

شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی O157:H7* در تخم طیور (بلدرچین،

مرغ، کبوتر و شترمرغ) بومی استان اصفهان

مهدی مرادی سرمیدانی^{۱*}، محسن فردعمادی^۱، ابراهیم رحیمی^۲، عبدالکریم زمانی مقدم^۳

۱. گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: Bluedvm@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶

چکیده

اشریشیاکلی یکی از متداول‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای در انسان و حیوانات است که باعث بروز عفونت‌های مختلفی می‌گردد. *اشریشیاکلی O157:H7* یکی از سروتیپ‌های مهمی است که در تحت گروه *اشریشیاکلی*‌های خونریزی دهنده روده‌ای قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف جستجوی سروتیپ *O157:H7* در نمونه‌های تخم طیور بومی موجود در بازار با استفاده از دو روش کشت و روش مولکولی PCR انجام و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نیز بررسی شد. در مجموع تعداد ۸۷ نمونه تخم طیور بومی (مرغ، بلدرچین، کبوتر، شترمرغ) از سه قسمت پوسته، زرده و سفیده (از هر قسمت یک نمونه مجزا) مورد بررسی قرار گرفت که بعد انجام مراحل کشت تعداد ۸ نمونه آلوده به این باکتری بودند سپس این ۸ نمونه جهت تعیین سویه مورد آزمایش با روش PCR قرار گرفتند و در نهایت تعداد ۴ نمونه واجد ژنوم سویه *O157:H7* بودند. همچنین پس از انجام آزمون‌های آنتی‌بیوگرام جهت تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بیشترین حساسیت در مورد *اشریشیاکلی* به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریواکسن، انروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نالی دیکسیک اسید بود.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی O157:H7*، تخم طیور بومی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کشت، PCR.

مقدمه

تماس با بستر آلوده رخ می‌دهد. علاوه بر این، انتقال آلودگی از پوسته به محتویات نیز امکان پذیر است و این حالت معمولاً در دقایقی پس از تخم‌گذاری که پوسته قابلیت نفوذ بیش‌تری دارد، رخ می‌دهد (CSLI (et al., 2012).

در کشورهای آسیایی و آفریقایی درصد جمعیت طیور بومی در مقابل کل جمعیت طیور ۸۰ درصد است (Abatangelo et al., 1978) و این جمعیت نقش مهمی در انتقال بیماری‌های مشترک به انسان را دارند (Blanco et al., 2003). با توجه به کیفیت بالای تخم مرغ‌های بومی، مصرف کنندگان تمایل بیشتری به خرید این محصولات دارند (ادیب فر و همکاران، ۱۳۷۹)؛ بنابراین عدم نظارت و کنترل دقیق بر روی مرغ‌های بومی از یک سو و شرایط نامناسب نگهداری آن‌ها در مناطق روستایی از سوی دیگر سلامت جمعیت

مسمومیت‌های غذایی یکی از مشکلات عمده بهداشت عمومی در جهان است (Chandra et al., 1999) و از بین مطالعاتی که در این زمینه انجام پذیرفته‌اند، توانایی بالای باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان عاملی برای فساد انواع مواد غذایی، به‌مراتب بیشتر گزارش شده است (C.D.C., 1983).

تخم مرغ غذای کامل و مهمی است که به دلیل دارا بودن مواد مغذی از جمله پروتئین، ویتامین E، B12، A و D در غذاهای متنوعی استفاده می‌شود (Alexandere et al., 2003).

آلودگی تخم مرغ به باکتری *اشریشیاکلی* از دو طریق عمودی و افقی امکان پذیر است. در شکل عمودی، محتویات تخم مرغ قبل از تشکیل پوسته آلوده می‌شود. انتقال افقی نیز از طریق پوسته رخ می‌دهد به طوری که آلودگی پوسته یا در هنگام عبور از کلوک و یا در اثر

انتروهمولیزین (*ehly*) اشاره نمود (Bar et al., 1973) و (Cave et al., 1994).

متأسفانه علی‌رغم انجام درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثری همچون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، انروفلوکساسین و تتراسایکلین، عفونت‌های ناشی از این باکتری نه تنها محدود نمی‌شوند بلکه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شدیدی نیز در آن‌ها ایجاد شده است (Beam et al., 2013).

با توجه به موارد فوق شناسایی عوامل باکتریایی موجود در تخم طیور عرضه شده به بازار از یک طرف می‌تواند امکان تدوین یک برنامه اصولی و مدون در کنترل و پیشگیری بیماری‌های ناشی از این مواد غذایی را فراهم کند و از طرف دیگر می‌تواند محکی باشد بر برنامه‌هایی که در مؤسسات تولید و عرضه تخم طیور در جهت کاهش آلودگی‌ها صورت می‌گیرد. متأسفانه علی‌رغم اهمیت بالای انواع تخم طیور در ایران، به‌خصوص تخم مرغ، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی O157:H7 و اشریشیاکلی تولیدکننده شیگا توکسین جدا شده از تخم‌های بومی طیور، انجام نگرفته است. در نتیجه مطالعه حاضر را به‌منظور شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی O157:H7 جدا شده از تخم‌های بومی طیور، انجام می‌پذیرد.

مواد و روش کار

در مجموع تعداد ۸۷ تخم طیور بومی (تعداد ۲۵ تخم مرغ، ۲۵ تخم کبوتر، ۲۵ تخم بلدرچین و ۱۲ تخم شترمرغ) از مراکز فروش و مراکز پرورشی تهیه و جهت بررسی آزمایش‌های بیوشیمیایی، مولکولی و بررسی الگوی مقاومت دارویی به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

تهیه نمونه از پوسته تخم‌ها، بدون تمیز کردن سطح آن‌ها و با کشیدن سواب استریل به سرتاسر پوسته انجام و به محیط کشت پیش غنی شده آب پپتونه

روستایی را از نظر ابتلا به بیماری‌های مشترک تهدید می‌کند (Blanco et al., 1998).

از بین مواد غذایی با منشأ دامی تخم طیور به‌خصوص تخم‌مرغ به دلیل نوع استفاده در تولیدات غذایی مانند سس‌ها، چاشنی‌های غذایی، بستنی و انواع غذاها که ممکن است به صورت خام یا نیم پز مورد استفاده قرار گیرد، همواره می‌تواند و به صورت بالقوه منشأ آلودگی و انتقال بیماری‌ها به انسان باشد (Cabassi et al., 2004).

اشریشیاکلی مهم‌ترین بیماری‌زای روده‌ای گرم منفی و میله‌ای شکلی است که موجب بروز مسمومیت غذایی مهلک در انسان می‌گردد (Bell C et al., 2002) و (Boyd R et al., 1987). حضور این باکتری در آب و غذا به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی عامل بیماری زایی غالب پذیرفته شده است (Calderwood et al., 1997).

چندین سویه از باکتری اشریشیاکلی به‌عنوان بیماری‌زاهای بالقوه در غذا معرفی شده‌اند. یکی از سویه‌های مهم آن، سویه اشریشیاکلی O157:H7 است که به‌عنوان یکی از عمده‌ترین سویه‌های بیماری‌زای انسان معرفی شده است. این باکتری توانایی تولید سمی شبیه به سم باکتری شیگا را دارد. اشریشیاکلی تولیدکننده شیگاتوکسین در گروه باکتری‌های مولد کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک، ایجاد اسهال خونی و غیر خونی، ترومبوسیتوپنی، آنمی همولیتیک و اختلالات کلیوی حاد قرار می‌گیرد (Bielaszewska et al., 2003 و Calderwood et al., 1997).

مطالعات نشان می‌دهند که در اکثر موارد، بیماری زایی باکتری اشریشیاکلی با حضور ژن‌های حدت این باکتری همراه است. از مهم‌ترین ژن‌های حدت باکتری اشریشیاکلی تولیدکننده شیگاتوکسین می‌توان به شیگاتوکسین ۱ (*stx1*)، شیگاتوکسین ۲ (*stx2*)، پروتئین اینتیمین (*eae*) و پلاسمید کدکننده

را جدا و به محیط کشت EMB انتقال داده شدند. پرگنه هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند را به عنوان باکتری های تیپیک در نظر گرفته و با آزمون های بیوشیمیایی اندول، متیل رد، سیترا، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI و آزمون اوره آزه، مورد ارزیابی قرار داده شد. بعد از انجام آزمون های تشخیصی و افتراقی بر روی پرگنه های مشکوک و تأیید وجود این باکتری، سویه هایی که به عنوان *اشریشیا کلی* مورد تأیید قرار گرفت.

قلیایی منتقل گردید. برای اخذ نمونه از محتویات زرده و سفیده، پوسته ی تخم مرغ ها شسته و جهت ضد عفونی کردن آن ها از روش غوطه وری در اتانول ۳۶٪ استفاده شد تا بدین وسیله با از بین رفتن هرگونه جرم موجود بر روی پوسته از تداخل در بررسی محتویات جلوگیری شود. پس از خشک شدن تخم مرغ ها با استفاده از دستکش و قیچی استریل، پوسته آهکی آن ها شکسته و در ظروف استریل، زرده و سفیده از هم جدا گردید.

پس از غنی سازی در محیط آب پپتونه قلیایی، در محیط کشت مک کانکی آگار، پرگنه های ارغوانی رنگ

جدول ۱- آزمون های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی *اشریشیا کلی*

| نوع باکتری | | نوع آزمون | | | | |
|--------------------|-------------------|-----------|------|-------|------|------|
| <i>اشریشیا کلی</i> | تولید اندول | متیل رد | VP | سیترا | H2S | اوره |
| | مثبت | مثبت | منفی | منفی | منفی | منفی |
| | لیزین دکربوکسیلاز | | | | | |
| | منفی | | | | | |

میزان فراوانی موارد مثبت بر حسب درصد گزارش گردید. در تمام واکنش های PCR، از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و از باکتری *اشریشیا کلی*: O157: K88ac:H19 (ATCC 25922) به عنوان کنترل مثبت واکنش، استفاده شد. واکنش PCR به منظور ردیابی باکتری *اشریشیا کلی*: O157: H7 صورت گرفت.

به منظور تشخیص *اشریشیا کلی* H7 O157 مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی های رشد کرده، صورت گرفت. به منظور تشخیص مولکولی DNA آن ها استخراج شده و پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز با پرایمرها اقدام به بررسی مولکولی شد. در پایان کارایی روش PCR در تشخیص های *اشریشیا کلی* O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت و

جدول ۲- لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژن های حدت باکتری *اشریشیا کلی*

| ژن حدت | توالی نوکلئوتیدی پرایمرها | اندازه محصول (bp) |
|------------------------------|---|-------------------|
| <i>E. coli</i> 16S rRNA | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTC AATTCATTTGAGTTT | ۹۱۹ |
| O157- RfbF O157- RfbR | GTGTCCATTTATAACGGACATCCATG CCTATAACGTCATGCCAATATTGCC | ۲۹۲ |
| H7- FLICH7-F H7- FLICH7-R | GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGA CTATCGCCATTCC | ۶۲۵ |

هم چنین در صورت جداسازی باکتری های *اشریشیا کلی*، برای تعیین الگوی حساسیت جدایه های *اشریشیا کلی* از روش انتشار دیسک با به کارگیری دیسک های (از شرکت پادتن طب ایران) استفاده شد و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای CLSI, 2012 (۳۱)

برنامه دمایی برای تکثیر ژن های O157 و H7 صورت زیر بود: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه.

نتایج

در این تحقیق تعداد ۸۷ تخم طیور بومی (تعداد ۲۵ تخم مرغ، ۲۵ تخم کبوتر، ۲۵ تخم بلدرچین و ۱۲ تخم شترمرغ) از مراکز فروش و مراکز پرورشی تهیه شده و از نظر آلودگی به باکتری اشریشیاکلی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت که در نهایت پس از انجام آزمون تشخیصی کشت ۸ نمونه (۹ درصد) از کل نمونه‌ها در محیط کشت EMB دارای جلای سبز متالیک بوده که نشان دهنده وجود باکتری اشریشیاکلی بوده است. سپس این ۸ نمونه تحت روش تشخیصی دقیق و حساس PCR جهت تعیین سویه O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت که از این ۸ نمونه فقط ۴ نمونه دارای ژنوم این سویه بودند.

انجام گرفت. به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی، دیسک‌هایی با غلظت استاندارد شامل سیپروفلوکساسین (Cp5)، تتراسیکلین (TE30)، داکسی‌سایکلین (D30)، ونکومایسین (V30)، سفتریواکسن (CRo30)، پنسیلین (PE)، استرپتومایسین (ST)، انروفلوکساسین (ENRO10)، آمیکاسین (AN 30)، آمپی‌سیلین (AM 30)، آموکسی‌سیلین (AMX 25)، نالی دیکسیک اسید (Na 30) از شرکت پادتن طب-ایران مورد استفاده قرار گرفتند.

در نهایت ارتباط آماری (جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها) با استفاده از نرم افزار آماری SPSS حاصل از نتایج به دست آمده با عوامل مرتبط احتمالی از جمله نوع نمونه و نوع تخم، مورد بررسی آماری قرار گرفت. در این بررسی $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار، معرفی شد.

جدول ۳- درصد آلودگی به باکتری اشریشیاکلی با روش کشت در قسمت‌های مختلف در نمونه‌های تحت مطالعه

| تخم طیور | آلودگی | پوسته | سفیده | زرده | سطح معنی‌داری |
|----------|--------|-------|-------|------|---------------------|
| مرغ | آلوده | ۴ | ۴ | ۰ | ۰/۵۹۸ ^{ns} |
| | سالم | ۹۶ | ۹۶ | ۱۰۰ | |
| بلدرچین | آلوده | ۴ | ۰ | ۰ | ۰/۳۶۳ ^{ns} |
| | سالم | ۹۶ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | |
| کبوتر | آلوده | ۸ | ۴ | ۰ | ۰/۳۵۳ ^{ns} |
| | سالم | ۹۲ | ۹۶ | ۱۰۰ | |
| شترمرغ | آلوده | ۱۶/۷ | ۰ | ۰ | ۰/۱۲ ^{ns} |
| | سالم | ۸۳/۳ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | |

ns: تفاوت بین بخش‌های مختلف معنی‌دار نیست.

هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مابین قسمت‌های مختلف تخم‌های مورد مطالعه وجود ندارد.

طبق نتایج به دست آمده آلودگی در تخم‌های طیور بومی مورد مطالعه هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری مشخص نشد.

از تعداد ۲۵ تخم کبوتر، هر تخم کبوتر به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۱ عدد (۴ درصد) مثبت و در سفیده نیز ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود.

از تعداد ۲۵ تخم مرغ، هر تخم مرغ به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۱ عدد (۴ درصد) مثبت و در سفیده نیز ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود.

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری /شیریشیاکلی، دیسک‌هایی با غلظت استاندارد شامل سیپروفلوکساسین (Cp5)، تتراسیکلین (TE30)، داکسی‌سایکلین (D30)، ونکومایسین (V30)، سفتریواکسن (CRo30)، پنسیلین (PE)، استرپتومایسین (ST)، انروفلوکساسین (NOR10)، آمیکاسین AN (30)، آمپی‌سیلین (30AM)، آموکسی‌سیلین AMX (25)، نالی‌دیکسیک‌اسید Na - (30) از شرکت پادتن طب- ایران مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام آزمون‌های آنتی‌بیوگرام جهت تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بیشترین حساسیت در مورد شیریشیاکلی به آنتی-بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریواکسن، انروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نالی‌دیکسیک‌اسید بود.

پس از انجام مراحل کشت و محرز شدن آلودگی به باکتری /شیریشیاکلی در نمونه‌ها، جهت جداسازی سویه O157:H7، ۸ نمونه مثبت شده در کشت مورد بررسی توسط روش مولکولی PCR قرار گرفتند. بعد از انجام PCR مشخص گردید که همه‌ی موارد مثبت در کشت، /شیریشیاکلی بوده ولی فقط ۴ نمونه (۴/۵ درصد) از کل نمونه‌ها به این سویه خاص (O157:H7) آلوده بودند.

نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۲ عدد (۸ درصد) مثبت و در سفیده نیز ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود. بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها با نرم افزار SPSS، هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی داری مشخص نشد.

از تعداد ۲۵ عدد تخم بلدرچین، هر تخم به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده و سفیده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود. بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی-داری مشخص نشد.

از تعداد ۱۲ عدد تخم شترمرغ، هر تخم به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده و سفیده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۲ عدد (۱۶/۷ درصد) مثبت بود.

بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری مشخص نشد.

جدول ۴- درصد آلودگی به باکتری /شیریشیاکلی در بخش‌های مختلف با روش PCR

| دام | آلودگی | پوسته | سفیده | زرده | سطح معنی‌داری |
|---------|--------|-------|-------|------|---------------|
| مرغ | آلوده | ۴ | ۰ | ۰ | ۰/۳۶۳ns |
| | سالم | ۹۶ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | |
| بلدرچین | آلوده | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ns |
| | سالم | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | |
| کبوتر | آلوده | ۰ | ۴ | ۰ | ۰/۳۶۳ns |
| | سالم | ۱۰۰ | ۹۶ | ۱۰۰ | |
| شترمرغ | آلوده | ۱۶/۷ | ۰ | ۰ | ۰/۱۲ns |
| | سالم | ۸۳/۳ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | |

ns: تفاوت بین بخش‌های مختلف معنی‌دار نیست.

جدول ۵- درصد آلودگی به باکتری اشریشیا کلی با روش PCR در تخم طیور بومی مختلف در نمونه‌های تحت مطالعه

| دام | آلودگی | پوسته | سفیده | زرده |
|---------------|--------|-------|---------|------|
| مرغ | آلوده | ۴ | ۰ | ۰ |
| | سالم | ۹۶ | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| بلدرچین | آلوده | ۰ | ۰ | ۰ |
| | سالم | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| کبوتر | آلوده | ۰ | ۴ | ۰ |
| | سالم | ۱۰۰ | ۹۶ | ۱۰۰ |
| شترمرغ | آلوده | ۱۶/۷ | ۰ | ۰ |
| | سالم | ۸۳/۳ | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| کل | آلوده | ۳/۴ | ۲/۳ | ۰ |
| | سالم | ۹۶/۶ | ۹۷/۷ | ۱۰۰ |
| سطح معنی‌داری | | ۰/۰۴* | ۰/۴۷۴ns | ۱ns |

* تفاوت بین تخم‌های مختلف با احتمال ۹۵٪ معنی‌دار است ($p < 0.05$)

ns: تفاوت بین تخم‌های مختلف معنی‌دار نیست.

اختلاف معنی‌داری بین بخش‌های مختلف تخم طیور بومی مورد مطالعه در روش PCR وجود نداشت.

پس از انجام محاسبات آماری مشخص شد تنها در پوسته با روش PCR آلودگی در شترمرغ به طور معنی‌داری از سایر طیور بیشتر بود.

این میزان آلودگی به طور محسوس در قسمت پوسته تخم شتر مرغ (۰/۰۴ درصد) در مقایسه با سایر طیور مورد مطالعه وجود داشت.

بحث

این بین بیش‌ترین موارد شامل اشریشیا کلی و پروتئوس و در درجه بعدی اهمیت، سراتیا، سیتروباکتر، انتروباکتر و پیرسینیا بودند. هم چنین باکتری سودوموناس در ۱۵ درصد پوسته‌ها و ۲۲ درصد زرده‌ها گزارش شده است و باسیلوس‌ها با ۳۹ درصد فراوانی بیش‌ترین باکتری جدا شده از پوسته بودند.

Cabassi و همکاران در سال ۲۰۰۴، شیوع بالای اشریشیا کلی و گونه‌های انتروباکتر را در تخم‌های شترمرغ با اختلالات باروری گزارش نمودند.

De Reu و همکاران در سال ۲۰۰۶ با انجام تحقیقی نشان دادند که اغلب باکتری‌های نفوذی به زرده، جزو دسته گرم منفی‌ها، متحرک و غیرخوشه‌ای (تکی) بودند و بیش‌ترین سهم را سودوموناس‌ها تشکیل می‌دادند.

De Chousalkar و همکاران در سال ۲۰۱۰، باکتری‌های سالمونلا و اشریشیا کلی را از پوسته تخم‌مرغ‌های تجاری در کشور استرالیا جداسازی کردند.

اشریشیا کلی یک باکتری بسیار مهم است که جزء فلور دستگاه گوارش انسان و حیوانات است و برخی از سویه‌های این باکتری به واسطه دارا بودن ژن‌های حدت قادر به ایجاد بیماری در روده و حتی خارج از روده می‌باشند (Bell et al., 2002).

برخی از سویه‌های باکتری اشریشیا کلی قادر به تولید وروتوکسین و ایجاد کولیت خونریزی دهنده و سندرم همولیتیک اورمیک می‌باشند (Cabassi et al., 2004) و Endoy et al., 2002).

بر طبق نتایج به دست آمده از تحقیق Bruce و همکاران در سال ۱۹۷۸ عمده باکتری‌های آلوده کننده پوسته تخم‌مرغ‌های هیچ نشده شامل: استرپتوکوک، استافیلوکوک، سودوموناس، میکروکوک، باسیلوس و خانواده انتروباکتریاسه بودند.

در سال ۲۰۰۳، Cook و همکاران با انجام مطالعه‌ای بر روی عفونت‌های منتقل شونده از طریق پوسته تخم مرغ، گزارش نمودند که در ۱۶ درصد موارد، باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از پوسته جدا شده‌اند که در

پرورش و نگهداری طیور مادر و تخم‌گذار باعث کاهش تماس با آلودگی و افزایش بیشتر سطح بهداشت و در نتیجه کاهش آلودگی‌های باکتریایی شده؛ اما این کاهش تماس کاملاً باعث از بین رفتن آلودگی نشده و در برخی مناطق آلودگی هرچند مختصر وجود دارد.

همچنین استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره طیور و وارد شدن این مواد به تخم‌مرغ خود علت دیگری است در کاهش آلودگی باکتریایی تخم‌مرغ‌ها ولی این موضوع خود باعث مشکلاتی خواهد شد.

همان‌طوری که در قسمت نتایج ذکر شده از ۸۷ نمونه تخم پرندگان مورد آزمایش تعداد ۸ مورد یعنی ۹/۱٪ آلوده به باکتری /شیریشیالکی بوده‌اند که این میزان آلودگی اگرچه میزان کمی است اما با توجه به مصرف بالای تخم پرندگان قابل توجه است.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و توجه به این نکته که باکتری جدا شده عمدتاً جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش پرندگان بومی بوده و با پاستوریزاسیون حرارتی از بین می‌رود. لذا توصیه می‌شود از مصرف تخم خام یا عسلی مخصوصاً در اطفال خودداری شود و تخم به صورت کاملاً پخته مصرف شود.

منابع

۱. ادیب فر، پرویز. (۱۳۷۹). میکروبی‌شناسی پزشکی (برای دانشجویان گروه پزشکی، پیراپزشکی و رشته‌های تخصصی)، چاپ اول، انتشارات نور دانش، ص ۸۵ تا ۱۰۰.
۲. پناهی، دهقان. (۱۳۷۴). فیزیولوژی پرندگان. انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر، ۶۸۹ صفحه.
۳. جیمزو ام. جی، ترجمه مرتضوی، سیدعلی، معتمدزادگان، علی. اعلمی، مهران. گوهری اردبیلی، اشرف. (۱۳۸۲). میکروبیولوژی مواد غذایی مدرن، جلد دوم، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۴۵۵ تا ۴۷۵.

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۱ توسط Loongyai و همکاران در تایلند صورت گرفت، به جداسازی باکتری‌های سالمونلا و /شیریشیالکی به روش مولکولی PCR از پوسته تخم‌مرغ و محتویات تخم‌مرغ، مرغ‌های تخم‌گذار پرداختند.

Knöbl و همکاران در سال ۲۰۱۲ در برزیل به جداسازی /انتروباکترها از تخم شترمرغ‌ها پرداختند و میزان شیوع /شیریشیالکی را ۱۵ درصد گزارش نمودند. مطالعات متعددی بیانگر این نکته می‌باشند که علاوه بر سروتیپ O157:H7 سایر سروتیپ‌های این باکتری که وروتوکسین تولید می‌کنند قادر هستند باعث ایجاد بیماری در انسان شوند (Boyd et al., 1987 و Doyle et al., 1987).

اگرچه سروتیپ O157: H7 اغلب در دستگاه گوارش حیوانات و بخصوص گاو موجود است و این حیوان به‌عنوان مخزن اصلی این سروتیپ محسوب می‌شود ولی درباره منبع سایر سروتیپ‌هایی که قادر به تولید وروتوکسین می‌باشند اطلاعات کمی در دست است (Cody et al., 1999).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر که به‌منظور شناسایی باکتری‌های /شیریشیالکی سویه O157: H7 که باعث آلودگی تخم طیور بومی می‌گردد انجام شد، نشان دهنده این است که حدود ۴/۵ درصد از موارد مشکوک جدا شده از نمونه‌ها دارای ژنوم این سویه بودند.

تخم پرندگان به دلیل داشتن مواد غذایی فراوان و منبع ارزان پروتئین، مصرف جهانی بالایی دارد و یکی از پرمصرف‌ترین مواد غذایی است. پرمصرف بودن این ماده غذایی سبب می‌شود که هرگونه تغییر فیزیکی و شیمیایی در آن از نظر متخصصین تغذیه مهم تلقی شود و اقداماتی در جهت کاهش آن انجام دهند.

با توجه به این مطالعه و سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر نقاط دنیا می‌توان این‌گونه برداشت کرد که استفاده از روش‌های مدرن نگهداری در کلیه مراحل

15. C.D.C. (1983). Infections notes outbreak of heamorrhagic colitis-Ottawa-Canada. MMWR. 32 (10): 133-4.
16. C.D.C. (1993). Multistste outbreak of *Escherichial coli* O157:H7 infections from heamorrhagic colitis Unites states. MMWR. 42 (14): 258-263.
17. Cabassi CS, Taddei S, Predari G, Galvani G, Ghidini F, Schiano E, Cavirani S. (2004). Bacteriological findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. Avian Diseases. 48 (3): 716-722.
18. Calderwood, S.B. (1997) Structure-Function realtionsheaps of Shiga toxin and the shiga- like toxins to bacterial enterotoxins and ribosome- inactivating proteins. Recent Advance In VTED Infections. 119- 122.
19. Cave, H and Bingen E. (1994) Differentiation of *E. coli* strains using DNA analysis. Res Microbiol. 145: 141-150.
20. Chandra, B., Louise, G and Tom, G. (1999). Specific Intraction of *Escherichia coli* O157: H7 derived shiga like toxin II with human renal endothelial cells. J Infect Dis. 172: 1397-1401.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. M100 S21. Wayne Pa: CLSI; 2012.
22. Cody SH. (1999). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Ann Intern Med. 130: 202-9.
23. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. (1987). Appl Environ Microbiol. 53: 2394-2396.
24. Endoy, T. and Rsyugi, K. (2002). Site of action of Verotoxin from *E. coli* on eucharistic ribosome's. Euro J Briche. 13: 683-721.
۴. زعیم کهن، حمید، ۱۳۸۰، بیماری‌های عفونی هاریسون ترجمه‌ی اصول طب داخلی هاریسون، چاپ اول، انتشارات سماط، ص ۳۷۳ تا ۳۸۱.
5. Abatangelo, G.D. Daga-Gordini, I. Castellani, and R. Cortivo. (1978). Some observation on the calcium ion binding to the eggshell matrix. Calcif Tissue Res. 26: 247.
6. Alexandere M., (2003). Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. Expert. Rev. Mol. Diagon. 3(1): 105-115.
7. Bar, A., and S.Hurwitz. (1973). Calcium restriction and intestinal calcium-binding protein in the laying fowl. Comp. Biochem. Physiol. A, 45, 571.
8. Beam A, Garber L, Sakugawa J, Koprak C. *Salmonella* awareness and related management practices in U.S. urban backyard chicken flocks (2013). PVM. 110: 481-488.
9. Bell C., (2002) Approach to the control of enteroheamorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Int J Food Microbiol. 78(3): 197-216.
10. Bielaszewska, M. Clarke I., Kamaliu, M.A and Petric, M (2003). Localization of interavenously administered Verocytotoxins (Shga-Like Toxins) 1 and 2 in Rabbits immunized and Tonxin Subunits. Infect Immune. 65(7): 2509-2516.
11. Blanco, J. E., Blanco, M and Blanco, J. Et al. (1998). Seogroups, Biotypes, and eae Genes in *Escherichia coli* Strains isolated from Diarrheic and Healthy Rabbits. J Clin Microbiol. 34(12): 3107-3110.
12. Board, R.G., S.G. Tullett, and H.R. Perrott. (1977). An arbitrary classification of the pore system in avian eggshells. J Zool. 182: 251.
13. Boyce, T.G., Swerdlow, D. L and Girffin, P. M. (2006). *Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic-Uremic syndrome. N Engl J Med. 333: 364-368.
14. Boyd R.F, Haerl B.G. (1987). B.M.M. 3 rd ed. Little Brown and company.

Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from avian eggs

Moradi Sarmeidani M^{1*}, Farde Emadi M¹, Rahimi E², Zamani Moghadam A³

1. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3. Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: Bluedvm@gmail.com

Received: 7 September 2017

Accepted: 7 November 2017

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) are one of the most common intestinal pathogenic bacteria that cause various infections among men and animals. *E. coli* O157:H7 is one of the major serotypes which are placed in the group of Enterohemorrhagic *E. coli* or EHEC. The purpose of this study was searching for serotype O157:H7 in samples of domestic birds' egg in the market by culture method and PCR molecular method and the antibiotic resistance of this bacterium was investigated. Totally, 87 samples of domestic poultry eggs (chicken, quail, pigeons, ostriches) three parts of shell, yolk and white (from each part a separate sample) were examined and after culturing steps, 8 samples were infected with this bacterium. Then, these 8 samples were tested with PCR strain and finally, 4 samples had O157: H7 strain genotype. Also after conducting antibiogram tests to determine the sensitivity toward different antibiotics, the most sensitivity of *E. coli* was belonged to antibiotics ciprofloxacin, ceftiozone, enrofloxacin, enrofloxacin and nalidixic acid.

Keywords: *E. coli* O157:H7, native poultry eggs, antibiotic resistance, cultivation, PCR