فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۰، دوره ۱۵، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۱، صفحه ۱۱۸ تا ۱۲۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

ردیابی ژن‌های حدت شیگاتوکسین و اینتیمین در اشریشیاکلی جدا شده از یک کبوتر با علایم گوارشی: گزارش موردی

مجید غلامی آهنگران[۱]، مهرداد استادپور[۲]، آنیتا خانی[۲]

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. نویسنده مسئول: mgholami6@gmail.com
۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۸/۲۹ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲**

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیاکلی* به عنوان فلور در دستگاه گوارش تمام خونگرم‌ها و از جمله کبوتر یافت می‌شود. این باکتری دارای ژن‌های حدت زیادی است که از جمله می‌توان به شیگاتوکسین و اینتیمین اشاره کرد. اینتیمین مسئول اتصال *اشریشیاکلی* به سلول‌های مخاطی روده بوده و شیگاتوکسین باعث مرگ سلول می‌شود. هدف از مطالعه اخیر بررسی حضور این ژن های حدت در اشریشیاکلی جداشده از یک مورد عفونت گوارشی در کبوتر به منظور امکان بیماریزایی اشریشیاکلی با منشا کبوتر در انسان می باشد.

مواد و روش ها: سوآب کلواکی از یک کبوتر با علایم گوارشی ارجاع شده به کلینیک دامپزشکی تهیه شد. پس از کشت و خالص‌سازی، با تست‌های بیوشیمیایی به تأیید موارد آلودگی *اشریشیاکلی* پرداخته شد. سپس با استخراج DNA به‌روش جوشاندن، به ردیابی ژن‌های همولیزین، اینتیمین و زیر واحدهای ۱ و ۲ شیگاتوکسین (stx_1 و stx_2) پرداخته شد. ژن های مورد نظر با پرایمر های اختصاصی و براساس تکثیر ژن های هدف با طول قطعه مشخص (به ترتیب ۱۶۵، ۸۹۰، ۶۱۴ و ۷۷۹ جفت بازی) مورد شناسایی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد سویه *اشریشیاکلی* جدا شده از کبوتر با علایم اسهال واجد ژن‌های حدت شیگاتوکسین ۱ و اینتیمین بوده و فاقد ژن کد کننده همولیزین و شیگاتوکسین ۲ می‌باشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد ژن‌های حدت شیگاتوکسین ۱ و اینتیمین در کبوتر واجد علایم گوارشی قابل ردیابی است. لذا با توجه به این نتایج، بر خلاف تصورات قبلی، ممکن است پرندگان منشا اشریشیاکلی شیگاتوکسوژنیک باشند و ممکن است علایم اسهال در کبوتر با حضور *اشریشیاکلی* واجد ژن شیگاتوکسین و اینتیمین در ارتباط داشته باشد که لازم است برای اثبات آن بررسی‌های بیشتری انجام شود.

واژه‌های کلیدی: شیگاتوکسین، اینتیمین، همولیزین، *اشریشیاکلی*، کبوتر

مقدمه

پرندگان، به عنوان عامل مهمی در انتقال عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شوند. وجود مدفوع کبوتر به عنوان منشا باکتریایی می‌تواند عامل مهمی در انتقال انواع مختلف عفونت‌ها باشد. از جمله این عفونت‌ها می‌توان به عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری *اشریشیاکلی* اشاره کرد (۱۱). *اشریشیاکلی* در دستگاه گوارش کبوتر به صورت طبیعی وجود دارد و عواملی همچون استرس و عفونت‌های ویروسی و باکتریایی سبب ایجاد شرایطی مناسب جهت ایجاد بیماری توسط این باکتری می‌گردد (۱۳). از میان سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد اسهال، انواع تولید کننده توکسین شیگا یا (STEC) از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری های معده‌ای – روده‌ای در انسان می‌باشند. این سویه‌ها علاوه بر ایجاد مسمومیت غذایی در انسان توانایی ایجاد بیماری‌های شدیدی مانند اسهال خونی، کولیت خونریزی‌دهنده، 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 می باشد (۱۴). *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین و *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن از انواع پاتوتیپ بیماری‌زای گوارشی هستند که می‌توانند منجر به عوارض گوارشی در انسان شوند و به عنوان پاتوژن زئونوز بررسی می‌شوند. *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن با چسبیدن و اثرگذاری بر مخاط پوششی روده‌ها منجر به اسهال می‌گردد. این نوع *اشریشیاکلی* واجد ژن اینتیمین (eae) و پلاسمید eaf است اما *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین علاوه بر اینکه واجد ژن های اتصال و اثرگذاری هستند قادر به تولید شیگاتوکسین نیز می‌باشند که به عنوان یک فاکتور حدت بسیار مهم در *اشریشیاکلی* مولد اسهال نقش دارند (۲۱). این توکسین‌ها ابتدا از طریق یک گیرنده گلیکولیپیدی به نام gb_3 به سطح سلول متصل شده و سپس طی فرایند اندوسیتوز وارد سلول شده و طی یک روند آنزیمی با خارج کردن یک آدنین از 28s r RNA بخش 60s ریبوزوم فرایند سنتز پروتئین را در سلول مهار کرده و باعث مرگ سلول می‌شود (۱۷و ۱۹).

پروتئین اینتیمین یک پروتئین ۳۴ کیلو دالتونی غشای خارجی می‌باشد و به وسیله ژن اینتیمین کد می‌شود (۱۲). این پروتئین مسئول اتصال نزدیک باکتری به سلول‌های مخاطی روده و ایجاد آسیب طی مکانیسمی به نام اتصال و تخریب می‌باشد (۱). همولیزین از دیگر اگزوتوکسین‌های *اشریشیاکلی* است که خاصیت سیتوتوکسیک دارد و با ایجاد روزنه در سلول‌ها باعث تجزیه سلول می‌گردد. وجود ژن‌های کد کننده همولیزین مخصوصاً همولیزین A (*hly*A) با شدت عفونت رابطه مستقیم دارد به طوری که ۷۸ درصد *اشریشیاکلی* بیماری‌زای ایجاد کننده عفونت های مجاری ادراری واجد این ژن بوده‌اند (۶ و ۲۱).

در خصوص اهمیت انتقال آلودگی *اشریشیاکلی* از طریق مدفوع حیوانات گزارش‌های متعددی وجود دارد. مطالعات اولیه، اهمیت پرندگان وحشی را در انتقال *اشریشیاکلی* تأیید کرده است (۱۰). در مورد کلاغ و گاو ثابت شده که می‌توانند آب و مراتع را با مدفوع خود آلوده کنند (۲، ۷و ۱۸).

به نظر می‌رسد وجود ژن‌های حدت و از جمله شیگاتوکسین، همولیزین و اینتیمین در *اشریشیاکلی*، اهمیت این انتقال و ایجاد بیماری در میزبان را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای از ۲۲ سویه *اشریشیاکلی* شیگاتوکسوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال در مکزیک توسط گارسیا و همکاران در سال ۲۰۰۵، اکثر سویه‌ها یا ژن stx_2 و یا

ترکیبی از ژن‌های stx_1 و eaeA را داشته اند، به طوری که ۹ سویه ژن stx_2، ۹ سویه ژن‌های stx_1 -eaeA، ۳ سویه ژن stx_1 و یک سویه هم ژن‌های stx_1 -eaeA- hlyA را نشان دادند (۵) که نشان از اهمیت ژن‌های حدت مورد بررسی در ایجاد بیماری‌زایی در انسان است. اولین بار بررسی آلودگی پرندگان با *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین در سال ۱۹۹۷ مطرح شد که فراوانی *اشریشیاکلی* شیگاتوکسوژنیک در ۱/۶ درصد پرندگان وحشی ذکر شد. این پرندگان در تماس نزدیک با فارم‌های پرورشی طیور اهلی بودند که می‌توانستند با مهاجرت، امکان انتقال این جدایه را بین فارم‌ها فراهم کنند (۲۰). علاوه بر آن، در مطالعات قبلی ژن اینتیمین و شیگاتوکسین در سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از پرندگان ردیابی شده است. فراوانی *اشریشیاکلی* جدا شده از طوطی‌سانان حدود ۱۷/۱۱ درصد گزارش شده است و فراوانی *اشریشیاکلی* شیگاتوکسوژنیک را در پرندگان سالم ۴/۶ درصد بیان کرده اند. در آن مطالعه، ۸/۴۷ درصد مرغ عشق، آلودگی *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین را نشان دادند (۹).

حضور *اشریشیاکلی* شیگاتوکسوژنیک در دستگاه گوارش کبوترها برای اولین بار توسط کباسی در سال ۱۹۹۳ گزارش شد که سویه‌های *اشریشیاکلی* را قادر به القای اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول ها دانست (۱۵). در پرندگان زینتی، ضیاالدینی و همکاران در سال ۱۳۹۹ نشان دادند که ۱۸/۵۷ درصد از جدایه‌های *اشریشیاکلی* واجد ژن اینتیمین و ۴/۲۸ درصد واجد ژن stx بودند. ۲/۸۵ درصد واجد همولیزین و تنها یک جدایه واجد ژن‌های اینتیمین و همولیزین و stx به‌طور هم‌زمان بود. در آن مطالعه اگرچه منبع عفونت مشخص نیست اما به نظر می‌رسد نگهداری پرندگان زینتی در فروشگاه‌های عرضه‌کننده پرندگان زینتی در مجاورت کبوتران اهلی و وحشی و احتمال آلودگی کبوترها با *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین می‌تواند منشاء عفونت باشد (۲۱).

در کشورهای در حال توسعه، شناسایی عفونت‌های شیگاتوکسوژنیک غیر O_{157} پیچیده است. در قدم اول، بیشتر تلاش‌ها جهت شناسایی O_{157} انجام می‌شود و در قدم دوم، آزمایشگاه‌های بالینی باید سموم شیگا را در نمونه‌های مدفوع تشخیص دهند و سپس نمونه‌های مثبت برای بررسی‌های سروتیپی به آزمایشگاه‌های بهداشت عمومی ارسال شوند (۷). عامل اصلی حدت در گروه شیگاتوکسوژنیک تولید پروتئین stx_1 یا stx_2 است. گفتنی است که بیرن و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش دادند که سندرم اورمیک همولیتیک (Syndrome Uremic Hemolytic) به طور قابل توجهی با سویه‌های شیگاتوکسوژنیک که دارای eae و یا stx_2هستند در ارتباط است.

اگرچه تاکنون بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* توکسوژنیک در دستگاه گوارش پرندگان مورد شک و شبهه است اما در این مطالعه به گزارش موردی ابتلا یک کبوتر اهلی به اسهال و جداسازی و ردیابی *اشریشیاکلی* و ژن های حدت اینتیمین و شیگاتوکسین پرداخته شده است که می تواند شواهدی بالینی مبنی بر احتمال بیماری‌زایی *اشریشیاکلی* توکسوژنیک در کبوتر باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

یک قطعه کبوتر چاهی ماده با سن حدود ۲ سال و وزن حدود ۷۵۰ گرم در تاریخ ۱۹ آبان ۱۳۹۸ به کلینیک دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی ارجاع داده شده است. این کبوتر از یک کلنی با حدود ۵۰ کبوتر به کلینیک دامپزشکی

آورده شده است. کبوتر مورد نظر با علایم بی اشتهایی و بی‌حالی معاینه شد. پرنده در طول دو روز گذشته دان قابل توجهی نخورده و قبل از شروع بیماری یک وعده غذایی را به شکل کامل از ضایعات سبزیجات خوراکی استفاده نموده است. در زمان مراجعه چینه دان خالی از مواد غذایی بود. صاحب پرنده قبلا مبادرت به مولتی ویتامین درمانی کرده و بنا به اظهارات او، قبل از این درمان، پرنده هیچ داروی دیگری را دریافت ننموده است. در معاینه دهان و محوطه حلق پرنده ضایعات دیفتریک کرم رنگ مشاهده گردید که با تهیه سواب مرطوب تک یاخته تاژک دار تریکوموناس گالینه مشاهده گردید. در معاینه، پرنده مبتلا به اسهال کف آلود و تا حدودی سبز رنگ بود که مبادرت به نمونه برداری و کشت بر روی محیط مک کانگی گردید. در محیط کشت باکتری *سالمونلا* جدا نشد اما باکتری *اشریشیاکلی* به وفور مشاهده گردید. در نمونه برداری از مدفوع، انگل یا تخم انگل مشاهده نگردید. پرنده به صورت علامتی با انروفلوکساسین و کلستین برای مدت ۵ روز درمان گردید. یک هفته پس از تجویز دارو حال عمومی پرنده رو به بهبودی بود.

شناسایی اشریشیاکلی

به منظور شناسایی باکتری *اشریشیاکلی*، از سواب کلواک بر روی محیط مک کانگی کشت داده شد و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در صورت رویت شدن پرگنه‌های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ)، از پرگنه‌های مذکور بر روی محیط ائوزین متیلن بلو(Eosin Methylene-Blue)یا EMB به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پرگنه‌های لاکتوز مثبت که بر روی محیط EMB ایجاد جلای سبز فلزی نمودند به صورت اولیه به عنوان باکتری *اشریشیاکلی* شناسایی شدند. سپس بر روی این پرگنه‌ها تست های افتراقی IMVICانجام شد. در صورتی که از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی تولید ایندول، احیای متیل رد، واکنش - Voges Proskawer و احیای سیترات به ترتیب به صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی بودند به عنوان *اشریشیاکلی* شناسایی شدند (۲۱).

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد (۸). از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط Brain Heart Infusion به عنوان منبع DNA استفاد شد.

آزمون PCR

برای انجام PCR از دستگاه Master Cycler Gradiantاستفاده شد. PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیترDNA تخلیص شده (حدود ۵۰ نانوگرم)، ۱۰ میلی‌مول تریس هیدروکلریدریک (اسیدیته ۸/۴)، ۱۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۳ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲ میلی‌مول از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ میلی‌مول از هرکدام dntp ها و یک واحد Taq- Polymerase و مابقی تا ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل (۳۳/۸ میکرولیتر) انجام شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. برای تعیین فاکتورهای حدت در جدایه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از زوج پرایمرهای معرفی شده توسط فاگان و همکاران در سال ۱۹۹۹ استفاده شد (۶). برنامه حرارتی برای انجام PCR شامل یک سیکل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل تکراری شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در ۲۰ ثانیه، همسرشت سازی در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه

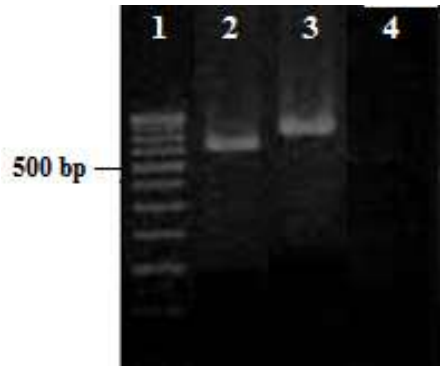
سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود. در پایان محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۴۰۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید.

جدول ۱- اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه (جفت بازی)
EHEC *hly*	F: ACGATGTGGTTTATTCTGGA R: CTTCACGTGACCATACATAT	۱۶۵
***stx*$_1$**	F: ACACTGGATGATCTCAGTGG R: CTGAATCCCCCTCCATTATG	۶۱۴
***stx*$_2$**	F: CCATGACAACGGACAGCAGTT R: CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	۷۷۹
***eae*A**	F: GTGGCGAATACTGGCGAGACT R: CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	۸۹۰

نتایج

در این بررسی، در مرحله اول باکتری *اشریشیاکلی* بر روی محیط مک کانگی و EMB جداسازی شد. با ظهور پرگنه‌های صورتی بر روی مک کانگی و پرگنه‌های سبز با جلای فلزی بر روی EMB *اشریشیاکلی* به صورت اولیه شناسایی شد و پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی IMVIC مورد تایید قرار گرفت. برای شناسایی ژن‌های حدت، محصول استخراج شده ژنوم باکتری در ۳ واکنش زنجیره ای مجزا با پرایمر های اختصاصی تکثیر شد که فقط ژن‌های شیگاتوکسین۱ (stx_1) و اینتیمین (eae) با طول قطعات ۶۱۴ و ۸۹۰ جفت بازی تکثیر و ردیابی شد (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR (ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: قطعه ٦١٤ جفت بازی مربوط به نمونه مثبت واجد ژن stx_1، ستون ۳: قطعه ۸۹۰ جفت بازی مربوط به نمونه مثبت واجد ژن eae و ستون ٤: کنترل منفی)

بحث

نتایج نشان داد سویه *اشریشیاکلی* جدا شده از کبوتر با علایم اسهال واجد ژن‌های حدت شیگاتوکسین ۱ و اینتیمین بوده و فاقد ژن کد کننده همولیزین و شیگاتوکسین ۲ می‌باشد. نتایج مطالعه اخیر در خصوص عدم ردیابی ژن همولیزین در سویه *اشریشیاکلی* واجد ژن شیگاتوکسین، با مطالعه ضیاالدینی و همکاران هم راستا است و به‌نظر می رسد این جدایه *اشریشیاکلی* واجد ژن شیگاتوکسین از نوع غیر H_7: O_{157} باشد. پیش‌تر نیز گزارش‌های زیادی منتشر شده که نشان می‌دهد اگرچه از گونه‌های مختلف پرندگان *اشریشیاکلی* شیگاتوکسین‌زا جدا شده است اما در اکثر موارد سروتیپ O_{157}:H جدا نشده است. لذا طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات مشابه به‌نظر می‌رسد فراوانی جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین غیر O_{157} در مدفوع پرندگان از موارد H_7: O_{157} بیش‌تر باشد. این یافته اهمیت موضوع انتقال *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین از طریق تماس با پرندگان را دوچندان می‌کند. چرا که ممکن است پرندگان در حالی‌که هیچ‌گونه علائم بالینی نداشته باشند منبع *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین از نوع غیر H_7: O_{157} باشند (۱۶).

در مطالعه اخیر *اشریشیاکلی* جدا شده واجد ژن stx_1 بود که مطابق یافته بیرن و همکاران ممکن است از بیماری‌زایی کمتری برخوردار باشد. بیرن و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش دادند که سندرم اورمیک همولیتیک (Hemolytic Syndrome Uremic) به طور قابل توجهی با سویه‌های شیگاتوکسوژنیک که دارای eae و یا stx_2 هستند در ارتباط است. در این مطالعه نیز بیشتر جدایه‌ها دارای ژن stx_1 بودند (۳). بهرحال جداسازی *اشریشیاکلی* واجد ژن‌های حدت شیگاتوکسین و اینتیمین از کبوتر واجد علایم گوارشی این تصور را القا می‌کند که ممکن است *اشریشیاکلی* جدا شده در ایجاد این علایم گوارشی نقش داشته باشد. قبلاً کورکسون و همکاران در سال ۲۰۱۳ عدم وجود گیرنده‌های Globotriaosylceramide را روی سلول‌های paneth در مخاط روده، دلیل عدم حساسیت و عدم بروز علایم کلینیکی در پرندگان آلوده به *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین بیان نمودند (۴).

نتیجه گیری

لذا با توجه به شواهد بالینی موجود، مطالعات بیشتر و دقیق‌تری حتی به شکل چالش تجربی لازم است تا نقش *اشریشیاکلی* توکسوژنیک در ایجاد علایم گوارشی در پرندگان مشخص شود. به طور کلی، با توجه به اهمیت *اشریشیاکلی* توکسوژنیک در ایجاد عوارض گوارشی در انسان، کبوتر می‌تواند به عنوان ناقل این اجرام بیماری‌زا مطرح باشد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

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. FEYZ, 17(2); 188-194.

2. Awad-Alla, M.E., Abdien, H.M., Dessouki, A.A. (2010). Prevalence of

bacteria and parasites in White Ibis in Egypt. Vet. Ital., 46(3); 277-86.

3. Byrne, L., Vanstone, G.L., Perry, N.T., Launders, N., Adak, G.K., Godbole, G., et al. (2014). Epidemiology and microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England, 2009–2013. J. Med. Mic., 63(9); 1181-1188.

4. Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Mic. Rev., 26(4); 822-880.

5. Estrada-García, T., Cerna, J.F., Paheco-Gil, L., Velázquez, R.F., Ochoa, T.J., Torres, J., et al. (2005). Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. Emerg. Infect. Dis., 11(8); 1306.

6. Fagan, P.K., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Djordjevic, S.P. (1999). Detection of Shiga-like toxin (stx1 andstx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol., 65(2); 868-872.

7. Friesema, I., Van Der Zwaluw, K., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., Van Duynhoven, Y., et al. (2014). Emergence of Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. Eurosurveillance., 19(17); 20787.

8. Gholami-Ahangaran, M., Zia-Jahromi, N. (2014). Identification of shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). Toxicol.Indust. Health., 30(8); 724-727.

9. Gioia-Di Chiacchio, R.M., Cunha, M.P.V., Sturn, R.M., Moreno, L.Z., Moreno, A.M., Pereira, C.B.P., et al. (2016). Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC): Zoonotic risks associated with *psittacine* pet birds in home environments. Vet. Microbiol., 184; 27-30.

10. Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution. Front. Microbiol., 2; 246.

11. Haag-Wackernagel, D., Moch, H. (2004). Health hazards posed by feral pigeons. J Infect., 48(4); 307-313.

12. Hosseini, S., Ranjbar, R., Zahrayi Salehi, T. (2016). The Identification of pathogenic *Escherichia coli* strains to carry intimin gene isolated from various water sources. Iran. J. Med. Microbiol., 10(4); 17-24.

13. Kimpe, A., Decostere, A., Martel, A., Haesebrouck, F., Devriese, L.A. (2002). Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. Avian Pathol., 31(4); 393-397.

14. Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., López, C., Justel, P., et al. (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(1); 13.

15. Morabito, S., Dell'Omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T., et al. (2001). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in

feral pigeons. Vet. Microbiol., 82(3); 275-283.

16. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T., Logue, C.M. (2020). Colibacillosis. In: Disease of Poultry. Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougald, L.R., Nair, V. and Suarez, D.L. editors. 14th ed., Massachusetts: Wiley-Blackwell, pp: 770-790.

17. Paton, J.C., Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev., 11(3); 450-479.

18. Persad, A.K., Lejeune, J.T. (2015). Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing E. coli. Am. Soc. Microbiol., 231-244.

19. Sandvig, K. (2001). Shiga toxins. Toxicon, 39(11); 1629-1635.

20. Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., Karch, H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol., 66(3); 1205-1208.

21. Ziauddini, A.H., Gholami-Ahangaran, M., Ahmadi-Dastgerdi, A. (2020). Detection of virulence genes of *intimin*, *hemolysin* and *shigatoxin* in *Escherichia coli* isolated from *Pscittacin*. New Cell. Molecul. Biotechnol. J., 10(38); 61-68.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 15, Issue 4, Number 60, Pages 118-126
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

The detection of virulence genes of shigatoxin and intimin in Escherichia coli isolated from a pigeon with gastrointestinal symptoms: A case report

Majid Gholami-Ahangaran[1], Mehrdad Ostadpoor[2], Anita Khani[2]

1. Associate Professor, Group of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Corresponding Author: mgholami6@gmail.com
2. Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received:2020.11. 19 **Accepted: 2021.05.12**

Abstract

Background & Aim : *Escherichia coli (E. coli)* is found as a flora in the digestive tract of all warm-blooded animals, including pigeons. This bacterium has many virulent genes including shigatoxin and intimin. Intimin is responsible for binding *E. coli* to intestinal mucosal cells, and shigatoxin causes cell death. The aim of recent study was to investigate the presence of these virulence genes in *E. coli* isolated from a case of gastrointestinal infection in pigeons in order to determine the possibility of pathogenic *E. coli* with origin of pigeons in humans.

Materials and Methods: In this regard, to identify virulent genes in *E. coli* isolated from diarrheic pigeon, a cloaca swab was prepared from a pigeon with diarrhea symptoms. After microbial culture and purification, the infection to *E. coli* was confirmed by biochemical examinations. Then, DNA was extracted by boiling method and hemolysin, intimin and sub unites of shigatoxin (stx_1 & stx_2) genes were detected. The target genes were identified by specific primers based on amplification of target genes with specific fragment lengths (165, 890, 614 and 779 bp, respectively).

Results: The *E. coli* strain isolated from pigeon with symptom of diarrhea had the virulence genes of stx_1 and intimin and lacks the genes encoding hemolysin and stx_2.

Conclusion: The results showed that the virulence genes of shigatoxin 1 and intimin were detectable in pigeons with gastrointestinal symptoms. According to these results, contrary to previous perceptions, birds may be the source of shigatoxogenic *E. coli*, and the symptoms of diarrhea in pigeons may be related to the presence of Shigatoxin and intimine in *E. coli*, which needs to be further investigated.

Keywords: *E. coli*, *Intimin*, *hemolysin*, *shigatoxin*, pigeon