Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 2, Jun. – Jul. 2016, Pages: 80-85

Original Article

Investigation for *Lactobacillus Acidophilus* Supernatant's Effects on Type I Fimbriae Promoter Activity in O26 Serotype of UPEC Strain of *Escherichia Coli*

Mehdi Moazzami Goudarzi[1*], Mohammad Vali Nejhad[2]

[1]Department of Microbiology, College of Paramedical Science, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran
[2]Department of Microbiology, College of Basic Science, Jahroum Branch, Islamic Azad University, Jahroum, Iran

Received: 6 Jun, 2014 Accepted: 27 Feb, 2014

Abstract

Background & Objectives: Type I fimbriae is one of the major key factors in attachment and colonization of *Escherichia coli* in the urinary tract. *fim* operon phase variation is controlled by various environmental situations. The goal of this study is to investigate of the effect of *lactobacillus acidophilus* culture supernatant (Cs) on *fim* phase variation.

Material and Methods: In this study, at first, *lactobacillus acidophilus* culture supernatant (CS) was prepared from overnight culture. Then modified M9 medium which included serial dilution of Cs (0.1% up to 6%) was prepared. Then UPEC isolate (o_{26}) was inoculated in modified M9. Finally, *Fim* promoter activity was assessed through *fim* promoter PCR product digestion by *HinfI* restriction enzyme.

Results: Modified M9 medium including 0.1% up to 0.7% of Cs, supports and stimulates *fim* operon expression. But modified M9 including 0.8% up to 3% of Cs, downregulated *fim* expression. By the way, UPEC was not able to multiply during inoculation in modified M9 including 4% up to 6% of Cs.

Conclusion: Probably, *Lactobacillus acidophilus* secrets some by-products which are able to inhibit *fim* operon expression in UPEC. Characterization and pharmaceutical application of these metabolites may be easily lead to design the new therapeutic products for prevention of urinary tract infections, especially in women.

Keywords: *Escherichia coli*, *lactobacillus acidophilus*, Urinary tract infection

***Corresponding author:**
E-mail: Moma1675@gmail.com

Citation: Moazzami Goudarzi M, Vali Nejhad M. Investigation for *Lactobacillus Acidophilus* Supernatant's Effects on Type I Fimbriae Promoter Activity in O26 Serotype of UPEC Strain of *Escherichia Coli*. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(2):80-85.

مقاله پژوهشی

تاثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی تغییر فاز تیپ یک فیمبریه درسروتیپ O_{26} اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری

مهدی معظمی گودرزی[۱*]، محمد ولی نژاد[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۱۶ پذیرش: ۹۲/۱۲/۸

چکیده

زمینه و اهداف: تیپ یک فیمبریه از عوامل کلیدی در اتصال باکتری اشرشیاکلی به مخاط دستگاه ادراری و کلنیزه شدن آن می‌باشد. بیان این عامل تحت کنترل تغییر فاز است و در شرایط محیطی مختلف اپرون سنتز کننده آن (*fim*) روشن و خاموش می گردد. هدف پژوهش پیش رو بررسی تاثیر متابولیت های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کنترل بیان این اپرون است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ابتدا مایع رویی کشت لاکتوباسیل از کشت شبانه تهیه شد. سپس سروتیپ O_{26} اشرشیاکلی در محیط حداقل M9 تغییر یافته حاوی رقت های سریال از مایع رویی کشت لاکتوباسیل و اسید لاکتیک کشت داده شد. رفتار اپرون ازطریق برش دادن محصول PCR اختصاصی پروموتر *fim* با آنزیم محدود الاثر *HinfI* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در محیط کشت M9 تغییر یافته که حاوی درصد حجمی ۰.۱٪ تا ۰.۷٪ از مایع رویی کشت لاکتوباسیل بود وضیعت اپرون در حالت روشن تعیین شد. از درصد حجمی ۰.۸٪ تا ۳٪ از محیط کشت باکتری رشد نموده اما اپرون را بیان نمی کند. این درحالی است که رشد باکتری در درصد حجمی از ۴ تا ۶٪ محیط کشت به طور کامل مهار گردید.

نتیجه گیری: احتمالا لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس متابولیت هایی تولید می کند که قادر به مهار بیان اپرون *fim* در باکتری اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری هستند. شناسایی دقیق و کاربرد فارماکولوژیک آنها احتمالا سبب ارائه فراورده های جدید دارویی با اهداف پیشگیری از عفونت ادراری به ویژه در بانوان می گردد.

کلید واژه ها: اشرشیاکلی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، عفونت ادراری

*ایمیل نویسنده رابط: moma1675@gmail.com

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت ادراری باکتری اشریشیاکلی می‌باشد که از طریق اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه ادراری موجب افزایش قابلیت تکثیر و تهاجم به بافت کلیه می‌شود (۱). دو اندامک سطحی تاژه و تیپ ۱ فیمبریه، از مهم‌ترین عوامل تحرک و کلنیزاسیون این باکتری در دستگاه ادراری می‌باشند. تاژه موجب رانده شدن باکتری در لایه‌ی مخاطی شده و فیمبریه موجب اتصال آن به گیرنده‌های اختصاصی موجود در سطح سلول‌های اپی‌تلیال ادراری می‌شود (۲). تیپ‌یک فیمبریه تقریباً در اکثر سویه‌های بالینی جدا شده مشاهده می‌شود و نقش آن در تشکیل بیوفیلم به خوبی روشن شده‌است (۳). فیمبریه‌ی تیپ ۱ به گیرنده حاوی D- مانوز متصل می‌شود و حضور قند D- مانوز مانع هماگلوتیناسیون اریتروسیت‌های انسانی توسط *E.coli* نمی‌شود و این اساس آزمون هماگلوتیناسیون حساس به مانوز در تشخیص فنوتیپیک این فیمبریه می‌باشد (۴). بیان تیپ‌یک فیمبریه در *E.coli* تحت کنترل فرایند تغییر فاز می‌باشد. اپرون *fim* که مسئول سنتز این نوع فیمبریه می‌باشد، شامل ژن‌های ساختاری *fimA,F,C,H* و ژن‌های تنظیمی *fimE,B* است. هم‌چنین ژن‌های *fimC,D* در سرهم شدن اجزای این نوع فیمبریه دخیل می‌باشند (۵). دو پروتئین FIM B,E با دارا بودن خاصیت ریکامبینازی قادر به تغییر در موقعیت قرارگیری توالی 314bp معکوس‌شونده، موسوم به توالی کنترل در پروموتور نخستین ژن ساختاری (*fimA*) می‌باشند (۶). طول قطعات حاصل از برش خوردن ناحیه سوئیچ‌کننده در

پروموتور اپرون *fim*، توسط اندونوکلئاز محدودالاثر *HinfI* اساس تشخیص مولکولی بیان ویا عدم بیان اپرون *fim* در اشرشیاکلی می‌باشد (تصویر ۱). پروتئین FIM H به‌عنوان پروتئین عامل اتصال به گیرنده‌های سطحی شامل قند D – مانوز می‌باشد.

از این رو استفاده از سوسپانسیون این قند به‌عنوان عامل ممانعت‌کننده از اتصال FIM H اساس بررسی فنوتیپی بیان این نوع فیمبریه از طریق آزمون هماگلوتیناسیون حساس به مانوز می‌باشد (۶). با توجه به شیوع نسبتاً بالای باکتری *E.coli* در نمونه‌های ادراری و هم‌چنین کثرت عفونت‌های واجد یا فاقد علائم بالینی، بررسی عوامل مؤثر در بیماری‌زایی این باکتری ضروری می‌نماید.یکی از راه‌های پیشگیری از رویداد عفونت‌های ادراری توسط این باکتری درک الگوی تغییر فاز اپرون کد کننده‌ی آن در ارتباط با فاکتورهای محیطی در سطح *In vitro* و *In vivo* خواهد بود (۳).

مواد و روش ها

در این پژوهش به منظور تهیه نمونه‌های لاکتوباسیل از نمونه گیری با سواب استریل از ۱۰۰ زن سالم در چندین مرکز بهداشتی درمانی و مطب خصوصی استفاده شد. همچنین حدود ۲۰۰ نمونه‌ی کشت ادرار از نظر وجود باکتری اشریشیاکلی از طریق کیت تشخیصی Hi25 *Entrobacteriacea* Identification kit ساخت شرکت Hi media مورد بررسی قرارگرفتند. پس از تعیین هویت کشت‌های به‌دست‌آمده، جهت سروتایپینگ آنتی‌ژن O سویه‌های مورد آزمون در محیط Tripticase Soy Broth (شرکت Difco) در ۳۷ درجه به مدت ۱۰ ساعت گرماگذاری شدند. سلول‌های باکتریایی از طریق سانتریفیوژ جدا شده و در سرم فیزیولوژی از آن‌ها سوسپانسیون تهیه گردید. سوسپانسیون‌های سلولی به مدت‌یک ساعت اتوکلاو شدند. قطره‌ای از هر کدام از سوسپانسیون‌ها ابتدا با آنتی‌سرم پلی‌والان سروتیپ‌های O (شرکت Difco وMAST) و در صورت آگلوتینه نمودن، با آنتی‌سرم منووالان همان گروه مجاور گردید.

به منظور شناسایی و جداسازی دقیق لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از دیگر سوش ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده شد. توالی پرایمر استفاده شده در این آزمون به قرار زیر است:

Forward: 5' TGCAAAGT GGTAGCGTAAGC 3'
Reverse: 5' CCTTTCCCTCACGGTACTG 3'

در این مرحله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد مشاهده باند ۱۷۰bp هویت باکتری را تایید می‌نماید (تصویر ۲ ج).

جهت بدست آوردن محلول رویی، از کشتهای شبانه رشد یافته در محیط MRS مایع استفاده شد. ابتدا محیط را هم زده شد تا میکروارگانیسمهای رشد یافته کاملاً در آن معلق شوند، سپس بوسیله پیپت استریل، واحدهای ۱۰ میلی لیتری از محیط به لوله های سانتریفوژ استریل درب دار منتقل شد. لوله ها در سانتریفوژ با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و در نهایت محصول دو فاز بدست آمد. محلول رویی مخلوطی از محیط کشت و متابولیتهای حاصل از پروبیوتیک مورد نظر بود که در شرایط استریل(زیر هود لامینار)، به ارلن استریل منتقل شد. و جهت مراحل بعدی آزمایشات، در ظروف در پوش دار در یخچال نگهداری شد.

به منظور تهیه محیط کشت M9 مایع تغییر یافته برای بررسی اثر مایع رویی و اسید لاکتیک روی تغییر فاز تیپ یک فیمبریه به این منظور سری محیط کشت حداقل M9 که به ترتیب حاوی درصد حجمی یک دهم تا شش درصد از مایع رویی تازه کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد تهیه شد. سروتیپ O_{26} اشرشیاکلی در شرایط استریل در انکوباتور شیکر دار با دور rpm۱۰۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت محیط کشت سانتریفوژ شده و مایع رویی جهت مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور امکان سنجی تاثیر اسید لاکتیک روی تغییر فاز فیمبریه و مقایسه نتایج آن با مایع رویی، به موازات از سری محیط کشت M9 که حاوی یک دهم تا شش درصد اسید لاکتیک بود نیز جهت سنجش رفتار اپرون استفاده شد. به منظور بررسی تاثیر تغییر در اسیدیته محیط ناشی از ترشح متابولیت ها لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط کشت در تمامی رقت های مایع رویی یک بار با افزودن محلول سود، اسیدیته محیط در محدوده‌ی خنثی نگه داشته شد. تمامی این مراحل یک بار برای سوش وحشی و یکبار برای سوش استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انجام شد.

به منظور بررسی مولکولی تغییرفاز تیپ یک فیمبریه دو پرایمر اختصاصی شامل:

پرایمر forward باتوالی:
5'GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG 3'
و پرایمر Revers با توالی:
5' AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG 3'

برای تکثیر توالی bp۵۵۹ که شامل ناحیه سوئیچ‌کننده اپرون *fim* می‌باشد، مورد استفاده قرارگرفت (۶). تخلیص DNA کروموزومی با استفاده از کیت تخلیص ساخت مرکز رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام پذیرفت. مخلوط واکنش PCR طبق دستورالعمل کیت در حجم نهایی۲۵ میکرولیتر آماده گردید. پس از پایان واکنش PCR، محصول آن توسط اندونوکلئاز محدودالاثر *HinfI* (شرکت Metabion) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، تحت فرایند Digestion قرارگرفت. پس از این مرحله محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. در نهایت رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آشکارسازی توسط تابش فرابنفش انجام پذیرفت.

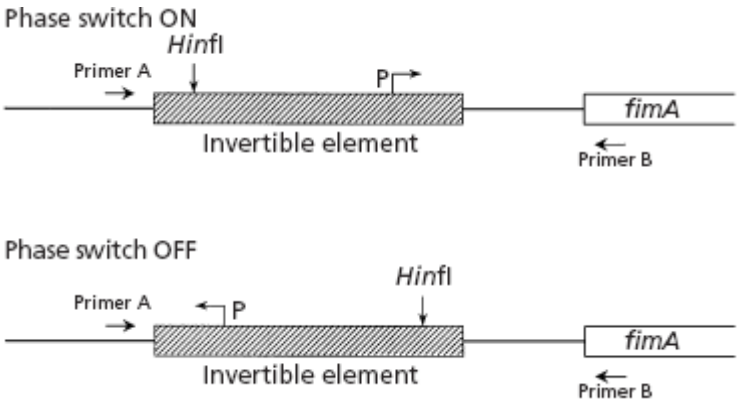
یافته ها

در میان ۱۰۰ نمونه کشت واژینال در ۸۷ مورد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر اساس خصوصیات بیوشمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. همچنین از میان ۲۰۰ نمونه

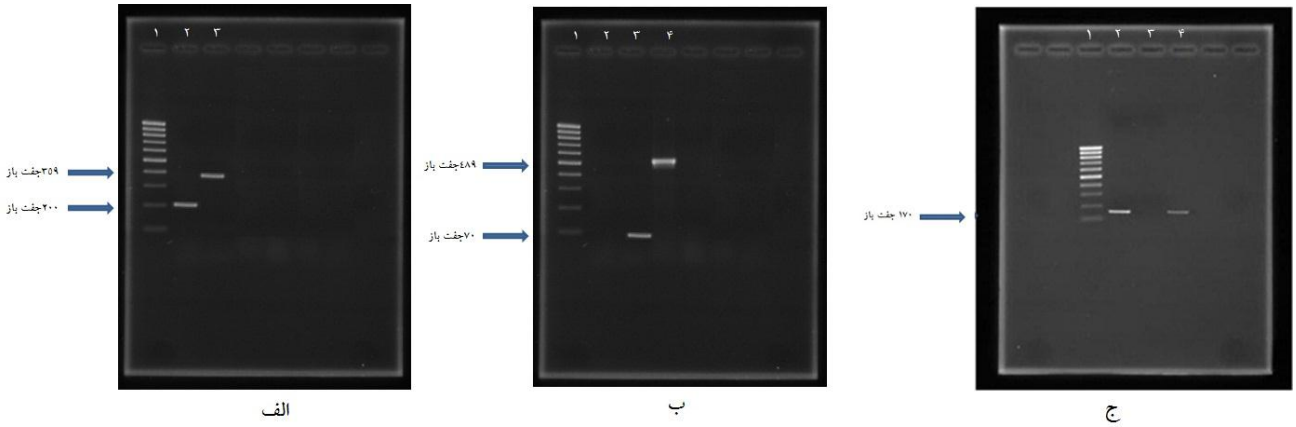
کشت ادراری بر اساس آزمون های افتراقی میکروبی و بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی دست کم باکتری در ۱۰۶ نمونه در نهایت اشرشیاکلی مورد شناسایی قرار گرفت. از میان ۱۰۶ جدایه اشرشیاکلی به دست آمده بر اساس آزمون سروتایپینگ با آنتی سرم های پلی ولان و منوولان o، سروتیپ O26 در ۷۵ جدایه از باکتری اشرشیاکلی مورد شناسایی قرار گرفت.

میزان دیگر سروتیپ های اشرشیاکلی که مورد شناسایی قرار گرفتند به ترتیب ۲۵ جدایه سروتیپ O44، و ۶ جدایه باقی مانده نیز سروتیپ O144 بودند.

پس تخلیص ناحیه تنظیمی اپرون مسئول سنتز تیپ یک فیمبریه ، درصورتی که پس از برش دادن محصول PCR با آنزیم *HinfI* قطعات ۳۵۹bp و bp ۲۰۰ ایجاد گردد معرف نمونه هایی است که در آنها اپرون *fim* خاموش می‌باشد. و در صورتی که قطعات bp ۴۸۹ و bp ۷۰ مشاهده گردد اپرون *fim* در حالت روشن است (تصویر شماره دو الف و ب). رفتار اپرون نسبت به تیمار توسط مایع رویی کشت لاکتوباسیل اسیدوفیلوس تیپ وحشی و اسید لاکتیک خالص در جدول ۱ و رفتار اپرون نسبت به تیمار توسط مایع رویی کشت لاکتوباسیل اسیدوفیلوس استاندارد و اسید لاکتیک خالص در جدول ۲ آورده شده است.



تصویر ۱: دو جهت‌گیری مختلف توالی معکوس شونده در پروموتور ژن *fim A* در دو فاز روشن و خاموش و موقعیت قرارگیری پرایمرها



تصویر ۲: تعیین جهت گیری ناحیه سوئیچ کننده اپرون *fim* در پرو موتور ژن *fim A* براساس برش محصول PCR با اندونوکلئاز *Hinf I*. الف: به ترتیب لاین دو و سه: باند مربوط به قطعات bp ۲۰۰ و bp ۳۵۹ که معرف نمونه هایی است که در آنها اپرون *fim*خاموش می باشد. لاین یک: مارکر ۱۰۰ ب: به ترتیب لاین سه و چهار: باند مربوط به قطعات bp۷۰ و bp ۴۸۹. نمونه هایی که در آنها اپرون *fim* در حالت روشن تعیین شده است. لاین یک: مارکر ۱۰۰، لاین دو: در این لاین نمونه ای ران نشده است. ج: شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس. ۱: مارکر bp۱۰۰ ، ۲: کنترل مثبت، ۳: کنترل منفی، ۴: نمونه مجهول

جدول ۱: رفتار اپرون *fim* در حضور رقت سریال مایع رویی و اسید لاکتیک در سوش وحشی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

درصدمایع رویی	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
درصد مایع رویی با اسیدیته ی خنثی	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
درصد لاکتات	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد

جدول ۲ : رفتار اپرون *fim* در حضور رقت سریال مایع رویی و اسید لاکتیک در سوش استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

درصدمایع رویی	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
درصد مایع رویی با اسیدیته ی خنثی	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
درصد لاکتات	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.۴	۰.۵	۰.۶	۰.۷	۰.۸	۰.۹	۱	۲	۳	۴	۵	۶
روشن	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
خاموش	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد

بحث

اشرشیاکلی رایج ترین کوکو باسیل گرم منفی در میان اعضای فلور میکروبی روده انسان است. صرف نظر از عفونت‌های گوارشی این باکتری، رایج‌ترین عفونت خارج روده‌ای آن، عفونت ادراری است. کمتر از ۱۲٪ از مردان و ۲۰٪ از زنان در طول زندگی خود دست کم‌یک بار عفونت حاد ادراری را تجربه می‌کنند (۱,۲). در خلال آغاز یک عفونت، در هریک از مکان‌های اکولوژیک میزبانی یک جمعیت هتروژن باکتریایی حضور دارد. این عدم تجانس باعث خواهد شد که عفونت با جمعیت‌های غالب باکتریایی گسترش‌یابد. همچنین امکان غلبه کردن بر شرایط غیر قابل پیش‌بینی میزبان‌ها و نیچ‌های متفاوت را فراهم می‌کند (۷). تغییرات فنوتیپیک سطحی باکتری منعکس‌کننده فرایندهای تنظیمی اختصاصی، متناسب با شرایط محیطی است. تحقیقات Snyder و همکاران نشان داده است که الگوهای متفاوت بیان فیمبریه بستگی به شرایط محیطی و رشد نظیر دما، محیط کشت و pH دارد و تغییر فاز مشاهده شده در عفونت‌های ادراری در نتیجه تفاوت محل استقرار آن‌ها می‌باشد (۷و۸ و۱۴). دستگاه ادراری مثالی از یک محیط متنوع می‌باشد و عامل بیماری‌زای موفق در محیط‌های مجرای ادراری، مثانه و کلیه‌ها باید حاوی ادهسین‌های خاصی باشد که محرک پاسخ ایمنی التهابی هستند (۹). Schwan و همکاران در یک بررسی به نقش مهم فاکتورهای محیطی در تنظیم بیان اپرون‌های مولد فیمبریه در اشرشیاکلی اشاره نموده‌اند (۱۰ و۱۲). تحقیقات Boudeau و همکاران نشان داد که اتصال به واسطه تیپ‌یک فیمبریه در توانایی تهاجم این باکتری ضروری می‌باشد. حتی حذف‌شدن ژن *mot B* که به‌طور طبیعی جهت چرخش تاژه مورد نیاز می‌باشد، باعث ایجاد نقص در بیان تیپ‌یک فیمبریه در سویه جهش یافته می‌گردد. پایه‌های مولکولی چنین تنظیمی‌ناشناخته است. اما این‌گونه به نظر می‌رسد چنین تنظیمی در سطح ناحیه سوئیچ‌کننده *fim* و یا روی بیان‌شدن ریکامبینازها عمل می‌کند (۱۱ و ۱۳). این پژوهشگران همچنین اشاره می کنند که در حضور مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس کازئی رشد اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری مهار می‌گردد. نتایج این پژوهشگران تا پژوهش ما منطبق بوده و نشان می‌دهد که پروبیوتیک ها پتانسیل بالقوه در مهار رشد اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری دارند. نتایج پژوهش ما نشان می‌دهد که در سوش استاندارد تفاوت معنی داری از نظر تاثیر روی بیان اپرون مسئول سنتز فیمبریه تیپ یک با سوش وحشی به دست آمده از نمونه های بالینی وجود ندارد. تنها تفاوت در قابلیت بالاتر سوش استاندراد در مهار رشد اشرشیاکلی و نه در میزان بیان اپرون مسئول سنتز تیپ یک فیمبریه است. این نتایج با نتایج Roe و همکاران انطباق دارد. آنها نقش تیپ‌یک فیمبریه در سیستیت‌های باکتریایی و تشکیل بیوفیلم‌های دستگاه ادراری را نشان داده و عنوان نمودند که فاکتورهای میزبانی به خصوص فلور میکروبی واژینال و خصوصیات سطوح در ارتباط با باکتری، نقش مهمی در تنظیم بیان اپرون‌های مولد فیمبریه ایفا می‌نمایند (۱۵).

نتایج پژوهش ما نشان داد که عملکرد اپرون در حضور مایع رویی کشت لاکتوباسیل و اسید لاکتیک مابین غلظت ۰/۱ تا ۰/۷ در صد در حالت روشن می‌باشد. این درحالی است که در حضور رقت سریال اسید لاکتیک مابین ۰/۵ تا ۰/۷ درصد اسید لاکتیک بر خلاف غلظت مشابه مایع رویی، اپرون در هر دو حالت روشن و خاموش مشاهده شده است. بدیهی است که غلظت بالاتر از ۰/۵ درصد اسید لاکتیک خالص احتمالا از طریق تغییر در اسیدیته محیط سبب القای حالت خاموش اپرون گردیده است. پرواضح است که اسید لاکتیک هرچند از مهمترین متابولیت‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به حساب می‌آید، اما قطعا تنها متابولیت تولید شده توسط این باکتری نیست. در همین شرایط در حضور رقت ۰/۵ تا ۰/۷ درصد مایع رویی کشت لاکتوباسیل سبب تحریک فعالیت اپرون در اشرشیاکلی گردید، اما هرگز اپرون درحالت خاموش مشاهده نشد. پرواضح است که صرف نظر از تاثیر مهاری اسیدلاکتیک روی بیان اپرون در غلظت‌های فوق، وجود دیگر متابولیت ها در مایع رویی کشت لاکتوباسیل نه تنها سبب مهار بیان اپرون *fim* نگردید، بلکه محرک بیان اپرون نیز می‌باشد.

از سوی دیگر رقت های ۰/۸ تا ۳ درصد به شکل مشترک در مایع رویی کشت و محلول اسید لاکتیک، سبب عدم بیان اپرون *fim* گردیدند. در رقت های بالای ۳ درصد به طور کلی رشد باکتری متوقف گردید. باتوجه به اینکه در تمامی رقت های مایع رویی یک بار نیز، اسیدیته محیط پس از افزودن مایع رویی با محلول سود در حد خنثی نگاه داشته شد، خاموش بودن اپرون در این محدوده غلظت مایع رویی فارغ از تاثیر اسید لاکتیک روی اسیدیته‌ی محیط ایجاد شده است. همان گونه در نتایج مشاهده می‌شود، خنثی نمودن محیط به واسطه افزودن سود سبب افزایش عدم بیان اپرون گشت.

چنین نتایجی نشان می‌دهند که صرف نظر از فاکتور تغییر در اسیدیته محیط ناشی از ترشح اسیدلاکتیک، قطعا این متابولیت و یا

تولید آب اکسیژنه به تنهایی عامل مهار رشد و یا عدم بیان اپرون در جدایه اشرشیاکلی نبوده است. احتمالا پپتیدهای فعال زیستی که توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تولید می‌شود از مهمترین عوامل دخیل در گنترل بیان اپرون *fim* در باکتری اشرشیاکلی هستند.

نتیجه گیری

در پژوهش ما با عنایت به سوابق موجود در مطالعات پیشین که به بررسی تاثیر تغییر در عوامل محیطی روی بیان اپرون *fim* می‌پردازند، به نظر می‌رسد اسید لاکتیک و احتمالا پپتیدهای فعال زیستی به عنوان مهمترین فاکتور دخیل در اثرات لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نقش آفرین می‌باشد. نتایج نسبتا مشابه در ۲ گروه تیمارشده توسط لاکتیک اسید و مایع رویی این فرضیه را تقویت می‌کند. از این رو احتمالا تغییر در اسیدیته محیط ارتباط معنی‌داری با سیستم های تنظیمی بیان اپرون دارد. یافتن و درک چنین فرایندهای تنظیمی همراه با سایر فاکتورهای محیطی – میزبانی در آینده‌ای نه چندان دور احتمالا امکان جایگزینی درمان‌های اکولوژیک محور را با درمان‌های تهاجم محور نظیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها که خود زمینه‌ساز انتخاب سویه‌های مقاوم می‌باشند فراهم خواهدنمود. از این طریق مکانیسم‌های بیان متقاطع میان ارگانل‌های سطحی، فراهم‌کننده بینش جامع‌تر و وسیع‌تر در مورد بیماری‌زایی باکتری اشرشیاکلی و حتی پیشگیری از آن خواهد بود. یافتن و درک صحیح تاثیر تک تک متابولیت های پروبیوتیکی در بیان و یا عدم بیان فاکتور های دخیل در پاتوژنز اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری، به خصوص در میان بیماران زن، امکان تخلیص و کاربرد فارماکولوژیک آنها را به عنوان روشی موثر در پیشگیری از آغاز چنین عفونت هایی دور از ذهن نمی‌نماید.

References

1. Abels BA. Urinary tract infections. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Bacteriol* 2011; **110**(2): 138-150.
2. Johnson J.R, Stamm W.E. Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 2002; **121**(13): 906-917.
3. Johnson J.R, Stell A.L. Extended Virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; **181**: 261-272.
4. Duguid JP, Old D.C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae, In: Beachey E. H. (editor.), Bacterial adherence, receptors and recognition. London, Chapman and Hall, 2009; PP: 185–216.
5. Klemm P. Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J* 1986; **5**(6): 1389-1393.
6. Gally DL, Bogan J.A, Eisenstein BI, Blomfield I.C. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* 1993; **175**(19): 6186-6193.
7. Snyder JA, Lloyd A.L, Lockatell C.V, Johnson D.E, Moblry HL. Role of phase variation of type 1 fimbriae in an uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect Immun* 2006; **74**(2): 1387-1393.
8. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003; **48**(3): 781-794.
9. Backhed F, Alsen B, Roche N, Angstrom J, Von Euler A, Breimer M.E, et.al. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* 2002; **277**(20): 18198-18205.
10. Schwan W.R., Lee J.L, Lenard F.A, Matthews B.T, Beck M.T. Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002; **70**(3): 1391-1402.
11. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; **39**(5): 1272–1284.
12. Lane M.C, Simms A.N, Mobley H.L. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; **189**(15): 5523-5533.
13. Xia Y, Gally D, Forsman-Semb K, Uhlin BE. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* 2000; **19**(7): 1450-1457.
14. Bryan A, Roesch P, Davis L, Moritz R, Pellett S, Welch RA. Regulation of type 1 fimbriae by unlinked fimB- and fimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *Infect Immune* 2006; **74**(2): 1072-1083.
15. Roe A.J, Currie C, Smith D.G.E, Gally D.L. Analysis of type 1 fimbriae expression in Vero toxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbial* 2001; **147**: 145-152.