مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (6) 2012
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (6) 2012

الكشف عن عوامل الفوعة لذراري الإشريكية القولونية المعزولة من حالات إسهال العجول بطريقة تفاعل البوليميراز المتسلسل

الدكتور سامر كامل إبراهيم*

(تاريخ الإيداع 19 / 4 / 2012. قبل للنشر في 4 / 11 / 2012)

□ ملخّص □

تم جمع 100 مسحة برازية من عجول صغيرة حديثة الولادة تعاني من إسهالات شديدة أو إسهال مدمى من مزارع المؤسسة العامة للأبقار (مسكنة، جورين و دير الزور) وذلك خلال العام 2011. زرعت العينات على وسط أجار ماكونكي من أجل عزل الإشريكية القولونية وتم تنقيتها ثم أجري التنميط الكيمياحيوي. تم في هذه الدراسة تنميط 150 ذرية من الإشريكية القولونية من أصل 90 عجلاً مصاباً بالإسهال. عند إخضاع هذه الذراري لتفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99 (F5)، فقد أظهرت النتائج أن 9 ذراري من أصل 150 ذرية (6%) تمتلك مورثات هذين العاملين وتعود هذه إلى9 عجول (10%). أما عند إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان السام لخلايا فيرو النمط VT1 والنمط VT2، فقد وجد أن 21 ذرية من الذراري المختبرة كانت إيجابية لوجود مورثات الذيفان السام لخلايا فيرو (14%) وعند حساب النسبة المئوية على عدد العجول فقد تبين أنها معزولة من 23.33% من العجول. أظهرت نتائج الاختبار أيضاً أن 15 ذرية كانت ايجابية لوجود مورثة الـVT1 و 6 ذراري كانت ايجابية لوجود مورثات الـVT1 و الـ VT2 سويةً. وعند الكشف عن امتلاك ذراري الإشريكية القولونية المعزولة في هذه الدراسة لمورثة الأنتيمين المميزة للذراري الممرضة للأمعاء، فقد بينت النتائج أن ذريتين فقط (1.33%) من الذراري المختبرة تملك هذه المورثة أي أن 2.22% من العجول كانت مصابة بالذرية الممرضة للأمعاء.

الكلمات المفتاحية: الإشريكية القولونية، الذيفان الصامد بالحرارة، تفاعل البوليميراز المتسلسل، K99، الذيفان السام لخلايا فيرو، الأنتيمين.

*أستاذ مساعد– قسم الأحياء الدقيقة– كلية الطب البيطري– جامعة البعث– حمص– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (6) 2012
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (6) 2012

Detection of Virulence Factors of Escherichia Coli Strains Isolated from Cases of Calf Diarrhea by Polymerase Chain Reaction

Dr. Samer Kamel Ibrahim*

(Received 19 / 4 / 2012. Accepted 4 / 11 /2012)

□ ABSTRACT □

A total of 100 fecal samples were collected from diarrheic calves from three farms located in Hama ,Aleppo and Der alzor province during 2011. The samples were cultured on MacConkey's agar medium for isolation of *E.coli* , and a total of 150 E.coli strains were identified from 90 calves. These strains were subjected to multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) to detect ETEC which posses genes of heat stable toxin(ST_a) and adhesion factor K99(F5). The results revealed that 9 out of 150 strains (6%) were positive for both genes, obtained from 9 calves (10%). Using PCR for detection VTEC (VT1&VT2), the results showed that 21 strains (14%) were positive. The VT1 gene was detected in 15 strains, meanwhile VT1 and VT2 genes were detected in six strains. The entimine (eaeA gene) was detected only in two strains (1.33%) which belonged to two calves(2.22%).

Key word: *E.coli*, Heat stable toxin, polymerase chain reaction, adhesion factor K99 (F5), VTEC, entimine

***Associate professor, Dep. Microbiology, Fac. Vet. Med, Albaath University, Homs, Syria.**

مقدمة:

تحدث أمراض الإسهال عند الحيوانات و الإنسان وبشكل متكرر بوساطة العدوى بنمط ممرض واحد أو أكثر من الأنماط الممرضة للإشريكية القولونية *Escherichia coli* و هذه الأنماط هي:

- الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء Enterotoxogenic *E. coli* (ETEC)
- الإشريكية القولونية المفرزة لذيفانات فيرو Verotoxogenic *E. coli* (VTEC)
- الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- الإشريكية القولونية الناخرة والمذيفنة للأمعاء Necroenterotoxogenic *E. coli* (NTEC)
- الإشريكية القولونية النذفية المعوية Enterohemolytic *E. coli* (EHEC)
- الإشريكية القولونية النافذة للأمعاء Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)
- الإشريكية القولونية المكدسة المعوية Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC)

وتُعدُّ العدوى بالإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاءETEC السبب الأكثر شيوعاً لداء العصيات القولونية عند العجول حديثة الولادة والخنانيص و كذلك لإسهال المسافرين والأطفال في الدول النامية (Quinn, et al. 2002; Nagy and Feket,2005).

وبشكل ملفت للانتباه فإن الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء لا تسبب أمراضاً عند الحيوانات الأخرى مثل الأرانب والخيول والدواجن لسبب غير واضح حتى الآن، حيث إن هذه الحيوانات تملك مستقبلات وتستجيب للذيفان المعوي ولعوامل الالتصاق لبعض ذراري الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء.

تلتصق الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء إلى ظهارة الأمعاء الدقيقة من دون إحداث أي ضرر شكلي و تنتج ذيفانات معوية موترة للخلايا (cytotonic toxin) تقوم بتبديل (تعديل) وظيفة الخلايا المعوية عن طريق زيادة الإطراح وقلة الامتصاص. وعليه فإن عوامل الفوعة الرئيسة للإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء هي عوامل الالتصاق (Adhesins) وتعرف أيضاً بالخمل. و في حالة الذراري الممرضة للعجول يكون عامل الالتصاق من النمط (F5)والمعروف سابقاً باسم (K99) والذيفانات المعوية و تفرز الذراري الممرضة للعجول الذيفان المعوي الصامد للحرارة المتغاير I أو a (ST_a). إضافة إلى عوامل الإلتصاق و الذيفانات المعوية فإن إمراضيتها تشتمل على عوامل الثوي وعلى رأسها مستقبلات عوامل الالتصاق و مستقبلات الذيفانات المعوية. ترتبط مستقبلات عوامل الالتصاق في ظهارة الأمعاء عند العجول بالعمر وهي تختفي من الأمعاء بعد أقل من عشرة أيام من الولادة

(Quinn et al,1998) و (Nagy and Fekete,2005) و(Quinn et al,2002)

تقوم الإشريكية القولونية المفرزة لذيفانات فيرو VTEC (يعرف الذيفان أيضاً باسم الذيفان شبيه الشيجا) بإنتاج ذيفانات سامة للخلايا وتقوم بقتل خلايا الجملة الوعائية للأمعاء والكلى وقد عرف حتى الآن متغايران رئيسان لهذا الذيفان و هما VT1 و VT2. ويوجد هنالك خلط بين الإشريكية القولونية المفرزة لذيفانات فيرو VTEC والإشريكية القولونية النذفية المعوية EHEC و يكمن الفرق الأساسي بينهما بأن الأخيرة تفرز ذيفاناً إضافياً حالاً للكريات الحمر Enterohemolysin ويعرف اختصاراً بـ(*Ehly*) (Schouten, et al 2004).

اختلفت الأراء حول دور الإشريكية القولونية المفرزة لذيفانات فيرو VTEC والإشريكية القولونية النذفية المعوية EHEC في إحداث الأمراض عند الأبقار والعجول وذلك بسبب عزلها و بتواتر عالٍ من الحيوانات السليمة والمريضة

على حد سواء و اعتبرت الأبقار والأغنام كعائل خازن لهذه الذراري التي تشكل مصدراً مهماً لعدوى البشر Beutin et al 1993) و(Oie,2008) .

أشارت دراسة أجريت في النمسا من قبل Herrera-Luna و زملائنا عام 2009 و كذلك Dean-Nystrom وزملاؤه عام 1997 إلى دور الإشريكية المفرزة لذيفانات فيرو والتي تملك الأنتيمين (*eaeA* gene) على إحداث الآفات الطامسة والماحية للأمعاء عند العجول Attaching and Effacing lesions وكذلك إحداث إسهال مدمى والتهاب القولون. كما أشار (Quinn وزملاؤه 2002) إلى أنها تسبب التهاب قولون نزفي معوي عند العجول.

بالنسبة إلى الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء EPEC فإن أهم عامل فوعة تملكه هو الأنتيمين الذي يرمز له بمورثة *eaeA* gene إذ يمكنها من الالتصاق واستعمار الزغيبات المعوية microvilli وإحداث الآفات الطامسة والماحية للخلايا المعوية وتقزم الزغابات المعوية (Quinn et al.,2002).

استخدمت العديد من التقنيات للكشف عن عوامل الفوعة للأنماط الممرضة للإشريكية القولونية مثل اختبار الحقن في معدة الفئران الرضيعة (للكشف عنSTa) و الحقن في عروة الأمعاء للأرانب (للكشف عنLT) واختبارات التراص (للكشف عن عوامل الالتصاق F4, F5,F6, F41,) واختبارات الأليزا للكشف عن الذيفانات المعوية وشبيهة الشيجا، واختبارات الزرع الخلوي للكشف عن تأثير هذه الذيفانات على أنواع معينة من الخطوط الخلوية مثل خلايا فيرو وخلايا هيلا. وفي العقود الأخيرة وبعد تطور التقانات الجزيئية ومعرفة الخارطة الوراثية لهذه الجرثومة فقد استخدم اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسلPCR للكشف عن عوامل الفوعة المختلفة للذراري الممرضة للإشريكية القولونية ونذكر في هذا المجال أبحاث كُلٍّ من (Franck, et al. 1998) و

و (Nishikawa et al. 2002) و (Zaharaei, et al 2006) و (Younis, et al 2009)

وذلك نظراً لما توفره هذه التقنية من سرعة ودقة في العمل وإمكانية الكشف عن أكثر من عامل فوعة في وقت واحد (Multiplex PCR).

أهمية البحث وأهدافه:

- عزل وتصنيف الإشريكية القولونية من حالات الإسهال عند العجول وبالأخص العجول حديثة الولادة.
- الكشف عن الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء ETEC من خلال الكشف عن عامل الالتصاقK99 (F5) والذيفان المعوي الصامد للحرارة STa.
- الكشف عن الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء EPEC وذلك عن طريق الكشف عن امتلاكها للأنتيمين *eaeA*
- الكشف عن الإشريكية القولونية المفرزة لذيفانات فيروVTEC من خلال الكشف عن ذيفانات فيرو VT1 و VT2

طرائق البحث ومواده :

العينات: تم جمع 100 مسحة برازية من عجول صغيرة ما أمكن (1-10 أيام) تعاني من إسهالات شديدة أو إسهال مدمى من مزارع المؤسسة العامة للأبقار (مسكنة، جورين و دير الزور) كما تم جمع 20 مسحة برازية من عجول رضيعة سليمة من نفس الأعمار من تلك المزارع.

تم أخذ العينات مباشرة من المستقيم باستخدام ماسحات قطنية معقمة، ووضعت في حافظة ثلجية ونقلت في اليوم نفسه إلى مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري–جامعة البعث علماً أن هذه الدراسة قد أجريت خلال عام 2011.

العزل الجرثومي : زرعت العينات على وسط أجار ماكونكي (انتاج شركة هايميديا الهندية ®Himedia) وتم تحضين الأطباق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37م°. تم انتقاء 4–5 مستعمرات مشتبهة (مخمرة للاكتوز) وتم تنقيتها ثم أجري التنميط الكيمياحيوي لها باختبارات الأندول وأحمر الميثيل و فوكس بروسكاور والسترات واليوريا واختبار النمو على بيئة اجار ثلاثي السكر والحديد (Quinn et al,2002) و (Orden, et al.,2002).

– تفاعل البوليميراز المتسلسل Polymerase Chain Reaction :

أ– **تحضير قالب الدنا:** حضر قالب الدنا حسب (China *et al.* 1996) و(Oie, 2008) . باختصار تم نقل 2–3 مستعمرات من العزولات النقية إلى 5 مل من وسط مرق لوريا وبريتاني (LB broth) وحضنت لمدة ليلة كاملة عند درجة حرارة 37م°. نقل 300 ميكروليتر من المرق إلى أنابيب إبندورف ثم نبذت في مثفلة خاصة لمدة 30 ثانية بسرعة 10000 G . تم التخلص من السائل الطافي وأذيب الراسب الجرثومي بـ 50 ميكروليتر من الماء المقطر الخالي من الأنزيمات الحالة للدنا والرنا (Sigma). وضعت الأنابيب في محم مائي بدرجة الغليان لمدة 10 دقائق. نبذت الأنابيب من جديد ونقل السائل الطافي إلى أنابيب إبندورف جديدة واستخدم هذا السائل كقالب دنا في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

ب – إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل

تم إخضاع عينات الدنا لتفاعل البوليميراز المتسلسل باستخدام عتيدة تفاعل البوليميراز المتسلسل (*Taq* PCR Core Kit, Cat. no. 201223, QIAGEN®)

تم استخدام مشرعات نوعية لتضخيم تسلسل محدد من كل مورثة من مورثات عوامل الفوعة حسب ما هو موضح في الجدول رقم (1)

عند إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل تم اتباع ثلاثة برامج. فالبرنامج الأول مخصص للكشف عن الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99 (F5) سويةً باتباع ما يعرف بتقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (Multiplex PCR). وكانت ظروف التفاعل هي: دورة واحدة لمدة 3 دقائق عند درجة94م° ومن ثم30 دورة (94 م° لمدة 1 دقيقة، 50 م°لمدة 1 دقيقة ، 72 م° لمدة 2 دقيقة) ودورة أخيرة عند درجة 72 م°لمدة عشر دقائق (Franck et al. 1998).

أما البرنامج الثاني فهو مخصص للكشف عن الذيفان السام لخلايا فيرو النمط VT1 و النمط VT2سويةً بتقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد وكانت ظروف التفاعل: دورة واحدة لمدة 3 دقائق عند درجة 94 م° ومن ثم30 دورة (94 م° لمدة 1 دقيقة، 62 م°لمدة 1 دقيقة ، 72 م° لمدة 1.5 دقيقة) ودورة أخيرة عند درجة 72 م°لمدة عشر دقائق (Oie, 2008).

والبرنامج الثالث مخصص للكشف عن مورثة الأنتيمين *eaeA* gene، وكانت ظروف التفاعل: دورة واحدة لمدة 3 دقائق عند درجة 94 م° ومن ثم30 دورة (94 م° لمدة 1 دقيقة، 55 م°لمدة1 دقيقة، 72 م° لمدة 2 دقيقة) ودورة أخيرة عند درجة 72 م°لمدة عشر دقائق (Nishikawa et al. 2002). (لاحظ الجدول رقم 3).

تم تحضير مزيج التفاعل كما هو موضح في الجدول رقم (2). وتم استخدام شواهد سلبية في كل مجموعة اختبار(المقصود بالشاهد السلبي هو جميع مكونات التفاعل باستثناء قالب الدنا).

جدول رقم (1): عوامل الفوعة و المشرعات المستخدمة في الكشف عنها و حجم نواتج التفاعل.

Virulence factor		Primer sequence 5'-3'	Size of product (bp) and Reference
K99 (F 5)	F	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG	314 (Franck et al. 1998)
	R	GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	
ST_a	F	GCTAATGTTGGCAA TTTTTATTTCTGTA	190 (Franck etal. 1998)
	R	AGGATTACAACAAA GTTCACAGCAGTAA	
Intimin(*eae* A)	F	ACG TTG CAG CAT GGGTAA CTC	815 (Nishikawa et al. 2002)
	R	GAT GGC GAG AAA TTA TAT CCC G	
VT1	F	CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-	256 (Oie ,2008)
	R	CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-	
VT2	F	TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG	185 (Oie, 2008)
	R	GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC	

جدول رقم (2) : مكونات مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل

Reagents	Volume	Final concentration
10 x coralLoad PCR Buffer	5µl	1 x
dNTP mix(10 mM of each)	1 µl	200 µM of each dNTP
Taq polymerase	0.25µl	1.25 units/ reaction
F primer (100 pm)*	0.3 µl	≠ 0.5 µM
R primer(100 pm)*	0.3 µl	≠ 0.5 µM
Template DNA (heated)	5 µl	≠1 µg
RNase, Dnase free distilled water	As request	--------
Total volume	50 µl	

*** في البرنامج الأول و الثاني أضيف زوجين من المشرعات (زوج لكل مورثة)**

جدول رقم (3): برمجة المدور الحراري من أجل تفاعل البوليميراز المتسلسل

Stage	No. of cycles	Temperature	Time
Initial Denaturation	1	94 C°	3 minutes
Amplifying of DNA (Denaturation, Annealing & Extension)	30	94 C°	1 minute
		Variable*	1 minute
		72 C°	1.5-2 minutes
Final extension	1	72 C°	10 minutes
Preservation	1	4 C°	∞

*** تختلف هذه الدرجة حسب نوع المشرعات المستخدمة .**

ج – الكشف عن نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل:

تم الكشف عن نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل بالرحلان الكهربائي في هلامة الأجاروز 2% (Peq gold universal No. 2) والمضاف له صبغة الإثيديوم بروميد بتركيز 1 ميكرغرام/مل في دارئة TBE من شركة تاكارا. بعد الرحلان لمدة ساعة و شدة تيار 100 فولت، نقلت هلامة الأجاروز الى نظام التظهير بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro Platinum) المزود بكاميرة فيديو ومرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية وموصولة بجهاز كمبيوتر وطابعة حرارية. و فحصت الصور من أجل وجود أنطقة دنا(DNA Bands) ذات أحجام مطابقة لكل عامل من عوامل الفوعة المختبرة حسب ما هو مذكور في الجدول رقم (1) وذلك مقارنةً مع معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder, PeqLab).

النتائج والمناقشة:

النتائج

تم في هذه الدراسة تنميط 150 ذرية من الإشريكية القولونية من أصل 90 عجلاً مصاباً بالإسهال، حيث لم تعزل هذه الجراثيم من 10 حالات.

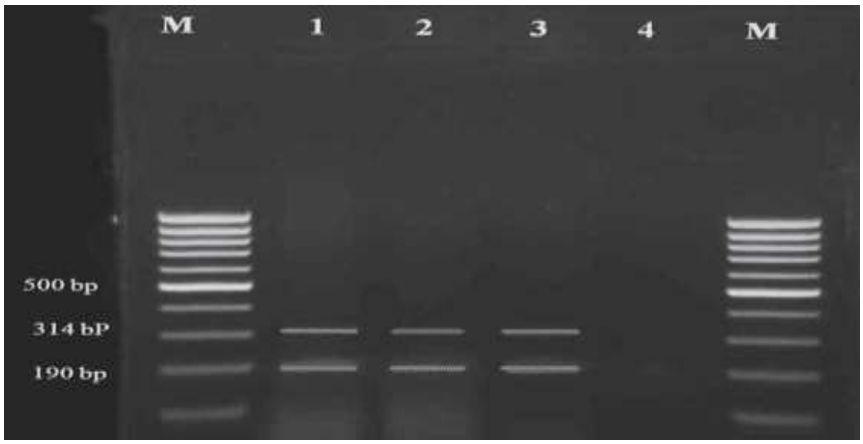
عند إخضاع هذه الذراري لتفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99، فقد أظهرت النتائج أن 9 ذراري من أصل 150 ذرية (6%) تمتلك مورثات هذين العاملين. و عند الرجوع إلى بيانات العجول تبين أن هذه الذراري قد عزلت من 9 عجول (10%) ، ثماني ذراري من عجول أعمارها تتراوح بين 1–10 يوماً وذرية واحدة من عجل عمره 25 يوم. وقد لوحظ أن هذه الذراري كانت جميعها إيجابية لوجود مورثات الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99(F5) معاً. (لاحظ الشكل رقم 1).

أما عند إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان السام لخلايا فيرو النمط VT1 والنمط VT2، فقد وجد أن 21 ذرية من الذراري المختبرة كانت إيجابية لوجود مورثات الذيفان السام لخلايا فيرو (14%) وعند حساب النسبة المئوية على عدد العجول فقد تبين انها معزولة من 23و33% من العجول. أظهرت نتائج الاختبار أيضاً أن 15 ذرية كانت ايجابية لوجود مورثة الـ VT1 و 6 ذراري كانت ايجابية لوجود مورثات الـ VT1 و الـ VT2 سويةً. (لاحظ الشكل رقم 2).

وعند الكشف عن امتلاك ذراري الإشريكية القولونية المعزولة في هذه الدراسة لمورثة الأنتيمين المميزة للذراري الممرضة للأمعاء، فقد بينت النتائج أن ذريتين فقط (1.33%) من الذراري المختبرة تملك هذه المورثة أي أن 2.22%

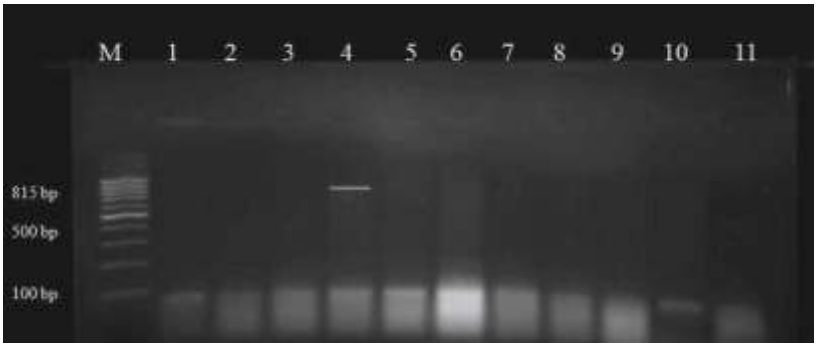
من العجول كانت مصابة بها. هذا ولم تكن هذه الذراري ايجابية لأي من عوامل الفوعة الأخرى المختبرة في هذه الدراسة. (لاحظ الشكل رقم 3).

بالنسبة إلى العينات المأخوذة من عجول سليمة ظاهرياً فقد بينت النتائج أن ذريتين من أصل 10 ذراري كانت إيجابية لوجود الذيفان السام لخلايا فيرو النمط VT1، وكانت سلبية لباقي عوامل الفوعة المختبرة.



الشكل رقم (1): نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي، وتشير الأعمدة 1 و 2 و 3 إلى ذراري تمتلك أنطقة دنا بأحجام 314 قاعدة آزوتية (K99) وانطقة دنا بأحجام 190 قاعدة آزوتية (STa)، يشير العمود رقم 4 إلى الشاهد السلبي.

الشكل رقم (2): نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفانات شبيهة الشيجا ، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي، وتشير الأعمدة 2 و 3 و 5 و 6 إلى ذراري تمتلك مورثات الـ VT1 و الـ VT2 سويةً، كما تشير الأعمدة 4 و 7 إلى ذراري تمتلك مورثات الـ VT1 فقط. يشير العمود رقم 1 إلى الشاهد السلبي.



الشكل رقم (3): نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن الأنتيمين ، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي، ويشير العمود رقم 4 إلى ذرية تمتلك مورثة الـ *eae A*، كما تشير الأعمدة 1 و 2 و 3 و 5 و 6 و7 و8 و 9و 10 إلى ذراري سلبية لأمتلاك هذه المورثة، يشير العمود رقم 11 إلى الشاهد السلبي.

المناقشة:

تعاني العجول في محطات التربية في سوريا من مشاكل الإسهال ويتسبب ذلك في خسائر اقتصادية مهمة جراء نفوق بعض العجول وخسارة الوزن وتكاليف العلاج. تُعدُّ الإسهالات من الأمراض متعددة الأسباب وتشكل الذراري الممرضة من الإشريكية القولونية وبالأخص الذراري المذيفنة للأمعاء جزءاً مهماً من مسببات الإسهال عند العجول حديثة الولادة(Nagy and Fekete,2005) . لذلك فقد هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن أهم عوامل الفوعة لذراري الإشريكية المتورطة في مشاكل الإسهال عند العجول وذلك باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل نظراً لما تتمتع به هذه التقنية من دقة وحساسية عالية و سرعة في الأداء .

دلت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99، واللذين يعدان أهم محددين إمراضيين لذراري الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء، أن 9 ذراري من أصل 150 ذرية (6%) تمتلك مورثات هذين العاملين. و عند الرجوع إلى بيانات العجول تبين أن هذه الذراري قد عزلت من 9 عجول (10%) ، ثماني ذراري من عجول أعمارها تتراوح بين 1–10 أيام وذرية واحدة من عجل عمره 25 يوماً. وقد لوحظ أن هذه الذراري كانت جميعها إيجابية لوجود مورثات الذيفان الصامد بالحرارة (STa) وعامل الالتصاق K99 (F5)معاً.

كانت هذه النتائج متقاربة مع تلك التي وجدها يونس وزملاؤه عام2009 حيث وجدوا أن 10.36% من عزولات الإشريكية من العجول المصابة بالإسهال كانت من النمط ETEC. وقد تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده(Wang *et al.,* 2006). وخلافاً لنتائج هذه الدراسة فقد أشار (Acha *et al.*,2004) إلى أن 40% من ذراري الإشريكية القولونية المعزولة من حالات إسهال العجول و14% من عجول سليمة ظاهرياً تحمل مورثات لـ K99 (F5) لكنها لا تنتج الذيفانات المعوية.

بينت نتائج هذه الدراسة أن 21 ذرية من الايشريكية القولونية(14%) كانت إيجابية لوجود مورثات الذيفانات السامة لخلايا فيرو، 15 منها كانت ايجابية لـVT1 و6 كانت ايجابية لـVT1 وVT2 وكانت النسبة المئوية للإصابة عند العجول 23.33%. اختلفت آراء الباحثين حول الدور الامراضي للايشريكية القولونية في إحداث الاسهال عند العجول، فقد أشار Wray وزملاؤه (1989) إلى دور VTEC التي تنتج VT1 وVT2 في احداث آفات في القولون والأمعاء الدقيقة مع وجود آفات طامسة وماحية للزغابات المعوية وذلك من خلال دراسة تجريبية على عجول رضيعة

باستخدام النمط المصلي O26 و O8 والتي تنتج VT1 وVT2 . ووجد Burnens وزملاؤه عام 1995 في دراسة أجريت في سويسرا أن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو موجودة في روث 60% من الأبقار والعجول في المزارع التي تعاني من حالات إسهال العجول مقارنة مع نسبة 30% من المزارع التي لا تعاني من مشاكل الإسهال عند العجول وأشاروا إلى وجود علاقة جوهرية بين الذراري المنتجة للذيفانVT1 والمقاومة للصادات الحيوية وحدوث الإسهال عند العجول. كما أشار محمد وزملاؤه عام 1986 إلى عزل 27 نمطاً مصلياً من الإشريكية القولونية المنتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو من حالات الإسهال عند العجول. قلل Woodward وزملاؤه 1999 من أهمية الإشريكية القولونية المنتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو في إحداث المرض عند العجول حديثة الولادة، حيث أنهم وجدوا فقط استجابة التهابية متوسطة في القناة المعوية ولم يلاحظوا وجود أي آفات ماحية وطامسة للأمعاء ويمكن أن يكون السبب في ذلك هو استخدام ذرية واحدة من النمط المصلي O157.

أشار China وزملاؤه عام 1996 إلى عزل الإشريكية القولونية والتي تملك مورثة الأنتيمين eaeA من حالات عجول نفقت بسبب الإصابة بها. توصل Mainil وزملاؤه عام 1993 إلى تورط AEEC التي تملك الأنتيمين في إحداث الإسهال والزحار عند العجول وعلى الأغلب بأعمار بين 2-8 أسابيع. بين Burnens وزملاؤه عام 1995 في نتائج دراستهم أن 4 من أصل 35 ذرية من ذراري الإشريكية القولونية كانت ايجابية لوجود الأنتيمين وVT1 سويةً ترافقت مع حالات الإسهال عند العجول بشكل مؤكد.

الاستنتاجات والتوصيات:

1-تشكل جراثيم الإشريكية القولونية التي تملك مورثة الذيفان السام لخلايا فيرو المسبب الأكبر لإسهال العجول

2-وجود عدد من جراثيم الإشريكية القولونية التي تملك مورثة الذيفان الصامد بالحرارة وعامل الالتصاق K99

3-ميزت الدراسة وجود عدد من ذراري الإشريكية القولونية التي تمتلك مورثة الانتيمين المميز للذراري الممرضة للأمعاء.

4-أظهرت الدراسة أن وجود مورثة الذيفان السام لخلايا فيرو النمط الأول VT1 أكثر من تواجد مورثة الذيفان السام لخلايا فيرو النمط الثاني VT2.

5-نوصي بضرورة حصول العجول حديثة الولادة على اللبأ (السرسوب) في الوقت المناسب وضرورة إتباع الإجراءات الصحية في رعايتها للتقليل من فرص حدوث العدوى وتحصين الأمهات باللقاحات الحاوية على ذراري الإشريكية القولونية المذيفنة للأمعاء لتامين الحماية للعجول في الأيام الأولى بعد الولادة.

المراجع:

1-Acha,S.J; Kuhn, L; Jonsson, P; Mbazima G.;Katoul.M.and Mallby,R. (2004):Studies on Calf, diarrheao in Mozamique: prevalence of Bacterial Pathology. Acta Vet. Scand. VOL. 45 , 27-36.

2-Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F., (1993): Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals.J. Clin. Microbiol. 31, 2483–2488.

3-Burnens, A. P.; Frey, A.; Lior, H. and Nicolet, J.(1995): Prevalence and Clinical Significance of Vero-Cytotoxin-Producing E. coli (VTEC) Isolated from Cattle in Herds with and without Calf Diarrhea. J.vet. med. B,vol. 42 , 311-318.

4-China, B.; Pirsson, V. and Mainil, J.(1996): Typing of Bovine Attaching and Effacing E. coli by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes, Applide and Environmental Microbiology, Vol. 62(9), 3462-3465.

5-Dean-Nystrom E.A., Bosworth B.T., Cray W.C., MoonH.W. (1997): Pathogenicity of Escherichia coli O157:H7in the intestines of neonatal calves. Infection and Immunity,

65, 1842–1848.

6- Franck ,S. M.; Bosworth ,B. T. and Moon, . W. (1998):Multiplex PCR for Enterotoxigenic, Attaching and Effacing, and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains from Calves. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, No. 6, 1795-1797.

7-Herrera-Luna, C., Klein, D., Lapan, G., Revilla-Fernandez, S., Haschek, B., Sommerfeld-Stur I., Moestl K.and Baumgartner,W. (2009) Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents, Veterinarni Medicina, 54, (1): 1–11

8- Mainil, J. G.; Jacquemin, E.; Kaeckenbeek, A. and Pohl, P. (1993): Association between the Effacing gene (eae A) and Shigha- like toxin- Encoding Genes in E. coli Isolates from Cattle. Am. J. Vet. Res. Vol. 54, 1064-1068.

9-Mohammed, A.; Peirs, J. S. and Wijewanta, E. A. (1986): Serotypes of VTEC Isolated from Cattle and Buffalo Calf Diarrhea. FEMS Microbiology Letters, vol. 35, pp: 261-265.

10-Nagy, B. and Fekete, P.Z.(2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. REVIEW, International Journal of Medical Microbiology, Vol 295 , 443–454.

11-Nishikawa, y., Zhou, Z., Ogasawara, J., Kitase, T., Abe, N.,Nakamora, H., Wadw, T., Ishii, E. and Haruki, K. (2002):Diarrheaging *E. coli* isolated from Sporadic Cases of diarrheal Disease Illnessin Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene-Possessing E. coli, Jpn. J. Infect. Dis., Vol.55, 183-190.

12- OIE Terrestrial Manual (2008): - Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Chapter 2.9.11. 1294-1304

13- Orden, J. A.; Ruiz-santa-Quiteria, J.A.; Cid, D. and Dela Fueente (2002): Presence And Enterotoxigenicity of F5and F41E. coli Strains Isolated from Diarrhoeic SmallRuminants In Spain, Small Ruminant Research , Vol.44, 159-161 .

14- Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Marky, B. K. and Carter, G. R. (1998) Clinical Veterinary Microbiology, Enterobactriace. Wolf Publishing.

15- Quinn, P. J.; Marky, B. K; Carter, M. E; Donnelly,W.J.C; Leonard, F.C. and Maguire, D. (2002) :Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Enterobactriace. 106-113 Blackwell Since Ltd.

16-Schouten, J.M. Bouwkneg, M. t, van de Giessen, A.W., Frankena, K., De Jong, M.C.M. and Graat, E.A.M. (2004): Prevalence Estimation and Risk Factors for Escherichia *coli* O157 on Dutch dairy farms, Preventive Veterinary Medicine , Vol.64 , 49–61.

17-Wang, J.; Jian. S.W.; Chem,X.; Lin,Z.L. and Pany,J.(2006): Prevalence of Fimbrial antigen(K88 Variant, K99 and 987p) of ETEC from neonatal and post weaning pig lets with diarrhea in central China, Asian-Australasian Journal of animals Science(19) 1342-1346.

18-Woodward, M. J.; Gavier-widen,D.; McLaren, I. M.; Wary, C.; Sozmen, M. and Pearson, G. R. (1999): Infection of Gnotobiotic Calves with E. coli O 157 : H 7 Strain 184. The veterinary record. April, 466-47.

19-Wray, C.; Melaren, I. and Pearson, G. R. (1989): Occurrence of Attaching Lesions in the Small Intestine of Calves Experimentally Infected with Bovine Isolates of VTEC. The Veterinary record, September, vol.125 ,365-368.

20-Younis, E. E., Ahmed,A. M., El-Khodery, S. A. , Osman, S. A. and El-Naker Y. F.I. (2009): Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic Escherichia coli and Salmonella spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt, Research in Veterinary Science ,Vol. 87, 373–379.

21-Zaharaei, S.T.; Safarchi, A. and Khorasgani, R.(2006): Idetification of Virulence Gene in Isolated E. coli from Diarrheic Calves and Lambs by Multiplex Polymerase Chain Reaction, Pakitan Journal of Biological Scienes Vol.9(2), 191-196.