مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی
JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

سال دوم، شماره اول، زمستان ۱۳۸۹
صفحات ۳۸-۳۳

شناسایی مولکولی باکتری های E.coli انتروتوکسیژنیک جدا شده از گوساله های مبتلا به اسهال استان البرز درسال ۱۳۸۹

هادی پورتقی شتربان[۱*]، وحید ده پهلوان[۲]، علیرضا شقایق[۳]، آریا بدیعی[۳]

۱. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

۲. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

۳. گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

** نویسنده مسئول:* hadi.poortaghi@kiau.ac.ir

چکیده

باکتری اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) معمول ترین نوع کلی باسیلوز در گوساله هاست که باعث بروز اسهال می شود. مهمترین عوامل مرتبط با بیماری زایی ETEC توانایی چسبیدن به انتروسیت ها به خصوص از طریق فیمبریه K99 و F41 و تولید انتروتوکسین های مختلف به خصوص انتروتوکسین مقاوم به حرارت St است. در مطالعه حاضر حضور باکتری ETEC در بین E.coli های جدا شده از موارد اسهال در گوساله های زیر یک ماه در استان البرز بررسی شد. برای این منظور مطالعه مولکولی بر روی سه ژن حدت K99، F41 و Sta مربوط به عوامل بیماری زای ETEC طی دوره زمانی خرداد تا آذر ۱۳۸۹ انجام گرفت. بر این اساس در بین ۶۰ E.coli جداسازی شده، شش مورد (۱۰%) باکتری ETEC شناسایی شد. همه نمونه های مثبت از نظر سن، کمتر از یک هفته و پنج مورد (۸۳/۳%) نیز سن کمتر از چهار روز داشتند. تمام ETEC های شناسایی شده واجد هر سه ژن حدت بودند.

واژه‌های کلیدی: انتروتوکسیژنیک اشریشیا کولی (ETEC)، اسهال گوساله ها، mPCR

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 2(1)33-38 2011

Molecular detection of diarrheagenic entrotoxigenic escherichia coli (ETEC) from calves fecal samples in Alborz province

Pourtaghi-shotorban H.[1*], Dahpahlevan V.[2], Shaghayegh A. [3], Badiee A. [3]

1.Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad university, Karaj Branch, Iran

2.Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad university, Karaj Branch, Iran

3.Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad university, Karaj Branch, Iran

***Corresponding author:** hadi.poortaghi@kiau.ac.ir

Entrotoxigenic Escherichia coli (ETEC) infection is one of the most common type of calves colibacillosis. The main virulence attributes to ETEC are adhesions (especially K99 and F41 fimberia) and neurotoxins (specially heat stable toxin). In the present study we detected ETEC from E.coli that were isolated from diarrheic calves at 1-30 days old in Alborz province. Therefore, we conducted molecular study based detection of virulence genes K99, F41 and Sta during May to November 2010. Among 60 isolated E.coli from calves diarrhea six (10%) ETEC were detected. All the positive cases were calves with less than 7 days old, which 5 cases (83/3) were less than 4 days old. All detected ETEC possed three virulent genes.

Key words: *ETEC,Calves diarrhea, mPCR*

مقدمه

اسهال در گوساله ها مشکلی بسیار جدی و مهم بوده و یکی از علل مهم زیان اقتصادی در هر دامداری بواسطه ایجاد مرگ و میر، تحمیل هزینه های درمان و کاهش رشد گوساله ها است (۱). باکتری اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک (ETEC)، روتاویروس، کروناویروس و کریپتوسپوریدیوم چهار عامل مهم ایجاد کننده اسهال در گوساله های نوزاد هستند (۹). باکتری های ETEC باعث بروز اسهال آبکی در گوساله های تازه متولد شده می شوند. باکتری های ETEC بدون اینکه تغییر شکلی در اپیتلیوم روده کوچک ایجاد کنند به آن چسبیده و با تولید توکسین های روده ای (Entrotoxins) در عملکرد انتروسیت ها تداخل کرده و باعث افزایش ترشح و کاهش جذب می شوند. بنابراین مهمترین فاکتور های مرتبط با بیماری زایی در ETEC فیمبریه به عنوان عامل چسبنده و انتروتوکسین های ترشحی می باشد (۵). به دلیل اختصاصی بودن اتصال فیمبریه به گلیکوپروتین سطح انتروسیت ها، باکتری های ETEC هر گونه تقریباً اختصاصی همان گونه است. در اتصال ETEC به انتروسیت های روده کوچک گوساله ها فیمبریه های مختلف از جمله K99، F41 و 987P که در این بین دو فیمبریه اول پر اهمیت تر هستند. باکتری E.coli پس از اتصال به انتروسیت از طریق تولید انتروتوکسین باعث بروز اسهال می شود. اگر انتروتوکسین توسط باکتری اتصال یافته تولید نشود، اسهال نیز بروز نمی کند. انتروتوکسین حساس به حرارت LT غالباً توسط ETEC های انسان و خوک تولید می شود در حالیکه در گوساله ها باکتری های ETEC عمدتاً با تولید توکسین مقاوم به حرارت ST باعث بروز اسهال می شوند (۲).

با توجه به اینکه E.coli فلور میکروبی طبیعی روده می باشد، کشت و جداسازی و شناسایی این باکتری با استفاده از روش های بیوشیمایی نمی تواند بیانگر مسبب بودن E.coli در ایجاد اسهال باشد. از طرف دیگر روش ELISA به واسطه اینکه تنها قدرت شناسایی فیمبریه K99 را دارد، روش کاملاً دقیقی در شناسایی باکتری های ETEC نیست.

هدف از انجام این تحقیق شناسایی باکتری های ETEC بر مبنای حضور سه ژن مهم حدت K99، F41 و Sta در باکتری های جدا شده از موارد اسهال در استان البرز، همراه با ارزیابی ریسک فاکتورهای مرتبط می باشد.

مواد و روش ها

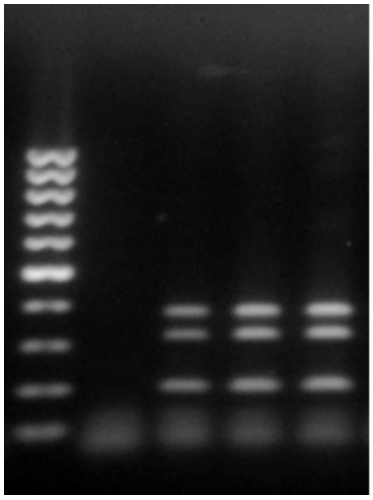
با استفاده از لوله و سواب استریل از رکتوم گوساله های دچار اسهال نمونه گیری انجام شد. تعداد ۲۹ نمونه از گاوداری های صنعتی، ۱۶ نمونه از گاوداری های نیمه صنعتی و ۱۵ نمونه از گاوداری های سنتی واقع در استان البرز و در مجموع ۶۰ نمونه تهیه شد. نمونه ها در کنار یخ و در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شده و با روش های معمول کشت باکتری E.coli مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین صورت که ابتدا کشت خطی در محیط مکانگی آگار و EMB آگار تهیه شد و در مورد کلونی های لاکتوز منفی مشکوک به E.coli واکنش IMViC در محیط کشت های SIM، MRVP، Simone Citrate و TSI انجام گرفت. باکتری هایی که از نظر بیوشیمیایی E.coli تشخیص داده شدند در محیط نوترینت براث و در حضور ۲۰% گلیسرول در دمای c °۷۰- تا زمان نیاز نگهداری شدند. به دلیل اینکه ژن های K99 و Sta بر روی پلاسمید و ژن F41 بر روی کروموزوم قرار دارد، استخراج کل DNA باکتری ها با انجام تغییراتی طبق روش سپهری سرشت انجام شد (۷). برای این منظور از روش جوشاندن (Boiling) برای استخراج ژنوم باکتری ها استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته در محیط نوترینت براث با ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شدند و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند تا تمام DNA آزاد گردد، سپس سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام گرفته و از مایع روی به عنوان DNA کل در واکنش mPCR استفاده شد. واکنش mPCR با انجام تغییراتی در حجم ۵۰ میکرولیتر و با ترکیب زیر طبق روش

شمس استفاده شد: ۵ میکرولیتر بافر PCR ×۵، ۲ میکرولیتر منیزیم کلراید (MgCl2) ۲۵ میلی مول، ۱ میکرولیتر مخلوط d NTP ۲ میلی مول، ۳ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پیلمراز، ۶ میکرولیتر مخلوط جفت پرایمرها، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۳۱ میکرولیتر آب استریل PCR grade (۹).

واسرشت اولیه زنجیر الگو (Denaturation Early) در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. واکنش PCR در ۳۵ سیکل انجام گرفت. بدین صورت که دناتوریشن در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. Annealing در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و Extension در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. Extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه انجام گرفت. برای کنترل مثبت از نمونه باکتری ETEC که از دانشگاه تهران گرفته شده بود استفاده شد، برای کنترل منفی در کنار تمام اجزای mPCR به جای الگو از آب مقطر استفاده شد. برای دیدن محصول مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول نهایی در ژل آگاروز ۱% تهیه شده از بافر TBE استفاده شد. برای شناسایی وزن مولکولی محصولات از مارکر bp ۱۰۰۰-۱۰۰ استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه بر روی ۶۰ نمونه اسهال گوساله که ۲۹ مورد (۴۸/۳%) از گاوداری های صنعتی، ۱۶ مورد (۲۶/۷%) از گاوداری های نیمه صنعتی و ۱۵ مورد (۲۵%) از گاوداری های سنتی بودند بررسی انجام شد. از ۶۰ نمونه E.coli جدا شده از موارد اسهال شش مورد (۱۰%) ETEC شناسایی شد. تمام باکتری های ETEC جدا شده در mPCR واجد هر سه ژن حدت به صورت توام بودند. محصول نهایی با پرایمرهای مورد استفاده پس از الکتروفورز بر روی ژل برای K99 قطعه ای به اندازه برای F41 قطعه ای به اندازه bp380 و برای Sta قطعه ای به اندازه 190 bp بود (تصویر ۱).



تصویر ۱: ژل الکتروفورز محصول M.mPCR مارکر، ۱ کنترل منفی، ۲ کنترل مثبت، ۳ و ۴ دو نمونه مثبت

در بررسی ارتباط ریسک فاکتورهای مختلف با ETEC مشخص شد که همه گوساله های مثبت از نظر ETEC سن کمتر از یک هفته داشته اند و به طور مشخص تمام موارد مثبت به غیر از یک مورد در گوساله های با سن زیر چهار روز دیده شد (۸۳/۳۳%). در بررسی پرسشنامه ها مشخص شد که از شش مورد باکتری ETEC شناخته شده چهار مورد از گوساله هایی جدا شد که برای کنترل اسهال در آنها آنتی بیوتیک تجویز شده بود. پنج مورد مثبت از گاوداری های سنتی و یک مورد از گاوداری های نیمه صنعتی جداسازی شد. هیچ نمونه مثبتی از گاوداری های صنعتی جداسازی نشد. تمام موارد ETEC شناخته شده مربوط به جنس نر بودند.

بحث و نتیجه گیری

سندرم اسهال از مهمترین بیماری های ماه اول زندگی در گوساله ها می باشد و اسهال ناشی از اشریشیاکلی از مهمترین اسهال های رایج در هفته اول زندگی می باشد. در این میان سویه های ETEC بیشترین فراوانی را در چهار روز نخست زندگی گوساله دارد (۳ و ۶). در مطالعه حاضر نیز میزان ۸۳/۳% نمونه های مثبت از نظر ETEC از گوساله های زیر چهار روز جدا شد.

مقادیر مختلفی از موارد اسهال ناشی از ETEC در کشور گزارش شده، در مطالعه شمس و همکاران که با روش mPCR در استان فارس انجام گرفته این میزان ۵/۳% بود (۹) در صورتیکه در مطالعه لطف اله زاده و همکاران که با روش آگلوتیناسیون در شهرستان ها بابل و قائم شهر انجام گرفت، این میزان ۱/۰۷% گزارش شد (۴). در مطالعه حاضر که با روش mPCR در استان البرز انجام گرفته میزان ETEC جدا شده از موارد اسهال ۱۰% است. به نظر می رسد که بخشی از تفاوت ها مربوط به متفاوت بودن میزان شیوع اسهال ناشی از ETEC در این مناطق می باشد. ضمن اینکه حاسیت و ویژگی روش های به کار رفته نیز متفاوت می باشد.

درمطالعه شمس ۲۵% از موارد مثبت از نظر ژن K99 و F41 فاقد ژن Sta بودند و لذا نمی توان این جدایه ها را ETEC تلقی نمود (۹). لذا شناسایی باکتری های ETEC ایجاد کننده اسهال در گوساله ها اگر فقط بر مبنای فیمبریه K99 باشد احتمال بروز اشتباه وجود خواهد داشت. تمامی موارد مثبت گزارش شده در مطالعه حاضر دارای هر سه ژن حدت بودند. اگر چه همه گوساله های اسهالی آلوده با ETEC از نظر جنس نر بودند ولی رابطه معنی داری بین جنسیت و بروز اسهال توسط ETEC برقرار نیست. در مطالعه به علت اینکه ۶۵% از نمونه های اسهال جمع آوری شده، از جنس نر بودند، تا حدی فراوانی بیشتر ETEC در این جنس قابل انتظار است. دلیل اینکه اکثر نمونه های اسهالی اخذ شده از جنس نر هستند را می توان تا حدودی عدم توجه لازم به جنس نر دانست چون که دراغلب گاوداری های صنعتی و نیمه صنعتی شیری گوساله های نر را پس از شیرگیری به فروش می رسانند و حتی در برخی واحدها مقدار و روزهای شیردهی آنها را کمتر از گوساله های ماده، در نظر می گیرند.

جداسازی ETEC از گوساله هایی که ۲۴ ساعت از درمان با آنتی بیوتیک در آنها می گذرد نشانگر عدم موثر بودن آنتی بیوتیک تجویز شده بر روی باکتری ETEC و یا آسیب دیدن هر چه بیشتر فلور میکروبی نرمال روده و فراهم شدن شرایط برای کلونیزه شدن باکتری ETEC می باشد. لذا انجام آنتی بیوگرام برای درمان صحیح و موثر اسهال ناشی از ETEC ضروری می باشد (۷ و ۸).

References

1- Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R. G. (2004) Bovine medicine disease and husbandry of cattle. 2nd ed, Blackwell Publishing. pp: 186-230

2- Al-Majali A. M., Asem E. K., Lamar C. H., Robinso, J. P., Freeman M. J., Saeed A. M. (2000) Studies on the mechanism of diarrhoea induced by Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa) in newborn calve. Veterinary Research Communications. 24: 327-338

3- Hirsh D. C., Zee, Y. C. (1999) Veterinary microbiology. Blackwell Science, Inc, Massachusetts. PP: 563

4- Lotfollahzadeh S., Ziaei Daroonkolai. N., Zahraei Sallehei. T., Poorbakhsh S. A., Mokhber Dezfouli. M. R., Afshari GH. R. (2005) A study on the presence of Escherichia coli, coccidian and cryptosporidium in stool samples of under month age diarrheic calves in Ghaemshahr and Babol and antibiotic sensivity of isolates. Journal of the faculty of veterinary medicine university of Tehran. 59: 131-136 (Text in Persian)

5- Nagy N., Fekete P. Z. (2005) Entrotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. International Journal of Medical Microbiology. 295: 443–454

6- Radostits O. M., Gay C., Blood D. C. (2000) Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 9th ed , W. B. Saunders, PP: 77-98

7- Sepehriseresht S., Salehi T. Z., Sattari M., Tadjbakhsh H., Aslani M. M. (2009) Detection of shigatoxigenic Escherichia coli from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. Comparative Clinical Pathology. 18: 53-57

8- Saei H. D., Ahmadi E., Kazemnia A. and Ahmadinia M. (2010) Molecular identification and antibiotic susceptibility patterns of Escherichia coli from sheep faeces samples. Comparative Clinical Pathology. Published online.

9- Shams Z., Tahamyan Y., Pourbakhsh A., Hosseiny M, H., Kargar M. and Hayati M. (2010): Detection of entrotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal samples of calves by molecular and serological method, Comparative Clinical Pathology, Published online.