شناسایی جدایه‌های *اشریشیاکلی* کلی‌سینوژنیک از لاشه مرغ گوشتی و بررسی اثر مهاری آنها بر پاتوتیپ‌های *اشریشیاکلی*

محبوبه باقری[۱]، مازیار جاجرمی*[۲]، رضا قنبرپور[۳]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ۹ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۳۰ مرداد ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۸ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

کلی‌سین‌ها ترکیباتی با خاصیت ضد باکتریایی هستند که توسط *اشریشیاکلی* تولید می‌شوند و به سویه‌های تولیدکننده، قابلیت رقابت اکولوژیک در برابر باکتری‌های دیگر را می‌دهند. هدف از انجام این مطالعه شناسایی سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده‌ی کلی‌سین جدا شده از لاشه مرغ گوشتی به روش PCR و بررسی اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوژنیک بر پاتوتیپ‌های مختلف *اشریشیاکلی* است. در این مطالعه، ۱۱۰ جدایه باکتری *اشرشیاکلی* از ۱۱۰ لاشه مرغ گوشتی از نظر حضور هفت گروه از ژن‌های تولیدکننده کلی‌سین شامل Y.U، E1، V، 5.10.K، E2-9، Ia.Ib و A.N.S4 مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۱۱۰ جدایه، ۵۴ جدایه (۴۹/۱ درصد) دارای یکی از ژن‌های تحت بررسی بودند. از میان نمونه‌ها، ۳۳ جدایه (۳۰ درصد) از نظر ژن Ia.Ib مثبت بودند. همچنین ژن‌های V و E1 با فراوانی به ترتیب ۲۰ درصد (۲۲ جدایه) و ۹ درصد (۱۰ جدایه) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. فراوانی ژن A.N.S4 ۲/۹ درصد (۳ جدایه) بود و ژن‌های E2-9 و 5.10.K هر یک به تنهایی در ۱ جدایه (۰/۹ درصد) تشخیص داده شدند. گروه ژنی Y.U در این مطالعه فاقد فراوانی بود. از میان ۵۴ جدایه واجد ژن‌های کلی‌سین، ۱۸ جدایه (۳۳/۳ درصد) دارای اثر مهاری نسبت به حداقل یکی از پاتوتیپ‌های ETEC، EIEC، EHEC، EAEC و EPEC بود. از نظر فنوتیپی، بیشترین اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوژنیک، بر دو پاتوتیپ ETEC و EAEC مشاهده شد.

واژگان کلیدی: *مرغ گوشتی، اشریشیاکلی، کلی‌سین، پاتوتیپ*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: maziar.jajarmi@uk.ac.ir

مقدمه

یکی از ویژگی‌های باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان مهم‌ترین عضو میکروبیوتای دستگاه گوارش، تولید ترکیباتی موسوم به کلی‌سین می‌باشد. حداقل ۳۰ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* قادر به تولید یکی از انواع کلی‌سین‌ها هستند (۱). کلی‌سین‌ها و میکروسین‌ها از انواع باکتریوسین‌هایی هستند که توسط باکتری‌های گرم منفی خانواده‌ی انتروباکتریاسه تولید می‌شوند. این ترکیبات در واقع توکسین‌های سنتز شده‌ی ریبوزومی می‌باشند. کلی‌سین‌ها در مقایسه با میکروسین‌ها پروتئین‌هایی با سایز بزرگ‌تر (۴۰ تا ۸۰ کیلو دالتون) هستند (۲). این پروتئین‌ها غالباً تحت شرایط استرس نظیر مواجهه با میتومایسین C تولید می‌شوند (۳). اختصاصیت باکتریوسین می‌تواند کاربرد مفیدی داشته باشد به این صورت که یک سویه‌ی باکتریایی خاص مورد هدف قرار می‌گیرد، بدون اینکه سایر جمعیت‌های میکروبی تخریب شوند (۴).

کلی‌سین‌ها بر اساس نحوه‌ی عمل و مسیرهای اثر آنها به سه گروه شامل کلی‌سین‌های دارای فعالیت نوکلئازی، کلی‌سین‌های دارای خاصیت تشکیل دهندگی منفذ در غشای سلولی و نهایتاً کلی‌سین‌های مؤثر بر پپتیدوگلیکان دیواره سلولی تقسیم می‌شوند (۵). باکتری‌های تولیدکننده‌ی کلی‌سین از اثر نامطلوب کلی‌سین بر خودشان حفاظت می‌شوند چون به‌طور همزمان پروتئین ایمنی ویژه‌ای سنتز می‌کنند که قادر است بر خود ارگانیسم اثر حفاظتی داشته باشد. بعضی از سویه‌های اشریشیاکلی فقط فاکتور ایمنی را سنتز می‌کنند که به‌عنوان یک مزیت رقابتی در برابر سویه‌های تولیدکننده‌ی کلی‌سین محسوب می‌شود (۶).

تا کنون ۲۵ نوع کلی‌سین مورد شناسایی قرار گرفته است که مکانیسم اثر متفاوتی دارند (۷). کلی‌سین E1 و K سنتز ماکرومولکول‌ها را مهار می‌کنند، کلی‌سین E2 باعث شکستن DNA می‌شود و کلی‌سین E3 یک نوع RNase می‌باشد که توانایی ایجاد برش در 16srRNA را دارد. تا کنون فعالیت اندونوکلئازی تعداد زیادی از کلی‌سین‌ها مشخص شده است که هر کدام از آنها باعث ایجاد برش در یک ناحیه خاص و در یک نوکلئوتید خاص می‌شود. کلی‌سین‌های E2 ، E7 ، E8 و E9 سبب شکستن DNA می‌شوند. کلی‌سین‌های E4 ، E6 و DF13 سبب هیدرولیز rRNA می‌شوند و کلی‌سین D و E5 باعث شکستن tRNA می‌شوند. کلی‌سین M یک کلی‌سین منحصر به فرد است که روی سنتز پپتیدوگلیکان اثر می‌کند (۸).

قابلیت تولید کلی‌سین می‌تواند هم در سویه‌های غیر بیماری‌زا و هم بیماری‌زا وجود داشته باشد. میکروارگانیسم کلی‌سینوژنیک فارغ از فاکتورهای حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، می‌تواند دارای مزیت رقابتی باشد زیرا می‌تواند باکتری‌های رقیب را از چرخه اکولوژیک حذف کند و فرصتی را برای بقا و تکثیر خود فراهم کند (۹). به‌عنوان مثال یک روش پیشنهادی برای کنترل سروتیپO157:H7 استفاده از حذف رقابتی و جلوگیری از کلونیزاسیون *اشریشیاکلی*‌های پاتوژن روده‌ای و یا حتی سایر اعضاء خانواده *انتروباکتریاسه* می‌باشد (۱۰).

سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای *اشریشیاکلی* را می‌توان بر اساس فاکتورهای حدت و نوع آسیب‌زایی طبقه‌بندی کرد. سویه‌های ایجادکننده‌ی بیماری‌های روده‌ای شامل پاتوتیپ‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (ETEC)، انتروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* (EPEC)، وروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (VTEC) یا *اشریشیاکلی* تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین (STEC)، *اشریشیاکلی* مهاجم روده‌ای (EIEC)، *اشریشیاکلی* مجتمع شونده‌ی روده‌ای (EAEC یا EAggEC) و *اشریشیاکلی* چسبنده‌ی منتشر (DAEC) می‌باشد.

مجموع EPEC ها و EHEC ها را در پاتوتیپی قرار می‌دهند به نام *اشریشیاکلی* اتصالی و محو کننده (AEEC). گروهی از STEC یا VTEC ها را که ضایعات اتصالی و محوکننده نیز ایجاد می‌کنند، انتروهموراژیک *اشریشیاکلی* (EHEC) می‌نامند (۱۱).

گوشت مرغ به دلیل در دسترس بودن و ارزان بودن نسبت به گوشت قرمز، از منابع مهم پروتئین حیوانی در جیره غذایی اکثر جوامع به شمار می‌رود. سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا مکرراً از نمونه‌های گوشت مرغ جدا می‌شوند (۱۲). تاکنون در ایران مطالعه‌ای در خصوص شناسایی سویه‌های کلی‌سینوژنیک با منشأ گوشت طیور انجام نشده است. شناسایی کلی‌سین‌ها در این جدایه‌ها به ما این امکان را می‌دهد که به شناخت بهتری از تنوع و نحوه انتشار ژن‌های کدکننده این ترکیبات در جمعیت‌های مختلف باکتریایی دست یابیم و بعضی از این جدایه‌ها ممکن است قادر به مهار سویه‌های انتروپاتوژنیک باشند. در این مطالعه جدایه‌های *اشریشیاکلی* به دست آمده از لاشه مرغ گوشتی سالم ذبح شده در کشتارگاه صنعتی، مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ژن‌های کدکننده هر یک از انواع کلی‌سین‌ها در جدایه‌ها تعیین شد و اثر مهاری جدایه‌های کلی‌سینوژنیک بر برخی سویه‌های انتروپاتوژنیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها، جداسازی و تأیید بیوشیمیایی اشریشیاکلی: از تعداد ۱۱۰ لاشه طیور در کشتارگاه صنعتی طیور از سطوح داخلی و خارجی هر لاشه نمونه سواب تهیه گردید و سواب‌ها بلافاصله با کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. جهت جداسازی و تأیید بیوشیمیایی *اشریشیاکلی* در آزمایشگاه سواب‌ها در محیط مک‌کانکی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب تا صبح انکوبه شدند. کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* در محیط مک‌کانکی (صاف، گرد، متوسط و صورتی رنگ) جهت تأیید بیوشیمیایی انتخاب شدند و با آزمایش IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج DNA از باکتری‌ها: برای استخراج DNA در این پژوهش از روش لیز سلولی با کمک NaOH نیم‌نرمال استفاده گردید. از کشت تازه‌ی باکتریایی یک کلنی انتخاب و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم‌نرمال، اضافه گردید و به صورت سوسپانسیون در آمد. پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر محلول تریس‌بیس ۱ مولار به سوسپانسیون اضافه شد تا عمل لیز باکتری توسط NaOH متوقف گردد و pH نهایی به ۷/۵ برسد. با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حجم سوسپانسیون به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و جهت انجام آزمایش PCR آماده شد.

شناسایی ژن‌های کدکننده کلی‌سین و سویه‌های کلی‌سینوژنیک: در این مطالعه برای شناسایی ژن‌های کدکننده کلی‌سین از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول شماره ۱ جهت انجام آزمایش PCR استفاده گردید.

برنامه‌ی دمایی برای انجام PCR عبارت بود از: ۱- ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۲- ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۳- ۵۳°C به مدت ۱ دقیقه، ۴- ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، ۵- تکرار از مرحله ۲ برای ۳۸ مرتبه و ۶- ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

جدول ۱- ژن‌های مربوط به کلی‌سین‌های مختلف، پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصولات PCR

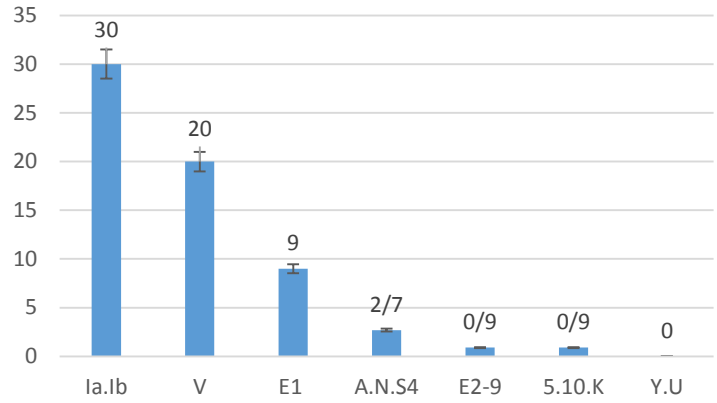
هدف	نام پرایمر	توالی	سایز محصول (bp)
A.N.S4	NS4: r	CGTAGCTATAATGAAGCAATGGCTTCA	۲۲۵
	NS4: f	ACC TCC AAC AGG AGA GGT CCC CAG TT	
V	V: f	CAC GCC CTG AAG CAC CAC CA	۴۰۰
	V: r	CCG TTT TCC AAG CGG ACC CC	
Ia.Ib	Iab: f	GCA CAA CAG GCC CGT CTG CTC	۳۸۵
	Iab: r	CAC CTT CCA CAT CCT CTG TCA CC	
E2.E3.E4E5	E2-9: f	CGA CAG GCT AAA GCT GTT CAG GT	۲۱۹
E6.E7E8.E9	E2-9: r	TGC AGC AGC ATC AAA TGC AGC CT	
Y.U	Yu: f	GTG AAC GGA CAG AAA CCC GCC	۲۴۳
	Yu: r	CAA TCT GTC TGA CAG CCT CTC CC	
5.10.K	510K: f	AAA GCT GAA CTG GCG AAG GC	۸۰۳
	510K: r	CAA CTC ATC ATC CCC TAT GTA AGA AG	
E1	E1: f	ACG GGA GTG GCT CTG GCG G	۳۸۹
	E1: r	CTC TTT ACG TCG TTG TTC TGC TTC CTG	

بررسی اثر مهاری کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی به صورت فنوتیپی: جهت بررسی اثر مهاری کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های *اشریشیاکلی*، سویه‌های مثبت از نظر ژن کلی‌سین در محیط LB مایع کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید. سپس هر پاتوتیپ بر روی LB جامد به‌صورت چمنی کشت داده شد (پلیت‌های LB جامد حاوی میتومیسین C بودند) سپس ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه مثبت از نظر ژن کلی‌سین به‌صورت Spot بر روی پلیت گذاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید.

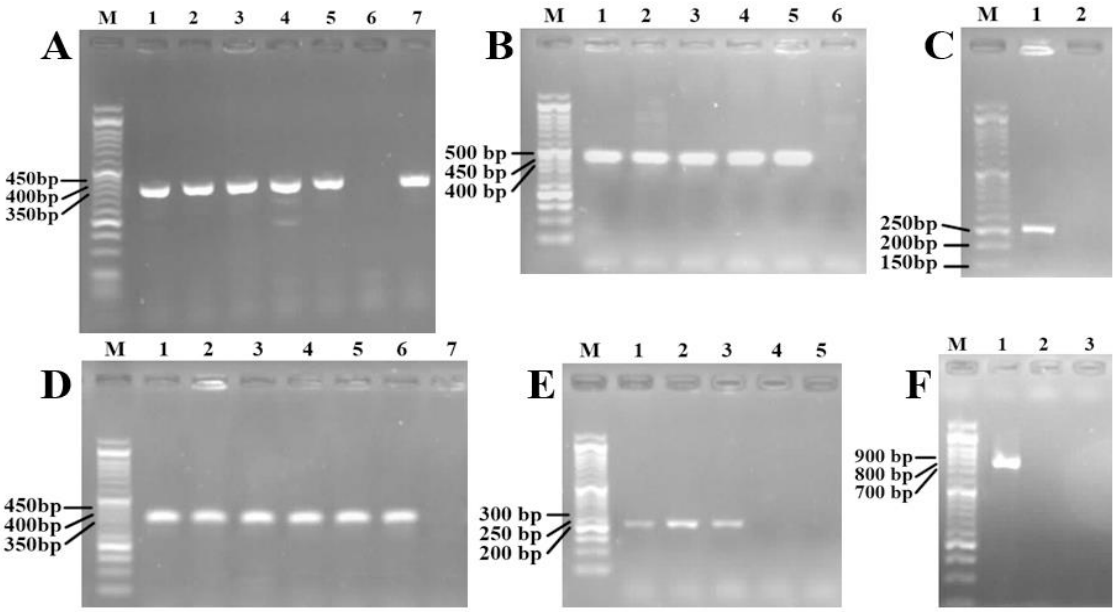
نتایج

فراوانی ژن‌های کدکننده کلی‌سین و سویه‌های کلی‌سینوژنیک: در این مطالعه از میان ۱۱۰ جدایه، ۵۴ جدایه (۴۹/۱ درصد) از نظر حداقل یکی از ژن‌های تحت بررسی مثبت ارزیابی شد. از میان کل نمونه‌ها، ۳۳ جدایه (۳۰ درصد) از نظر ژن Ia.Ib مثبت بودند. همچنین ژن‌های V و E1 با فراوانی به ترتیب ۲۰ درصد (۲۲ جدایه) و ۹ درصد (۱۰ جدایه) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. فراوانی ژن A.N.S4 ۲/۹ درصد (۳ جدایه) بود و ژن‌های E2-9 و 5.10.K هر یک به تنهایی در ۱ جدایه (۰/۹ درصد) تشخیص داده شدند. گروه ژنی Y.U در این مطالعه فاقد فراوانی بود (شکل ۱). همچنین نتایج الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۲ قابل مشاهده است.

پروفایل ژنی و اثر مهاری سویه‌های واجد ژن کلی‌سین بر پاتوتیپ‌های اشریشیاکلی: در این مطالعه مجموعاً ۱۰ پروفایل مختلف از گروه‌های ژنی کلی‌سین مورد شناسایی قرار گرفت. بیشترین فراوانی مربوط به پروفایل Ia.Ib (۲۲ جدایه) و V (۱۲ جدایه) بود (جدول ۲). در این مطالعه از میان ۵۴ جدایه واجد ژن‌های کلی‌سین، ۱۸ جدایه (۳۳/۳ درصد) دارای اثر مهاری نسبت به حداقل یکی از پاتوتیپ‌های ETEC، EIEC، EHEC، EAEC و EPEC بود. از نظر فنوتیپی، بیشترین اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوژنیک، بر دو پاتوتیپ ETEC و EAEC مشاهده شد. با این وجود دو جدایه اثر مهاری قابل توجهی بر تمامی پاتوتیپ‌های مورد بررسی از خود نشان دادند که دارای پروفایل‌های ژنی V و V/Ia.Ib/5.10.K بودند (شکل ۳).



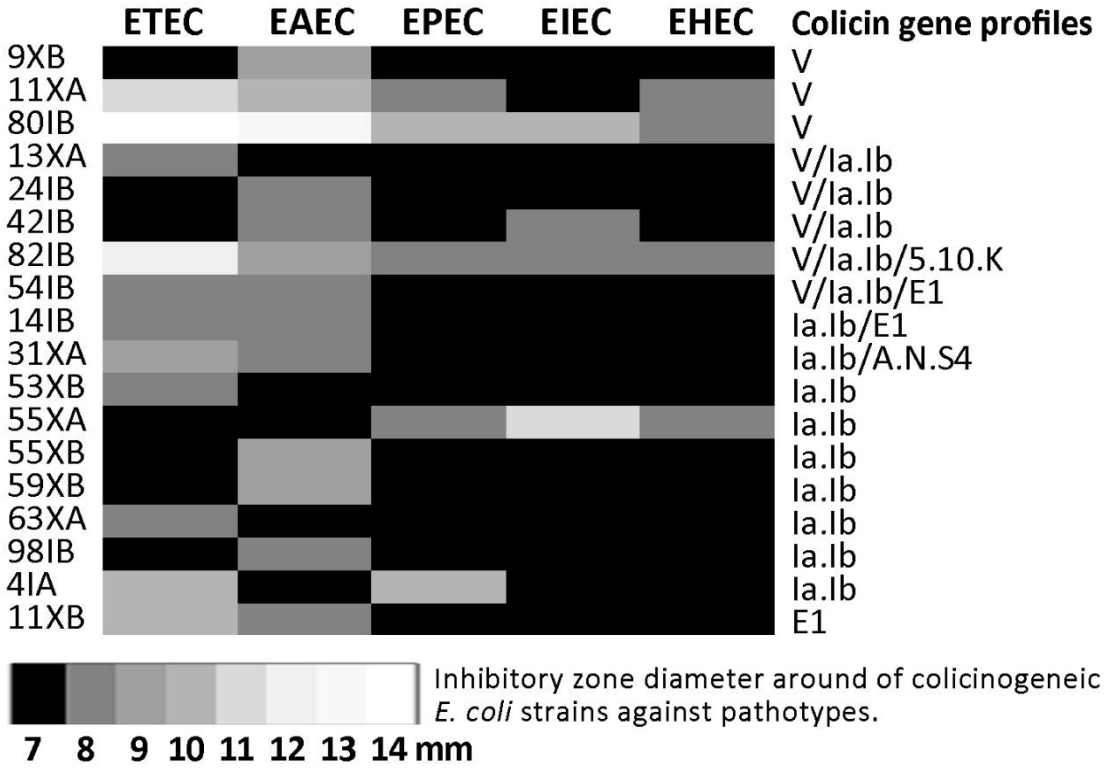
شکل ۱- فراوانی جدایه‌های مثبت از نظر ژن‌های Ia.Ib، E2-9، E1، V، A.N.S4، 5.10.K و Y.U



شکل ۲- الکتروفورز نمونه‌های مثبت و منفی از نظر گروه‌های ژنی Ia.Ib (A)، V (B)، E2-9 (C)، E1 (D)، A.N.S4 (E) و 5.10.K (F)

جدول ۲- انواع و فراوانی پروفایل‌های ژنی در جدایه‌های مثبت از نظر ژن‌های کلی‌سین مورد بررسی

Colicin gene groups							Prevalence (%)	95% CI
V	Ia.Ib	E1	E2-9	A.N.S4	5.10.K	U.Y		
+		+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
+							12/54 (22.22)	11.13%-33.31%
+	+						5/54 (9.26)	1.53%-1.69%
+	+				+		1/54 (1.85)	0%-5.45%
+	+	+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
	+	+					1/54 (1.85)	0%-5.45%
	+						22/54 (40.74)	27.64%-53.85%
	+			+			3/54 (5.56)	0%-11.67%
		+					5/54 (9.26)	1.53%-1.69%
			+				1/54 (1.85)	0%-5.45%



شکل ۳- اثر جدایه‌های کلی‌سینوژنیک بر پاتوتیپ‌های مختلف *اشریشیاکلی* و پروفایل ژن‌های کدکننده کلی‌سین در این جدایه‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

یک مزیت مشخص تولید باکتریوسین‌های متعدد، طیف وسیع‌تر فعالیت علیه باکتری‌های رقیب و در نتیجه تقویت تطابق با محیط‌های مختلف است (۶). تاکنون دو مکانیسم اصلی و اولیه برای مقاومت به کلی‌سین شناسایی شده‌اند: ۱) مکانیسمی که نتیجه جهش و یا عدم حضور یک رسپتور خاص کلی‌سین می‌باشد ۲) مقاومتی که مرتبط با عدم حضور یک سیستم جابجایی کلی‌سین می‌باشد (۱۴).

شامبرگر و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای در آمریکا ۲۳ سویه باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های مدفوع انسان، گاو، گوسفند، گربه و اردک را از نظر تولید کلی‌سین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فاکتورهای ویرولانس و توانایی مهار سویه‌های *اشریشیاکلی* پاتوژن مورد بررسی قراردادند. هفت نوع کلی‌سین B، E1، E2/E7، E7، Ia/Ib، K و M شناسایی شد که نیمی از سویه‌ها دارای چند نوع کلی‌سین مختلف بودند. بعضی از کلی‌سین‌ها درچند سویه دیده شد (Ia/Ib درچهار سویه،E7 و K در دو سویه) و بیشترین فروانی به ترتیب مربوط به کلی‌سین B، E2/E7 وM و کمترین فراوانی مربوط به کلی‌سین E1 گزارش شد. چهارده سویه کلی‌سینوژنیک ازنظر توانایی مهار ۱۰ سویه پاتوژن *اشریشیاکلی* مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۶ سویه کلی‌سینوژنیک توانستند تمام سویه‌های پاتوژن را مهارکنند (۱۵).

درمطالعه‌ای که توسط چاریکچی و همکاران (۲۰۰۱) در کشور ترکیه بر روی ۱۲۹ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* عامل عفونت ادراری که از نمونه ادرار افراد بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های دو شهر ازمیر و مانیسا جدا شده بودند، انجام گرفت. تعداد ۳۳ جدایه (۲۵/۵درصد) کلی‌سینوژنیک و ۲۰ نوع کلی‌سین مختلف شناسایی گردید. تعداد ۶ جدایه

(۴/۶۵ درصد) کلی‌سین E1 و۲۲ جدایه (۱۷درصد) کلی‌سین V تولید کردند و بیشترین فراوانی مربوط به کلی‌سین‌های گروه E (بیش از ۵۰ درصد) گزارش شد (۱۶).

خلف و همکاران (۲۰۱۵) درکشور عراق ۳۰ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* که از ۱۰۵ نمونه ادرار، مدفوع و سواب گوش بیماران در پنج بیمارستان شهر بغداد جدا شده بودند، ازنظر ژن‌های تولیدکننده ۴ کلی‌سین E1، E3، E9 و M مورد بررسی قرار دادند. چهار جدایه (۱۳/۳۳ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E1 و ۱۵ جدایه (۵۰ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین M بودند. دربین جدایه‌های واجد ژن E1، ۳ جدایه مربوط به نمونه‌های ادراری و در بین جدایه‌های واجد ژن M، ۱۲ جدایه مربوط به نمونه‌های ادراری بودند. هیچ یک از جدایه‌ها دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E3 و E9 نبودند. بنابراین جدایه‌های *اشریشیاکلی* عامل عفونت‌های دستگاه ادراری فراوانی بالایی ازکلی‌سین M (۸۰ درصد) و کلی‌سین E1 (۷۵ درصد) نشان دادند (۱۷).

سام جیس و همکاران (۲۰۱۰) درجمهوری چک گزارش کردند که ژن کلی‌سین‌های E1، Ia و V در اغلب سویه‌ها با هم حضور دارند (۱۸). حضور مشترک کلی‌سین Ia و V درسویه‌ها که به‌وسیله پلاسمیدهای قابل انتقال یکسان کد می‌شوند، نتیجه ادغام اپران میکروسین V و چند ژن دیگر در پلاسمید تولیدکننده کلی‌سین Ia است. اگر چه تولید بیش از یک کلی‌سین به‌وسیله سویه‌های *اشریشیاکلی* معمول است، اما اغلب کلی‌سین‌هایی که معمولاً با هم تولید می‌شوند، ارتباط معنی‌داری دارند و به صورت تصادفی تولید نمی‌شوند (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر ۶ جدایه از نظر بیش از یک ژن تولیدکننده‌ی کلی‌سین مثبت بودند. وجود همزمان چند نوع ژن کدکننده‌ی کلی‌سین در یک سویه به عوامل مختلفی مانند: انتقال ژنتیکی مؤثر در اجتماع باکتری‌ها، ناهمگنی پایین در زیستگاه و صرف انرژی نسبتاً کم برای تولید کلی‌سین بستگی دارد (۲۰).

کاتلر و همکاران (۲۰۰۷) اثر رژیم غذایی حاوی کلی‌سین E1 را برروی *اشریشیاکلی* انتروتوکسیکوژنیک F18 عامل اسهال بعد از شیرگیری در خوک‌های جوان بررسی کردند که بر اساس این مطالعه کلی‌سین E1 باعث کاهش شدت و بروز اسهال پس از شیرگیری ناشی از سویه F18 گردید (۲۱). در پژوهشی دیگر پاتون و همکاران (۲۰۰۶) اثر بازدارندگی کلی‌سینE1 را بر باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* در سوپ و غذاهای آماده مصرف گزارش کردند (۲۲). همچنین اثرکاهشی کلی‌سینE1 بر سویه‌های یوروپاتوژنیک عامل عفونت ادراری در انسان در مطالعه ریجاوک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده است (۲۳).

گوردون و همکاران (۲۰۰۶)، ۲۶۶ جدایه *اشریشیاکلی* از مدفوع انسان را بررسی کردند. بر اساس نتایج، ۱۰۲ جدایه (۳۸ درصد) کلی‌سین و میکروسین تولید کردند (۲۴ درصد جدایه‌ها حداقل یک نوع کلی‌سین و۲۰ درصد جدایه‌ها حداقل یک میکروسین تولید کردند). چهارده جدایه کلی‌سین E1 (۵/۳ درصد) و ۲۲ جدایه (۸/۳ درصد) میکروسین V تولید کردند. تنها یک جدایه هر سه کلی‌سین E1، V و Ia را تولید کرد (۲۴). مطالعات نشان می‌دهد میکروسین V درسویه‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک ممکن است یک فاکتور حدت باشد و فراوانی ژن‌های میکروسین V با افزایش پاتوژنیستی[۵] سویه‌های *اشریشیاکلی*

[۵] Pathogenicity

افزایش‌یافته‌است (۱۹).

تهمتن و همکاران (۲۰۱۱) در شهرستان شیراز سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از ۳۰۰ نمونه مدفوع گاوهای سالم و اسهالی را از نظر ژن تولیدکننده کلی‌سین‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. از ۳۰۰ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* ۱۱۵ نمونه کلی‌سینوژنیک بودند و ۶ نوع کلی‌سین (E1، V، Ia Ib، UY، 5.10.k و A.N.S4) شناسایی شد. تقریباً ۱۰۰ درصد جدایه‌ها حداقل دارای یک ژن تولیدکننده کلی‌سین بودند. ۳۰ جدایه (۱۰ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین V و ۲۶ جدایه (۸/۶۷ درصد) دارای ژن تولیدکننده کلی‌سین E1 بودند. بیشترین فراوانی مربوط به ژن Ia.Ib و کمترین فراوانی مربوط به ژن A.N.S4 گزارش گردید (۴۴). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۱۳).

بر اساس مطالعه‌ای‌که توسط تقوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شهرستان یاسوج برای شناسایی تیپ‌های کلی‌سین بر روی *اشریشیاکلی* کامنسال جدا شده از نمونه‌های مدفوع کودکان انجام دادند، از ۱۲۰ نمونه *اشریشیاکلی* ۸۵ جدایه (۷۰/۸ درصد) کلی‌سینوژنیک بودند، به‌طوری که ۳۴/۱۱ درصد از نمونه‌ها دارای یک ژن، ۴۵/۸۹ درصد دو نوع و ۲۰ درصد دارای بیش از دو نوع ژن کلی‌سین بودند. تعداد ۳۳ جدایه (۲۲/۵ درصد) ژن V، ۱۴ جدایه (۱۱/۷ درصد) ژن E1 و تعداد ۴ جدایه (۴/۷ درصد) هر دوژن E1 وV را داشتند. یک‌سویه با شش نوع کلی‌سین در بین نمونه ها مشاهده شد. بیشترین وکمترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن‌های Ia.Ib و A.N.S4 گزارش شد (۲۵).

عوامل مختلفی مانند نوع گونه حیوانی، جیره غذایی، کیفیت زیستگاه، ویژگی‌های میزبان، ویژگی‌های جغرافیایی، اثربخشی ارگانیسم‌های پروبیوتیک و استفاده از دیگر روش‌های آزمایشی می‌تواند نوع کلی‌سین را در جدایه‌های حیوانی و انسانی تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

با توجه به نقش مهم اکولوژیک سویه‌های کلی‌سینوژنیک در دستگاه گوارش، مهم‌ترین کلی‌سین‌های مربوط به *اشریشیاکلی* در دستگاه گوارش مرغ گوشتی E1، V و Ia.Ib بود و بیشترین اثر مهاری سویه‌های کلی‌سینوژنیک، بر دو پاتوتیپ ETEC و EAEC مشاهده شد. اکولوژی محیط‌های طبیعی پیچیده‌تر از رقابت دو سویه در محیط آزمایشگاهی است. گاهی پس از کاهش اولیه‌ی سویه متأثر از کلی‌سین در محیط طبیعی، این سویه‌ها دچار ریکاوری بعد از مواجهه می‌شوند. مواجهه مداوم با کلی‌سین، می‌تواند منجر به غلبه بر محدودیت‌ها شود و سویه‌ی متأثر بیشتر با محیط تطابق یافته و زنده‌مانی آن افزایش یابد. از طرفی بیشتر ژن‌های کدکننده‌ی باکتریوسین‌ها بر روی پلاسمیدهای خود منتقل شونده قرار دارند. استفاده از سویه‌های کلی‌سینوژنیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند مخاطره آمیز باشد، زیرا ممکن است عامل کدکننده کلی‌سین و ژن ایمنی همراه با آن به سویه‌های پاتوژن منتقل شود. این موضوع نشان می‌دهد که خالص‌سازی باکتریوسین، مسیر بهتری برای توسعه‌ی استفاده از باکتریوسین‌هاست نسبت به استفاده از میکروارگانیسم زنده.

References

1- Samuels AN, Roggiani M, Smith KA, Zhu J, Goulian M, Kohli RM. Deciphering the Role of Colicins during Colonization of the Mammalian Gut by Commensal *E. coli*. *Microorganisms*. 2020; 8(5): 664.

2- Calcuttawala F, Pal A, Nath P, Kar R, Hazra D, Pal R. Structural and functional insights

into colicin: a new paradigm in drug discovery. *Archives of Microbiology*. 2022; 204(1): 1-9.

3- Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996 1; 27(6): 467-479.

4- Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, *et al.* Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2007; 71(1): 158-229.

5- Cursino L, Chartone-Souza E, Nascimento A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2002; 33(3): 185-195.

6- Cameron A, Zaheer R, Adator EH, Barbieri R, Reuter T, McAllister TA. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. *Toxins.* 2019; 11(8): 475.

7- Bosák J, Micenková L, Hrala M, Pomorská K, Kunova Bosakova M, Krejci P, *et al.* Colicin FY inhibits pathogenic Yersinia enterocolitica in mice. *Scientific reports*. 2018 16; 8(1): 1-2.

8- Cramer WA, Sharma O, Zakharov SD. On mechanisms of colicin import: the outer membrane quandary. *Biochemical Journal.* 2018; 475(23): 3903-3915.

9- Millstein RL. Natural selection as a population-level causal process. *The British Journal for the Philosophy of Science*. 2020; 57(4): 627–653.

10- Askari N, Ghanbarpour R. Molecular investigation of the colicinogenic *Escherichia coli* strains that are capable of inhibiting *E. coli* O157: H7 in vitro. *BMC veterinary research*. 2019; 15(1): 1-8. [In Persion]

11- Jesser KJ, Levy K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current opinion in infectious diseases*. 2020; 33(5): 372.

12- Al-Marri T, Al-Marri A, Al-Zanbaqi R, Al Ajmi A, Fayez M. Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence genes of Escherichia coli from backyard poultry farms. *Veterinary World*. 2021; 14(11): 2869.

13- Tahamtan Y, Shirazi Z, Pourbakhsh A, Kargar M, Hyati M, Namvari MM, *et al.* Detection of Colicin genes by PCR in *Escherichia coli* isolated from cattle in Shiraz-Iran. *Archives of Razi Institute.* 2012; 67(1): 63-67. [In Persion]

14- Alonso G, Gomes C, González C, Rodríguez Lemoine V. On the mechanism of resistance to channel-forming colicins (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (IncHI3). *FEMS microbiology letters*. 2000; 192(2): 257-261.

15- Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of food protection*. 2004; 67(3): 486-492.

16- Çarikçi Aİ, Coşar G. Colicin production and colicin Typing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2001; 31(6): 483-486.

17- Khalaf ZZ, Flayyih MT. The genotypic identification of colicins produced by clinical isolates of *Escherichia coli* in Iraq. *World Journal of Environmental Biosciences*. 2015; 3: 94-9.

18- Šmajs D, Micenková L, Šmarda J, Vrba M, Ševčíková A, Vališová Z, *et al.* Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC microbiology*. 2010; 10: 288.

19- O'Brien GJ, Chambers ST, Peddie B, Mahanty KH. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis*. 1996 1; 20(3):185-190.

20- Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of food protection*. 2004; 67(3): 486-492.

21- Cutler SA, Lonergan SM, Cornick N, Johnson AK, Stahl CH. Dietary inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive *Escherichia coli* in pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(11): 3830-3835.

22- Patton BS, Dickson JS, Lonergan SM, Cutler SA, Stahl CH. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*. 2007; 70(5): 1256-1262.

23- Rijavec M, Budič M, Mrak P, Müller-Premru M, Podlesek Z, Žgur-Bertok D. Prevalence of ColE1-like plasmids and colicin K production among uropathogenic *Escherichia coli* strains and quantification of inhibitory activity of colicin K. *Applied and environmental microbiology*. 2007; 73(3): 1029-1032.

24- Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006; 152(11): 3239-3244.

25- Taghavi S, Kargar M, Doosti A. Molecular Identification of the colicin types in *Escherichia coli* in the Yasuj city. Armaghane danesh. 2014; 19(4): 371-9. [In Persion]

Identification of colicinogenic *Escherichia coli* isolates from broiler carcasses and their inhibitory effect on *E. coli* pathotypes

Mohboubeh Bagheri[1], Maziar Jajarmi[2*], Reza Ghanbarpour[3]

1- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bardsir Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3- Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Receive: June 30, 2022; Revise: August 21, 2022; Accept: August 30, 2022

Summary

Colicins are antibacterial compounds produced by *Escherichia coli* which give the producing strains the ability to compete ecologically against other bacteria. The aim of this study was to identify *Escherichia coli* strains producing colicin isolated from broiler carcasses by PCR and to investigate the inhibitory effect of colicinogenic strains on different *Escherichia coli* pathotypes. In this study, swab sample was obtained from 110 carcasses of broiler carcasses slaughtered in Kerman industrial slaughterhouse. one confirmed *Escherichia coli* isolate was selected from each carcass. Seven groups of colicin genes including Y.U, E1, V, 5.10.K, E2-9, Ia.Ib and A.N.S4 were screened using PCR and specific primers. Strains containing at least one colicin encoding gene were studied for their inhibitory effect on the growth of various *Escherichia coli* pathotypes. In this study, out of 110 isolates, 54 isolates (49.1%) were positive for at least one of the studied genes. Of the total samples, 33 isolates (30%) were positive for Ia.Ib gene. Also, V and E1 genes with frequencies of 20% (22 isolates) and 9% (10 isolates) were in the next ranks, respectively. The prevalence of A.N.S4 gene was 2.9% (3 isolates) and E2-9 and 5.10.K genes were only detected in 1 isolate (0.9%). The U.Y gene group was not detected in this study. Among 54 isolates with colicin genes, 18 isolates (33.3%) had an inhibitory effect on at least one of the ETEC, EIEC, EHEC, EAEC and EPEC patotypes. Phenotypically, the most inhibitory effect of colicinogenic strains was observed on ETEC and EAEC pathotypes.

***Key words**: Broiler, Escherichia coli, colicin, pathotypes*