

فراوانی ژن‌های حدت stx_1 $ehxA$ و stx_2 در اشریشیا کلی غیر O157 جدا شده از گاو و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این جدایه‌ها

قربان بهزادیان نژاد^{۱*}، تقی زهرایی صالحی^۲، رامین مظاهری نژاد فرد^۳، نعمت شمس^۳، داریوش شیرانی^۴

(۱) گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

(۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

(۳) گروه علوم آزمایشگاهی، آموزشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

(۴) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ اسفند ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۱۷ خرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

اشریشیا کلی مولد سموم شیگا یکی از باکتری‌های مهم خانواده آنتروباکتریاسه است که قادر به ایجاد عفونت در انسان و طیف وسیعی از حیوانات می‌باشد که این عفونت‌ها ممکن است منجر به بروز عوارض خطرناکی از قبیل کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک گردد. در این تحقیق فراوانی ژن‌های حدت همولیزین ($ehxA$) و سموم شیگا (stx_1 , stx_2) در سویه‌های اشریشیا کلی غیر O157 جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاوهای ارجاع شده به بیمارستان آموزشی دام‌های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه بررسی شد. علاوه بر این، تابلوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به هفت آنتی بیوتیک متداول در دامپزشکی سنجیده شد. پس از انجام PCR چندگانه بر روی ۳۹ سویه اشریشیا کلی غیر O157 جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاوی، ۱۰ سویه حاوی دو تا از ژن‌های مورد نظر یافت شدند. پراکندگی ژن $ehxA$ صفر بود که بطور بارزی کمتر از مقادیر گزارش شده در مقالات است. چنانکه انتظار می‌رفت فراوانی ژن‌های stx در حد معمول (حدود ۲۵ درصد) بود. در بررسی فراوانی انواع ژن‌های رمزگذار سموم شیگا، stx_2 بیشتر از stx_1 یافت شد. تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت چندگانه نسبت به دو یا چند آنتی بیوتیک شامل آمپی سیلین، اریترومایسین، پلی میکسین-ب، تتراسایکلین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول، جنتامایسین و/یا سفالوتین بودند. بطور کلی نتایج حاصله از این بررسی با اندکی تفاوت منطبق بر پیش بینی‌های معمول بوده است. مضافاً، مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند از دلایل پراکندگی گسترده مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در حیوانات پرورشی باشد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کلی آنتروهموراژیک، آنتروهمولیزین، سموم شیگا، آنتی بیوگرام.

انتقال می‌یابد (۱۲). گمان می‌رود که ارتباط مستقیمی بین تولید این آنتروهمولیزین و توانایی STEC مولد STX (بویژه در سویه‌های O157) در ایجاد بیماری‌های جدی ترو وجود داشته باشد (۱۷، ۱۸).

از دید همه‌گیرشناسی، STEC علاوه بر حیوانات وحشی طیف وسیعی از حیوانات اهلی و خانگی را نیز آلوده می‌کند (۸). در اکثر کشورها گاوها عموماً بعنوان مخزن اصلی محسوب می‌شوند حال آنکه در برخی از کشورها مانند استرالیا گوسفندان مخزن اصلی بیماری هستند. عفونت از طریق مواد غذایی، انتقال شخص به شخص و نیز انتقال ثانویه شیوع می‌یابد.

تعیین هویت عوامل حدت اشریشیا کلی در مطالعات تجربی می‌تواند دید ما را نسبت به روند بیماری در عفونت‌های ایجاد شده بوسیله این باکتری افزایش دهد. مضافاً، پایش میزان شیوع باکتری‌های مولد سموم شیگا از جمله STEC موجب پیشگیری از خطرات و عواقب عفونت‌های ایجاد شده با این گونه باکتری‌ها می‌گردد. توانایی محدودسازی موثر وسعت و شدت بیماری STEC بستگی به روش‌های تشخیص سریع و حساس آزمایش نمونه‌های انسانی و دامی و نیز ناقلین احتمالی دارد.

مقدمه

یکی از بیماری‌زاترین باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه، اشریشیا کلی آنتروهموراژیک (EHEC) می‌باشد. برخی EHEC سموم شیگا (STX) تولید می‌کنند و به همین دلیل بعنوان اشریشیا کلی مولد سموم شیگا (STEC) شناخته می‌شوند. این سموم که عموماً روی پلاسמידها و ترانسپوزونها رمزگذاری شده و بوسیله باکتریوفاژها حمل می‌گردند بدلیل تأثیرات بارز بر سلول‌های Vero بعنوان وروسایتوتوکسین‌ها (VT) نیز معرفی می‌شوند (۷). سموم پلی پپتیدی شیگا متشکل از دو سم Stx_1 و Stx_2 بوده که برترتیب بوسیله ژن‌های stx_1 و stx_2 در جزایر بیماری‌زایی (PAI) ژنوم باکتری رمزگذاری می‌شوند و عامل ایجاد عوارض خطرناک از قبیل Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) و Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) در افراد مبتلا به STEC می‌باشند (۱۰). دیگر عامل حدت بالقوه کمکی EHEC، آنتروهمولیزین (HlyA) است که ژن آن همانند ژن‌های سموم شیگا بوسیله یک مگاپلاسמיד رمزگذاری شده و روی باکتریوفاژهای معتدل



مواد و روش کار

در این مطالعه، از ۳۹ سویه اشریشیا کولی غیر O157 جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاوهای ارجاعی به بیمارستان دام‌های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. نمونه‌ها از تازه مبتلایان به اسهال که فاقد سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک بودند اخذ شد. مدفوع‌ها بلافاصله در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی روی محیط‌های مک کانکی، سوربیتول-مک کانکی و ائوزین-متیلن بلو (EMB) کشت داده شدند. مضافاً، از محیط‌های افتراقی اوره، آهن سه قندی (TSI) و متیل رد-وژس پروسکاوئر (MR-VP) جهت شناسایی و جداسازی باکتری‌ها استفاده گردید.

جهت انجام PCR، از کشت فراشبانه جدایه‌های اشریشیا کولی بر روی محیط لوریا-برتانی (LB) استفاده شد. بر اساس روش معتدل شده Boerlin و همکاران (۲)، چند پرگنه از کشت تازه 18-24 ساعت LB در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شده و سپس ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و بخش رویی حاوی DNA جدا گردید. جهت تقویت ژنهای مورد جستجو از سه جفت پرایمر استفاده شد که مشخصات آنها در جدول شماره ۱ ذکر شده است (۱۳، ۱۵). به ازای هر نمونه، ۱۱/۵ میکرولیتر از آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر از بافر ده برابر، ۱ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر از dNTP ده میلی مولار، ۱ میکرولیتر از (سه جفت) با غلظت ده پیکومولار و ۰/۵ میکرولیتر از DNA پلیمراز پنج واحد در یک میکرولیتر در یک میکروتیوب استریل مخلوط شده و سپس ۲ میکرولیتر DNA به آن افزوده شد. وضعیت چرخه‌های بکار رفته در ترموسایکلر (Techne TC-512, UK) به شرح ذیل بود:

Initial denaturation در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۵ دقیقه آغاز شده و سپس ۳۰ چرخه، هر چرخه شامل: Denaturation در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه، Annealing در ۵۸ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱ دقیقه انجام شد. Final extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۷ دقیقه پایان یافت. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکترو فورز شد. سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ شده و با استفاده از اشعه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت. یک نمونه اشریشیا کولی O157:H7 بعنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

تمامی جدایه‌های اشریشیا کولی به منظور تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها (آنتی‌بیوگرام) در محیط آب‌گوشت مغذی (آب پپتونه) کشت داده شدند. پس از یک شب گرمخانه‌گذاری محیط کشت مایع حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سطح پلیت‌های حاوی محیط مولر-هینتون با استفاده از سواب استریل با مقداری محیط کشت حاوی باکتری آغشته شده و سپس دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک با

فاصله مناسب روی سطح پلیت قرار داده شدند (روش دیسک دیفیوژ یون کربی-بائر)، پلیت‌ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده سپس نتایج طبق دستورالعمل NCCLS قرائت شد. فهرست دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده بشرح زیر است:

سفالوتین ۳۰ μg (Difco, USA)، پلی میکسین-ب ۳۰۰ μg (USA) (Difco)، آمپی سیلین ۱۰ μg (Biomerieux, France)، جنتامایسین ۱۰ μg (Biomerieux, France)، تتراسایکلین ۳۰ μg (Biomerieux, France)، اریترومایسین ۱۵ μg (پادتن طب، ایران) و تری متوپریم-سولفامتوکسازول (پادتن طب، ایران).

نتایج

در PCR چندگانه بر روی پرگنه‌های حاصل از کشت ۳۹ جدایه اشریشیا کولی غیر O157، ۱۰ نمونه حاوی ژن‌های مورد نظر یافت شد. یک نمونه حاوی *stx*_۱ و نه نمونه حاوی *stx*_۲ بود اما هیچ نمونه‌ای حاوی دو یا سه ژن یافت نشد. بررسی آماری نتایج با استفاده از Fishers Exact Test نشان داد که هر کدام از ژن‌های *stx*_۱ و *stx*_۲ می‌تواند بصورت مستقل وجود داشته باشد. بر اساس آزمون t-student (Independent Sample Test) فراوانی ژن *stx*_۲ در گاوها بر حسب سن و جنس فاقد تفاوت معنی‌دار بود ($p > 0/05$).

تمامی جدایه‌های اشریشیا کولی دارای مقاومت چندگانه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک یا بیشتر بودند. بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین حساسیت جدایه‌ها بترتیب نسبت به جنتامایسین و اریترومایسین و بیشترین و کمترین مقاومت جدایه‌ها بترتیب نسبت به اریترومایسین و پلی میکسین-ب بود (جدول ۲).

بحث

امروزه علیرغم مشکلات فراروی آزمایشات روزمره نمونه‌های مدفوعی برای جستجوی EHEC، دلایل کافی بهداشتی و اقتصادی برای غربالگری روزانه EHEC در برخی نمونه‌های بالینی وجود دارد. عمده ترین دلیل بهداشتی برای غربالگری EHEC، شناسایی همه‌گیری‌ها بمنظور محدود ساختن موارد مرگ و میر است. بیش از ۶۰ سویه EHEC قادر به ایجاد اسهال خونی هستند که اکثریت آنها از سروتایپ‌های غیر O157:H7 (ECO) می‌باشند. گاوها مهمترین گونه حیوانی آلوده کننده انسانها با EHEC (STEC) بوده و آلودگی را از طریق فرآورده‌های گوشتی و لبنی آلوده یا تماس مستقیم به انسان انتقال می‌دهند (۸). میزان زیاد کلونیزاسیون STEC در گله‌های گاو (گاه تا ۶۰ درصد حیوانات سالم گله) در بسیاری از کشورها موید این موضوع می‌باشد. در این بررسی، تعداد ۱۰ مورد از مجموع ۳۹ جدایه اشریشیا کولی بعنوان STEC شناسایی شد که در محدوده آمار معمول (۱۰-۲۵ درصد) است.

در میان ۳۹ جدایه اشریشیا کولی غیر O157 مطالعه اخیر، هیچ ژن



جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

ژن	پرایمر	توالی (5'3')	اندازه (bp)	ماخذ
<i>ehxA</i>	RH35 RH37	CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCAAATGTTATCCCATGACATCATTGACT	۳۲۱	۱۵
<i>stx₁</i>	LP30 LP31	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	۳۴۸	۱۳
<i>stx₂</i>	LP43 LP44	ATCCTATTCCTCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	۵۸۴	۱۳

جدول ۲- نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۳۹ جدایه گاوی اشریشیا کلی غیر O157. R: مقاوم، I: نیمه حساس، S: حساس، AMP: آمپی سیلین، ERY: اریترومایسین، PB: پلی میکسین-ب، TET: تتراسایکلین، SXT: تریمتوپریم-سولفامتوکسازول، GM: جنتامایسین، CF: سفالوتین.

	CF	GM	TET	SXT	PB	ERY	AMP	
R	۱۶	۶	۲۶	۲۹	۲	۲۸	۲۹	
I	۱۸	۰	۰	۷	۱۱	۱	۱	
S	۵	۳۳	۱۳	۳	۲۶	۰	۹	

سطح ترجمه سم *Stx₂* در شرایط *in vivo* از سم *Stx₁* بیشتر است. دانسته شده که دست کم رونویسی سم *Stx₁* در شرایط *in vitro* بیان وابسته به آهن دارد. بهر حال، مقدار آهن در روده بسیار کم بوده و بنابراین بنظر می‌رسد که رونویسی نه‌های وابسته به سم *Stx₁* در شرایط *in vivo* نیز سرکوب شود. این امر احتمالاً به بقای بیشتر باکتری‌های حاوی ژن‌های حدت *stx₂* در طبیعت منجر می‌شود.

در بحث مقاومت آنتی بیوتیکی، تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت چندگانه نسبت به دو یا بیشتر آنتی بیوتیک‌های آزمایش شده بودند. بر اساس مطالعات منتشر شده، مقاومت‌های چندگانه میکروبی بصورت گسترده‌ای در جدایه‌های اشریشیا کلی دام‌ها از قبیل گاوها مشاهده می‌شود. در مطالعه‌ای بر روی حساسیت ۴۸ جدایه گاوی STEC نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف از جمله سولفانامید، آمپی سیلین و تتراسایکلین در کشورهای مختلف اروپایی مشخص شد که تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه می‌باشند (۹). بعدها، Cristancho و همکاران (۶) نشان دادند که تقریباً تمامی ۶۰ سویه اشریشیا کولی همزیست روده‌ای که از گوساله‌های کانادایی جدا شده بود به چهار یا پنج آنتی بیوتیک شامل آمپی سیلین، تتراسایکلین، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول و/یا جنتامایسین مقاومت داشتند. پژوهشگران و جود بخشی از این مقاومت‌های آنتی بیوتیکی را بدلیل پراکندگی گسترده عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها و اینتگررها دانسته‌اند. مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها در دامپزشکی و پرورش حیوانات می‌تواند از دلایل این گسترده‌گی در پراکندگی و نیز افزایش فعالیت ژن‌های رمزگذار مقاومت‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، آقایان مهندس غفاری و مهندس توتونچی تقدیر بعمل می‌آید.

رمزگذار آنتروهمولیزین یافت نشد. نتیجه پژوهشها پیرامون تکامل همولیزین در EHEC نشان داده که *ehxA* در انواع سرو تایپ‌های STEC این باکتریها حفظ شده که می‌تواند بعنوان ابزاری برای جستجوی این سویه‌ها بخصوص آنهایی که با بیماری‌زایی وابسته‌اند بکار رود (۱۴). در مطالعه‌ای بر روی ۵۰۴ جدایه STEC گاوی در اسپانیا، ۶۳ درصد جدایه‌ها واجد *ehxA* بودند (۱). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۲۴۶ جدایه STEC دامی غیر O157 در اسپانیا، ژن‌های *ehxA* در ۴۶ درصد جدایه‌ها پیدا شد (۱۶). دیگر مطالعات انجام گرفته بر روی جدایه‌های STEC نتایج مشابهی را نشان می‌دهد (۵). بهر حال، نتایج مطالعه پیش رو با نتایج حاصل از بررسی‌های فوق مبنی بر همراهی ژن‌های رمزگذار آنتروهمولیزین و سموم شیگا متفاوت بوده که ممکن است ناشی از تفاوت در پراکندگی جغرافیایی باکتریوفاژهای حامل ژن‌های حدت کمکی و عناصر ژنتیکی متحرک (MGE) مانند پلاسمیدها و ترانسپوزونها، شرایط محیطی تاثیر گذار بر باکتریوفاژها شامل دما، رطوبت و تابش نور خورشید و یا فیز بولوژی میزبان باشد.

در مطالعه اخیر، یک جدایه حاوی *stx₁* و نه جدایه حاوی *stx₂* یافت شد. این نتایج شبیه به نتایج مطالعات دیگر است که اکثر حاکی از پراکندگی بیشتر *stx₂* نسبت به *stx₁* می‌باشد. Chahed و همکاران (۳) در بررسی جدایه‌های STEC گاوی دریافتند که درصد قابل توجهی از جدایه‌ها دارای *stx₂* بوده حال آنکه درصد اندکی واجد *stx₁* بود. این پژوهشگران قبلاً در مطالعه‌ای دراز مدت بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۳ نتایج مشابهی را در سویه‌های STEC جدا شده از نمونه‌های مربوط به دام‌ها بدست آورده بودند (۴). یافته‌های پژوهش‌های طولانی مدت دیگر بر روی سویه‌های STEC جدا شده از نمونه‌های با منشأ دامی یافته‌های فوق را تایید می‌کند (۱۱). بنظر می‌رسد که بیشتر بودن میزان پراکندگی *stx₂* نسبت به *stx₁* در شرایط مختلف متفاوت باشد. یک احتمال آن است که



References

- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Blanco, J. (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J. Clin. Microbiol* 42: 645-651.
- Boerlin, P., Chen, S., Colbourne, J. K., Johnson, R., De Grandis, S., Gyles, C. (1998) Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in Shiga toxin-producing E.coli. *Infect. Immun.* 66: 2553-2561.
- Chahed, A., China, B., Mainil, J., Daube, G. (2006) Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. *J. Appl. Microbiol.* 101: 361-368.
- Chahed, A., Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., Pierard, D., Daube, G. (2005) Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003. *Eurosurveillance.* 10: 33-36.
- Cookson, A. L., Cao, M., Bennett, J., Nicol, C., Thomson-Carter, F., Attwood, G. T. (2010) Relationship between virulence gene profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing E. coli isolates from cattle and sheep in New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3744-3747.
- Cristancho, L., Johnson, R. P., McEwen, S. A., Gyles, C. L. (2008) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli in white veal calves. *Vet. Microbiol.* 126: 200-209.
- Fratamico, P. M., Bhagwat, A. A., Injaian, L., Fedorka-Cray, P. J. (2008) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces. *Foodborne Pathog. Dis.* 5: 827-838.
- Gyles, C. L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 85(E. Suppl.): E45-E62.
- Maidhof, H., Guerra, B., Abbas, S., Elsheikha, H. M., Whittam, T. S., Beutin, L. (2002) A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5834-5842.
- Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Dhahi, G., Echeita, A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Blanco, J. (2005) Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.* 156: 793-806.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Lopez, C., Justel, P., Alonso, M. P., Echeita, A., Bernardez, M. I., Gonzalez, E. A., Blanco, J. (2007) Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 7: 13-21.
- Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., Caprioli, A. (2003) A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing E. coli. *Infect. Immun.* 71: 3343-3348.
- Osek, J. (2003) Development of a multiplex PCR: approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1217-1225.
- Paton, A. W., Paton, J. C. (2002) Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* and *saa*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 271-274.
- Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C., Livrelli, V. (2001) Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2460-2468.
- Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G.,



- Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Usera, M. A., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Blanco, J. (2003) Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet. Microbiol.* 94: 47-56.
17. Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63: 1055-1061.
18. Schmidt, H., Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2364-2367.



DETECTION OF *EHxA*, *STX*₁ AND *STX*₂ VIRULENCE GENES IN NON-O157 *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM CATTLE BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION AND THE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF THESE ISOLATES

Behzadian Nezhad, G.¹, Zahraei Salehi, T.², Mazaheri Nezhad Fard, R.^{1,4}, Shams, N.³, Shirani, D.⁴

¹Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

³Department of Laboratory Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Khorramabad- Iran.

⁴Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 2 March 2011 , Accepted 7 June 2011)

Abstract:

Shiga toxigenic *Escherichia coli* is one the most important bacteria within Bacteriaceae. The bacteria infect humans and a wide spectrum of animals, resulting in dangerous consequences such as hemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis. In the current study, the prevalence of hemolysin (*ehxA*) and Shiga toxin (*stx*₁ and *stx*₂) virulence genes in non-O157 *Escherichia coli*, isolated from cattle stool samples, was evaluated by Multiplex PCR. The animals were referred to the Large Animal Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. The antibiotic resistance profiles of the isolates were assessed against seven usual antibiotics used in veterinary medicine. In the PCR study of 39 non-O157 *Escherichia coli* strains isolated from cattle stool samples, 10 samples were found positive for *stx*₁ or *stx*₂ genes. The prevalence of *ehxA* gene was zero, which is significantly lower than that mentioned in papers reporting on this issue. As expected, the prevalence rate of *stx* genes in cattle isolates was usual (nearly 25%). The prevalence of *stx*₂ was greater than the prevalence of *stx*₁. All isolates were multiple resistant to two or more antibiotics, including ampicillin, erythromycin, polymyxin-B, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin and/or cephalotin.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, enterohemolysin, Shiga toxins, antibiogram.

*Corresponding author's email: behzadiannejad@modares.ac.ir, Tel: 021-88011001, Fax: 021-88013030

