



تعیین انواع پلاسمید بر اساس تیپ رپلیکون و مقایسه آن با انواع شیگاتوکسین و اینتیمین جدایه‌های حیوانی/شریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک

علی نعمتی^۱، مهدی عسکری بدوئی^{۲*}، غلامرضا هاشمی تبار^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ دی ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۴ بهمن ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۱۵ بهمن ۱۴۰۲

 10.22034/nfvm.2024.434828.1222

چکیده

سویه‌های پاتوتیپ/شریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) باعث بیماری‌های خطرناکی همچون کولیت هموراژیک (HC) و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) در انسان می‌شوند. در حال حاضر، یکی از چالش‌های مهم در کنترل عفونت‌های ناشی از STEC، ردیابی و شناسایی به موقع سویه‌های بیماری‌زا در نمونه‌های محیطی، غذایی و بالینی است. برای این منظور از ژن‌های *stx* و *eae* به همراه ژن‌های اختصاصی سرورگروپ‌ها در دو پروتوکول استاندارد در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و آمریکا (MLG5B.05) استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، به بررسی انواع رپلیکون‌ها و مقایسه آن با سرورگروپ‌های مهم بیماری‌زا و سویه‌های *stx2* مثبت پرداخته شد تا با شناسایی رپلیکون‌های مهم، بتوان در قدم بعدی از ژن‌های حدت کدشونده بر روی این نوع پلاسمیدها به‌عنوان مارکرهای جایگزین روش‌های ISO/TS 13136 و MLG5B.05 استفاده نمود. بر این اساس، ۹۶ جدایه STEC به دست آمده از میزبان‌های مختلف حیوانی در قالب PCR های تکی و Multiplex PCR ارزیابی شدند. از میان ۸۲ سویه STEC دارای پلاسمید، به ترتیب رپلیکون‌های FIB (۶۹/۸۲) با ۸۴/۱٪، K/B (۲۱/۸۲) با ۲۵/۶٪، B/O (۱۱/۸۲) با ۱۳/۴٪، P (۸/۸۲) با ۹/۷٪، Y (۶/۸۲) با ۷/۳٪، FIA (۳/۸۲) با ۳/۶٪، II (۳/۸۲) با ۳/۶٪ و L/M (۱/۸۲) با ۱/۲٪ بیشترین فراوانی را داشتند. در این مطالعه اگرچه فراوانی پلاسمیدهای FIB قابل توجه بود، اما در مورد سویه‌های بیماری‌زا STEC، ارتباط آنها با پلاسمید K/B نشان داده شد، به طوری که بیشترین جدایه‌های STEC دارای الگوی *stx2 + eae + ehxA* و این رپلیکون بودند. بررسی ارتباط نوع پلاسمید با تحت تیپ‌های ژن *stx2* و تعیین محتوای ژنتیکی این پلاسمیدها جهت ارزیابی حدت و شناسایی مارکر ژنتیکی احتمالی از محتوای پلاسمیدی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک، پلاسمید، رپلیکون، مارکر

مقدمه

چند ساعت بعد از به دنیا آمدن نوزاد انسان، باکتری *Escherichia coli* (*E. coli*) در مجرای گوارشی ساکن می‌شود. پس از آن، باکتری *E. coli* و میزبان انسانی با یکدیگر رابطه همزیستی که هر دو طرف سود می‌برند، برقرار می‌نمایند. این باکتری به ندرت باعث ایجاد بیماری در میزبان خود می‌شود، مگر آن که میزبان دارای نقص سیستم ایمنی یا دستگاه گوارش دچار آسیب و التهاب باشد (۱). در عین حال، تعدادی از سویه‌های *E. coli* وجود دارند که با کسب عوامل حدت اختصاصی، توانایی ساکن شدن در جایگاه‌های جدید را به دست آورده‌اند. این سویه‌ها که با این نواحی جدید انطباق پیدا کرده‌اند، می‌توانند طیف وسیعی از بیماری‌ها را در میزبان خود ایجاد نمایند. ویژگی‌های حدت کسب شده، اغلب بر روی عناصر ژنتیکی کد می‌شوند که می‌توانند به شکل‌های مختلف به سایر سویه‌های باکتریایی منتقل گردند (۲، ۳). آن دسته از سویه‌های *E. coli* که به‌طور موفقیت‌آمیزی، عوامل حدت را به‌صورت ترکیبی در خود جای داده‌اند، تحت عنوان پاتوتیپ‌های اختصاصی *E. coli* شناخته می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آنها، پاتوتیپ / شریشیکیلی شینگاتوکسیژنیک (STEC) می‌باشد که توانایی ایجاد اسهال، کولیت هموراژیک و در موارد پیشرفت بیماری سندرم همولیتیک اورمیک یا HUS که یک بیماری حاد کلیوی و کشنده در انسان است را دارد (۴، ۵).

سروگروپ‌های O157, O26, O103 سویه‌های STEC به‌عنوان شایع‌ترین سروگروپ‌های بیماری‌زا در اتحادیه اروپا محسوب می‌شوند که در میان سویه‌های جدا شده از بیماران HUS، سروگروپ‌های O26 و O157 بالاترین فراوانی را داشتند (۶). همچنین بالاترین آمار بیماری و عوارض خطرناک (عفونت HUS، اسهال خونی و موارد بستری شده) مربوط به سویه‌هایی از STEC بوده است که واجد شینگاتوکسین دو (*stx2*) بوده‌اند (۶). نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بین ظهور سویه‌های خطرناک STEC و کسب پلاسمیدهای حدت توسط آنها یک رابطه

مستقیم وجود دارد (۷). ژن‌های حدت کد شونده بر روی این پلاسمیدها، باعث افزایش بیماری‌زایی و بروز علائم شدید در انسان می‌شوند. یکی از راه‌های شناسایی این پلاسمیدها، دسته‌بندی آنها می‌باشد تا از این طریق بتوان پلاسمیدهای مهم و به دنبال آن سویه‌های خطرناک STEC را ردیابی نمود.

یکی از دقیق‌ترین و کم هزینه‌ترین روش‌های دسته‌بندی پلاسمیدها، رپلیکون تایپینگ (Replicon typing) می‌باشد که بر اساس تفاوت‌های ژنتیکی موجود در لوکوس‌های مربوط به ژن‌های رپلیکون و توالی‌های تنظیم‌کننده همانندسازی، ۱۷ نوع رپلیکون مختلف قابل دسته‌بندی است (۷، ۸). جایگاه Replicon مربوط به ماشین همانندسازی پلاسمید می‌باشد و اساس این روش بر این پدیده استوار است که پلاسمیدهایی که دارای ماشین همانندسازی مشابه یا به عبارتی رپلیکون مشابه هستند، به علت رقابتی که بین آنها برای همانندسازی و بقا در سلول باکتری ایجاد می‌شود، نمی‌توانند با هم و به‌طور همزمان در یک باکتری حضور داشته باشند و این عدم سازگاری باعث می‌گردد که در نهایت پس از چندین بار تقسیم سلولی فقط یکی از پلاسمیدهایی که رپلیکون مشابه دارند در سلول باکتری باقی بماند و مابقی حذف شوند (۷). بدین ترتیب، پلاسمیدها را به انواع گروه‌های ناسازگاری یا incompatibility که به اختصار Inc نامیده می‌شود تقسیم‌بندی می‌کنند (۸).

در حال حاضر، یکی از چالش‌های مهم در کنترل عفونت‌های ناشی از STEC، ردیابی و شناسایی به موقع سویه‌های بیماری‌زا در نمونه‌های محیطی، غذایی و بالینی است (۹). برای این منظور از ژن‌های *stx* و *eae* به همراه ژن‌های اختصاصی سروگروپ‌ها در دو پروتکل استاندارد در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و آمریکا (MLG5B.05) استفاده می‌شود (۱۰). روش اجرایی جهت تشخیص سویه‌های STEC در هر دو رفرنس به این صورت است که ابتدا ژن‌های شینگاتوکسین (*stx1/stx2*) و اینتیمین (*eae*) ردیابی می‌شوند. در صورت مثبت بودن

(۳۳٪؛ ۳۳/۱۰۰) به جدایه‌های قبلی اقدام شد. بدین ترتیب، در مجموع این پژوهش با مطالعه بر روی ۹۶ جدایه تایید شده STEC که شامل ۳۵ جدایه از گاو، ۳۲ جدایه از گوسفند، ۹ جدایه از بز، ۱۸ جدایه از کیوتر و ۲ جدایه از میمون بودند، انجام گردید.

نمونه‌های اخذشده مربوط به جدایه‌های جدید، طبق منابع استاندارد با استفاده از سوآپ استریل از مدفوع میزبان‌های حیوانی اخذ شد و سپس داخل لوله فالکن همراه با سرم فیزیولوژی و یخ جهت کشت و بررسی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی منتقل گردیدند (۱۱، ۱۲). هر نمونه بر روی محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت، کلونی‌های رشد کرده مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های مشکوک (لاکتوز مثبت با اندازه متوسط) جهت تشخیص، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲).

تعیین هویت جدایه‌های جدید همراه با کشت مجدد جدایه‌های کلکسیون میکروبی جهت استخراج DNA: در مورد جدایه‌های جدید، پس از بررسی خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی آنها، موارد تایید شده از محیط مک‌کانکی آگار به محیط LB آگار منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C استخراج DNA جدایه‌ها انجام گرفت. در مورد جدایه‌های موجود در کلکسیون آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، ابتدا تمامی جدایه‌ها در محیط BHI براث کشت و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد تمامی جدایه‌ها در محیط LB آگار کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C استخراج DNA آنها انجام گرفت. استخراج DNA جدایه‌ها به روش جوشاندن انجام شد (۱۳).

نمونه، مرحله بعد به ردیابی سرورگروپ‌های O26, O103, O111, O145, O157 در روش ISO/TS 13136 و ردیابی سرورگروپ‌های O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157 در روش MLG5B.05 پرداخته می‌شود (۹، ۱۰). از معایب اصلی هر دو این پروتوکول‌ها آن است که بسیاری از سویه‌های STEC فاقد ژن *eae* به علت داشتن شیگاتوکسین، سویه‌های پاتوتیپ EPEC به علت داشتن *eae* گونه‌های *E. albertii* به علت داشتن شیگاتوکسین و در نهایت فازهای آزاد حمل‌کننده شیگاتوکسین که همگی در محیط و نمونه‌های غذایی مشکوک وجود دارند منجر به ایجاد واکنش کاذب مارکرهای انتخابی (*stx1/stx2/eae*) مورد استفاده در این دو پروتوکول با عوامل ذکر شده خواهد شد. نتیجه این اتفاق، پیدایش مقدار قابل توجهی از پاسخ‌های مثبت کاذب شامل مجموعه‌ای از سویه‌های غیر STEC یا غیر بیماری‌زا یا با بیماری‌زایی کم خواهد بود که از نظر زمان و هزینه چالش‌زا است (۹).

با توجه به این مشکل، پژوهش حاضر با هدف بررسی نوع رپلیکون پلاسمید در سویه‌های STEC با ریسک بالای بیماری انجام گرفت تا با معرفی پلاسمیدهای مهم بتوان از رپلیکون آنها یا ژن‌های حدت کدشونده بر روی آنها به‌عنوان مارکر جایگزین جهت ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماری‌زا STEC استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد بررسی: در این پژوهش در مجموع از ۶۳ جدایه STEC مرتبط با میزبان‌های حیوانی شامل ۲۱ جدایه از گاو، ۲۲ جدایه از گوسفند، ۱۸ جدایه از کیوتر و ۲ جدایه از میمون استفاده گردید. این جدایه‌ها در کلکسیون آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد موجود بود که طی سالیان گذشته (۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱) از شهرهای مختلف ایران (تهران، گرمسار، دامغان، سمنان و مشهد) به دست آمده بودند. علاوه بر این ۶۳ جدایه، نسبت به اخذ مجموعاً ۱۰۰ نمونه مدفوعی جدید از میزبان‌های گاو، گوسفند و بز و اضافه کردن موارد شناسایی شده سویه‌های STEC

شناسایی سویه‌های STEC در جدایه‌های جدید و بررسی مجدد جدایه‌های کلکسیون: جهت شناسایی پاتوتیپ STEC در نمونه‌های *E. coli* به دست آمده از جدایه‌های جدید و همچنین بررسی مجدد سویه‌های کلکسیون میکروبی به منظور تأیید قطعی STEC بودن آنها، یک واکنش Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های شیگاتوکسین نوع ۱ و نوع ۲ (*stx1*, *stx2*)، اینتیمین (*eae*) و همچنین انتروهمولیزین (*ehxA*) انجام گردید

(جدول ۱). لازم به ذکر است که برای ردیابی شیگاتوکسین در نمونه‌های اخذ شده از کبوتر، از پرایمر اختصاصی شیگاتوکسین نوع *stx2f* (مختص به سویه‌های STEC کبوتری است) در طی یک مرحله واکنش جداگانه PCR تکی استفاده شد (جدول ۱). دستورالعمل انجام واکنش‌های PCR بر اساس مطالعات Paton 1998 و Schmidt 2000 اجرا شد (۱۴، ۱۵).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی پاتوتیپ STEC

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
Virulence markers				
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	65°C, 63°C, 59°C/ 60S ²	(14)
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTCTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATCTG	255		
<i>stx2f</i>	AGATTGGGCGTCATTCACCTGGTTG TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	428	56°C/ 60S	(15)
<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	65°C, 63°C, 59°C/ 60S ²	(14)
<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534		

¹ Annealing Temperature and Duration

² Touchdown PCR

تعیین سرگروپ جدایه‌های STEC پس از شناسایی قطعی سویه‌های STEC، بررسی نوع سرگروپ آنها انجام شد. لازم به ذکر است که سرگروپ تعدادی از سویه‌های کلکسیون میکروبی از جمله سویه‌های کبوتری (O128, O63, O75) در مطالعه قبلی تعیین شده بود (۳). در نتیجه در مطالعه حاضر تعیین سرگروپ صرفاً برای جدایه‌های جدید (۳۳ جدایه) و آن دسته از سویه‌های کلکسیون میکروبی که سرگروپ آنها از نظر O80 و O146 نامشخص بود، انجام شد.

بر این اساس، شناسایی ۱۳ سرگروپ مهم بیماری‌زا به اضافه سرگروپ‌های O5 و O91 با استفاده از واکنش‌های Multiplex PCR و PCR تکی طبق دستورالعمل مقالات رفرنس انجام شد (جدول ۲). سرگروپ‌های مورد بررسی شامل موارد زیر بودند:

O5, O26, O45, O55, O80, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146, O157

پنل اول: یک مرحله واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سرگروپ‌های زیر انجام شد:

O26, O45, O103, O111, O113, O121, O145
واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۳/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۵/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید).

از سویه‌های کلکسیون میکروبی به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پنل دوم: یک مرحله واکنش Multiplex PCR برای شناسایی سرگروپ‌های زیر انجام شد:

O55, O91

موارد زیر هستند:

O5, O80, O104, O128, O146, O157

برای هر کدام از این سرگروپ‌ها، به صورت جداگانه واکنش در حجم ۱۶ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۸ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی $MgCl_2$ ۱/۵ mM، مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۱ میکرولیتر) و در نهایت ۲ میکرولیتر (معادل ۲۰۰ ng) از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید. از سویه‌های کلکسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی $MgCl_2$ ۱/۵ mM، مقدار ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۱/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۲/۵ میکرولیتر (معادل ۲۵۰ ng) از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

از سویه‌های کلکسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

سایر سرگروپ‌های باقی‌مانده به وسیله واکنش PCR تکی به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین سرگروپ‌های جدایه‌های STEC

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
<i>Serogroups</i>				
O5	CTTATCCGATTAATGGCTTC TAGTCGATTTGCTTTTATGG	144	50°C/ 50S	(16)
O26	CAATGGGCGGAAATTTAGTA ATAATTTTCTCTGCCGTCGC	155	56°C/ 60S	(17)
O45	TGCAGTAACCTGCACGGGCG AGCAGGCACAACAGCCACTACT	238		
O55	TCCTTATTTGTGTCTGGGGG CCAGGAAAGCTGCCAATTATC	207	54°C/ 60S	(18)
O80	TGAGAGCCAAGATCCAAGCA TGGGCCATATTCGAAGTTTGAA	158	55°C/ 30S	(19)
O91	TTGCATCTGGCGCAATAAACACGG ACACCATCCCAAATACCTGCTTGC	616	54°C/ 60S	(17)
O103	TTGGAGCGTTAACTGGACCT GCTCCCGAGCACGTATAAAG	321	56°C/ 60S	
O104	TGAACTGATTTTATAGGATGG AGAACCTCACTCAAATTATG	351	55°C/ 60S	
O111	TGTTTCTTTCGATGTTGCGAG GCAAGGGACATAAGAAGCCA	438	56°C/ 60S	
O113	TGCCATAATTCAGAGGGTGAC AACAAAAGCTAATTGTGGCCG	514		
O121	TCCAACAATTGGTCGTGAAA AGAAAAGTGTGAAATGCCCGT	628		
O128	ATGATTTCTTACGGAGTGC	782	50°C/ 30S	(19)

	CTCTAACCTAATCCCTCCC			
O145	TTCATTGTTTTGCTTGCTCG GGCAAGCTTTGGAAATGAAA	750	56°C/ 60S	
O146	ATTCGGGTAACGACCCTGTGTTGA AGACTGCTAATGCAAGGAACATG G	378	50°C/ 30S	(20)
O157	TCGAGGTACCTGAATCTTTCCTTCTGT ACCAGTCTTGGTGCTGCTCTGACA	894	56°C/ 60S	(17)

¹ Annealing Temperature and Duration

بدین ترتیب ۱۷ رپلیکون مورد بررسی قرار گرفتند که شامل موارد زیر بودند:

B/O, FIC, A/C, P, T, K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1, Frep, X, HI1, N, HI2, L/M

تعیین تیپ رپلیکون پلاسمید در جدایه‌های

STEC جهت مشخص کردن تیپ رپلیکون پلاسمید بر طبق مطالعه Johnson و همکاران (۷) از سه مرحله واکنش Multiplex PCR در قالب سه پنل استفاده شد.

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی رپلیکون پلاسمیدها

Primer name	Sequence (5'-3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing Tem/Time ¹	Reference
Plasmid replicon types				
<u>Panel 1</u>				
B/O-F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	159	60°C/ 30S	(7)
B/O-R	TCTGCGTCCGCCAAGTTCTGA			
FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262		
FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465		
A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534		
P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750		
T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
<u>Panel 2</u>				
K/B-F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	160	60°C/ 30S	(7)
K/B-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
W-F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242		
W-R	GGTGC GCGCATAGAACCGT			
FIIA-F	CTGTCTGTAAGCTGATGGC	270		
FIIA-R	CTCTGCCACAACTTCAGC			
FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462		
FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGACG			
FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702		
FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
Y-F	AATCAACAACAACACTGTGCAGCCTG	765		
Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			

Panel 3				
II-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	60°C/ 30S	(7)
II-R	TCGTTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
Frep-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270		
Frep-R	GAAGATCAGTCACACCATCC			
X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTT- GCTGAT	376		
X-R	TC AATTTTATCTCATGTTTTAGC TGAGAG-			
HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471		
HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559		
N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644		
HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
L/M-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785		
L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			

¹ Annealing Temperature and Duration

پنل اول: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های B/O, FIC, A/C, P, T: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

پنل دوم: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳/۶ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

پنل سوم: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های I1, Frep, X, HI1, N, HI2, L/M: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۵/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۴/۲ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

از سویه‌های کلکسیون میکروبی به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل (حاوی مسترمیکس و پرایمرها) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

پراکندگی ژن‌های *stx1*, *stx2*, *stx2f*, *aeae*, *ehxA*
در سویه‌های STEC ۹۶ در میان ۹۶ سویه STEC بررسی شده، فراوانی ژن‌های شیگاتوکسین (*stx*) بدین شرح بود:

پنل اول: شرایط انجام Multiplex PCR برای شناسایی رپلیکون‌های B/O, FIC, A/C, P, T: واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که در آن از ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس هات استارت (2X Hot Start Taq Master Mix Amplicon) حاوی ۱/۵ mM MgCl₂، مقدار ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای forward و reverse (مجموع: ۳ میکرولیتر) و در نهایت ۳ میکرولیتر (معادل ۳۰۰ ng از نمونه DNA استخراج شده استفاده گردید.

سویه‌هایی که فقط دارای *stx1* بودند شامل ۲۶ جدایه؛ سویه‌هایی که فقط دارای *stx2* بودند شامل ۲۷ مورد و در نهایت سویه‌هایی که هر دو شیگاتوکسین (*stx1 + stx2*) را داشتند شامل ۲۵ جدایه بودند. در رابطه با *stx2f*، این ژن تنها در سویه‌های STEC کیوتری یافت شد که ۱۸ سویه از ۹۶ جدایه را شامل می‌شد. همچنین در میان ۹۶ سویه STEC بررسی شده، ۳۲ جدایه دارای ژن *eae* و ۶۲ جدایه دارای ژن *ehxA* بودند.

فراوانی سرگروپ‌های شناسایی شده در

سویه‌های STEC از میان ۹۶ سویه STEC مورد مطالعه، به ترتیب سرگروپ‌های O113 (13/96) با ۱۳/۵۴٪، O5 (13/96) با ۱۳/۵۴٪، O103 (12/96) با ۱۲/۵۰٪، O128 (9/96) با ۹/۳۷٪، O26 (5/96) با ۵/۲۰٪، O91 (3/96) با ۳/۱۲٪، O111 (3/96) با ۳/۱۲٪، O63 (3/96) با ۳/۱۲٪، O75 (3/96) با ۳/۱۲٪، O128 (2/96) با ۲/۰۸٪، O80 (2/96) با ۲/۰۸٪ و O157 (2/96) با ۲/۰۸٪، بیشترین درصد فراوانی را داشتند. در رابطه با ۲۶ جدایه STEC، سرگروپ آنها در میان پانزده سرگروپ مهم بیماری‌زا مورد مطالعه نبود و در نتیجه ردیابی نشد.

مقدار فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در

سویه‌های STEC در مجموع از میان ۸۲ سویه STEC دارای پلاسمید، به ترتیب رپلیکون‌های FIB (69/82) با ۸۴/۱۴٪، K/B (21/82) با ۲۵/۶۰٪، B/O (11/82) با ۱۳/۴۱٪، P (8/82) با ۹/۷۵٪، Y (6/82) با ۷/۳۱٪، FIA (3/82) با ۳/۶۵٪، I1 (3/82) با ۳/۶۵٪ و L/M (1/82) با ۱/۲۱٪ بیشترین فراوانی را داشتند (لازم به ذکر است که تعدادی از پلاسمیدها دارای بیش از یک نوع رپلیکون بودند).

در میان ۶۹ جدایه دارای رپلیکون FIB، ۲۵ مورد (۳۶/۲۳٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در رابطه با رپلیکون K/B، از میان ۲۱ جدایه، ۱۲ مورد (۵۷/۱۴٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در مورد رپلیکون P، از میان ۸ جدایه، ۵ مورد (۶۲/۵۰٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در

میان ۶ جدایه دارای رپلیکون Y، ۴ مورد (۶۶/۶۶٪) دارای تنها ژن *stx2* بودند. در مورد رپلیکون L/M، ۱ جدایه مربوط به این رپلیکون (۱۰۰٪) دارای تنها ژن *stx2* بود. در نهایت، در ارتباط با رپلیکون‌های B/O، FIA و I1، مورد مثبتی که دارای تنها ژن *stx2* باشد، مشاهده نگردید (نمودار ۱).

در رابطه با رپلیکون FIB، در بین این ۲۵ جدایه دارای *stx2* ۱۸ مورد (۷۲٪) دارای ژن *eae* بودند که الگوی *stx2 + ehxA + eae* نیز در میان (۲/۱۸) ۱۱/۱۱٪ از آنها شناسایی شد. در مورد رپلیکون K/B، در میان ۱۲ جدایه دارای *stx2* ۳ مورد (۲۵٪) دارای ژن *eae* بودند که الگوی *stx2 + eae + ehxA* نیز در یک مورد از ۳ جدایه شناسایی شد. در میان ۵ جدایه دارای *stx2* در رپلیکون P، هر ۵ مورد (۱۰۰٪) دارای ژن *eae* بودند. در رابطه با رپلیکون Y، در بین این ۴ جدایه دارای *stx2* هر ۴ مورد (۱۰۰٪) دارای ژن *eae* بودند. با این حال، الگوی *stx2 + eae + ehxA* در جدایه‌های مربوط به رپلیکون‌های P و Y مشاهده نشد. در نهایت، در مورد رپلیکون L/M، ۱ جدایه مربوط به آن دارای ژن *eae* نبود (جدول ۱).

از لحاظ سرگروپ، در میان ۶۹ جدایه دارای رپلیکون FIB، به ترتیب سرگروپ‌های O5 (11/69) با ۱۵/۹۴٪، O103 (8/69) با ۱۱/۵۹٪، O113 (6/69) با ۸/۶۹٪، O128 (6/69) با ۸/۶۹٪، O26 (4/69) با ۵/۷۹٪ و O157 (2/69) با ۲/۸۹٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۲۱ جدایه دارای رپلیکون K/B، به ترتیب سرگروپ‌های O113 (7/21) با ۳۳/۳۳٪، O5 (7/21) با ۳۳/۳۳٪ و O128 (3/21) با ۱۴/۲۸٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۱۱ جدایه دارای رپلیکون B/O، به ترتیب سرگروپ‌های O5 (6/11) با ۵۴/۵۴٪ و (3/11) O91 با ۲۷/۲۷٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. در میان ۸ جدایه دارای رپلیکون P، سرگروپ O103 (2/8) با ۲۵٪ بیشترین فراوانی را دارا بود. در میان ۶ جدایه دارای رپلیکون Y، سرگروپ O103 (2/6) با ۳۳/۳۳٪ بیشترین فراوانی را دارا بود. در میان ۳ جدایه دارای رپلیکون FIA،

مورد سروگروپ ۱ جدایه دارای رپلیکون L/M، این سروگروپ جزء موارد مورد مطالعه نبود و بنابراین شناسایی نشد (نمودار ۲).

هر ۳ سویه به سروگروپ O91 (3/3, 100%) تعلق داشتند. در میان ۳ جدایه دارای رپلیکون I1، هر ۳ سویه به سروگروپ O26 (3/3, 100%) تعلق داشتند. در نهایت، در

جدول ۴- توزیع انواع رپلیکون‌های پلاسمید شناسایی شده در سویه‌های STEC بر اساس عوامل حدت (شیگاتوکسین تیپ دو، اینتیمین، انترهمولیزین) و همچنین سروگروپ‌های مهم بیماری‌زا (O103, O26, O157)

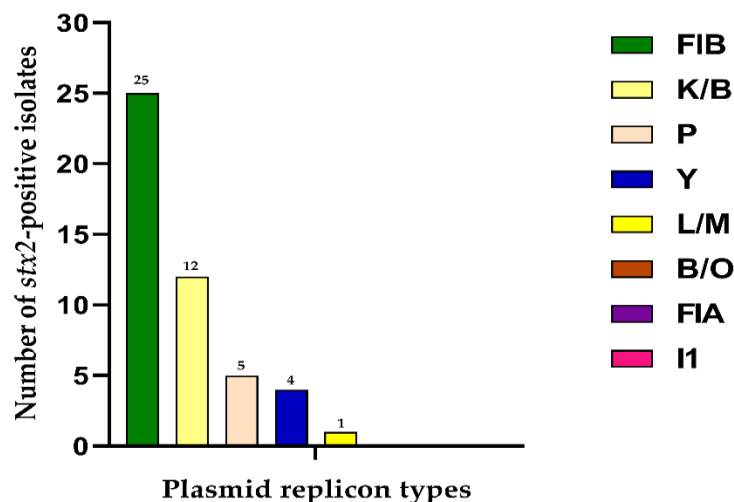
Replicon	<i>stx2</i> (n = 45) ¹	<i>stx2 + eae</i> (n = 21) ²	<i>stx2 + eae + ehxA</i> (n = 3) ³	Important serogroups (n = 19) ⁴
FIB (n = 69)	25/69, 36.2%	18/25, 72%	2/18, 11.1%	14/69, 20.2% (O103 = 8, O26 = 4, O157 = 2)
K/B (n = 21)	12/21, 57.1%	3/12, 25%	1/3, 33.3%	0
B/O (n = 11)	0	0	0	0
P (n = 8)	5/8, 62.5%	5/5, 100%	0	2/8, 25% (O103 = 2)
Y (n = 6)	4/6, 66.6%	4/4, 100%	0	2/6, 33.3% (O103 = 2)
FIA (n = 3)	0	0	0	0
I1 (n = 3)	0	0	0	3/3, 100% (O26 = 3)
L/M (n = 1)	1/1, 100%	0	0	0

¹ *stx2* = 27; *stx2f* = 18.

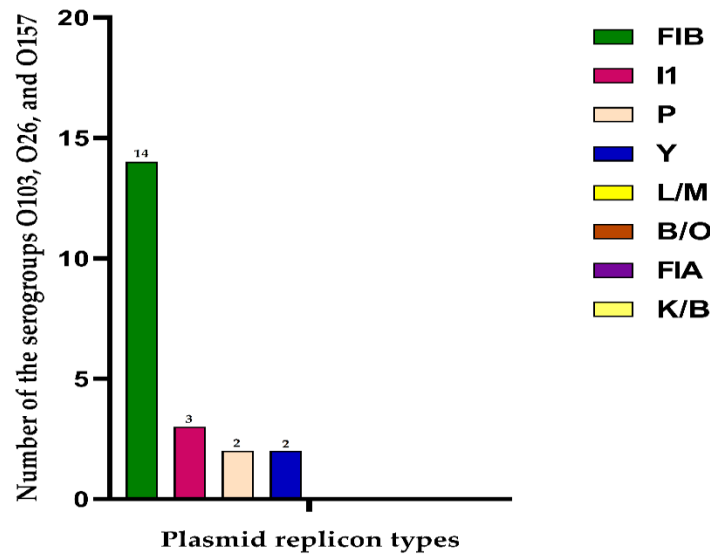
² *stx2 + eae* = 4; *stx2f + eae* = 17.

³ *stx2 + eae + ehxA* = 3; *stx2f + eae + ehxA* = 0.

⁴ Important serogroups are: O103 (n = 12), O26 (n = 5), O157 (n = 2).



نمودار ۱- میزان فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در سویه‌هایی از STEC که واجد تنها *stx2* بودند (n = 45)



نمودار ۲- میزان فراوانی انواع رپلیکون پلاسمیدها در سروگروپ‌های مهم بیماری‌زا STEC (n = 19)

بحث و نتیجه‌گیری

دو دستورالعمل رفرنس برای ردیابی سویه‌های STEC وجود دارد که پروتوکل اول در اتحادیه اروپا (ISO/TS 13136) و پروتوکل دوم در آمریکا (MLG5B.05) اجرا می‌شود. در حال حاضر استفاده از هر دو پروتوکل به‌ویژه در نمونه‌های غذایی با چالش همراه است (۲۱، ۲۲). به این جهت که ممکن است هر کدام از مارکرهای *stx1/stx2/eah* در دو یا تعداد بیشتری از ارگانیسم‌های موجود در نمونه مورد بررسی وجود داشته باشند که هیچ ارتباطی با سویه‌های STEC ندارند (۲۳، ۲۴). در نتیجه شناسایی و جایگزین کردن مارکرهای جدید با هدف به حداقل رساندن پاسخ‌های مثبت کاذب می‌تواند از نظر زمانی و مالی بسیار ارزشمند باشد، به‌ویژه اگر مارکرهای جدید توانایی شناسایی سویه‌های به شدت بیماری‌زای STEC که باعث ایجاد HUS در انسان می‌شوند را داشته باشند (۲۵).

مطالعه حاضر با هدف بررسی نوع رپلیکون در سویه‌های بیماری‌زا STEC انجام گرفت تا ارتباط این سویه‌ها با نوع پلاسمید حمل‌کننده مورد بررسی قرار گیرد. در صورتی که نوع خاصی از رپلیکون با سویه‌های خطرناک در ارتباط باشد، می‌توان در قدم بعدی نسبت به شناسایی ژن‌های

حدت حمل شونده توسط آن پلاسمید اقدام نمود. در صورتی که ژن‌های حمل‌شونده توسط آن پلاسمید دارای رپلیکون مشخص باشند و با بیماری‌زایی نیز در ارتباط باشند، می‌توان از رپلیکون آن پلاسمید به‌عنوان یک مارکر احتمالی برای ردیابی سویه‌های به شدت بیماری‌زا STEC استفاده نمود. در این راستا، بررسی نتایج نشان داد که رپلیکون FIB بالاترین فراوانی را در میان سویه‌های STEC مورد مطالعه دارد. هم‌راستا با این پژوهش، در مطالعات دیگر نیز به فراوانی رپلیکون FIB در سویه‌های STEC اشاره شده است (۲۶، ۲۷). به نظر می‌رسد که رپلیکون FIB نه تنها در پاتوتیپ STEC، بلکه در سایر پاتوتیپ‌های *E. coli* نیز از فراوانی بالایی برخوردار است و به‌عنوان شایع‌ترین رپلیکون پلاسمید در *E. coli* شناخته می‌شود (۷). اما در ارتباط با سویه‌های بیماری‌زا STEC، تنها ارتباط آنها با رپلیکون پلاسمید مربوط به رپلیکون K/B بوده است که ۵۷٪ جدایه‌های STEC واجد این رپلیکون، دارای *stx2* بودند و همچنین بیشترین جدایه‌های STEC دارای الگوی *stx2 + eae + ehxA* دارای این رپلیکون بودند. در مطالعه‌ای به ارتباط پلاسمیدهای با رپلیکون K/B با جدایه‌های *E. coli* بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک اشاره شده است که می‌تواند حائز

می‌شوند. در نهایت لازم است که پراکندگی این رپلیکون در سویه‌های کمتر بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا STEC و نیز پاتوتیپ‌های دیگر *E. coli* بررسی شود تا مطمئن شد که پلاسمیدهای مربوط به این نوع رپلیکون اختصاصی سویه‌های به شدت بیماری‌زا STEC هستند. در رابطه با رپلیکون K/B نیز، از آنجایی که پلاسمیدهای واجد این رپلیکون در سویه‌های خطرناک مورد مطالعه شناسایی شدند، بررسی اختصاصیت آنها در سویه‌های STEC جدا شده از بیماران با علائم شدید و همچنین بررسی ارتباط آن با تحت تیپ ژن *stx2* پیشنهاد می‌گردد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری پایانی، این مطالعه نشان داد که پلاسمیدهای با رپلیکون K/B مهم‌ترین نوع پلاسمید در سویه‌های STEC با ریسک بالای بیماری محسوب می‌شوند که بیانگر اهمیت ژن‌های حدت کدشونده بر روی این نوع پلاسمید و نقش آنها در بیماری‌زایی می‌باشد.

سپاسگزاری: بدین‌وسیله از کلیه تکنسین‌های آزمایشگاه /شریشیاکلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، قدردانی می‌شود. پژوهش حاضر در قالب رساله دکتری به شماره ۵۷۲۹۹ انجام گرفته است.

اهمیت باشد (۲۸). در مورد رپلیکون I1 نیز، ارتباط آن با سروگروپ مهم O26 قابل توجه بود، به نحوی که هر ۳ جدایه دارای رپلیکون I1 متعلق به سروگروپ O26 بودند. با این حال، بررسی مطالعات دیگر نشان می‌دهد که رپلیکون FIB همچنان از نظر فراوانی در سویه‌های بیماری‌زا و بالینی STEC در رتبه اول قرار دارد (۲۹). به‌طور کلی رپلیکون‌های خانواده F از جمله رپلیکون FIB به‌طور قابل توجهی در باکتری‌های روده‌ای حضور دارند و با فراهم کردن ژن‌های حدت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری می‌شوند (۳۰).

رپلیکون FIB تنها از نظر فراوانی مهم‌ترین نوع رپلیکون در سویه‌های خطرناک STEC محسوب می‌شود، با این حال نتیجه‌گیری در مورد اختصاصی بودن برای سویه‌های خطرناک STEC و کاربرد آن به‌عنوان مارکر نیاز به بررسی بیشتر این رپلیکون در مجموعه‌ای از جدایه‌های STEC، به‌ویژه سروگروپ‌های مهم به دست آمده از بیماران با علائم شدید دارد که تحت تیپ ژن *stx2* آنها مشخص باشد. همچنین لازم است که پلاسمیدهای FIB به دست آمده از این بیماران، از منظر محتوای ژنی به دقت بررسی شوند تا اطمینان حاصل کرد که ژن‌های حدت مسئول تشدید بیماری بر روی پلاسمیدهای با رپلیکون FIB کد

References

- 1- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2): 123–40.
- 2- Donnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*. 2001; 107(5): 539–48.
- 3- Badouei MA, Taban H, Nemati A, Santos LF Dos. Molecular serotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of animal origin in Iran reveals the presence of important non-O157 seropathotypes. *Vet Res Forum*. 2023; 14(5): 267–74.
- 4- Donnenberg M. *Escherichia coli*: pathotypes and principles of pathogenesis.

Academic Press. 2013. 1–273.

- 5- Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, Nakayama K, Murata T, Tamura K, et al. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(26): 17043–8.

- 6- European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia infection*. In: EC. **STEC infection; Annual Epidemiological Report for 2021**. DC Annu Epidemiol Rep 2021. Stockholm: ECDC; 2022.

- 7- Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ*

Microbiol. 2007; 73(6): 1976–83.

8- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005; 63(3): 219–28.

9- Delannoy S, Beutin L, Fach P. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(4): 1083–8.

10- Delannoy S, Tran ML, Fach P. Insights into the assessment of highly pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and raw milk cheeses by High Throughput Real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* 2022; 366: 109564.

11- Bellwood B, Andrasik-Catton M. Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures. *John Wiley & Sons.* 2023.

12- Cappuccino JC, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. Benjamin/Cumming Pub. Co., New York; 1992.

13- Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J.* 2009; 41(2): 117–22.

14- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*(O111), and *rfb*(O157). *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 598–602.

15- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(3): 1205–8.

16- Sánchez S, Llorente MT, Echeita MA, Herrera-León S. Development of three multiplex PCR assays targeting the 21 most clinically relevant serogroups associated with Shiga toxin-producing *E. coli* infection in humans. *PLoS One.* 2015; 10(1): 1–11.

17- DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Heal Res Rev.* 2011; 12(2): 169–85.

18- Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(8): 2427–32.

19- Istituto Superiore di Sanità. Identification of the VTEC serogroups mainly associated with

human infections by conventional PCR amplification of O-associated genes. *EU Ref Lab E coli.* 2020; 1–8.

20- Liu Y, DebRoy C, Fratamico P. Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Mol Cell Probes.* 2007; 21(4): 295–302.

21- ISO (International Organization for Standardization). Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O11. Available online <https://www.iso.org/standard/53328.html>. 2012; ISO/TS 131.

22- Anonymous. Detection, isolation and identification of top seven Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Available online at https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-08/MLG-5C02.pdf. 2021.

23- Brandal LT, Tunsjø HS, Ranheim TE, Løbersli I, Lange H, Wester AL. Shiga toxin 2a in *Escherichia albertii*. *Journal of clinical microbiology.* United States. 2015; 53(4): 1454–5.

24- Ooka T, Tokuoka E, Furukawa M, Nagamura T, Ogura Y, Arisawa K, et al. Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(1): 144–6.

25- Asadi Karam M, Bouzari S, Oloomi M, Aslani M, Jafari A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2010; 2(1): 3–7.

26- Salaheen S, Kim SW, Springer HR, Hovingh EP, Van Kessel JAS, Haley BJ. Genomic diversity of antimicrobial-resistant and Shiga toxin gene-harboring non-O157 *Escherichia coli* from dairy calves. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023; 33: 164–70.

27- Castro VS, Polo RO, de Souza Figueiredo EE, Bumunange EW, McAllister T, King R, et al. Inconsistent PCR detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Insights from whole genome sequence analyses. *PLoS One.* 2021; 16(9): 1–26.

28- Berg ES, Wester AL, Ahrenfeldt J, Mo SS, Slette-meås JS, Steinbakk M, *et al.* Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and IncK/bla_{CMY-2} resistance plasmids. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23(6): 407.e9-407.e15.

29- Bumunang EW, Zaheer R, Stanford K, Laing C, Niu D, Guan LL, *et al.* Genomic

Analysis of Shiga Toxin-Producing *E. coli* O157 Cattle and Clinical Isolates from Alberta, Canada. *Toxins (Basel).* 2022; 14(9): 603.

30- Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(12): 2518-2529.



Plasmid Replicon Typing and Comparison with Virulent Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates in Animal Sources


Ali Nemati¹, Mahdi Askari Badouei^{*2}, Gholamreza Hashemi Tabar³

1- PhD Student in Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Receive: January 9, 2024; Revise: February 3, 2024; Accept: February 4, 2024

 10.22034/nfvm.2024.434828.1222

Summary

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are responsible for severe human diseases, such as hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS). Controlling infections associated with STEC poses a significant challenge, particularly in the timely tracking and identification of pathogenic strains in environmental, food, and clinical samples. Currently, the detection protocols in the European Union (ISO/TS 13136) and the United States (MLG5B.05) rely on the genes *stx* and *eae*, along with specific serogroup-associated genes. Here, we investigated various replicons and compared them with major pathogenic serogroups and *stx2*-positive strains to identify crucial replicons that can potentially harbor virulence genes, overcoming the limitations of ISO/TS 13136 and MLG5B.05 methodologies by focusing on the virulence genes encoded on these plasmids as alternative markers. Ninety-six STEC isolates from various animal hosts were subjected to single and multiplex PCR assays. Among the 82 STEC strains carrying plasmids, the prevalence of different replicons, including FIB (69/82, 84.1%), K/B (21/82, 25.6%), B/O (11/82, 13.4%), P (8/82, 9.8%), Y (6/82, 7.3%), FIA (3/82, 3.7%), I1 (3/82, 3.7%), and L/M (1/82, 1.2%), was determined. While the frequency of FIB plasmids was notable, an association between pathogenic STEC strains and K/B plasmids was observed. Most STEC isolates carrying the *stx2 + eae + ehxA* gene pattern were associated with K/B replicon. The study suggests examining the correlation between plasmid types and *stx2* gene subtypes and determining the genetic content of these plasmids to assess virulence and identify potential genetic markers.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Plasmid, Replicon, Marker