(19)

جمهورية العراق

وزارة التخطيط

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية

براءة اختراع

(12)

(11) رقم البراءة : 6235　　　(51) التصنيف الدولي : A61K15/747

(21) رقم الطلب : 2019/683

(22) تاريخ تقديم الطلب : 2019/10/14　　　(52) التصنيف العراقي 6

(30) تاريخ طلب الأسبقية - بلد الأسبقية - رقم طلب الأسبقية

(45) تاريخ منح البراءة : 2020/5/6

(72) اسم المخترع وعنوانه :

1-م.م. مختار جواد كاظم الامام / بغداد -الغزالية -م ٦٦٧ ز ٢٢ د ١٥

2-أ.د. مي طالب فليح / جامعة بغداد -كلية العلوم - قسم علوم الحياة

(73) اسم صاحب البراءة : المذكورات اعلاه

(74) اسم الوكيل :

(54) تسمية الاختراع :

استخدام العصية اللبنية الحمضية في علاج الاسهال الدموي للانسان .

منحت هذه البراءة استنادا لأحكام المادة (21) من القانون براءة الأختراع والنماذج الصناعية رقم (65) لسنة 1970 المعدل وعلى مسؤولية المخترع.

د.حسـ... ي داود
...سجل
...الجهاز

اسم وعنوان الاختراع

استخدام العصية اللبنية الحمضية في علاج الاسهال الدموي للانسان

Use the *lactobacillus acidophilus* in treating of bloody diarrhea in human

الموجز

تم جمع مائتان وخمسون عينة من براز الاطفال تحت سن الخمس سنوات من بعض المستشفيات العراقية، حيث شخصت جميع العينات باستخدام الاختبارات الكيموحيوية, والصفات المظهرية على الاوساط الزرعية, وقد تبين ان نسبة 15.7% (33)عزلة من عزلات بكتريا *E.coli* شخصت كبكتريا مرضية وشكلت الايشيريشيا القولونية النزفية نسبة 21% بواقع (7) عزلات من البكتريا المرضية والتي تواجدت في المرضى الذين يعانون من الاسهال الدموي, وقد تم تاكيد النتائج اعتمادا على نظام VITEK. استخدم النمط المنفرد من تفاعل البلمرة متعدد السلسلة في التحري عن بعض الجينات بما في ذلك:*16SrRNA* و *eae*و*Stx1* و *Ler* المشفرة الى جزء من الوحدة الصغيرة للرايبوسوم، وبروتين الالتصاق وسموم الشيكلا ، وكذلك الجين المنظم، باستخدام بادئات صممت لهذا الغرض. وقد تبين ان جين *16SrRNA* موجود في كل العزلات بحجم (213 bp)، وكذلك جين *eae* متواجد بحجم(741) ، نتائج فحص PCR لسموم الشيكلا، اظهرت ان جين *Stx1* متواجد في جميع العزلات بحجم (446bp). واظهر الفحص ان الجين التنظيمي *Ler* تواجد في جميع العزلات (120bp). تم الحصول على العزلة القياسية .*Lactobacillus acidophilus* وتم اختبار الفعالية المضادة لمستخلص العصية اللبنية الخالي من الخلايا ضد الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157:H7 ، وتبين قدرة مستخلص العصية اللبنية *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية وبمختلف التخافيف بما في ذلك : (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). تم دراسة الصفات الخاصة بالمواد المضادة للميكروبات الموجودة في مستخلص عزلة *Lactobacillus acidophilus*واظهرت النتائج ان البكتريوسين هو الوحيد القادر على التاثير التثبيطي، بينما لم يظهر دور تثبيطي لكل من حامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين. التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلص *Lactobacillus acidophilus* قد تم تحديده من خلال استخدام تخافيف مختلفة وذلك لتحديد التركيز القادرعلى تثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية والذي بدوره ساعد في تحديد قيمةMIC الفرعية لأكمال الاختبار التجريبي، فأظهرت نتائج الدراسة الحالية،هنالك تاثيرتثبيطي معنوي (0.05 >) للعصية اللبنية *Lactobacillus acidophilus* ضد عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية*E.coli* O157:H7 وتبين ان التخفيف (1/8) يمثل (MIC) وهو اقل تخفيف قادر على تثبيط نمو البكتريا. تم قياس مستوى التعبير الجيني لتحديد السلوكيات لجين الفوعة (*Stx1*) وكذلك الجين التنظيمي (*Ler*) في عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية النمط*E.coli* O157:H7 وذلك بعد التعرض للاجهاد باستخدام العصية اللبنية الحمضية حيث اظهرت النتائج الحالية ان مستوى التعبير الجيني لجين الفوعة (*Stx1*) والجين التنظيمي (*Ler*) قد انخفض في عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية .

Summary

Two hundred and fifty specimens (stool) from children under five years for both sexes were collected in sterilized containers from some Iraqi hospitals, the result showed 15.7% (33) isolates identified as pathogenic *E.coli,* and showed 21% (7) isolates were identified as Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotype O157:H7 from patients with bloody diarrhea, the identification was confirmed by VITEK 2 system. Monoplex pattern of PCR was used also for detection different genes in (7) *Escherichia coli* O157:H7 isolates; include *16SrRNA, eae, Stx1,Ler* that encoded for ribosomal RNA, intimin, , shiga toxins, regulatory gene, with specific primers. Result showed all isolates of *E.coli* O157:H7 were positive for *16SrRNA* gene with (213bp), *eae* with (741bp), and *Stx1* gene appeared in all isolates with (446bp) amplicon sizes. Regulatory gene in all isolates with (120bp). Standard strain of *Lactobacillus acidophilus* was obtained from (American Type Culture Collection ATCC4356). Antimicrobial activity of the cell free culture supernatant (CFCS) from *lactobacillus acidophilus* was tested against the *E.coli* O157:H7. Result showed only cell free culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* has inhibitory activity against *E.coli* O157:H7 isolates with different dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Characterization of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus* were performed, Current result showed the bacteriocin was only has inhibitory effect against pathogenic *E.coli,* while organic acids and hydrogen peroxide hasn't any role in inhibition. Minimum inhibitory concentration (MIC) of cell free supernatants of *Lactobacillus acidophilus* was determined by employing different dilutions to detect the concentration of probiotic that will inhibit enterohemorrhagic *E.coli* serotypesO157:H7 growth, and helped in determination of sub-minimum inhibitory concentration (Sub-MIC) to complete the tests. Result showed there was significant inhibitory effect

($p < 0.05$) of *Lactobacillus acidophilus* against isolates, and the findings of this experiment revealed that (1/8) lowest dilution (MIC) was able to inhibit the bacterial growth of *E.coli* O157:H7 isolates. Gene expression level has been used in study to determinate the behaviors of virulence factor (Stx1) and regulatory factor (Ler) in enterohemorrhagic *E.coli (*O157:H7) after being under stressed with probiotic strain *(Lactobacillus acidophilus),* the result showed that virulence gene (*Stx1)* and regulatory gene (*Ler*) a decrease in expression of *E.coli* (O157:H7).

المفصل

المقدمة

تعتبر الايشيريشيا القولونية النزفية من اهم مسببات الامراض للانسان، لاسيما الاسهال الدموي لدى الاطفال والذي يتطورالى متلازمة انحلال الدم Haemolytic Ureaemic Syndrome (HUS) وتعتبر المسؤول الرئيسي لازدياد حالات الوفاة حول العالم **[1]**. ترجع ضراوة البكتريا الكبيرة الى قدرتها على افراز سموم قاتلة تسمى بسموم الشيكلا Shiga toxin (Stx) وكذلك انتاج عوامل اخرى تساعدها على الالتصاق بجسم المضيف مثل بروتين Intimin وكذلك افراز الجين التنظيمي *Ler* المسؤول عن نشاط اغلب عوامل الفوعة**[2] [3] [4].**

تستخدم العصيات اللبنية Lactobacilli بشكل اساسي في الصناعة والغذاء والمجالات المتعلقة بصحة الإنسان والحيوان فهي تساهم في إنتاج الأغذية المخمرة ، والحفاظ على الأغذية .ويتم تسويق بعض السلالات كبروبيوتيك ، حيث أنها تظهر فوائد صحية تتجاوز القيمة الغذائية الأساسية **[5] [6].**

الدراسات مستمرة حول استخدام بروبايوتك العصيات اللبنية في تطبيقات علاجية واسعة ومنها حالات الاسهال لدى مختلف الاعمار، وبما انه تأثير العصية اللبنية الحمضية *Lactobacillus acidophilus* على بكتريا الايشيريشيا القولونية المعوية النزفية (مظهريا وجينيا) لم تدرس محليا لذلك هدفت الدراسة الى:

1. عزل الايشيريشيا القولونية النزفية المعوية النمط المصلي *E.coli* O157:H7 محليا من حالات اسهال لدى الاطفال.

2. تحديد اكثر العوامل ضراوة للايشيريشيا القولونية النزفية.

3. تقييم تأثير بروبيوتيك العصية اللبنية الحمضية (العزلة القياسية) مظهريا على الايشيريشيا القولونية النزفية.

4. تحديد اقل تركيز من البروبيوتيك قادرعلى تثبيط نمو الايشيريشيا القولونية النزفية.

5. دراسة تأثير بروبيوتيك العصية اللبنية الحمضية على التعبير الجيني لاكثر عاملين ضراوة من عوامل فوعة الايشيريشيا القولونية النزفية.

الفن السابق

دراستنا الحالية اثبتت قدرة بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط نمو الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157:H7 من خلال تثبيط التعبير الجيني لجين *Stx1*المسؤول عن انتاج سموم الشيكا، وكذلك من خلال قدرة البروبيوتك على تثبيط التعبير الجيني للجين المنظم *Ler* لأغلب عوامل الفوعة ومن ضمنها عوامل الالتصاق في الايشيريشيا القولونية النزفية وبالتالي امكانية استخدام بروبيوتك العصية الحمضية اللبنية في علاج الايشيريشيا القولونية النزفية ومنع المراحل المتقدمة لاجتياح البكتريا للمضيف وتحطيم الاوعية الدموية للقولون. ونجدر الاشارة الى نسبة الامان العالية في استخدام البروبيوتك من قبل الانسان قد اثبتت من قبل بحوث ودراسات عالمية. وكذلك نجدر الاشارة الى اننا لم نلاحظ دراسة محلية او غير محلية سابقة قد وصفت الالية التي يقوم بها البروبيوتك في تثبيط الاسهال الناتج من الايشيريشيا القولونية النزفية*E.coli* O157:H7 ولكن هنالك بعض البحوث العالمية فقط، اكدت امكانية استخدام البروبيوتك في تخفيف الاسهال في الانسان بشكل عام ولم تذكر الالية الخاصة في تثبيط الاسهال الناتج من الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157:H7والتي ذكرت في دراستنا الحالية.

تفاصيل الفكرة

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات

تم جمع مائتان وخمسون عينة من براز الاطفال تحت سن الخمس سنوات للفترة من تشرين الاول 2018 الى شباط 2019 في حاويات معقمة من ثمانية مستشفيات في بغداد

2- تشخيص بكتريا الايشيريشيا القولونية النزفية المعوية

- الصفات التنموية والمظهرية حسب **Atlas *et al.*, [7]**

- الاختبارات البايوكيميائية

- **التصبيغ بصبغة كرام حسب[8] ,.Collee *et al***
- **فحص الكاتليز حسب [9] Harley and Prescott**
- **فحص الاوكسديز حسب [10] Vandepittie *et al*.,**
- **اختبار Voges-Proskauer حسب [9] Harley and Prescott)**
- **اختبار Methyl red حسب[11] ,Aneja**
- **فحص اليوريز حسب[8] ,.Collee *et al*.**
- **فحص استهلاك السترات حسب [12],MacFaddin**
- **فحص الاندول حسب [13] ,De**

3. التشخيص باستخدام نظام VITEK

4. التشخيص الجيني

ا. تم استخلاص عينات الحامض النووي (DNA) لجميع العزلات باستخدام (DNA purification kit) المصنع من قبل شركة Geneaid.

ب. تصميم البرايمرات

تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي للتحري عن وجود الجين التشخيصي 16SrRNA لجنس الـ *E.coli* وجينات الفوعة، *Stx1,Ler,eae* وذلك بتصميم برايمرات خاصة وفقا لـ NCBI

	Primer name	Sequence 5' ⟶ 3'	Product length	Origin
1.	EAE	F:GGGCGGTCAGATTCAGCATA R:CCATCACTGACTGTCGCACT	741bp	New
2.	STX1	F:GTGTTGCAGGGATCAGTCGT R:GACTCTTCCATCTGCCGGAC	446bp	New
3.	Ler	F:ACCGCAATGAAGAAGGGCAGA R:TTTCTTCTTCAGTGTCCTTCAC	120bp	New
4.	16SrRNA	F:GATGACCAGCCACACTGGAA R:GGAGTTAGCCGGTGCTTCTT	213pb	New

ج.PCR Amplification

تم مزج الحمض النووي والبرايمرات ومحلول PCR master mix معًا في انبوبة حجم إجمالي (20 µl) شملت 5µl من مزيج محلول PCR master mix +1 µl من كل برايمر + 2 µl من DNA المستخلص من البكتريا قيد الدراسة كقالب ثم أُكمل الحجم بالماء المقطر المعقم . تم استعمال المازج vortexed لغرض مزج الخليط ووضعه في جهاز PCR thermocycler لتضخيم قطعة الجين المستهدف.

وكانت ظروف تفاعل التسلسل كالتالي:

Reaction conditions of PCR for *eae*

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95ºC	3min	35
Denaturation	95ºC	1min	
Annealing	58.5ºC	40sec	
Extension	72 ºC	40sec	
Final Extension	72 ºC	5min	

Reaction conditions of PCR for *Stx1*

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 ºC	5min	35
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	61.6ºC	30sec	
Extension	72ºC	40sec	
Final Extension	72 ºC	5min	

Reaction conditions of PCR for *Ler*

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 ºC	5min	35
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	60ºC	30sec	
Extension	72ºC	40sec	
Final Extension	72 ºC	5min	

Reaction conditions of PCR for*16SrRNA*

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 ºC	5min	35
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	59.2ºC	30sec	
Extension	72ºC	40sec	
Final Extension	72 ºC	5min	

د. تحضير Agarose gel

تم تحضير هلام الاكروز بتركيز 2 ٪ ، وذلك بإذابة 2 غرام من مسحوق agarose في 100 مل من الدارئ TBE.وبعدها يمزج مع 5 µl من الصبغة الحمراء الامنة إلى الهلام مع الخلط ، سكب الاغاروز في جرة الهلام ببطئ لمنع تشكيل فقاعة ، ثم يتم تبريدها إلى 20 درجة مئوية. بعد سكب هلام الاغاروز يتم صنع العديد من الحفر بعناية باستخدام مشط في أحد جانبي الهلام على بعد 5-10 ملم من نهاية الهلام. بعد التصليب النهائي ، يتم إزالة المشط بعناية ، تم وضع الجرة في الخزان الكهربائي ، بعدها تم اضافة (5 µl) من DNA ladder في أول حفرة من هلام الاغاروز الكهربائي. تم خلط عينة الحمض النووي بصبغة تسمى (loading dye) ، بحيث تم خلط (7 µl) من كل عينة من الحمض النووي مع الصبغة (3 µl)، ثم تم نقل 10 ميكرولتر من الحمض النووي للتحميل بعناية ، ويتم إغلاق خزان الكهربائي مع غطاء خاص به ، وتم تشغيل التيار الكهربائي (70 فولت لمدة 1 ساعة) وبعد انتهاء الترحيل تم تصوير الهلام تحت جهاز transilluminator الأشعة فوق البنفسجية.

5.عزل العصية اللبنية الحمضية

تم توفير العصية اللبنية الحمضية القياسية السلالة المرمزة 4356 التابعة الى American Type Culture Collection (ATCC) من قبل شركة (Holisherb-USA).

6. اختبار الفعالية المضادة لمستخلص العصية اللبنية

اعتمادا على **Rammelsberg and Radler,[13]**

- تم تنمية العصية اللبنية الحمضية على وسط MRS لمدة 20 ساعة.
- باستخدام الطرد المركزي بسرعة 11000 لمدة عشر دقائق ، تم الحصول على رائق العصية اللبنية.
- تم تنمية الايشيريشيا القولونية النزفية على الوسط المغذي السائل ومن ثم تم زرعها على الوسط المغذي الصلب لمدة 24 ساعة.
- تم وضع 100 مايكروليتر في الحفر التي عملت في الوسط المغذي الصلب لبكتريا الايشيريشيا القولونية النزفية.حيث كل حفرة تمثل تخفيف من رائق العصية اللبنية الحمضية.
- تم قياس قطر منطقة التثبيط حول الحفر.

7. توصيف المواد المضادة الميكروبية في العصية اللبنية الحمضية

- تم تنمية العصية اللبنية الحمضية على وسط MRS وفي نفس الوقت تم تنمية الايشيريشيا القولونية النزفية على الوسط المغذي وحضت لمدة 24 ساعة بدرجة37 درجة مئوية.
- استخدم الطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند 4 درجات مئوية وذلك للحصول على رائق العصية اللبنية وبالتالي تم تقسيمه في ثلاثة أنابيب وعولج الأنبوب الأول بانزيم التربسين لتحديد إنتاج البكتريوسين و تمت معالجة الأنبوب الثاني بـ 0.5 ملغ من انزيم الكاتاليز لتحديد إنتاج بيروكسيد الهيدروجين ، وتم ضبط الأنبوب الثالث على درجة الحموضة 6.5 ± 0.1 ، وتم استخدام الأنبوب الرابع كأنبوب سيطرة موجبة (غير معالج).
- تم اختبار تأثير رائق العصية اللبنية على نمو الايشيريشيا القولونية النزفية.

8.تحديد الحد الادنى لتركيز البروبايوتك المثبط للايشيريشيا القولونية النزفية (MIC)

اعتمادا على Wiegand *et al.*,[15]

تعرف التركيزات الدنيا المثبطة (MICs) بأنها أدنى تركيز لمضادات الميكروبات تستطيع ان تمنع نمو الكائنات الحية الدقيقة بعد الحضانة .وتم تنفيذ التجربة على النحو التالي:

- إجراء التخفيفات التسلسلية (1/2 ، 1/4 ، 1/8 ، 1/16 ، 1/32) من بروبايوتك العصية اللبنية مع الوسط المغذي للايشيريشيا القولونية النزفية داخل أنابيب معقمة .
- تم تلقيح كل انبوب بالايشيريشيا القولونية النزفية بحجم 200 مايكروليتر،مع الحضانة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

- انانبيب السيطرة قسمت الى قسمين: انابيب سيطرة موجبة تحتوي على الوسط السائل المغذي والملقح بالايشيريشيا القولونية وانابيب سيطرة سالبة تحتوي على الوسط السائل المغذي فقط.

9. التعبير الجيني

ا. استخلاص RNA

تم استخلاص عينات الحامض النووي (RNA) باستخدام محاليل مصنعة من قبل شركة Promega الامريكية.

ب. Quantitative -PCR

تم مزج الحمض النووي والبرايمرات ومحلول q-PCR master mix معًا في انبوبة حجم إجمال (10 µl) ووضعت في جهاز q-PCR thermocycler لتضخيم قطعة الجين المستهدف

Components of q-PCR reaction

Components	Volumes
q-PCR master mix	**5**
RT mix	**0.25**
MgCl2	**0.25**
Forward primer	**0.5**
Reverse primer	**0.5**
Nuclease free water	**2.5**
RNA	**1**
Total volume	**10**

Reaction conditions of RT-PCR for*16srRNA* gene

Stage	Temperature	Time	Cycle
RT. Enzyme activation	37 ºC	15min	
Initial denaturation	95 ºC	10min	51
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	59ºC	30sec	
Extension	72ºC	30sec	
Melt on Green	72 ºC	5min	

Reaction conditions of RT-PCR for *Ler* gene

Stage	Temperature	Time	Cycle
RT. Enzyme activation	37 ºC	15min	
Initial denaturation	95 ºC	10min	51
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	60ºC	30sec	
Extension	72ºC	30sec	
Melt on Green	72 ºC	5min	

Reaction conditions of RT-PCR for *STX1* gene

Stage	Temperature	Time	Cycle
RT. Enzyme activation	37 ºC	15min	
Initial denaturation	95 ºC	10min	51
Denaturation	95 ºC	30sec	
Annealing	61.6ºC	30sec	
Extension	72ºC	30sec	
Melt on Green	72 ºC	5min	

يتم حساب التعبير الجيني اعتمادا على المعادلة التالية:

ΔCt = Ct of tested gene - Ct of housekeeping gene

ΔΔCt = ΔCt (sample) – ΔCt (Calibrator)

Fold changes = 2^{-} ΔΔCt

اجريت الفحوصات الكلاسيكية التشخيصية على العزلات البكتيرية المعزولة من مرضى مصابين بالاسهال الدموي وقد تم تشخيص 33 عزلة من الايشيريشيا القولونية المعوية المرضية وبعد اجراء الفحوصات الجينية والزراعة على الاوساط الخاصة، تم الكشف عن وجود 7 عزلات من الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157:H7وقد تم تأكيد الفحوصات باستخدام نظام الفايتك وباستخدم النمط المنفرد من تفاعل البلمرة متعدد السلسلة في التحري عن بعض الجينات بما في ذلك:*16SrRNA* و*eae* و*Stx1* و *Ler* المشفرة الى جزء من الوحدة الصغيرة للرايبوسوم، وبروتين الالتصاق وسموم الشيكا ، وكذلك الجين المنظم، باستخدام بادئات صممت لهذا الغرض تبين ان جين *16SrRNA* موجود في كل العزلات بحجم (213 bp)، وكذلك جين *eae* متواجد بحجم(741) ، نتائج فحص PCR لسموم الشيكا، اظهرت ان جين *Stx1* متواجد في جميع العزلات بحجم (446bp). واظهر الفحص ان الجين التنظيمي *Ler* تواجد في جميع العزلات(120bp). يعتبر سم الشيكا الذي يفرز من قبل الايشيريشيا القولونية النزفية من اكثر عوامل الفوعة ضراوة حيث تستخدمه البكتريا لمهاجمة جسم المضيف ويسبب تحطم الاوعية الشعرية الصغيرة في الغشاء المخاطي للقولون وبالتالي يسبب الوفاة، لذلك ركزت دراستنا الحالية على التحديد الجزيئي لهذا العامل بتصميم برايمر خاص لتشخيص الجين المسؤول عن افرازه وكذلك دراسة التعبير الجيني له بعد تعرضه للاجهاد من البروبيوتك. الجين التنظيمي *Ler* المنظم ل 41 من جينات الفوعة في الايشيريشيا القولونية النزفية، من اولويات دراستنا في تشخيصه جزيئيا وكذلك تحديد التعبير الجيني له بعد التعرض للبروبيوتك. وقد تمكنا من الحصول على العزلة القياسية *Lactobacillus acidophilus*. التابعة الى American Type Culture Collection وتم اختبار الفعالية المضادة لمستخلص العصية اللبنية الخالي من الخلايا ضد الايشيريشيا القولونية النزفية ، وتبين قدرة مستخلص العصية اللبنية *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية وبمختلف التخافيف بما في ذلك :(1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). تم دراسة الصفات الخاصة بالمواد المضادة للميكروبات الموجودة في مستخلص عزلة *Lactobacillus acidophilus*واظهرت النتائج ان البكتريوسين هو الوحيد القادر على التاثير التثبيطي لبكتريا *E.coli* المرضية، بينما لم يظهر دور تثبيطي لكل من حامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين. التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلص*Lactobacillus acidophilus* قد تم تحديده من خلال استخدام تخافيف مختلفة وذلك لتحديد التركيز القادرعلى تثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية والذي بدوره ساعد في تحديد قيمةMIC الفرعية لأكمال الاختبار التجريبي، فأظهرت نتائج الدراسة الحالية،هنالك تاثيرتثبيطي معنوي (0.05 >) للعصية اللبنية *Lactobacillus acidophilus* ضد عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية وتبين ان التخفيف (1/8) يمثل (MIC) وهو اقل تخفيف قادر على تثبيط نمو البكتريا. وبأستخدام تقنية RT-PCR تم قياس مستوى التعبير الجيني لتحديد السلوكيات

لجين الفوعة (*Stx1*) وكذلك الجين التنظيمي (*Ler*) في عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية وذلك بعد التعرض للاجهاد باستخدام العصية اللبنية الحمضية حيث اظهرت النتائج الحالية ان مستوى التعبير الجيني لجين الفوعة (*Stx1*) والجين التنظيمي (*Ler*) قد انخفض في عزلات الايشيريشيا القولونية النزفية

اظهرت نتائجنا الحالية على قدرة بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط نمو الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157:H7 من خلال تثبيط التعبير الجيني لجين *Stx1*المسؤول عن انتاج سموم الشيكا، وكذلك من خلال قدرة البروبيوتك على تثبيط التعبير الجيني للجين المنظم *Ler* لأغلب عوامل الفوعة ومن ضمنها عوامل الالتصاق في الايشيريشيا القولونية النزفية وبالتالي امكانية استخدام بروبيوتك العصية الحمضية اللبنية في علاج الايشيريشيا القولونية النزفية ومنع المراحل المتقدمة لاجتياح البكتريا للمضيف وتحطيم الاوعية الدموية للقولون. ونجدر الاشارة الى نسبة الامان العالية في استخدام البروبيوتك من قبل الانسان قد اثبتت من قبل بحوث ودراسات عالمية. وكذلك نجدر الاشارة الى اننا لم نلاحظ دراسة محلية او غير محلية قد وصفت الالية التي يقوم بها البروبيوتك في تثبيط الاسهال الناتج من الايشيريشيا القولونية النزفية*E.coli* O157:H7 ولكن وصفت بعض البحوث العالمية امكانية استخدام البروبيوتك في تخفيف الاسهال في الانسان بشكل عام.

التطبيقات

1. الدراسة الحالية توصلت الى امكانية استخدام بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية في تثبيط التعبير الجيني لسموم الشيكا والجين المنظم لعوامل الفوعة الاخرى في الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157: H7 ،والذي يعتبر ذو اهمية بالغة طبيا في علاج الاسهال الدموي.حيث بالامكان استخدام المعزز الحيوي من قبل الدوائر الصحية لعلاج حالات الاصابة بالاسهال الناتج من بكتريا الايشيريشيا القولونية النزفية وممكن ان يكون بديلا عن المضادات الحياتية، وكذلك لنسبة الامان العالية في استخدام المعزز الحيوي (بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية).

المميزات

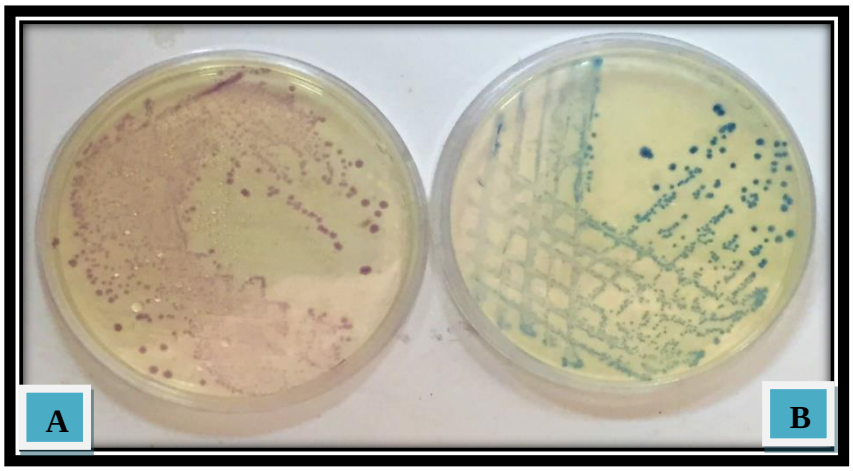
1.الدراسة الحالية توصلت الى امكانية استخدام بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية في تثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية المسببة للاسهال الدموي من خلال تثبيط التعبير الجيني لسم الشيكا والجين التنظيمي المسؤول عن اغلب عوامل الفوعة،، وبالتالي امكانية استخدام المعزز الحيوي العصية اللبنية الحمضية كبديل للمضادات الحيوية المستخدمة في تثبيط البكتريا ، حيث ان البحوث السابقة قد استخدمت المضادات الحيوية لتثبيط الايشيريشيا القولونية النزفية وقد اتثبت في السنوات الاخيرة الى المقاومة العالية لهذا النوع من البكتريا لاغلب المضادات الحيوية وذلك لاسباب عديدة ومن اهمها الاستخدام الخاطئ للمضادات،وبالتالي قد تطورت مقاومة البكتريا واصبحت اكثر ضراوة وفي نفس الوقت لم تستطيع ان تقاوم المعزز الحيوي (البروبيوتك) وذلك لتأثيره المباشر على التعبير الجيني لعوامل الفوعة والجين التنظيمي لهذه العوامل ،، ويعتبر استخدام المعزز الحيوي مرغوبا جدااا وذلك لنسبة الامان العالية وخلوه من اي اعراض جانبية وامكانية استخدامه مع مختلف الاعمار.

عناصر الحماية

1. **استخدام العصية اللبنية الحمضية في علاج الاسهال الدموي للانسان**
2. **اشارة الى عنصر الحماية الاول (تم عزل بكتريا الايشيريشيا القولونية النزفية المعوية النمط المصلي*E.coli* O157:H7 محليا).**
3. **اشارة الى عنصر الحماية الاول (التحديد الجزيئي لاكثر عوامل الفوعة ضراوة للايشيريشيا القولونية النمط المصلي O157: H7وبأستخدام برايمرات صممت شخصيا دون الاعتماد على بحوث سابقة) .**
4. **اشارة الى عنصر الحماية الاول (الكشف عن قدرة بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية في تثبيط نمو الايشيريشيا القولونية النمط المصلي*E.coli* O157: H7).**
5. **اشارة الى عنصر الحماية الاول (الكشف عن قدرة بروبيوتك العصية اللبنية الحمضية في تثبيط التعبير الجيني لسموم الشيكا والجين المنظم لعوامل الفوعة الاخرى في الايشيريشيا القولونية النزفية *E.coli* O157: H7 ،والذي يعد ذو اهمية بالغة طبيا في علاج الاسهال الدموي).**

الرسومات التوضيحية

1. شكل يوضح عزلة الايشريشيا القولونية على وسط Chrome agar O157



A- EHEC serotype O157

B- EHEC non O157

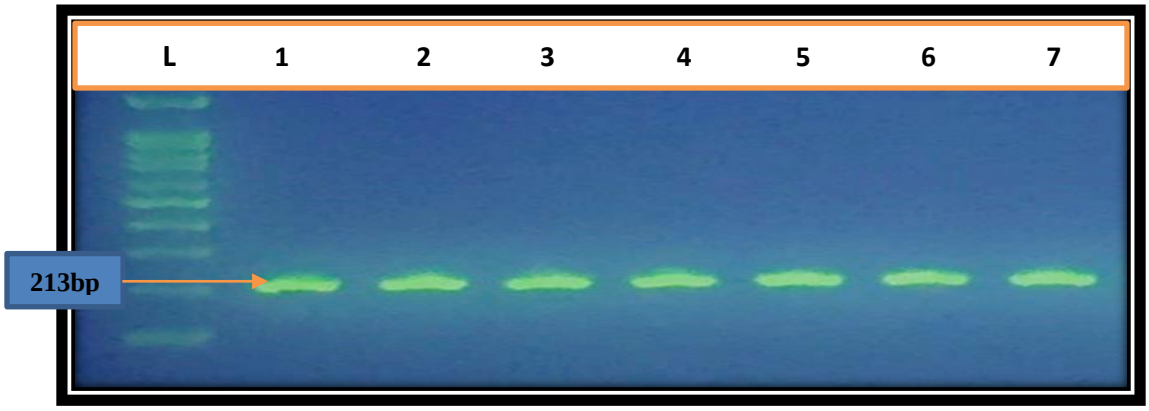
2. جدول يوضح تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA لعزلات الايشيريشيا القولونية النزفية.

Number of isolates	Concentration ng/µl	Purity
1	120.4	1.9
2	90.5	1.8
3	338.3	1.8
4	284	1.8
5	300.7	1.9
6	282.7	1.8
7	397.2	1.8

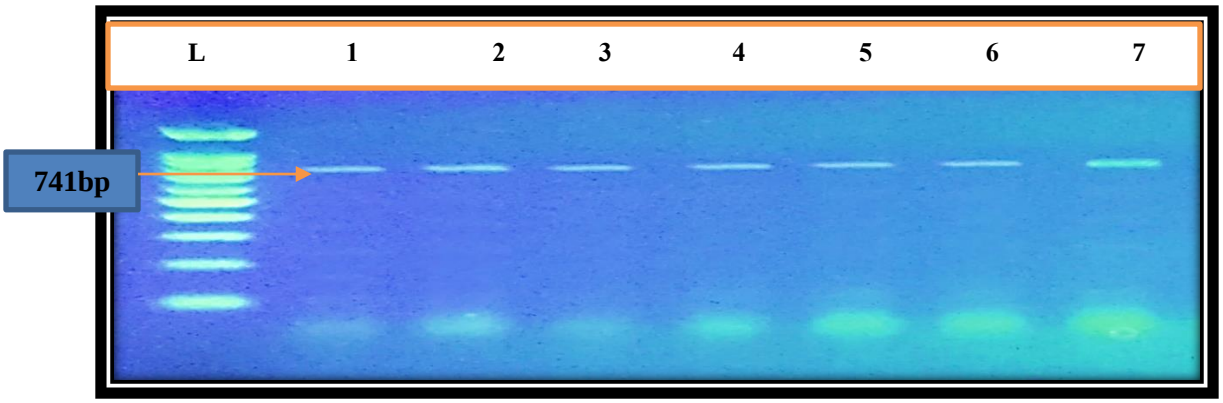
3.جدول يبين نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلات المنتخبة

Id	Biochemical tests	Results
1	Gram stain	_
2	Green metallic sheen producing	+
3	Citrate utilization	-
4	Catalase production	+
5	Lactose fermentation	+
6	Indole production	+
7	Voges-Proskauer test	-
8	Methyl red	+
9	Motility	+
10	Oxidase production	_
11	Kligler Iron Agar (KIA)	A/A, with gas , No H_2S
12	Urease production	-
13	Hemolysis	α,B and gamma hemolysis

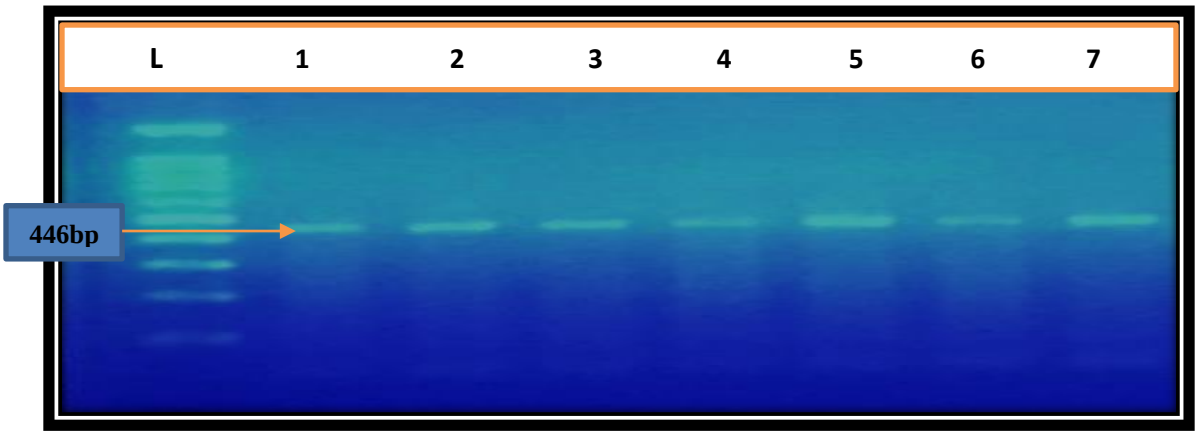
4 .شكل يوضح التشخيص بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي بتحديد جين *16SrRNA*



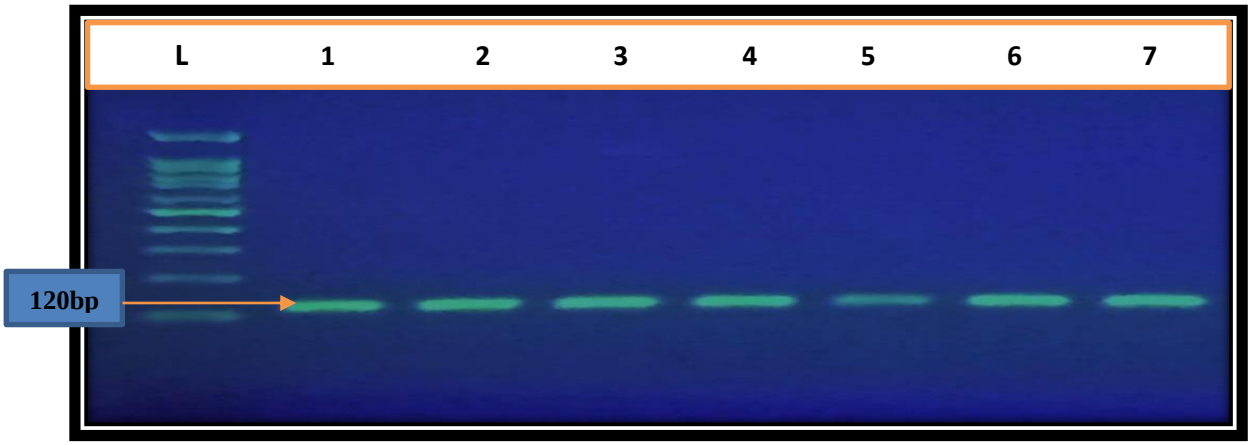
5. شكل يوضح التشخيص بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي بتحديد جين *eae*



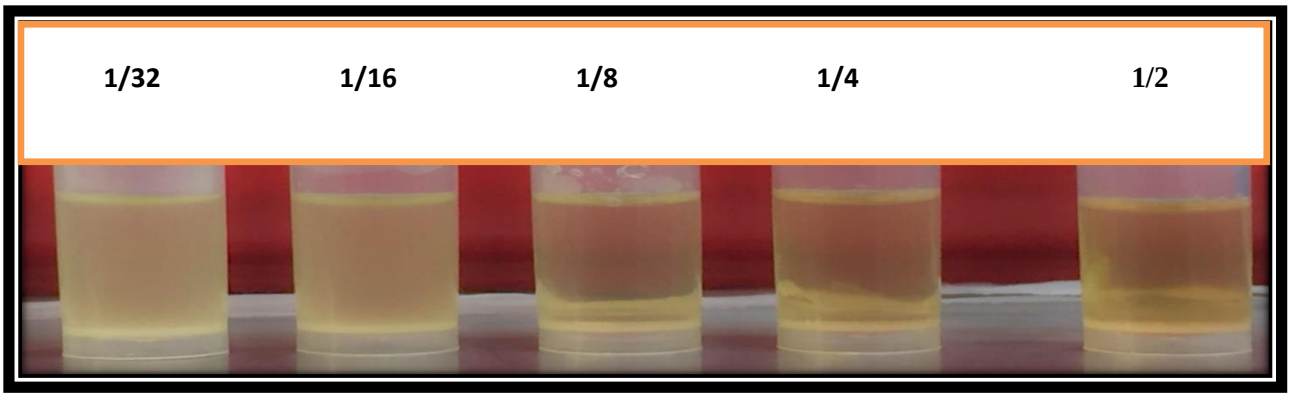
6.شكل يوضح التشخيص بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي بتحديد جين *STX1*



7.شكل يوضح التشخيص بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي بتحديد جين *Ler*



8.شكل يوضح التركيز الادنى من البروبيوتك القادر على التثبيط (MIC)



9 .شكل يوضح انخفاض التعبير الجيني لجين *STX1* بعد التعرض لتأثير البروبيوتك

E.coli isolates	H.K.	*Stx1*	ΔCt	ΔΔCt	folding
1B	18.01	20.08	2.07	0.00	1.00
2B	11.92	21.5	9.58	00.0	1.00
1	17.27	20.56	3.30	1.23	0.43
2	10.61	21.37	10.76	1.18	0.44

*(B) is mean before treating with *lactobacillus acidophilus*

10 .شكل يوضح انخفاض التعبير الجيني لجين *Ler* بعد التعرض لتأثير البروبيوتك

E.coli isolates	H.K.	*Ler*	ΔCt	ΔΔCt	folding
1B	18.01	22.2	4.1	0.00	1.00
2B	11.92	16.7	8.3	0.00	1.00
1	17.27	22.1	4.9	0.8	0.5
2	10.61	18.9	4.8	3.5	0.08

*(B) is mean before treating with *lactobacillus acidophilus*

المصادر

1. **Saberianfar**, R., Chin-Fatt, A., Henry, K. A., Scott, A., Topp, E., & Menassa, R. (2019). Plant-produced chimeric VHH-sIgA against enterohemorrhagic E. coli intimin shows cross-serotype inhibition of bacterial adhesion to epithelial cells. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 270.
2. **Cheng**, C., Balasubramanian, S., Fekete, A., Krischke, M., Mueller, M. J., Hentschel, U., ... & Abdelmohsen, U. R. (2017). Inhibitory potential of strepthonium A against Shiga toxin production in enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) strain EDL933. *Natural product research*, *31*(23), 2818-2823.
3. **Login,** F. H., Jensen, H. H., Pedersen, G. A., Amieva, M. R., & Nejsum, L. N. (2018). The soluble extracellular domain of E-cadherin interferes with EPEC adherence via interaction with the Tir: intimin complex. *The FASEB Journal*, *32*(12), 6860-6868.
4. **Franzin,** F. M., & Sircili, M. P. (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorragic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *BioMed research international*, *2015*.
5. **Stefanovic,** E., Kilcawley, K. N., Roces, C., Rea, M. C., O'Sullivan, M., Sheehan, J. J., & McAuliffe, O. (2018). Evaluation of the potential of Lactobacillus paracasei adjuncts for flavor compounds development and diversification in short-aged cheddar cheese. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1506.
6. **Zotta,** T., Parente, E., & Ricciardi, A. (2017). Aerobic metabolism in the genus Lactobacillus: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal of applied microbiology*, *122*(4), 857-869.
7. **Atlas**, R. M., Brown, A. E., & Parks, L. C. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby-Year Book. *Inc., USA*.

8. **Collee,** J.G.; Miles, R.S. and Watt, B. (1996) .Test for The Identification of Bacteria. P.131-149. In, J.G. Collee; A.G. Fraser; B.P. Marmion; and A. Simmons (Eds.). Mackie and McCarteny Practical Medical Microbiology. 14th.ed. Churchill Livingstone, New York.

9. **Harley**, J. P., & Prescott, L. M. (2002). Bacterial morphology and staining. *Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York*, 31-36.
10. **Vandepitte**, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heuck, C. C., & Heuck, C. C. (2003). *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. World Health Organization.
11. **Aneja**, K. R. (2007). *Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology*. New Age International.
12. **MacFaddin**. (2000).Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
13. **De**, R. K. (2007). Diagnostic Microbiology. Jaypee Brothers. New Delhi.
14. **Rammelsberg**, M., & Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, *69*(2), 177-184.
15. **Wiegand**, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, *3*(2), 163.