JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره دوم، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۵: ۱۱۷-۱۰۹

بررسی گوسفندان سالم شهرستان گرمسار به عنوان مخزن احتمالی *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) و شیگاتوکسیژنیک (STEC) با استفاده از روش PCR چندگانه

مازیار جاجرمی[۱]، مهدی عسکری بدوئی[۲*]، اکبر میرصالحیان[۳]

۱- دانش آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران

۳-گروه میکروبیولوژی، بخش باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۳ شهریور ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۷ آبان ۱۳۹۱

چکیده

تعیین ژنوتیپ و پاتوتیپ جدایه‌های باکتری اشریشیا کلی، در یک محدوده‌ی مشخّص جغرافیایی با استفاده از روش‌های مولکولی، در بررسی اپیدمیولوژی بیماری ارزشمند بوده و دارای کاربرد است. اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک (EPEC) و اشریشیا کلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) از جمله پاتوتیپ‌های مهم این باکتری هستند که با بررسی ژن‌های حدّت stx1 stx2 eae و ehly به لحاظ حضور، فراوانی و پروفایل ژنی در این تحقیق در میان گوسفندان سالم مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، در بازه‌ی زمانی زمستان سال ۱۳۸۹ و بهار سال ۱۳۹۰، از مدفوع ۸۰ گوسفند به ظاهر سالم متعلق به ۱۱ گله‌ی گوسفند در شهرستان گرمسار، نمونه‌برداری انجام شد. در میان ۸۰ نمونه‌ی مورد بررسی، از ۴۷ مورد (۵۸/۷۵٪) اشریشیا کلی شیگاتوکسیژنیک جداسازی شد. در میان ۹۸ جدایه‌ی اشریشیا کلی در بررسی حاضر، پروفایل ژنی stx1/ehly با فراوانی ۵۴/۰۸٪، ژنوتیپ غالب بود. هیچ موردی از سویه‌های EPEC شناسایی نگردید. بنابراین گوسفند در شهرستان گرمسار از مخازن احتمالی برای عفونت‌های ناشی از STEC محسوب می‌گردد که می‌تواند به واسطه‌ی مصرف گوشت گوسفند و دیگرفرآورده‌های آن، از طرق مختلف به انسان منتقل شده و سبب ایجاد عوارض گوناگون به ویژه اسهال گردد.

کلمات کلیدی: *گوسفند، گرمسار، اشریشیا کلی شیگاتوکسیژنیک، اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک*

*نویسنده مسئول: مهدی عسکری بدوئی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران. تلفن: ۰۲۳۲-۴۲۵۲۱۲۱

پست الکترونیک: *askari@iau-garmsar.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فرم بیماری‌زای روده‌ای باکتری *اشریشیا کلی* را می‌توان به پاتوتیپ‌های مختلفی طبقه‌بندی کرد که *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) و *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک (STEC)، از پاتوتیپ‌های بسیار مهم این باکتری محسوب می‌شوند. سویه‌های انتروپاتوژنیک، ضایعات بافتی را در سلول‌های اپی تلیال مخاط روده ایجاد می‌نمایند که به ضایعات اتّصالی و محوکننده (Attaching/Effacing) موسوم می‌باشند. یکی از مهم‌ترین عوامل در القاء این ضایعات، پروتئینی به نام اینتیمین است که توسط ژن *eae* کُد می‌شود (۳، ۱۷). سویه‌های *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک، توکسینی به نام شیگاتوکسین تولید می‌کنند که توسط ژن‌های *stx*1 و *stx*2 کُد می‌گردد. این توکسین در بدن، سلول‌های اندوتلیال عروق خونی مخاط دستگاه گوارش، کلیه‌ها، مغز و بافت‌های دیگر را مورد هدف قرار داده و منجر به نشت مایعات و خونریزی می‌گردد (۷). لذا سویه‌های شیگاتوکسیژنیک معمولاً از عوارضی چون سندروم اورمی همولیتیک (HUS) وکولیت هموراژیک (HC) جداسازی شده‌اند. به سویه‌های شیگاتوکسیژنیک که دربردارنده‌ی عوامل حدّت مختلف مانند شیگاتوکسین، اینتیمین و انتروهمولیزین هستند، سویه‌های انتروهموراژیک (EHEC) نیز اطلاق می‌گردد (۲). سویه‌های انتروهموراژیک معمولاً با عوارض حاد بیماری در انسان مرتبط بوده و نقش مهمی در اپیدمی‌های حاصله ایفا می‌نمایند (۱۵ و ۱۸).

جدایه‌های *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک و شیگاتوکسیژنیک از مدفوع عمده‌ی حیوانات تأمین‌کننده‌ی محصولات غذایی قابل جداسازی بوده و همواره به عنوان یک خطر، سلامت عمومی جامعه را تهدید می‌کند (۸). سویه‌های انتروپاتوژنیک معمول (Typical EPEC)، از انسان و سویه‌های انتروپاتوژنیک غیرمعمول (Atypical EPEC) از حیوانات مختلف جداسازی شده است. علاوه بر این گاو و گوسفند، مخازن مهم شناخته شده برای سویه‌های شیگاتوکسیژنیک محسوب می‌شوند. مطالعات متعدد وقوع *اشریشیاکلی* شیگاتوکسیژنیک را در انسان مربوط به شیوع آن در میان حیوانات دانسته‌اند (۱ و ۹).

بیماری ناشی از *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک در انسان سخت و طولانی بوده و معمولاً با اسهال، استفراغ و تب همراه می‌باشد. اسهال ناشی از سویه‌های انتروپاتوژنیک معمولاً مزمن است و می‌تواند به سوء جذب، سوءتغذیه و کاهش رشد منجر شود. به دلیل در دسترس نبودن روش‌های ساده، شناسایی سویه‌های انتروژنوپانیک در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی انجام نمی‌گیرد و میزان دقیق شیوع بیماری‌های حاصله مشخص نمی‌باشد. به علاوه، سویه‌های انتروپاتوژنیک از عوامل عمده‌ی ایجاد اسهال به خصوص در میان نوزاد انسان و حیوانات است که در نقاط مختلف جغرافیایی نیز گسترده می‌باشد (۶ و ۱۲).

هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان حضور سویه‌های *اشریشیاکلی* شیگاتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در میان گوسفندان به ظاهر سالم شهرستان گرمسار بود که طی آن به بررسی نقش گوسفندان به عنوان مخزن احتمالی این سویه‌ها نیز پرداخته شد. با توجه به مصرف بالای گوشت و فرآورده‌های دامی گوسفند در کشور، دسترسی به اهداف مذکور می‌تواند در تعیین اپیدمیولوژی پاتوتیپ‌های مورد نظر ارزشمند باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش کار

کشت و جداسازی *اشریشیا کلی*

در این مطالعه طی زمستان سال ۱۳۸۹ و بهار سال ۱۳۹۰ با مراجعه به ۱۱ گلّه‌ی گوسفند در اطراف شهرستان گرمسار که با توجه به شرایط پرورش، همگی سنتی بودند، تعداد ۸۰ نمونه مدفوع با استفاده از سوآپ استریل و از رکتوم گوسفندان به ظاهر سالم اخذ گردید. سوآپ‌ها در محیط انتقالی Amies و در کنار یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال گردید. به منظور افزایش تعداد باکتری‌ها، هر سوآپ در داخل محیط غنی‌کننده‌ی آب پپتونه قرار داده شد و۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس هر نمونه روی محیط مک کانکی آگار و سوربیتول مک کانکی آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید (۱۰). پرگنه‌های گرد، صورتی تا قرمز با اندازه‌ی متوسط و محدّب، که در حقیقت مشکوک به *اشریشیا کلی* بودند از محیط مک کانکی و پرگنه‌های سوربیتول منفی که بی‌رنگ، محدّب و گرد بودند از محیط سوربیتول مک کانکی انتخاب و در محیط TSI کشت داده شدند و در نهایت جدایه‌هایی که در محیط TSI حالت اسید/اسید ایجاد کرده بودند، برای بررسی خواص بیوشیمیایی از لحاظ تولید اندول، تولید هیدروژن سولفید، حرکت و ... درمحیط‌های SIM، MRVP و سیترات کشت داده شد.

PCR چندگانه

به منظور استخراج DNA از جدایه‌های بدست آمده، ابتدا هر جدایه‌ی تأیید شده توسط آزمایشات بیوشیمیایی، در محیط LB آگارکشت داده شد. پس از ۱۸ الی ۲۰ ساعت انکوباسیون تعداد ۳-۵ پرگنه از روی محیط LB آگار برداشت شد و در ۳۵۰µl آب مقطر مخلوط و به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه ورتکس (Vortex) گردید و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه میکروتیوب حاوی باکتری در آب در حال جوش قرار گرفت و بلافاصله با استفاده از یخ، نمونه‌ها سرد شد. سپس نمونه‌ها به وسیله‌ی دستگاه میکروسانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰rpm به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی حاوی DNA برای انجام مراحل بعدی در دمای۲۰°C- نگهداری گردید (۱۸).

برای بررسی ژن‌های حدّت *stx1*، *stx2*، *eae* و *ehly* در جدایه‌ها از روش PCR چندگانه (پاتون و پاتون ۱۹۹۸) استفاده شد (جدول ۱) (۱۱). مخلوط PCR برای بررسی ژن‌های حدّت در جدایه‌ها، برای واکنش PCR در حجم ۲۵ µl تنظیم شد. این حجم شامل۲/۵ µl بافر ۱۰x، کلرید منیزیم با غلظت ۲ mM، dNTP با غلظت ۰/۲ mM، ۰/۵ µM پرایمر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۳ µl DNA و آب مقطر تا حجم ۲۵ µl بود. سیکل‌های دمایی نیز مطابق دستور ارائه شده در مطالعات پیشین اعمال گردید (۱۲). کنترل مثبت (سویه‌ی O157:H7 تهیه شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) و کنترل منفی (آب مقطر) نیز برای هر واکنش PCR درنظر گرفته شد. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪، الکتروفورز گردید و در نهایت ژل الکتروفورز شده پس از رنگ‌آمیزی به کمک اتیدیوم بروماید تحت نور UV به کمک دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شد و عکس‌برداری گردید. عکس‌ها به دقت مورد بررسی قرار گرفت و پروفایل ژنی هر جدایه تعیین گردید.

نتایج

از میان ۸۰ نمونه مدفوع اخذ شده از گوسفندان سالم، با استفاده از کشت‌های افتراقی و آزمایشات

Archive of SID

www.SID.ir

بیوشیمیایی، ۷۴ نمونه واجد (۹۲/۵ درصد) و ۵ نمونه فاقد باکتری *اشریشیا کلی* تشخیص داده شد. در مجموع ۹۸ جدایه به دست آمد، که از این میان ۲۶ جدایه سوربیتول منفی (۲۶/۵۳ درصد) بود.

تمامی ۹۸ جدایه‌ی *اشریشیا کلی*، تحت آزمون PCR چند گانه قرارگرفت و در نهایت ۶۱ جدایه متعلق به ۴۹ نمونه (۶۱/۲۵ درصد)، حاوی حداقل یکی از ژن‌های حدّت مورد بررسی بود. ۵۹ جدایه متعلق به ۴۷ نمونه (۵۸/۷۵ درصد)، *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک و ۲ جدایه متعلق به ۲ نمونه (۲/۵ درصد) فقط حاوی ژن *ehly* بود. در هیچ یک از جدایه‌ها، ژن *eae* شناسایی نگردید. ژنوتیپ *stx1/ehly* با فراوانی ۵۴/۰۸ درصد، پروفایل غالب در میان جدایه‌ها بود. همچنین ژنوتیپ *stx1/stx2/ehly* رتبه دوم را با فراوانی ۵/۱ درصد به خود اختصاص داد (جدول۲). از میان ۲۶ جدایه‌ی سوربیتول منفی، ۱۷ مورد دارای ژنوتیپ *stx1/ehly*، ۲ مورد دارای ژنوتیپ *stx1/stx2/ehly* و مابقی فاقد ژن‌های حدّت مورد بررسی بود.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی ژن‌های حدّت در مطالعه حاضر

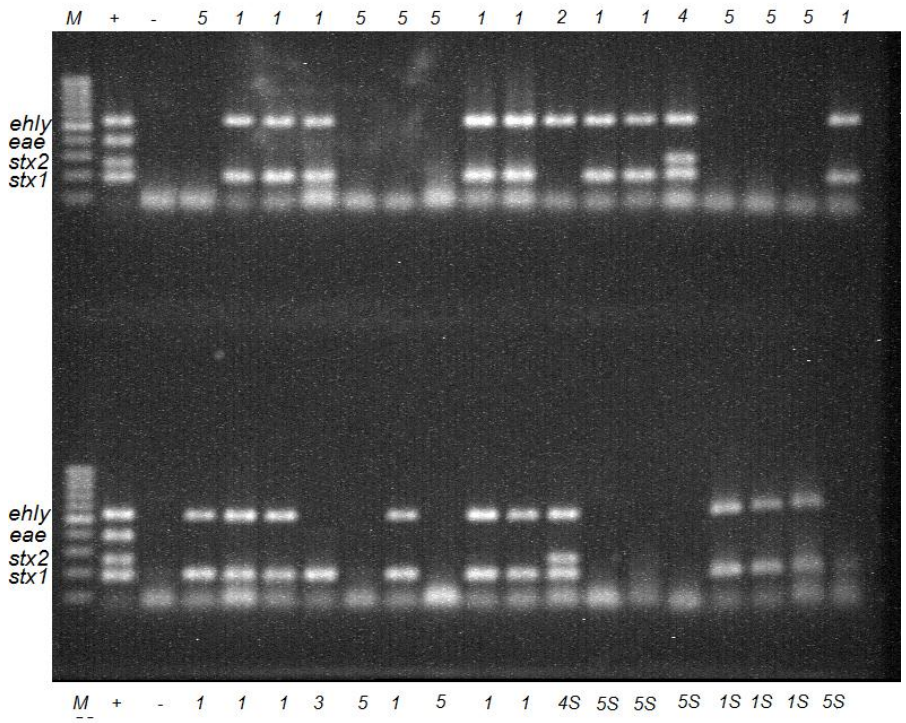
پرایمر	توالی	ژن هدف	طول محصول PCR(bp)	رفرانس
Stx1-F	5´-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3´	*stx1*	۱۸۰	Paton & Paton (1998)
Stx1-R	5´-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3´			
Stx2-F	5´-GGCACTGTCTCTCTGAAACTGCTCC-3´	*stx2*	۲۵۵	
Stx2-R	5´-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3´			
Eae-F	5´-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3´	*eae-A*	۳۸۴	
Eae-R	5´-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3´			
Hly-F	5´-GCATCATCAAGCGTACGTTCC-3´	*ehly*	۵۳۴	
Hly-R	5´-AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT-3´			

جدول ۲- ژنوتیپ ، تعداد جدایه‌ها و نمونه‌های دارای ژن‌های حدّت مورد بررسی

ژنوتیپ	تعداد نمونه (٪)	تعداد جدایه (٪)
stx1	۱ (۱/۲۵)	۱ (۱/۰۲)
stx1/ehly	۴۱ (۵۱/۲۵)	۵۳ (۵۴/۰۸)
stx1/stx2/ehly	۵ (۶/۲۵)	۵ (۵/۱)
Ehly	۲ (۲/۵)	۲ (۲/۰۴)
مجموع	۴۹ (۶۱/۲۵)	۶۱ (۶۲/۲۵)

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر ۱- انواع پروفایل‌های ژنی بدست آمده از جدایه‌های *اشریشیا کلی* گوسفند در تحقیق حاضر (در این شکل، تصویر ژل الکتروفورز PCR چندگانه ی یکسری از نمونه‌ها مشاهده می‌شود)

M، مارکر 100bp-plus؛ +، کنترل مثبت (O157:H7)؛ -،کنترل منفی؛**۱**- پروفایل *stx1/ehly*؛ **۲**-پروفایل*ehly*؛ **۳**-پروفایل *stx1*؛ **٤**- پروفایل *stx1/stx2/ehly* **٥**-نمونه ی فاقد ژن حدت؛ **S**، سوربیتول منفی.

بحث و نتیجه‌گیری

در انسان، *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک به واسطه دارا بودن عوامل حدّت، در هر سنی چه به صورت تک‌گیر و چه به صورت همه‌گیر حائز اهمیت است و *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک در زمره‌ی یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای در میان کودکان مخصوصاً در سنین زیر ۲ سال قرار دارد. میزان شیوع این عوامل بسته به جمعیت تحت بررسی، روش‌های تشخیصی مورد استفاده، فصل و ... متفاوت است (۹). سویه‌های *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک از مدفوع بسیاری از حیوانات تأمین کننده‌ی محصولات غذایی قابل جداسازی بوده و همواره به عنوان یک خطر، سلامت عمومی جامعه را تهدید می‌نماید. تعیین ژنوتیپ و پاتوتیپ جدایه‌ها با روش‌های ملکولی در بررسی پاتوژنز و اپیدمیولوژی باکتری در یک محدوده‌ی مشخص جغرافیایی ارزشمند بوده و دارای کاربرد است.

در مطالعه‌ی حاضر، از میان ۹۸ جدایه‌ی بدست آمده از ۸۰ نمونه مدفوع گوسفند سالم بالغ، پاتوتیپ شیگاتوکسیژنیک با فراوانی قابل توجه ۵۸/۷۵ درصد (n=۴۷) در میان نمونه‌ها و ۶۰/۲ درصد (n=۵۹) در میان جدایه‌ها، دارای بیشترین اهمیت است. تهمتن و همکاران از میان ۱۳۵۴ جدایه‌ی متعلق به ۳۷۰ نمونه مدفوع گوسفندان بالغ و سالم در شیراز، ۴/۴۸ درصد گوسفندان را واجد *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک، و ۰/۵ درصد جدایه‌ها را به عنوان پاتوتیپ انتروهموراژیک شناسایی کردند (۱۴). در استرالیا، فاگان و همکاران در سال ۱۹۹۹، ۱۰۰ گوسفند سالم را مورد بررسی قرار دادند که از این میان فراوانی پاتوتیپ شیگاتوکسیژنیک، انتروپاتوژنیک و انتروهموراژیک، به

Archive of SID

www.SID.ir

ترتیب ۴۴ درصد، ۷ درصد و ۱۰ درصد بود (۵). سانچز و همکاران در سال ۲۰۱۰ بامطالعه ۵۲۱ جدایه ی بدست آمده ازگوسفندان بالغ در اسپانیا، ۸۰/۸ درصد نمونه‌ها را *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک و ۰/۸ درصد را انتروهموراژیک و ۷۰/۶ درصد را واجد ژن *ehly* شناسایی کردند (۱۳). از مطالعه‌ی حاضر و مطالعات دیگر چنین بر می‌آید که در گوسفند مهم‌ترین پاتوتیپ از حیث فراوانی، شیگاتوکسیژنیک است (۵، ۱۳ و ۱۴). از طرفی شیوع حدوداً ۶۰ درصدی شیگاتوکسیژنیک‌ها در مطالعه‌ی حاضر می‌تواند حاکی از وجود یک منبع مشترک در میان گلّه‌های گوسفند شهرستان گرمسار باشد. در مطالعه‌ی حاضر هیچ سویه‌ی انتروهموراژیک و انتروپاتوژنیک بدست نیامد. درصد فراوانی بسیار بالای *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک در گوسفندان منطقه نیازمند مطالعات وسیع‌تر در این زمینه می‌باشد که در صورت بدست آمدن نتایج مشابه باید سیاست‌های کاهش آلودگی را ضرورتاً مورد بررسی قرار داد.

همین طور در مطالعه‌ی حاضر با بررسی ژنوتیپ جدایه‌ها مشخص گردید که ژنوتیپ *stx1/ehly* با فراوانی ۵۱/۲۵ درصد در میان نمونه‌ها، تنها ژنوتیپ قابل ملاحظه در مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه‌ی فاگان و همکاران در سال ۱۹۹۹ در استرالیا بر روی ۱۰۰ رأس گوسفند سالم، فراوانی ژنوتیپ *stx1/ehly*، ۱۰ درصد گزارش شد که دومین ژنوتیپ مهم بعد از ژنوتیپ *stx1* با فراوانی ۳۰ درصد محسوب می‌شد (۵). لذا احتمالاً ژنوتیپ *stx1/ehly* به لحاظ فراوانی از ژنوتیپ‌های نسبتاً شایع در میان سویه‌های شیگاتوکسیژنیک جداشده از گوسفند به حساب می‌آید. در مطالعه حاضر فراوانی جدایه‌های دارای ژن *stx1* (۵۸/۷۵ درصد) در مقایسه با جدایه‌های دارای ژن *stx2* (۶/۲۵ درصد) بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است. در مطالعه ی فاگان و همکاران فراوانی سویه‌های دارای ژن *stx1*، ۴۹ درصد و سویه‌های دارای ژن *stx2*، ۳ درصد گزارش گردیدکه نتایج آن با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد (۵). بنابراین به نظر می‌رسد در گوسفند، فراوانی ژن *stx1* در مقایسه با *stx2*، در میان جدایه‌های شیگاتوکسیژنیک بیشتر است. البته در مطالعه‌ی تهمتن و همکاران در شیراز، فراوانی ژن *stx1*، ۲۵ درصد و فراوانی ژن *stx2*، ۲۱/۴۲ درصد در میان ۳۷۰ رأس گوسفند اعلام گردید که در این مطالعه ژن‌های *stx1* و *stx2* از فراوانی قابل توجهی برخوردار می‌باشند (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر فراوانی ژن *ehly*، ۶۰ درصد و در مطالعه ی فاگان و همکاران ۱۴ درصد گزارش گردید و با توجه به اینکه فراوانی ژنوتیپ *ehly* در هر دو مطالعه نزدیک به ۳ درصد (در مطالعه حاضر ۲/۵ درصد و در مطالعه‌ی فاگان و همکاران ۳ درصد) بوده است، به نظر می‌آید که حضور ژن *ehly* در میان سویه‌های *اشریشیا کلی* گوسفندان بیشتر در ارتباط با حضور ژن‌های دیگر به ویژه *stx1* می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر هیچ جدایه‌ای واجد ژن *eae* شناسایی نگردید. این در حالی است که فاگان و همکاران، فراوانی ژن *eae* در جدایه‌های بدست آمده از گوسفند را ۱۷ درصد اعلام کردند (۵). همچنین وانی و همکاران در هندوستان با مطالعه ی جدایه‌های مدفوعی بدست آمده از ۱۰۱ گوسفند، فراوانی ژن *eae* را ۴/۹ درصد اعلام کردند(۱۵).در بررسی‌های مختلف روی *اشریشیا کلی* مدفوعی به دست آمده از گوسفند، اگرچه در مقایسه با ژن *stx* میزان وقوع ژن *eae* در سطح پایین‌تری قرار دارد، ولی برای قضاوت بهتر در مورد فراوانی ژن *eae* و *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک در منطقه مورد بررسی نیازمند جامعه‌ی آماری بزرگ‌تری هستیم.

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه‌ی حاضر از میان ۲۶ جدایه‌ی سوربیتول منفی، ۱۷ مورد دارای ژنوتیپ *stx1/ehly*، ۲ مورد دارای ژنوتیپ *stx1/stx2/ehly* و مابقی فاقد ژن‌های حدّت مورد بررسی بود. ازین رو همه این ۱۹ سویه‌ی سوربیتول منفی که دارای ژن‌های حدت هستند، پاتوتیپ شیگاتوکسیژنیک محسوب می‌شوند. این در حالی است که اغلب سویه‌های O157:H7 سوربیتول منفی هستند (۱۰).

عوارض حادّ ناشی از عفونت‌هایی مانند سندروم اورمی همولیتیک معمولا با سویه‌های انتروهموراژیک واجد ژن *stx*2 مرتبط است. این در حالی است که مطالعات جدید نقش سایر سویه‌های شیگاتوکسیژنیک مانند سویه‌های واجد *stx*1 را در ایجاد عوارض شدید در انسان نشان داده است (۲). بنابراین از بررسی حاضر چنین بر می‌آید، که با توجّه به فراوانی بالای *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک در میان گوسفندان شهرستان و همینطور مصرف بالای گوشت گوسفند در منطقه‌ی مورد بررسی، این حیوان می‌تواند یکی از مخازن مهم *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک برای عفونت‌های ناشی از این پاتوژن در انسان به شمار آید. به منظور کاهش خطرات ناشی از آن در زمینه‌ی سلامت عمومی جامعه، باید فراوانی پاتوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های این باکتری در میان افراد بیمار شهرستان نیز مورد بررسی قرار گیرد و بر رعایت موازین بهداشتی در خطوط کشتارگاهی تأمین‌کننده‌ی گوشت، بیش از پیش دقت لازم مبذول گردد. از طرفی پیشنهاد می‌شود برای تعیین منشأ سویه‌های شیگاتوکسیژنیک، از روش‌های انگشت نگاری ژنتیکی جهت مقایسه جدایه‌ها استفاده شود و برای روشن شدن چهره دقیق اپیدمیولوژی عفونت، تحقیقات مشابه در منطقه با جامعه‌ی آماری بزرگ‌تر و در بازه‌های زمانی وسیع‌تری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

در پایان نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از استاد گرامی جناب آقای دکتر زهرایی صالحی (دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به جهت اهدای جدایه‌ی استاندارد (کنترل مثبت) اعلام می‌نمایند. همچنین از همکاری دکتر علیرضا کوچک‌زاده، امین کشمیری، کمال خسروی، مجید یزدانی و حسن شیرین کلام تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Baljer, G., Wieler, L.H. (1999). Enterohaemorrhagic *E. Coli* (EHEC) Recent information a new medically important zoonic agent. *Lohman information* **22:** 21-6.
2. Bielaszewska, M., Kock, R., Friedrich, A.W., Von Eiff, C., Zimmerhackl, L.B., Karch, H., Mellmann, A. (2007). Shiga toxin mediated hemolytic uremic syndrome: Time to change the diagnostic paradigm? *journal Plos One* **2:** 1024.
3. Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Alonso, M.P., Mora, A., Coira, M.A., Madrid, C., Juarez, A., Bernardez, M.I., Gonzalez, E.A. (2006). Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology* **9:** 103-10.
4. Echeverria, P., Orskov, F., Orskov, I., Knutton, S., Scheutz, F., Brown, J.E., Lexomboon, U. (1991). Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. *Journal of Infectious Diseases* **164:** 550-4.
5. Fagan, P.K., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Djordjevic, S.P. (1999). Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **65:** 868-72.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Frankel, G., Philips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., Knutton S. (1998). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molcular Microbiology* **30:** 911-21.
7. Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Sciences* **85:** 45-62.
8. Mainil, J.G., Doube, G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* **98:** 1332-44.
9. Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C., Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Journal of Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102:** 852-85.
10. Ojeda, A., Prado, V., Martinez, J., Arellano, C., Borczyk, A., Johnson, W., Lior, H., Levine, M.M. (1995). Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotype from different sources. *Journal of Clinical Microbiology* **33:** 2199–201.
11. Paton, A.W., Paton, J.C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*1, *stx*2, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hly A*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *Journal of Clinical Microbiology* **36:** 598-602.
12. Ramachandran, V., Brett, K., Hornitzky, M.A., Dowton, M., Bettelheim, K.A., Walker, M.J., Djordjevic, S.P. (2003). Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *Journal of Clinical Microbiology* **41:** 5022-32.
13. Sanchez, S., Martinez, R., Garcia, A., Benitez, J.M., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Dahbi, G., Lopez, C., Mora, A., Alonso, J.M., Reya, J. (2010). Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal study. *Small Ruminant Research* **93:** 144-8.
14. Tahamtan, Y., Pourbakhsh, S.A., Hayati, M., Namdar, N., Shams, Z., Namvari, M.M. (2011). Prevalence and molecular characterization of verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and sheep in Shiraz-Iran. *Archives of Razi Instittute* **66:** 29-36.
15. Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Nishikawa, Y., Buchh, A.S. (2003). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. *Lettters in Applied Microbiology* **37:** 121-6.
16. Wani, S.A., Hussain, I., Fayaz, I., Mir, M.A., Nishikawa, Y. (2008). Subtype analysis of stx1, stx2 and eae genes in Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lamb diarrhoea in India. *Veterinary Journal* **182:** 482-90.
17. Wasteson, Y. (2001). Zoonotic *Escherichia coli. Acta Veterinaria Scandinavica* **95:** 79-84.
18. Zahraei Salehi, T., Askari Badouei, M., Mahdizadeh Gohari, I. (2011). Molecular detection and susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. *Comparative Clinical Pathology* **20:** 585-9.
19. Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H. (2002). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **40:** 4486-92.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 2, 2012

Investigation on Healthy Sheep as a Reservoir for Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) Strains in Garmsar District by Multiplex-PCR

Jajarmi, M.[1], Askari Badouei, M.[2*], Mirsalehiyan, A.[3]

1- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

3- Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received Date: 13 Sept 2012 *Accepted Date: 7 Nov 2012*

Abstract

Genotype and pathotype characterization of Escherichia coli isolates through molecular methods at a specific geographical area is particularly useful in the evaluation of disease, epidemiology. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and shigatoxin-producing Escherichia coli (STEC) are among the most important E. coli pathotypes. In this study 80 fecal samples were collected from 11 healthy sheep flocks in winter and spring of 2011 in Garmsar district. Escherichia coli isolates were screened by multiplex-PCR for stx1, stx2, eae, and ehly virulence genes. Among fecal samples, 47 cases (58/75%) were diagnosed as STEC Carrier. Among 98 E. coli isolates, stx1/ehly (54/8%) was the predominant genotype. EPEC strains were not recognized in this study. Therefore, sheep might be a possible reservoir for STEC infection in Garmsar and can be transmitted to humans through consumption of lamb meat and other related products.

Keywords: *Sheep, Garmsar, Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), Shigatoxigenic Escherichia coli (STEC)*

**Corresponding author: Askari Badouei, M*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran. Tel: 09125152573
Email: askari@iau-garmsar.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir