



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

• پریسا ارجمندپور

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان، واحد علوم تحقیقات

• یحیی تهمتن (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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

اسهال ناشی از سویه‌های پاتوژن (EPEC و ETEC، EHEC) در گوساله‌ها و بره‌ها به‌ویژه در نخستین روزهای پس از تولد، به علت تلفات و خسارات اقتصادی حاصله از اهمیت زیادی برخوردار است. در طی این تحقیق ۲۰۰ سوآب رکتوم از گوساله‌ها و بره‌های یک تا ۳۰ روزه مبتلا به اسهال در مدت یک سال (۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳) در شهرستان شیراز جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و آنوزین-متیلن‌بلو و مینکا کشت داد شد. در این مطالعه شیوع ژن‌های بیماری‌زای/شیریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (STa، F41، K99) /شیریشیا کلی انتروهموراژیک (Stx1، Stx2، eae) و/شیریشیا کلی انتروپاتوژنیک (bfpb و eae) با استفاده از تکنیک Multiplex PCR بررسی شد. نتایج نشان داد از ۱۳۳/شیریشیا کلی جدا شده ۱۲/۰۳ درصد دارای هر سه ژن بیماری‌زای ETEC و سه درصد دارای هر سه ژن بیماری‌زای EHEC می‌باشند. همچنین تعیین توالی ژن حدت K99 نشان داد که توالی نوکلئوتیدی آن‌ها، ۹۷ تا ۱۰۰ درصد با توالی‌های نوکلئوتیدی رفرنس‌های موجود در بانک ژنی شباهت 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، شیریشیا کلی‌های پاتوژن، PCR، فارس

• 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

داخل کشور و چه در سایر مناطق جهان منتشر شده است. سوبه‌های خاصی از اشربیشیا کلی مانند اشربیشیا کلی انتروتوکسیژن (ETEC) و اشربیشیا کلی تولید کننده وروتوکسین با ایجاد اسهال مرتبط هستند (۱). اما اثبات شده است که EPEC، ETEC و EHEC مهم‌ترین باکتری‌های ایجاد کننده اسهال هستند (۱۳). باکتری‌های این سه گروه واجد خصوصیتی هستند از قبیل قدرت بقا، تکثیر و فاکتورهای منحصر به فرد که مهم‌ترین نقش را در ایجاد بیماری ایفا می‌کنند. مهم‌ترین ویژگی باکتری‌های سوبه 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) را تولید نموده‌اند (۱۹).

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

مقدمه

اشربیشیا کلی، ارگانسیم متحرکی است که به سادگی بر روی محیط‌های کشت معمولی به خوبی رشد می‌کند. این باکتری هوازی و بی‌هوازی اختیاری است و بر روی محیط مک‌کانکی آگار کلنی‌های گرد، برجسته، صاف و صورتی ایجاد می‌کند. کلنی‌های آن با یک جلای فلزی بر روی آگار اتوزین متیلن بلو (EMB) و مثبت شدن تست اندول (تبدیل تریپتوفان به اندول) به سرعت تشخیص داده می‌شود، این باکتری‌ها لاکتوز مثبت می‌باشند و همچنین دارای پیلی هستند. اشربیشیا کلی 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 سیستم‌پروتیپ را تشکیل می‌دهند، شامل نوع اتصال باکتری به سلول میزبان، تأثیر اتصال روی سلول‌های میزبان، تولید توکسین و عوامل تهاجمی می‌باشند. یک ویروتیپ معمولاً بیش از یک گروه سرولوژی و سروتیپ دارد. بر این اساس پاتوتیپ‌های اشربیشیا کلی که ایجاد اسهال می‌کنند شامل اشربیشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC)، اشربیشیا کلی انتروپاتوژنیک (EPEC)، اشربیشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC)، اشربیشیا کلی انترواگری‌گیتو (EAggEC)، اشربیشیا کلی انترواینویسیو (EIEC) و اشربیشیا با چسبندگی پراکنده (DAEC) می‌باشند (۱۲).

گزارشات فراوانی در ارتباط با نقش عفونت روده‌ای به شکل اسهال توسط سوبه‌های پاتوژن اشربیشیا کلی به خصوص سوبه انتروتوکسیژنیک، انتروپاتوژنیک و انتروهموراژیک در گوساله و بره تازه متولد شده چه در

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 رنگ بری ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید و آب مقطر، با استفاده از اشعه فرابنفش و دستگاه ژل داگ مشاهده گردید.

نتایج

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

نتایج PCR نشان داد که از ۱۳۳ E.coli جداساده، 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 Stx1، ۱۶ جدایه (۱۲/۰۳ درصد) دارای فاکتور Stx2، ۱۸ جدایه (۱۳/۵۳ درصد) دارای فاکتور eae، هشت جدایه (۶/۰۱ درصد) دارای هر دو فاکتور Stx1 و Stx2 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 نمونه ها 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 نمونه ای یافت نشد. ضمناً در ۶۱ نمونه (۴۵/۸۶ درصد) باکتری مربوط به هیچ کدام از سه گروه فوق یافت نشد.

به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد میزان آلودگی بره ها به دو سویه ETEC و سویه EPEC صفر بوده و همچنین میزان آلودگی آن ها به سویه EHEC ۴/۵۱ درصد بدست آمد. ارتباط آماری معنی داری بین میزان آلودگی به این سه گروه باکتری در بره ها بدست نیامد ($P < 0/05$). در مورد گوساله ها نتایج نشان داد میزان آلودگی گوساله ها به سویه ETEC ۳۰/۸ درصد، EHEC ۲۱/۶۶ درصد و EPEC صفر می باشد. بین میزان آلودگی این سه گروه باکتری در گوساله ها ارتباط آماری معنی داری بدست آمد ($P < 0/05$). در مورد بزها نتایج نشان داد میزان آلودگی بزها به دو سویه ETEC و EPEC صفر بوده اما به سویه EHEC (۳/۱۲۰) ۰/۲۵ درصد بدست آمد. در این مورد نیز ارتباط آماری معنی داری بین میزان آلودگی به این سه گروه باکتری در بزها بدست نیامد ($P < 0/05$). (۲).

بحث

در مطالعه حاضر به طور کلی مشخص شد که ۲۷/۸۱ درصد از گوساله ها به سویه ETEC آلوده شده اند در حالی که هیچ کدام از بره ها و بزها توسط این سویه آلوده نشده بودند. ۴/۵۱ درصد از بره ها، ۱۹/۵۴ درصد از گوساله ها 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 فراوانی ها با مطالعاتی که توسط سایر محققین در مناطق مختلف انجام گرفته است، متفاوت

طبقه بندی شده اند (۱۳).

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

تمام سویه های EHEC دارای همولیزین (توسط ژن hlyA در پلاسمید کدگذاری می شود)، یک سم شینگلا مانند (توسط ژن های stx1 و stx2 کدگذاری می شود) و پروتئینی به وزن ۹۷ کیلو دالتون به نام intimin (توسط ژن eaeA کدگذاری می شود) می باشند (۱۰).

امروزه روش های نوین مولکولی که به بررسی ژن های عوامل بیماری زایی می پردازند، جایگزین روش های معمول می شوند که نسبت به روش های مولکولی نقاط ضعفی همچون وقت گیر بودن، عدم حساسیت و اختصاصیت بالا و همچنین نیاز به پیش تیمار نمونه دارند. روش های مولکولی از جمله روش Multiplex PCR برای جستجوی ژن های اختصاصی عوامل بیماری زایی در نمونه های کلینیکی از جدیدترین، حساس ترین و اختصاصی ترین روش هایی است که امروزه برای تعیین فراوانی عفونت ها کاربرد دارد (۱۱).

از آنجا که درک صحیح از میزان شیوع یک بیماری از یک طرف اهمیت آن بیماری را نشان می دهد و از طرف دیگر می تواند به مسئولین و دست اندرکاران مبارزه با بیماری در اتخاذ روش های 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 سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۲، ۲۰۰ نمونه سوآب از مخاط رکتوم گوساله و بره های یک تا ۳۰ روزه اسهالی از نواحی مختلف شهرستان شیراز جمع آوری گردید. سوآب حاوی نمونه مدفوع در لوله های در پیچ دار حاوی محیط trypticase soy broth (TSB) به آزمایشگاه باکتری شناسایی مؤسسه رازی شیراز انتقال داده شد. نمونه ها بر روی محیط های مک کانکی آگار و EMB (اوزین متیلین بلو) کشت خطی داده شد. از تست های مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی سیترات، اوره، TSI+MR و VP به منظور شناسایی و جداسازی باکتری E.coli از سایر باکتری های موجود در نمونه استفاده گردید. از پرایمرهای اختصاصی K99، F۴۱ و Sta برای شناسایی باکتری ETEC، پرایمرهای Stx1، Stx2 و eae برای شناسایی باکتری EHEC و پرایمرهای Bfp و eae برای شناسایی باکتری EPEC به منظور از دیاد قطعه های به ترتیب ۳۱۴، ۳۸۰، ۱۹۰، ۵۵۵، ۱۱۸، ۸۴۰، ۹۱۰، جفت بازی ژن های K۹۹، F۴۱، Stx1، Stx2، Bfp، eae و eae استفاده از تکنیک PCR و با استفاده از دستگاه اپندورف ساخت کشور آلمان استفاده گردید (۱). برای استخراج DNA کشت ۲۴ ساعت از سوآب رکتوم در محیط TSB برداشته شد و سانترفیوژ 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

بیماری‌زایی فیمبریه K۹۹ و F۴۱ و انتروتوکسین STa در اشربیشیاکلی انتروتوکسی‌ژنیک در گوساله‌ها به ترتیب ۱۲/۰۳ درصد، ۱۸/۰۴ درصد و ۱۵/۷۸ درصد تعیین گردید، و ۱۲/۰۳ درصد از نمونه‌ها هر سه ژن را با هم داشتند. اما این سه فاکتور در نمونه‌های حاصل از بره و بز یافت نشد. مطالعه چن و همکاران در سال ۲۰۰۴ در شرق چین میزان فراوانی K۹۹ و F۴۱ را در اشربیشیاکلی انتروتوکسی‌ژنیک پنج درصد اعلام کردند(۵). نتایج تحقیق نسیری و همکاران در سال ۱۹۸۲ در فرانسه این فراوانی را ۶/۱ درصد نشان داد(۱۱). در ایران هم بر روی این سویه مطالعاتی انجام گرفته است از جمله مطالعه کیانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ که بر روی گوساله‌های یک تا ۳۰ روزه کار کردند و اعلام کردند که ۱/۵ درصد از نمونه‌ها فاکتور F۴۱، دو درصد فاکتور F۴۱ و STa و هشت درصد

می‌باشد. در مورد سویه اشربیشیاکلی انتروتوکسی‌ژنیک پژوهش‌های فراوانی انجام شده است که نشان از حضور این سویه در حیوانات بخصوص در گوساله‌ها و بره‌ها و شیوع عفونت این سویه در هفته اول زندگی این حیوانات دارد. از جمله مطالعه وانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشمیر که اعلام کردند هشت درصد از گوساله‌های بیمار و پنج درصد از بره‌های مبتلا به اسهال، آلوده به سویه ETEC بودند و اظهار داشتند که در هیچ کدام از گوساله‌ها و بره‌های سالم سویه ETEC حضور ندارد(۲۴). شبانا و همکاران در سال 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 اسهال در شیراز انجام گرفت، میزان شیوع ژن‌های عوامل

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 AGGATTACAACAAAAGTTCACAGCAGTAA	۳۸۰
Stx۱	(TTCGCTCTGCAATAGGT(A (TCCCCAGTTCAATGTAAGA(T	
Stx۲	(GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTT(C (AGGGGTCGATATCTCTGTC(C	۱۹۰
Eae	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC	۵۵۵
Bfp	GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC	۱۱۸

سه فاکتور Stx₁, Stx₂ 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 درصد 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 STX₁، ۲۵ درصد دارای توکسین Stx₂، 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 Stx₁ و ۳/۲ درصد دارای ژن Stx₂ 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 Stx₁, Stx₂، eae و hlyA را مورد بررسی قرار دادند و نتایج PCR نشان داد که ۲۳/۱ درصد از نمونه‌ها دارای ژن Stx₁، ۲۶/۹۲ درصد از نمونه‌ها حاوی ژن Stx₂، ۵۰ درصد دارای هر دو ژن Stx₁ و Stx₂، 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 (F1۷،F5 و F۴۱) بودند، ۴۴/۲ درصد دارای Stx₁ و ۳۶/۶ درصد دارای ۹ درصد بودند (۱۴).

همان طور که 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

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 شناسایی 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 اشریشیاکلی جدا شده ژن F۴۱ را داشتند (۲۱)، در صورتیکه در مطالعه لطفاله‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۳ که با روش‌گلو تیناسیون در شهرستان‌های بابل و قائم‌شهر انجام گرفت، این میزان ۱/۰۷ درصد گزارش شد (۳). به نظر می‌رسد که بخشی از تفاوت‌ها 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 ساندلرند 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 Stx₁، ۲۵ درصد از بره‌ها و ۱۰ درصد از گوساله‌ها حاوی توکسین Stx₂ 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 Stx₁، ۱۲/۰۳ درصد دارای Stx₂ 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

جدول ۲- 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)	۲ (۲۵)
گوساله	۱۲۰	۳۷ (۳۰،۸۳)	۲۶ (۲۱،۶۶)	۰ (۰)	۳۷ (۳۰،۵۲)
بز	۵	۰ (۰)	۳ (۶۰)	۰ (۰)	۲ (۴۰)
کل	۱۳۳	۳۷ (۲۷،۸۱)	۳۵ (۲۶،۳۱)	۰ (۰)	۶۱ (۴۵،۸۶)

*Others: منظور سایر باکتری‌ها به غیر از سه گروه ذکر شده در جدول می‌باشد.

- borzprovince. *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 enterotoxigenic E.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 *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *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

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 (EPEC و EHEC، ETEC) با بکارگیری تکنیک Multiplex PCR از نمونه مستقیم سوآب 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 به دست 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 ظاهر 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

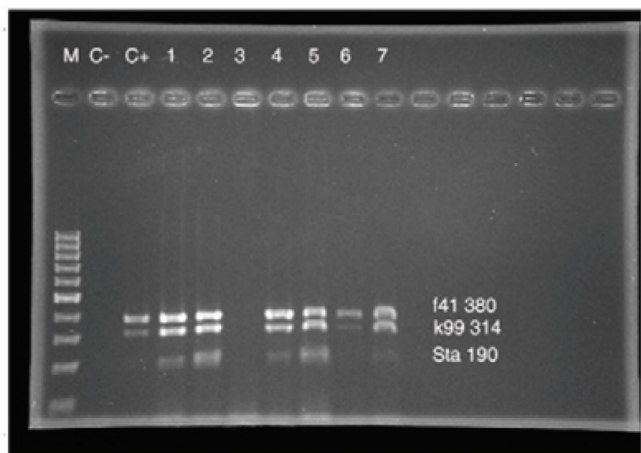
نویسندگان مقاله از کارکنان بخش بیولوژی مولکولی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز کمال تشکر و امتنان را دارند. این مقاله با حمایت پروژه موسسه رازی با شماره مصوب ۹۱۱۳-۱۸-۸۴-۲ انجام شده است.

منابع مورد استفاده

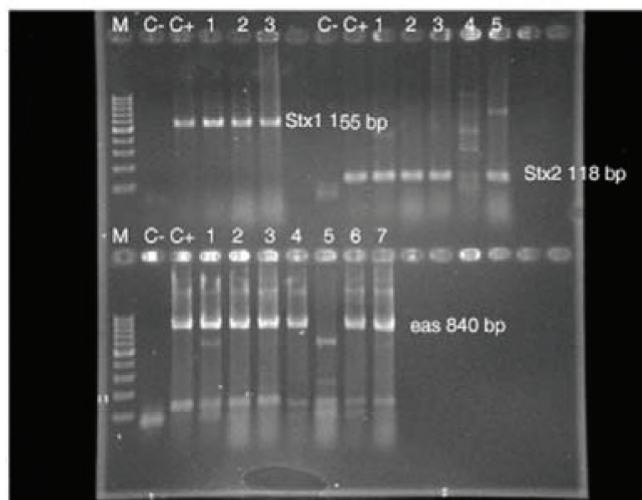
- 1.Pourtaghi-Shotorban H., Dahpahlevan V., Shaghayegh A. and Badiee A.(2011).Molecular detection of diarrheic enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from calves fecal samples in Al-

- cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *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 Vo, 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 coli* O157:H7 Gastroenteritis- Connecticut. Connecticut Department 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 calves natural 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. *IJRSET*, Vol, 2, Issue 7, ISSN: 2319-8753.
24. Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Nishikawa, Y and 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. *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.





شکل ۱- نتایج Multiplex PCR و تشکیل باندهای *Sta* (190bp), *K99* (314bp), *F41* (380 bp), (نمونه‌ها: ۱-۷)، نمونه ۶ دارای هر دو فاکتور *F41* و *K99* می‌باشد، نمونه‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷ دارای هر سه فاکتور *F41*، *K99* و *Sta* می‌باشند. نمونه ۳ برای هر سه فاکتور منفی می‌باشد.



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

♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦