

بررسی فراوانی فیمبریه F۵ در باکتری‌های *E.coli* جدا شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال در شهرستان اراک

- سید شمس الدین قائم مقامی، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی
- سیدعلی پوربخش، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- حسین گودرزی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- کیوان ابراهیمی، کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۳

E.mail: ghaemagham@yahoo.com

چکیده

باکتری *E.coli* از جمله عوامل معمول مولد اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده می باشد این باکتری دارای خصوصیتی است که از مهمترین آنها وجود یا عدم وجود فیمبریه F۵ است. هدف از انجام این تحقیق تعیین فراوانی فیمبریه F۵ در سویه های *E.coli* جدا شده از گوساله های مبتلا به اسهال می باشد. در این طرح تعداد ۲۳۴ نمونه مدفوع از گوساله های مبتلا به اسهال با سن زیر یک ماه جمع آوری گردید پس از جداسازی باکتری *E.coli*، وجود فیمبریه F۵ در باکتری های جدا شده به وسیله آنتی سرم اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفت و از بین ۲۳۴ نمونه تعداد ۲۱ مورد (۹٪) مثبت تشخیص داده شد. فراوانی موارد مثبت در گوساله های مبتلا با سن زیر ۵ روز ۱۹٪ و در گوساله های بالای ۵ روز ۵٪ تعیین گردید همچنین فراوانی موارد مثبت در گاوداری های سنتی (۲۰٪) به میزان قابل توجهی از گاوداری های صنعتی (۲/۶٪) بالاتر بود. با توجه به نتایج بدست آمده، باکتری *E.coli* در ایجاد اسهال در گوساله ها در شهرستان اراک دخیل بوده و باید مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گوساله، اسهال، فیمبریه (F۵)

Pajouhesh & Sazandegi No: 67 pp: 87-91

Survey of F5 fimbriae in *Escherichia coli* isolated from diarrheal calves in Arak city (Iran).

By: Ghaemmaghami, S.H., Member of Scientific Board of Natural Resource and Agriculture Research Centre., Pourbakhsh, S.A., Member of Scientific Board of Razi Research Institute., Goodarzi, H., Member of Scientific Board of Razi Research Institute., Ebrahimi, K., Expert of Natural Resource and Agriculture Research centre.

Escherichia coli is one of the common agents of diarrhea in new born calves. Bacteria has characteristics which from them, the presence of fimbriae is very important. The purpose of this research was determination of prevalence of F5 fimbriae in isolated bacteria from diarrheal calves. In this research, 234 fecal samples were collected from diarrheal

calves with less than one month old. After isolation of *E.coli*, the presence of F5 fimbriae in isolated bacteria was examined by specific antiserum (F5 antiserum). From 234 samples 21 cases (9%) were positive. Frequency of positive cases was 19% in calves with less than 5 days old and 5% in calves with more than 5 days old, also frequency of positive cases in rural dairy farms (20%) was significantly higher than industrial dairy farms (2/6%). According to results, *E. coli* plays role in calves diarrhea in Arak city and it must be noted.

Key words: Calf, Diarrhea, Fimbriae(F5).

مواد و روش کار

الف - نمونه

در این طرح تعداد ۲۳۴ نمونه سواب مدفوع از گوساله‌های مبتلا به اسهال کلینیکی با سن زیر یک ماه اخذ گردید. سواب‌ها بر روی محیط EMB در یک نقطه مالیده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

ب - جداسازی و خالص سازی باکتری *E. coli*

پس از انتقال پلیت‌های EMB به آزمایشگاه، آنها به روش معمول کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس از کلنی‌های سبزرنگ با جلای فلزی برداشت شده و کشت آنها در مک کانگی انجام پذیرفت. در مرحله بعد و پس از کشت کلنی‌های لاکتوز مثبت در محیط TSI (در صورت مشاهده اسید/اسید)، آنها توسط تست تفریقی IMVIC مورد ارزیابی قرار گرفتند. کلنی‌هایی که اندول تولید نموده و آزمایش متیل رد آنها مثبت و آزمایش Voges Proskauer و سیمون سترات آنها منفی بود به عنوان کلنی *E. coli* خالص شده جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

ج - آزمایش سرمی

پس از خالص سازی باکتری‌های *E. coli* از نمونه‌های مدفوع، به منظور تظاهر مناسب فیمبریه، باکتری در محیط Mink agar, Trypto soy agar (TSA) و به صورت سفراهی تا ۳ مرتبه کشت داده شد. در مرحله بعد توسط PBS از باکتری سوسپانسیون مناسب تهیه شده و به میزان ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بر روی لام قرار گرفت پس از اضافه نمودن آنتی سرم اختصاصی F5 به سوسپانسیون فوق و مخلوط نمودن آن، لام تا ۲ دقیقه تکان داده شده و در صورت مشاهده واکنش آگلوتیناسیون، نمونه به عنوان مورد مثبت (حامل فیمبریه F5) در نظر گرفته می‌شد.

نتیجه

بر اساس نتیجه حاصل از بررسی تعداد ۲۳۴ نمونه مدفوع مربوط به گوساله‌های مبتلا به اسهال (از نظر فیمبریه F5)، فراوانی فیمبریه F5 در نمونه‌های مورد آزمایش ۹٪ برآورد گردید (جدول شماره ۱). جدول شماره ۲، فراوانی فیمبریه F5 در باکتری‌های جداسازی شده از گوساله‌های بیمار را بر اساس سن نشان می‌دهد.

مقدمه

کلنی باسیلوز از جمله بیماری‌های شایع در بین حیوانات تازه متولد شده است. این بیماری به دو شکل در گله تظاهر پیدا می‌کند، که عبارتند از کلنی سپتی سمی و کلنی باسیلوز روده‌ای (۱۷). انواع سرمی خاصی از باکتری *E. coli* سبب کلنی باسیلوز می‌گردند، دسته‌ای از آنها با سپتی سمی مربوط بوده و گروه دیگر با اسهال در ارتباط می‌باشند. باکتری‌های این گروه واجد خصوصیتی هستند که این خصوصیات قابلیت‌هایی از قبیل قدرت بقاء و تکثیر و همچنین افزایش ترشح مایع در روده را در باکتری ایجاد می‌نماید. از جمله این ویژگی‌ها قابلیت باکتری در تولید سم می‌باشد، به طور کلی دو نوع سم توسط باکتری بیماری‌زا تولید می‌گردد، ۱- سم حساس به حرارت ۲- سم مقاوم به حرارت تاکنون تمام باکتری‌های جدا شده از گوساله سم مقاوم به حرارت (Sta) را تولید نموده‌اند (۲). مهمترین ویژگی باکتری بیماری‌زا وجود فیمبریه در سطح باکتری است که سبب اتصال آن به مخاط شده و از حذف عامل توسط حرکات دودی جلوگیری می‌نماید. پیلی یا فیمبریه رشته‌های نازک پروتئین هستند که سطح سلول باکتری را می‌پوشانند و مانند یک ماده چسبنده سبب اتصال باکتری به سلول‌های پوششی روده می‌گردند (۲). بر اساس گزارشات موجود می‌توان فاکتور F5 را به عنوان مهم‌ترین پادگن موجود بر روی باکتری *E. coli* بیماری‌زا در گوساله‌ها قلمداد نمود (۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸). طراحی پروب‌های اختصاصی برای شناسایی فاکتورهای حدت از قبیل سم و فیمبریه امکان مطالعات گسترده‌تر بر روی سویه‌های بیماری‌زای باکتری را فراهم نموده است (۱۳،۲۰،۲۱).

تحقیقات انجام شده در زمینه نقش باکتری مذکور در ایجاد اسهال در گوساله‌ها طی سالهای ۱۹۶۰ تا ۱۹۸۰ محققین جهان را برآن داشت تا درصد کنترل این بیماری از طریق واکنس مناسب برآیند (۱۰) و در حال حاضر نیز واکنس‌های حاوی این عامل به صورت تجاری در جهان موجود می‌باشد. این تحقیق به منظور تعیین فراوانی فیمبریه F5 در باکتری‌های *E. coli* جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها در گاوداری‌های شهرستان اراک صورت پذیرفت.

چند تاکنون گزارشی درمورد میزان شیوع این فاکتور در کشور ارائه نشده ولی آمار و ارقام متفاوتی در رابطه با میزان شیوع این فاکتور در باکتری‌های جدا شده در نقاط مختلف جهان وجود دارد. Bourguin در طی بررسی خود بر روی ۱۷۸ رأس گوساله مبتلا به اسهال، میزان شیوع *E.coli* حامل فیمبریه F۵ در نمونه‌های مورد آزمایش را ۱۶/۷٪ گزارش نمود (۳).
تحقیقات انجام شده در مراکش در طی یک دوره ۳ ساله میزان شیوع عامل فوق در گوساله‌های مبتلا به اسهال (با سن ۱ تا ۲۵ روز) را ۲۶/۹٪ نشان داد (۶).

Abraham پس از بررسی بر روی ۱۰۸ نمونه مدفوع مربوط به گوساله‌های مبتلا به اسهال میزان شیوع باکتری‌های حامل فاکتور F۵ را ۱۱/۱٪ گزارش نمود (۱). در انگلستان نیز در طی تحقیقات انجام شده بر روی باکتری‌های *E.coli* جدا شده از گاوها (در طی ۵ سال)، میزان شیوع پادتن F۵ ۹/۱٪ تعیین گردید (۱۹).

Fuente در طی دو تحقیق متوالی در قسمت مرکزی اسپانیا (سال ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹) میزان شیوع پادگن F۵ را به ترتیب ۱۱/۹٪ و ۲۷/۸٪ گزارش نمود (۴، ۵) نتیجه این تحقیق بیانگر این است که امکان تغییر

جدول شماره ۱: فراوانی فیمبریه F۵ در نمونه‌های مورد آزمایش

نمونه‌های حامل فیمبریه F۵	۲۱	۹٪
نمونه‌های فاقد فیمبریه F۵	۲۱۳	۹۱٪
جمع	۲۳۴	۱۰۰٪

در جدول شماره ۳، فراوانی فیمبریه F۵ در باکتری‌های جدا شده از گوساله‌های مبتلا بر اساس سیستم پرورشی (صنعتی و غیر صنعتی) آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج طرح حاضر فراوانی فیمبریه F۵ در باکتری‌های *E.coli* جدا شده از موارد اسهال در گوساله‌ها ۹٪ برآورد گردید. هر

جدول شماره ۲: فراوانی فیمبریه F۵ در *E.coli* های جدا شده از موارد اسهال گوساله‌ها بر حسب سن

جمع	-		+		فراوانی فیمبریه F۵ سن گوساله مبتلا
	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	
۱۰۰٪	۸۱٪	۵۰	۱۹٪	۱۲	۱ - گوساله‌های مبتلا با سن زیر ۵ روز
۱۰۰٪	۹۵٪	۱۶۳	۵٪	۹	۲ - گوساله‌های مبتلا با سن بالای ۵ روز

جدول شماره ۳: فراوانی فیمبریه F۵ در *E.coli* های جدا شده از موارد اسهال در گوساله‌ها بر حسب سیستم پرورش

جمع	-		+		فراوانی فیمبریه F۵ سیستم پرورش
	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	
۱۰۰٪	۹۷/۴٪	۱۴۵	۲/۶٪	۴	۱ - گوساله‌هایی که تحت سیستم صنعتی پرورش داده می شوند
۱۰۰٪	۸۰٪	۶۸	۲۰٪	۱۷	۲ - گوساله‌هایی که تحت سیستم سنتی و یا نیمه صنعتی پرورش داده می شوند

مرکزی که صمیمانه ما را در اجرای طرح مذکور یاری نموده اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- 1-Abraham, G., Roeder, P.L., Zewdu, R.,1992; Agents associated with neonatal diarrhea in Ethiopian dairy calves. Tropical Animal Health and production, 24:2, 74-80.
- 2-Acres,S.D.,1985; Enterotoxigenic escherichia infection in new born calves: A review. J. Dairy sci, 58: 229-256.
- 3-Bourgouin, H.,1996; The place of cryptosporidium among the diseases of new born calves in correze. Bulletin-des- G.T.V, 2: 19-41.
- 4-De la Fuente, R., Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Luzon, M., Cid, D., Garcia, S., Orden, J.A., Gomez-Bautista, M.,1998; Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. Prev vet med, Aug 7, 36(2): 45-52. (A).
- 5-De-la. Fuente, R., Luzon, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Garcia, A., Cid, D., orden, JA., Garcia, S., Sans, R., Gomez-Bautista, M.,1999;. Cryptosporidium and concurrent infections with other major entero pathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Veterinary-Parasitology, 80:3, 179-185.(5)
- 6-Fassi-Fehri, M.M., Johnson, D.W., Taoudi, A., Berrada, J.,1988; Epidemiology of diarrhea due to *Escherichia coli* and rotaviruses in calves and lambs in Morocco. Annales-de-Recherches-Veterinaires, 19:1, 59-64.
- 7-Garcia, A., Ruiz-Santa- Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Sanz, R., Gomez-Bautista., de la Fuente, R.,2000; Rotavirus and conccarrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comp Immunol Microbiol Infec Dis, Jul, 23(3): 175-83. (B)
- 8-Gulali,B.R., Sharma, V.K., Taku, A.K.,1992; Occurrence and enterotoxigenicity of F₁₇ fimbriae bearing *Escherichia coli* from calf diarrhea. Veterinary Record, 131: 15, 348-349.
- 9-Mainil, J.G., Bex,F., Jacquemin, E., Pohl,P., Couturier, M., Kaeckenbeeck, Albert.,1990; Prevalence of four enterotoxin (StaP, StaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88,987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. American Journal of Veterinary Research, 51:2,187-190.
- 10-Moon, H. W., Bunn, T. O.,1993;. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals-Vaccine, 11: 2,213-220.
- 11-Myers,L.L., Guinee, P.A.M.,1976;. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. Infection and Immunity, 13:4, 1117-1119.
- 12-Nagy, B., Fekete, P.Z.,1999;. Enterotoxigenic *Escherichia coli*

میزان شیوع عامل در مقاطع مختلف زمانی وجود دارد. همچنین Garcia در اسپانیا، پادگن F5 را در ۱۶/۷٪ از باکتری‌های *E.coli* جدا شده از موارد اسهال در گوساله‌ها تشخیص داد (۷).

همانطوری که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود فراوانی این عامل در گوساله‌های مبتلا به اسهال با سن زیر یک هفته به میزان قابل توجهی بالاتر از شیوع آن در گوساله‌های با سن بالای یک هفته می‌باشد. با توجه به اینکه عمدتاً باکتری *E.coli* حیوانات نوزاد را در چند روز اول زندگی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵ روز اول)، وجود اختلاف در شیوع بر اساس سن دام‌های مبتلا منطقی به نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج جدول شماره ۳، فراوانی *E.coli* بیماری‌زا در گاوداری‌های سنتی و نیمه صنعتی به میزان قابل توجهی بالاتر از گاوداری‌های صنعتی است این مسئله اهمیت رعایت موازین بهداشتی در هنگام تولد گوساله و بعد از آن را نشان می‌دهد که از جمله آنها می‌توان وجود اتاق زایمان جداگانه، شستشو و ضدعفونی نواحی زایمان در روی بدن مادر، جداکردن نوزاد پس از تولد و نگهداری آن در محل جداگانه تمیز و تغذیه به موقع و کافی توسط آغوز را نام برد.

اگرچه پادگن F5 به عنوان مهمترین فاکتور موجود بر روی *E.coli* بیماری‌زا در گوساله‌ها شناخته شده است ولی دخالت سایر پادگن‌های فیمبریه از قبیل F₄₁ و F₁₇ در بیماری‌زایی اسهال به اثبات رسیده است (۲، ۸، ۱۲، ۱۴، ۱۵)، ولیکن به دلیل نقش اولیه F5 در بیماری‌زایی اسهال کلی باسیلی، تعیین فراوانی این فاکتور مد نظر مجریان این طرح بوده است.

در تحقیق حاضر میزان شیوع پادگن F5 بر اساس خصوصیات فنوتیپی باکتری *E.coli* (تظاهر مناسب فیمبریه) تعیین گردیده است. با توجه به گزارشات موجود در ارتباط با استفاده از روش‌های ملکولی (پروپ‌های اختصاصی) برای تشخیص فاکتورهای حدت (فیمبریه و سم) در باکتری‌های *E.coli* (۱۳، ۲۰، ۲۱)، پیشنهاد می‌شود در طی یک بررسی گسترده‌تر، باکتری‌های جدا شده از موارد بیماری به روش ملکولی مورد بررسی قرار گیرد تا در مرحله بعد بتوان با استفاده از سویه‌هایی که در آنها فیمبریه به خوبی تظاهر می‌نماید واکنش مناسبی تهیه نمود. در پایان با توجه به نتایج بدست آمده انجام اقدامات زیر ضروری می‌باشد:

- ۱ - بهداشتی نمودن جایگاه نگهداری دام در مراکز پرورش سنتی.
- ۲ - ارتقاء سطح آگاهی دامپروران در زمینه چگونگی رعایت مسائل بهداشتی در هنگام زایمان و پس از آن.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از نتایج طرح تحقیقاتی تحت عنوان بررسی میزان شیوع فاکتور F5 در باکتری‌های *E.coli* جدا شده از موارد اسهال در گوساله‌ها، که با همکاری موسسه رازی به مرحله اجرا رسیده، استخراج گردیده است.

بدین وسیله از زحمات آقایان محمد طاهری کارشناس محترم بخش تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی و مهدی احمدی کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات استان

calves with bacteriemia.

17-Radostits, O.M., Blood, D.C., 1994;. Veterinary Medicine pp: 707-712.

18-Ueda, H., Terakado, N., Isayama, Y., Sakurai, K., Naka Zawa, M., 1981;. Etiologic studies on enterotoxigenic *Escherichia coli* among isolates from domestic animal in Japan. National Institute of Animal Health Quartely, 21: 2, 108-109.

19-Wary, C., McLaren, I.M., Carroll, P.J., 1993;. *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. Vet Rec, 30, 133(18): 439-42. (I)

20-Woodward, M.J., Kearsley, R., Wray, C., Roeder, P.L., 1990;. DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. Vet Microbiol, Apr, 22(2-3): 277-90. (E)

21-Woodward, M.J., Wray, C., 1990;. Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals. Vet microbiol, oct, 25(1): 55-65. (D)

(ETEC) in farm animals. Vet Res, mar-Jun, 30(2-3): 259-84. (C)

13-Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A., 1994;. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. Zentralbl veterinarmed B, mar, 41(1): 49-59(F).

14-Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Garcia, S., Cid, D., de la Fuente, R., 1999;. In vitro activities of cephalosporins and quinolones against *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic dairy calves. Antimicrobial Agents and chemotherapy, March, 43(3): 510-13(H)

15-Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Garcia, S., Cid, D., de la Fuente, R., 2000;. In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents. J vet med B Infect Dis vet Public Health, Jun, 47(5): 329-35.

16-Ou Said, A.M., Contrepolis, M. G., Vartainian, M., Giradeau, J.P., 1998;. Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from

