Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۳، ۳۱۵-۳۰۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,3: 309-315, 2015

اثر کلی سین بر روی باکتری اشریشیا کلی F5 (K99) در موش

فاطمه گلستان[1] یحیی تهمتن[2*] الهام معظمیان[3]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم- ایران
۲) بخش باکتری شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، شیراز- ایران
۳) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز- ایران

(دریافت مقاله: ۱۹ فروردین ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۶ خرداد ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: فیمبریه باکتری F5 (K99) *E. coli* مهمترین و شایعترین عامل چسبنده‌ای که تاکنون برروی سویه‌های اشریشیا کلی درگیر در اسهال گوساله‌هاشناخته شده است. این باکتری از طریق توکسین‌های مقاوم حرارتی (ST) سبب اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده می‌شود. با افزایش نگرانی در مورد گسترش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، یافتن راه حل جایگزین مانند استفاده از کلی سین‌ها ضرورت دارد. کلی سین‌ها ترکیبات آنتی باکتریایی هستند که بوسیله سویه اشریشیا کلی تولید می‌شوند و دارای خاصیت کشندگی بر روی باکتری‌های همان نوع یا باکتری‌های مشابه هستند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر کلی سین برای کنترل عفونت باکتریایی F5 (K99) *E. coli* و اثر بخشی آن در مدل موش آزمایشگاهی می‌باشد. **روش کار:** موش‌هایی که آنتی بیوتیک مصرف کردند به ۴ گروه تقسیم شدند. موش‌های گروه اول بدون تلقیح هیچ گونه باکتری و محلول کلی سین نگه داری شدند. به موش‌های گروه دوم فقط ۰/۵ mL از محلول کلی سین خورانده شد. به هر یک از موش‌های گروه سوم تنها ۰/۵ mL از سوسپانسیون باکتری F5 (K99) *E. coli* خورانده شد. نهایتاً موش‌های گروه چهارم ابتدا ۰/۵ mL از محلول کلی سین خورانده شد و بلافاصله بعد از خوراندن محلول کلی سین به این موش‌ها ۰/۵ mL از سوسپانسیون باکتری F5 (K99) *E. coli* خورانده شد. از موش‌های هر ۴ گروه ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ روز بعد از تلقیح، نمونه مدفوع جهت شمارش باکتری گرفته شد. **نتایج:** کلی سین اثر مهاری بر روی باکتری F5 (K99) *E. coli* داشت. تفاوت معنی‌داری بین میزان باکتری بدست آمده از مدفوع موش‌های گروه چهارم نسبت به گروه سوم بدست آمد. **نتیجه گیری نهائی:** بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر نتیجه گرفته می‌شود که کلی سین‌ها نقش مهمی در مهار باکتری F5 (K99) *E. coli* دارند. همچنین با مطالعه بیشتر کلی سین توانائی جایگزینی آنتی بیوتیک‌های رایج را دارد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کلی F5(K99)، کلی سین، باکتریوسین

مقدمه

مهمترین و شایعترین عامل چسبنده ای که تاکنون برروی سویه‌های اشریشیا کلی درگیر در اسهال گوساله‌ها شناخته شده است ، فاکتور F5(K99) می‌باشد که امکان اتصال باکتری به سطوح اپیتلیال سلول‌های روده را فراهم می‌سازد(۱۵). فاکتور F5 (K99) که از واحدهای تکراری با وزن مولکولی ۱۸/۲ kd تشکیل شده، قادر است که به ماده N– گلیکولیل نورامینیک اسید متصل شود. این ترکیب در سطح سلول‌های روده گاو حضور داشته و به عنوان رسپتور برای فاکتور F5 (K99) به کار می‌رود (۱۲). بنابراین باکتری‌ها قادرند بطور مؤثر STa که بطور معمول تولید می‌شوند را انتقال دهند که بدین وسیله دفع وسیع مایعات را القاء می‌کنند و کاهش آب و الکترولیت‌ها به سرعت منجر به دهیدراتاسیون می‌شود(۱۰). درمان متعارف آنتی بیوتیکی برای پیشگیری و درمان عفونت‌های روده ای سال‌هاست که در صنعت دامپروری مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۶). با افزایش نگرانی در مورد گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی این انتظار می‌رود که استفاده از آنتی بیوتیک‌ها مدیریت شده باشد. در واقع تحقیقات به سمتی کشیده شده است که راه حلی جایگزین بجای درمان بوسیله آنتی بیوتیک‌های متعارف یافت شود. بسیاری از تحقیقات به سمت استفاده از باکتریوسین‌ها متوجه شده است. باکتریوسین‌ها ترکیباتی پروتئینی هستند که بوسیله باکتری‌ها تولید می‌شوند و دارای فعالیت آنتی باکتریایی هستند. یک گروه از باکتریوسین‌ها، کلی سین‌ها هستند که بوسیله باکتری اشریشیا کلی تولید می‌شوند و بر روی باکتری اشریشیا کلی یا سویه‌های مشابه نزدیک به آن از اعضای خانواده انتروباکتریاسه تأثیر دارد (۴،۱۴). با توجه به فعالیت ضد میکروبی آن و این که کلی سین توسط بافت‌های بدن حیوان جذب نمی‌شود شاید می‌تواند بعنوان راه حلی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در حیوانات باشد(۵). هدف از این مطالعه بررسی محلول کلی سین به عنوان روشی برای درمان عفونت باکتریایی F5 (K99) *E. coli* در مدل موش آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

باکتری‌های اشریشیا کلی F5 (K99) جهت بیان بیشتر فیمبریه F5 (K99) در محیط کشت مایع مینکا کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۶۰۰nm، OD سوسپانسیون باکتری را روی ۰/۴ تنظیم گردید. در این OD میزان باکتری معادل با 5×10^8 CFU/mL می‌باشد.

آماده سازی محلول کلی سین: روش Oudega و Pugsley با ایجاد تغییراتی برای آماده‌سازی محلول کلی سین مورد استفاده قرار گرفته شد باکتری‌های کلی سینوژنیک از مطالعات قبل بدست آمد (۱۱). این باکتری‌ها

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۷۱-۳۶۲۴۰۳۳۱، نمابر: ۰۷۱-۳۶۲۴۰۲۰۱ Email: yahyatahamtan@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

از نمونه‌های دستگاه گوارش گاو تهیه شده است. پس از مراحل جداسازی، با استفاده از تست مولکولی PCR سویه‌های کولیسینوژنیک تشخیص داده شدند. باکتریهای مذکور در محیط TSB broth کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. پس از ۲۴ساعت، ۵ mL از سوسپانسیون باکتری رشد کرده به ۵۰ mL محیط TSB broth جدید تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷°C شیکردار (۱۶۰ rpm) قرار داده شد. هنگامی که OD در طول موج ۶۰۰nm به ۰/۴ رسید، محلول میتومایسین C (۲۵۰mL/µg) جهت القای تولید کلی سین به سوسپانسیون باکتری اضافه شد و غلظت‌نهایی به ۵۰۰ng/mL رسید. بعد از یک ساعت انکوباسیون، محلول کشت باکتری به مدت ۱۰min در ۱۰/۰۰۰ × g سانتریفیوژ شد. ۵ mL بافر فسفات سالین به رسوب باکتری تلقیح و سپس سونیکه شد. پس از سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰min در ۱۰/۰۰۰ × g، محلول رویی بوسیله فیلتر ۰/۲۲µm فیلتر شد(۹).

خوراندن باکتری‌های کشت داده شده به موش‌های بالغ: در این بررسی ۴۰ موش BALB/c با سن ۴ هفته و وزن ۲۲g-۱۸ استفاده گردید. هشت موش از ۴۰ موش تحت عنوان گروه A بدون مصرف آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات در یک قفس جداگانه نگهداری شد. ۳۲ موش باقی مانده تحت عنوان گروه B در یک قفس قرار داده شد و به میزان ۱۰mg/l آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات جهت از بین بردن باکتری‌های ساکن دستگاه گوارش آنها به آب مصرفی موش‌ها اضافه شد. ۲۴ ساعت پس از مصرف آنتی بیوتیک، آنتی بیوتیک تراپی قطع و از نمونه مدفوع موش‌های گروه B بطور جداگانه روی پلیت‌های EMB آگار کشت داده شد. در حقیقت مقایسه نمونه مدفوع موش‌های گروه A و گروه B نشان دهنده تأثیر آنتی بیوتیک مصرفی در گروه B می‌باشد.

۳۲ موش موجود در گروه B به ۴ گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۸ موش بود. هشت موش موجود در گروه اول (گروه کنترل) در یک قفس بطور جداگانه بدون تلقیح هیچ گونه باکتری نگهداری شدند. به موش‌های گروه دوم فقط ۰/۵mL از محلول کلی سین خورانده شد. به هر یک از موش‌های گروه سوم تنها ۰/۵mL از سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی K۹۹(F۵) (۱۰۸ CFU/mL) خورانده شد. نهایتاً به موش‌های گروه چهارم ابتدا ۰/۵mL از محلول کلی سین خورانده شد و بلافاصله بعد از خوراندن محلول کلی سین، به این موش‌ها ۰/۵mL از سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) داده شد.

از موش‌های هر۴ گروه ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ روز بعد از تلقیح، نمونه مدفوع گرفته شد. ۱g از نمونه مدفوع هر موش به طور جداگانه به ۱mL از بافر فسفات سالین منتقل شد. از نمونه‌های مدفوع ۳۲ موش موجود در ۴ گروه رقت ده تایی (۱:۱۰) در بافر فسفات سالین آماده گردید.

از نمونه‌های مدفوع موش‌ها هر کدام جداگانه بطور کامل و بدون تهیه رقت نیز روی محیط EMB آگار کشت داده شد. همچنین ۱۰۰µl از رقت تهیه شده (۷-۱۰ تا ۹-۱۰) مربوط به نمونه مدفوع هر موش بطور جداگانه روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴h در انکوباتور ۳۷°C درجه قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌ها شمارش شد.

موش‌های همه گروه‌ها بلحاظ وجود یا عدم وجود اسهال بررسی شدند.

مطالعات بافت شناسی: از هر گروه، یک موش جهت مطالعات بافت شناسی پس از بیهوشی، کشته و کالبد گشایی شدند و مورد بررسی قرار گرفت. سپس قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش از جمله معده، روده کوچک و روده بزرگ به مدت ۲۴ ساعت در بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. بعد از ۲۴ ساعت در پارافین قرار داده شد و بعد بوسیله رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند و سپس بوسیله پاتولوژیست با استفاده از میکروسکوپ نوری برای مشاهده عفونت و وجود یا عدم وجود ضایعات مورد بررسی قرار گرفتند.

با توجه به سویه باکتری ایکولی کولیسینوژنیک و همچنین \شریشیا کولای F۵ (K۹۹) جدا شده از مطالعات قبل، این آزمایش‌ها قابلیت تکرار داشتند.

آنالیز آماری: نتایج این مطالعه بر اساس نرم افزار SPSS ۱۲/۵ با استفاده از روش ANOVA مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

نتایج

مقایسه نمونه مدفوع موش‌های گروه A (بدون مصرف آنتی بیوتیک) و موش‌های گروه B (با مصرف آنتی بیوتیک) نشان دهنده تأثیر مصرف آنتی بیوتیک در موش‌های گروه B می‌باشد که باکتری‌های ساکن دستگاه گوارشی آنها با مصرف آنتی بیوتیک از بین رفتند. به عبارت دیگر، از نمونه مدفوع موش‌های گروه B باکتری جدا نشد این در حالی بود که از نمونه مدفوع موش‌های گروه A که آنتی بیوتیک مصرف نکرده بودند بر روی محیط EMB آگار باکتری‌های ساکن دستگاه گوارش رشد کردند. تفاوت بین این دو گروه کاملاً معنی‌دار بدست آمد ($p>0/05$).

نمونه مدفوع از موش‌های گروه اول در گروه B که آنتی بیوتیک مصرف کرده‌اند اما باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) و محلول کلی سین به آنها خورانده نشد، نشان از آن است که بعد از مصرف آنتی بیوتیک، در طول مدت زمان انجام بررسی هیچ گونه باکتری ساکن دستگاه گوارش در آنها پیدا نشد، پس با مقایسه نمونه مدفوع این گروه در مدت زمان انجام آزمایش با نمونه مدفوع موش‌های گروه سوم (فقط سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی (F۵) K۹۹ دریافت کردند) و چهارم (سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) و محلول کلی سین همزمان دریافت کردند) می‌توان اطمینان حاصل کرد باکتری‌های بازیافت شده از نمونه مدفوع موش‌های این دو گروه باکتری‌های \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) خورانده شده به این موش‌ها بوده است. ارتباط آماری معنی‌داری بین موش‌های گروه اول با گروه‌های سوم و چهارم گروه B بدست آمد ($p>0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. شمارش باکتری F۵ (K۹۹) *E.coli* در گروه سوم (موش‌هایی که فقط F۵ (K۹۹) *E.coli* دریافت کرده‌اند) و در گروه چهارم (موش‌هایی که F۵ (K۹۹) *E.coli* و کلی سین همزمان دریافت کرده‌اند).

	شمارش F۵ (K۹۹) *E.coli* ($\log_{۱۰}$ CFU $g^{-۱}$)																	
	گروه سوم (موش‌هایی که فقط F۵ (K۹۹) *E.coli* دریافت کردند)									گروه چهارم (موش‌هایی که F۵ (K۹۹) *E.coli* و کلی سین همزمان دریافت کردند)								
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین
روز																		
۱	۵/۶	۵/۴	۵/۵	۵/۳	۵/۷	۵/۲	۶/۱	۵/۳	۵/۵	۴/۹	۴/۴	۵	۴/۵	۴/۹	۴/۸	۵	۴/۹	۴/۸
۲	۴/۳	۴/۶	۴/۲	۴/۵	۴/۷	۴/۱	۴/۴	۴	۴/۳۵	۳/۷	۳/۴	۳/۶	۳/۳	۳/۵	۳/۶	۳/۳	۳/۴	۳/۵
۳	۴/۱	۴	۳/۹	۳/۶	۳/۷	۳/۸	۳/۵	۳/۶	۳/۸۵	۳/۹	۳/۶	۳/۸	۳/۱	۳/۴	۳/۲	۳/۱	۳	۳/۳۶
۴	۳/۳	۳/۷	۳/۴	۳/۳	۳/۶	۳/۵	۳/۸	۳/۲	۳/۵	۳	۲/۶	۲/۷	۲/۱	۱/۹	۱/۸	۲/۲	۲/۳	۲/۳
۵	۳/۲	۳	۳/۱	۲/۹	۳/۳	۲/۸	۲/۹	۲/۹	۳	۲/۲	۲/۱	۲	۱/۸	۱/۷	۱/۵	۱/۴	۱/۳	۱/۶
۶	۲/۷	۲/۵	۲/۶	۲/۴	۲/۸	۲/۶	۲/۴	۲/۲	۲/۵	۱/۵	۱/۳	۱/۷	۱/۱	۱/۲	۱/۲	۱	۱	۱/۲
۷	۲	۱	۱/۳	۱/۷	۱/۲	۱/۴	۱/۶	۱/۸	۱/۵	۱	۰/۶	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۶
اسهال	-	+	+	+	-	+	+	+		-	-	+	-	-	-	-	-	

بعـد از گرفتن نمونه مدفوع از موش‌های گروه دوم (فقط محلول کلی سین دریافت کرده) هیچ گونه باکتری روی محیط EMB آگار و محیط آگار خوندار رشـد نکرد. زیرا محلول کلی سـین استفاده شده فاقد باکتری کلی سینوژنیک بود. همچنین مطالعه بافت شناسی بر روی ۳ موش از این گروه هیچ ضایعه را در دستگاه گوارشی آنها نشان نداد.

کشـت نمونـه مدفـوع از موش‌های گـروه سـوم که بـه آنها فقط سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) خورانده شده بود روی محیط EMB آگار دارای جلای سبز فلزی کاملاً مشخص بود و با انجام تست آنتی سرم اطمینان حاصل شد که باکتری بازیافت شده باکتری \شریشیا کلی (F۵) K۹۹ می‌باشد. همچنین پس از رقت سازی نمونه‌های مدفوع و کشت روی محیط مک کانکی آگار شمارش تعداد کلنی‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ بررسـی شـد (تصویر۱) (جدول ۱). در ۶ موش از ۸ موش موجود در این گروه اسهال مشاهده شد ($p>۰/۰۵$). همچنین نتایج حاصل از مطالعات بافت شناسی حاکی از ایجاد ضایعه در دستگاه گوارشی ۷ موش از ۸ موش موجـود در این گروه بود. بیـن موش‌های گروه دوم (دریافت کننده محلول کلی سین فاقد باکتری) و گروه سوم (دریافت کننده سوسپانسیون باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹)) تفاوت آماری معنی‌داری بدست آمد($p>۰/۰۴$).

از موش‌های گروه چهارم (محلول کلی سین و سوسپانسیون K۹۹(F۵) همزمـان دریافـت کرده)، در زمان‌های ۱ ، ۲ ، ۳ ، ۴ ، ۵ ، ۶ و ۷ روز پس از تلقیح نمونه گیری شـد و در هر مرحله از آنها رقت تهیه و کشـت داده شد (جدول ۱). نمونه‌های مدفوع گروه چهارم بطور کامل و بدون تهیه رقت روی محیط EMB آگار کشت داده شد که جلای سبز فلزی باکتری‌های رشد کرده روی آن مشـاهده شد (تصویر ۲). اما در مقایسه با نمونه مدفوع گروه سوم روی محیط EMB آگار میزان باکتری رشد کرده و جلای فلزی حاصل از آن بطور قابل توجهی کاهش پیدا کرده بود. همچنین از رقت تهیه شده از نمونه مدفوع مربوط به زمان‌های مختلف پس از تلقیح روی محیط مک کانکی آگار کشت داده و تعداد کلنی‌ها شمارش گردید (تصویر ۳).

نتایج حاصل از شـمارش کلنی در گروه چهارم و مقایسـه آن با تعداد کلنی‌های شـمارش شـده از نمونه مدفوع گروه سوم، کاهش چشمگیری در میزان باکتری \شریشیا کلی (F۵) K۹۹ در گروه چهارم که محلول کلی سین و سوسپانسـیون باکتری F۵ (K۹۹) همزمان استفاده کرده بودند، در زمان‌های مختلف مشـاهده شـد($p>۰/۰۵$) (تصویر ۴). اسهال در یکی از موش‌های گروه چهارم در طول مدت زمان بررسـی مشاهده گردید. طبق بررسـی‌های بافت شناسی هیچ گونه آسیب بافتی و ضایعه‌ایی در دستگاه گوارش موش‌های این گروه مشاهده نشد.

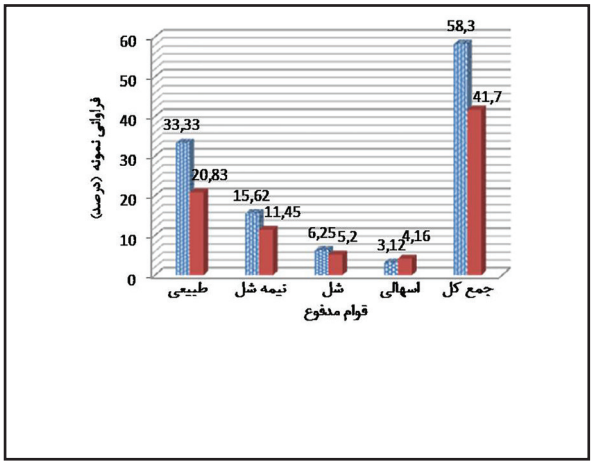
بحث

باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) مهمترین عامل ایجاد اسهال گوساله در روزهای اول زندگی می‌باشد (۳). اسهال ناشی از \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) در گوسـاله‌ها بویـژه در نخسـتین روزهای پس از تولد، بـه علت تلفات و خسارات اقتصادی حاصله از اهمیت زیادی برخوردار است (۸).

آنتی‌بیوتیک به عنوان درمان پروفیلاکسی جهت کنترل عفونت‌های باکتریایی در دام بیش از ۵۰ سـال اسـت که مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد (۷). درمان بیماریهای اسـهالی نیاز به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها دارد، این آنتی‌بیوتیک‌ها به آرامی از روده جذب می‌شـوند یا اصلاً از روده جذب نمی‌شـود. استفاده غیرمنطقی از آنها می‌تواند باعث ایجاد مقاومت دارویی و تغییـر در فلور میکروبی روده شـود. کاهش کاربـرد آنتی‌بیوتیک در دام فقط زمانی بدست می‌آید که استراتژی آنتی‌میکروبی مناسبی در دسترس باشـد. یکی از این مکانیسم‌ها باکتری‌های پروبیوتیک است (۴). مکانیسم جلوگیـری از باکتری‌های پاتوژن بـرای تعدادی از میکروارگانیسـم‌های پروبیوتیک به وسـیله تولید باکتریوسین است. اسـتفاده از باکتریوسین‌ها از قبیل کلی سـین در حیوانات می‌تواند به وسـیله سویه‌های تولید کننده

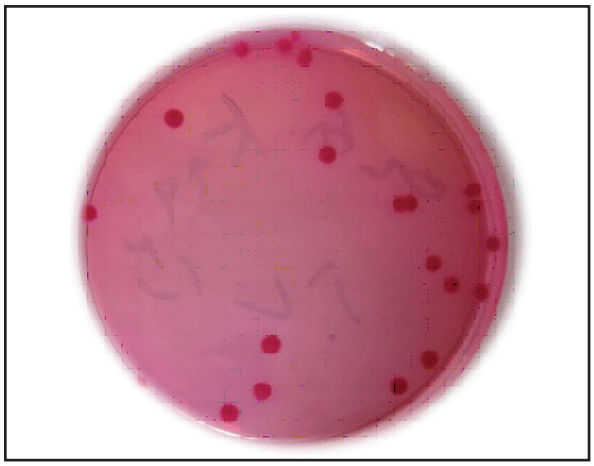
www.SID.ir

Archive of SID

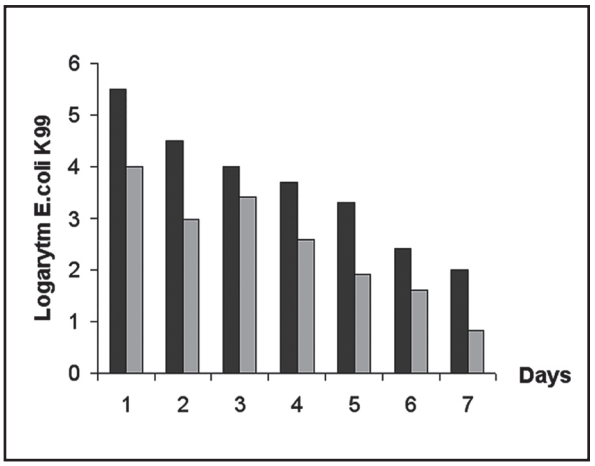


تصویر ۱. شـمارش کلنی‌های باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) از نمونه مدفوع موش گروه SB۳، ۲۴ ساعت پس از تلقیح، از رقت 10^{-7} cfu/mL روی محیط مک کانکی آگار.

تصویـر ۲. باکتری \شریشـیا کلی F۵ (K۹۹) از نمونه مدفوع مـوش گروه چهارم، ۲۴ ساعت پس از تلقیح.



تصویر ۳. شـمارش کلنی‌های باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) از نمونه مدفوع موش گروه SB۴، ۲۴ ساعت پس از تلقیح، از رقت 10^{-7} cfu/mL روی محیط مک کانکی آگار.



تصویر ۴. مقایسه میزان دفع F۵ (K۹۹) *E. coli* در دو گروه سوم و چهارم.
گروه ۳ گروه ۴

باکتریوسین در حیوانات آزمایش شود. با توجه به فعالیت ضدمیکروبی آن و عدم جذب کلی سین توسط بافت‌های بدن می‌تواند به عنوان راه حلی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در حیوانات باشد (۴،۱۴).

در ایـن مطالعه برای اولین بار اثر مهاری کلی سـین بر روی باکتری \شریشـیا کلی F۵ (K۹۹) در محیط in vivo بررسی شد. طبق این بررسی کلی سـین باعث مهار باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) در بدن موجود زنده شد بطوری که کاهش چشمگیری در میزان باکتری \شریشیا کلی F۵ (K۹۹) و اسهال ناشـی از این باکتری در موش بالغ بوجود آورد. باکتری‌های کلی سـینوژنیک هیچ تأثیر مضری در بدن موش‌ها ایجاد نکرد. مطالعات دیگر در زمینه تأثیر کلی سـین بر روی باکتری‌های دیگر از جمله \شریشیا کلی H۷:O۱۵۷ و انواعی دیگر از باکتری‌های \شریشیا کلی در بدن موجود زنده انجام شده است که با مطالعه حاضر قرابت دارد. Zhao و همکاران در سال ۱۹۹۸، کاهش باکتری H۷:O۱۵۷ تلقیح شده به گاو را به وسیله باکتری‌های پروبیوتیک بررسی کردند. در این بررسی ۱۸ باکتری پروبیوتیک، شامل ۱۷ باکتری *E. coli* و یک باکتری Proteus mirabilis بود. در نمونه کنترل فقط باکتری‌های پروبیوتیک را به گاوها تلقیح کردند، بعد از گذشت چند روز مشاهده شد که این باکتری‌ها در گاو بیماری ایجاد نکردند. در نمونه آزمایشی پس از گذشت دو روز از تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک، باکتری H۷:O۱۵۷ *E. coli* را بـه گاوهـا تلقیح کردند، بعد از پایان دوره بررسـی باکتری‌های H۷:O۱۵۷ در مدفوع گاو مشاهده نشد. نتایج این تحقیق مشخص کرد که خوراندن باکتری‌های پروبیوتیک قبل از خوراندن باکتری H۷:O۱۵۷ به گاو می‌تواند به طور چشمگیری میزان باکتری H۷:O۱۵۷ را کاهش دهد. طبق این بررسی یکی از متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارشی گاو کلی سین‌ها بودند که خاصیت ضد باکتریایی بر روی *E. coli* H۷:O۱۵۷ داشتند (۱۷).

Doyle و همکارانش در سـال ۲۰۰۱ مشـاهده کردند که به تعدادی گاو که باکتری \شریشیا کلی H۷:O۱۵۷ خورانده شده بود و سپس ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از خوراندن باکتری H۷:O۱۵۷ به آنها باکتری کلی سینوژنیک

www.SID.ir

Archive of SID

نیز خورانده شـده بود ، باکتری H۷:O۱۵۷، ۱۲ روز پس از تلقیح در نمونه مدفوع گاوها مشـاهده نشـد، این در حالی بود که گاوهای گروه کنترل که فقط به آنها باکتری H۷:O۱۵۷ خورانده شده بود تا ۳۰ روز بعد از تلقیح در نمونه مدفوع آنها باکتری H۷:O۱۵۷ مشاهده شد(۶).

Cutler وهمـکاران درسـال ۲۰۰۷ تأثیر کلی سـین E۱ در بیماری اسـهال ایجاد شده به وسیله اشریشیا کلی F۱۸ درخوک‌های از شیر گرفته شده بررسی کرد که براساس آن کلی سین E۱ باعث کاهش این بیماری و بهبود رشد در این خوک‌ها شد (۴).

در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات انجام شـده مشـخص گردید کلی سین‌ها اثر مهاری بر روی باکتری‌های مورد بررسی داشتند. نتایج این تحقیق و پژوهش‌های مشابه سایر محققین نشان داد کلی سین‌ها در بدن موجود زنده فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ می‌کنند (۱،۲،۴،۶،۱۳،۱۴،۱۷). لذا تحقیق حاضر تنها اثر کولیسین‌های ذکر شده بر روی باکتری *E. coli* F۵ (K۹۹) در حیوان آزمایشـگاهی را تائید می‌کنـد و بنابراین نمی‌توان نتایج این مطالعه را به اثر بخشـی آن بر روی سـایر باکتری‌های پاتوژن روده‌ای تعمیم داد.

با توجه به محدودیت‌ها و مشـکلات حاصل از درمان آنتی بیوتیکی، کلی سین‌ها می‌توانند در آینده به عنوان یک پروبیوتیک، کاندیدای خوبی برای جایگزین شدن آنتی بیوتیک‌های متداول باشند و به عنوان یک روش درمانی مورد توجه قرار گیرند.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم دکتر حیاتی، کارشناس ارشد بخش باکتری شناسی و آقای مهندس صادق زاده مسئول بخش حیوانات موسسه رازی شیراز تشکر و قدردانی می‌شود. این مطالعه بخشی از پروژه تحقیقاتی موسسه رازی شیراز می‌باشد.

References

1. Budras, K.D., McCarthy Braude, A.I., Siemienski, J.S. (1968) The influence of bacteriocins on resistance to infection by gram negative bacteria. J Clin Invest. 47: 1763-1773.
2. Bradley, D.E., Howard, S.P., Lior, H. (1990) Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* and shielding of colicin and phage receptors by their O-antigenic side chains. Can J Microbiol. 37: 97-104.
3. Christopher, M.J., Bhaskaran, S., Rathore, K.S., Waghela, S. (2004) Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. Vet Microbiol. 101: 153-160.
4. Cutler, A.S., Lonergan, S.M, Cornick, N., Johnson, A.K., Stahl, C.H. (2007) Dietary inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive *Escherichia coli* in pigs. Antimicrob Agents Chemother. 51: 3830-3835.
5. Diez-Gonzalez, F. (2007) Applications of bacteriocins in livestock. Curr Issues Intest Microbiol. 8: 15-23.
6. Doyle, M.P. (2001) Reducing foodborne disease: what are the priorities?. Nutrition. 16: 647–694.
7. McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D., White, D.G. (2002) The food safety perspective of antibiotic resistance. Anim Biotechnol. 13: 71-84.
8. Ok, M., Guler, L., Turgut, K., Ok, U., Sen, I., Gunduz, K., Birdane, M.F., Guzelbektes, H. (2008) The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. Zoonoses Public Health. 56: 94-101.
9. Pugsley, A.P., Oudega, B. (1987) Nucleotide sequencing of the structural gene for colicin N reveals homology between the catalytic, C-terminal domains of colicins A and N. Molecul Microbiol. 12: 317-325.
10. Roe, A.J., Yull, H., Naylor, S.W., Woodward, M.J., Smith, D.G.E., Gally, D.L. (2003) Heterogeneous surface expression of espA translocon filaments by *Escherichia coli* O157:H7 Is Controlled at the posttranscriptional level. Infect Immun. 71: 5900-5909.
11. Shirazi, Z., Tahamtan, Y., Hayati, M., Sahragard, I. (2013) Inhibition of colicinogenic *E. coli* on diarrheic *E. coli* K99 isolated from calves. Online J Vet Res. 17: 236-244.
12. Smit, H., Gaaster, W., Kamerling, J.P., Vliegenthare, J.F.G., Graaf, F.K. (1984) Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* F5 (K99) fimbrial adhesin. Infect Immun. 46: 578-584.
13. Smith, H.W., Huggins, M.B. (1977) Treatment

www.SID.ir

Archive of SID

of experimental *Esherichia coli* infection in mice with colicin V. J Med Microbial. 10: 479-482.

14. Stahl, C.H., Callaway, T.R., Lincoln, L.M., Lonergan, S.M., Genovese, K.J. (2004) Inhibitory activities of colicins against *E. coli* strains responsible for post weaning diarrhea and edema disease in swine. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3119-3121.
15. Steinsland, H., Valentiner Branth, P., Gjessing, H.K., Aaby, P., Molbak, K., Sommerfelt, H. (2003) Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli* longitudinal study. Lancet. 362: 286–291.
16. Takash, A. (2010) Preventive effect of probiotic bifidobacteria against shiga toxin-producing *Escherichia Coli* and *Salmonella* infections. biosci Microbiota Food Health. 29: 11–21.
17. Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Mueller, P.O.E., Parks, A.H. (1998) Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. J Clin Microbiol. 36: 641-647.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of colicin on *E. coli* K99 in mice

Golestan, F.[1], Tahamtan, Y.[2*], Moazemian, E.[3]

[1]*Department of Microbiology, Azad University of Jahrom, Jahrom- Iran*
[2]*Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute-Shiraz, Shiraz- Iran*
[3]*Department of Microbiology, Azad University, Science and Research Branch, Shiraz-Iran*
(Received 8 April 2015, Accepted 16 June 2015)

Abstract:

BACKGROUND: K99 pilus antigen is one of the major adherence factors found on enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of neonatal calves. It causes severe diarrhea in newborn calves via the production of heat-stable enterotoxin (STa).With increasing concern over the spread of antimicrobial resistance, the development of alternative to conventional antibiotics such as colicin is urgently needed. Colicin is an antimicrobial peptide produced by one strain of *E. coli* to suppress the growth of other strains of *E.coli*. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to investigate the control of *E.coli* k99 and the efficacy of colicinogenic *E.coli* (CEC) in adult mice. **METHODS:** The mice, used antibiotic were divided into four groups. The first group did not receive any inoculation. The second group was fed just with 0.5 ml colicin solution. The third group was fed just with 0.5 ml *E.coli* k99 suspension. The fourth group was first fed by 0.5 ml *E.coli* k99 suspension immediately after oral administration of CEC suspension. Fecal samples of mice in four groups were taken 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days after inoculation and colony forming units (CFUs) were monitored per gram feces. **RESULTS:** The results showed that CEC has inhibitory effect against *E.coli* k99. There were observed significant differences between the amounts of *E.coli* k99 recovered from the feces of mice in fourth group with the amount of *E.coli* k99 recovered from the feces of mice in third group. **CONCLUSIONS:** The data presented here support this claim that CEC plays a significant role against *E.coli* k99. Furthermore, the study suggested colicin warrants further evaluation as a potential alternative to conventional antibiotics for use to control of *E.coli* k99.

Keyword: colicin, colicinogenic *E.coli*, *E.coli* K99

Figure Legends and Table Captions

Table 1. *E.coli* F5 (K99) colony count in group 3 (mice that received *E.coli* K99) and group 4 (mice that received simultaneously *E.coli* K99 and Colicin).

Figure 1. *E.coli* K99 colony count form mice feces in group SB3, 24 h after inoculation, from 10-7 cfu/ml on Mac Conkey agar.

Figure 2. *E.coli* K99 from mice feces in group 4, 24 h after inoculation.

Figure 3. *E.coli* K99 colony count form mice feces in group SB4, 24 h after inoculation, from 10-7 cfu/ml on Mac Conkey agar.

Figure 4. Excretion rate of *E.coli* K99 between both groups 3 and 4.

***Corresponding author's email: yahyatahamtan@yahoo.com, Tel: 071-36240331, Fax: 071-36240201**

www.SID.ir