



## فراوانی ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA* در باکتری های اشریشیاکلی مولد شیکاتوکسین جدا

### شده از ماهی و میگو در استان بوشهر

پریسا بهشود<sup>۱</sup>، الهه تاج بخش<sup>۲</sup>، فهیمه نوربخش<sup>۳\*</sup>

۱. گروه میکروبی شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. مرکز تحقیقات سم شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.



\* نویسنده مسئول: [nourbakhshf951@mums.ac.ir](mailto:nourbakhshf951@mums.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

#### چکیده

اشریشیاکلی مولد توکسین شیکا یک پاتوژن مهم در بیماری های ناشی از غذا می باشد و تاکنون چندین همه گیری ناشی از غذا در سراسر جهان را مرتبط با این باکتری دانسته اند. آلودگی با این ارگانسیم باعث اسهال آبکی و خونی می شود. در این مطالعه تعداد ۴۰۰ نمونه ماهی و میگو در استان بوشهر تهیه گردید و با انجام آزمایش های میکروبیولوژی و مولکولی وجود اشریشیاکلی تأیید گردید و در حضور زوج پرایمرهای اختصاصی فراوانی ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA* مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه هایی که به صورت بسته بندی مورد بررسی قرار گرفتند، باکتری اشریشیاکلی جدا نگردید اما در نمونه های غیر بسته بندی از تعداد ۲۰۰ نمونه ماهی مورد بررسی در ۳۵ نمونه (۱۷/۵ درصد) اشریشیاکلی جداسازی گردید و از ۵۰ نمونه میگوی مورد بررسی در ۱۰ نمونه (۲۰ درصد) اشریشیاکلی جداسازی گردید. پس از انجام آزمون Multiplex PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی، در ایزوله های جدا شده از ماهی باندهای مربوط به ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA* به تنهایی در هیچ نمونه ای یافت نشد. در دو ایزوله (۲۰ درصد) باند مربوط به ژن های *stx1* و *eaeA* و در یک ایزوله (۱۰ درصد) باند مربوط به ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA* مشاهده گردید، در صورتی که در ایزوله های اشریشیاکلی جدا شده از میگو، تنها در یک نمونه (۳۳/۳۳ درصد) ژن *stx1* مشاهده گردید. در این تحقیق مشخص گردید که فراوانی ژن *stx1* از ژن *stx2* بیشتر می باشد. به این ترتیب می توان بیان نمود که الگوی ژنتیکی غالب *stx1* می باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، شیکاتوکسین، فرآورده های دریایی، ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA*

## مقدمه

تاکنون چندین همه گیری ناشی از غذا در سراسر جهان به علت اشریشیاکلی مولد توکسین شیگا مشاهده شده است. آلودگی با این ارگانسیم باعث اسهال آبکی و خونی می شود و از عوارض بعدی عفونت با سروتیپ O:157 H:7 این باکتری می توان به کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک همولیتیک اشاره کرد (۱). بیش از صد سروتیپ از اشریشیاکلی شناسایی شده است که توانایی تولید شیگاتوکسین را داشته و دارای یکی از ژن های *stx1*, *stx2* یا واریانت هایی از *stx2* هستند که محل این ژن ها بر روی باکتريوفاژ لیزوژنیک می باشد. علاوه بر تولید توکسین، دیگر فاکتور ویروانس STEC پروتئینی به نام Intimin با وزن مولکولی ۹۴ کیلو دالتون موجود در غشای خارجی باکتری است که مسئول چسبندگی به سلول های اپیتلیوم روده می باشد و توسط ژن *eae* رمز می شود (۲). آلودگی انسان با این باکتری از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده یا انتقال شخص به شخص صورت می گیرد (۳). سوبه های اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین در اواخر دهه ۱۹۷۰ به عنوان عامل اتیولوژیک اسهال در کانادا شناسایی شدند (۴). سوبه های اشریشیاکلی وروتوکسیژنیک، توکسینی ترشح می کنند که به دلیل توانایی آن در کشتن سلول های vero، وروتوکسین و به دلیل شباهت آن به نورو توکسین شیگای مترشح از شیگلا دیسلانتری تیپ I، توکسین شبیه شیگاتوکسین نامیده شده و سوبه های تولید کننده آن نیز به STEC معروف می باشند. ژن تولید کننده وروتوکسین بر روی ژنوم باکتريوفاژ معتدل قرار دارد و توسط تبدیل فاژی به اشریشیاکلی وارد می گردد. توکسین های vero به دو گروه *stx1*, *stx2* تقسیم بندی می گردند. وروتوکسین با اثر بر روی RNA ریبوزومی سبب ممانعت از سنتز پروتئین ها می شود، توانایی باکتری اشریشیاکلی O:157 H:7 در ایجاد بیماری های شدید برای انسان، به دلیل ترشح شیگاتوکسین های *stx1* و *stx2* یا وروتوکسین های *vt2* و *vt10* و واریته های این توکسین است (۵). شناسایی این سوبه ها به طور روتین در آزمایشگاه ها انجام نمی گیرد و پژوهشگران درصدد یافتن راه های ساده برای غربالگری این باکتری ها هستند (۶). هموزن بودن این سوبه از نظر ژنتیکی سبب یافتن متدهای زیادی برای جداسازی این سوبه ها نظیر عدم قدرت تخمیر سوربیتول و عدم تولید بتا دی گلوکورونیداز است که بیشتر انواع اشریشیاکلی قادر به انجام آن می باشند. از این جهت با ساختن محیط های انتخابی نظیر سوربیتول مکانکی آگار، سفیکسیم پتاسیم تلوریت سوربیتول مکانکی آگار و سفکسیم پتاسیم تلوریت رامنوز سوربیتول مکانکی آگار می توان این سوبه ها را غربالگری کرد (۷). اشریشیاکلی به عنوان یکی از مهم ترین باکتری ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی نقش حائز اهمیتی را در بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی بر عهده دارد. این باکتری عامل مهم اسهال و اختلالات گوارشی در کشورهای درحال توسعه و مکان های با فقر بهداشتی است. بیماری های اسهالی مهم ترین مشکل سلامت عمومی در سرتاسر جهان هستند و سالانه منجر به مرگ بیش از دو میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه می شوند (۸). از آنجاکه تاکنون در مورد فراوانی ژن های *stx1* و *stx2* در سوبه های شیگاتوکسین اشریشیاکلی جدا شده از فرآورده های دریایی در استان بوشهر، صورت نگرفته است، در این تحقیق برآن شدیم تا ضمن جداسازی این باکتری فراوانی ژن های *stx1*, *stx2* و *eaeA* را نیز مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش ها

این مطالعه تعداد ۴۰۰ نمونه از فرآورده های دریایی (۱۰۰ نمونه میگو که ۵۰ نمونه به صورت بسته بندی شده و ۵۰ نمونه به صورت غیر بسته بندی از مراکز فروش میگو و ۳۰۰ نمونه ماهی ۱۰۰ نمونه به صورت بسته بندی شده و ۲۰۰ نمونه به صورت غیر بسته بندی از مراکز فروش ماهی) در استان بوشهر تهیه گردید و با رعایت زنجیره سرما و در شرایط استریل به آزمایشگاه کنترل کیفی اداره کل دامپزشکی استان بوشهر انتقال داده شدند.



## مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

به منظور غنی‌سازی ۲۵ گرم از هر نمونه (از قسمت‌های سطحی و داخلی) جداسازی و به شکل هموژن شده به ۲۲۵ سی‌سی محیط تریپتیک سوی برات (difco, TSB) حاوی ۲۰ mg/l نووبیوسین کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس برای جداسازی باکتری، تمام نمونه‌های غنی‌شده بر روی محیط سوربیتول مک‌کانکی آگار حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر سفکسیم، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تلوریت پتاسیم، کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلونی‌های سوربیتول منفی، خالص‌سازی گردید. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری‌های جداسازی شده از محیط ویولت رد بایل آگار (VRBA Merck) و متیلن بلو آگار (EMB Merck) استفاده شد. در نهایت به منظور تشخیص قطعی /شریشیاکلی، از کلنی‌های ایزوله تشکیل‌شده بر روی محیط EMB تست‌های بیوشیمیایی تأییدی IMVIC و TSI بر روی کلنی‌ها انجام گرفت. به منظور تأیید تشخیص قطعی باکتری /شریشیاکلی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16srRNA* واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز صورت پذیرفت (۹ و ۱۰). جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت‌سنجی DNA تخلیص‌شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند. آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی /شریشیاکلی با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن ۲ میکرولیتر از پرایمرهای F و R، یک میکرولیتر از DNA الگو و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر به محتویات کیت Accupower PCR PreMix انجام گرفت. ترکیبات موجود در کیت در جدول شماره یک نشان داده شده است. تمام نمونه‌های باکتری /شریشیاکلی با تکثیر PCR قطعه ۲۰۰ جفت باز ژن *16srRNA* تأیید شدند. در این تحقیق /شریشیاکلی ATCC 25922 و سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند (۹).

جدول ۱. اجزای کیت Accupower PCR PreMix

Component	20 µl Reaction
Taq DNA Polymerase	1 U
Each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCl (pH=9)	10 mM
KCl	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Stabilizer and tracking	

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA* به صورت ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مشاهده باند ۲۰۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن تست است (۹). به منظور بررسی ژن‌های *stx1*، *stx2* و *eaeA* در حضور زوج پرایمرهای نشان‌دهنده در جدول شماره دو واکنش PCR صورت پذیرفت.

جدول ۲. توالی پرایمر های مورد استفاده برای ردیابی ژن های *stx1*, *stx2* و *eaeA* در ایزوله های اشریشیاکلی.

Gene	Sequence (5'-3')	Annealing (°C)	Size of product (bp)
<i>Stx1</i>	F: ACACTGGATGATCTCAGTGG R: CTGAATCCCCCTCCATTATG	58	614
<i>Stx2</i>	F: CCATGACAACGGACAGCAGTT R: CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	58	779
<i>eaeA</i>	F: GTGGCGAATACTGGCGAGACT R: CCCATTCTTTTTTCACCGTGC	58	890
<i>16srRNA</i>	16S-F, GCGGACGGGTGAGTAATGT 16S-R, TCATCCTCTCAGACCAGCTA	-	200

آزمایش PCR به منظور تشخیص ژن های *stx1*, *stx2* و *eaeA* با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix ساخت BioNEER در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با افزودن ۲۰ پیکومول از پرایمرهای F و R، ۴ میکرولیتر از DNA الگو و ۱ واحد آنزیم تک پلیمرز به محتویات کیت انجام گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن های *stx1*, *stx2* و *eaeA* به صورت ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به منظور تائید وجود قطعه تکثیر شده از الکتروفورز محلول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد (۱۱).

## نتایج

مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی ژن های *stx1*, *stx2* و *eaeA* در ایزوله های اشریشیاکلی مولد شیگاتوکسین جدا شده از ماهی و میگو استان بوشهر در فصل بهار انجام گرفت. پس از بررسی نمونه های گرم خانه گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط EMB آگار، نمونه هایی که کلنی سبز رنگ دارای جلای فلزی داشتند، به عنوان باکتری اشریشیاکلی، در نظر گرفته شدند. در نمونه هایی که به صورت بسته بندی مورد بررسی قرار گرفتند، باکتری اشریشیاکلی جدا نگردید اما در نمونه های غیر بسته بندی از تعداد ۲۰۰ نمونه ماهی مورد بررسی در ۳۵ نمونه (۱۷/۵ درصد) اشریشیاکلی جداسازی و از ۵۰ نمونه میگوی مورد بررسی در ۱۰ نمونه (۲۰ درصد) اشریشیاکلی جداسازی گردید. از ۳۵ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از ماهی، ۱۰ ایزوله دارای واکنش سوربیتول منفی و واکنش لاکتوز مثبت داشتند و از ۱۰ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از میگو سه ایزوله دارای واکنش سوربیتول منفی و واکنش لاکتوز مثبت داشتند و در محیط EMB جلای سبز فلزی نشان دادند. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.



## مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

جدول ۳. تعداد و درصد موارد مثبت سویه‌های مولد شیگاتوکسین و سویه‌های غیر شیگاتوکسین در ایزوله‌های اشریشیاکلی از نمونه‌های غیر بسته‌بندی شده.

Serotype	تعداد و درصد موارد مثبت در	
	نمونه‌های ماهی	نمونه‌های میگو
STEC	۱۰	۳
	۵درصد	۶درصد
Non STEC	۲۵	۷درصد
	۱۲/۵درصد	۱۴درصد
Total	۳۵	۱۰درصد
	۱۷/۵درصد	۲۰درصد

پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی اشریشیاکلی و حضور توالی ژن *I6SrRNA*، در ۴۵ نمونه مورد بررسی مثبت تشخیص داده شد. مشاهده باند ۲۰۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد. پس از انجام آزمون Multiplex PCR در حضور پرایمرهای اختصاصی، از ۳۵ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از ۲۰۰ نمونه ماهی بسته‌بندی نشده، ۱۰ ایزوله STEC بوده که باندهای مربوط به ژن‌های *stx1*، *stx2* و *eaeA* به تنهایی در هیچ نمونه‌ای یافت نشد. در ۲ ایزوله (۲۰درصد) باند مربوط به ژن‌های *stx1*، *eaeA* و در ۱ ایزوله (۱۰درصد) باند مربوط به ژن‌های *stx1*، *stx2* و *eaeA* مشاهده گردید؛ بنابراین ژن *stx1* در ۳ نمونه (۳۰درصد)، ژن *stx2* در یک نمونه (۱۰درصد) و ژن *eaeA* در ۳ نمونه (۳۰درصد) در ماهی یافت شد. در ۳ ایزوله اشریشیاکلی ETEC جدا شده از ۵۰ نمونه میگوی بسته‌بندی نشده، تنها در ۱ نمونه ژن *stx1* (۳۳/۳۳ درصد) مشاهده گردید. در نتیجه از ۱۳ ایزوله اشریشیاکلی ETEC جدا شده از ۲۵۰ نمونه فرآورده‌های دریایی بسته‌بندی نشده، باندهای مربوط به ژن‌های *stx1*، *stx2* و *eaeA* به تنهایی در یک نمونه (۷/۶۹ درصد) یافت شد. در ۲ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) باند مربوط به ژن‌های *stx1*، *eaeA* و در ۱ ایزوله (۷/۶۹ درصد) باندهای مربوط به هر سه ژن *stx1*، *stx2* و *eaeA* مشاهده گردیدند؛ بنابراین ژن *stx1* در ۳ نمونه (۳۰/۷۶ درصد)، ژن *stx2* در ۱ نمونه (۷/۶۹ درصد) و ژن *eaeA* در ۳ نمونه (۲۳/۰۷ درصد) در فرآورده‌های دریایی یافت شد.

### بحث

دریای عمان و خلیج فارس، این آبراه سرشار از مواهب خدادادی، با مساحتی حدود ۲۳۹۰۰۰ کیلومترمربع و مرز آبی حدود ۱۸۰۰ کیلومتر، از دماغه گوآتر آغاز و تا اروندرود ادامه یافته است. این آبراه حساس اقتصادی با عمقی حدود ۷۰ تا ۹۰ متر، از دیرباز مسیر داد و ستد و مرکز تمدن و پیشرفت بشر بوده و هست. عمق سواحل آن کم است و از ۲۰ متر تجاوز نمی‌کند، لذا از نظر صیادی و بهره‌برداری از منابع دریایی و صید ماهی و میگو اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به اهمیت اقتصادی ماهی و میگو در این تحقیق بر آن شدیم تا به فراوانی بعضی از فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از ماهی و میگو در

استان بوشهر بپردازیم. *شریشکلی* عموماً به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می شود، به این علت نقش مهمی را در میکروبی شناسی غذا و آب به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی به عهده دارد. سویه های *شریشکلی* مولد *شیگاتوکسین* از مهم ترین باکتری های بیماری زای منتقل شونده به وسیله مواد غذایی هستند. این سویه ها باکتری های کومانسال نشخوارکنندگان و گوسانان می باشند که از طریق مواد غذایی به ویژه گوشت های نیم پز مانند همبرگر و سبزی ها خام مانند کاهو و اسفناج به انسان منتقل می شوند (۱۲).

تحقیقات محدودی در مورد بررسی فراوانی ژن های ویروالانس در سویه های STEC جدا شده از فرآورده های دریایی صورت گرفته است. در این تحقیق که برای اولین بار در استان بوشهر صورت گرفت، از ۲۵۰ نمونه فرآورده های دریایی غیر بسته بندی شده، ۴۵ نمونه (۱۸ درصد) آلوده به *شریشکلی* بوده و از این تعداد ۱۳ ایزوله (۲۸/۸۹ درصد) STEC بودند. از ۲۰۰ نمونه ماهی که به صورت غیر بسته بندی تهیه شده بود، در ۳۵ نمونه (۱۷/۵ درصد) *شریشکلی* جداسازی گردید و از ۵۰ نمونه میگوی غیر بسته بندی مورد بررسی در ۱۰ نمونه (۲۰ درصد) *شریشکلی* جداسازی گردید. از ۳۵ ایزوله *شریشکلی* جدا شده از ماهی، ۱۰ ایزوله (۲۸/۵۷ درصد) دارای واکنش سوربیتول منفی و واکنش لاکتوز مثبت داشتند و از ۱۰ ایزوله *شریشکلی* جدا شده از میگو ۳ ایزوله (۳۰ درصد) دارای واکنش سوربیتول منفی و واکنش لاکتوز مثبت داشتند که به عنوان سویه های مولد *شیگاتوکسین* مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون PCR به منظور بررسی فراوانی ژن های *eaeA*، *stx2*، *stx1* در ایزوله های مولد *شیگاتوکسین* جدا شده از ماهی، ژن های *eaeA* و *stx1* در ۲ ایزوله (۲۰ درصد) و ژن های *eaeA*، *stx2*، *stx1* با هم در یک ایزوله (۱۰ درصد) مشاهده گردیدند؛ اما در ایزوله های جدا شده از میگو تنها در یک نمونه (۳۳/۳۳ درصد) ژن *stx1* مشاهده گردید. در نتیجه از ۱۳ ایزوله *شریشکلی* ETEC جدا شده از ۲۵۰ نمونه فرآورده های دریایی بسته بندی نشده، باندهای مربوط به ژن های *stx1*، *stx2* و *eaeA* به تنهایی در یک نمونه (۷/۶۹ درصد) یافت شد. در ۲ ایزوله (۱۵/۳۸ درصد) باند مربوط به ژن های *stx1*، *eaeA* و در یک ایزوله (۷/۶۹ درصد) باندهای مربوط به هر سه ژن *stx1*، *stx2*، *eaeA* مشاهده گردیدند؛ بنابراین ژن *stx1* در ۳ نمونه (۳۰/۷۶ درصد)، ژن *stx2* در یک نمونه (۷/۶۹ درصد) و ژن *eaeA* در ۳ نمونه (۲۳/۰۷ درصد) در فرآورده های دریایی یافت شد. برخی از سویه های مولد *شیگاتوکسین* هیچ کدام از ژن های مورد نظر را نداشتند و همچنین به ندرت سویه هایی دیده می شود که تمامی ژن ها را داشته باشند. سویه هایی که هم زمان دارای چند ژن باشند، به عنوان سویه های با بیماری زایی بیشتر در نظر گرفته می شوند. مطالعات محققان دیگر در زمینه میزبان آلودگی ماهی به باکتری *شریشکلی* نشان دهنده بالاتر بودن میزان آلودگی نسبت به تحقیق ما هست، به طوری که Gupta و همکاران آلودگی به *شریشکلی* را در ۹۶ نمونه ماهی را ۴۸/۹۵ درصد گزارش کردند که نسبت به تحقیق ما بسیار بالاتر می باشد. در همین تحقیق فراوانی ژن *stx1* ۷۶/۵۹ درصد و فراوانی ژن *stx2* ۵۱/۰۶ درصد گزارش گردید در حالی که ۳۷/۰۳ درصد از نمونه ها هم زمان دو ژن *stx1* و *stx2* را داشتند (۱۳). مطالعات انجام شده در ایران به منظور بررسی فراوانی ژن های ویروالانس در باکتری *شریشکلی* بیشتر بر روی گوشت و یا فرآورده های لبنی صورت گرفته است، به طوری که در این مطالعات مشخص گردیده معمولاً در طی کشتار، پوست گاوسانان با این باکتری آلوده می شوند و به عنوان یک فاکتور خطر برای آلوده نمودن محصولات گوشتی دارای اهمیت می باشد. به طوری که Barkocy در سال ۲۰۰۳ میزان آلودگی پوست گاو با *شریشکلی* *E. coli* O157:H7 را ۶۰/۶ درصد گزارش کردند (۱۴). در تحقیق انجام شده توسط کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۲ از ۴۲۸ نمونه همبرگر جمع آوری شده در شیراز ۲۶۴ نمونه (۶۱/۶۸ درصد) به عنوان باکتری *شریشکلی* تولیدکننده *شیگاتوکسین* تشخیص داده شدند، که با انجام تست تأییدی ۵ نمونه (۱/۸۹ درصد)



## مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

درصد) باکتری/شریشیالکی O157 H7 تشخیص داده شدند. در این تحقیق ۲ ایزوله (۷۶/۰ درصد) دارای ژن‌های *eaeA* و *stx1* بودند (۱۵). در تحقیق انجام‌شده توسط Sanath Kumar و همکاران در ۲۰۰۹ بر روی آلودگی ماهی و صدف، سویه‌های STEC شریشیالکی به ترتیب ۳ درصد و ۵ درصد گزارش گردید در این تحقیق سروتیپ O69 به‌عنوان غالب‌ترین سروتیپ مشخص گردید (۱۶).

### نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

در این تحقیق و تحقیقات محققان دیگر مشخص گردید که فراوانی ژن *stx1* از ژن *stx2* بیشتر می‌باشد. به‌این ترتیب می‌توان بیان نمود که الگوی ژنتیکی غالب *stx1* می‌باشد. سروتیپ بسیار مهم/شریشیالکی مولد شیکاگاتوکسین *E. coli* O:157 H:7 می‌باشد که به‌طور طبیعی در گاوسانان وجود دارد. مطالعات نشان داده است که حداکثر دفع این باکتری از طریق مدفوعی طی تابستان و اوایل پاییز صورت می‌گیرد و از صفر تا ۶۱ درصد در مزارع دامی متغیر است و هم‌چنین تحقیقات نشان می‌دهد که بیشترین میزان جداسازی این باکتری در ماه‌های گرم سال صورت می‌گیرد. با توجه به دوز عفونی اندک سویه‌های مولد شیکاگاتوکسین باکتری/شریشیالکی پایش مستمر و هم‌زمان انواع نمونه‌های مواد غذایی و کلینیکی در تمام نقاط کشور توصیه می‌شود.

### تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در جمع‌آوری نمونه برای این پژوهش یاری رسانده‌اند تشکر می‌نماییم.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

### فهرست منابع

- [1]. Xia X, Meng J, McDermott PF, Ayers S, Blickenstaff K, Tran TT, Abbott J, Zheng J, Zhao S. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(6):1709-17.
- [2]. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, Alonso MP, Echeita A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J. 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 Microbiology*. 2007;7(1):1-9.
- [3]. Wang J, Zhang H, Allen RD. Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*. 1999;40(7):725-32.
- [4]. Ali, MY, Rahman MT, Islam MA, Choudhury KA and Rahman MA. Characteristics of *E. coli* isolates of human and animal origin. *Progressive Agriculture*. 1998;9: 221-24
- [5]. Adwan K, Abu-Hasan N, Essawi T, Bdir M. Isolation and characterisation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains from northern Palestine. *Journal of medical microbiology*. 2002;51(4):332-5.
- [6]. Goldwater PN, Bettelheim KA. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC medicine*. 2012;10(1):1-8.
- [7]. Kerrn MB, Klemmensen N, Frimodt-Moller F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50:513-6.
- [8]. Heiman KE, Mody RK, Johnson SD, Griffin PM, Gould LH. *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(8):1293

- [9]. Bakhtiari S, Mahmoudi H, Seftjani SK, Amirzargar MA, Ghiasvand S, Ghaffari ME, Adabi M. Antibiotic resistance pattern and phylogenetic groups of the uropathogenic *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Hamedan, west of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2020;12(5):388..
- [10]. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1989;2(1):15-38.
- [11]. Ziauddin A H, Gholami-Ahangaran M, Ahmadi-Dastgerd A I. Detection of virulence genes of intimin, hemolysin and shigatoxin in *Escherichia coli* isolated from Piscitacin. *NCMBJ*. 2020; 10 (38) :61-68
- [12]. Ostroff SM, Griffin PM, Tauxe RV, Shipman LD, Greene KD, Wells JG, LEWIS JH, Blake PA, Kobayashi JM. A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections in Washington State. *American Journal of Epidemiology*. 1990 1;132(2):239-47.
- [13]. Gupta B, Ghatak S, Gill JP. Incidence and virulence properties of *E. coli* isolated from fresh fish and ready-to-eat fish products. *Veterinary World*. 2013;6(1).
- [14]. Barkocy-Gallagher GA, Edwards KK, Nou X, Bosilevac JM, Arthur TM, Shackelford SD, Koohmaraie M. Methods for recovering *Escherichia coli* O157: H7 from cattle fecal, hide, and carcass samples: sensitivity and improvements. *Journal of food protection*. 2005;68(11):2264-8.
- [15]. Kargar M, Dianati P, Homayoon M, Jamali H. Isolation, characterization and antibiotic resistance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in hamburger and evolution of virulence genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hly* by multiplex PCR. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2013;3(3):208-14.
- [16]. Sanath Kumar H, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 2001 Nov 6;33(5):334-8.



“This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws”.



## Prevalence of *stx1*, *stx2*, and *eaeA* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from fish and shrimp in Bushehr, Iran

Parisa Behshood<sup>1</sup>, Elahe Tajbakhsh<sup>2</sup>, Fahimeh Nourbakhsh<sup>3\*</sup>

1. Ph.D. Department of Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph.D. Department of Biology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3. Ph.D. Medical Toxicology Research Centre, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.



\*Corresponding author: [nourbakhshf951@mums.ac.ir](mailto:nourbakhshf951@mums.ac.ir)

Received: 2022/05/28

Accepted: 2022/06/21

### Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is an important pathogen in food-borne diseases, and several food-borne epidemics around the world have been linked to this bacterium. Contamination with this organism causes watery and bloody diarrhea. In this study, 400 fish and shrimp samples were prepared in Bushehr province, and the presence of *Escherichia coli* was confirmed by conducting microbiological and molecular tests, and the abundance of *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes was investigated in the presence of a pair of specific primers. *Escherichia coli* was not isolated in the packaged samples, but in non-packaged samples, out of 200 fish samples, *Escherichia coli* was isolated in 35 samples (17.5%) and out of 50 shrimp samples in 10 samples (20%) of *Escherichia coli* were isolated. After performing the multiplex PCR test in the presence of specific primers, *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes were not found alone banned in any of the strains isolated from fish. In two isolates (20%), the band related to *stx1* and *eaeA* genes and in one isolate (10%) the band related to *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes were observed, while in *Escherichia coli* strains isolated from shrimp, only in one sample (33.33%) *stx1* gene was observed. In this research, it was found that the frequency of *stx1* gene is higher than *stx2* gene. In this way, it can be stated that the genetic pattern is *stx1* dominant.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Shiga toxin, sea products, *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes.

**How to cite this article:** Behshood P, Tajbakhsh E, Nourbakhsh F. Prevalence of *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from fish and shrimp in Bushehr. Journal of Zoonosis. 2022; 2 (1): 1-9.