مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۲۰۸-۲۰۰

Original Article

شناسایی مولکولی باکتری *اشریشیا کلی* K99 و ارزیابی تیتر سرمی آن در حیوان آزمایشگاهی

فائزه فرحانی[۱]، یحیی تهمتن*[۲]، محمد کارگر[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی-شیراز، [۳] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیا کلی* مهمترین عامل ایجاد اسهال گوساله ها در روزهای اول زندگی می باشد. از مهمترین راهبردهای کنترل و پیشگیری از این بیماری واکسیناسیون مادران باردار است که به واسطه خوراندن آغوز به نوزاد انجام می شود. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی باکتری *اشریشیا کلی* K99 و ارزیابی تیتر سرمی آن در حیوان آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت تجربی بر روی حیوان آزمایشگاهی رت انجام گرفت. در ابتدا از روش Multiplex PCR برای شناسایی ژن های عوامل بیماریزایی K99، F41 و STa استفاده شد. پس از کشت باکتری در محیط کشت مینکای مایع، با افزودن فرمالین ۰/٤ درصد غیر فعال گردید. آنتی ژن حاصل پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ آماده سازی گردید. میزان تقریبی آنتی ژن برای تزریق به رت در ۲ دوز 10^{7} CFU/ml و 10^{9} تنظیم شد. گروه آزمون، آنتی ژن را در دو نوبت همراه با اجوانت آلوم به صورت زیر پوستی دریافت کردند. گروه کنترل نیز همه موارد به جز آنتی ژن را دریافت نمودند. خون گیری تا هشت هفته صورت گرفت و تیتر آنتی بادی در سرم ها تعیین شد.

یافته ها: رت های ایمن شده افزایش تیتر از هفته چهارم تا انتهای هفته هفتم را نشان دادند. میانگین عیارآنتی بادی های سرمی رت های ایمن شده به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود. اما در گروهی که دوز بالاتری از آنتی ژن را دریافت کرده بودند، عیارآنتی بادی بیشتر از گروه دیگر بود. اما سرعت کاهش عیار آنتی بادی هر دو گروه هم زمان و در پایان هفته هفتم مشاهده گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از دوز بالاتر آنتی ژن تزریقی باعث افزایش میزان عیارآنتی بادی و ایمنی پایدارتر می شود. بنابراین برای القای پاسخ ایمنی در بدن حیوان کارآمدتر می باشد.

واژگان کلیدی: فیمبریه K99، *اشریشیاکلی*، اسهال، گوساله، الایزا.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۳

مقدمه

اسهال حیوانات مانند گوساله ها باعث ایجاد خسارات اقتصادی فراوانی در صنعت دامپروری می گردد. این امر با دو روش مستقیم (به علت مرگ گوساله ها و هزینه درمان) و غیر مستقیم (کاهش رشد دام پس از بیماری) بروز می نماید. باکتری *اشریشیا کلی* (*E.coli*) از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مهمترین عامل ایجاد اسهال گوساله ها در روزهای اول زندگی می باشد (۱). اگر چه سویه های خاصی از *اشریشیا کلی* با ایجاد اسهال مرتبط می باشند، اما سویه های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (ETEC) باکتری غالب ایجاد کننده اسهال در گوساله ها است. این سویه با داشتن دو فاکتور حدت، عامل استقرار و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) و حساس به حرارت (LT) موجب اسهال آبکی می گردد (۲).

سویه ETEC دارای پنج فاکتور استقرار شامل: F18، F41، K99 (F5)، K88 (F4) و P987 (F6) می باشد (۳). مهمترین و شایع ترین عامل چسبنده ای که تاکنون بر روی سویه های

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹٤۰ پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

اشریشیا کلی درگیر در اسهال گوساله ها شناخته شده است، فاکتور K99 می باشد. این فاکتور امکان اتصال باکتری به سطوح اپی تلیال سلول های روده را فراهم می سازد (٤).

عوامل دیگری مانند محیط غیر بهداشتی، محافظت نامناسب در برابر آب و هوا، ایمنی ناکافی آغوز، کمبود آنتی بادی در شیر مادر و تغییرات رژیم غذایی به شدت به بیماری کمک می کند. در نهایت در صورت عدم درمان و کنترل بیماری یاد شده، دام در اثر اسهال شدید طی چند روز تلف می گردد (٥). مشکل درمان در این نوع اسهال دهیدراتاسیون می باشد. به منظور کنترل دهیدراتاسیون، استفاده از محلول های ساده یا تنظیم شده الکترولیت از راه خوراکی یا غیر خوراکی مفید می باشد. همچنین آنتی بیوتیک های مختلفی به عنوان یک راه حل درمان کننده برای درمان گوساله ها مورد استفاده قرار گرفته اند. اما مقاومت آنتی بیوتیکی در بسیاری از باکتری های مطرح در حیوانات نگران کننده است (٦). یکی از موثرترین روش های کنترل این بیماری استفاده از واکسن چند اپی توپی فیوژن آنتی ژن است که می تواند موجب تولید آنتی بادی های موثر خنثی کننده (نوترالیزان) علیه ETEC گردد (٧). هدف از این مطالعه تحریک سیستم ایمنی رت با استفاده از آنتی ژن *اشریشیاکلی* K99 و ارزیابی میزان تیتر سرمی رت ها بود.

مواد و روش ها

الف) شناسایی باکتری: باکتری *اشریشیاکلی* K99 مورد استفاده در این مطالعه از بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز تهیه گردید.

ب) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن های مربوط به فاکتورهای استقرار K99، F41 و STa به ترتیب از پرایمرهای اختصاصی آنها استفاده گردید (جدول ١) (٨).

جدول ١: پرایمرهای اختصاصی به منظور شناسایی جنس *اشریشیا کلی*.

عامل بیماریزا	توالی پرایمر ۵'⟶۳'	اندازه پرایمر (bp)
K99	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	٣١٤
F41	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	٣٨٠
STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	١٩٠

واکنش PCR با حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل ٥/٢ میکرولیتر بافر 1x، ٠/٥ میکرولیتر dNTP، ١ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ٠/٢٥ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ٢ میکرولیتر از DNA انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad C1000, Life Science Group)، با شرایط واسرشت ابتدایی در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ٥ دقیقه، ٢٥ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٥٠ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، طویل شدن در دمای ٧٠ درجه سلیسیوس به مدت ٩٠ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ٧٠ درجه سلیسیوس به مدت ١٠ دقیقه انجام گرفت (٩). محصولات PCR به ژل آگاروز ١/٥ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند.

ج) تهیه آنتی ژن: برای این منظور باکتری *اشریشیاکلی* K99 در محیط مایع مینکا (دی هیدروژن پتاسیم فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، گلوکز، کازآمینو اسید، آگار، عصاره مخمر، نمک های جزئینه و آب مقطر) به مدت ٢٤-١٨ ساعت در گرمخانه ٣٧ درجه سلیسیوس پاساژ داده شد. سپس به نمونه ها فرمالین اضافه گردید و مجددا به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلیسیوس در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. به منظور تایید مرگ باکتری ها، نمونه ها به صورت تصادفی بر روی محیط آگار به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شدند.

د) ایمن سازی: برای این منظور ٢٧ سر رت با وزن تقریبی ١٧٠ گرم برای ایمن سازی انتخاب شدند. ٢٠ سر رت به عنوان گروه آزمون و یک گروه ٧ تایی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. گروه آزمون، آنتی ژن را ٢ دوز 10^{7} و 10^{9} CUF/ml به صورت زیر جلدی به فاصله دو هفته و همچنین گروه کنترل همه موارد به جزآنتی ژن را دریافت نمودند.

ه) تعیین عیارآنتی بادی: نمونه گیری خون رت ها پس از یک هفته بعد از تزریق دوم تا هفته هشتم ادامه یافت. سرم

نمونه ها توسط سانتریفیوژ جداسازی و برای انجام تست الایزا به کار برده شد.

و) آزمون الایزا: به منظور استاندارد کردن و طراحی آزمایش الایزا نیاز به اندازه گیری و مشخص کردن مقدار آنتی ژن برای پوشاندن در کف پلیت ۹٦ خانه ای مخصوص الایزا می باشد.

۱- تهیه آنتی ژن برای انجام آزمایش الایزا: برای این منظور باکتری کشت داده شده در محیط کشت مینکا مانند مرحله قبل چند بار با بافر PBS استریل شستشو گردید. رسوب باقی مانده بر اساس استاندارد مک فارلند تنظیم شد. آنتی ژن تنظیم شده در داخل چاهک پلیت الایزا ریخته شد و به مدت یک شب نگهداری گردید. پس از شستشوی پلیت الایزا چاهک ها توسط محلول بلاکر پوشانده شد و به مدت یک ساعت گرمخانه گذاری گردید.

۲- در این مرحله از سرم هایی به دست آمده از نمونه های خون رت، رقت تهیه شد. سپس به هر چاهک از این سرم ها اضافه و مجدداً گرمخانه گذاری گردید. در نهایت آنتی بادی کونژوگه اضافه شد.

۳- تهیه آنتی بادی کونژوگه: ابتدا محلول کونژوگه HRP (Horse reddish peroxidase) ساخت شرکت Sigma باغلظت ۱:٤۰۰۰ در هرچاهک ریخته و به مدت یک ساعت انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون و انجام مراحل شستشو و خشک نمودن، سوبسترا اضافه گردید.

٤- آماده سازی سوبسترا: برای این منظور، قرص OPD (Ornitho phenyl dyalanin) در آب مقطر حل گردید. سپس به آن آب اکسیژنه اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محل تاریک نگهداری گردید. سپس به ظرف الایزا، اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد اضافه شد و نتایج در طول موج ٤۵۰ نانومتر خوانده شدند.

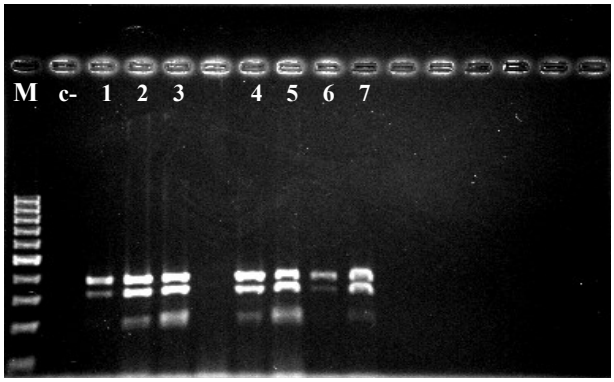
ز) آنالیز آماری: نتایج با استفاده از نسخه دوازدهم نرم افزار *SPSS* و آزمون آماری آنالیز واریانس (*ANOVA*) مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. مرز معنی داری بر روی P<۰/۰۵ قرار گرفت.

یافته ها

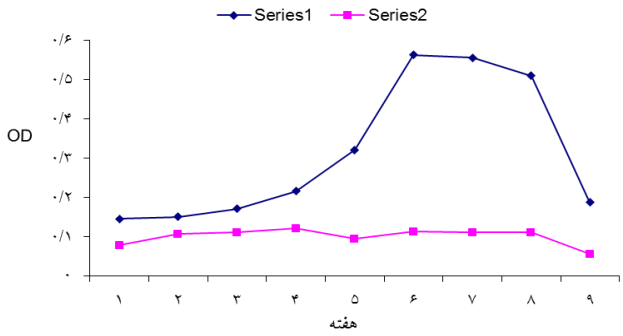
در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی K99، F41 و انتروتوکسین STa و روش PCR چندگانه مشخص گردید که تمامی نمونه ها هرسه ژن را دارند(شکل ۱).

با بررسی نمونه های سرم رت های گروه آزمون در مدت هشت هفته میزان ایمنی زایی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار ۱ میزان عیارآنتی بادی مربوط به گروه آزمون نسبت به کنترل قابل ملاحظه می باشد. نتایج به دست آمده در این پژوهش، افزایش عیارآنتی بادی از هفته پنجم تا هفتم و سپس به تدریج کاهش تیتر را نشان داد. با تیتراسیون سرمی پادتن های ضد K99 مشخص گردید که تولید پادتن موجب القای ایمنی حفاظتی در حیوان آزمایشگاهی می شود. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که گروه مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل در هفته پنجم تا هفتم تفاوت معنی داری دارد (p<۰/۰۵). اما در گروه کنترل هیچ گونه افزایش عیار ایمنی مشاهده نشد. تغییرات در گروه آزمایش در هفته اول تا چهارم نیز معنی دار نبود (p >۰/۰۵).

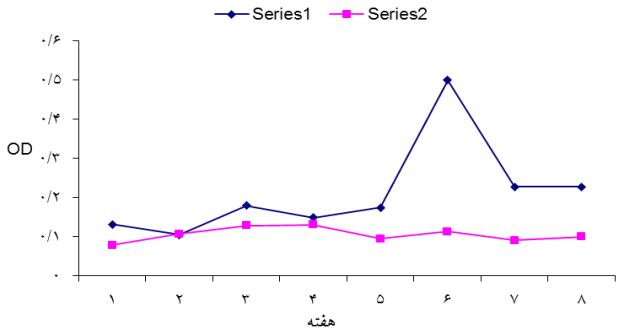
با توجه به بررسی میانگین مقادیر عیار آنتی بادی در سرم گروهای مورد آزمون دریافت کننده آنتی ژن *اشریشیاکلی* K99 غیرفعال، تغییرات معنادار بود. به طوری که بیشترین میزان تیترآنتی بادی بین هفته های پنجم تا هفتم قرار



شکل ۱: نتایج الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن های فاکتورهای استقرار K99، F41 و STa . M) مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، c-) کنترل منفی، ستون های ۱ تا ۷) ژن های تکثیر یافته در نمونه ها (F41 (۳۸۰ جفت باز) ، K99 (۳۱٤ جفت باز) و STa (۱۹۰ جفت باز)).



نمودار ۱: مقایسه نتایج تیتر سرمی گروه تست با گروه کنترل.



نمودار ۲: نتایج تیترسرمی آنتی ژن تزریقی$^{۱۰^{۶}}$.

داشت (نمودار ۲).

بحث

در مطالعه حاضر هویت مولکولی *اشریشیا کلی* در کنار روش های معمول با به کارگیری روش PCR چندگانه و همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی K99، F41 و STa بررسی شد. یافته ها نشان داد که PCR ابزار تشخیصی مفیدی برای تشخیص این باکتری است. زیرا سریع، اختصاصی، حساس و ارزان می باشد.

مطالعه شمس (Shams) و همکاران نیز نشان داد که PCR ابزار تشخیصی اختصاصی، حساس، سریع و نسبتاً ارزان برای تشخیص ژن های عوامل بیماریزایی مانند K99، F41 و STa در *اشریشیا کلی* های انتروتوکسیژنیک در گوساله های مبتلا به اسهال می باشد (۹). این محققان سپس ایمنی زائی آنتی ژن *اشریشیاکلی* K99 را با روش الایزا مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که ایمنی زایی رت ها با آنتی ژن غیر فعال، موجب افزایش عیار ایمنی در رت ها می گردد. این امر به واسطه ی تحریک سیستم ایمنی رت با آنتی ژن یاد شده به دست می آید (۹). در این راستا اجوانت ها با افزایش پایداری آنتی ژن و رهاسازی تدریجی آن در بدن حیوان زنده موجب تماس طولانی مدت آن با سیستم دفاعی و ایجاد پاسخ ایمنی قوی می گردد.

استفاده از اجوانت برای افزایش چشمگیر عیار آنتی بادی نیز توسط محققان دیگر نیز انجام شده است. فیگوریدو (Figurido) و همکاران در سال ۲۰۰٤ به منظور بررسی و یافتن آنتی بادی علیه فیمبریه K99 و F41 از سویه *اشریشیا کلی* در گاوهای باردار،آنتی ژن را با آلومینیوم و پتاسیم سولفیت به عنوان اجوانت به حیوان تزریق نمودند (۱۰). هوائی (Havai) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ در تولید آنتی بادی ضد *استافیلوکوکوس* در خرگوش از اجوانت استفاده کردند (۱۱).

استفاده از رت به دلیل اندازه بزرگتر و حجم خون بیشتر و زنده ماندن در دفعات خونگیری نسبت به موش ارجح است. این امر با بررسی های اپیدمیولوژیکی توسط سایر محققان هم خوانی دارد. مریون (Merion) و همکاران از نوزاد رت به عنوان مدلی برای ایمن سازی در برابرآنتی ژن های K99 و F41 باکتری *اشریشیا کلی* استفاده کردند. یافته آنها نشان داد که واکسن ترکیبی شامل K99 و F41 بیشترین حفاظت و کمترین میزان مرگ و میر را در نوزادان به دنبال داشته است (۱۲).

ژوفه (Zhofe) و همکاران نیز در سال ۱۹۹۱ به منظور بررسی بیماری اسهال در دام های تازه متولد شده که توسط عوامل فیمبیریایی P987، K88 و K99 باکتری *اشریشیا کلی* و *روتاویروس* ایجاد می شد، از واکسن ترکیبی بر روی حیوانات آزمایشگاهی خرگوش و رت استفاده کردند. نتایج آنها حاکی از افزایش پادتن در سرم بود (۱۳).

در مطالعه حاضر نتایج عیار سرمی پس از تزریق آنتی ژن به حیوان آزمایشگاهی نشان دهنده افزایش عیار با استفاده از روش الایزا بود. این یافته با مطالعات گزارش شده در مورد بررسی آنتی بادی منوکلونال علیه فیمبریه K99 سویه *اشریشیا کلی* در حیوانات گروه آزمایش توسط کروش (Crouch) و

همکاران (١٤)، وارشنی (Varsheney) و همکاران در سال ۲۰۰۷ (١٥) مطابقت داد. فیگوریدو (Figurido) و همکاران نیز در سال ۲۰۰٤ به منظور بررسی و یافتن آنتی بادی علیه فیمبریه K99 و F41 از سویه ی *اشریشیاکلی*، گاوهای باردار را مورد آزمایش قرار دادند. یافته های آنها، مقاومت دستگاه گوارش و عدم تلفات در گاوهایی دریافت کننده دوز محلول آنتی ژن را نشان داد (١٠).

در این پژوهش، ایمنی زایی رت ها علیه باکتری *اشریشیا کلی* سویه K99 صورت گرفت. سپس به منظور ارزیابی و تشخیص آنتی بادی های ضد باکتری *اشریشیاکلی* K99 از روش الایزای غیر مستقیم استفاده گردید. زیرا این تکنیک حساس، ارزان، سریع و قابل اطمینان است. به منظور بررسی اپیدمیولوژی تیتراسیون سرمی پادتن های ضد *اشریشیا کلی* K99، محققان زیادی مانند: کروش(Crouch) و همکاران (١٤)، مرشدی (Morshedi) و همکاران (١٦)، ربانی (Rabani) و همکاران (١٧) و بدیعی (Badeai) و همکاران (١٨) نیز از روش الایزا استفاده نموده اند.

روند افزایش آنتی بادی متعاقب تزریق آنتی ژن در سرم رت های گروه آزمایش که آنتی ژن را با غلظت دوگانه دریافت کرده بودند و نیز با توجه به استاندارد سازی الایزا (آنتی ژن پوشیده شده در کف پلیت ۵×۱۰^{۶} در نظر گرفته شد) در هفته پنجم تا هفتم به حداکثر میزان خود رسید. این امر می تواند به این دلیل باشد که اجوانت ها با افزایش پایداری آنتی ژن و رهاسازی تدریجی آن در بدن رت ها به نحوی که به تماس طولانی مدت آنها با سیستم دفاعی منجرشود، موجب ایجاد پاسخ ایمنی قوی می گردند. سپس بارسیدن به نقطه اوج، سیر نزولی پیدا می کنند.

در رت های گروه آزمون که بر اساس استاندارسازی، آنتی ژن پوشیده شده در کف پلیت معادل ۱۰×۱۰^{۶} در نظر گرفته شده بود نیز منحنی رسم شده الگوی تقریباً یکسانی را با منحنی ۵×۱۰^{۶} نشان داد. این منحنی نیز در هفته پنجم تا هفتم عیار بالایی از آنتی بادی را نشان داد. این امر نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی توسط آنتی ژن می باشد. در حقیقت رت های دریافت کننده آنتی ژن به دلیل تماس مکرر با آنتی ژن، پاسخ اولیه با تولید حداکثر میزان آنتی بادی را دارا بودند. سپس این فرایند افزایشی با رسیدن به اوج به تدریج نزول کرده و عیار پادتن کاهش قابل ملاحظه ای را داشت. اگرچه افزایش عیار آنتی بادی در روش اول در بین گروه های مختلف، خود نیز اختلاف معنی داری با گروه کنترل داشت. این تفاوت در روش دوم نیز مشهود بود. اما اختلاف آماری معنی دار بین گروه اول و دوم بسیار حائز اهمیت بود.

بنابراین به منظور افزایش عیار آنتی بادی، استفاده از روش دوم و استفاده از $۱۰^{۹}$ cfu/ml آنتی ژن بسیار مناسب تر می باشد. گذشته از این، اختلاف آماری معنی داری بین زمان افزایش حداکثری عیار آنتی بادی در هر دو روش مشاهده نگردید. به طوری که عیار آنتی بادی در هر دو روش تقریباً از هفته چهارم افزایش یافت و درانتهای هفته هفتم با کاهش همراه بود. این امر وابسته به اشباع شدن سلول های ایمنی توسط آنتی ژن های مورد نظر می باشد.

یعنی زمانی که جایگاه های سلول های ایمنی به وسیله اپی توپ های آنتی ژن تزریق شده پر و سپس اشباع می شود، پس از آن افزایش بیش از حد آنتی ژن تأثیر چندانی بر روی میزان و مدت زمان ایمنی ندارد. بنابراین در میزان عیار آنتی بادی، تنها در روش دوم افزایش عیار آنتی بادی به وجود می آید. اما مدت زمان افزایش در هر دو گروه کاملاً یکسان است.

نتایج نشان داد که در هر دو روش اول و دوم میزان عیار آنتی بادی از یک ماه پس از تزریق به حداکثر میزان خود می رسد. این میزان تقریباً در تمام مطالعات انجام شده گزارش شده است. به طوری که در تحقیقات انجام شده بر روی گاو، گوسفند، خرگوش و موش نشان داده شده است که عیار آنتی بادی سرم از هفته چهارم شروع به افزایش می کند و معمولاً پس از هفته هفتم به تدریج کاهش می یابد (١٩ و ٢٠).

در این مطالعه در گروه شاهد هیچ گونه افزایش عیار آنتی بادی مشاهده نگردید و همچنان ثابت و بدون واکنش گزارش شد. این امر بیانگر این مطلب است که محلول روماند محیط کشت

بدون باکتری، توانایی ایمنی زایی را ندارد و آنتی ژن ضعیف شده در بدن موجود زنده از اثر بخشی موثرتری دارد. به طوری که عدم وجود آن از ایجاد ایمنی ممانعت می نماید.

اسنودگرس (Snodgers) و همکاران در سال ۱۹۸۲، در بررسی آنتی بادی های سرم گوساله و گاوهای ایمن سازی شده افزایش عیار پادتن را از هفته چهارم تا ششم مشاهده نمودند. این یافته بیانگر این مطلب است که واکسن توسعه یافته علیه باکتری *اشریشیا کلی*، بیشترین حفاظت را در برابر بیماری اسهال دارد (۲۱).

مریون (Merion) و همکاران در سال ۱۹۸۸ به منظور ارزیابی آنتی ژن های K99 و F41 با ایمن سازی نوزاد موش، بیشترین حفاظت و افزایش عیار را از هفته سوم به بعد و به دنبال آن کاهش عیار سرمی را گزارش کردند (۱۲). کروش (Crouch) و همکاران در سال ۲۰۰۱ به منظور بررسی اثر فیمبریه K99 *اشریشیا کلی*، *روتا ویروس* و *کرونا ویروس*، گوساله های تازه متولد شده را مورد بررسی قرار دادند. بررسی سطح بالای پادتن از هفته چهارم علیه عوامل یاد شده بیانگر حفاظت گوساله ها در برابر اسهال بود (١٤).

جرمین (Germin) و همکاران در سال ۲۰۱۱ به منظور بررسی اثر فیمبریه K99 سویه *اشریشیا کلی* سرم گاوهای باردار ایمن سازی شده را مورد ارزیابی قرار دادند. افزایش عیار آنتی بادی از هفته ششم حالت صعودی داشت و با رسیدن به قله حالت نزولی پیدا کرد (۲۲). در سال ۲۰۱۰ نتایج بررسی انجام شده توسط ربانی (Rabbani) و همکاران حضور قابل توجه آنتی بادی های ضد *اشریشیاکلی* K99 را در هر دو جمعیت گوساله های سالم و مبتلا به اسهال گزارش کردند. همچنین عدم ارتباط بین سطح سرمی این آنتی بادی و حفاظت گوساله ها در برابر اسهال مشخص شد (۱۷). این یافته با نتایج مطالعه حاضر و دیگر محققان یاد شده مغایرت دارد.

به طور کلی ایمنی زایی در حیوان به منظور جلوگیری از ایجاد بیماری توسط آن عامل است. معمولاً بر حسب مدت زمان بارداری نحوه ایمنی زایی متفاوت می باشد. اما انجام دو تزریق به منظور ایمنی زایی به فاصله ۳-۲ هفته صورت می گیرد. به طوری که تزریق دوم حداقل ۲ هفته قبل از زایش است. این نوع ایمنی زایی را غیرفعال می گویند. زیرا نوزاد تازه متولد شده از آغوز مادر ایمن شده مصرف کرده و به طور غیرمستقیم ایمن می گردد (۲۳). به منظور بررسی میزان عیار آنتی بادی در مادران ایمن از روش الایزا استفاده می شود. این آزمون در سرم یا آغوز قابل انجام است (٢٤).

با توجه به اینکه آنتی ژن *اشریشیا کلی* دارای عوامل بیماری زایی مانند فیمبریه K99 و F41 است و این دو عامل، دارای ویژگی های چسبندگی و آگلوتینه کردن گلبول قرمزاسب هستند(۲۳)، بنابراین تزریق آنتی ژن کامل به رت می تواند حداکثر ایمنی را ایجاد نماید (۲۵).

نتایج بررسی حاضر و مطالعه انجام شده توسط دیگر محققان حاکی از آن است که ارائه یک مدل حیوانی برای بررسی ایمنی و بیماری زایی *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک و دیگر عوامل بیماری زای ایجاد کننده اسهال و درک بهتر عوامل تعیین حدت مفید است. بهره گیری از یک مدل حیوانی می تواند در ارائه معیاری برای انتخاب واکسن در پیشگیری از بیماری اسهال و مقابله با آن مفید باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که استفاده از دوز بالاتر آنتی ژن تزریقی باعث افزایش میزان عیار آنتی بادی و ایمنی پایدارتر می شود. بنابراین برای القای پاسخ ایمنی در بدن حیوان کارآمدتر می باشد. این امر به دلیل تحریک بیشتر سلول های ایمنی به وسیله ی آنتی ژن های با دوز بالاتر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از موسسه واکسن وسرم سازی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical Microbiology Appleton and Lange. 2010; 23(3): 108-110.

2. Tao LV, Nga N, Thien Thu N, Tuan DV. Virulence and pathogenic factors of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in the centre of Vietnam. Vet Sci Techniques. 2010; 10(4): 17-23.

3. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. J Dairy Sci. 2009; 92: 5057-5066.

4. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in entero toxigenic *Escherichia coli* (ETEC) . 2008; 1: 1011-1014.

5. Miguel A, Asco N,Javier Ochoa-Repa R, Walters N. Partially assembled K99 fimbriae are required for protection. Infect Immunity. 2009; 73(11): 7274-7280.

6. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expert Review Vaccines. 2008; 7(6): 795-804.

7. Hashish EA, Zhang C, Ruan X, Knudsen DE, Chase CC, Isaacson RE, Zhou G, Zhang WA. Multiepitope fusion antigen elicits neutralizing antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* and homologous bovine viral diarrhea virus in vitro. Clin Vaccine Immunol. 2013; 20(7): 1076-1083.

8. Nagy B, Feket P. Enterotoxigenic *Escherichia* medicine. Int J Med Microbiol. 2005; 1: 443-454.

9. Shams Z, Tahamtan Y, Kargar M, Hosseni MH, Pourbakhsh SA. Isolation and antibiotic sensitivity of *E. coli* K99 isolates from diarrhic calves at Fars province. J Microbial Word. 2010; 24(5): 256-260.

10. Figueiredo HCP, Large AP, Pereiaj FN, Leite RC. Passive immunity in cattle againts ETEC. Serologic evaluation of a bacterin containing k99 and F41 fimbria in colostrum of vaccinated females and calf serum. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 23(6):425-443

11. Havaei S, Mirsalehian A, Bazarjani F, Ghavaminejad A, Bamdad K, Poursina F, Tamizifar H. The effect of aluminium hydroxide, Freund's adjuvant and DTP vaccine on immunization of rabbit against encapsulated *Staphylococcus aureus* type 5. J Isfahan Med School. 2008; 45(26): 88-90.

12. Marion D. Prodective against Enterotoxigenic *Escherichia coli* O101, K99, F41 in the infant mouse diarrhea model. Infect Immunity.1988;1:1364-1370.

13. Zhffa A, Slajka SE,Zajak J. Antibody response in mice, rabbits and piges in response to vaccination with an inactivated oil vaccine coataining rotavirus and *Escherichia coli* strains with K88, K99 and 987p fimberial antigens.Vet Med. 1991; 36(7): 423-431.

14. Crouch F,Oliver S,Francis MJ. Serological,colostraland milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus,corono virusand *Escherichia coli* K99.Vet Record. 2001; 149(5): 105-108.

15. Varshney C, Ponnanna NM, Pranati A, Pragna R. Development of a monoclonal antibody-ased co-agglutination test to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. J Vet Sci. 2007;1 :57-64.

16. Morshedi A, Rabbani M, Zahraei Salehi T, Rezazadeh F, Taghipoor-Bazargani T. Evaluation of antibodies levels against *Esherichia coli* rotavirus and coronavirus in the colostrum of non

vaccinated cows in southern Tehran Iran. Int J Vet Res. 2010; 36(5): 217-219.

17. Rabbani M, Rezazadeh MoKhber-Dezfuli MR, Zahraie-Salehi T, Yoosefi-Ramandi A, Bahonar AR. Detection of anti-*E. coli*, *Rotavirus* and Crunavirus antibodies in sera samples of diarrheic and normal calves under 1 month of age. J Vet Res. 2007; 23(6): 145-149.

18. Badiei Kh, PourJafar M, Ghane M. Fecal *E.coli* F5 (k99) antigen in diarrheric calves of high and average producing holstein dairy cows. Global Veterinaria. 2011; 12(4): 441-446.

19. Acres SD, Isaacson RE, Babiuk L, Kapitany RI. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. Infect Immun. 2004; 25(7): 121-126.

20. Altmann K, Mukkur T. Passive immunization of neonatal lambs against infection with enteropathogenic *Escherichia coli* via colostrum of ewes immunised with crude and purified K99 pili. Res Vet Sci. 2001; 1: 234-239.

21. Snodgrass R, Nagy LK, Sherwood D, Campbell I. Passive immunity in calf diarrhea: vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. Infect Immunity. 1982; 37(2): 586-591.

22. Germine SS, Ebied, MH, Ibrahim FK, Mettias KN, Daoud AM. Field evalution of egg yolk antibodies in prevention and treatment of *Enteric coli* bacilosis in calves. Benha Vet Medical J. 2011; 12(3): l108-1114.

23. Morris JA, Wray C, Sojka WJ. Passive protection of lambs against enteropathogenic *Eschenchia coli*: role of antibodies in the serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. J Med Microbiol. 2000; 13(3): 265-271.

24. Jayappa H , Davis R, Dierks L, Sweeney D, Wasmoen T. Demonstration of passive protection in neonatal calves against colibacillosis following immunization of pregnant heifers at 3 months of gestation.Vet Therapeutics. 2008; 23(4): 283-289.

25. Valente C, Fruagnati G, Tesei B, Ciorba A, Cardaras P, Floris A, Bordoni E. Vaccination of pregnant cows with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* protection by colostrum in newborn calves, Comparative immunology. Microbiol Infect Dis. 2009; 11(3): 189-198.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Molecular identification of *Escherichia coli* K99 and evaluation of the serum antibody titer in laboratory animals

Faezeh Farahani[1], Yahya Tahamtan[2], Mohammad Kargar[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Escherichia coli* is one of the primary etiologic agents for diarrhoea in neonatal calves, and the maternal immunization is an effective protection for the neonates because of feeding with colostrum. This study was aimed to molecular detection of *E. coli* K99 and evaluation of the serum antibody titers in laboratory animals.

Materials & Methods: This study was experimentally carried out on rat to detect the marker genes. First, a Multiplex PCR was applied to detect the Sta, F41 and K99 pathogenic genes. Following growth of *E. coli* K99 bacteria into Minca broth, the bacteria were inactivated by 0.4% formaldehyde. The antigen was prepared after washing with PBS and centrifugation. The rats were subcutaneously inoculated with inactivated antigen with 10^7 and 10^9 CFU/ml in two groups. The control group was inoculated with a suspension containing all ingredients except for the antigen. Rat was allowed to nurse immediately after injection, and blood samples were taken for serum titration for 8 weeks.

Results: An increase in the titer of serum antibody was seen after four weeks, and it continued after seven weeks. The antibody titration of rate was significantly higher in the immunized rat group than in the control group. We found good correlation in two groups. There is a grateful increase in antibody titer in group 2 (received 10^9 CFU/ml antigen) than in group 1 (received 10^7 CFU/ml antigen), but decreasing rate in the both groups were the same.

Conclusion: These findings indicate that the use of killed antigen with high titer preparation containing sufficient antigen and may provide passive protection in animals. This resulted in by stimulation of immune cell due to high dose antigen.

Keywords: Fimbriae K99, *Escherichia coli*, Diarrhea, Calves, ELISA.

Correspondence to: Yahya Tahamtan

Tel: +989177117940

E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 200-208.