Assiut Vet. Med. J. Vol. 60 No. 140 January 2014

PREVALENCE OF *ESCHERICHIA COLI* F5 (K99) IN PRE-SLAUGHTERED CALVES IN MOSUL CITY

M.G. HASSAN
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq.
Email: montaha2007montaha@yahoo.com

ABSTRACT

Received at: 25/11/2013

Accepted: 27/2/2014

The current study was established to determine the prevalence of *Escherichia coli* F5 (K99) in calves introduced to slaughtering in Mosul city abattoir. Diagnosis depend on Sandwich Elisa test (SET) for detection of *Escherichia coli* antigens. Forty eight fecal samples were collected from calves suffering from diarrhea to detect the presence of pathogenic *E.coli* F5K99 antigens. The Results revealed 4 (8.33%) samples were positive for the presence of *E.coli* F5 (K99) antigens while 44 (91.66%) samples were negative to these antigens. Therefore we can applied Elisa technique in ante-mortem inspection at abattoir to detect the presence of pathogenic bacteria antigen including *E.coli* F5 (K99) which may be transmitted through the meat to avoid outbreaks.

Keywords: *E.coli F5 (K99), Calves, Mosul city.*

مدى تواجد جراثيم الايشريشيا القولونية (K99) F5 في العجول المعدة للجزر في مدينة الموصل

منتهى غازي حسن
Email: montaha2007montaha@yahoo.com

أجريت دراسة مسحية ووبائية لتحديد مدى انتشار جراثيم الايشريشيا القولونية (K99) F5 من العجول المعدة للجزر في مجزرة مدينة الموصل. واعتمد تشخيص هذه الجراثيم من خلال الكشف عن وجود مستضداتها باستخدام تقنية الادمصاص المناعي (SET) (Sandwich Elisa test). حيث جمعت (48) عينة براز من العجول المعدة للجزر والتي تعاني من الإسهال للكشف عن وجود جراثيم الايشريشيا القولونية (K99) F5. أظهرت نتائج الدراسة ان هناك (4) عينات موجبة لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية (K99) F5 وبنسبة (8.33%) بينما كانت بقية العينات والبالغ عددها (44) عينة سالبة لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية (K99) F5 وبنسبة (91.66%). لذا من الممكن اعتماد تقنية الادمصاص المناعي (SET) للكشف عن مستضدات بعض الجراثيم المعوية الممرضة ومنها الايشريشيا القولونية (K99) F5 باعتبارها طريقة سريعة وتقنية حساسة يمكن تطبيقها في المجازر على الحيوانات المعدة للجزر في فحص قبل الذبح للكشف عن بعض الجراثيم الممرضة التي تنتقل عن طريق لحوم هذه الحيوانات لتلافي تفشي الأوبئة الناجمة عن بعضها.

INTRODUCTION
المقدمة

يعتبر الإسهال احد أهم المشاكل الصحية البيطرية التي تواجه تربية وإنتاج الحيوانات الحقلية في اغلب دول العالم لما يسببه من ضعف في مناعة الحيوان ويجعله عرضة للإصابة بالأمراض (Razzaque *et al*., 2010) وهناك مسببات عديدة لالتهاب المعدة والأمعاء في العجول فربما يكون سببها الفيروسات مثل Corona virus أو Rotavirus أو قد تكون الجراثيم هي المسبب خاصة جراثيم السالمونيلا والايشريشيا القولونية أو ربما يكون سببها الاوالي الطفيلية مثل الأبواغ الخبيئة Cryptosporidium والكوكسيديا Coccidia (Uhde *et al*., 2008). تعد جراثيم الايشريشيا القولونية احد مسببات الإسهال التي تصيب العجول الصغيرة العمر حيث تصاب هذه العجول بما يسمى Colibacillosis التي عادة ما تحدث بصورة متكررة في العديد من دول العالم الأمر الذي زاد من أهمية هذا المرض لما يسببه من خسائر اقتصادية (Younis *et al*., 2009, Radostits *et al*., 2007) وأحيانا يكون حدوث المرض بطور تحت الحاد مما يؤدي إلى ظهور حالات سوء التغذية والهزال (Barragry, 1997). تكون العجول الصغيرة العمر حساسة للإصابة بجراثيم الايشريشيا القولونية F5 وخاصة العجول التي أخذت اللبأ الخالي من الأجسام المضادة للنمط المصلي *E. coli* F5 (Gulliksen *et al*., 2009). إن إصابة حيوانات المزرعة بجراثيم الايشريشيا القولونية المعوية المنتجة للذيفانات Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) من الأهمية بمكان لأن أغلبها من نوع الملتصقات adhesions وهي من النوع التي تحمل الأهداب الموجودة على السطح بضمنها النمط المصلي (K99) F5 وهي تشخص كمستضدات سطحية في العجول (Rippinger *et al*., 1995). تستطيع عترات الايشريشيا القولونية إنتاج أنواع مختلفة من الملتصقات التي تسمح أو تمكن الجرثومة من الالتصاق مع مستقبلات سطح الخلية وتكوين مادة خارج الخلية. أن الملتصقات الهدبية للأيشريشيا القولونية النمط المصلي F5 يلعب دورا مهما في تكوين مستعمرات الايشريشيا القولونية المعوية المنتجة للذيفانات ETEC في الخلايا الطلائية للأمعاء الدقيقة في العجول (Nagy and Fekete, 2005, Jay, 2004, Acres, 1985). تفرز عترات ETEC عدة ذيفانات أهمها الذيفان المعوي المتفكك بالحرارة الذي يؤثر على توازن الألكتروليتات في بطانة المعدة (Amanda *et al*., 2000). تعتبر العجول المصابة بجراثيم الايشريشيا القولونية المنتجة للذيفانات EHEC مضائف خازنة ورئيسية لهذه الجراثيم في البراز والذي يعد المصدر الرئيسي للتلوث البرازي في اللحوم

(Radostits *et al*., 2007). وأشارت العديد من البحوث إلى وجود جراثيم الايشريشيا القولونية الممرضة k99 في براز العجول البالغة والسليمة (Radostits *et al*., 2007, Achá *et al*., 2004 Gatti *et al*., 1993). وأعتمد بعض الباحثين تقنية الاليزا كطريقة سريعة للكشف عن وجود مستضدات الجراثيم المعوية المسببة للإسهال المعدي في براز العجول ومنها جراثيم الايشريشيا القولونية (k99)F5 (الربيعي،٢٠١١) ووجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية k99 في حقول تربية العجول (Cho *et al*., 2012). وفي هذه الدراسة تم التركيز على الكشف عن مدى انتشار جراثيم الايشريشيا القولونية النمط المصلي (k99) F5 من العجول المعدة للجزر في مجزرة مدينة الموصل.

MATERIALS and METHODS

المواد والطرق المعملية

جمع العينات

جمعت (48) عينة براز من العجول المعدة للجزر في مدينة الموصل بعضها كانت تعاني من حالات الإسهال. اخذت عينات البراز من منطقة المستقيم لكل عجل وبطريقة معقمة ونقلت العينات مبردة إلى المختبر واعتمد الفحص المختبري على التشخيص المباشر لمستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية باستخدام العدة التشخيصية للاليزا لتشخيص مستضدات الايشريشيا القولونية F5 (K99) والمجهزة من شركة Bio-X diagnostic.

طريقة الاليزا

تم تخفيف محلول الغسل المركز 20X في الماء المقطر وتم تخفيف محلول المنظم المركز 5X في الماء المقطر. تم تخفيف نماذج البراز باستخدام محلول التخفيف المنظم والمخفف بتركيز ١:١ وترك المزيج لترسيب المواد الغريبة العالقة بمحلول البراز. أضيف ١٠٠ مايكروليتر من نماذج البراز المخففة إلى حفر طبق الاليزا بعد تحديد الحفر الخاصة بالمحاليل القياسية الموجبة والسالبة كسيطرة من دون إضافة عينات البراز عليها. حضنت الصفيحة بدرجة ٢١°م لمدة ساعة مع مراعاة تغطية الحفر. تم سكب محتويات الطبق وقلبها على مناديل نظيفة لضمان إزالة جميع السوائل منها وملئت الحفر بعد ذلك بمحلول الغسل كررت هذه العملية ثلاث مرات مع مراعاة عدم تكون الفقاعات في الحفر. تم وضع ١٠٠ مايكروليتر من محلول الاقتران conjugate solution لكل حفرة وحضنت بدرجة ٢١°م لمدة ساعة واحدة مع مراعاة تغطية الحفر. سكبت بعدها محتويات الطبق وغسلت بمحلول الغسل ثلاث مرات بعدها أضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول كاشف اللون chromogen solution لكل حفرة على الطبق وحضنت بدرجة ٢١°م في مكان مظلم لمدة عشر دقائق يلي ذلك تم إضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول موقف التفاعل stop solution على كل حفرة وتم قراءة النتائج مباشرة باستخدام المطياف وبطول موجي قدره ٤٥٠ نانوميتر. تم حساب النتائج باستخدام برنامج خاص وحسب الطريقة المعتمدة من الشركة المصنعة.

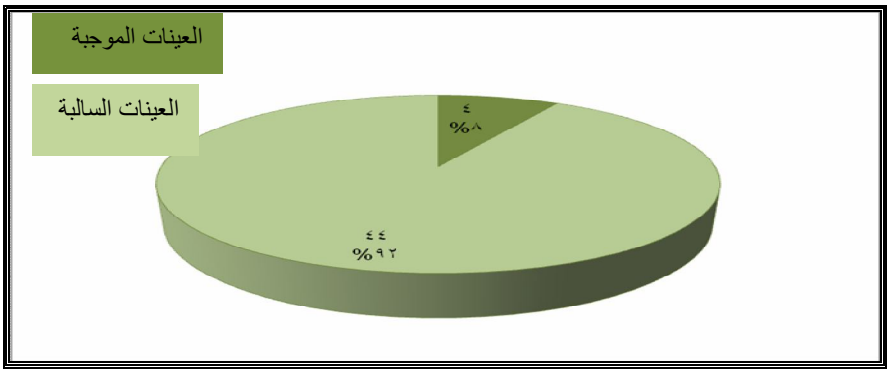
RESULTS

النتائج

أوضحت نتائج الكشف عن مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية F5 (K99) في عينات براز العجول والبالغ عددها (48) عينة ، إن (4) عينات من براز العجول المعدة للجزر في مدينة الموصل كانت موجبة لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية (k99) F5 وبنسبة (8.33%) في حين كانت (44) عينة من عينات البراز سلبة لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية F5 (K99) وبنسبة (91.66 %) الجدول (١).

الجدول ١: النسبة المئوية الكلية لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية F5 (K99) في براز العجول المعدة للجزر.

العينات	عدد العينات	النسبة المئوية	المعدل والخطأ القياسي
العينات الموجبة لمستضدات *E.coli* k99	4	8.33	٩.٣٥٠ ± ٠.٩٥٤
العينات السالبة لمستضدات *E.coli* k99	44	91.66	3.329 ± 0.189
المجموع	48	99.99	



الشكل ١: النسبة المئوية الكلية لوجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية F5 (K99) في براز العجول المعدة للجزر.

DISCUSSION
المناقشة

ظهر من نتائج الدراسة الحالية ان نسبة وجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية F5(K99) في براز العجول المعدة للجزر كانت (8.33%) بأستخدام تقنية الاليزا (SET)، وهي مقاربة لنسبة وجود مستضدات الايشريشيا القولونية F5(K99) في براز العجول السوية سريريا (٩.١%) واقل من نسبة وجود مستضدات الايشريشيا القولونية في براز العجول المصابة بالاسهال المعوي (٤٠٥%) بأستخدام تقنية الاليزا (الربيعي،٢٠١١) وأقل من نسبة وجود مستضدات جراثيم الايشريشيا القولونية k99 المعزولة من العجول المصابة بالإسهال (11.91%) باستخدام تقنية تلازن الشريحة (Cabalar *et al*., 2001) وأقل من نسبة وجود جراثيم الايشريشيا القولونية k99 (16%) من العجول المصابة بالإسهال باعتماد طريقة biochemical fingerprinting method (Achá *et al*, 2004). فضلا عن عزل هذه الجراثيم بنسبة (10.36%) من العجول المصابة بالإسهال في مصر باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction (PCR) اعتمادا على وجود الحامض النووي الدنا (Younis *et al*, 2009) بينما لم تعزل جراثيم الايشريشيا القولونية k99 من براز العجول المصابة بالإسهال باستخدام تقنية الاليزا (De Verdier Klingenberg and Svensson, 1998) وعلى النقيض من ذلك عزلت جراثيم الايشريشيا القولونية k99 بنسبة (17.4%) من العجول المصابة بالإسهال باستخدام تقنية الاليزا (Izzo *et al*., 2011). هذا التباين في نسبة تشخيص وجود جراثيم الايشريشيا القولونية k99 قد يعزى إلى اختلاف الطرق المتبعة في التشخيص من حيث درجة حساسيتها ومدى خصوصيتها في الكشف عن المسبب المرضي المعين (Cho *et al*, 2012). كما وإن انتشار جراثيم الايشريشيا القولونية النمط F5(k99) في أمعاء العجول وتسببها في حدوث حالات الإسهال في فترة الرضاعة المبكرة قد يعزى إلى عدم نضوج خلايا الدم البيض التي بدورها تؤثر على الجهاز المناعي فتعمل على تقليل مناعة العجول، وكذلك التفاوت في مستوى المناعة المتخصصة وغير المتخصصة في العجول المصابة بالإسهال في قطعان الأبقار الحلوب قد يؤثر على مستوى الإصابة بجراثيم الايشريشيا القولونية البرازية (Kawakami *et al*., 2010). والمؤشر الآخر الذي يجب نلفت الانتباه إليه والذي يلعب دورا هاما في مدى انتشار هذه الجراثيم المعوية المسببة للإسهال في العجول هو عدم إتباع الشروط الصحية في نظم تربية العجول من حيث النظافة على مستوى الحيوان وبيئته لكون هذه العجول تعتبر مضائف خازنة للجراثيم المعوية فكلما كانت نسبة التلوث عالية في بيئة الحيوانات تصل جراثيم الايشريشيا القولونية ETEC الى جسم الحيوان ويكون لها القدرة على إحداث المرض بوجود عوامل الضراوة كالأهداب في النمط المصلي K99 والذيفان الثابت بالحرارة (Foster and Smith, 2009). ويفضل إجراء الفحوصات المختبرية التي تلعب دورا مهما في الكشف عن المسببات المرضية ويمكن اعتمادها لمراقبة الحالات المرضية وتجنب انتشار الأوبئة الناجمة عن تلك المسببات المرضية ومنها جراثيم الايشريشيا القولونية (McGuirk, 2008) حيث ان الحيوان الشافي من المرض يستمر بطرح المسبب المرضي المعدي في البراز لمدة من الوقت بعد الشفاء فضلا عن اختلاف عترات الجراثيم المعوية ومقاومة الحيوان ضد المرض (Radostits *et al*., 2007). أثبتت البحوث أن الحرص على إتباع برامج تحصين العجول وإعطاء اللقاحات كاملة وبضمنها لقاح (Rotavec corona vaccine) فضلا عن ضمان اخذ العجول الصغيرة اللبأ خلال الـ ٢-٦ ساعات الأولى من ولادتها يساهم وبدرجة كبيرة في التقليل من نسبة حدوث حالات الإسهال الناجم عن جراثيم الايشريشيا القولونية النمط المصلي K99 في العجول (Germine *et al*., 2011, Parreno *et al*., 2010, Radostits *et al*., 2007). لذا ننصح بالكشف عن هذا النوع من الجراثيم الممرضة في الفحص قبل الذبح في المجازر باستخدام هذا الاختبار كونه اختبارا سريعا وله نسبة حساسية وخصوصية عالية لتلافي وصولها إلى اللحوم المستهلكة.

REFERENCES
المراجع

الربيعي ، إسراء عبد الغني ، (٢٠١١) دراسة تشخيصية لبعض مسببات الإسهال المعدية في العجول باستخدام اختبار الاليزا المباشر المتعدد. رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل، الموصل ،العراق.

Acha, R.; Kühn, S.J.; Jonsson, I.; Mbazima, P. and Katouli, M and Möllby, G. (2004): Studies on calf diarrhea in Mozambique: Prevalence of bacterial pathogens. Acta. Vet. Scand. 45(1): 27–36.

Acres, S.D. (1985): Enterotoxigenic *E. coli* infections in newborn calves: a review. Journal of Dairy Science, 68, 229–256.

Amanda, L.; Horstman, M. and Kuehn, J. (2000): Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. J. Biol. Chem. 275 (17): 12489-12496.

Barragry, T. (1997): Calf diarrhoea. Irish Vet. J. 50: 49-58.

Cabalar, M.; Boynukara, B.; Lhan, T. and Ekün, H. (2001): Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in healthy dairy cattle herds in van, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25: 191-196.

Cho, Y.; Sun, D.; Cooper, V.; Dewell, G.; Schwartz K. and Yoon, K. (2012): Evaluation of a commercial rapid test kit for detecting bovine enteric pathogens in feces. J. Vet. Diag. Invest. 24: 559-562.

De Verdier Klingenberg, K. and Svensson, L. (1998): Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. Acta. Vet. Scand. 1998; 39(2): 195-199.

Foster, D.M. and Smith, G.W. (2009): Pathophysiology of diarrhea in calves. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 25(1): 13–36.

Gatti, M.S.V.; Ferraz, M.M.G.; R.cz, M.L. and de Castro, A.F.P. (1993): Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhoea. Vet. Microbiol. 37 (1-2): 187-190.

Germine, S.S.; Ebied, M.H.; Ibrahim, F.K.; Mettias, K.N. and Daoud, A.M. (2011): Field evaluation of egg yolk antibodies in prevention and treatment of enteric colibacillosis in calves veterinary serum and vaccine research institute, Abassia, Cairo. Beennhhaa Vet. Med. J. (1): 108-114.

Gulliksen, S.M.; Jor, E.; Lie, K.I.; Hamnes, I.S.; Loken, T.; Akerstedt, J. and Osteras, O. (2009): Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. J. Dairy Sci. 92(10): 5057-5066.

Izzo, M.M.; Kirkl, P.D.; Mohler, V.L.; Perkins, N.R.; Gunn, A.A. and House, J.K. (2011): Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhea. Aust. Vet. J. 89(5): 167-73.

Jay, C.M.; Bhaskaran, S.; Rathore, K.S. and Waghela, S.D. (2004): Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. Vet. Microbiol. 101(3): 153-160.

Kawakami, S.; Yamada, T.; Nakanishi, N.; Cai, Y. and Ishizaki, H. (2010): Leukocyte phagocytic activity with or without probiotics in Holestein calves. Res. J. Biol. Sci. 5(1): 13-16.

McGuirk, S.M. (2008): Disease management of dairy calves and heifers. Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. 24(1): 139-153.

Nagy, B. and Fekete, P.Z. (2005): Enterotoxogenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295(6-7): 443-454.

Parreno, V.; Marcoppido, G.; Vega, C.; Garaicoechea, L.; Rodriguez, D.; Saif, L. and Fernandez, F. (2010): Milk supplemented with immune colostrums: protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. J. Immunol. Immunopathol. 136(1-2): 12-27.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007): Veterinary Medicine. 10th ed, W.B. Saunders, England. pp 304-374.

Razzaque, M.A.; AL-Mutawa, T. and Mohammed, S.A. (2010): Diarrhea in pre-weaned calves: Relative risk rates for morbidity and mortality in 13 commercial farm of hot aired zone. Am. J. Anim. And Vet. Sci.5(3): 215-220.

Rippinger P.; Bertschinger, H.U.; Imberechts, H.; Nagy, B.; Sorg, I.; Stamm, M.; Wild, P. and Wittig, W. (1995): Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P, and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine post-weaning diarrhea and oedema disease., Vet. Microbiol. (45): 281-295.

Uhde, F.L.; Kaufmann, T.; Sager, H.; Albini, S.; Zanoni, R.; Schelling, E. and Meylan, M. (2008): Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrheic dairy calves in Switzerland.Vet. Rec. 20;163(12): 362-6.

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. Res. Vet. Sci.87(3): 373-9.