تاثير بروتين اللاكتوفرين المنقى من حليب الابقار ضد البكتريا المسببة للاسهال عند الاطفال

أ.د. رغد اكرم عزيز **سند علاء الدين مسلم**
الجامعة المستنصرية / كلية التربية الاساسية / قسم العلوم
أ.د. محمد فرج المرجاني
الجامعه المستنصرية / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

شملت الدراسة 50 عينة جمعت من براز اطفال مصابين بالاسهال الدموي والمائي الحاد وكانت اعمارهم دون سن الخمس سنوات , اذا امكن الحصول على 14 عزلة بكتيريه من اصل 50 عينة وبنسبة 28 % , اما العينات التي لم يظهر فيها نمو والتي تمثلت بنسبة 72 % من مجموع العينات قد يعزى الى وجود مسببات اخرى فقد يكون المسبب المرضي من الطفليات مثل *Entamoeba histolytica* و *Giardia Lamblia* و *Crytosporidium Parvum* و *Cyclospora Cayetanensi* , او قد يعزى حدوث الاسهال الى وجود الفيروسات وخصوصآ فيروس الروتا Rota virus الذي يعد من اكثر الانواع الفيروسية شيوعآ والمسببة للاسهال بين الاطفال دون سن الخمس سنوات , اذ شكلت بكتريا *E.coli* النسبة الاعلى فبلغ المجموع الكلي 10 عزلة اي بنسبة 20 % من مجموع العينات الكلية , اما بكتريا *Salmonella* فقد تم الحصول على عزلة واحد بنسبة 2 % من مجموع العينات الكلية , ومن جانب اخر تم الحصول على 3 عزلات تعود لبكتريا *Shigella* 21.4 % من مجموع العزلات الكلية .

فصل بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الابقار من ابقار نوع (فريزين) في الاسبوع الاول بعد الولادة من اجل دراسة قدرته على تثبيط نمو البكتريا المسببة للاسهال قيد الراسة , بينت النتائج كفاءة تأثير بروتين اللاكتوفيرين في تثبيط بكتريا *Salmonella* خارج جسم الكائن الحي وبلغت قطر منطقة التثبيط بحدود 15 ملم, كما انخفضت معدلات الاصابة بين الفئران عند استعمال بروتين اللاكتوفيرين داخل الجسم الحي .

المقدمة

يعد بروتين اللاكتوفيرين Lactoferrin من الإفرازات البروتينية الخاصة الموجودة في حليب بعض اللبائن، وهو بروتين سكري Glycoprotein رابط للكاربوهيدرات موجب الشحنة Cationic له القدرة على الارتباط بالحديد ومن ثم فانه يمنع نمو الأحياء المجهرية التي تتطلب الحديد في نموها، ولذا يصنف اللاكتوفيرين ضمن البروتينات التي تمتلك مقاومة حيوية عالية ضد الكثير من الأحياء المجهرية (عزيز واخرون، 2002؛ عزيز والمشايخي، 2003؛ Adlerova واخرون , 2008) . كما يعد اللاكتوفيرين أحد مجموعة البروتينات الناقلة للحديد Transferrin التي تشمل كلاً من Serum transferrin و Ovotransferrin، ويعد بروتين اللاكتوفيرين جزءاً من النظام الدفاعي للمضيف, إذ يكون عاملا فعالا وقويا ضد معظم أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فضلا عن بعض الخمائر والأعفان، إذ انه يؤثر في الأنواع التي تتشابه في الصفات المورفولوجية أو الفيزيولوجية , تكون آلية حدوث الإسهال عن طريق التصاق البكتريا المهاجمة بالأمعاء الدقيقة وإنتاجها سموما معوية جراء تماسها مع مستلمات خاصة موجودة في خلايا الطبقة المخاطية للأمعاء وذلك من خلال تنشيط أنزيم الأدينيل سايكليز Adenylatecyclase وزيادة تركيزه مما يؤدي إلى زيادة تركيز أحادي الفوسفات الخلوي CycliAdenosin Mono Phosphate، ونتيجة لذلك يزداد فقدان السوائل والأملاح من الأمعاء ويحدث الإسهال المائي، كما قد تقوم بعض أنواع البكتريا بغزو أو تحطيم خلايا القولون مؤدية إلى حدوث إسهال زحاري مصحوب بدم ومخاط وقيح، وهنالك بعض الأنواع من البكتريا التي لها القدرة على إنتاج سم خلوي يدعى Cytotoxin يؤدي إلى تحطيم نهاية الأمعاء الدقيقة والغليظة (Guerrant وآخرون، 1975؛ Aziz واخرون، 2016)، وتمتلك معظم الانواع العائدة للعائلة المعوية عوامل ضراوة والتي تعد السبب المباشر الرئيس في احاث الاصابات مثل اليوريز والهيمولاسين وكذلك البكتريوسينات والتي تع مواد بروتينية ذات طبيعة قاتلة او مثبطة لنمو الانواع المختلفة من الاحياء المجهرية (Al-Charrakh واخرون , 2011) . وتمتاز البكتريا المعوية Enterobacteriaceae بقابليتها الكبيرة على تكوين الغشاء اليوي Biofilm بسبب امتلاكها على وسائل الحركة فضلا عن انتاجها للسيليلوز الذي يلعب دورآ مهمآ في عملية الالتصاق بسطوح الخلايا (Solano واخرون , 2002) . ان الغشاء اليوي عبارة

عن قالب من البوليمرات خارج خلوية تتجمع داخلها مجتمعات بكتيرية مرتبطة بالسطح وتؤدي هذه التجمعات الى عواقب اقتصادية وطبية (Mariana واخرون , 2009) , وتحصل اجناس هذه العائلة على الحديد الذي يرتبط مع بروتينات المضيف من خلال صناعتها لحاملات الحديد وافرازها مركبات عضوية عالية الالفة للارتباط بالحديد تدعى Siderophor والتي تتنافس مع خلايا المضيف لجذب الحديد من بروتينات المضيف (Clarke واخرون , 2001)، **وجاءت هذه الدراسة لتهدف الى فصل وتنقية بروتين اللاكتوفرين من حليب الابقار واختبار تاثيره ضد مسببات الاسهال البكتيرية عند الاطفال.**

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية

1. العزلات البكتيريه المرضية

تم الحصول على 10 عزلات بكتيرية تعود لبكتيريا *Escherichia coli* وعزلة واحدة لبكتريا *Salmonella spp* و ثلاث عزلات لبكتريا *Shigella spp* من مجموع 50 عينة أخذت من براز اطفال مصابين بالاسهال الدموي والمائي الحاد باعمار دون سن الخمس سنوات من مستشفى الطفل المركزي ومستشفى الطفل في الكاظمية , وللفترة من 2015/11/2 ولغاية 2016/1/7 وزرعت النماذج بصورة مباشرة و شخصت العزلات اعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية ،ثم اعتمد التشخيص النهائي باستعمال نظام Vitek 2.

تحضير الشرش :

استعمل اللبأ البقري من ابقار نوع (فريزين) في الاسبوع الاول بعد الولادة في تحضير الشرش وحسب ماذكره Al-Mashikhi و Nakai (1987), فتمت عملية تخلص من الدهن من خلال استعمال جهاز النبذ المركزي المبرد و بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وبدرجة 4 م , وبعد ازالة الطبقة الدهنية اضيف الى اللبأ حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1 عياري بصورة مدرجة مع استمرار التحريك الى ان وصل الرقم الهيدروجيني الى 4.6 على درجة حرارة 25 م , جرى بعدها عملية التخلص من الكازين المترسب بعد استعمال النبذ المركزي المبرد و بسرعة 10000 دورة / دقيقة , لمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 4 م , جمع الراشح المتمثل بالشرش واجرى له عملية

التنافذ الغشائي باستعمال انابيب الفصل الغشائي Dialysis tube التي تسمح بنفاذ جزيئات ذات اوزان جزيئية 12000 كيلو دالتون فما دون من اجل التخلص من الاملاح الداخلة في تركيب الشرش وكذلك اللاكتوز وتحت تيار مستمر للماء لمدة 10 ساعات , حفظ بعدها الشرش بدرجة حرارة التجميد لحين الاستعمال .

فصل بروتين اللاكتوفيرين باستعمال كروماتوكرافي التبادل الايوني

تهيئة المبادل(Carboxy Methyl Cellulose (CMC : حضر المبادل الايوني بالطريقة التي قام بوصفها Whitaker (1972) , اذ علق 25 غم من مادة المبادل الايوني في 1 لتر من الماء المقطر وترك حتى ركدت حبيبات المبادل وجرى التخلص من الدقائق العالقة وغسل المبادل الرطب بـــ 500 مللتر من محلول حامض الهيدروكلوريك, ورشح تحت التفريغ باستعمال اوراق ترشيح نوع (Whatman No.1) , ثم غسل المبادل لمرات عدة بالماء المقطر للتخلص من اثار حامض الهيدروكلوريك ولحين وصول الرقم الهيدروجيني لحبيبات المبادل الى 7 , بعدها علقت حبيبات المبادل بمحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار وغسل مرات متعددة بالماء المقطر لحين وصول الرقم الهيدروجيني لحبيبات المبادل الى 7 , ثم غسل المبادل بمحلول دارئ منظم دارئ Tris بتركيز 0.5 مولار وبرقم هيدروجيني مقداره 7.5واصبح المبادل جاهز للعمل .

اجراء الفصل :

مزج 1000 مللتر من الشرش المحضر مع المبادل المنشط وتم تحريك المزيج بهدوء لمدة ساعة بوساطة قضيب زجاجي الى ان تم ايصال الرقم الهيدروجيني الى 7.5 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم , عبئ المزيج في عمود زجاجي ليعطي هلاماً بأبعاد 1.5×17 سم , وأهمل المحلول الخارج من العمود الذي يمثل البروتينات غير المرتبطه (Unbound Proteins) وغسل المتبقي من البروتينات أذ جمع المحلول الخارج في أنابيب اختبار, بسرعه جريان مقدارها 18 مللتر / ساعه وبواقع 3 مللتر / جزء, استمرت عمليه الغسل الى أن وصلت قراءة الامتصاصيه قرب الصفر على طول موجي 280 نانومتر باستعمال جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer جمع المحلول الخارج من العمود Eluant في أنابيب اختبار , وجرت متابعة قياس البروتين في كل جزء على طول موجي 280 نانومتر بعد تصفير جهاز المطياف الضوئي , رسم

منحنى الامتصاصية بالاعتماد على رقم الجزء المنفصل , توالت بعدها العمليات المنفصلة لجمع اجزاء كل قمة , واجريت لها عملية تنافذ غشائي ضد الماء المقطر مدة 24 ساعة باستعمال اكياس التنافذ الغشائي Dialysis tubes , ثم جففت النماذج بالتجفيد وحفظت بالتجميد لحين الاستعمال .

دراسة تأثير بروتين اللاكتوفيرين ضد مسببات الاسهال البكتيريه :

استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion التي ذكرها Batish واخرون (1988) لاختبار فعالية بروتين اللاكتوفيرين ضد البكتيريه المسببه للاسهال قيد الدراسة وعلى النحو الاتي :

زرعت اطباق بتري معقمة والحاوية على الوسط المغذي الصلب Nutrient Agar بطريقة النشر باستعمال القضيب الزجاجي المعقوف L-Shape المعقم بالكحول , بعد ان نقل 100 مايكرولتر من لقاح مزارع البكتيريا قيد الدراسة المنشطة بعمر 24 ساعة .عقم محلول اللاكتوفيرين بوساطة الترشيح بمرشح بكتريولوجي Millipore0.22 مايكرومتر .استعمل الثاقب الفليني لعمل ثقوب في الوسط الزرعي , بعدها ملئت الحفر بـــ 100 مايكرولتر من بروتين اللاكتوفيرين .حضنت الاطباق بدرجة حراره 10 م لمده ساعتين للسماح للبروتين بالانتشار خلال الوسط , ثم حضنت الاطباق على درجة حراره 37 م لمدة 24 ساعة .قيست اقطار مناطق التثبيط لكل حفرة بالملم .

تأثير اللاكتوفيرين ضد مسببات الاسهال البكتيري داخل الجسم الحي (في الفئران) :

لمعرفة فعالية بروتين اللاكتوفيرين تجاه بكتريا السالمونيلا المسببة للإسهال داخل جسم الكائن الحي *In vivo* ،تم إستعمال فئران بيضاء نوع ABLB/C بعمر 6-8 اسابيع , وبمعدل وزن 18 غرام , تم الحصول عليها من المركز الوطني للبحوث والرقابة الدوائية , وغذيت على العليقة المركزة المصممة لتربية وتجارب الفئران , في ظروف تدفئة وتبريد مسيطر عليها , والتي قسمت على اربع مجاميع كما يأتي :

المجموعة الأولى (م$_1$) : مجموعة سيطرة والتي تضمنت تغذية الحيوانات تغذية إعتيادية وضمت 3 فئران .

المجموعة الثانية (م$_2$) : تضمنت تغذية الحيوانات تغذية إعتيادية مع إعطائها لمدة 7 أيام 0.2 مللتر من بكتريا *Salmonella spp*المحتوي كل مللتر منه على 1×10^8 خلية (Hudault واخرون , 2001).

المجموعة الثالثة ($م_3$) : تضمنت تغذية الحيوانات تغذيـــة إعتياديـــة مـــع إعطائهـــا لمدة 7 أيام بكتريا*Salmonella spp* بحجم 0.2 مللتر متبوعة بـــ5 أيام أخـــرى أعطي خلالها:

- **0.3 مللتر بروتين اللاكتوفيرين لثلاث فئران .**

المجموعة الرابعة ($م_4$) : تضمنت تغذية الحيوانات تغذية إعتيادية مع إعطائها لمدة 5 أيام (في كل يوم منها) 0.3 مللتر من :

- **0.3 مللتر بروتين اللاكتوفيرين لثلاث فئران .**

متبوعة بـــ7 أيام أخـــرى أعطي في كل يوم منها بكتريا*Salmonella spp*بحجم اللقاح نفسه المذكور سابقاً لمعرفة دور بروتين اللاكتوفيرين في حماية الحيوانات من الإصابة ببكتريا *Salmonella spp*.

وبعد مرور اسبوعين قتلت الفئران بقطع الحبل الشوكي , فتحت البطن واستخرج منها كل من الكبد والطحال والامعاء الدقيقة , تم تنظيف الاعضاء بغسلها بالماء المقطر المعقم عدة مرات واخذ جزء صغير من كل عضو ووضع في انبوب معقم يحتوي محلول الملح الفسلجي لغرض عملية الزرع .

تقـــدير العـــدد الحـــي لبكتريا *Salmonella spp* في أعضاء الفئران

أتبعت الطريقة التي وصفها Lievin واخرون(2000) لعد بكتريا *Salmonella spp* في أعضاء الفئران وعلى النحو الآتي :جمعت الأمعاء الدقيقة والكبد والطحال لمجاميع الفئران الخاضعة للتجربة وغسلت بالمحلول الملحي الفسلجي لمرات متعددة .جنست الاعضاء بوساطة مجنس يدوي معقم .اجريت تخافيف عشرية لكل عضو مجنس باستعمال المحلول الملحي الفسلجي المبرد .أجرى الزرع على اطباق معقمة تحتوي على الوسط *Salmonella – shigella* agar , بطريقة النشر باستعمال القضيب الزجاجي المعقوف L – Shape المعقم بالكحول , بعد ان تم نقل 100 مايكروليتر من كل تخفيف .حضنت الاطباق بدرجة 37 م ولمدة 24 ساعة .حسبت اعداد البكتريا بحسب طريقة عد الاطباق القياسية

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص البكتريا المسببة للاسهال :

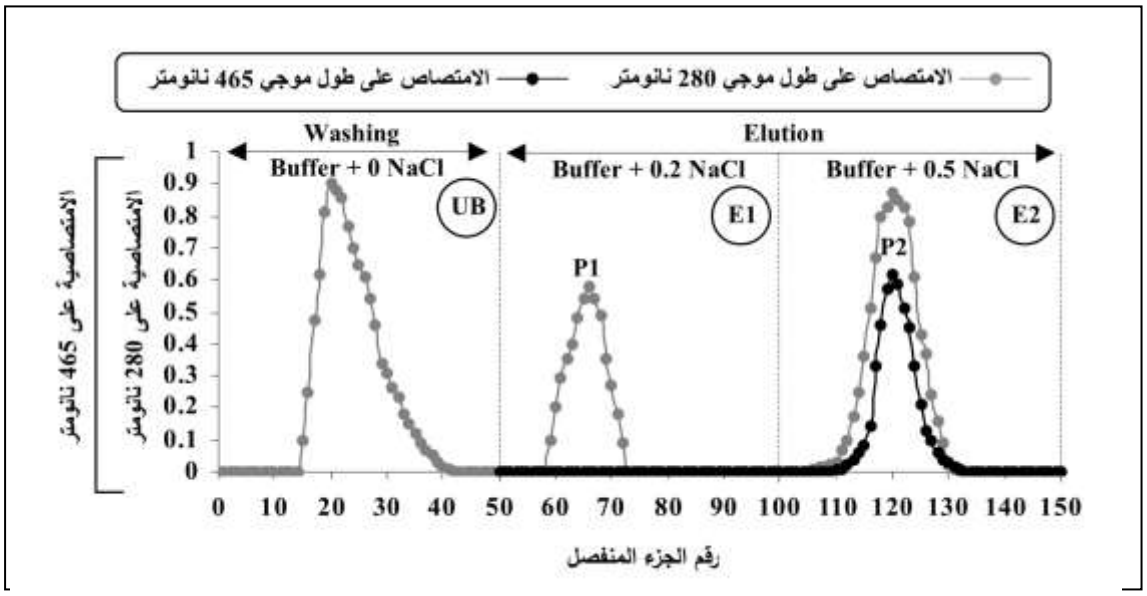
تضم العائلة المعوية مجموعة من الاعداد البكتيرية الكبيرة والتي تشارك فيما بينها والتي تشترك فيما بينها بعدة صفات منها سالبيتها لصبغة كرام , عصوية الشكل , وموطنها الطبيعي يكون في امعاء الانسان والحيوان وتتضمن هذه العائلة أجناساً مرضية عديدة اهمها *Klebsiella* , *Salmonella* , *Shigella* وغيرها , وقسم منها تكون نبيتاً طبيعياً مثل E.coli وافرا د هذه العائلة تكون اما هوائية او لا هوائية اختيارية ومخمرة لمدى واسع من الكربوهيدرات وتحتوي على تراكيب مستضدية معقدة وتنتج أنواعاً مختلفة من السموم وعوامل الضراوة (Brooks واخرون , 2007) .

اذ شخصت العزلات مبدئياً على انها تعود لبكتريا *E. coli* و *Salmonella spp* و *Shigella spp* بالاعتماد على الفحوصات الزرعية والمجهرية , استناداً الى شكل وقوام المستعمرات النامية ,حيث ظهرت مستعمرات بكتريا *E.coli* المزروعة على وسط الماكونكي الصلب بشكل مستعمرات ناعمة وتكون حافاتها منتظمة , تمتاز بلونها الاحمر المائل الى الوردي بسبب تخميرها سكر اللاكتوز (الغزاوي و الشمري , 2014) , اما الفحص المجهري فقد اكد شكلها العصوي و سلبيتها لصبغة كرام .

اما بكتريا السالمونيلا فقد اكد الفحص المجهري انها عصيات سالبة لصبغة كرام (ابو غرة واخرون , 2013), وعند زرعها على وسط السالمونيلا – شيكلا الصلب ظهرت السالمونيلا على هيأة مستعمرات عديمة اللون مع وجود سواد في المركز بسبب انتاجها غاز كبرتيد الهيدروجين H_2S, , وظهرت المستعمرات بلون ابيض غامق عند زرعها على وسط الدم الصلب وبعضها محاط بمنطقة شفافة كدليل على قدرتها على انتاج انزيم الهيمولايسين المحلل لكريات الدم الحمراء , في حين ظهرت مستعمرات الشيكلا على وسط الماكونكي الصلب بشكل مستعمرات صفراء شاحبة يصل قطرها الى 2 مللتر , وظهرت على وسط السالمونيلا شيكلا الصلب بلون شاحب بسبب عدم قدرتها على انتاج غاز كبرتيد الهيدروجين , وفي الفحص المجهري تميزت بانها عصوية مكورة وسالبه لصبغة كرام .

فصل بروتين اللاكتوفيرين من لبأ الابقار

أستعمل المبادل الأيوني الموجب الشحنة Carboxy Methyl Cellulose في تنقية بروتين اللاكتوفيرين نظرا لما يمتاز به من خصائص مهمة كسهولة التحضير وامكانية استعماله بعد أعادة تنشيطه لمرات عدة , اذ مرر الشرش المحضر من لبأ الأبقار بعد أجراء عملية التنافذ الغشائي على عمود التبادل الايوني الموجب CMC، ويبين الشكل (1) ظهور قمة واحدة في مرحلة الغسل تمثل البروتينات غير المرتبطة من بروتينات الشرش مثل الفالاكتوالبومين α –Lactoalbumin والبيتالاكتوكلوبيولين β-Lactoglobulin وعند اجراء عملية الاسترداد لوحظ ظهور قمتين (P_1 وP_2) اذ لوحظ ان الاولى اظهرت لوناً مخضراً وهذا يشير الى انزيم اللاكتوبيروكسيديز، بينما أعطت القمة الثانية لونا ورديا وقد أظهرت أرتفاعاً واضحاً عند قراءتها على طول موجي مقداره 465 نانومتر الخاص بالكشف عن بروتين اللاكتوفيرين (Shimazaki واخرون , 1992).



شكل (1) : فصل بروتين اللاكتوفيرين على عمود التبادل الايوني الموجب CM-Cellulose بأبعاد 1.5×17 سم من شرش لبأ الابقار وبسرعة جريان مقدارها 18 مل / ساعة وبواقع 3 مل / جزء , جرى الغسل باستعمال محلول منظم دارى Tris بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 , واجريت عملية الاسترداد على مرحلتين باستعمال محلولين وهما E1 محلول منظم دارى Tris بتركيز 0. 5 مولار وكلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني مقداره 7.5 , والمحلول المنظم الثاني E2 يحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار .

تطابقت النتائج التي تم التوصل اليها مع العديد من الدراسات ، اذ قام Nam واخرون (1999) بتنقية بروتين اللاكتوفيرين من حليب الماعز بتقنية التبادل الايوني باستعمال CM-Toyopearl650M , وقد حصل من خلال هذا الاستعمال على قمتين مثلت احداهما انزيم اللاكتوبيروكسيديز بينما مثلت الثانية بروتين اللاكتوفيرين، كما تمكن Fee وChand (2006) من فصل و تنقية بروتين اللاكتوفيرين واللاكتوبيروكسيديز من حليب الابقار بتقنية التبادل الايوني باستعمال SP Sepharose Big، اذ لوحظ ظهور قمتين كانت احداهما بلون مخضر والاخرى بلون وردي . وأستطاع Lu واخرون (2007) من فصل بروتين االلاكتوفيرين من لبأ الأبقار باستعمال تقنية الترشيح الفائق Ultrafiltration للحصول على الشرش المركز اعقبها خطوة التبادل الايوني بوساطة SP-Sepharose والحصول على قمتين مثلت الاولى انزيم اللاكتوبيروكسيديز بينما كانت الثانية بروتين اللاكتوفيرين ذي اللون الوردي المميز .

الفعالية التثبيطية لبروتين اللاكتوفيرين ضد مسببات الاسهال البكتيري :

اختبرت الفعالية التثبيطية لبروتين اللاكتوفيرين ضد العزلات البكتيرية قيد الدراسة المسببة للاسهال , وبين الجدول (1) امتلاك بروتين اللاكتوفيرين تأثيراً مثبطاً لنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام قيد الدراسة وقد وصلت اقطار مناطق التثبيط لـــ 20 ملم , اذ يقوم اللاكتوفيرين بمنع نمو الاحياء المجهرية من خلال وظيفته في سحب وحجز ايونات الحديد وهذا يفسر حاجة البكتريا الماسة للحديد لغرض القيام بالعمليات الايضية المختلفة .

جدول (1) : الفعالية التثبيطية لبروتين اللاكتوفيرين ضد العزلات البكتيرية قيد الدراسة

العزلات البكتيرية	الفعالية التثبيطية لبروتين اللاكتوفيرين(اقطار مناطق التثبيط بالملم)	العزلات البكتيرية	الفعالية التثبيطية لبروتين اللاكتوفيرين(اقطار مناطق التثبيط بالملم)
E. coli 1	10	*E. coli 8*	7
E. coli 2	0	*E. coli 9*	6
E. coli 3	12	*Shigella 1*	12
E. coli 4	7	*Shigella 2*	20
E. coli 5	0	*Shigella 3*	6
E. coli 6	10	*Salmonella*	13
E. coli 7	6		

دراسة تأثير بروتين اللاكتوفيرين داخل الجسم الحي ضد مسببات الاسهال البكتيرية

تمت دراسة التأثير التثبيطي والقاتل لبروتين اللاكتوفيرين تجاه بكتريا الإسهال داخل جسم الكائن الحي *In vivo* ،.بينت النتائج كفاءة تأثيربروتين اللاكتوفيرين في تثبيط بكتريا.*Salmonella spp* في اعضاء الفئران , ففي مجموعة التي اعطت بروتين اللاكتوفيرين قبل اصابتها لمدة 7 ايام انخفضت نسبة معدل نمو المستعمرات النامية من 180.3وحدة تكوين مستعمرة / مللتر الى 37.6وحدة تكوين مستعمرة / مللترفي الكبد , ومن 150.3وحدة تكوين مستعمرة / مللتر الى39.3في الامعاء , ومن 173.3 الى 30.6وحدة تكوين مستعمرة / مللتر في الطحال , اما مجموعة الفئران التي اعطيت بروتين اللاكتوفيرين لوحده بعد 7 ايام من اصابتها بالبكتريا الممرضة , والتي اظهرت معدل نمو كثيف في الكبد والامعاء والطحال على التوالي , فقد انخفض هذا المعدل ليصل الى 57.5 , 0 , 0وحدة تكوين مستعمرة / مللترفي الكبد والامعاء والطحال على التوالي . ان عمل بروتين اللاكتوفيرين حيال الاحياء المجهرية هو سحب وربط ايون الحديد Chelating Iron الا ان الدراسات اللاحقة وجدت ان اللاكتوفيرين يؤثر حتى في الاحياء المجهرية المعروفة بعدم حاجتها الماسة للحديد أذ انه يقوم بتحطيم الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة گرام مما يسبب تغيراً في نفاذية الغشاء ومن ثم موت الكائن المجهري اما ببتيدة اللاكتوفيرسين الحاملة للشحنة الموجبة لها القدرة على الارتباط الكيمياوي بجدار الخلية البكترية المحتوي على طبقة متعدد السكريات الدهنية LPS السالبة الشحنة (عزيز واخرون، 2002؛ Rossi واخرون , 2002) , ومن بين جميع الفوائد والمزايا المناعية التي يتمتع بها بروتين اللاكتوفيرين ضمن التراكيز التي يوجد بها في حليب الام تعد صفتة القاتلة bacteriostatic هي الاهم , والتي تكون فعالة تجاه البكتريا والفطريات والفايروسات فهو ينشط الجهاز المناعي و له تأثير كعامل مضاد للاكسدة Antioxidant ,ومضاد للسرطان anti-carcinogenic effects , كما اظهرت الدراسات ان استعمال المكملات الغذائية المحتوية على اللاكتوفيرين تمنع من تسمم الدم عند الاطفال حديثي الولادة . ويجب ان يكون اللاكتوفيرين في بيئة يكون فيها تركيز الحديد منخفضاً حتى يحتفظ بفعاليته المثبطة للجراثيم , فقد وجد عند اضافة مصدر خارجي من الحديد الى حليب الثدي فأن فوائد اللاكتوفيرين قد تفقد قيمتها , والتي قد تزيد بدورها من خطر العدوى (عزيز واخرون، 2002؛ Campos واخرون , 2013) , وتم

اكتشاف منطقة على سطح بروتين اللاكتوفيرين تحتوي على عدد كبير المستقبلات الذي يعمل على تثبيط استمرار نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام من خلال احداث اضطراب في جدار الخلية (Adlerova واخرون , 2008) .

المصادر

- الغزاوي، غيداء جاسم . و الشمري، أحمد جري شبيب .(2014) . قابلية بعض انواع البكتريا المعزولة من شط العرب والمياه البحرية على الإمتزاز الحيوي لبعض المعادن الثقيلة . مجلة أبحاث البصرة (العلميات) .40(3) .
- ابو غرة ، صياح ; سليق،سمير ، وابو يونس، عهد.(2013) . تشخيص بكتيريا spp. Salmonellaالمعزولة من الأجبان البيضاء المصنعة من حليب الغنم بالاعتماد على تقنيتي API وPCR . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . (1)29 : 129-141.
- عزيز، رغد اكرم والمشايخي، شعلان علوان. (2003). دراسة فعالية لاكتوفيرين شرش لبأ الأبقار والجاموس المضادة لنمو بعض أنواع البكتريا. مجلة الزراعة العراقية، مجلد 8، العدد 5: 156– 166.
- عزيز، رغد اكرم ؛ المشايخي، شعلان علوان وعبود، صبري جثير. (2002). تنقية وتوصيف اللاكتوفيرين من شرش لبأ الأبقار والجاموس. مجلة الزراعة العراقية، مجلد 7، العدد 3: 148–158.
- Adlerova, L.;Bartoskova ,A.andFaldyna, M. (2008) . Lactoferrin: a review .VeterinarniMedicina . 53 (9): 457–468.
- Al-Charrakha, A. H.; Yousif, S.Y. and Al- Janabi, H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from Klebsiella isolates from Hilla/Iraq. J.Microbial .Vol . 2(5): 1-11
- Al-Mashikhi, S. A. and Nakai, S.(1987).Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey protein by gel filtrations techniques.*Journalof Dairy Science*, 70:2486-2492.
- Batish, V.K.; Chander, H.; Zumdegni, K.C.; Bhatia, K.L. and Singh, R.S. .(1988) . Antibacterial activity of lactoferrin against some common food – borne pathogenic organisms . The Australian Journal of Dairy Technology . 43(1) : 16 – 18 .
- Brooks, G. F.; Butel, J. S.; Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed. A lange medical book

- Campos, L.F.; Repka, J.C.D.and Falcão, M.C.(2013) . Effects of human milk fortifier with iron on the bacteriostatic properties of breast milk . Jornal de Pediatria 89(4) : 394–399
- Clarke, T. E.; Tari, L. W. and Vogel, H. J. (2001). Structural biology of Bacterial iron uptake systems. Curr Top Med Chem., Vol .1,No. 1 :pp. 7 -30
- Fee, J. C. and Chand A.(2006). Direct capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange.Separation and Purification Technology, 48: 143–149 .
- Guerrant, R. L.; Moore, R. A.; Kirschenfeld, P. M. and Sande, M. A. (1975).Role of toxigenic and invasiva bacteria in acute diarrhea of childhood. New Eng. J. Med. 293: 567-572.
- Hudault, s.; Guignot , J . andServin , A.L. (2001) . *Escherichiacoli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonellatyphimurium* Infection. GUT; 49: 47 - 55.
- Lievin , V. ; Peiffer , I. ; Hudault , S. ; Rochat , F. and Servin , A.L. (2000) . Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity .GUT. 47(5) : 646- Shimazaki, K. I.; Nitta, K.; Sato, T.; Tomimura, T. and Tomita, M. (1992). Different profiles of induced cotton effects of human and bovine lactoferrin by cibacronblue F3GA binding. Comparative Biochemistry and Physiology,101B, (4):541-545.
- Lu, R. R.; Xu, S. Y.; Wang, Z. and Yang, R. J.(2007). Isolation of lactoferrin from bovine colostrums by ultrafiltration coupled with strong action exchange chromatography on a production scale. *Journal of Membrane Science*, 297:152-161.
- Nam, M. S.; Shimazaki, K.; Kumura, H.; Kyung Lee, K. K. and Yu, D. Y. (1999). Characterization of korean native goat lactoferrin .Comparative Biochemistry and Physiology, Part B,123:201–208.
- Mariana, N. S.; Salman, S.A.; Neela, V.; Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillinresistance Staphylococcus aureus. Afr. J. Microbiol. Res.Vol.3,No. 6 : 330-338.
- Aziz, A. R.; Salman, J. A. S. and Hachim. O. A. H. (2016). ANTIBACTERIAL EFFECT OF BACTERIOCIN FROM *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* SSP. *CREMORIS*

AGAINST DIARRHEAL CAUSATIVE BACTERIA. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences, Vol. 3, No. 11, 114-118.

- Rossi, P.; Giansanti, F.; Boffi, A.; Ajello, M.; Valenti P.; Chi¬ancone, E. and Antonini,G.(2002).Ca+2binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide . Biochem¬istry and Cell Biology, 80: 41–48.
- Solano, C. and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. Mol. Microbiol. 43: 793 – 808
- Whitaker, J.R. (1972).Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker. Inc. New York, USA.

Abstract

The study included 50 samples collected from the stool of children with bloody diarrhea and acute watery and were aged under five years of age, if possible, get a 14 bacterial isolates out of 50 samples and 28%, while the samples where growth does not appear, which were represented by 72% of the total samples may be due to the presence of other pathogens that causes it may be sick from parasites such as *Entamoeba histolytica*, and *Giardia Lamblia* and *Crytosporidium Parvum* and *Cayetanensi Cyclospora*, or may be due occurrence of diarrhea to the presence of viruses, especially rotavirus which is one of the most viral common types and causes of diarrhea among children under the age of five years, as the bacteria *E.coli* accounted for the highest percentage, bringing the total isolation of 10 at a rate of 20% of the total samples, either *Salmonella* bacteria have been getting the isolation of a single 2% of the total samples, and the other was to get three isolates belonging to the bacteria *Shigella* 21.4% of the total isolates

Separation of lactoferrin protein from colostrum cows from cows type) Friesen) in the first week after birth in order to study its ability to inhibit the bacterium that causes the growth of diarrhea under hometown, the results showed the efficiency of the effect of the protein lactoferrin in inhibiting bacteria Salmonella outside the body of the organism and amounted to inhibition zone up to 15 mm and injury rates have decreased in mice when using the protein lactoferrin in vivo.