Archive of SID

DOI: http://dx.doi.org/10.22034/vj.2017.109220

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109220

شناسایی مولکولی فاکتورهای حدت *اشریشیا کلی* در سه سویه EHEC، ETEC و EPEC در گوساله‌ها و بره‌های مبتلا به اسهال در شیراز

• **پریسا ارجمندپور**
دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان، واحد علوم تحقیقات
• **یحیی تهمتن (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران ، ایران
تاریخ دریافت: دی ماه ۹۴ تاریخ پذیرش: تیر ۹۵
Email: yahyatahamtan@yahoo.com

چکیده

اســـهال ناشی از سویه‌های پاتوژن (EHEC،ETEC و EPEC) در گوســـاله‌ها و بره‌ها به‌ویژه در نخستین روزهای پس از تولد، به علت تلفات و خســـارات اقتصادی حاصله از اهمیت زیادی برخوردار است. در طی این تحقیق ۲۰۰ سوآب رکتوم از گوساله‌ها و بره‌های یک تا ۳۰ روزه مبتلا به اســـهال در مدت یک سال (۱۳۹۲تا ۱۳۹۳) در شهرستان شیراز جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و ائوزین-متیلن‌بلو و مینکا کشـــت داد شـــد. در این مطالعه شیوع ژن‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (K99، F41، STa) *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (Stx۱، Stx۲ و eae) و *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (eae و bfpb) با اســـتفاده از تکنیک Multiplex PCR بررسی شد. نتایج نشان داد از ۱۳۳ *اشریشیا کلی* جداشده ۱۲/۰۳ درصد دارای هرسه ژن بیماری‌زای ETEC و ســـه درصد دارای هر سه ژن بیماری‌زای EHEC می‌باشند. همچنین تعیین توالی ژن حدت K۹۹ نشان داد که توالی نوکلئوتیدی آن‌ها، ۹۷ تا ۱۰۰ درصد با توالی‌های نوکلئوتیدی رفرنس‌های موجود در بانک ژنی شـــباهت دارد. پراکندگی شیوع عفونت با سه سویه مذکور در مناطق مختلف جهان متفاوت می‌باشد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از عوامل مدیریتی، سن گوساله‌ها، زمان دریافت آغوز، حجم و کیفیت آن و واکسیناسیون مادران باردار باشد.

کلمات کلیدی: فاکتورهای حدت، *اشریشیا کلی*های پاتوژن، PCR، فارس

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 27-34

Molecular Identification of Virulence Factors of ***E. coli*** in Three Strains of ETEC, EHEC and EPEC in Calves and Lambs with Diarrhea in Shiraz

By: Arjmandpout, P., MSC Student, Department Biology, Science Faculty, Sirjan Islamic Azad University, Shiraz Branch Research Science. Tahamtan, Y., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 2016-01-06 Accepted: 2016-06-28

Email: yahyatahamtan@yahoo.com

Pathogenic *E.coli* (ETEC, EHEC and EPEC) cause diarrhea in new born calves and lambs are important especially due to mortality rate and high economic losses. In this study 200 rectal swab samples were collected from 1-30 day-old calves and lambs with diarrhea during 2013-2014 in Shiraz. The samples were inoculated on Mac Conkey, EMB and Minca agar media. The presence of various virulence genes of ETEC (k99, F41 fimbria and Sta), EHEC (Stx1, Stx2 and eae) and EPEC (bfpb and eae) was investigated using multiplex PCR. The PCR test results showed that out of 133 *E. coli* isolates, 12.03% and 3% possessed all three virulence genes of ETEC and EHEC, respectively. The sequencing of K99 gene showed 97-100% homology between the isolates. The variety of ETEC, EPEC and EHEC prevalence has been reported in the world. These variations could be due to managing factors, calves age, colostrum intake and dam vaccination.

Key words: Pathogenic *E. coli,* Virulence Factors, PCR, Fars

مقدمه

اشریشیاکلی، ارگانیسم متحرکی است که به سادگی بر روی محیط‌های کشت معمولی به خوبی رشد می‌کند. این باکتری هوازی و بی هوازی اختیاری است و بر روی محیط مک‌کانکی‌آگار کلنی‌های گرد، برجسته، صاف و صورتی ایجاد می‌کند. کلنی‌های آن با یک جلای فلزی بر روی آگار ائوزین متیلن‌بلو (EMB) و مثبت شدن تست اندول (تبدیل تریپیتوفان به اندول) به سرعت تشخیص داده می‌شود، این باکتری‌ها لاکتوز مثبت می‌باشند و همچنین دارای پیلی هستند. اشریشیاکلی از ساکنین طبیعی مجاری روده حیوانات است، اما برخی از این باکتری‌ها با دارا بودن فاکتورهای بیماری‌زا ایجاد بیماری کرده که مهم‌ترین بیماری اسهال است. این باکتری به عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد اسهال در گوساله‌ها و بره‌ها در روزهای اول زندگی شناخته شده است (۶). ویژگی‌هایی که اساس سیستمویروتیپ را تشکیل می‌دهند، شامل نوع اتصال باکتری به سلول میزبان، تأثیر اتصال روی سلول‌های میزبان، تولید توکسین وعوامل تهاجمی می باشند. یک ویروتیپ معمولا بیش از یک گروه سرولوژی وسروتیپ دارد. بر این اساس پاتوتیپ‌های *اشریشیا کلی* که ایجاد اسهال می کنند شامل *اشریشیا کلی* انتروتوکسی‌ژنیک (ETEC)، *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC)، *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (EHEC)، *اشریشیا کلی* انترواگری‌گیتیو(EAggEC)، *اشریشیا کلی* انتروانویسیو (EIEC) و اشریشیا با چسبندگی پراکنده(DAEC) می‌باشند (۱۲).

گزارشات فراوانی در ارتباط با نقش عفونت روده‌ای به شکل اسهال توسط سویه‌های پاتوژن *اشریشیا کلی* به خصوص سویه انتروتوکسیژنیک، انتروپاتوژنیک و انتروهموراژیک در گوساله و بره تازه متولد شده چه در داخل کشور و چه در سایر مناطق جهان منتشر شده است. سویه‌های خاصی از *اشریشیا کلی* مانند *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژن (ETEC) و *اشریشیا کلی* تولید کننده وروتوکسین با ایجاد اسهال مرتبط هستند (۱). اما اثبات شده است که EPEC، ETEC و EHEC مهم‌ترین باکتری‌های ایجادکننده اسهال هستند (۱۳). باکتری‌های این سه گروه واجد خصوصیاتی هستند از قبیل قدرت بقا، تکثیر و فاکتورهای منحصر به فرد که مهم‌ترین نقش را در ایجاد بیماری ایفا می‌کنند. مهم‌ترین ویژگی باکتری‌های سویه ETEC وجود فیمبریه در سطح باکتری است که سبب اتصال آن به مخاط شده و سم تولید می‌کنند. به طور کلی دو نوع سم توسط این باکتری بیماری‌زا تولید می‌گردد، ۱- سم حساس به حرارت و ۲- سم مقاوم به حرارت، تاکنون تمام باکتری‌های جدا شده از گوساله سم مقاوم به حرارت(STa) راتولید نموده‌اند (۱۹).

سویه EPEC عامل عمده اسهال در نوزادان است که عمدتا در کشورهای در حال توسعه بیماری‌زا می‌باشد (۱۳). این سویه دارای فاکتور پیوستگی ((EPEC adherence factor (EAF) می‌باشد که توسط پلاسمید ۶۰ مگا دالتونی کد می‌شود. سویه‌هایی از EPEC که فاقد EAF می‌باشند (ATEC)، دارای فیمبریه‌ای به قطر هفت نانومتر به نام bfp (bundle-forming pilus) می‌باشند که در سال ۱۹۹۱ توسط جیرون و همکاران گزارش شده است(۱۳). فاکتور دیگری که در بیماری‌زایی این سویه موثر است فاکتورeae است. از این دو ژن eae و bfp برای شناسایی سویه EPEC و دو رده آن typical و atypical استفاده می‌شود (۱۳). سویه‌هایی از باکتری E. coli که دارای هر دو ژن eae و bfp هستند، جز دسته typical EPEC و سویه هایی که فاقد ژن bfp هستند، جز دسته typical

www.SID.ir

Archive of SID

طبقه‌بندی شده‌اند (۱۳).

در سال ۱۹۸۳ رایلی و همکاران بر طبق دو مشاهده اپیدمیولوژیکی سویه EHEC را به عنوان یک سویه بیماری‌زا از باکتری E.coli معرفی کردند (۱۸). این سویه باعث بیماری‌های گوارشی شدید و اسهال آبکی به همراه درد شکمی می‌شود که نه تنها قادر به تولید سیتوتوکسین (وروتوکسین) می‌باشند، بلکه توانایی اتصال به مخاط روده را نیز دارند(۴) (۱۷).

تمام سویه‌های EHEC دارای همولیزین (توسط ژن hlyA در پلاسمید کدگذاری می‌شود)، یک سم شیگلا مانند (توسط ژن‌های stx۱ و stx۲ کدگذاری می‌شود) و پروتئینی به وزن ۹۷ کیلو دالتون به نام intimin (توسط ژن eaeA کدگذاری می‌شود) می‌باشند (۱۰).

امروزه روش‌های نوین مولکولی که به بررسی ژن‌های عوامل بیماری‌زایی می‌پردازند، جایگزین روش‌های معمول می‌شوند که نسبت به روش‌های مولکولی نقاط ضعفی همچون وقت‌گیر بودن، عدم حساسیت و اختصاصیت بالا و همچنین نیاز به پیش تیمار نمونه دارند. روش‌های مولکولی از جمله روش Multiplex PCR برای جستجوی ژن‌های اختصاصی عوامل بیماری‌زایی در نمونه‌های کلینیکی از جدیدترین، حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش‌هایی است که امروزه برای تعیین فراوانی عفونت‌ها کاربرد دارد (۱۱).

از آنجا که درک صحیح از میزان شیوع یک بیماری از یک طرف اهمیت آن بیماری را نشان می‌دهد و از طرف دیگر می‌تواند به مسئولین و دست‌اندرکاران مبارزه با بیماری در اتخاذ روش‌های مناسب برای پیشگیری و کنترل بیماری در سطوح مختلف کمک نماید، لذا در مطالعه حاضر شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری اسهال ناشی از *E. coli* در دام مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲، ۲۰۰ نمونه سواب از مخاط رکتوم گوساله و بره‌های یک تا ۳۰ روزه اسهالی از نواحی مختلف شهرستان شیراز جمع‌آوری گردید. سواب حاوی نمونه مدفوع در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی محیط trypticase soy broth (TSB) به آزمایشگاه باکتری شناسایی مؤسسه رازی شیراز انتقال داده شد. نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک‌کانکی‌آگار و EMB (ائوزین متیلن بلو) کشت خطی داده شد. از تست‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی سیترات، اوره، TSI،MR و VPبه منظور شناسایی و جداسازی باکتری E.coli از سایر باکتری‌های موجود در نمونه استفاده گردید. از پرایمرهای اختصاصی K99،F۴۱ و Sta برای شناسایی باکتری ETEC، پرایمرهای Stx2 ،Stx1 و eae برای شناسایی باکتری EHEC و پرایمرهای Bfp و eae برای شناسایی باکتری EPEC به منظور ازدیاد قطعه‌های به ترتیب ۳۱۴، ۳۸۰، ۱۹۰، ۵۵۵، ۱۱۸، ۸۴۰، ۹۱۰، جفت بازی ژن‌های K۹۹،F۴۱،Stx۱،Sta،Stx۲،Bfp،eae و eae با استفاده از تکنیک PCR و با استفاده از دستگاه اپندورف ساخت کشور آلمان استفاده گردید (۱). برای استخراج DNA کشت ۲۴ ساعت ازسواب رکتوم در محیط TSB برداشته شد و سانتریفوژ گردید و DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج (DNP TM) ساخت شرکت سیناژن مطابق پروتکل کیت استخراج گردید. برنامه دمایی PCR در دستگاه ترموسیکلر شامل ۲۵ سیکل و دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۰ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای نهایی ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. سپس محصول PCR به ژل آگارز انتقال داده شد و بعد از رنگ آمیزی و رنگ‌بری ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید و آب مقطر، با استفاده از اشعه فرابنفش و دستگاه ژل داک مشاهده گردید.

نتایج

از ۲۰۰ نمونه سوآب رکتوم با استفاده از روش های کشت، رنگ‌آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی ۱۳۳ باکتری E.coli جداسازی شد. به منظور شناسایی سویه‌های EPEC،ETEC و EHEC با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده برای تمامی نمونه‌ها تست PCR انجام گرفت.

نتایج PCR نشان داد که از ۱۳۳ E.coli جداشده، ۱۶ (۱۲/۰۳ درصد) جدایه دارای فاکتور K۹۹، ۲۴ جدایه (۱۸/۰۴ درصد) دارای فاکتور F۴۱ و ۲۱ جدایه (۱۵/۷۸ درصد) دارای فاکتور STa و تنها ۱۶ جدایه (۱۲/۰۳ درصد) دارای این سه ژن با هم بودند (شکل ۱).

نتایج PCR برای سویه EHEC نشان داد که از ۱۳۳ E.coli جدا شده ۱۳ جدایه (۹/۷۷ درصد) دارای فاکتور Stx۱، ۱۶ جدایه (۱۲/۰۳ درصد) دارای فاکتور Stx۲، ۱۸ جدایه (۱۳/۵۳ درصد) دارای فاکتور eae، هشت جدایه (۶/۰۱ درصد) دارای هر دو فاکتور Stx۱ و Stx۲ به طور همزمان، چهار جدایه (سه درصد) هر سه فاکتور را به طور همزمان با هم داشتند (شکل ۲). نتایج تست PCR برای سویه EPEC نشان داد که این سویه از هیچ کدام از نمونه‌ها جدا نشد.

در نهایت از ۱۳۳ نمونه بدست آمده ۳۷ نمونه (۲۷ درصد) مربوط به گروه ETEC و ۳۵ نمونه (۲۶/۳۱ درصد) مربوط به گروه EHEC بودند و سویه EPEC در هیچ نمونه‌ای یافت نشد. ضمنا در ۶۱ نمونه (۴۵/۸۶ درصد) باکتری مربوط به هیچکدام از سه گروه فوق یافت نشد.

به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد میزان آلودگی بره‌ها به دو سویه ETEC و سویه EPEC صفر بوده و همچنین میزان آلودگی آن‌ها به سویه EHEC ۴/۵۱ درصد بدست آمد. ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی به این سه گروه باکتری در بره‌ها بدست نیامد ($p < ۰/۰۵$). در مورد گوساله‌ها نتایج نشان داد میزان آلودگی گوساله‌ها به سویه ETEC ۳۰،۸ درصد، EHEC ۲۱،۶۶ درصد و EPEC صفر می‌باشد. بین میزان آلودگی این سه گروه باکتری در گوساله‌ها ارتباط آماری معنی‌داری بدست آمد ($p < ۰/۰۵$). در مورد بزها نتایج نشان داد میزان آلودگی بزها به دو سویه ETEC و EPEC صفر بوده اما به سویه EHEC (۱۲۰ /۳) ۰/۲۵ درصد بدست آمد. در این مورد نیز ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی به این سه گروه باکتری در بزها بدست نیامد ($p < ۰/۰۵$). (۲).

بحث

در مطالعه حاضر به طور کلی مشخص شد که ۲۷/۸۱ درصد از گوساله‌ها به سویه ETEC آلوده شده‌اند در حالی‌که هیچ کدام از بره‌ها و بزها توسط این سویه آلوده نشده بودند. ۴/۵۱ درصد از بره‌ها، ۱۹/۵۴ درصد از گوساله‌ها و ۲/۲۵ درصد از بزها به سویه EHEC آلوده شده بودند و به طور کلی از ۱۳۳ نمونه جداسازی شده، ۲۶/۳۱ درصد سویه EHEC و ۲۷/۸۱ درصد سویه ETEC جداسازی شد. این فراوانی‌ها با مطالعاتی که توسط سایر محققین در مناطق مختلف انجام گرفته است، متفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. در مورد سویه اشریشیاکلی انتروتوکسی‌ژنیک پژوهش‌های فراوانی انجام شـــده اســـت که نشان از حضور این ســـویه در حیوانات بخصوص در گوســـاله‌ها و بره‌ها و شـــیوع عفونت این ســـویه در هفتـــه اول زندگی این حیوانات دارد. از جمله مطالعه وانی و همکاران در ســـال ۲۰۱۳ در کشمیر که اعلام کردند هشـــت درصد از گوساله‌های بیمار و پنج درصد از بره‌های مبتلا به اســـهال، آلوده به ســـویه ETEC بودند و اظهار داشتند که در هیچ کدام از گوساله‌ها و بره‌های ســـالم سویه ETEC حضور ندارد(۲۴). شبانا و همکاران در ســـال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای که بر روی گاو و گوسفندهای مبتلا به اسهال انجام دادند، اعلام کردند که ۲/۲ درصد از نمونه‌ها به سویه ETEC آلوده شده‌اند(۲۰). در این مطالعه طی بررسی‌هایی که بر روی گوساله، بره و بز مبتلا به اســـهال در شـــیراز انجام گرفت، میزان شیوع ژن‌های عوامل بیماری‌زایـــی فیمبریه K۹۹ و F۴۱ و انتروتوکســـین STa در اشریشـــیاکلی انتروتوکسی‌ژنیک در گوســـاله‌ها به ترتیب ۱۲/۰۳ درصد، ۱۸/۰۴ درصد و ۱۵/۷۸ درصـــد تعیین گردید، و ۱۲/۰۳ درصد از نمونه‌ها هر ســـه ژن را با هم داشـــتند. اما این سه فاکتور در نمونه‌های حاصل از بره و بز یافت نشد. مطالعه چن و همکاران در ســـال ۲۰۰۴ در شرق چین میزان فراوانی K۹۹ و F۴۱ را در اشریشـــیاکلی انتروتوکســـی‌ژنیک پنج درصد اعلام کردند(۵). نتایج تحقیق نســـیری و همکاران در ســـال ۱۹۸۲ در فرانســـه این فراوانی را ۶/۱ درصـــد نشـــان داد(۱۱). در ایران هم بر روی این ســـویه مطالعاتی انجام گرفته اســـت از جمله مطالعه کیانی و همکاران در ســـال ۱۳۸۹ که بر روی گوســـاله‌های یک تـــا ۳۰ روزه کار کردند و اعـــلام کردند که ۱/۵ درصد از نمونه‌ها فاکتور F۴۱، دو درصد فاکتور F۴۱ و Sta و هشـــت درصد

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در RCP

عامل بیماری زا	توالی پرایمر --	اندازه پرایمر(bp)
K۹۹	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	۳۱۴
F۴۱	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	
STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	۳۸۰
Stx۱	(TTCGCTCTGCAATAGGT(A (TTCCCCAGTTCAATGTAAGA(T	
Stx۲	(GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTT(C (AGGGGTCGATATCTCTGTC(C	۱۹۰
Eae	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC	۵۵۵
Bfp	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	۱۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

از نمونه‌ها هر سه فاکتور را با هم داشتند(۲). بررسی شمس و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استان فارس با استفاده از روش مولکولی و سرولوژی به شناسائی دو فاکتور K۹۹ و F۴۱ از گوساله‌های یک تا ۳۰ روزه پرداختند و اعلام کردند که ۵/۳ درصد از نمونه‌ها برای فاکتور K۹۹ مثبت بودند و همه باکتری‌های اشرشیاکلی جدا شده ژن F۴۱ را داشتند(۲۱)، در صورتیکه در مطالعه لطف‌الهزاده و همکاران در سال ۱۳۸۳ که با روشآگلوتیناسیون در شهرستان‌های بابل و قائم‌شهر انجام گرفت، این میزان ۱/۰۷ درصد گزارش شد(۳). به نظر می‌رسد که بخشی ازتفاوت‌ها مربوط به متفاوت بودن میزان شیوع اسهال ناشی از ETEC در این مناطق باشد، ضمن اینکه حساسیت و ویژگی روش‌های به کار رفته نیز متفاوت می‌باشد. مطالعات دیگر که توسط سایر محققین در این زمینه انجام شده است درصد فراوانی بیشتری را نسبت به این مطالعه و مطالعات ذکر شده در بالا نشان می‌دهند. برای مثال در مطالعه‌ای که در ۷ هفت منطقه اروپا جهت بررسی عوامل ایجاد کننده اسهال عفونی در گوساله‌ها توسط ساندرلند و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت، میزان شیوع اشریشیاکلی K۹۹ از هشت تا ۴۶ درصد گزارش گردید(۲۲). در مطالعه‌ای که در بخش‌هایی از ترکیه انجام شد، نشان داده شد که ۱۶ درصد از گوساله‌های مبتلا به اسهال دارای اشریشیاکلی K۹۹ بوده‌اند(۸).

در رابطه با دو سویه EHEC و EPEC در حیوانات مطالعات متعددی در مناطق مختلف انجام و میزان حضور ژن‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه حاضر حضور سویه EHEC و EPEC در گوساله، بره و بز نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد که ۷۵ درصد از بره‌ها و سه درصد از گوساله‌ها دارای توکسین Stx۱، ۲۵ درصد از بره‌ها و ۱۰ درصد از گوساله‌ها حاوی توکسین Stx۲ بوده‌اند. ۱۳/۵۳ درصد از گوساله‌ها دارای فاکتور eae و سه درصد از گوساله‌ها هر سه فاکتور را با هم داشتند، و به طور کلی ۹/۷۳ درصد از نمونه‌ها دارای Stx۱، ۱۲/۰۳ درصد دارای Stx۲ و ۱۳/۵۳ درصد دارای فاکتور eae بوده‌اند. ورما و همکاران در مطالعه‌ای در هند بر روی گوساله و بره‌ها تعیین کردند که ۹/۷۳ درصد از گوساله‌ها و شش درصد از بره‌ها دارای سویه EHEC بودند که از این تعداد ۹/۷۳ درصد از گوساله‌ها و شش درصد از بره‌ها دارای هر سه فاکتور Stx۲،Stx۱ و eae بودند (۲۳). قابل ذکر است که در مطالعات دیگر محققان، این فراوانی‌ها نسبت به مطالعه حاضر درصد بیشتری نشان می‌دهد، از جمله بررسی‌های نوتنا و همکاران در اردن که گزارش کردند سویه EHEC در ۲۵ درصد از بره‌ها و ۶۵/۵ درصد از بزها حضور داشته است(۱۵). مطالعات شبانا و همکاران که بر روی گاو و گوسفندهای مبتلا به اسهال انجام گرفت، نشان داد ۴۸/۹ درصد با سویه EHEC و ۶/۷ درصد با سویه EPEC آلوده شده‌اند(۲۰). کیم و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کره جنوبی حضور این سویه‌ها را در خوک اعلام و تعیین کردند که ۳۸ از نمونه‌ها دارای ژن‌های فیمبریه، ۴۲ درصد دارای توکسین و ۳۴ درصد دارای هر دو فاکتور فیمبریه و توکسین بوده و از این تعداد ۲۳ درصد دارای توکسین LT، چهار درصد دارای توکسین STX۱، ۲۵ درصد دارای توکسین Stx۲، ۲۱ درصد دارای Intimin، ۶۶ درصد از نمونه‌ها آلوده به سویه ETEC و ۵۳ درصد نمونه‌ها آلوده به سویه EPEC بودند(۱۰). مطالعه وانی و همکاران بر روی گوساله و بره‌های مبتلا به اسهال نشان داد که ۴/۱۶ درصد از نمونه‌ها دارای ژن eaeA، ۲/۵ درصد دارای ژن Stx۱ و ۳/۲ درصد دارای ژن Stx۲ بوده‌اند(۲۴). مطالعات دیگری در این زمینه نیز انجام شده است که درصد فراوانی بیشتری را نسبت به این مطالعه و مطالعات ذکر شده در بالا نشان می‌دهد، از جمله مطالعه دستمالچی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ارومیه بر روی گوساله‌های مبتلا به اسهال و سالم با استفاده از روش Multiplex PCR که شیوع ژن‌های Stx۱، Stx۲، eae و hlyA را مورد بررسی قرار دادند و نتایج PCR نشان داد که ۲۳/۱ درصد از نمونه‌ها دارای ژن Stx۱ ، ۲۶/۹۲ درصد از نمونه‌ها حاوی ژن Stx۲ ، ۵۰ درصد دارای هر دو ژن Stx۱ و pt ۹، ۲۶/۹۲ درصد دارای ژن eaeA و ۵۷/۶۹ درصد از نمونه‌ها دارای ژن hlyA بودند(۷). نجین و همکاران با آزمایش بر روی گوساله‌ها با استفاده از روش PCR اعلام کردند که ۳/۳۱ درصد از نمونه‌ها دارای یک فیمبریه (F۱۷،F۵ و F۴۱) بودند، ۴۴/۲ درصد دارای Stx۱ و ۳۶/۶ درصد دارای ۹ درصد بودند (۱۴).

همان طورکه ذکر شد، بیماری‌های عفونی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در صنعت دامپروری هستند که باعث خسارات اقتصادی زیادی می‌گردند. از جمله این بیماری‌ها، اسهال گوساله‌ها و بره‌ها است که از دو طریق

جدول۲- فراوانی سویه های ETEC-EHEC-EPEC بر اساس نوع حیوانات

نوع حیوانات	تعداد باکتری جدا شده	(٪)ETEC	(٪)EHEC	(٪)EPEC	(٪)*Others
بره	۸	۰(۰)	۶(۷۵)	۰(۰)	(۲۵)۲
گوساله	۱۲۰	۳۷(۳۰،۸۳)	۲۶(۲۱،۶۶)	۰(۰)	(۵۲،۵)۶۳
بز	۵	۰(۰)	۳(۶۰)	۰(۰)	(۴۰)۲
کل	۱۳۳	۳۷(۲۷،۸۱)	۳۵(۲۶،۳۱)	۰(۰)	(۴۵،۸۶)۶۱

*Others: منظور سایر باکتری ها به غیر از سه گروه ذکر شده در جدول می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مستقیم (به علت مرگ گوساله‌ها و بره‌ها و هزینه درمان) و غیرمستقیم (کاهش رشد دام پس از بیماری) صورت می‌پذیرد (۱۶). در بین عوامل عفونی، سویه‌های اشریشیاکلی پاتوژن از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردارند و مهم‌ترین عامل ایجاد اسهال در گوساله‌ها و بره‌ها خصوصاً در روزهای اول زندگی می‌باشند (۶). مطالعات زیادی در ارتباط با این عفونت انجام گرفته است که اهمیت موضوع را نشان می‌دهد، اما تاکنون در زمینه میزان شیوع و تعیین هویت مولکولی فاکتورهای حدت سویه‌های پاتوژن اشریشیاکلی پاتوژن (ETEC، EHEC و EPEC) با بکارگیری تکنیک Multiplex PCR از نمونه مستقیم سواب رکتوم (بدون از دست دادن باکتری در کشت‌های متعدد) در ایران مطالعه‌ای صورت نگرفته است، لذا در این مطالعه در کنار روش‌های معمول با بکارگیری روش Multiplex PCR و همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، عوامل بیماری‌زای اشریشیاکلی (K۹۹، F۴۱، Sta، Stx۱، Stx۲، Aggr، Eae و Bfpb) بررسی گردید.

برای کامل کردن این پژوهش پیشنهاد می‌شود نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی گسترده‌تر انتخاب گردد، تعداد بیشتری از نمونه‌ها جهت مطالعه بررسی شود، کارایی روش مولکولی در شناسایی عوامل بیماری‌زایی برای تشخیص سویه‌های EHEC، ETEC و EPEC به طور مستقیم در مدفوع بررسی شود، حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی پاتوژن به‌دست آمده از گوساله‌ها و بره‌های مبتلا به اسهال مقایسه و بررسی گردد، باکتری‌های جدا شده به روش مولکولی مورد بررسی قرار گیرد تا در مرحله بعد بتوان با استفاده از سویه‌هایی که در آن‌ها فیمبریه به خوبی تظاهر می‌نماید واکسن مناسبی تهیه نمود. همچنین بیماری‌زایی باکتری‌های جدا شده با الگوهای مولکولی متفاوت در حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات ذکر شده از دیگر مناطق جغرافیایی می‌توان نتیجه گرفت که میزان شیوع عفونت با سه سویه EHEC، ETEC و EPEC در مناطق مختلف جهان متفاوت می‌باشد، که بخشی از این تفاوت‌ها می‌تواند مرتبط با عواملی نظیر عوامل مدیریتی، سن گوساله‌های مورد مطالعه، زمان دریافت آغوز، حجم و کیفیت آن، و واکسیناسیون مادران باردار و همچنین استفاده از تکنیک‌های متفاوت در مطالعات باشد. اما با توجه به بالا بودن نسبی فراوانی آلودگی‌های ETEC و EHEC در این منطقه، مراقبت‌های بهداشتی ضرورت بیشتری ایجاد می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان بخش بیولوژی مولکولی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز کمال تشکر و امتنان را دارند. این مقاله با حمایت پروژه موسسه رازی با شماره مصوب ۹۱۱۳-۱۸-۸۴-۲ انجام شده است.

منابع مورد استفاده

1.Pourtaghi-Shotorban H., Dahpahlevan V., Shaghayegh A. and Badiee A.(2011).Molecular detection of diarrhea genicentrotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from calves fecal samples in Alborzprovince. *Journal of veterinary clinical research*.Vol, 2, NO,1. pp: 33-38. (In persian)

2.Kiani, Y., Tahamtan, Y., Hoseini, M.H and Hayati,M.(2011). An assessment for comparing virulent factors of enterotoxigenicE.coli k99 isolates by PCR and SDS- PAGE methods. *Journal of Microbial World*. Vol, 3, No,4. pp:238-244.

3.Lotfollahzadeh, S.,Ziaei Daroonkolai, N., ZahraeiSalehi, T., Poorbakhsh, S.A., MokhberDezfouli, M.R and Afshari, GH.R.(2004).A study on the Presence of *Escherichia coli* ,coccidia and cryptosporidium in stool samples of under one month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic Sensitivity Of Isolates. *J. Fac. Vet. Med. Univ.Tehran.*Vol,59. NO,2. pp:131-136.

4.Boyce,T., Swerdlow,D.Land Griffin, P.M.(1995). *Escherichia coli* O157: H7 and the Hemolytic- Uremic Syndrome. *The New England Journal of Medicin,* Vol, 333, No,6. pp: 364-368.

5.Chen, X., Gao, S., Jiao, X and Liu, X.(2004). Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Veterinary Microbiology*, Vol, 103, pp: 13-20.

6. Christopher, M.J., Bhaskaran, S., Rathore, K.S and Waghela, S.(2004). Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Veterinary Microbiology*, Vol,101, No,2. pp: 153-160.

7.Dastmalchi ,H. and Ayremlou, N.(2012). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in feces of healthy and diarrheic calves in Urmia region, *Iran.I. J. M*,Vol, 4, No,2. pp: 63-69.

8.Guler, L., Gunduz, K. and Ok, U.(2008). Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherihia coli* isolated from calvesin Turky. *Zoonoses and Public Health*,Vol, 55, No,5. pp: 249-257.

9.Kim, H., Samadpour, M., Grimm, L., Clausen, C.R., Besser, T.E., Baylor, M., and et al.(1994).Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7in Washington State, 1984-1991.The *Journal of Infectious Diseases*,Vol, 170, No,6. pp:1606-1609.

10. Kim,Y.J., Kim,J.H., Hur, J andLee,J.H.(2010). Isolation of *Escherichia coli* from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes.*The Canadian Journal of Veterinary Research,*Vol, 74,No,1. pp:59–64 .

11.Naciri, M., Lefay, M., Mancassola, R., Poirier, P and Chermette, R.(1999). Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Veterinary Parasitology*, Vol, 85, No,5.pp: 245-257.

12.Nagy, B., Moon, H. WandIsaacson, R.E.(1977).Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli* selection of piliated forms invivo, adhesion of piliated forms to epithelial

www.SID.ir

Archive of SID

cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcineenteropathogenic *E. coli. Infect Immun* ,Vol, 16, No,1. pp: 344-352.

13.Nataro, J.P and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli. Clinical Microbiology Review,*Vol, 11,No,1. pp: 142-201.

14.Nguyen, T.D., Thanh Vo2, T and Khac, H.V.(2011). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci,* Vol, 12,No,2. pp:159-164.

15.Novotna, R., Alexa, P., Hamrik, J., Madanat, A., Smola, J. and Cizek,A.(2005). Isolation and characterization Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157:H7. *Vet. Med. – Czech,* Vol, 50,No, 3. pp: 111–118.

16. Ok, M., Guler ,L., Turgut, K., Ok, U., Sen, I., Gunduz, K., Birdane, M. F and Guzelbektes, H.(2008). The studies on the Aetiology of Diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* Strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health,*Vol, 56,No,2 .pp: 94-101.

17. Phan, Q and Mshar, P.(2003). Escherichia coliO157:H7 Gastroenteritis- Conecticut. Conecticut Dipartment of Public Health, Vol, 23,No, 2. pp: 5-8.

18. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G and et al .(1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med ,Vol, 308,No,12 . pp:681-685.

19.Schoonderwoerd, M., Clarke, R.C., Dreume, A.A and Rawluk, S.A.(1988). Colitis in calvesnatural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111.NM. *Can. J .Vet. Res*, Vol, 52, No,4. pp: 484-487.

20.Shabana, I.I. (2014). *Escherichia coli* Pathotypes Associated With Diarrhea in Human and Domestic Animals. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences,* Vol, 9, No, 3. pp: 155-161.

21.Shams, Z., Tahamtan, Y., Pourbakhsh, A., Hosseiny, M.H., Kargar, M. and Hayati,M.(2012). Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comp Clin Pathol*,Vol, 21, pp:475–478.

22. Sunderland, S., Sarasola, P., Giles, C.G and Smith, D.G.(2003). Efficacy of danofloxacin 18% injectable solution in the treatment of *Escherichia coli* diarrhoea in young calves in Europe. *Research in Veterinary Science*,Vol, 74, No,2. pp: 171-178.

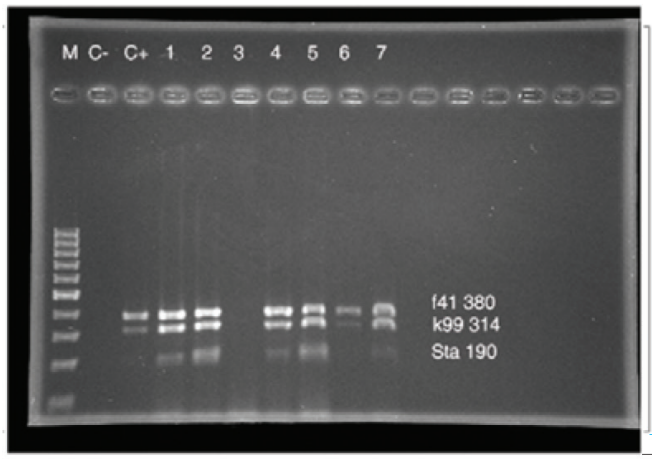
23.Verma, Sh., Kumar, M., Kashyap, S.,Singh,M and Venkatesh,V.(2013). Current Scenario Of *Escherichia coli* And Its Serotype"o157" In Indian Subcontinent. *IJIRSET,*Vol, 2, Issue 7,ISSN: 2319-8753.

24.Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Nishikawa,YandBuchh, 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. *Letters in Applied Microbiology* ,Vol, 37,NO, 2. pp: 121–126.

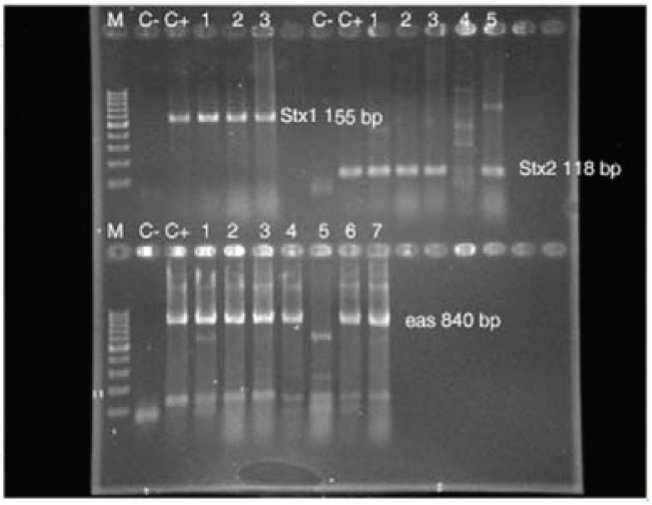
25.Wani, S.A., Hussain, I., Beg, S.A., Rather, M.A., Kabli, Z.A. Mir, M.A and Nishikawa,Y. (2013). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and salmonellae in calves and lambs in Kashmir.absence, prevalence and antibiogram. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*,Vol,32, No,3.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نتایج Multiplex PCR و تشکیل باندهای (190bp) *STa*، (۳۱۴bp *K99*)، (۳۸۰ bp) *F41*،(نمونه ها:۷-۱)، نمونه ۶ دارای هر دو فاکتور *K99* و *F41* می‌باشد، نمونه‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و۷ دارای هر سه فاکتور *K99*،*F41* و *Sta* می باشند.نمونه ۳ برای هر سه فاکتور منفی می باشد.



شکل ۲- نتایج Single PCR برای سه فاکتور*Stx1*:555bp،(*Stx2*:118bp 840bp) *eae*:, M: مارکر،-C: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت، خطوط ۳-۱: نمونه‌های *Stx1* مثبت، خطوط ۵-۱ سری دوم نمونه‌های *Stx2* مثبت و خطوط ۷-۱ پائین نمونه‌های *eae* مثبت (فقط PCR مربوط به تعدادی از آنها به‌عنوان نمونه آورده شده است).

www.SID.ir