مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره چهارم (پیاپی ۹)، زمستان ۱۳۸۹
صفحات ۲۴۴-۲۳۸

مقایسه برخی از فاکتورهای حدت اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک K۹۹ با دو روش PCR و SDS-PAGE

یاسمین کیانی[۱]، یحیی تهمتن*[۲]، محمد حسین حسینی[۲]، معصومه حیاتی[۳]

[۱]کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی،
[۳]کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

چکیده

سابقه و هدف: اسهال ناشی از اشریشیاکلی K۹۹ در گوساله‌ها به ویژه در نخستین روزهای پس از تولد، به علت تلفات و خسارات اقتصادی حاصله از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه شیوع ژن‌های عوامل بیماریزایی اشریشیاکلی K ۹۹ با استفاده از تکنیک Multiplex PCR و سپس الگوی پروتئینی این باکتری‌ها با روش‌های مختلف بید، اوره و پودر شیشه با SDS- PAGE ارزیابی گردید.

موادوروش‌ها: ۳۰۰ سواب رکتوم از گوساله‌های ۱ تا ۳۰ روزه مبتلا به اسهال طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ جمع‌آوری شد. یک بخش جهت انجام Multiplex PCR برای شناسایی ژن‌های عوامل بیماریزایی K۹۹، F۴۱ و STa استفاده گردید و بخش دیگر جهت کشت بر روی محیط‌های مختلف جهت جداسازی اشریشیاکلی و SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج PCR نشان داد از ۲۰۰ اشریشیاکلی جداشده، ۱۶مورد دارای ژن‌های عوامل بیماریزایی K۹۹، F ۴۱ و STa می‌باشند و در هیچکدام از نمونه‌های جدا شده از گوساله‌ها سم حساس به حرارت (LT)وجود نداشت. همچنین نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که الگوهای پروتئینی باکتری‌های مختلف اشریشیاکلی متفاوت می‌باشد. نتایج SDS-PAGE حاصل از ستون بیانگر وجود تنها یک باند مربوط به آنتی ژن K۹۹ بود.

نتیجه‌گیری: مشاهده فاکتورهای حدت باکتری‌های اشریشیاکلی K۹۹ جدا شده نشان داد که همه باکتری‌ها حداقل دارای سه ژن K۹۹، F۴۱ و Sta می‌باشند. با وجود این که از نظر مولکولی تفاوت معنی‌داری در بین نمونه‌ها مشاهده نشد. اما از نظر الگوی پروتئینی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در بین باکتری‌های جدا شده وجود داشت. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های متفاوت الگوهای پروتئینی مختلف و در نتیجه بیماریزایی متفاوتی دارند.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی K۹۹، PCR، SDS-PAGE، گوساله

دریافت مقاله: آبان‌ماه ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: دی‌ماه ۱۳۸۹

*)آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
شیراز، گروه باکتری شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹۴۰
پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی، ارگانیسم متحرکی است که به سادگی بر روی محیط‌های کشت معمولی رشد می‌کند و بیشتر سویه‌های آن در محیط‌های افتراقی باکتری های روده ای مانند مک کانکی آگار در شکل کلنی‌های تخمیرکننده‌ی لاکتوز ظاهر می‌شوند. بر روی آگار خون‌دار، بعضی از سویه‌ها به ویژه آن‌هایی که در عفونت‌های ادراری شرکت می کنند، همولیزبتا ایجاد می کنند اما اکثر نمونه‌ها بدون پیگمان هستند. از نظر بیوشیمیایی اشریشیاکلی توانایی شاخصی در بروز تست مثبت برای اندول، لیزین دکربوکسیلاز، تخمیر مانیتول و تولید گاز از گلوکز دارد. اشریشیا کلی از ساکنین طبیعی مجاری روده حیوانات است. با وجود اینکه سویه‌های خاصی از اشریشیا کلی مانند انتروتوکسیژنیک اشریشیا کلی (ETEC) و اشریشیاکلی تولید کننده وروتوکسین با ایجاد اسهال مرتبط هستند (۱و۲)، ثابت شده که ETEC باکتری غالب ایجاد کننده اسهال در گوساله ها و بچه خوک ها است (۳). سویه های ETEC بطور جهانی عامل اسهال حاد در انسان و حیوانات هستند. کلی باسیلوز روده‌ای از لحاظ اقتصادی یک بیماری مهم در گوساله‌های تازه متولد شده است که توسط سویه‌های انتروتوکسیژن (ETEC) ایجاد می شود (۴). چنین اسهالی بطور طبیعی نتیجه همراهی دو عامل مهم بیماریزایی است که توسط این سویه‌های اشریشیاکلی تولید می‌شوند. اول آنکه اجازه چسبیدن آنها به مخاط روده داده شود که از دفع باکتری توسط حرکات روده جلوگیری نماید، ثانیا تولید انتروتوکسین‌های حساس به حرارت LT (Toxin Heat labile) با وزن مولکولی ۸۸ کیلودالتون و یا مقاوم به حرارت ST (Heat stable Toxin) با وزن مولکولی ۵ کیلودالتون می‌باشد که جذب مایعات را از روده به مخاطره می اندازد. انترو توکسین LT توسط انتروتوکسین‌های خوکی و انسانی تولید می شود در حالی که انترو توکسین‌های ST توسط انتروتوکسین های انسانی، خوکی و گاوی تولید می‌گردد. اتصال به مخاط روده اولین و اساسی ترین مرحله در ایجاد بیماریزایی اشریشیاکلی انتروتوکسیژن می‌باشد (۵). در ETEC های جدا شده از گوساله‌های دارای اسهال در اکثر موارد فیمبریه K۹۹ به تنهایی یا همراه با فیمبریه F۴۱ وجود دارد (۶). روش‌های متعددی برای تعیین هویت ETEC بکار برده می‌شوند که معمولاً از طریق شناسایی یکی یا هر دو عامل بیماریزایی (فیمبریه ها و انتروتوکسین‌ها) می‌باشد. اسهال اشریشیاکلی انتروپاتوژن با سروتیپ‌های اختصاصی متعددی از اشریشیاکلی همراه بوده است. این سویه‌ها توسط آنتی ژن O و گاهی توسط تعیین تیپ آنتی ژن H شناسایی می‌شوند. گام اول در تأیید بیماری تشخیص تعداد زیاد باکتری اشریشیاکلی بیان‌کننده فیمبریه در مدفوع است. به وسیله درمان با آنتی بیوتیک، مدت زمان اسهال اشریشیاکلی انترو پاتوژن را می‌توان کوتاه‌کرد و اسهال مزمن را درمان نمود. هدف از این پژوهش، مقایسه مولکولی اشریشیا کلی جدا شده از گوساله‌های اسهالی در سطح استان فارس با توجه به فاکتورهای حدت باکتری اشریشیا کلی K۹۹ و همچنین ارزیابی الگوی پروتئینی آن‌ها با روش SDS- PAGE بود.

مواد و روش‌ها

در سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹، ۳۰۰ نمونه از مخاط رکتوم گوساله‌های ۱ تا ۳۰ روزه اسهالی با استفاده از سواپ استریل جمع‌آوری گردید و سواپ حاوی نمونه مدفوعی درلوله‌های در پیچ‌دار حاوی محیط TSB (Tryptic Soy broth) به آزمایشگاه موسسه رازی انتقال داده شد. نمونه‌ها برروی محیط مک کانکی آگارکشت خطی داده شد. از تست‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی سیترات، اوره، TSI، MR و VP به منظور شناسایی باکتری جدا شده استفاده گردید. از پرایمرهای اختصاصی K۹۹، F۴۱ و STa به منظور ازدیاد قطعه‌های به ترتیب ۳۱۴، ۳۸۰ و ۱۹۰ جفت بازی ژن‌های K۹۹، F۴۱ و Sta با استفاده از تکنیک PCR استفاده گردید (۷، ۸ و ۹) (جدول۱). در استخراج DNA کشت ۲۴ ساعته از سواب رکتوم در محیط TSB برداشته شد و سانتریفیوژ گردید و رسوب آن با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (DNP^{TM}) ساخت شرکت سیناژن مطابق پروتکل کیت استخراج گردید. برنامه دمایی PCR در دستگاه ترموسیکلر شامل ۲۵ سیکل و دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۰ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای نهایی ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. سپس محصول

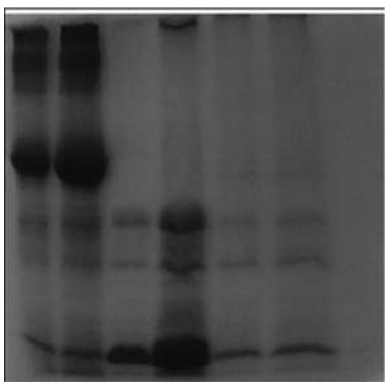
جدول۱: پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در PCR.

عامل بیماریزا	توالی پرایمر ۵′ → ۳′	اندازه پرایمر (bp)
K۹۹	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	۳۱٤
F٤۱	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	۳۸۰
STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	۱۹۰

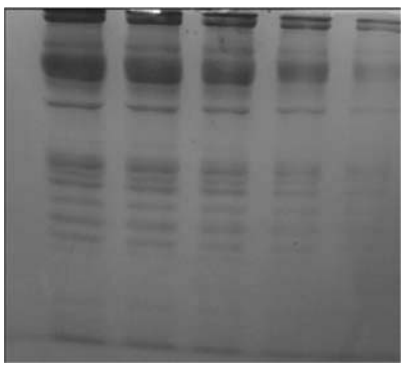
PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شد و با اشعه فرابنفش مشاهده گردید. برای خالص‌سازی فیمبریه K۹۹ باکتری در محیط کشت مینکا واجد، KH_2PO_4، Na_2HPO_4، گلوکز، کازآمینو اسید، عصاره مخمر، نمک‌های کمیاب و آب مقطر کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون باکتری سانتریفیوژ گردید و چند بار با PBS شستشو داده شد. برای اینکه باکتری به صورت محلول درآید از پودر شیشه، اوره و بید استفاده شد و نمونه آماده شده با پودر شیشه بر روی ستون جذب کروماتوگرافی برده شد تا آنتی ژن خالص بدست آید. سپس برای تعیین مقدار پروتئین پس از ترسیم منحنی استاندارد از روش لوری استفاده شد. همچنین تعیین الگوی پروتئینی باکتری با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد. برای این منظور ابتدا ۲/۵٪ stacking gel و ۱۰٪ resolving gel تهیه گردید و سپس TEMED (تترا متیلن دی آمین) برای انجام پلیمریزاسیون اضافه شد. در ابتدا برای انجام پلیمریزاسیون از ۵۰ میلی‌آمپر و در نهایت تا ۱۲۰میلی آمپر استفاده شد. همچنین از رنگ کوماسی بلو برای رنگ‌آمیزی ژل استفاده گردید و پس از رنگ‌بری باندها مشاهده شدند.

نتایج

از ۳۰۰ نمونه گرفته شده، در ۲۰۰ نمونه باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوز شناسایی شد. همه‌ی کلنی‌های تخمیرکننده لاکتوز (۲۰۰نمونه) در تست‌های بیوشیمیایی شامل سیترات، اوره، TSI، MR- VP، SIM مثبت شدند. از ۲۰۰ جدایه اشریشیاکلی پس از کشت در محیط مینکا (به منظور بیان فیمبریه **K۹۹**) تنها ۱۶ جدایه (۸٪) به طریق اسلاید آگلوتیناسیون با آنتی سرم تجاری K ۹۹ (ساخت شرکت Mastgroup انگلستان) مثبت شدند. از ۲۰۰ نمونه سواب رکتوم که به طور مستقیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در TSB (تریپتیک سوی براث) از طریق Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی فیمبریه K۹۹، F۴۱ و انتروتوکسین Sta مورد بررسی قرار گرفت، ۱۶ نمونه (۸٪) هر سه ژنK۹۹، F۴۱ و Sta را دارا بودند. در ۳ نمونه (۱/۵٪)تنها ژن F۴۱ و در ۴ نمونه (۲٪) هردو ژن F۴۱ و Sta وجود داشت. اما هیچکدام از نمونه‌ها دارای ژن LT نبودند. رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی برلیانت بلو نشان داد هر یک از باکتری‌های لیز شده حاوی تعداد زیادی باند پلی پپتیدی می‌باشند. تعداد باندهای پروتئینی به روش اوره به مراتب



شکل ۱: باندهای حاصل از پودر شیشه

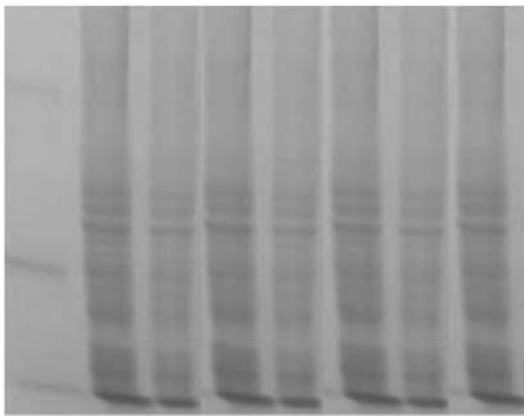


شکل۲: باندهای حاصل از بید

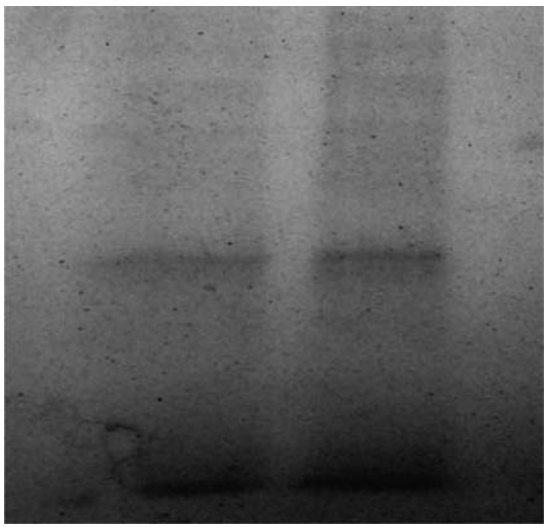
بیشتر از روش بید به دست آمد، در حالی که باندهای مربوط به پودر شیشه از هر دو روش یاد شده بسیار بیشتر بود (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴). اگر چه در روش پودر شیشه تعداد باندها بسیاربیشتر بود، اما تمام فیمبریه باکتری در محلول وجود داشت. بنابراین پس از اضافه کردن نمونه حاصل از پودر شیشه به ستون افینیتی کروماتوگرافی، خلوص بهتر باند مربوط به K۹۹ مشاهده گردید و بر اساس مارکر، تک باند بدست آمده (۱۸۲۰۰ دالتون) مربوط به آنتی ژن ۱۸کیلو دالتونی K۹۹ بود.

بحث

بیماری‌های عفونی از مهمترین عوامل تأثیرگذار در صنعت دامپروری می‌باشد که باعث خسارات اقتصادی زیادی می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها، اسهال گوساله‌ها است که از دو طریق مرگ گوساله‌ها و هزینه درمان و کاهش رشد دام پس از بیماری، خسارت به بار می‌آورد (۶). عوامل عفونی درگیر در اسهال گوساله‌ها، اشریشیاکلی K۹۹، سالمونلا، روتاویروس، کوروناویروس و برخی از تک یاخته‌ها نظیر کریپتوسپوریدیوم می‌باشند که در بین این عوامل عفونی، باکتری اشریشیاکلی K۹۹ از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مهم‌ترین عامل ایجاد اسهال در گوساله‌ها در روزهای اول زندگی می‌باشد (۱۰). مطالعات متعدد انجام شده نشان از شیوع این بیماری در گوساله‌های سنین زیر ده روز دارند. از جمله مطالعات گولر (Guler) و همکاران نشان داد که شیوع عفونت های اشریشیا کلی K۹۹ در هفته اول زندگی گوساله‌ها می‌باشد (۱۱). در مطالعه جاری از ۲۰۰ نمونه باکتری اشریشیاکلی جدا شده (۸٪) ۱۶ مورد اشریشیا کلی K۹۹ بود. مطالعه آکام (Akam) و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که میزان حساسیت گوساله‌ها نسبت به اشریشیا کلی K۹۹ در نخستین هفته پس از تولد در حدود ۶۶/۶٪ می‌باشد (۱۲). تحقیقات هره (Here) و همکاران نیز نشان داد که بچه خوک‌های ۱ تا ۶ روزه به آسانی درگیر اشریشیاکلی K۹۹ می‌شوند (۱۳). در مطالعه‌ای که در ۷ منطقه اروپا جهت بررسی عوامل ایجادکننده اسهال عفونی در گوساله‌ها توسط ساندرلند (Sanderland) و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت میزان شیوع اشریشیاکلی K۹۹ از ۸ تا ۴۶ درصد گزارش گردید (۱۴). در مطالعه‌ای که در بخش‌هایی از ترکیه انجام شده است نشان می‌دهد که ۱۶٪ از گوساله‌های مبتلا به اسهال دارای اشریشیاکلی K۹۹ بوده‌اند (۱۵). در مطالعات جداگانه‌ای که بر روی جدایه‌های اشریشیاکلی در مناطق مختلف ویتنام انجام شده مشخص گردید که ۱۶/۷٪ و ۱۸/۲۹٪ از جدایه‌ها دارای عامل بیماریزایی K۹۹ بودند(۱۶و۱۷). فراوانی اشریشیاکلی‌های K۹۹ در مناطق مختلف جهان متفاوت گزارش شده است که بخشی از این تفاوت (میزان شیوع)، بستگی به منطقه جغرافیایی دارد. اما نباید از نظر دور داشت که بخش دیگری از این تفاوت می‌تواند مرتبط با عواملی مانند عوامل مدیریتی، سن گوساله‌های مورد مطالعه، نقش آغوز در نتیجه تفاوت در زمان دریافت آن، حجم و



شکل۳: باندهای حاصل از اوره.



شکل۴: تک باند ۱۸کیلو دالتونی ستون جذبی کروماتوگرافی.

کیفیت آغوز دریافت شده، واکسیناسیون مادران باردار و همچنین استفاده از تکنیک‌های متفاوت در مطالعات باشد. در تحقیق حاضر جهت بیان فیمبریه K۹۹ از محیط مینکا استفاده شد. استفاده از محیط مینکا و شرایط مختلف رشد از لحاظ pH و درجه حرارت انکوباسیون و همچنین مدت زمان انکوباسیون توسط گینه (Guinee) و همکاران در سال ۱۹۹۷ مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که محیط مینکا شرایط مناسب برای بیان رشد آنتی ژن K۹۹ را دارد (۱۸و۱۹). فرانسیس (Fransis) و همکاران نیز که تولید آنتی ژن K۹۹ را در دو محیط کشت سنتزی و کامل مقایسه کردند به این نتیجه دست یافتند که محیط های کشت سنتزی مینکا، در مقایسه با محیط آگار خوندار ارجح‌تر است که با نتایج تحقیق جاری مطابقت دارد (۲۰). در مطالعه حاضر ازتکنیک PCR Multiplex برای تفکیک و تشخیص ژن های موردنظر K۹۹، F۴۱، Sta و LT استفاده شد. بر اساس نتایج، هر ۱۶ نمونه دارای هر سه ژن K۹۹، F۴۱ و Sta بوند .در حالیکه ۳ نمونه تنها ژن F۴۱ و ۴ نمونه دو ژن F۴۱ و Sta را دارا بودند. هیچکدام از نمونه ها ژن LTرا نداشتند. برای شناسایی این عوامل از پرایمرهای اختصاصی K۹۹، F۴۱، Sta و LT و مشاهده باندهای ۳۱۴، ۳۸۰، ۱۹۰ و ۴۸۰ جفت باز استفاده شد. فرانک (Franck) و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز نشان دادند که PCR ابزار تشخیصی اختصاصی، حساس، سریع و نسبتاً ارزان جهت تشخیص ژن های عوامل بیماریزایی K۹۹، F۴۱ و Sta در اشریشیاکلی های انتروتوکسیژنیک در گوساله‌های مبتلا به اسهال می‌باشد (۲۱). بورگوین (Bourgouin) در سال ۱۹۹۶ طی بررسی های خود بر روی ۱۷۸ رأس گوساله مبتلا به اسهال، میزان شیوع اشریشیاکلی حامل فیمبریه f ۵در نمونه‌های مورد آزمایش را ۱۶/۷٪ گزارش نمود (۲۲). در مطالعه حاضر از سه روش جهت خالص سازی آنتی‌ژن و بررسی الگوی پروتئینی استفاده شد. در بین روش‌های استفاده شده باندهای حاصل از پودر شیشه قابل ملاحظه بود، زیرا پودر شیشه کل پیکره باکتری را تخریب می کند، اماخلوص فیمبریه کمتر است. البته نمونه حاصل از پودر شیشه جهت استفاده برای ستون از روش‌های دیگر بهتر است. در صورتیکه بید و اوره به صورت سطحی فیمبریه را جدا می‌کنند و تمام فیمبریه‌های سطحی را نمی‌توانند جدا کنند. همچنین ممکن است برخی فیمبریه‌ها را بشکنند و بنابر این قسمتی از آن ها روی پیکره بماند. در نتیجه در این دو روش محصول خالص‌تر است ولی مقدار آن کمتر می‌باشد. در روش پودر شیشه تفاوت باندها بیانگر تفاوت در الگوی پروتئینی باکتری‌های K۹۹ جدا شده می‌باشد. در روش بید باندهای بدست آمده از تفاوت نسبتاً کمتری برخوردار بودند. همانگونه که در شکل ۲ مشخص است در برخی موارد تراکم باند نسبت به بقیه تفاوت دارد. این تفاوت در باندهای حاصل ازروش اوره تقریباً مشاهده نگردید. در هر دو روش بید و اوره باندهای مربوط به آنتی ژن k۹۹ آنگونه که در روش پودر شیشه معلوم بود مشخص نشده است. خالص‌سازی آنتی‌ژن k۹۹ در روش SDS-PAGE که توسط گراف (Graff) و همکاران انجام شد نشان داد این آنتی ژن از زیر واحدهای پروتئینی متفاوتی تشکیل شده است که این نتایج با نتایج منتشر شده توسط ایساکسون (Isaacson) در سال ۱۹۹۷ مغایرت داشت. وی اظهار داشت آنتی ژن k۹۹ تنها یک زیر واحد دارد (۲۳).

نتیجه گیری

مشاهده فاکتورهای حدت باکتری‌های k۹۹ جدا شده نشان داد که با این که از نظرمولکولی تفاوت معنی داری در بین نمونه‌ها وجود ندارد. اما از نظر الگوی پروتئینی تفاوت‌های قابل ملاحظه ای بین باکتری‌های جدا شده وجود دارد. این تفاوت در نمونه‌های حاصل از پودر شیشه به مراتب بیشتر از دو روش دیگر اوره و بید بود. با توجه به داده‌های بدست آمده چنین نتیجه گرفته می‌شود که باکتری‌های متفاوت، الگوهای پروتئینی مختلفی دارند و بنابراین بیماریزایی آن‌ها نیز متفاوت است .

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله از کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی و ایمنی‌شناسی موسسه رازی شیراز به دلیل همکاری صمیمانه کمال امتنان را دارند.

References

1. Levine MM. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherant. J Infect Dis. 1987; 155(3): 377-389.
2. Schoonderwoerd M, Clarke RC, van Dreumel AA, Rawluk SA. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of Escherichia coli O111:NM. Can J Vet Res. 1988; 52(4): 484-487.
3. Johnson MW, Fitzgerald GR, Welter MW, Welter CJ. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pig. Vet Med. 1992; 87(4): 382-386.
4. Hacker J. Role of fimbrial adhesions in the pathgenesis of *Escherichia coli* infections. Can J Microbiol. 1992; 38(7): 720-727.
5. Klemm P. Fimbrial adhesions of *Escherichia coli*. Rev Infect Dis. 1985; 7(3): 321-340.
6. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int J Med Microbiol. 2005; 295(6-7): 443-454.
7. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxigenic Esherishia Coli by using multiplex PCR assay for stx(1), stx (2), eaeA, enterohemorragic *E.coli* hlyA, rfbom. J Clin Microbiol. 1998; 36(2): 598- 602.
8. Elwell LP. Plasmid- mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. Ann Rev Microbiol. 1980; 34: 465-496.
9. Shimizu M, Sakano T, Yamamoto J, Kitajima K. Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of Esherishia coli isolated from calves with diarrhea in Japan. Microbiol Immunol. 1987; 31(5): 417-426.
10. Acha SJ, Kuhn I, Jonsson P, Mbazima G, Katouli M, Mollby R. Studies on calf diarrhea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. Acta Vet Scand. 2004; 45(1-2): 27-36.
11. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 142-201.
12. Akam A, Khelef D, Kaidi R, Othmani A, Lafri M, Tali-Maamar H, Rahal K, Tahrat N, Chirila F, Cozma V, Abdul Hussain MS. Frequency of Cryptosporidium parvum, *Escherichia coli* K99 and Salmonella spp. isolated from healthy and unhealthy calves in six breeding farms from Mitidja, Algeria (Preliminary results). Rev Sci Parasitol. 2004; 5(1-2): 13-21.
13. Li SG, Shen ZQ, Shan H. Cloning and nucleotide sequencing of fusion gene of K99 antigen and heat stable toxin I of *Escherichia coli*. Zhongguo Shou Yao Zazhi. 2007; 4: 11-14.
14. Sunderland SJ, Sarasola P, Rowan TG, Giles CJ, Smith DG. Efficacy of danofloxacin 18% injectable solution in the treatment of *Escherichia coli* diarrhoea in young calves in Europe. Res Vet Sci. 2003; 74(2): 171-178.
15. Guler L, Gunduz K, Ok U. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherihia coli* isolated from calves in Turky. Zoonoses Public Health. 2008; 55(5): 249-257.
16. Hariharan H, Coles M, Poole D, Page R. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves from piglets and calves from piglts and calves with diarrhea. Can Vet J. 2004; 45(7): 605-606.
17. Khai LTL, Voung PQ, Kobayashi H, Phan TT, Loc CB, Yamasaki S, Taniguchi T. Isolation,identification and treatment of piglet'diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88,K99,987P in Cantho Province,Vietnam. Res Microbiol. 2008; 24: 210-21.
18. Guinee PAM, Jansen WH, Agterberg CM. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect Immun. 1976; 13(5): 1369-1377.
19. Guinee PAM, Veldkamp MJ, Jansen WH. Improved minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977; 15(2): 676-678.
20. Evans DG, Evans DJ, Tjoa WS, DuPont HL. Detection and characterization of colonization factor enterotoxigenic Escheriachia coli isolated from adults with diarrhea. Infect Immun. 1978; 19(2): 727-736.
21. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. J Clin Microbiol. 1998; 36(6): 1795-1797.
22. Bourgouin H. The place of cryptosporidium among the diseases of new born claves in correze. Bulletin-des-G.T.V. 1996; 2: 19-41
23. Isaacson RE. K99 surface antigen of Esherichia coli: purification and partial characterization . Infect Immun. 1977; 15(1): 272-279.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 4, January 2011

An assessment for comparing virulent factors of enterotoxigenic *E. coli* k99 isolates by PCR and SDS- PAGE methods

Yasaman Kiani[1], Yahya Tahamtan[2], Mohammad Hosein Hoseini[2], Masumeh Hayati[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Reserch Institute, Shiraz, Iran
[3]M.Sc., Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Reserch Institute, Shiraz, Iran

Abstract

Background and Objective: Since *E. coli* K99 is a causative agent of diarrhea and casualties in calf, it has adverse impacts on economy. This research studied the pathogenic factors of the *E. coli* by Multiplex PCR, and determined protein pattern of different *E. coli* isolates by SDS-PAGE (sodium dodsil sulfate polyacryl amid gel electroforesis).

Materials and methods: 300 rectal swabs were collected from 1-30 days-old calf during a period between 2010 to 2011. One part of the samples was studied with Multiplex PCR method for determination of the K99, F41 as well as STa genes, and another part was cultured for *E. coli* isolation and SDS-PAGE assay.

Results: The PCR results indicated that 16 of the 200 isolated *E. coli* had K99, F41, and STa pathogenic factors. LT was not found in the isolates. SDS-PAGE results showed different protein pattern in the isolated *E. coli* strains. The results of SDS-PAGE column showed only one band for K99 antigen.

Conclusion: Based on the found virulent factors in the isolated *E. coli* K99, it has been shown that the isolates contain at least three pathogenic genes (K99, F41, and STa). Although no significant difference has been seen between the isolates in terms of gene investigations, there was a meaningful difference in the protein patterns of the isolates. As a conclusion, different bacteria showed different protein patterns and consequently had different pathogenic ability.

Keywords: E. coli K99, PCR, SDS-PAGE, Calf.

Correspondence to: Yahya Tahamtan
E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com
Phone: +989177117940

Journal of Microbial World 2011 3(4): 238-244