مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۲، ۲۲۵-۲۱۹
Journal of Veterinary Research. 72,2:219-225, 2017
Original Article

بررسی مولکولی ژن‌های حدت *stx*۱, *stx*۲, *eaeA* و *hlyA* در باکتری اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های کلواکی در کبوتران وحشی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها

عبدالمجید محمدزاده* پژمان محمودی ایرج اشرافی‌تمای 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 کلواک کبوتران شهر تهران و بررسی حضور ژن‌های حدت و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد. **روش کار:** در مجموع ۱۱۷ نمونه مدفوع از ناحیه کلواک 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 *stx*۱، *stx*۲، *eaeA* و *hlyA* در جدایه‌ها با روش Multiplex PCR تعیین گردید. **نتایج:** تتراسایکلین و سولفامتوکسازول به ترتیب با ۸۳/۵٪ و ۸۵/۶٪ مقاومت، غیرمؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند و هیچ کدام از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو مقاوم نبودند. فراوانی ژن *stx*۱، *stx*۲ و *hly* به ترتیب ۳/۰۹ ، ۶/۱۸ و ۲/۰۶ گزارش شد. ژن *hlyA* در هیچ‌کدام 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 شیگاتوکسین 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

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 اشرشیا 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 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 خونریزی‌دهنده، و سندرم اورمی همولیتیک را دارند. اگرچه سروتیپ‌های غیر O_{157}:H_7، توانایی ایجاد اورمی همولیتیک را دارند اما مهمترین سروتیپ ایجاد کننده این سندرم O_{157}:H_7 می‌باشد (۱۱). دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان و بخصوص گاو به عنوان مخزن سویه STEC و همچنین سروتیپ غالب بیماریزای این سویه یعنی O_{157} 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 ایمونولوژیک با هم متفاوت می‌باشند. به دلیل اثر تخریبی این توکسین‌ها روی کشت سلولی ورو (Vero cells) به آن‌ها وروتوکسین (VT۱ و VT۲) 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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۸۱۳-۴۲۲۷۳۵۰ نمابر: ۰۸۱۳-۴۲۲۷۴۷۵ Email: mohammadzadeh4@gmail.com

می‌شود (۱۱). سـویه‌های STEC همچنین توانایی بروز فاکتورهای حدت دیگری را نیز دارند از جمله این فاکتورها می‌توان اینتیمین (کد شونده توسط ژن *eae*A) و پروتئین همولیزین در سـویه EHEC (کد شـونده توسط ژن *hly*A پلاسـمیدی) را نام برد (۱۸). اینتیمین یک پروتئین kda ۹۴ است کـه در اتصال باکتری به سـلول‌های اپیتلیال روده و ایجاد آسـیب به این سـلول‌ها دخیل اسـت (۳). الگوی بروز فاکتورهای حدت کد شونده توسط ژن‌های *stx*۱، *stx*۲، *eae*A و *hly*A 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 آنتی بیوتیکی متفاوتی داشـته و سویه‌های پاتوژن اشریشیاکلی می‌توانند به عنوان منشأ ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح باشـند. این سـویه‌ها توانایـی منتقل کردن ژن‌های مقاومت به باکتری‌هـای فلور نرمال روده را دارند (۱۲). با توجه به اینکه اطلاعات کافی درباره مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های *stx*۱، *stx*۲، *eae*A و *hly*A در اشریشیاکلی جدا شده از سوآب کلواک کبوتر در شهر تهران وجود ندارد. و با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از انجام این مطالعه حاظر بررسی آلودگی نمونه‌های اخذ شده از کبوترهای اطراف تهران به باکتری اشریشیاکلی، بررسـی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های *stx*۱، *stx*۲، *eae*A و *hly*A در جدایه‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: این مطالعه در تابستان و پاییز ۱۳۹۳انجام شد و در مجموع از۱۱۷ کبوتر چاهی شـهر تهران، نمونه برداری با سـوآب از ناحیه کلواک انجام پذیرفت.

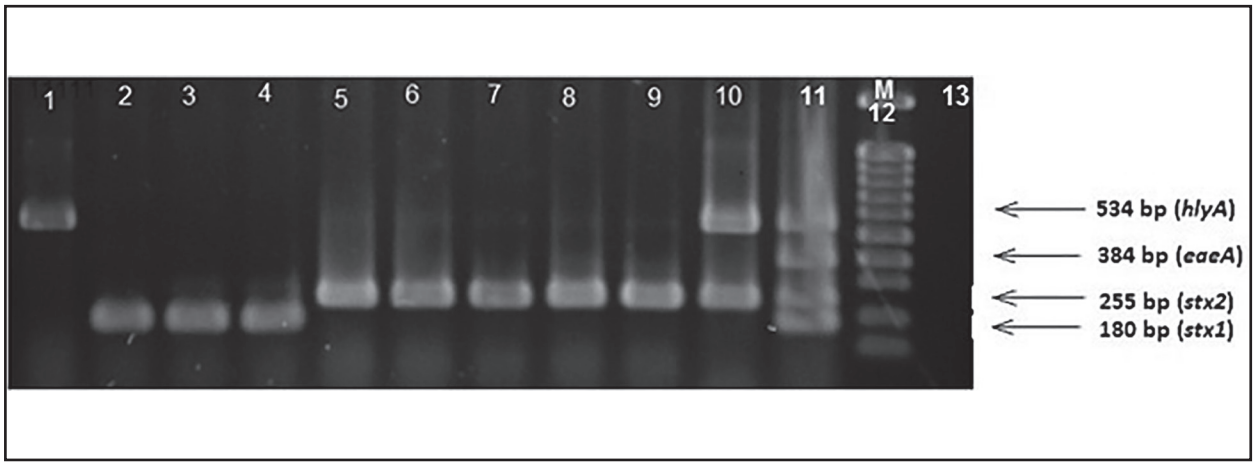
جداسازی باکتری اشریشیا کلی: سوآب مدفوعی اخذ شده از کبوترها مستقیماً در لوله حاوی محیط کشت (Triptic Soy Broth) TSB (مرک آلمان) قرار داده شد. پس از انتقال لوله‌ها به آزمایشگاه سوآب اخذ شده به صـورت خطی روی محیط MacConkey Agar (مرک آلمان) کشـت داده شـدند. پس از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷°C، پرگنه‌های صورتـی رنـگ لاکتوز مثبـت روی محیط مکانکـی‌آگار، با انجام سـایر تست‌های بیوشیمیایی تفریقی از قبیل: TSI، اوره، اندول، واکنش متیل رد، وژس پروسـکوئر، سیمون سیترات و جلای فلزی در EMB (مرک آلمان) تشخیص داده شدند.

بررسـی حساسـیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مطابق روش استاندارد انتشار در دیسک (Kirby- bauer) طبق دستورالعمل ۲۰۰۷ انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام گرفت. دیسک-های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (۳۰ µg)، سفترياکسون (۵ µg)، کوآموکسی‌کلاو (۳۰ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، انروفلوکساسین (۵ µg)، نئومایسین (۳۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، سولفامتوکسـازول (۱۰۰ µg) و فلوروفنیکول (۳۰ µg) تهیه شـده از شرکت پادتن طب مورد استفاده قرار گرفتند. به این صورت که جدایه‌های اشریشـیا کلی روی محیط مولر هینتون آگار به روش چمنی کشـت داده شـدند و سپس دیسـک‌های آنتی‌بیوتیکی روی محیط با فاصله قرار داده شـده و پلیت‌های محیط کشـت 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.

بررسـی حضور ژن‌هـای حدت در جدایه‌های اشریشـیا کلی با روش Multiplex PCR: برای اسـتخراج DNA از کشـت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشـت TSB به عنوان منشـأ DNA مورد اسـتفاده قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از محیط کشـت حاوی باکتـری در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سـانتریفیوژ گردید سـپس DNA باکتریایی توسـط کیت سینا ژن (۸۱۱۵C) اسـتخراج گردید. واکنش PCR شـامل ۲ µl از نمونه استخراج شـده، ۲۰۰ µM dNTP، ۲۵۰ nM از هر پرایمر و یک واحد آنزیم Taq polymerase و ۵ µl PCR buffer (محصول شرکت سینا ژن) در حجم نهایی ۵۰µl انجام شـد. (توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است) (۸). برنامـه دمایـی PCR هم به این صورت بود: واسرشـت اولیه در دمای ۹۴°C به ۵ دقیقه، و به دنبال آن ۳۰ سیکل دمایی انجام شد. در طی این ۳۰ سیکل، واسرشـت در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمـای ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله امتداد در دمای ۷۲ °Cبه مدت ۳۰ ثانیه انجام شـد. و نهایتاً بعد از اتمام سیکل‌ها امتداد نهایی نمونه‌ها در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه در دسـتگاه ترموسیکلر TECHNE TC-512 England پایـان یافت (۱۷). محصـولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده و باندهای DNA در دستگاه ژل داک (BIO RAD) آشکار شدند.

نتایج

در مجمـوع، ۹۷ جدایـه باکتری اشریشـیا کلی از ۱۱۷ مـورد کبوتر جداسـازی شد. این ۹۷ جدایه با تست‌های بیوشیمایی 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 انروفلوکساسـین مقاوم بود و هیچ کدام به کوآموکسـی‌کلاو مقاومت نشـان نداد. از طرف دیگر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نئومایسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول بالا و به ترتیب برابر ۷۵، ۸۱ و ۸۳ جدایه از کل موارد ۹۷ جدایه گزارش شد. نتایج تست حساسیت آنتی-بیوتیکی همه جدایه‌ها در جدول ۲ ذکر شده است. از بیـن ۹۷ جدایه، ۲ جدایه (۲/۰۶٪) واجد ژن *hly*A، ۶ جدایه (۶/۱۸٪) واجد ژن *stx*۲ و ۳ جدایـه (۳/۰۹٪) واجد *stx*۱ بودند. ژن *eae*A در هیچ‌کدام از جدایه‌ها حضور نداشت و همچنین قابل ذکر است که هیچ‌کدام از جدایه‌ها واجد ۳ یا ۴ ژن مورد بررسی به طور همزمان نبودند فقط در یک مورد ژن



تصویر ۱. نتایج PCR Multiplex جهت تعیین حضور ژن‌های *stx۲*، *eaeA*، *hlyA* و *stx۱*. ۱: *hly*، ۲-۴: *stx۱*، ۵-۹: *stx۲*، ۱۰: *stx۲* و *hly*، ۱۱: کنترل مثبت (ATCC ۳۵۲۱۸)، ۱۲: مارکر ۱۰۰bp، ۱۳: کنترل منفی

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

ژن	سکانس (۵' - ۳')	طول قطعه(bp)	منبع
Stx۱	F ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	۱۸۰	
	R AGAACGCCCACTGAGATCATC		
Stx۲	F GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	۲۵۵	
	R TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
eaeA	F GACCCGGCACAAGCATAAGC	۳۸۴	
	R CCACCTGCAGCAACAAGAGG		۱۳
hlyA	F GCATCATCAAGCGTACGTTCC	۵۳۴	
	R AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		

stx۲ و *hly* 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 اشریشیا 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 اشریشیا کلی جدا شده از کبوتران اطراف شهر تهران تعیین شد که مقاومت آنتی-بیوتیکی 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 آنتی بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیا کلی جدا شده از کبوتر به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین 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 اشریشیا کلی بالاست. این بالا بودن میزان مقاومت به تتراسایکلین را احتمالا می‌توان به استفاده گسترده و نابجای این آنتی-بیوتیک در صنعت دامپزشکی نسبت داد. در مطالعه حاضر میزان مقاومت نسبت به انروفلوکساسین بسیار پایین بود (یک جدایه از ۹۷ جدایه). که با آنچه Radimersky و همکاران درباره میزان مقاومت اشریشیا 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 آلوده شدن 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 بقایایی 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، سیتوتوکسیسیتی در کشت سلولی، ایمنواسی و PCR استفاده می‌شود (۱). در روش PCR جدایه‌ای که واجد *stx۱* ویا *stx۲* باشد به عنوان STEC در نظر گرفته می‌شود (۱۳). در مطالعه حاضر با روش Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های *stx۱*، *stx۲*، فراوانی ژن *stx۱* در جدایه‌ها، ۳ مورد از ۹۷ جدایه (۳/۰۹٪) و ژن *stx۲*، ۶ مورد از ۹۷ نمونه (۶/۱۸٪) گزارش شد. فراوانی ژن *stx۲* به طور معنی‌داری ($p<0/01$) بیشتر از ژن *stx۱* 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)
سفتریاکسون	۹۴ (٪۹۳/۸)	۴ (٪۴/۱)	۲ (۲/۱)
کوآموکسی‌کلاو	۹۵ (٪۹۷/۹)	۲ (٪۲/۱)	۰ (٪۰)
استرپتومایسین	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)
نئومایسین	۱۲ (٪۱۲/۴)	۱۰ (٪۱۰/۳)	۷۵ (٪۷۷/۳)
تتراسایکلین	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)

کردند هم‌خوانی داشــت. در مطالعه حاضر فراوانی STEC در بین جدایه‌ها ۹ مــورد از ۹۷ نمونه (٪۹/۲۷) بود. برخی مطالعــات اپیدیمیولوژی صورت گرفته در ایران در رابطه با فراوانی STEC شــیوع بین ۰/۷ تا ۱۵٪ گزارش شــده‌اند و در مواردی از آن‌ها ســروتیپ H۷:O۱۵۷ را گــزارش نکرده‌اند (۲،۹). 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 *stx*۲ می‌باشند (۴). با توجه به حضور ژن‌های *stx*۱ و *stx*۲ در باکتری‌های جدا شده از سوآب کلواک کبوتر می‌توان گفت که این پرندگان به صورت بالقوه توانایی انتقال باکتری‌های حامل این ژن‌های حدت را به انســان دارند. اما مطالعه حاضر نشــان داد که خوشــبختانه فراوانی این ژن‌ها در جدایه‌های اشریشیا کلی اخذ شده از کبوتر پایین می‌باشد. یکی دیگر از عوامل بیماریزایی سویه‌های STEC پروتئین اینتیمین می‌باشــد که به وسیله‌ی ژن *eae*A کد می‌شود. اینتیمین باعث اتصال نزدیک باکتری به ســلول‌های اپیتلیال روده و ایجاد آسیب‌های خاصی به نام اتصال و محو شــدن (Attaching/effacing) می‌شود (۳). این ژن در هیچ‌کدام از جدایه‌ها وجود نداشت. محققان زیادی روی وابستگی حضور ژن‌های *stx* و *eae*A اتفاق نظر دارند (۲۰). اما مطالعه حاضر نشان داد که در جدایه‌های اخذ شده از کبوتر همه *stx* مثبت‌ها برای *eae*A منفی هستند. Zahraei Salehi و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که از ۱۲ جدایه اشریشــیا کلی اخذ شــده از جوجه‌هــا تعداد ۲ مورد (٪۱۶/۶۶) حامل ژن *eae*A می‌باشند و همچنین بیان کردند که هیچ‌کدام از جدایه‌هایی که *stx* دارند واجد *eae*A نیستند؛ آن‌ها از این عدم وابستگی بین حضور دو ژن مذکور نتیجه گرفتند که شــاید اشریشیاکلی‌های ساکن بدن پرندگان 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 نتیجه گیری را می‌توان به مطالعه حاضر تعمیم داد. از جمله ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر ژن *hly*A می‌باشد. محصول این ژن همولیزینی اســت که بر روی سلول‌های یوکاریوتی مؤثر می‌باشد و باعث ایجاد منفذ در این ســلول‌ها و متلاشی شدن آن‌ها می‌شود (۸). در مطالعــه حاضر فراوانی این ژن ۲ جدایــه (٪۲/۰۶) بود که یکی از جدایه‌ها فقــط حــاوی ژن *hly* بود اما یکی از آن‌ها واجــد *stx*۲ هم بود. در مطالعه Zahraei Salehi و همــکاران هیــچ کدام از جدایه‌هــا واجد ژن *hly*A نبودنــد (۲۰). Santaniello و همکاران با اخذ نمونه‌های ســوآب کلواک کبوتر به جســتجوی باکتری اشریشیا کلی سروتیپ H۷:O۱۵۷ پرداختند. آن‌ها گزارش کردند که میزان حضور این ســروتیپ در جدایه‌های اشریشیا کلی ۴ مورد از ۵۰۴ نمونه (٪۰/۷۹) اخذ شــده می‌باشــد. هر ۴ مورد حامل ژن‌هــای *stx*۲ و *eae*A بودند. یکی از این چهار جدایه حامل *stx*۱ و دو تا از آن‌ها حامل *hly*A بود (۱۶). در نهایت با کنار هم قرار دادن نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات صورت گرفته می‌توان گفت که کنترل و پیشگیری سویه‌های 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 پرندگان در مناطق شهری مورد توجه باشد.

تشکر و قدردانی

نویســندگان از حمایت‌های مالی معاونت محتــرم پژوهش و فناوری دانشــگاه 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

1. 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.

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., Sprigings, 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) from1995 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 *stx*1, *stx*2, *eae*A, Enterohemorrhagic *E. coli hly*A, 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 *stx*1, *stx*2 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., la´udio, 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 *stx*1, *stx*2, *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 *stx*1, *stx*2, *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 *stx*1, *stx*2, *eae* and *hly*A 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 *stx*1, *stx*2 and *eae*A is 3.09%, 6.18% and 2.06% respectively and *hly*A was not found in any of isolates. **CONCLUSIONS:** The frequency of *stx*1 and *stx*2 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 *hly*A، *eae*A، *stx*2 and *stx*1: 1: *hly*, 2-4: *stx*1, 5-9: *stx*2, 10: *stx*2 and *hly*A, 11:control positive (ATCC 35218), 12: Ladder 100bp, 13: control negative.

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