JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۵: ۱۰۵-۹۷

جداسازی و فراوانی *اشریشیاکلی* O157:H7 از مزارع پرورش شترمرغ استان لرستان با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

سپیده اسدی[۱]، نعمت شمس[۲*]، سیدمحمد نایب‌آقایی[۳]

۱- کارشناسی ارشد ناپیوسته باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- دانشجوی دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱

چکیده

اشریشیاکلی O157:H7 در سراسر دنیا به‌عنوان یک عامل مهم اسهال، کولیت خونریزی دهنده و سندروم اورمی همولیتیک شناخته شده است. مخزن اصلی و طبیعی اشریشیاکلی O157:H7 حیوانات اهلی و وحشی می‌باشند که باکتری را از طریق مدفوع خود در محیط منتشر می‌کنند. هدف این مطالعه جداسازی و تعیین شیوع اشریشیاکلی O157:H7 در نمونه‌های مدفوع مزارع پرورشی شترمرغ با استفاده از کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چند گانه در استان لرستان بود. در این بررسی توصیفی- مقطعی در مجموع یکصدنمونه مدفوع شترمرغ طی ماه‌های فروردین تا خرداد سال ۱۳۹۴ جمع آوری گردید. ده گرم نمونه مدفوع به آب گوشت تریپتون‌سوی حاوی مکمل نوبیوسین (TSB-n) اضافه گردید. جهت غربالگری، کلیه نمونه‌های غنی شده بر روی محیط انتخابی مکانکی‌آگار سوربیتول‌دار حاوی مکمل سفکسیم و تلوریت پتاسیم (CT-SMAC) کشت داده شد. سپس کلیه جدایه‌های سوربیتول منفی اشریشیا کلی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با آزمون PCR چندگانه مورد ارزیابی قرارگرفتند. از یکصد نمونه مدفوع، بعد از غنی سازی و کشت در محیط انتخابی CT-SMAC، پرگنه‌های سوربیتول منفی از ۱۵ نمونه (۱۵ درصد) جدا گردید. در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه تنها ۴ جدایه (۴ درصد) به عنوان اشریشیاکلی O157:H7 شناسایی شدند. مطالعه حاضر اولین گزارش جداسازی و تشخیص اشریشیاکلی O157:H7 از نمونه‌های مدفوع شترمرغ در ایران می‌باشد. این بررسی اهمیت مدفوع شتر مرغ را به عنوان مخزنی از اشریشیاکلی O157:H7 نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: *جداسازی، شیوع، اشریشیاکلی O157:H7، شترمرغ، مدفوع*

* *نویسنده مسئول: نعمت شمس*

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران. تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۱۰۹

پست الکترونیک: nematshams1386@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اشریشیا کلی انتروهموراژیک O157:H7 به عنوان یکی از مهمترین عوامل اسهال خونی یا کولیت هموراژیک (HC) می‌باشد که در موارد حاد منجر به ایجاد سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) و پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک (TTP) و در نهایت مرگ می‌شود (۳، ۵، ۹، ۱۵، ۲۱). *اشریشیا کلی* O157:H7 با تولید شیگاتوکسین و از طریق موادغذایی آلوده به این باکتری بویژه گوشت نپخته و نیم‌پز و نیز شیر خام و غیر پاستوریزه در ایجاد بیماری‌های منتقل شونده توسط مواد غذایی نقش دارد (۱۷). از مهم‌ترین مواد غذایی که در همه‌گیری‌های مختلف احتمال آلودگی آن‌ها با باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 وجود دارد، می‌توان به همبرگر، گوشت چرخ کرده، شیر، ماست، پنیر، سبزیجات، آب میوه‌ها (به‌ویژه آب سیب)، جوانه ترب و یونجه اشاره کرد (۲، ۴، ۸، ۲۳). باکتری فوق در تمامی نواحی جغرافیایی یافت می‌شود و از مواد غذایی مختلف جدا شده است ولی میزان جداسازی آن در مناطق مختلف بسیار متفاوت گزارش شده است. که این امر بسته به نوع ماده غذایی بررسی شده، فصل نمونه‌گیری و روش‌های جداسازی باکتری متفاوت بوده است. نشخوار کنند گان اصلی به ویژه گاو، گوسفند و بز اصلی‌ترین مخازن این باکتری محسوب می‌شوند اما این سویه از پرندگان اهلی و وحشی مانند: بوقلمون، پرندگان دریایی، پرندگان زینتی، مرغ نوروزی و سایر حیوانات نظیر اسب، سگ، گربه، خوک، آهو و شیر و. نیز جدا گردیده است (۲۷، ۱۰، ۲۹).

جداسازی *اشریشیاکلی* O157:H7 از گونه‌های جانوری که هم به عنوان میزبانان واقعی یا صرفاً میزبانان اتفاقی عمل می‌نمایند، از نظر بهداشت محیط و مواد غذایی مهم و با اهمیت تلقی می‌شود. توسعه تجارت گوشت ومواد پروتئینی با کیفیت از منابع جدید از جمله شترمرغ در دو دهه اخیر مورد توجه بسیاری از کشورها قرار گرفته و با توسعه تجارت این محصولات الگوهای جدید تغذیه‌ای در دنیا در حال شکل‌گیری است و در این راستا با افزایش تقاضا برای گوشت و محصولات جانبی شترمرغ، تولید، پرورش و تجارت شترمرغ در برخی از کشورها از جمله ایران مورد توجه قرارگرفته است. پرورش شترمرغ در ایران از اواسط دهه ۷۰ با واردات تعدادی تخم نطفه‌دار به کشور آغاز گردید. از آن زمان تاکنون پرورش این پرنده در کشور گسترش یافته است و اکنون در بیشتر استان‌ها مزارع پرورش شترمرغ دائر می‌باشد (۲۹). استان لرستان به لحاظ موقعیت جغرافیایی و اقلیمی یکی از مکان‌های مناسب جهت احداث مزارع پرورش شترمرغ می‌باشد. با توجه به پایین بودن دوز عفونی *اشریشیاکلی* O157:H7 (کمتر از ۵۰ تا ۱۰۰ باکتری)(۲۱) و اهمیت آن در بهداشت و سلامت انسان از یک طرف و نبود اطلاعات کافی درخصوص میزان آلودگی مزارع پرورشی شترمرغ استان به این باکتری از سوی دیگر، این مطالعه با هدف جداسازی و تعیین شیوع *اشریشیاکلی* O157:H7 از نمونه‌های مدفوع در سطح مزارع پرورشی شترمرغ استان لرستان انجام گردید.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر به صورت توصیفی- مقطعی در بهار ۱۳۹۴ بر روی یکصد نمونه مدفوع شتر مرغ که به صورت تصادفی از سطح مزارع پرورشی جمع آوری گردید، انجام گرفت. نمونه‌ها در ظروف استریل جمع-آوری و در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان جهت انجام مراحل بعدی انتقال داده شدند. به منظور غنی سازی ۱۰ گرم از نمونه‌های مدفوع به ۲۲۵ میلی-

Archive of SID

www.SID.ir

لیتر آب گوشت تریپتون سوی (TSB) (Merck, Germany) حاوی مکمل نوبیوسین (۲۰mg/l) (Merck, Germany) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. نمونه‌های غنی شده بر روی محیط سوربیتول مک‌کانکی آگار (SMAC) (Merck, Germany) حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر سفکسیم (Oxoid, UK) و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تلوریت پتاسیم (Oxoid, UK) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، کلنی‌های سوربیتول منفی خالص سازی گردید (۱۹).

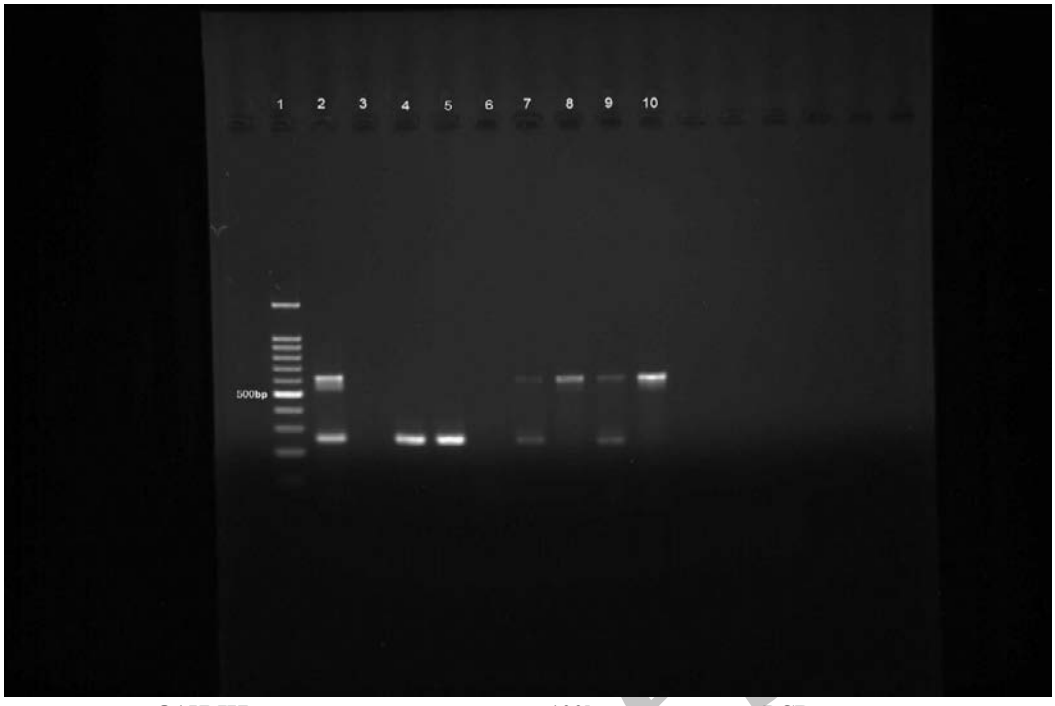
جهت بررسی حضور ژن‌های O157 و H7 در جدایه-های سوربیتول منفی و تشخیص نهایی *اشریشیاکلی* O157:H7 از آزمونPCR چندگانه با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی (جدول شماره ۱) (SinaClon, Iran) برای تشخیص ژن‌های O_{157} (*rfb*) و H_7 (*flic*) استفاده گردید (۱۳، ۲۵). جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (Sinagen, Iran) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکترومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای انجام آزمون PCR غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۹ میکرومولار ازمسترمیکس (Ampliqon C, Denmark)، ۱ میکرومولار از هر پرایمر، ۲ میکروگرم DNA از هر نمونه و باقیمانده حجم آب استریل استفاده شد. آزمون PCR چندگانه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Primus 96,Germany) با شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه (واسرشت سازی)، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه (گسترش نهایی) با ۳۰ سیکل انجام شد. در این مطالعه از سویه استاندارد آزمایشگاهی *اشریشیاکلی* O157:H7 اخذ شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR توسط دستگاه الکتروفورز (Padideh Nojen Pars, Iran) بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ (Sigma, USA) و با استفاده از رنگ Safe Stain(SinaClon, Iran) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, England) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

بر اساس آزمون‌های باکتری شناسی از مجموعه نمونه-های مورد مطالعه تعداد ۱۵ جدایه (۱۵ درصد) بر اساس ویژگی عدم تخمیر سوربیتول بر روی محیط SMAC به عنوان سروتیپ مشکوک به *اشریشیاکلی* O157:H7 شناسایی گردید. در ادامه کلیه جدایه‌های سوربیتول منفی جهت تشخیص نهایی *اشریشیاکلی* O157:H7 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد از ۱۵ جدایه *اشریشیا کلی* سوربیتول منفی، تنها ۴ جدایه (۴ درصد) بطور همزمان واجد هر دو ژن O_{157} و H_7 بودند که به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 در نظر گرفته شدند و ۶ جدایه تنها واجد ژن H_7 و ۲ جدایه تنها واجد ژن O_{157} و سه جدایه نیز فاقد هر دو ژن مذکور بودند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات PCR: چاهک ۱: مارکر 100bp، چاهک ۲: کنترل مثبت *اشریشیاکلی* O157:H7، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴ و ۵: نمونه های مثبت *اشریشیاکلی* واجد ژن O157، چاهک ۶: نمونه‌های منفی از نظر ژن O157 و H7، چاهک ۷ و ۹: نمونه‌های مثبت *اشریشیاکلی* واجد هر دو ژن O157و H7، چاهک ۸ و ۱۰: نمونه‌های مثبت *اشریشیاکلی* واجد ژن H7

جدول شماره ۱:پرایمرهای ژن‌های *O157* وH7جهت تشخیص *اشریشیاکلی* O157:H7

نام پرایمر		توالی پرایمر ۵' ⟶ 3'	اندازه (bp)	منابع
O_{157}	F	CGG ACA TCC ATGTGA TATGG	۲۵۹	۲۵
	R	TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC		
H_7	F	GCGCTGTCGAGT TCT ATC GAGC	۶۲۵	۱۳
	R	CAA CGG TGA CTTTATCGC CA TTCC		

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 از جمله باکتری‌هایی است که در سال‌های اخیر توجه محققان و دست اندرکاران بهداشتی را به لحاظ بروز همه‌گیری‌هایی که داشته است، به خود معطوف نموده است. به طور کلی در کشورهای در حال توسعه پژوهش‌های وسیعی در مورد شیوع و بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 در حیوانات صورت گرفته است. با توجه به اینکه مخزن اصلی *اشریشیاکلی* O157:H7 دام‌های اهلی نظیر گاو، گوسفند و محصولات غذایی آنها می‌باشد، بیشتر بررسی‌ها و مطالعات موجود مربوط به آلودگی این دام‌ها و فرآورده‌های تهیه شده از آنها بوده است (۷، ۹، ۱۱، ۱۵). اگرچه *اشریشیا کلی* شیگاتوکسین‌زای گروه سرمی O157(STEC O157) در جوجه‌های گوشتی، بوقلمون، کبوتر و پرندگان وحشی از قبیل مرغ نوروزی، پرندگان دریایی و غاز گزارش شده است (۲۶). بررسی‌های انجام شده جهت تعیین میزان شیوع سروتیپ *اشریشیاکلی* O157:H7 در گوشت لاشه و مدفوع پرندگان اهلی،

Archive of SID
www.SID.ir

وحشی و زینتی در ایران و سایر کشورها نتایج متفاوتی نشان می‌دهد.

آکایا و همکاران (۲۰۰۶) در ترکیه میزان آلودگی لاشه به*اشریشیاکلی* O157:H7 را در ۱۹۰ نمونه گوشت طیور ۱/۰۵ درصد گزارش نمودند (۱). در پژوهش رحیمی و همکاران (۲۰۱۰) بر روی گوشت بوقلمون در اصفهان، از مجموع ۲۴۰ نمونه مورد بررسی با انجام تست‌های کشت و بیوشیمیایی، میزان آلودگی نمونه‌ها به اشریشیاکلیO157:H7 (۲۴/۲ درصد) گزارش گردید که پس از انجام PCR تنها (۸/۵ درصد) ازنمونه‌های مورد مطالعه به عنوان نمونه‌های آلوده به اشریشیاکلیO157:H7 شناخته شدند (۲۸). در بررسی ژائو و همکاران (۲۰۰۱) که بر روی ۲۱۲ نمونه گوشت مرغ و ۱۹۴ نمونه گوشت بوقلمون در سطح ۵۹ سوپر مارکت شهر واشنگتن صورت پذیرفته است میزان آلودگی به *اشریشیا کلی* بترتیب ۳۸/۷ و ۱۱/۹ درصد اعلام گردید لیکن در هیچکدام از نمونه‌های مورد مطالعه سویه‌های شیگاتوکسین‌زا نظیر*اشریشیاکلی* O157:H7 یافت ننمودند (۳۵). مطالعه سانتانیلو و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ۵۰۴ نمونه سواپ کلواک کبوتر در شهر ناپولی ایتالیا نشان داد که تنها ۴ نمونه (۰/۷ درصد) به *اشریشیاکلی* O157:H7 آلوده هستند (۳۰). همچنین شر و همکاران (۱۹۹۸) از ۹۹ پرنده‌ی مورد بررسی در ایالت ویسکانسین آمریکا تنها در یک کبوتر آلودگی به این سروتیپ یافتند (۳۱). کوچک-زاده و همکاران (۲۰۱۵) طی یک بررسی به منظور تعیین میزان شیوع سویه‌های شیگاتوکسین‌زای *اشریشیا کلی* (STEC) بر روی ۶۵۷ جدایه *اشریشیا کلی* که از ۲۱۹ پرنده متعلق به ۳۸ گونه مختلف جداسازی شده بود، دریافتند ۱/۸ درصد پرندگان مورد مطالعه (غاز و اردک اهلی، مرغ مینا و باز) حامل سویه‌های STEC هستند (۱۸).

نتایج بررسی حاضر با بعضی از مطالعات انجام گرفته بر روی پرندگان زینتی در ایران و سایر کشورها متفاوت می‌باشد. در مطالعه طهماسبی و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ۲۵۶ نمونه مدفوعی از پرندگان زینتی (مرغ عشق، بلدرچین، بلبل، طوطی، مینا، سهره، مرغ بهشتی، طاووس و قرقاول) از نقاط مختلف شهرکرد، در هیچ کدام از نمونه‌های مورد بررسی *اشریشیاکلی*مشاهده ننمودند (۳۴). نامبردگان در مطالعات جداگانه دیگر که بر روی ۱۸۰ نمونه مدفوع پرندگان زینتی یزد (۱۵۰ نمونه قناری، ۳۰ نمونه مرغ عشق) و ۸۰ نمونه مدفوع کبوتر خانگی در شهرکرد داشتند، عدم وجود سروتیپ *اشریشیاکلی* O157:H7 را دریافتند (۳۲،۳۳). مطالعه مورابیتو و همکاران (۲۰۰۱) در ایتالیا بر روی ۶۴۹ نمونه مدفوع کبوتر نشان داد که ۷۰ نمونه واجد سویه‌های شیگاتوکسین‌زای *اشریشیا کلی* هستند اما سروتیپ *اشریشیاکلی* O157:H7 در هیچ کدام از نمونه‌های مورد بررسی یافت نگردید (۲۴). از علل عدم آلودگی به سروتیپ*اشریشیاکلی* O157:H7 در مطالعات فوق شاید بتوان به سطح مطلوب بهداشتی، وضعیت تغذیه‌ای و محیط زندگی در کبوترهای خانگی در مقایسه با سایر پرندگان زینتی اشاره کرد که خود باعث تفاوت در نتایج حاصله می‌گردد.

بیشترین بررسی‌ها در خصوص میزان آلودگی شترمرغ با *اشریشیا کلی* و مقاومت میکروبی این جدایه‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی ایران و سایر کشورها بر روی تخم این پرنده صورت پذیرفته است. (۶، ۱۰، ۱۶، ۲۲، ۲۹). تاکنون در ایران هیچ گونه بررسی در خصوص میزان آلودگی مدفوع مزارع پرورشی شترمرغ به *اشریشیاکلی* O157:H7 صورت نگرفته است. مطالعه حاضر اولین

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش از وضعیت آلودگی مدفوع شتر مرغ به *اشریشیاکلی* O157:H7 در استان لرستان و ایران می‌باشد. بررسی حاضر نشان داد تنها ۴ جدایه (۴ درصد) در نمونه‌های مورد بررسی به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 شناسایی شدند. طی مطالعه‌ای در باغ وحش عراق حمزه و همکاران (۲۰۱۳) میزان آلودگی نمونه مدفوع شترمرغ را به *اشریشیاکلی* O157:H7 با استفاده از کشت و سروتایپینگ، ۶۶/۷٪ (۳ مورد از ۹ نمونه) اعلام کردند (۱۴) که با بررسی حاضر بدلیل تعداد کم نمونه‌ها، فصل نمونه‌گیری، روش بررسی و نیز تفاوت منطقه جغرافیایی همخوانی ندارد. مطالعه نامبردگان در ماه‌های خرداد و تیر (فصول گرم سال) انجام گرفته است و این در حالی است که بررسی حاضر در فصل بهار که سردتر است صورت پذیرفته است. بررسی‌ها نشان داده است که نوعی شیوع فصلی در رابطه با دفع مدفوعی *اشریشیاکلی* O157:H7 وجود دارد و حیوانات در فصول گرم سال، ارگانیسم را بیشتر دفع می‌نمایند (۱۲).

مطالعه لی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ایالت‌های ایندیانا و اوهایوی ایالات متحده امریکا که جهت تعیین میزان آلودگی لاشه شترمرغ به *اشریشیاکلی* O157:H7 و سالمونلا انجام گرفت، نشان داد که هیچکدام از لاشه‌ها به *اشریشیاکلی* O157:H7 آلوده نمی‌باشند (۲۰). از دلایل اختلاف با مطالعه حاضر نیز می‌توان به نوع نمونه، روش بررسی و منطقه جغرافیایی اشاره کرد. بررسی فوق به جداسازی این ارگانیسم در لاشه شتر مرغ پرداخته است در صورتی که بیشترین حضور *اشریشیاکلی* O157:H7 در مدفوع می‌باشد. احتمالاً در بررسی فوق مراحل نگه‌داری و حمل و نقل رعایت اصول بهداشت صورت گرفته و در کاهش آلودگی مؤثر بوده است.

با توجه به اینکه بیش‌ترین حضور *اشریشیاکلی* O157:H7 در مدفوع بوده و از این طریق می‌تواند باعث آلودگی سطح لاشه و گوشت دامها طی مراحل کشتار شود، به همین دلیل رعایت اصول بهداشت به همراه پایش دوره‌ای و منظم باکتری در کلیه مراحل نگهداری، پرورش و کشتار خطر ابتلا به عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی* O157:H7 را در سطح جامعه کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته ازپایان نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته باکتری شناسی می‌باشد لذا نویسندگان از مساعدت و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Akkaya, L., Atabay, H.I., Kenar, B., Alisarli, M. (2006).Prevalence of verotoxigenic*E. coli*O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey.*Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. **50**: 513-516.

2- Alexander, E. R., Boase, J., Davis, M., Kirchner, L., Osaki, C., Tanino, T., Samadpour, M., Tarr,P., Goldoft, M., Lankford, S., Kobyashi, J., Stehr-Green, P., Bradley, P., Hinton, B., Tighe, P., Pearson, B., Flores, G.R., Abbott, S., Bryant, R., Werner, S.B. and Vugi, D.J. (1995). *Escherichia coli*O157:H7outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **44**:157–159.

3- Badouei, M.A., ZahraeiSalehi, T., RabbaniKhorasgani, M., Tadjbakhsh, H., NikbakhtBrujeni, G. (2010). Occurrence and characterization of enterohaemorrhagic*Escherichia coli* isolates from diarrhoeic calves. *Comparative Clinical Pathology*.**19**:295-300.

4- Besser, R. E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G and Griffin, P.M. (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome

Archive of SID

www.SID.ir

14- Hamzah, A.M., Hussein, A.M., Khalef, J.M. (2013). Isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 Strain from Fecal Samples of Zoo Animal. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2013/843968.
15- Heuvelink, A. E., Van den Biggelaar, F. L. A. M., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Herbes, R. G., Huyben, R., Nagelkerke, N., et al. (1998). Occurrence of verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms.*Journal of Clinical Microbiology*.**36**:3480–3487.
16- Jahantigh, M. (2010). Bacteriological study of dead in- shell embryos of ostrich. *Iranian Journal of Veterinary Research*.**11**:88-90.
17- Kargar, M and Homayoon, M. (2010). Outbreaks of infection sources and antibiotic resistance in EHEC strains among children under 5 years old in Marvdasht. *MedicalSciences Journal of Islamic Azad University Tehran Medical Branch*.**19**:268-273.
18- Koochakzadeh, A., AskariBadouei, M., ZahraeiSalehi, T., Aghasharif, S., Soltani, M., and Ehsan, M. (2015). Prevalence of shiga toxin-producing and enteropathogenic*Escherichia coli* in wild and pet birds in Iran. *RevistaBrasileira de Ciência Avícola.***17**, 445–450.
19- Lee, J.H., Choi, S.J. (2006). Isolation and characteristics of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microbes and Infection*.**8**:2021-26.
20- Ley, E.C., Morishita, T.Y., Brisker, T., Harr, B.S. (2001). Prevalence of Salmonella, Campylobacter, and *Escherichia coli* on ostrich carcasses and the susceptibility of Ostrich- origin *E. Coli* isolates to various antibiotics. *Avian Diseases*.**45**:696-700.
21- Lim, J.Y., Yoon, J.W., Hovde, C.H. (2010). A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157.*Journal of Microbiology and Biotechnology*.**20**: 5–14.
22- Mohamadi, E., Alizade, H., Askari, N., Salehi, M., Porjafarian, M., Ghanbarpour, R. (2014). Antibiotic Resistance Profle in Relation to Phylogenetic Background in *Escherichia coli* Isolated From Fecal Samples of Healthy Ostrich. *International Journal of Enteric Pathogens*.3: e25366.
from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association*.**269**:2217–2220.
5- Boyce, T., Swerdlow, D.L and Griffin, P.M. (1995).*Escherichia coli* O_{157}: H_7 and the Hemolytic Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine*.**333**:364-368.
6- Cabassi, C.S., Taddei, S., Predari, G., Galvani, G., Ghidini, F., Schiano, E., et al. (2004). Bacteriologic findings in ostrich (Struthiocamelus) egges from farms with reproductive failures. *Avian Diseases.* **48**:716-722.
7- Callaway, T.R., Elder, R.O., Keen, J.E., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. (2003). Forage Feeding to Reduce Preharvest*Escherichia coli* populations in Cattle, a Review. *Journal of Dairy Science***. 86**: 825-60.
8- Chauret,C (2011). Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence*.**2**:593-601.
9- Cliver, D.O., Rieman H.P. (2002). Foodborne Disease. 2nd ed.; Great Britain, Academic Press: 90-100.
10- Deeming, D. C. (1996). Microbial spoilage of ostrich (Struthiocamelus) egges. *British Poultry Science*.**37**:689-693.
11- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., et al. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*.**82**: 273-9.
12- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*.**162**:190–212.
13- Ganon, V.P., D' Souza, S., Graham, T., King, R.K., Red, S. (1997). Use of the flagellar*H7* genes as a target in multiplex PCR assay and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *E. coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*.**35**: 656-662.

Archive of SID

www.SID.ir

23- Montville, T.J., Matthews, K.R. (2005). Food Microbiology, an Introduction. Washington DC, ASM Press: 111- 126.

24- Morabito S, Dell'Omo G, Agrimi U, Schmidt H, Karch H, Cheasty T, Caprioli A. (2001) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Veterinary Microbiology*.**82**:275-283.

25- Paton, A.W., Paton, J.C. (1998). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagicE.colihlyA, rfbO_{111}, and rfbO_{157}. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 598-602.

26- Persad, A., LeJeune, J. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* 2: EHEC-0027-2014. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014

27- Rabatsky-Her, T., Dingman, D., Marcus, R., Howard, R., Kinney, A., Mshar, P. (2002). Deer Meat as the Source for a Sporadic Case of *Escherichia coli* O157:H7 Infection, Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* **8:** 525-527.

28- Rahimi, E., Momtaz, H., Dousti, A., Jazayeri, K., Mahmoudi, R. (2010). Detection of contamination of turkey meat to *Escherichia coli*O157:H7 and *Listeria*Monocytogenes by cultural and PCR methods. *Iranian Veterinary Journal*. **5**: 20-26.

29- RezaeiFar, A., Peighambari, S.M., Sadrzadeh, A., AskariBadouei, M. (2013). Bactrial contamination of dead- in- shell embryos in ostrich hatcheries and antimicrobial resistance patterns of isolated Escherichia coli. *Iranian Journal of Vetrinary Medicine*.**7**:169-75.

30- Santaniello, A., Gargiulo, A., Borrelli, L., Dipineto, L., Cuomo, A., Sensale, M., et al. (2007).Survey of Shiga toxin-producing *Escherichiacoli O157:H7* in urban pigeons (*Columbalivia*) in the city of Napoli, Italy.*Italian Journal of Animal Science*.**6**: 313-16.

31- Shere, J.A., Bartlett, K.J., Kaspar, C.W. (1998). Longitudinal Study of *Escherichia coli*O157:H7Dissemination on Four Dairy Farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbioogyl*.**164**: 390–99.

32- Tahmasby, H., Momtaz, H., Salehi, N., RafieeDolatabadi, M., Yektaneh, F. (2011). Prevalence of Escherichia *Coli* O157:H7in pet birds in Yazd, Iran. *Pajouhandeh.* **16**: 252-5.

33- Tahmasby, H., Momtaz, H., RafieeDolatabadi, M.,Barati, S., Mehrabian, S., Jaffari, M., Khosravi, M., Ghasemi, M., Ahmadi, S.V. (2012). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by PCR and evaluation of resistance to beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli* isolated from pigeons in Shahrekord, Iran.*Veterinary Journal (Pajouhesh&Sazandegi)*.**99**: 8-14.

34- Tahmasby, H., Barati, S., Momtaz, H., RafieeDolatabadi, M., Ghasemi, M., Ahmadi, S.V.Mehrabian, S. (2013).An Investigation of beta-lactam antibiotics resistance in *Escherichia coli*isolates and molecular detection of *Escherichia coli* O157:H7in cage birds from Shahrekord, Iran.*Biological Journal of Microorganism*.**3**:33-44.

35- Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., Meng, J. (2001). Prevalence of *Campylobacter spp*., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. *Applied and Environmental Microbioogyl*.**67**:5431–5436.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 2, 2017

Isolation and Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 from Fecal Samples of Lorestan Ostrich Farms using Culture and Multiplex PCR

Asadi, S[1];Shams, N.[2*]; Nayebaghaee, S.M[3]

1. MSc in Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram-Abad, Iran
2. Assistant professor,Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. PhD student of Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Uremia University, Iran

Received Date: 23 February 2017 *Accepted Date: 22 May 2017*

Abstract: *E.coliO157:H7 is recognized globally as an important cause of diarrhea, hemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. The main and natural reservoirs of E. coliO157:H7 are feces of domestic and wild animals, which shed the bacteria with their feces into the environment.The aim of the present study was to isolation and the prevalence determination of E. coliO157:H7 in fecal samples of ostrich farms using culture and multiplex PCR in Lorestan province. In this cross sectional study, at all 100 fecal samples of ostrich were collected during March to May 2015. A 10-g of fecal sample was added to 90 ml of Trypticase soya broth containing novobiocin and all of enrichment samples were cultured on selective sorbitol Macconkey agar plates supplemented with Cefixime and tellurite (CT-SMAC) for screening test. All nonsorbitol fermenting isolates were evaluated to multiplex PCR using specific primers. From 100 fecal samples, after enrichment and selective plating, 15 (15%) nonsorbitol fermenting were isolated, but only 4 (4%) isolates were identified as E.coliO157:H7 using multiplex PCR. The present study is the first report on isolation of E. coliO157:H7 from ostrich feces sample in Iran. This study shows the importance of ostrich fecal as a reservoir of E. coliO157:H7.*

Keywords: *Isolation, Prevalence, E. coliO157:H7, Ostrich, Feces.*

**Corresponding author: Shams, N.*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Tel: +9866-33120109
Email: nematshams1386@yahoo.com

www.SID.ir