

بررسی مولکولی ژن‌های حدت *eaeA*، *stx*_۲، *stx*_۱ و *hlyA* در باکتری اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های کلوآکی در کبوتران وحشی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها

عبدالمجید محمدزاده* پژوهشگر ارشد، ایرج اشرافی تمای آرام شریفی

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرا دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ آذر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: کبوترها می‌توانند حامل پاتوژن‌های انسانی و حیوانی باشند که یکی از مهمترین این پاتوژن‌ها باکتری اشریشیا کلی است. این باکتری عامل ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان می‌باشد. هدف: هدف این مطالعه بررسی فراوانی حضور باکتری اشریشیا کلی در ناحیه کلوآک کبوتران شهر تهران و بررسی حضور ژن‌های حدت و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد. روش کار: در مجموع ۱۱۷ نمونه مدفوع از ناحیه کلوآک کبوتر اخذ گردید. شناسایی باکتری با کشت بر روی محیط‌های افتراقی صورت گرفت. سپس برای جدایه‌ها تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار در آگار انجام شد. حضور ژن‌های حدت *eaeA*، *stx*_۲، *stx*_۱ و *hlyA* در جدایه‌ها با روش Multiplex PCR تعیین گردید. نتایج: نتایج تتراسایکلین و سولفامتو کسازول به ترتیب با ۸۲/۵٪ و ۸۵/۶٪ مقاومت، غیر مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند و هیچ کدام از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک کوآموکسی کلاو مقاوم نبودند. فراوانی ژن *stx*_۱، *stx*_۲ و *hlyA* به ترتیب ۳/۰۹، ۶/۱۸ و ۲/۰۶ گزارش شد. ژن *hlyA* در هیچ کدام از جدایه‌ها حضور نداشت. نتیجه گیری نهایی: تناوب ژن‌های *stx*_۱ و *stx*_۲ در حیوانات و پرندگان و ارتباط آن‌ها با ایجاد بیماری در انسان، در ایران به خوبی مشخص نشده است، بنابر این ارتباط نزدیک انسان با پرندگانی مانند کبوتر و حضور سویه‌های مولد شیگا توکسین در این پرندگان به ظاهر سالم، نیاز به بررسی دقیق تر و جامعی برای شناسایی سویه‌های مولد شیگا توکسین در جهت کنترل و پیشگیری از انتشار مستقیم و غیر مستقیم این عامل مشترک بین انسان و دام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کبوتر، اشریشیا کلی، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن‌های حدت

مقدمه

اشریشیا کلی مولد اسهال، انواع تولید کننده توکسین شیگا یا (STEC) از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های معده ای-روده‌ای در انسان می‌باشد. این سویه‌ها علاوه بر ایجاد مسمومیت غذایی در انسان توانایی ایجاد بیماری‌های شدیدی مانند اسهال خونی، کولیت خونریزی دهنده، و سندرم اورمی همولیتیک را دارند. اگرچه سروتیپ‌های غیر H_۷:O_{۱۵۷}، توانایی ایجاد اورمی همولیتیک را دارند اما مهمترین سروتیپ ایجاد کننده این سندرم H_۷:O_{۱۵۷} می‌باشد (۱۱). دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان و بخصوص گاو به عنوان مخزن سویه STEC و همچنین سروتیپ غالب بیماری‌زای این سویه یعنی O_{۱۵۷} شناخته شده است. STEC همچنین از حیواناتی مانند خوک، سگ، گربه و همچنین پرندگان جدا شده است (۱۹). سویه‌های STEC توانایی تولید توکسین‌هایی را دارند که شبیه توکسین باکتری شیگلا دیسانتری تیپ I هستند. این توکسین‌ها شامل *stx*_۱ و *stx*_۲ هستند که از لحاظ ایمنولوژیک با هم متفاوت می‌باشند. به دلیل اثر تخریبی این توکسین‌ها روی کشت سلولی ورو (Vero cells) به آن‌ها وروتوکسین (VT_۱ و VT_۲) و باکتری ترشح کننده این توکسین‌ها را اشریشیا کلی وروتوکسیژنیک (VTEC) می‌نامند. وروتوکسین روی RNA ریبوزومی سلول میزبان تأثیر گذاشته و پروتئین‌سازی را مهار می‌کند. ژن کد کننده این توکسین از طریق فاژ معتدل به باکتری اشریشیاکلی وارد

پرندگان مختلف با حضور گسترده در محیط پیرامون ما همواره به عنوان یک عامل مهم در پخش عوامل بیماری‌زا تلقی می‌شوند. از جمله مهم‌ترین این پرندگان از لحاظ میزان حضور، کبوتران می‌باشد. وجود مدفوع کبوتر به عنوان منشأ باکتریایی می‌تواند عامل مهمی در انتقال انواع مختلف عفونت‌ها باشد. از جمله این عفونت‌ها می‌توان به عفونت‌های ایجاد شده توسط سویه‌های مولد اسهال باکتری اشریشیا کلی اشاره کرد (۷). این باکتری در مجاری گوارشی کبوتر به صورت فلور نرمال حضور داشته و عواملی مانند استرس، عفونت‌های ویروسی و انگلی باعث مناسب شدن شرایط و ایجاد بیماری (به وسیله اشریشیا کلی) در کبوتر می‌شود. این باکتری می‌تواند از طریق مدفوع کبوتر دفع شده و در محیط قرار بگیرد. باکتری اشریشیا کلی در مدفوع و شرایط نامساعد محیطی توانایی بقا و ماندگاری بالایی دارد که این قضیه احتمال برخورد باکتری دفع شده از طریق مدفوع با انسان و ایجاد بیماری را افزایش می‌دهد (۱۰). اشریشیا کلی مهمترین باکتری بی‌هوازی اختیاری ساکن مجاری گوارشی حیوانات خونگرم و انسان است. برخلاف سویه‌های پاتوژن اشریشیا کلی که دارای ژن‌های خاص مرتبط با حدت هستند و توانایی ایجاد اسهال در میزبان را دارند، سویه‌های غیر پاتوژن فاقد این ژن‌ها می‌باشند. از میان سویه‌های



شرکت پادتن طب مورد استفاده قرار گرفتند. به این صورت که جدایه‌های اشریشیا کلی روی محیط مولر هینتون آگار به روش چمنی کشت داده شدند و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی روی محیط با فاصله قرار داده شده و پلیت‌های محیط کشت به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطره‌اله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد.

بررسی حضور ژن‌های حدت در جدایه‌های اشریشیا کلی با روش Multiplex PCR: برای استخراج DNA از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت TSB به عنوان منشأ DNA مورد استفاده قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید سپس DNA باکتریایی توسط کیت سینا ژن (۸۱۱۵C) استخراج گردید. واکنش PCR شامل ۲ μl از نمونه استخراج شده، ۲۵۰ nM از هر پرایمر و یک واحد آنزیم Taq polymerase و ۵ μl PCR buffer (محصول شرکت سینا ژن) در حجم نهایی ۵۰ μl انجام شد. (توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است) (۸). برنامه دمایی PCR هم به این صورت بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به ۵ دقیقه، و به دنبال آن ۳۰ سیکل دمایی انجام شد. در طی این ۳۰ سیکل، واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله امتداد در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. و نهایتاً بعد از اتمام سیکل‌ها امتداد نهایی نمونه‌ها در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسیکلر TECHNE TC-۵۱۲ England پایان یافت (۱۷). محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده و باندهای DNA در دستگاه ژل داک (BIO RAD) آشکار شدند.

نتایج

در مجموع، ۹۷ جدایه باکتری اشریشیا کلی از ۱۱۷ مورد کبوتر جداسازی شد. این ۹۷ جدایه با تست‌های بیوشیمیایی ذکر شده تشخیص داده شدند. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به این صورت بود که کمترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو و انروفلوکساسین بود که از بین ۹۷ جدایه فقط یک جدایه به انروفلوکساسین مقاوم بود و هیچ کدام به کوآموکسی‌کلاو مقاومت نشان نداد. از طرف دیگر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نئوماکسین، تتراسایکلین و سولفامتو کسازول بالا و به ترتیب برابر ۷۵، ۸۱ و ۸۳ جدایه از کل موارد ۹۷ جدایه گزارش شد. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی همه جدایه‌ها در جدول ۲ ذکر شده است. از بین ۹۷ جدایه، ۲ جدایه (۲/۰۶٪) واجد ژن *hlyA*، ۶ جدایه (۶/۱۸٪) واجد ژن *stx2* و ۳ جدایه (۳/۰۹٪) واجد *stx1* بودند. ژن *eaeA* در هیچ کدام از جدایه‌ها حضور نداشت و همچنین قابل ذکر است که هیچ کدام از جدایه‌ها واجد ۳ یا ۴ ژن مورد بررسی به طور همزمان نبودند فقط در یک مورد ژن

می‌شود (۱۱). سویه‌های STEC همچنین توانایی بروز فاکتورهای حدت دیگری را نیز دارند از جمله این فاکتورها می‌توان اینتیمین (کد شونده توسط ژن *eaeA*) و پروتئین همولیزین در سویه EHEC (کد شونده توسط ژن *hlyA* پلاسמידی) را نام برد (۱۸). اینتیمین یک پروتئین ۹۴ kDa است که در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده و ایجاد آسیب به این سلول‌ها دخیل است (۳). الگوی بروز فاکتورهای حدت کد شونده توسط ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA* در سویه‌های پاتوژن، خیلی بیشتر از سویه‌های فلور طبیعی است. بنابراین بررسی حضور این ژن‌ها دارای اهمیت است (۱۸). سویه‌های پاتوژن و فلور طبیعی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی داشته و سویه‌های پاتوژن اشریشیاکلی می‌توانند به عنوان منشأ ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح باشند. این سویه‌ها توانایی منتقل کردن ژن‌های مقاومت به باکتری‌های فلور نرمال روده را دارند (۱۲). با توجه به اینکه اطلاعات کافی درباره مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA* در اشریشیاکلی جدا شده از سوآب کلوآک کبوتر در شهر تهران وجود ندارد. و با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از انجام این مطالعه حاضر بررسی آلودگی نمونه‌های اخذ شده از کبوترهای اطراف تهران به باکتری اشریشیاکلی، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA* در جدایه‌ها می‌باشد.

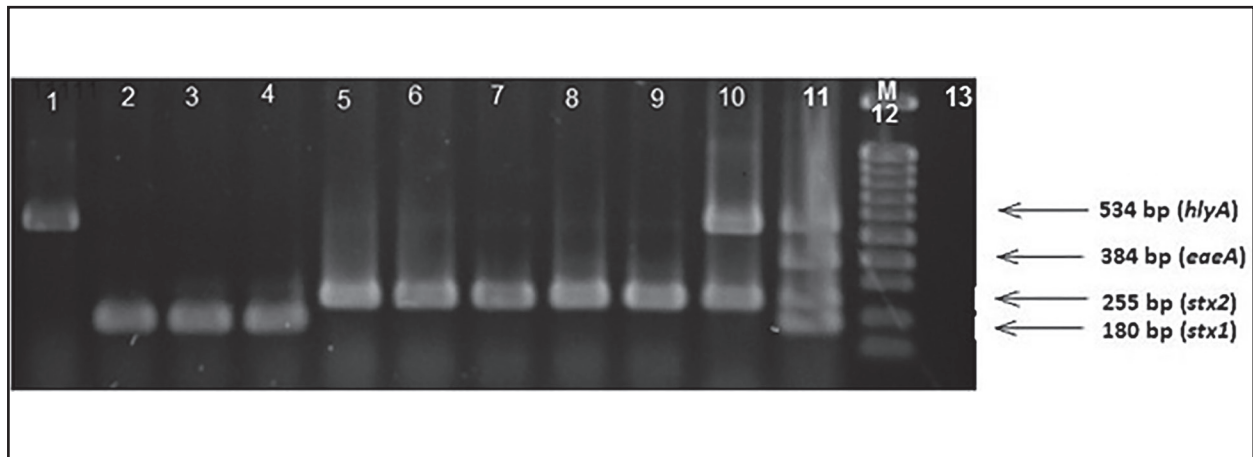
مواد و روش کار

نمونه‌گیری: این مطالعه در تابستان و پاییز ۱۳۹۳ انجام شد و در مجموع از ۱۱۷ کبوتر چاهی شهر تهران، نمونه برداری با سوآب از ناحیه کلوآک انجام پذیرفت.

جداسازی باکتری اشریشیا کلی: سوآب مدفوعی اخذ شده از کبوترها مستقیماً در لوله حاوی محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) (مرک آلمان) قرار داده شد. پس از انتقال لوله‌ها به آزمایشگاه سوآب اخذ شده به صورت خطی روی محیط MacConkey Agar (مرک آلمان) کشت داده شدند. پس از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷°C، پرگنه‌های صورتی رنگ لاکتوز مثبت روی محیط مکانکی آگار، با انجام سایر تست‌های بیوشیمیایی تفریقی از قبیل: TSI، اوره، اندول، واکنش متیل رد، و ژس پروسکوئر، سیمون سترات و جلای فلزی در EMB (مرک آلمان) تشخیص داده شدند.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مطابق روش استاندارد انتشار در دیسک (Kirby-bauer) طبق دستورالعمل ۲۰۰۷ انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام گرفت. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (۳۰ μg)، سفتریاکسون (۵ μg)، کوآموکسی‌کلاو (۳۰ μg)، استرپتومایسین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، انروفلوکساسین (۵ μg)، نئوماکسین (۳۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، سولفامتو کسازول (۱۰۰ μg) و فلوروفنیکول (۳۰ μg) تهیه شده از





تصویر ۱. نتایج PCR Multiplex جهت تعیین حضور ژن‌های *stx2*، *eaeA*، *hlyA* و *stx1*: ۱-*hlyA*، ۲-*stx1*، ۳-*stx2*، ۴-*stx1*، ۵-*stx2*، ۶-*stx1*، ۷-*hlyA*، ۸-*stx1*، ۹-*stx2*، ۱۰-*stx1* و *hlyA*: ۱۱. کنترل مثبت (ATCC ۳۵۲۱۸)، ۱۲: مارکر ۱۰۰bp، ۱۳: کنترل منفی

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

منبع	طول قطعه (bp)	سکانس (۵' - ۳')	ژن
Stx1	۱۸۰	F ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC	Stx1
		R AGAACGCCCACTGAGATCATC	
Stx2	۲۵۵	F GGCACCTGTCTGAAACTGCTCC	Stx2
		R TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
eaeA	۳۸۴	F GACCCGGCACAAGCATAAGC	eaeA
		R CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
hlyA	۵۳۴	F GCATCATCAAGCGTACGTTCC	hlyA
		R AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

stx2 و *hlyA* به طور همزمان مشاهده شد. تصویر ۱ نتایج Multiplex PCR ژن‌های بررسی شده را نشان می‌دهد.

بحث

کبوتران همواره به عنوان یکی از عوامل پخش کننده پاتوژن‌های مشترک بین انسان و دام شناخته شده‌اند. از جمله این پاتوژن‌ها می‌توان به اشیریشیا کلی و گونه‌های مختلف سالمونلا اشاره کرد. با توجه به حضور این پرندگان در محیط پیرامون انسان و حیوانات دیگر، امکان انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از این پرندگان به انسان وجود دارد (۶). در این مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشیریشیا کلی جدا شده از کبوتران اطراف شهر تهران تعیین شد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌ها نسبتاً پایین بود. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به تتراسایکلین (۸۱٪) گزارش شد که این نتیجه با آنچه Radimersky و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش نمودند، همخوانی داشت. آن‌ها گزارش کردند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اشیریشیا کلی جدا شده از کبوتر به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بالاست (۱۵). قابل ذکر است که گزارشات زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین در جدایه‌های حیوانی (۵) و انسانی (۱۴) در اشیریشیا کلی بالاست. این بالا

بودن میزان مقاومت به تتراسایکلین را احتمالاً می‌توان به استفاده گسترده و نابجای این آنتی‌بیوتیک در صنعت دامپزشکی نسبت داد. در مطالعه حاضر میزان مقاومت نسبت به انزوفلوکساسین بسیار پایین بود (یک جدایه از ۹۷ جدایه). که با آنچه Radimersky و همکاران درباره میزان مقاومت اشیریشیا کلی جدا شده از کبوتر گزارش کردند کاملاً همخوانی دارد (۱۵). محققین بر این باورند که عادات غذایی کبوتر و همچنین تماس نزدیک این پرندگان با انسان باعث آلودگی آن‌ها با باکتری‌های مهم پزشکی و بقایای آنتی‌بیوتیکی و مواد شیمیایی می‌شود (۱۵). به عنوان مثال استفاده تغذیه‌ای و تجمع کبوتران شهری در اطراف سطل‌های زباله از جمله مهمترین راه‌های آلودگی این پرندگان با پاتوژن‌ها و بقایای آنتی‌بیوتیکی به شمار می‌رود که این مسئله به ایجاد سویه‌های مقاوم در بدن این حیوانات و انتشار این سویه‌ها در محیط پیرامون انسان کمک می‌کند. بنابراین دفع صحیح و مناسب زباله‌ها می‌تواند به عنوان یک روش کاربردی جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و گسترش این مقاومت حائز اهمیت باشد. این موضوع در مورد شهرهای بزرگ مانند تهران به دلیل حجم بالای زباله، و همچنین وجود انواع مختلف زباله مانند بقایای مواد شیمیایی و دارویی حاصل از کارخانجات، مراکز صنعتی و بیمارستانی از اهمیت بیشتری برخوردار است. تشخیص سویه‌های STEC از لحاظ پزشکی از اهمیت زیادی برخوردار است به دلیل اینکه این سویه‌ها عامل سندرم‌های خطرناکی مثل اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک می‌باشد. جهت شناسایی این سویه‌ها از روش‌های مختلفی مانند الیزا، سیتوتوکسیسیته در کشت سلولی، ایمنواسی و PCR استفاده می‌شود (۱). در روش PCR جدایه‌ای که واجد *stx1* و یا *stx2* باشد به عنوان STEC در نظر گرفته می‌شود (۱۳). در مطالعه حاضر با روش Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های *stx1*، *stx2*، فراوانی ژن *stx1* در جدایه‌ها، ۳ مورد از ۹۷ جدایه (۳٪) و ژن *stx2*، ۶ مورد از ۹۷ نمونه (۶٪) گزارش شد. فراوانی ژن *stx2* به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) بیشتر از ژن *stx1* بود که این نتیجه با آنچه Tahamtan و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش



جدول ۲. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی.

آنتی‌بیوتیک	حساس (%)	نیمه‌حساس (%)	مقاوم (%)
سفکسیم	۳۶ (۳۷/۱)	۲۳ (۲۳/۷)	۳۸ (۳۹/۲)
سفترایکسون	۹۴ (۹۳/۸)	۴ (۴/۱)	۲ (۲/۱)
کوآموکسی‌کلاو	۹۵ (۹۷/۹)	۲ (۲/۱)	۰ (۰)
استریتوماپسین	۳۶ (۳۷/۱)	۱۵ (۱۵/۵)	۴۶ (۴۷/۴)
جنتامایسین	۷۳ (۷۵/۳)	۴ (۴/۱)	۲۰ (۲۰/۶)
انروفلوکساسین	۹۳ (۹۵/۹)	۳ (۳/۱)	۱ (۱/۱)
نئوماپسین	۱۲ (۱۲/۴)	۱۰ (۱۰/۳)	۷۵ (۷۷/۳)
تنتراسایکلین	۴ (۴/۱)	۱۲ (۱۲/۴)	۸۱ (۸۳/۵)
سولفامتوکسازول	۱۰ (۱۰/۳)	۴ (۴/۱)	۸۳ (۸۵/۶)
فلوروفنیکول	۷۷ (۷۹/۴)	۴ (۴/۱)	۱۶ (۱۶/۵)

و باعث ایجاد منفذ در این سلول‌ها و متلاشی شدن آن‌ها می‌شود (۸). در مطالعه حاضر فراوانی این ژن ۲ جدایه (۲/۰۶٪) بود که یکی از جدایه‌ها فقط حاوی ژن *hly* بود اما یکی از آن‌ها واجد *stx2* هم بود. در مطالعه Zahraei Salehi و همکاران هیچ کدام از جدایه‌ها واجد ژن *hlyA* نبودند (۲۰). Santaniello و همکاران با اخذ نمونه‌های سواب کلوک کبوتر به جستجوی باکتری اشریشیا کلی سروتیپ HV:O157 پرداختند. آن‌ها گزارش کردند که میزان حضور این سروتیپ در جدایه‌های اشریشیا کلی ۴ مورد از ۵۰۴ نمونه (۰/۷۹٪) اخذ شده می‌باشد. هر ۴ مورد حامل ژن‌های *stx2* و *eaeA* بودند. یکی از این چهار جدایه حامل *stx1* و دو تا از آن‌ها حامل *hlyA* بود (۱۶). در نهایت با کنار هم قرار دادن نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات صورت گرفته می‌توان گفت که کنترل و پیشگیری سوبیه‌های شیگاتوکسین در ایران، نیازمند مطالعه جامع تر بوده تا بتوان از انتشار مستقیم و غیر مستقیم‌ای عامل مشترک بین انسان و دام جلوگیری کرد. همچنین به دلیل این که این جدایه‌ها دارای مقاومت قابل توجهی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشند همواره باید اجرای تمهیدات لازم جهت کنترل تعداد این پرنده‌گان در مناطق شهری مورد توجه باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بو علی سینا همدان و همچنین از جناب آقای دکتر تقی زهرایی صالحی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

References

- Adeli, Z., Firoozeh, F., Zibaei, M., Shakib, P. (2013) Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran. J KaUMS. 17: 188-194.

کردند هم‌خوانی داشت. در مطالعه حاضر فراوانی STEC در بین جدایه‌ها ۹ مورد از ۹۷ نمونه (۹/۲۷٪) بود. برخی مطالعات اپیدمیولوژی صورت گرفته در ایران در رابطه با فراوانی STEC شیوع بین ۰/۷ تا ۱۵٪ گزارش شده‌اند و در مواردی از آن‌ها سروتیپ HV:O157 را گزارش نکرده‌اند (۲۰). Emery و همکاران در سال ۱۹۹۲ با نمونه‌گیری از مدفوع ۸۲ عدد مرغ و ۴۳۶ عدد بوقلمون گزارش کردند که ۲۲٪ نمونه‌های مرغی و ۱۱٪ نمونه‌های بوقلمون واجد ژن‌های سیتوتوکسیت مانند *stx2* می‌باشند (۴). با توجه به حضور ژن‌های *stx1* و *stx2* در باکتری‌های جدا شده از سواب کلوک کبوتر می‌توان گفت که این پرنده‌گان به صورت بالقوه توانایی انتقال باکتری‌های حامل این ژن‌های حدت را به انسان دارند. اما مطالعه حاضر نشان داد که خوشبختانه فراوانی این ژن‌ها در جدایه‌های اشریشیا کلی اخذ شده از کبوتر پایین می‌باشد. یکی دیگر از عوامل بیماری‌زایی سوبیه‌های STEC پروتئین اینتیمین می‌باشد که به وسیله‌ی ژن *eaeA* کد می‌شود. اینتیمین باعث اتصال نزدیک باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده و ایجاد آسیب‌های خاصی به نام اتصال و محو شدن (Attaching/effacing) می‌شود (۳). این ژن در هیچ‌کدام از جدایه‌ها وجود نداشت. محققان زیادی روی وابستگی حضور ژن‌های *stx* و *eaeA* اتفاق نظر دارند (۲۰). اما مطالعه حاضر نشان داد که در جدایه‌های اخذ شده از کبوتر همه *stx* مثبت‌ها برای *eaeA* منفی هستند. Zahraei Salehi و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که از ۱۲ جدایه اشریشیا کلی اخذ شده از جوجه‌ها تعداد ۲ مورد (۱۶/۶۶٪) حامل ژن *eaeA* می‌باشند و همچنین بیان کردند که هیچ‌کدام از جدایه‌هایی که *stx* دارند واجد *eaeA* نیستند؛ آن‌ها از این عدم وابستگی بین حضور دو ژن مذکور نتیجه گرفتند که شاید اشریشیاکلی‌های ساکن بدن پرنده‌گان از لحاظ ایجاد بیماری مهم انسانی اورمی همولیتیک، خیلی حائز اهمیت نمی‌باشند (۲۰). با توجه به تشابه نتایج مطالعه حاضر با نتایج Zahraei Salehi این نتیجه‌گیری را می‌توان به مطالعه حاضر تعمیم داد. از جمله ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر ژن *hlyA* می‌باشد. محصول این ژن همولیزینی است که بر روی سلول‌های یوکاریوتی مؤثر می‌باشد



2. Aslani, M.M., Bouzari, S. (2003) An epidemiological study on 18. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection among population of northern region of Iran Mazandaran and Golestan provinces. *Europ J Epidemiol.* 18: 345-349.
3. Barrett, T.J., Kaper, J.B., Jerse, A.E., Wachsmuth, I.K. (1992) Virulence factors in Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J Infect Dis.* 165: 979-980.
4. Emery, D.A., Nagaraja, K.V., Shaw, D.P., Newman, J.A., White, D.G. (1992) Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 36: 504-511.
5. Enne, V.I., Cassar, C., Springings, K., Woodward, M.J., Bennett, P.M. (2008) A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett.* 278: 193-199.
6. Grossmann, K., Weniger, B., Baljer, G., Brenig, B., Wieler, L.H. (2005) Racing, ornamental and city pigeons carry shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) with different Shiga toxin subtypes, urging further analysis of their epidemiological role in the spread of STEC. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 118: 456-463.
7. Haag-Wackernagel, D., Moch, H. (2004) Health hazards posed by feral pigeons. *J Infect.* 48: 307-313.
8. Islam, M.A., Mondol, A.S., Boer, E., Beumer, R.R., Zwietering, M.H., Talukder, K.A. (2008) Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 74: 5414-5421.
9. Jomezadeh, N., Farajzadeh Sheikh, A., Khosravi, A.D. (2009) Amin M. Detection of Shiga Toxin Producing *E. coli* strains isolated from stool samples of patients with diarrhea in Abadan Hospitals. *Iran J Biolog Sci.* 9: 820-824.
10. Kimpe, A., Decostere, A., Matrel, A., Haesebrouck, F., Devrise, L.A. (2002) Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Avian Pathol.* 31: 393-397.
11. Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., López, C., Justel, P. (2007) Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin) producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo(Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 1: 1-9.
12. Obrig, T.G. (2010) *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. *Toxin.* 2: 2769-94.
13. Paton, A.W., Paton, J.C. (1998) Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO15*. *J Clin Microbiol.* 2: 598-602.
14. Phongpaichit, S., Wuttananupan, K., Samasanti, W. (2008) Class 1 integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from human stools. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 39: 279-287.
15. Radimersky, T., Frolkova, P., Janoszowska, D., Dolejska, M., Svec, P., Roubalova, E., Cikova, P., Cizek, A., Literak, I. (2010) Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *J App Mic.* 109: 1687-1695.
16. Santaniello, A., Gargiulo, A., Borrelli, L., Dipineto, L., Cuomo, A., Sensale, M., Fioretti, A. (2010) Survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in urban pigeons (*Columba livia*) in the city of Napoli, Italy. *Ital J Anim Sci.* 6: 313-316.
17. Tahamtan, Y., Hayati, M., Namavari, M.M. (2010) Prevalence and distribution of the *stx1*, *stx2* genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. *Iran J Med.* 2: 9-14.
18. Vaˆnia, L., Silva Jacques, R., Nicoli Thiago, C., Nascimento, C., laˆudio, G., Diniz. (2009) Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Recovered from Urban Pigeons (*Columba livia*) in Brazil and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns.



Current Microbiol. 59: 302-308.

19. Wallace, J.S., Cheasty, T., Rowe, B. (1997) Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J Appl Microbiol. 82: 399-404.
20. Zahraei Salehi, T., Safarchi, A., Peighambari, S.M., Mahzounieh, M., Rabbani Khorasgani, M. (2001) Detection of *stx1*, *stx2*, *eae*, *espB* and *hly* genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. J Vet Med. 56: 17-20.



Molecular analysis of virulence genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hlyA* in *Escherichia coli* isolated from cloacal samples in wild pigeons (*Columba livia*) and determination of their antibiotic resistance

Mohammadzadeh, A.^{*}, Mahmoodi, P., Ashrafi tamai, I., Sharifi, A.

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received 19 December 2016, Accepted 11 March 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Pigeons can be carriers for some human and animal pathogens, one of the most important of which is *Escherichia coli*. **OBJECTIVES:** This bacterium is responsible for outbreaks of many human diseases. Our objective was to determine the prevalence of *Escherichia coli* in cloacal area of pigeons in Tehran city (Iran), and determine the prevalence of some virulence genes and also antibiotics resistance pattern of isolates. **METHODS:** Altogether 117 samples of pigeon feces were collected from cloacal swab. The identification of bacteria was done by culture on differential culture media. Then antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method. Isolates were tested for the presence of virulence genes *stx1*, *stx2*, *eae* and *hlyA* using multiplex polymerase chain reaction. **RESULTS:** *Escherichia coli* were detected in 82.9% of 277 samples from pigeons. Sulfamethoxazole was the least effective drug (85.6% resistance), followed by tetracycline (83.5%). No resistance was detected to co-amoxiclav. The prevalence of *stx1*, *stx2* and *eaeA* is 3.09%, 6.18% and 2.06% respectively and *hlyA* was not found in any of isolates. **CONCLUSIONS:** The frequency of *stx1* and *stx2* distribution in animals and birds is not well understood as yet. Due to the close relationship of humans with birds like pigeons and presence of STEC strains in apparently healthy birds, necessitates considering precise regulations to restrict and prevent the prevalence of this life-threatening virus in Iran.

Keyword: pigeon, *Escherichia coli*, antibiotic resistance, virulence gene

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers use in this study.

Table 2. Antibiotic susceptibility pattern in *E.coli*.

Figure 1. Multiplex PCR results gene *hlyA*, *eaeA*, *stx2* and *stx1*: 1: *hly*, 2-4: *stx1*, 5-9: *stx2*, 10: *stx2* and *hlyA*, 11: control positive (ATCC 35218), 12: Ladder 100bp, 13: control negative.



^{*}Corresponding author's email: mohammadzadeh4@gmail.com, Tel: 0813-4227350, Fax: 0813-4227475

J. Vet. Res. 72, 2, 2017