بررسی میزان شیوع ژن‌های مولد شیگاتوکسین (stx1, stx2) در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بره‌های نژاد سنگسری مبتلا به عفونت دستگاه گوارشی در منطقه سمنان با استفاده از تکنیک Multiplex – PCR

حمید استاجی*(DVM, Ph.D)، محمدرضا سلیمی بجستانی (DVM, Ph.D)، عماد چنگیزی (DVM, Ph.D)، عباس جواهری وایقان (DVM, Ph.D)

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سویه‌های اشریشیاکلی مولد شیگاتوکسین اجرام بیماری‌زایی هستند که با ایجاد مانند کولیت خون‌ریزی‌دهنده و سندروم همولیتیک اورمیک در انسان در ارتباط‌اند و شیگاتوکسین‌ها (stx1, stx2) از مهم‌ترین عوامل حدت این سویه‌ها می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه بررسی شیوع و انتشار ژن‌های stx1 و stx2 در سویه‌های E. coli جدا شده از بره‌های نژاد سنگسری واقع در اطراف شهر سمنان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طی یک دوره سه ماهه در بهار سال ۱۳۹۳، تعداد ۱۶۰ نمونه به‌صورت سوآب مقعدی از بره‌های مبتلا به سندروم اسهال گرفته شده و از لحاظ کشت و بیوشیمیایی جهت جداسازی باکتری اشریشیاکلی به‌عنوان عامل ایجاد عفونت بررسی شده و سپس سویه‌های E. coli جداسازی شده به‌واسطه روش Multiplex-PCR جهت ردیابی ژن‌های stx بررسی شدند.

یافته‌ها: از تعداد ۱۶۰ نمونه مورد بررسی، تعداد ۵۱ سویه E. coli به‌عنوان عامل ایجاد اسهال در بره‌ها جداسازی شدند. از میان ۵۱ جدایه تعداد دوازده (۲۴٪) سویه دارای حداقل یکی از انواع stx بودند و به‌عنوان STEC تشخیص داده شدند. در میان این ۱۲ سویه، پنج (۱۰٪) سویه حامل ژن stx1، چهار (۸٪) سویه حامل ژن stx2 و تعداد سه (۶٪) سویه حامل هر دو واریته stx بودند.

نتیجه‌گیری: تناوب حضور ژن‌های stx1 و stx2 در حیوانات و ارتباط آن‌ها با ایجاد بیماری در انسان در ایران به‌خوبی مشخص نشده است. به‌دلیل مصرف بالای گوشت گوسفند و به‌خصوص پرورش گوسفندان نژاد سنگسری در منطقه اطراف سمنان و حضور سویه‌های STEC در بره‌های مبتلا به سندروم اسهال به میزان ۲۴٪ در نمونه‌های مدفوع دام‌های مورد مطالعه، بررسی دقیق‌تر و جامعی در این رابطه جهت شناسایی دقیق‌تر میزان انتشار سویه‌های مولد شیگاتوکسین در دام‌های فوق‌الذکر، کنترل و پیشگیری از انتشار مستقیم و غیرمستقیم این عامل مشترک بین انسان و دام و مخاطره‌آمیز مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک، شیگاتوکسین ۱، شیگاتوکسیین، اسهال گوسفند، سمنان

مقدمه

سویه‌های تولیدکننده سم شیگا در باکتری اشریشیاکلی (STEC)، یک گروه بسیار مهم از پاتوژن‌های مشترک و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۲۱۵

Email: hstaji@semnan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

زئونوز بین انسان و حیوان را شامل می‌شوند که طیف وسیعی از علایم بالینی از قبیل اسهال غیر خونی و خونی، کولیت خون‌ریزی‌دهنده (HC) و سندرم همولیتیک – اورمیک (HUS) را در انسان ایجاد می‌نمایند [۴-۱].

با وجود این‌که در میان سویه‌های مختلف STEC، اعضاء سروتیپ O157:H7 از لحاظ اپیدمیولوژیک در ایجاد مشکلات بهداشتی ذکر شده، بسیار پراهمیت در نظر گرفته می‌شوند، اما نمی‌توان نقش سویه‌های غیر O157 را در این مورد نادیده گرفته و کم‌اهمیت پنداشت، چنان‌که موارد زیادی از ابتلاء و عفونت انسانی در مناطق جغرافیایی مختلف به آن‌ها نسبت داده شده است [۷-۵]. سویه‌های موجود در گروه STECاز لحاظ سرولوژیک بسیار متنوع بوده و بیش از ۲۰۰ سروتیپ در این گروه شناسایی شده‌اند که از این میان بیش از ۱۰۰ مورد از آنان با عفونت‌های انسانی در ارتباط‌اند [۸].

چندین عامل حدت با ایجاد بیماری توسط STEC در ارتباط هستند. مهم‌ترین عامل حدت در این رابطه، تولید شیگاتوکسین (stx) می‌باشد که از ساخت پروتئین‌ها در سلول‌های میزبان ممانعت نموده و منجر به مرگ سلولی می‌شود. سویه‌های مختلف STEC توانایی تولید یک یا تعداد بیش‌تری از شیگاتوکسین‌ها مانند Stx1، Stx2 و یا انواع مختلف آن‌ها را دارند. Stx1، stx2 و واریانت‌های آن‌ها بسیار نامتجانس بوده و از لحاظ واکنش‌های سرم‌شناسی فاقد واکنش متقاطع می‌باشند. شیگاتوکسین ۱ از لحاظ ساختاری و بیوشیمیایی کاملاً مشابه شیگاتوکسین تولید شده توسط باکتری شیگلا دیسانتریه تیپ ۱ بوده در حالی‌که شیگاتوکسین ۲ فقط حدود ۵۶٪ شباهت با شیگاتوکسین ۱ دارد [۹].

سویه‌های مختلف STEC در دستگاه گوارشی میزبان‌های مختلفی از قبیل نشخوارکنندگان، سگ، گربه، شتر و حتی پرندگان حضور دارند اما گوسفند و گاو به‌عنوان مخازن اصلی این باکتری‌ها جهت انتشار در محیط و به سایر میزبان‌ها مطرح می‌باشند [۱۱،۱۰]. انتقال اشریشیاکلی مولد شیگاتوکسین به انسان عمدتاً از طریق مصرف گوشت ناپخته که در کشتارگاه به‌واسطه تماس با مدفوع یا محتویات احشایی دام‌ها آلوده شده و یا شیر خام و حتی تماس مستقیم اشخاص با حیوانات حامل و آلوده صورت می‌گیرد [۱۲-۱۴].

با توجه به این‌که در منطقه سمنان دامپروری و به‌خصوص پرورش گوسفندان نژاد سنگسری به منظور تامین گوشت مصرفی توسط شهروندان ساکن سمنان و سایر نقاط کشور رونق بسیار بالایی دارد، در این مطالعه بر آن شدیم که میزان شیوع ژن‌های مولد شیگاتوکسین را در سویه‌های E. coli جداشده از موارد اسهال بره‌های پرواری منطقه به‌عنوان یکی از عوامل بالقوه در انتقال عفونت به انسان به‌خصوص افراد دامدار مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت. در طی یک دوره سه ماهه در فصل بهار سال ۹۳، تعداد ۱۶۰ نمونه مدفوعی از بره‌های مبتلا به سندروم اسهال جمع‌آوری شده و در جوار یخ سریعاً به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه سمنان منتقل شده و سپس طبق پروتکل ارائه شده توسط Alonso و همکاران (۱۹۹۱)، جستجوی باکتری E. coli در آن‌ها به‌عنوان عامل بیماری‌زا انجام گرفت به این صورت که ابتدا سواپ مربوط به هر کدام از نمونه‌های مدفوع در محیط mFC (Membrane Fecal Coliforms) (Sigma-Aldrich) کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴/۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس پرگنه‌های تک ایجاد شده مجدداً در محیط mFC کشت و در دمای ۴۴/۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد از کلونی‌های تک ایجاد شده به‌طور هم‌زمان در محیط‌های Mac Conkey (Oxoid) و ECC (E. coli/Coliform selective agar) (CHROMagar) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری می‌شدند و کلونی‌های صورتی رنگ لاکتوز مثبت در محیط مک کانکی و آبی رنگ ایجاد شده در محیط ECC به‌عنوان پرگنه‌های مشکوک به E. coli جهت انجام سایر تست‌های بیوشیمیایی و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

تاییدکننده E. coli انتخاب می‌شدند به این ترتیب که نهایتاً پرگنه‌های رشدیافته به محیط‌های Eosin Methylene Blue (EMB) ساخت شرکت Sigma-Aldrich منتقل شده و پس از گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، پرگنه‌های با جلای فلزی سبز متالیک جهت انجام سایر تست‌های بیوشیمیایی تفریقی از قبیل تولید گاز اندول، واکنش متیل رد، وژس پروسکائر و سیمون سیترات انتخاب شده و سویه‌های اشریشیاکلی از لحاظ بیوشیمیایی تشخیص داده می‌شدند [۱۵].

در مرحله بعد جهت تشخیص سویه‌های Enterohemorrhagic E. coli (EHEC)، از میان سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از مرحله اول، یک کلونی از باکتری E. coli تشخیص داده در مرحله اول در درون ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Modified Tryptic Soy Broth (mTSB) محصول شرکت Sigma-Aldrich به‌صورت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس یک لوپ از سوسپانسیون فوق (۰/۱ میلی‌لیتر) در محیط Cefexime-Tellurite supplemented sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC-CT) ساخت شرکت Biokar فرانسه کشت شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شدند. در مرحله بعد تعداد ۵-۶ پرگنه سوربیتول منفی از این محیط مجدداً در محیط SMAC فاقد آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم و تلوریت کشت شده و سویه‌های تایید شده از لحاظ بیوشیمیایی به‌صورت تعلیق هم‌راه گلیسرول در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌شدند [۲۰]. با توجه به این‌که فقط ۵ سویه از E. coliهای بیماری‌زای جداسازی شده خصوصیات سوربیتول منفی و مقاومت به نوبیوسین را از خود نشان دادند و مطابق مطالعات انجام شده سویه‌های EHEC سوربیتول مثبت و حساس به نوبیوسین نیز وجود دارند [۲۲،۲۱]، لذا در این مطالعه تمامی ۵۱ سویه جداسازی شده از موارد اسهال بره‌ها از لحاظ مولکولی به منظور ردیابی ژن‌های مولد شیگاتوکسین مورد مطالعه قرار گرفتند.

استخراج اسیدهای نوکلئیک. جهت استخراج DNA از جدایه‌های ذخیره شده E. coli، ابتدا نمونه‌ها از یخچال خارج شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط لوریا برتانی آگار (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت می‌شدند. سپس از پرگنه‌های رشد یافته برداشت کرده و به میکروتیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم نرمال افزوده می‌شد تا شیرابه‌ای یک‌نواخت به‌دست آید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر تریس (حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl, pH=8.0) به سوسپانسیون فوق اضافه می‌گردید تا عمل هضم باکتری‌ها توسط سود متوقف شده و محلولی با pH نهایی ۷/۵ تهیه شود. بلافاصله با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مجموعه حجم محلول به ۵۰۰ میکرولیتر رسیده و رقت نهایی از عصاره DNA جهت انجام آزمون PCR تهیه گردید [۱۶].

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن های stx1 و stx2 در سویه های اشریشیاکلی جداسازی شده از موارد اسهال بره‌ها

نام پرایمر	توالی ′۵→′۳	دمای ذوب پرایمر	ژن هدف	اندازه محصول
Stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	۵۹	Stx1	۱۸۰ bp
Stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	۶۱		
Stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	۶۳	Stx2	۲۵۵ bp
Stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	۶۰		

انجام آزمون Multiplex-PCR جهت ردیابی ژن‌های stx1 و stx2 . پس از انجام مراحل استخراج DNA از سوش‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه مطابق پروتکل ارائه شده توسط Paton & Paton (2002) با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی ژن‌های Stx1 و stx2 ، درون دستگاه ترموسایکلر (Techne,UK) انجام پذیرفت [۳]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

برای قرائت نتایج PCR چندگانه، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. شاهد مثبت (سویه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

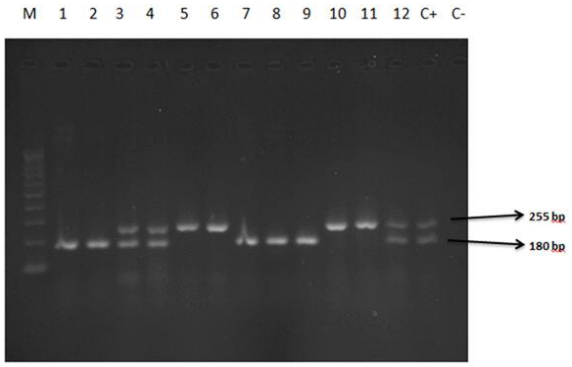
اشریشیاکلی ATCC 35218) و منفی (آب مقطر) در تمام واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت. به‌علاوه صحت نتایج PCR با استفاده از سوش فاقد stx از لحاظ وجود باندهای غیر اختصاصی کنترل گردید. در گوده اول ژل نیز مارکر bp-plus100 استفاده شد (شکل ۱). برای رنگ‌آمیزی ژل از رنگ Ethidium Bromide استفاده شده و زیر دستگاه UV illuminator (Vilber lourmat-voo) 6612 نتایج بررسی شد.

نتایج

از میان ۱۶۰ نمونه مدفوعی اخذ شده از بره‌های مبتلا به سندروم اسهال مطابق پروتکل کشت و جداسازی ذکر شده در بخش مواد و روش کار، در مرحله اول مطابق با پروتکل Alonso و همکاران [۱۵]، تعداد ۵۱ مورد (۳۱/۸۷٪) باکتری اشریشیاکلی جداسازی شده و این گونه به عنوان عامل ایجاد بیماری و عفونت در بره‌های مورد مطالعه تشخیص داده شد.

در مرحله بعد از لحاظ بیوشیمیایی ردیابی سویه‌های EHEC بر اساس پروتکل Tahamtan و همکاران (۲۰۱۰) صورت پذیرفت که از این میان تعداد ۵ جدایه به‌عنوان پرگنه‌های سوربیتول منفی در محیط CT-SMAC و مقاوم به آنتی‌بیوتیک نوبیوسین در محیط mTSB تشخیص داده شدند و مابقی به‌عنوان سویه‌های سوربیتول مثبت و حساس به نوبیوسین تشخیص داده شده و با توجه به این‌که محیط‌های CT-SMAC و mTSB عموماً جهت ردیابی سروتیپ O157 باکتری E. coli استفاده می‌شوند و سویه‌های غیر O157 نیز توانایی رشد و ایجاد خصوصیات O157 را دارا هستند، لذا تمامی ۵۱ سویه جداسازی شده از موارد اسهال بره‌ها جهت ردیابی مولکولی ژن‌های مولد stx مورد مطالعه قرار گرفتند.

در مرحله بعد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه جهت ردیابی ژن‌های stx1 و stx2 بر روی جدایه‌های E. coli انجام شده و از میان ۵۱ جدایه، تعداد ۱۲ جدایه (۲۴٪) دارای حداقل یکی از واریته‌های ژن مولد سم شیگا بوده و به‌عنوان اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک تشخیص داده شده و تعداد ۳۹ جدایه (۷۶٪) به‌عنوان اشریشیاکلی غیر توکسیژنیک تشخیص داده شدند. از میان ۱۲ سویه اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک، تعداد ۵ جدایه (۱۰٪) حامل ژن stx1، ۴ جدایه (۸٪) حامل ژن stx2 و نهایتاً ۳ جدایه (۶٪) حامل هر دو واریته stx1 و stx2 بودند. قابل ذکر است که هر سه مورد سویه حامل هر دو ژن stx1 و stx2 و هم‌چنین دو عدد از سویه‌های حامل ژن stx2 جزء ۵ سویه‌ای بودند که در مرحله کشت و جداسازی در محیط‌های CT-SMAC و mTSB خصوصیات عدم استفاده از سوربیتول و مقاومت نسبت به نوبیوسین را نشان داده بودند.



شکل ۱. پراکندگی ژن‌های stx1 و stx2 در سویه‌های STEC جدا شده از موارد اسهال بره‌ها. M مارکر، ۱۲ – ۱ نمونه‌های STEC مورد بررسی، C+ شاهد مثبت و C- شاهد منفی

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری گونه اشریشیاکلی به‌عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات خون‌گرم مطرح بوده و برخی از سویه‌های این گونه دارای عوامل حدتی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد در برخی میزبان‌ها به‌ویژه انسان ایجاد عفونت دستگاه گوارش مانند اسهال و عفونت‌های خارج روده‌ای از قبیل منتژیت، سندروم همولیتیک– اورمیک و غیره را نموده و از این گروه می‌توان به سویه‌های شیگاتوکسیژنیک (STEC) اشاره نمود که حامل ژن‌های مولد سم شیگا بوده و این سم یاخته‌های اپیتلیال پرزهای بخش ایلئوم دستگاه گوارش را مورد تهاجم قرار می‌دهد. اعضاء خانواده سم شیگا، سمومی ترکیبی هستند که از یک بخش کاتالیتیک تحت واحد A و یک تحت واحد B چندگانه (Multimeric) تشکیل شده که

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

این تحت واحد B در اتصال سم به گیرنده‌های خاص گلیکولیپیدی یاخته‌های هدف نقش دارد [۱۸،۱۷].

گرچه روش استاندارد طلایی (Gold Standard) تشخیص سویه‌های STEC و توانایی تولید سم شیگا توسط آن‌ها، استفاده از کشت سلول‌های Vero و سنجش سمیت سلولی برای این تیره سلولی می‌باشد، اما با توجه به اهمیت بالینی بالای سویه‌های مولد سم شیگا، استفاده از روش‌های تشخیصی سریع و با حساسیت و ویژگی بالا بسیار پراهمیت بوده و روش آزمایشگاهی PCR واجد خصوصیات فوق به‌خصوص حساسیت و ویژگی بالا می‌باشد. روش PCR و به‌خصوص Multiplex-PCR در تشخیص سویه‌های STEC از نمونه‌های بالینی به‌ویژه نمونه‌هایی که از لحاظ میکروب‌شناسی کمپلکس بوده و یا حاوی باکتری‌های مرده هستند بیش‌تر کاربرد داشته و این روش برای تشخیص سویه‌های مولد سم شیگا، اصلاح شده و به‌طور وسیعی از آن برای این منظور استفاده می‌شود [۱۷،۱۱].

در میان واریته‌های stx1 و stx2 سم شیگا، نوع stx2 به‌عنوان مهم‌ترین عامل حدت در ایجاد بیماری در انسان مطرح می‌باشد. این سم برای موش آزمایشگاهی ۴۰۰ برابر سمی‌تر و کشنده‌تر از نوع stx1 بوده و هم‌چنین در موش ضایعاتی از قبیل جذب جفت و جنین، هماتومای داخل رحمی، تجمع فیبرین و نفوذ نوتروفیل‌ها به داخل فضای رحم را القاء می‌نماید. سم stx2 از لحاظ توالی اسیدهای آمینه حدود ۵۵٪ شباهت با نوع stx1 دارد [۹].

میزان شیوع ژن‌های مولد سم شیگا در باکتری‌های اشریشیاکلی موجود در دستگاه گوارش حیوانات و ارتباط آن با ایجاد بیماری انسان در ایران به خوبی و به‌صورت جامع مشخص نشده است. بیش‌تر مطالعات اپیدمیولوژیک در رابطه با شیوع عفونت‌های STEC در انسان نشان داده است که میزان شیوع این عفونت‌ها در بازه ۱۵-۰/۷٪ می‌باشد [۲۰،۲۲-۲۷]. با توجه به این‌که حیوانات و به‌ویژه نشخوارکنندگان اهمیت بالایی در انتقال سویه‌های STEC داشته و هم‌چنین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حاملین این گروه از پاتوژن‌ها مطرح می‌باشند، مطالعاتی در جهت تعیین میزان شیوع این باکتری‌ها در نشخوارکنندگان انجام شده است. زهرایی صالحی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای که بروی جدایه‌های اشریشیاکلی از گاو انجام دادند دریافتند که حدود ۸٪ جدایه‌ها حامل ژن‌های stx بوده و از این میان حدود ۵٪ به سروتیپ O157 تعلق داشته و مابقی به سروتیپ‌های غیر O157 تعلق داشتند که مسئوول موارد انفرادی بیماری HUS در انسان می‌باشند و شیوع واریته stx2 در میان آن‌ها بیش از stx1 بوده و این یافته با نتایج جمعه‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ که نشان دادند عمده سویه‌های جداشده از موارد انسانی حامل stx2 هستند هم‌خوانی دارد [۲۴،۱۲]. عسگری و همکاران در سال ۲۰۰۹ در تحقیقی که بر روی شیوع واریته‌های ژن‌های مولد شیگاتوکسین در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از گوساله‌ها انجام دادند نشان دادند که میزان شیوع stx1 حدود ۵٪ و نوع stx2 حدود ۲٪ می‌باشد که نتایج آن با نتایج اخذ شده در این مطالعه و مطالعات جمعه‌زاده و زهرایی صالحی هم‌خوانی نداشته و نشان‌دهنده تفاوت شیوع این ژن‌ها در مناطق مختلف و میزبان‌های متفاوت می‌باشد [۲۷،۲۶].

در مطالعات مختلف صورت گرفته مشخص شده است که عمدتاً واریته stx2 مسئول ایجاد HUS در انسان می‌باشد و در برخی موارد بیش از ۷۰٪ موارد عفونت انسانی توسط سویه‌های مولد stx2 ایجاد شده و حتی گزارشاتی مبنی بر شیوع ۱۰۰٪ این واریته از شیگاتوکسین در موارد عفونت انسانی وجود دارد [۲۹،۲۸] و با توجه به این‌که میزان شیوع واریته stx2 در سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از بره‌های نژاد سنگسری ۱۴٪ می‌باشد، لذا این گروه از نشخوارکنندگان به‌عنوان یکی از منابع بالقوه در انتقال این عفونت‌ها به انسان‌ها و به‌ویژه ساکنین منطقه مطرح هستند.

Slutsker و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که میزان شیوع سویه‌های STEC در نمونه‌های مدفوع افراد مبتلا به اسهال ۰/۳ تا ۹/۳٪ بوده و در استرالیا سروتیپ O111

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

به‌عنوان یکی از اعضاء STEC شایع‌ترین عامل بیماری و شیوع عفونت‌ها در انسان بوده است [۲۹].

با وجود این‌که مصرف گوشت ناپخته مهم‌ترین راه انتقال STEC به انسان می‌باشد اما ارتباط مستقیم با دام‌های آلوده نیز به‌طور مستقیم با انتقال این عامل به انسان و به‌ویژه افراد دامدار در ارتباط است [۳۰-۳۲]. هم‌چنین با توجه به این‌که شیوع ژن‌های stx فقط مختص سروتیپ‌هایی از قبیل O157 باکتری اشریشیاکلی نمی‌باشد لذا توصیه می‌شود آزمایشگاه‌های تشخیصی از تکنیک‌های مستقل از تعیین سروتیپ، مانند روش ردیابی stx بر اساس PCR در موارد شیوع گاستروآنتریت‌های انسانی برای تشخیص هرچه سریع‌تر این عوامل استفاده نمایند [۳۳].

در مطالعات انجام شده توسط Keen و همکاران (۲۰۰۲) و هم‌چنین Ludwig و همکاران (۲۰۰۱) مشخص شده است که ژن‌های مولد شیگاتوکسین در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از حیوانات نسبت به سویه‌های جدا شده از انسان، بیش‌تر در شرایط آزمایشگاه بیان شده و یا به عبارتی بیش‌تر خاصیت سایتوتوکسیک دارند و این امر می‌تواند خطر بیش‌تر و اهمیت بیش‌تر سویه‌های حیوانی منتقله به انسان را توجیه نماید و نظریه مخزن بودن نشخوارکنندگان برای موارد انسانی HUS را قوت می‌بخشد [۳۴،۲۸].

تحقیقاتی که بر روی دفع فصلی سویه‌های STEC و میزان شیوع ژن‌های stx در آن‌ها انجام پذیرفته نشان می‌دهند که تفاوت معنی‌داری در انتشار فصلی این سویه‌ها وجود داشته و میزان انتشار ژن‌های stx درباره ۴۰-۹٪ قرار دارد به این ترتیب که شمار باکتری‌های حامل این ژن‌ها در فصل زمستان در بیش‌ترین میزان خود قرار داشته و این نتایج با یافته‌های مطالعاتی که نشان‌دهنده تفاوت در دفع فصلی سویه‌های STEC توسط نشخوارکنندگان است هم‌خوانی دارد [۳۵-۳۷] و این که در ایران از ابتدای زمستان تا اواخر بهار در بیش‌ترین میزان خود می‌باشد و این دوره زمانی با بیش‌ترین موارد عفونت‌های انسانی با باکتری اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک هماهنگ می‌باشد [۳۸].

در مطالعه حاضر پس از جداسازی سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی از موارد اسهال بره‌ها، سعی بر آن بود که از لحاظ بیوشیمیایی جدایه‌های EHEC مطابق با پروتکل Tahamtan و همکاران (۲۰۱۰) تشخیص داده شوند، اما فقط تعداد کمی از سویه‌ها (پنج سویه) خصوصیاتی از قبیل سوربیتول منفی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک نووبیوسین را از خود نشان دادند و با توجه به این‌که هدف از انجام این پژوهش بررسی شیوع ژن‌های stx1 و stx2 در سویه‌های مسبب اسهال در بره‌های سنگسری می‌باشد، لذا تمامی ۵۱ سویه جداسازی شده از موارد اسهال بره‌های سنگسری از لحاظ حضور ژن‌های مورد بحث بررسی شدند.

جهت تشخیص و بررسی دقیق اپیدمیولوژیک این قبیل عفونت‌ها در منطقه، بایستی سویه‌های STEC جدا شده از موارد بالینی انسانی را از لحاظ پروفایل ژنتیکی با سویه‌های جدا شده از سایر منابع و به‌ویژه موارد اسهال بره‌ها و سایر نشخوارکنندگان منطقه، مورد مقایسه و ارزیابی قرار داده تا بتوان درک بهتر و دقیق‌تری از چهره همه‌گیرشناسی و نقش گوسفندان نژاد سنگسری در گسترش این قبیل عفونت‌ها در منطقه سمنان به‌دست آورد و هم‌چنین بررسی پروفایل ژنتیکی سویه‌های STEC جدا شده از موارد انسانی در منطقه و تعیین نوع stx و تحت تیپ‌های آن‌ها و مقایسه آن با موارد جداسازی شده از عفونت‌های انسانی، در تشخیص منابع آلودگی میزان ارتباط موارد دامی و انسانی بسیار کمک‌کننده خواهد بود. هم‌چنین به‌دلیل آلوده شدن احتمالی لاشه‌ها در کشتارگاه به محتویات دستگاه گوارش، بررسی میزان آلودگی آن‌ها به STEC و مقایسه این سویه‌ها با سویه‌های جداشده از موارد انسانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیران محترم و کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جناب آقای ایرج اشرافی، جهت همکاری در اجرای بخش مولکولی این پژوهش تشکر و قدردانی می نماییم.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

منابع

[1] Feng P, Councell T, Keys Ch, Monday SR. Virulence Characterization of Shiga-Toxigenic Escherichia coli Isolates from Wholesale Produce. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 343-345.

[2] Franz E, Klerks MM, de Vos OJ, Termorshuizen AJ, Van Brugger AHC. Prevalence of STEC Stx1, Stx2, eae A and rfbE genes and survival of E. Coli O157:H7 in manure from organic and low input conventional dairy farms. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 2180-2190.

[3] Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of shiga toxigenic escherichia coli by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. J Clin Microbiol 2002; 40: 271-274.

[4] Dutta TK, Roychoudhury P, Bandyopadhyay S, Wani SA, Hussain I. Detection & characterization of Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC) & enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in poultry birds with diarrhoe. Indian J Med Res 2011; 133: 541-545.

[5] Adwan K, Abu-Hasan N, Essawi T, Bdir M. Isolation and characterisation of shiga toxigenic E. coli strains from northern Palestine. J Med Microbiol 2002; 51: 332-335.

[6] Wang H, Paton JC, Thorpe CM, Bonder CS, Sun WY, Paton AW. Tissue factor-dependent procoagulant activity of subtilase cytotoxin, a potent AB5 toxin produced by shiga toxigenic Escherichia coli. J Infect Dis 2010; 202: 1415-1423.

[7] Sahilah AM, Aishah HN, Noraida I. Azuhairi AA Detection of shiga toxin 1&2 (Stx1 & Stx2) genes in E. Coli O157:H7 isolated from retail beef in Malaysia by multiplex polymerase chain reaction. Sains Malaysia 2010; 39: 57-63.

[8] Rammurthy T. Shiga toxin producing escherichia coli (STEC): the bug in our backyard. Ind J Med Res 2008; 128: 233-236.

[9] Islam MA, Mondol AS, De Boer E, Beumer RR, Zwietering MH, Talukdar KA, Heuvelink AE. Prevalence and genetic characterization of shiga toxin producing Escherichia coli isolates from slaughtered animals in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 5414-5421.

[10] Hazarika RA, Singh DK, Kapoor KN, Agarwal RK, Pandey AB, Purusottam. Verotoxic escherichia coli (STEC) from beef and its product. Ind J exp Biol 2007; 45: 207-211.

[11] Jomezadeh N, Sheikh AF, Khosravi AD, Amin M. Detection of shiga toxin producing E. Coli strains isolated from stool samples of patients with diarrhea in Abadan hospitals. Iran J Biological Sci 2009; 9: 820-824.

[12] Rodolpho D, Marin JM. Isolation of shiga toxigenic escherichia coli from butcheries in taquaritinga city, state of sao Paulo, Brazil. Braz J Microbiol 2007; 38: 599-602.

[13] Naidu KG, Gaddad SM, Shivannavar CT, Goud RN, Neogi U, Saumya R. Prevalence and antibiotic sensitivity of shiga toxin producing escherichia coli in gulbarga region. India Trends Med Res 2007; 2: 149-154.

[14] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

[15] Alonso JL, Soriano A, Carbajo O, Amoros I, Garelick H. Comparison and recovery of Escherichia coli and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5 C. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3746-3749.

[16] Osmondsun TW, Eyre CA, Hayden KM, Dhillon J, Garbelotto MM. Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. Mol Ecol Resour 2013; 13: 66-74.

[17] Beutin L. Emerging enterohaemorrhagic Escherichia coli, causes and effects of the rise of a human pathogen. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006; 53: 299-305.

[18] Brett KN, Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. stx1c Is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing escherichia coli isolates from Sheep but not among isolates from cattle. J Clin Microbiol 2003; 926-936.

[19] Vicente HIG, Do Amaral LA, De Mello A, Cerqueira F. Shiga toxigenic Escherichia coli serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples of dairy farm. Braz J Microbiol 2005; 36: 217-222.

[20] Tahamtan Y, Hayati M, Namavari MM. Prevalence and distribution of the stx1, stx2 genes in Shiga toxin producing E. coli (STEC) isolates from cattle. Iranian J Microbio 2010; 2: 8-13.

[21] Muller EE, Ehlers MM. Biolog identification of non-sorbitol fermenting bacteria isolated on E. coli O157 selective CT-SMAC agar. Water SA 2005; 31: 247-251.

[22] Baylis CL. Growth of pure cultures of Verocytotoxin-producing Escherichia coli in a range of enrichment media. J Appl Microbiol 2008; 105: 1299-1265.

[23] Jamshidi A, Bassami MR, Rasooli M. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain reaction in Mashhad, northeastern Iran. Iran J Vet Res 2008; 9: 72-76.

[24] Zahraei Salehi T, Mahzounieh M, Asadian F, Khosravi M. Virulence genes in Escherichia coli isolates from calves in shahrekord area, Iran. 16th European congress of clinical microbiology and infectious disease, nice, France 2006.

[25] Shekarforoosh S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. Detection and frequency of stx2 gene in E.coli O157 and O157 strains isolated from sheep carcasses in Shreaz-Iran. Pakistan J Biomed Sci 2008; 11: 1085-1092.

[26] Sepehriseresht S, Zahraei Salehi T, Sattari M, Tadjbakhsh H, Aslani MM. Detection of shigatoxigenic Escherichia coli from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. Comparat Clin Pathol 2008; 3: 12-17.

[27] Askari Badouei M, Zahraei Salehi T, Rabbani Khorasgani M, Tadjbakhsh H, Nikbakht Brujeni G. Occurrence and characterization of enterohaemorrhagic Escherichia coli isolates from diarrheic calves. Comparat Clin Pathol 2009; 9: 201-205.

[28] Ludwig K, Karmali MA, Sarkim V, Bobrowski C, Petric M, Karch H, et al. Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 2001; 39: 2272–2279.

[29] Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 2003; 41: 4930-4940.

[30] Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM, et al. Escherichia coli O157:H7 diarrhea in the US: clinical and epidemiological features. Ann Intern Med 1997; 126: 505-513.

[31] Slutsker L, Ries AA, Maloney K, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, et al. A nationwide case-control study of E. coli O157:H7 infection in the United States. J Infect Dis 1998; 177: 962-966.

[32] Trevena WB, Willshaw GA, Cheasty T, Wray C. Associations between human infection with vero cytotoxin-

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

producing Escherichia coli O157:H7 and farm animal contact. In: Proceedings of the 3rd international symposium and workshop on Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli infections. 1997. abstract V28/I.

[33] Fey PD, Wickert RS, Rupp ME, Safranek TJ, Hinrichs SH. Prevalence of Non O157:H7 Shiga toxin-producing escherichia coli in diarrheal stool samples from nebraska. Emerg Infect Dis 2000; 6: 530-533.

[34] Keen EJ, Elder RO. Isolation of Shiga-toxigenic Escherichia coli O157 from hide surface and the oral cavity of finished beef feedlot cattle. JAMA 2002; 220: 756-763.

[35] Bonardi S, Maggi E, Bottarelli A, et al. Isolation of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. Vet Microbiol 1999; 67: 203-211.

[36] Aljaro CG, Muniesa M, Jofre J, Blanch AR. Prevalence of the stx2 gene in coliform populations from aquatic environments. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 3535-3540.

[37] Bonardi S, Maggi E, Pizzin G, Morabito S, Caprioli A. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. Int J Food Microbiol 2001; 66: 47-53.

[38] Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG. The prevalence of Escherichia coli O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. Epidemiol Infect 1994; 113: 199-207.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

Distribution of Escherichia coli Shiga toxin encoding genes (stx_1, stx_2) in Sangesari lambs suffering from diarrhea by Multiplex PCR technique

Hamid Staji (Ph.D)*, Mohammad Reza Salimi Bejestani (Ph.D), Emad Changizi (Ph.D), Abbas Javaheri Vayeghan (Ph.D)
Dept .of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

(Received: 8 Feb 2015; Accepted: 14 Jul 2015)

Introduction: Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains are human pathogens linked to hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Shiga toxins (Stx1 and Stx2) are the major virulent factors of these strains. The aim of this study was to investigate the prevalence and distribution of stx1 and stx2 gene in E. coli strains isolated from Sangesari lambs domesticated in Semnan suburb, Iran.

Materials and Methods: During a 3-monthes survey in 2014, 160 samples of recto-anal mucosal swabs were collected from lambs with diarrhea. They were examined for the E. coli in cultural medium and biochemical tests as the causative agent of gastrointestinal tract (GI) infection and investigated the presence of *stx1* and *stx2* genes by using multiplex-PCR.

***Results*:** Fifty one Escherichia coli strains were isolated from 160 fecal samples. Twelve of them were (24%) positive for at least one type of STX genes (STEC strain). Of the 12 STEC isolates, 5 (10%) harbored *stx1*, 4 (8%) *stx2*, and 3 (6%) carried both *stx1* and *stx2*.

Conclusion: The frequency of stx1 and stx2 distribution in Sangesari lambs and their relation to human GI diseases is not well understood yet. According to the popularity of lamb meat in Iran, specially breeding these animals in Semnan suburbs, it is warrant to consider precise regulations to restrict and prevent the prevalence of this life-threatening and foodborne diseases in Iran.

Keywords: Shigatoxigenic Escherichia coli, Shigatoxin 1, Shigatoxin 2, Sheep diarrhea, Semnan

* Corresponding author. Tel: +98 23 33654215
hstaji@semnan.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]