). طبق تحقیقات انجام شده مکمل‌های غذایی ، مانند برخی از پروبیوتیک‌ها، به عنوان یک گزینه معتبر برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها ظاهر شده‌اند(۱۰). بنابراین تلاش زیادی برای یافتن آنتی‌بیوتیک‌های بی‌خطر و طبیعی مانند پروبیوتیک‌ها در حال انجام است (۱۱).در حال حاضر استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین مناسبی در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر آنتی بیوتیک و میکروارگانیسم‌هایی که سبب فساد مواد غذایی می‌شوند و در نظر گرفته شده است(۱۲). البته در برخی موارد عنوان شده است، فقط در صورتی که این محیط‌های کشت حاوی باکتری پروبیوتیک غلیظ باشند و یا در pH خاصی قرار داشته باشند، می‌توان اثر مهاری آن را مشاهده کرد (۱۳). فاکتورهایی مانند pH اثر زیادی بر اتصال پروبیوتیک در از بین بردن هاله رشد دارند (۱۴).

از این رو در پژوهش حاضر به بررسی اثر مهاری باکتری پروبیوتیک بر روی باکتری اشرشیاکلی و سویه‌های بالینی پرداخته شده است ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک مشکل در حال رشد در سراسر جهان گسترش یافته است. ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک، توانایی این باکتری‌ها برای مهار افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز مهار قدرت بیماری‌زایی آن‌ها است. باکتری‌های اسیدلاکتیک از قبیل جنس لاکتوباسیلوس، با تولید عامل‌های ضدمیکروبی و نیز به‌کارگیری مکانیسم‌های مختلف، دارای عملکرد بسیار موثری در این راستا هستند(۱۵). از دیگر باکتری‌های موثر بر روی عفونت ادراری ناشی از باکتری اشرشیاکلی میتوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و *لاکتوباسیلوس کازئی* را نام برد که قادرند با به دام انداختن و تجمع پذیری با باکتری اشرشیا کلی اوروپاتوژن سبب کاهش اتصال و مانع تشکیل بیوفیلم آن در شرایط آزمایشگاهی شوند (۱۶).

از بین عمده‌ترین باکتری‌های به‌دست آمده شامل اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر، سیتروباکتر، سودوموناس، استافیلوکوک‌ها، به نظر می‌رسد اکثر باکتری‌های جدا شده، فلور طبیعی بدن بودند و میزان فراوانی حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله کوتریموکسازول نشان دهنده‌ی این است که ۴۹ ٪ ، باکتری های ذکر شده به آن مقاوم شده‌اند که این مقاومت می‌تواند ذاتی یا اکتسابی باشد و همچنین سیپروفلوکساسین به عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک با درصد حساسیت ۸۲ ٪ در باکتری *E.coli* معرفی کرد که این آنتی‌بیوتیک‌ها هنوز هم نقش بسزایی در درمان عفونت‌ها دارند (۱۷). در دهه گذشته مطالعات زیادی در مناطق مختلف دنیا برروی جداسازی و بررسی فراوانی عوامل عفونت ادراری با روش‌های مختلف از جمله روش‌های کشت و یا تعیین هویت ملکولی انجام شده است.

علیشاه و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیقی به بررسی و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی ژن‌های *papG* و *papC* در باکتری اشرشیاکلی جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. در این پژوهش توصیفی مقطعی ۵۰ کودک مبتلا به عفونت دستگاه ادراری مراجعه کننده به مرکز طبی تهران جمع‌آوری و پس از جداسازی باکتری و استخراج DNA آزمون‌های لازم انجام شد و حضور ژن‌های کلاس *papG* و *PapC* به روش PCR چند گانه بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد ژن‌های *papC* و *papG* کلاس I ، شایع‌ترین ژن کدکننده ادهسین *pap* فیمبریه در اشرشیاکلی جداشده از عفونت دستگاه ادراری هستند. علت تفاوت نتایج این پژوهش با سایر مطالعات به دلیل تنوع منطقه جغرافیایی می‌باشد (۱۸). محمد حسن شیرازی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی کلونینگ ژن *PapG* *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* و بررسی تنوع توالی آن پرداختند. *اشرشیاکلی یوروپاتوژن*، پاتوژن غالب در عفونت‌های ادراری می‌باشند. با وجود آنتی ژن‌ها و توکسین‌های مختلف باکتری‌های دخالت کننده در ایجاد عفونت، یکی از عوامل مهم در عفونت‌های ناشی از اشرشیاکلی و سایر باکتری‌های گرم منفی، چسبیدن باکتری

[1] *Lactiplantibacillus plantarum*

به سطح سلول میزبان می‌باشد، بنابراین مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب جهت مهار عفونت میباشد. با توجه به اینکه، پروتئین *PapG* به عنوان عامل چسبندگی عمل می‌کند، بنابراین ناحیه‌ی N ترمینال *papG* بین سویه‌های بالینی یک توالی حفاظت شده است که می‌توان از آن برای طراحی واکسن علیه عفونت ادراری استفاده کرد (۱۹).

علیرضا مهریاری و همکاران (۱۳۹۴) در پژوهشی شناسایی و تعیین فراوانی کلاس‌های I، IIو III ژن *papG* باکتری *Escherichia coli* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند، که در این پژوهش، ۵۵ نمونه‌ی ادراری افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری، از آزمایشگاه‌های بالینی شهر تهران جمع‌آوری شد. پس از جداسازی باکتری و استخراج DNA، حضور ژن‌های *papG I*، *papG II* و *papG III* با استفاده از روش Multiplex PCR بررسی شدند. نتایج نشان داد که ژن *papG* II شایع‌ترین ژن کد کننده‌ی ادهسین نوع *papG* فیمبریه‌ی P در اشرشیاکلی جدا شده از عفونت دستگاه ادراری در شهر تهران است. این مسأله، می‌تواند اطلاعات با ارزشی را در آسیب‌شناسی عفونت دستگاه ادراری و راهکارهای درمانی پیش رو، فراهم کند(۲) . افسانه شعبان و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی فراوانی سروتایپ‌های انتروپاتوژن دارای ژن *papG* در اشرشیاکلی جداسازی شده از ادرار و خون بیماران بستری در بیمارستان‌های شهرستان خرم‌آباد انجام شد و فراوانی ژن *PapG* به روش Multiplex PCR بررسی شد. در طی این بررسی حضور ژن (IIIو II) *papG* در اشرشیاکلی انتروپاتوژن جداسازی شده از ادرار و خون مشاهده شد . بنابراین، سویه‌های انتروپاتوژن نیز قادرند مانند سویه‌های یوروپاتوژن دارای ژن *papG* و فیمبریهP منجر به ایجاد عفونت‌های ادراری و سپتی‌سمی شوند(۲۰).

فاطمه اشرفی و همکاران (۱۳۹۵) در پژوهشی به بهینه سازی بیان تولید پروتئین نوترکیب *PapG. AcmA* در سویه بیانی اشرشیاکلی پرداختند. نتایج نشان داد که کلون‌سازی و بیان ژن *PapG .AcmA* قابل انجام می‌باشد. همچنین، استفاده از منبع کربن گلوکز درترکیب محیط کشت پیچیده نسبت به محیط کشت LB بیان بهتری دارد. در نهایت با تخلیص و ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب، می‌توان از آن به عنوان یک کاندیدای واکسن استفاده کرد(۲۱). محمد حسن شیرازی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی کلونینگ ژن *PapG* اشرشیاکلی یوروپاتوژن و بررسی تنوع توالی آن پرداختند. *اشرشیاکلی یوروپاتوژن*، پاتوژن غالب در عفونت‌های ادراری می‌باشد. با وجود آنتی‌ژن‌ها و توکسین‌های مختلف باکتری‌های دخالت کننده در ایجاد عفونت، یکی از عوامل مهم در عفونت‌های ناشی از اشرشیاکلی و سایر باکتری‌های گرم منفی، چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان می‌باشد، بنابراین مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب جهت مهار عفونت می باشد. با توجه به اینکه، پروتئین *PapG* به عنوان ادهسین عمل می‌کند، کاندیدی مناسب برای تهیه واکسن است.

ناحیهٔ Nترمینال ژن *PapG* در بین سویه‌های بالینی یک توالی حفاظت شده است و می‌توان از آن برای طراحی واکسن علیه عفونت ادراری استفاده کرد(۱۹). فیجان و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به بررسی فعالیت مولکولی گونه‌های مختلف گونه‌های پروبیوتیک تک زنجیره و چند زنجیره اشرشیاکلی پرداختند. مقاومت شدید گونه‌های بیماری‌زای *E. coli* به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شده مطالعات در زمینه این باکتری بسیار مورد توجه محققان قرار بگیرد. یکی از راه‌های مقابله باگونه‌های بیماری‌زا و مقاوم *E.coli* استفاده از گونه‌های پروبیوتیک است. هدف از این پژوهش بررسی و ارزیابی فعالیت عوامل آنتی‌گونیستی[1] با استفاده از محصولات پروبیوتیک تک زنجیره و چند زنجیره برعلیه پاتوژن‌های کلینیکی *E. coli* است (۲۲). فالاگاس و همکاران (۲۰۰۶) در پژوهشی به بررسی تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک در جلوگیری از عفونت‌های ادراری در زنان پرداختند. عفونت‌های مکرر مجاری ادراری تعداد زیادی از زنان در سراسر جهان را مبتلا می‌کند. استفاده از پروبیوتیک ها، به خصوص لاکتوباسیل‌ها، برای پیشگیری از ابتلا به عفونت‌های ادراری در نظر گرفته شده است. از آنجایی که لاکتوباسیل‌ها بر فلور بیماری زا در زنان یائسه سالم تسلط دارند، پیشنهاد شده است که ترمیم فلور ادراری، که تحت

[1] Antagonist

سلطه پاتوژن‌ها است، با استفاده از لاکتوباسیل‌ها در برابر عفونت ادراری محافظت شوند. در زنان سالم و زنان مبتلا به عفونت ادراری، مطالعات بسیاری از جمله آزمایش های حیوانی و میکروبیولوژیکی برای ارزیابی و بررسی اثربخشی و ایمنی پروبیوتیک‌ها در برابر یوروپاتوژن‌ها انجام شده است. بیشتر آنها یافته‌های دلگرم کننده‌ای برای برخی از گونه‌های خاص لاکتوباسیل‌ها داشتند. به نظر می‌رسید در بین لاکتوباسیل‌های مورد مطالعه، Lactobacillus rhamnosus GR-1 و L. reuteri RC- (که پیشتر L. *fermentum* RC-14 نامیده می‌شد) برای جلوگیری از UTI مؤثرتر است. L. *Casei shirota* و L. *crispatus* CTV-05 نیز در برخی مطالعات اثربخشی خود را نشان داده‌اند. به نظر نمی‌رسد L. *rhamnosus* GG در پیشگیری از عفونت‌های ادراری به همان اندازه مؤثر باشند. شواهد حاصل از مطالعات موجود نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها می‌توانند برای پیشگیری از عفونت ادراری مکرر در زنان مفید باشند. همچنین، مشخصات ایمنی خوبی دارند. با این‌حال، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است(۸). گرازدانوف و همکاران (۲۰۰۴) در پژوهشی به بررسی و آنالیز ساختار ژنتیکی پروبیوتیک اشرشیاکلی زنجیره نیسل ۱۹۱۷ پرداختند. آن‌ها در این پژوهش قسمت‌های مختلف کروموزوم گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای *E. coli* را با روش‌های آنالیز tRNA و بررسی جزایر ژنوم (GEIs) و بررسی DNA با روش هیبریداسیون DNA/DNA مطالعه کردند. شواهد حاصل از این مطالعه نشان داد که سیستم‌های مختلف جذب آهن، چسبنده‌ها و پروتئازها، می‌توانند به بقای موفقیت‌آمیز این سویه پروبیوتیک در روده انسان کمک کنند، که به احتمال زیاد سبب از بین رفتن *E. coli* توسط این سویه از پروبیوتیک می‌شود(۷).

مصرف پروبیوتیک‌ها که موجب رشد باکتری‌های مفید روده یا کاهش بیماری‌زایی میکروب‌های مضر می‌شوند در تضمین سلامت بدن و به‌ویژه سلامت سیستم گوارشی بسیار چشم گیر است. از آنجا که سیستم گوارش به‌طور مستقیم بر سیستم ایمنی بدن تاثیر دارد، پروبیوتیک‌ها با تولید هر چه بیشتر لنفوسیت‌ها موجب تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شوند و از بروز بیماری‌های عفونی جلوگیری می‌کنند. مصرف پروبیوتیک‌ها باعث کاهش و از بین رفتن جذب مواد آلرژی‌زای موجود در لبنیات از طریق روده می‌شود. علاوه براین، طبق پژوهش‌های مختلف، شمار نوزادان مبتلا به اگزما و نیز آلرژی در کودکانی که مادرانشان در دوران بارداری پروبیوتیک مصرف کردند به‌طور چشمگیری از سایر کودکان کم‌تر است. نتایج مطالعاتی که در این مقاله به آن اشاره شده است، نشان می‌دهد که پروبیوتیک توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا، از جمله باکتری اشرشیاکلی را دارند. پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* استفاده شده تاثیر مثبتی روی این سویه باکتری داشته است. در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مؤثر در درمان بیماری‌های عفونی به یکی از چالش‌های مهم تبدیل شده است(۲۳). ایجاد مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک‌ها از این جهت مهم است که در بسیاری از موارد در هنگام بروز بیماری و زمانی که درمان با آنتی‌بیوتیک الزامی است، میکروارگانیسم‌های مقاوم شده به درمان پاسخ نمی دهند(۲۴). یکی از مهمترین نتایج تحقیق ذکر شده در این مقاله این است که تا کنون باکتری مورد بررسی به داروی آنتی‌بیوتیک مقاوم نشده است و آنتی‌بیوتیک بکار رفته توانسته هاله رشد باکتری را از میان بردارد و پروبیوتیک کار شده در این پژوهش نیز اثرات هم‌افزایی روی آنتی‌بیوتیک به‌کار رفته داشته است که نشان دهنده این است که پروبیوتیک‌ها با القای مکانیسم‌هایی توانایی جایگزینی با آنتی بیوتیک‌ها را خواهند داشت.

سپاسگزاری

از خانم دکتر رودابه بهزادی اندوهجردی و خانم دکتر مریم تاج‌آبادی ابراهیمی بدلیل همکاری شایسته ایشان در پیشبرد این پژوهش سپاسگذارم.

منابع

1. Ghasemipour Z., SALEHZADEH A., ZAMANI H. Prevalence of Pathogenicity Islands and Fim H Virulence Genes in Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infection in Rasht City, Iran. JOURNAL OF ILAM UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES. 2018 [cited 2022September07];26(3):63-71. Available from:

10.1002/jcph.1121. PMID: 30248200; PMCID: PMC6656559

11. Joint F. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 2002; 30

12. Chatterjee M, Anju C, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG, Biswas R. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology 2016; 306(1): 48-58

13. López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Díaz-Regañón J. Inhibitory effect of Gramnegative and Gram-positive microorganisms against Helicobacter pylori clinical isolates.Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61(1): 139-142

14. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. Amb Express 2012; 2(1): 48

15. Sadri, M., Arbab Soleimani, N., Forghanifard, M. The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of ProbioticLactobacilli on Uropathogenic Escherichia coli (UPEC). *Biological Journal of Microorganism*, 2016; 5(17): 159-170. doi: 10.22108/bjm.2016.20376

16. Bandari S,Soleimani NA,Tajbakhsh E, The effect of probiotic lactobacilli on the attachment power and biofilm formation of Escherichia coli isolated from urinary tract infections. J of Microbial Word 2018; 11(3): 278-287.

17. NOUROUZI JAMILEH, KARGAR MOHAMMAD, POURSHAHIAN F., KAMALI M.. STUDY ON THE PREVALENCE OF URINARY TRACT INFECTION BY ESCHERICHIA COLI, ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PLASMID PROFILE OF ISOLATED BACTERIA IN JAHROM CITY. ANNALS OF MILITARY AND HEALTH SCIENCES RESEARCH. 2006 [cited 2022September08]; 4(1 (SERIAL NUMBER 13)):745-749. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=65024

18. ALISHAH MITRA, ZAHRAEI SALEHI TAGHI, AMINI KIUMARS, YAHYARAEYAT RAMAK. EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND DETECTION OF PAPC AND PAPG GENES IN ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION. QOM UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES JOURNAL. 2016 [cited 2022September07]; 10(8): 80-87.

19. HAMIDIYEH F., SHIRAZI M.H., FALLAH MEHRABADI J., POURMAND M.R., OSTAD MOHAMMADI S., MOLLA AGHAMIRZAEI H., AFSHAR D.. PAPG GENE CLONING, ESCHERICHIA COLI UROPATHOGEN AND EXAMINATION OF ITS SUBSEQUENCE DIVERSITY. IRANIAN SOUTH MEDICAL JOURNAL (ISMJ). 2013 [cited https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=709956 .

2. Mahrati, A., Parviz, M., Khalajzadeh, S. Identifying and determining the Classes I, II, and III papG Gene of Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. Journal of Isfahan Medical School, 2015; 33(348): 1412-1419.

3. MAHDIZADEH M.A., ESKANDARI SOHEYL, ZAVAR M., PIROUZ B.. THE IMPORTANCE OF ESCHERICHIA COLI O157:H7 IN FOODBORN INFECTION. JOURNAL OF KERMAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES. 2008 [cited 2022September07];15(4):353-361.Availablefrom: https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=82402

4. Borchert D, Sheridan L, Papatsoris A, Faruquz Z, Barua JM, Junaid I, Pati Y, Chinegwundoh F, Buchholz N. Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: Review and research perspective. Indian J Urol. 2008 Apr;24(2):139-44. doi: 10.4103/0970-1591.40604. PMID: 19468386; PMCID: PMC2684288.

5. TALEBI TAHER MAHSHID, NIKSOLAT MARYAM, MINAEIAN SARA, KHODABANDELOU NILOOFAR, ZANDIEH ZHALEH. THE EFFECT OF PROBIOTICS IN THE PREVENTION OF URINARY TRACT INFECTIONS IN ELDERLY PATIENTS HOSPITALIZED IN INTENSIVE CARE UNITS. RAZI JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES (JOURNAL OF IRAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES). 2017 [cited 2022September07]; 24(156):32-41. Available from:https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=550567

6. keikha, M., Rava, M. Trend of antibiotic resistance of Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. Journal of Paramedical Sciences & Rehabilitation, 2017; 6(4): 73-78. doi: 10.22038/jpsr.2017.21755.1556.

7. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. J Bacteriol. 2004;186(16):5432-41.

8. Falagas ME, Betsi GI, Tokas T, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. Drugs. 2006;66(9):1253-1261. doi:10.2165/00003495-200666090-00007

9. Dudek-Wicher R, Junka A, Paleczny J, Bartoszewicz M. Clinical Trials of Probiotic Strains in Selected Disease Entities. Int J Microbiol. 2020 May 28; 2020:8854119. doi: 10.1155/2020/8854119. Erratum in: Int J Microbiol. 2021 Feb 11; 2021:7356890. PMID: 32565816; PMCID: PMC7292209.

10. Liu Y, Tran DQ, Rhoads JM. Probiotics in Disease Prevention and Treatment. J Clin Pharmacol. 2018 Oct;58 Suppl 10(Suppl 10):S164-S179. doi:

2022September07];16(1):1-8. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=277060

20. SHABAN A., NOROUZI J.. DETECTION OF PAP G GENE IN ENTER OPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI (EPEC) STRAINS ISOLATED FROM URINE AND BLOOD OF HOSPITALIZED PATIENTS' IN KHORRAMABAD CITY, IRAN. JOURNAL OF ADVANCES IN MEDICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH. 2016 [cited 2022September07]; 24(104):102-111. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=484867

21. ASHRAFI FATEMEH, MASOMIAN MOHAMMAD REZA, MIRZAIE AMIR. OPTIMIZATION THE EXPRESSION OF PAPG.ACMA RECOMBINANT PROTEIN INESCHERICHIA COLI SYSTEM. JOURNAL OF MICROBIAL WORLD. 2016 [cited 2022September07]; 9(1 (26)):6-14. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=517669

22. Fijan S, Šulc D, Steyer A. Study of the In Vitro Antagonistic Activity of Various Single-Strain and Multi-Strain Probiotics against Escherichia coli. Int J Environ Res Public Health. 2018; 15(7):1539. Published 2018 Jul 20. doi:10.3390/ijerph15071539

23. KARAMI P., ASLANI M.M., NAJAFI MOSLEH M., ALIKHANI M.Y... DETERMINATION PATTERN OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN ENTROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM CHILDREN WITH DIARRHEA. AVICENNA JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE (SCIENTIFIC JOURNAL OF HAMADAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES AND HEALTH SERVICES). 2012 [cited 2022September09]; 19(1 (SN 63)):27-31. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=245534

24. BONYADIAN M., BARATI S., HABIBIAN R., AND JOSTOJUO T. INVESTIGATION THE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM GASTROENTERITIS CASES IN SHAHREKORD COUNTY. JOURNAL OF SHAHREKORD UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES. 2014 [cited 2022September09]; 15(6):117-123. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=372606

Molecular study of probiotic effect on *PapG* gene in different strains of Escherichia coli separated from urinary tract infection

Romina Rezaei[1], Dr Rodabe Behzadi[2*], Dr Maryam Tajabadi[3]

[1] M.Sc. Student, Department of Cellular and Molecular Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor of Genetics, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Escherichia coli induced urinary tract infection urinary tract infections is a prevalent acquired infection in Iran. The *papG* virulence gene plays a crucial role in the pathogenesis of *E. coli*, particularly in binding to epithelial cells. In addition, as a group of probiotics, lactobacilli have an important role in the body and are therapeutically benefits in some cases. This study aimes to molecularly investigate the effect of Lactobacillus casei PTCC 1608 on different strains of uropathogenic *E. coli* isolated from urinary infection through PCR. The desired strain of *E. coli* was isolated from patients with urinary tract infections and investigated through differentiation methods. The *papG* gene of the desired strain was evaluated through PCR and then strains with positive genotypes were isolated and the antibacterial effect of Lactobacillus casei was evaluated through dilution and disc diffusion methods in a liquid medium. The antibacterial effect of Lactobacillus casei on antibiotic-resistant uropathogenic *E. coli* was studies. From a total of 40 samples isolated from the urine of patients with urinary tract infections, the results of MIC-MBC were either positive or negative. The antibiotic sensitivity test at the dilution of 1 to 10 showed an inhibition zone of 9 cm. These results indicated that the isolated bacterium was not resistant to ampicillin and the antibiotic did not lose its therapeutic effect. Moreover, the probiotic used has a therapeutic role and can improve urinary infections.

Keyword: ampicillin, antibiotic Resistance, europathogeni , *E.coli*, Lactobacillus casei, *PapG*, probiotics,PCR, Urinary tract infection

* rahabehzadi@yahoo.com