

دسته بندی ژنتیکی ایزوله های اشریشیا کلی O157:H7 جدا شده از گوشت خام دام و طیور

با روش RAPD-PCR

ماندانا لطفی^۱، حسن ممتاز^{۲*}، الهه تاجبخش^۳

۱. دانش آموخته دکترای میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: hamomtaz@iaushk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵

چکیده

باکتری اشریشیا کلی O157:H7 یکی از مهم ترین سویه های بیماری زای روده ای است که معمولا از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل می شود. این سویه عامل ایجاد کولیت خونریزی دهنده، سندرم HUS، ترومبوتیک سیتوپنیک پورپورا و در مواردی مرگ است. مخزن اصلی این باکتری نشخوارکنندگان هستند. هدف از این پژوهش دسته بندی ژنتیکی (ژنوتایپینگ) ایزوله های این سویه جدا شده از گوشت خام دام و طیور با روش RAPD-PCR است. ۳۴۴ نمونه گوشت خام نشخوارکنندگان و طیور از مراکز عرضه گوشت تازه در شهرهای اصفهان و شهرکرد جمع آوری و پس از کشت و جداسازی اشریشیا کلی از آن ها، حضور سروتیپ O157:H7 با استفاده از روش PCR تایید شد. جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله های O157:H7 جدا شده از روش RAPD-PCR استفاده شد. از مجموع ۳۴۴ نمونه گوشت خام مورد مطالعه، ۲۰۲ جدایه اشریشیا کلی (۵۸/۷ درصد) جداسازی شد که میزان آلودگی به سویه O157:H7 در آن ها، ۱۷/۸ درصد (۳۶ نمونه) بود. دسته بندی ژنتیکی جدایه های اشریشیا کلی O157:H7، ۹ پروفایل مختلف را در میان این ۳۶ جدایه نشان داد و قرابتی معادل ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد در بین ایزوله ها یافت شد. در این پژوهش تشابه مولکولی زیادی بین سویه های اشریشیا کلی O157:H7 جدا شده از گوشت حیوانات مختلف در شهرهای اصفهان و شهرکرد دیده شد. همچنین مشخص شد که روش RAPD-PCR روشی ساده، سریع و ارزان جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه های مختلف اشریشیا کلی از جمله سویه O157:H7 می باشد.

کلید واژه ها: اشریشیا کلی O157:H7، RAPD-PCR، دسته بندی ژنتیکی، گوشت خام.

مقدمه

باکتری می باشند را به تدریج تولید می کنند. این ترکیبات شامل انتروتوکسین ها، سیدروفورها، وروتوکسین ها و همولیزین ها می باشند. که در مورد سویه اشریشیا کلی O157:H7 مهم ترین عامل بیماری-زا، وروتوکسین می باشد، این توکسین با جلوگیری از سنتز پروتئین موجب مرگ سلول ها می شود. سروتیپ O157:H7 عامل اصلی ایجاد کولیت خونریزی دهنده^۱ و سندرم HUS^۲ است. البته در برخی منابع به وجود بیماری دیگری به نام ترومبوتیک سیتوپنیک پورپورا

اشریشیا کلی، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است، که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. این باکتری، ۰/۱ درصد فلور روده را به خود اختصاص داده است و از طریق مسیر مدفوعی-دهانی (oral-fecal) از یک فرد به فرد دیگر منتقل می شود (Johnson et al., 2001). بیشتر سویه های اشریشیا کلی، غیر بیماری زا هستند اما برخی از سروتیپ ها مانند O157:H7 موجب بروز بیماری های مختلف و حتی مرگ می شوند (Kaper, et al., 2004). سروتیپ های بیماری زای اشریشیا کلی ترکیبات سلولی منحصر به فردی که در ارتباط با بیماری زایی

^۱ Hemorrhagic colitis

^۲ Hemolytic Uraemic Syndrome

از روش های تشخیصی گوناگونی جهت شناسایی این باکتری استفاده می‌گردد که از آن جمله می‌توان به روش های سرولوژیکی، کشت سلولی و روش های مولکولی اشاره کرد. در سال های اخیر با پیشرفت تکنولوژی، استفاده از روش های مولکولی بر پایه PCR به علت حساسیت بسیار بیشتر نسبت به روش های دیگر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. از مهمترین روش های بر پایه PCR می‌توان به روش چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA (RAPD-PCR) (Random Amplification of Polymorphic) (DNA- Polymerase Chain Reaction) اشاره کرد. در این پژوهش به منظور دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های دامی از روش RAPD-PCR استفاده شد. در این روش از پرایمر غیر اختصاصی به طول ۸-۱۲ یا ۵-۱۵ نوکلئوتیدی استفاده می‌شود. پس از الکتروفورز محصول PCR در نمونه های مختلف، برای هر نمونه یک پروفایل نسبتاً منحصر به فرد به دست می‌آید که می‌توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن های باکتریایی استفاده کرد (Nasonova et al., 2008).

مطالعه حاضر با هدف ردیابی سروتیپ O157:H7 *اشریشیاکلی* در گوشت خام دام و طیور عرضه شده در سطح بازارهای شهرهای اصفهان و شهرکرد و دسته بندی ژنتیکی ایزوله های جدا شده با روش RAPD-PCR انجام شده است.

روش کار

جمع آوری، جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها در این مطالعه مقطعی-توصیفی تعداد ۳۴۴ نمونه از گوشت خام نشخوارکنندگان و طیور (۹۴ نمونه گوشت گاو، ۵۶ نمونه گوشت گوسفند، ۸۰ نمونه گوشت مرغ، ۴۴ نمونه گوشت بوقلمون و ۷۰ نمونه گوشت شتر) از مراکز عرضه گوشت تازه دام و طیور در نقاط مختلف

(TTP) و مرگ نیز اشاره شده است (Nasonova et al., 2008). بیماری‌های یاد شده می‌تواند با بروز ناگهانی، تمامی گروه های سنی را درگیر سازد. این باکتری برای اولین بار در آمریکا به دنبال استفاده از گوشت های آلوده در رستوران های زنجیره ای شناسایی گردید. بزرگ ترین شیوع این باکتری در کشور ژاپن به دنبال مصرف ترپچه گزارش شده است که باعث بروز بیش از ۹۰۰۰ مورد بیماری و ۷ مورد مرگ شد (Murphy et al., 2005). حیواناتی مثل گاو، گوساله و گوسفند مخزن اصلی این سویه‌ها هستند. گوشت گوساله مهمترین منبع غذایی است که معمولاً در کشتارگاه‌ها و در طی مراحل مختلف کشتار آلوده می‌شود (Reinders et al., 2002). علاوه بر این گزارشاتی مبنی بر آلودگی گوشت گوسفند و بز نیز وجود دارد (Manning et Lan and Reeves., 2002) (al., 2008 and

امکان انتقال باکتری از حیوانات به انسان، از راه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و مصرف مواد غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه آلوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت، ساندویچ های گوشتی، سبزیجات، آب میوه ها به ویژه آب سیب وجود دارد (Gould et al., 2009). این باکتری از منابع مختلف دامی نظیر شیرخام، گوشت خام، پنیر سنتی و انواع نمونه‌های کلینیکی دامپزشکی جدا شده است و در اکثر گزارشات مربوط به تحقیقات انجام شده در دامپزشکی به نقش بالقوه این باکتری در انتقال مقاومت‌های دارویی از دام به انسان اشاره شده است. از طرفی تاکنون مطالعات زیادی در خصوص ردیابی باکتریولوژی و مولکولی این ارگانیزم از منابع دامی در ایران انجام نشده است، لذا ضروری به نظر می‌رسد که علاوه بر جداسازی این باکتری از منابع غذایی دامی (گوشت و شیر) به تعیین ارتباط ژنتیکی ایزوله‌های دامی و انسانی *اشریشیاکلی* O157:H7 پرداخته شود (B' elanger et al., 2011).

دقیقه. در نهایت محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلوباز و از سویه استاندارد/شریشیالکی ATCC25922 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی سروتیپ/شریشیالکی *O157:H7* به منظور شناسایی ملکولی جدایه‌های/شریشیالکی *O157:H7* از پرایمرهای مربوط به ردیابی آنتی ژن سوماتیک *O157* و فلاژل *fliCH7* درج شده در جدول ۱ در قالب یک واکنش PCR چندگانه‌ای استفاده شد (Paton and Paton., 1998 and Gannon et al., 1997). واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر 10x buffer، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۱۵۰ میکرو مول dNTPs، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس - لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای $58^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنترل مثبت/شریشیالکی *O157:H7* از کلکسیون باکتری‌های گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه گردید و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ایزوله‌های *O157:H7* جدا شده در این مرحله

شهر اصفهان و شهرکرد در فاصله زمانی مرداد ۱۳۹۶ تا مرداد ۱۳۹۷ جمع آوری گردید. ۱۰ گرم از هر نمونه گوشت دام و طیور بعد از هموژن کردن در دستگاه Stomaker (AES Chemunex, Combourg, France) در ۹۰ میلی‌لیتر محیط مایع TSB کشت داده شد (Rahimi et al., 2008). به منظور شناسایی اولیه/شریشیالکی، کشت در محیط مک کانکی (Mac Conkey) (مرک، آلمان) و آزمایشات مختلف بیوشیمیایی مانند رشد در محیط ائوزین متیلن بلو (EMB) (مرک، آلمان)، واکنش تولید اسید در محیط TSI (مرک، آلمان)، واکنش IMViC (با کشت در محیط های SIM، MR/VP و سیمون سترات (مرک، آلمان)) انجام شد (Mahon et al., 2007).

شناسایی مولکولی ایزوله‌ها به روش PCR به منظور تأیید جدایه‌های احتمالی/شریشیالکی تکثیر ژن *16srRNA* با روش PCR انجام گردید. جهت انجام PCR ابتدا ژنوم باکتری‌هایی که بر اساس تست‌های بیوشیمیایی به عنوان/شریشیالکی تشخیص داده شدند به کمک کیت استخراج DNA (سیناژن-ایران) استخراج شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *16srRNA* در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرو مول dNTPs، ۲ میلی مول $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس - لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای $58^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۷

۴ میلی مول $MgCl_2$ و ۳ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس - لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۸ دقیقه، $30^{\circ}C$ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای $28^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه. در نهایت محصولات PCR مربوط به مرحله فوق در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز ۳۶ ایزوله با نرم افزار Bionumerics software Applied Maths, Sint-) (Martems-Latem, Belgium) و ضریب تشابه دایس آنالیز شدند. ایزوله هایی با شباهت بالای ۸۰ درصد در یک پروفایل قرار گرفتند.

شامل ایزوله های 21A, 22A, 24A, 25A, 26A, 27A, 28A, 29A, 30A, 32A, 34A, 4H, 11H, 12H, 13H (جدا شده از گوشت مرغ)، 31A, 33A, 1H, 6H, 7H, 8H, 9H, 16H (جدا شده از گوشت گاو)، 35A, 3H, 10H, 14H, 15H (جدا شده از گوشت گوسفند)، 23A, 5H (جدا شده از گوشت بوقلمون)، 19A, 20A, 36A, 2H (جدا شده از گوشت شتر)، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

دسته‌بندی ژنتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی O157:H7 به روش RAPD-PCR دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های O157:H7/اشریشیاکلی با استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی AACGCGCAAC انجام شد (Marialouis and Santhanam., 2016). واکنش نهایی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA هدف، ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۲ میکرومول پرایمر RAPD، ۳۰۰ میکرومول dNTPs،

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر ("۵"- "۳")	نام ژن	هدف
(Momtaz et al., 2013a)	۹۱۹	AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	16srRNA	شناسایی اشریشیاکلی
(Momtaz et al., 2013b)	۲۵۹	CGGACATCCATGTGATATGG TTGCCTATGTACAGCTAATCC3	O157	شناسایی O157
(Momtaz et al., 2013b)	۶۲۵	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	fliCH7	شناسایی H7

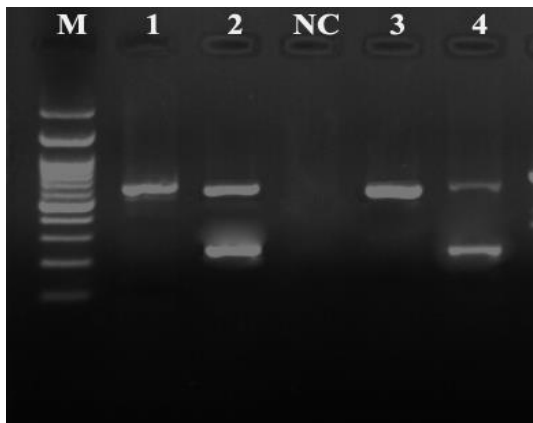
گوشت مرغ، ۱۶/۶۶ درصد گوشت بوقلمون، ۱۶/۶۶ درصد گوشت شتر) به سویه اشریشیاکلی O157:H7 آلوده بودند (تصویر ۲). ۳۶ ایزوله مربوط به سروتیپ O157:H7 انتخاب و به روش RAPD-PCR ژنوتایپ شدند. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، ایزوله های مورد مطالعه دارای الگوی بانندی از محدوده ۱۲۰ تا بالای ۱۰۰۰۰ جفت باز بودند. آنالیز RAPD، نه پروفایل مختلف در ۳۶ ایزوله را نشان داد و قرابتی معادل ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد بین ایزوله‌ها مشاهده شد و

نتایج

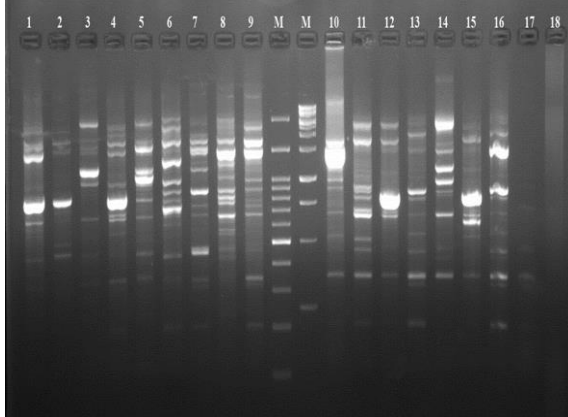
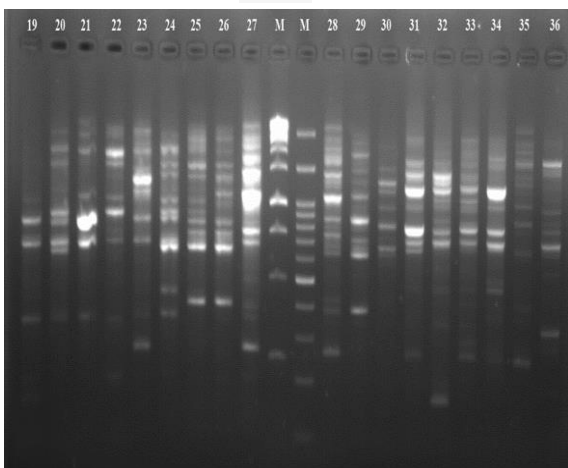
از مجموع ۳۴۴ نمونه گوشت خام مورد مطالعه، تعداد ۲۰۲ نمونه (۵۸/۷ درصد) آلوده به باکتری اشریشیاکلی بودند که تمام ایزوله های جدا شده در آزمایش PCR با ردیابی ژن 16srRNA در آن ها تایید شدند (تصویر ۱).

از ۲۰۲ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده، تعداد ۳۶ ایزوله معادل ۱۷/۸ درصد از نمونه‌ها (۲۲/۲۲ درصد گوشت گاو، ۱۱/۱۱ درصد گوشت گوسفند، ۳۳/۳۳ درصد

پروفایل قرار گرفتند. با در نظر گرفتن ضریب تشابه

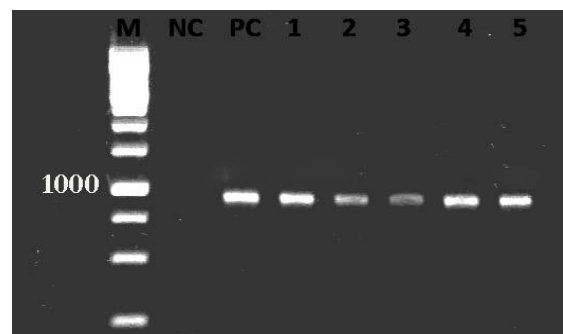


تصویر ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن های *fliCH7* و *O157* در ایزوله های اشریشیاکلی (ستون M=مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون های 1-4= نمونه های مورد مطالعه واجد قطعه ۶۲۵ و ۲۵۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن های *fliCH7* و *O157*).



تصویر ۳- باندهای حاصل از آنالیز RAPD-PCR مربوط به اشریشیاکلی O157:H7 جدا شده از گوشت خام (ستون های M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی و ۱ کیلوبازی DNA).

جداییهایی که قرابت بالای ۸۰ درصد داشتند در یک بالای ۸۰ درصد، ایزوله های 2H و 20A در پروفایل نه با ضریب تشابه ۹۰/۹ درصد، ایزوله های 22A و 25A در پروفایل شماره یک با ضریب تشابه ۸۵/۷ درصد، ایزوله های 1H و 6H در پروفایل چهار با ضریب تشابه ۸۴/۲ درصد، ایزوله های 30A, 31A, 32A, 33A, 34A در پروفایل هشت با قرابت ۸۴ درصد، ایزوله های 27A, 28A, 7H, 8H, 16H در پروفایل شماره دو با قرابت ۸۲/۶ درصد، ایزوله های 24A, 29A در پروفایل هفت با ضریب تشابه ۸۲/۴ درصد، ایزوله های 4H, 11H, 12H, 13H در پروفایل سه با ضریب تشابه ۸۱/۲ درصد، ایزوله های 21A, 15H در پروفایل شش با قرابت ۸۰ درصد و ایزوله های 35A, 3H, 9H, 14H در پروفایل پنج با ضریب تشابه ۸۰ درصد قرار گرفتند. لازم به ذکر است کمترین میزان تشابه در ایزوله 19A جدا شده از گوشت شتر با سایر ایزوله ها با قرابت ۴۳/۷

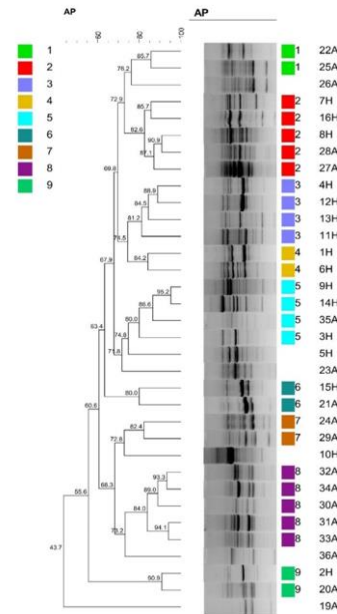


درصد مشاهده شد (تصویر ۴).

تصویر ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله های اشریشیاکلی (ستون M=مارکر یک کیلو بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون های 1-5= نمونه های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

متفاوتی در مورد میزان جداسازی باکتری یاد شده در کشورهای مختلف منتشر شده است. در بعضی از مناطق میزان شیوع این سویه را مشابه با شیگلا و در برخی کمتر و یا بیشتر از آن نیز گزارش کرده اند (Khan and Yamasaki., 2002). در ایالت متحده تخمین زده می شود که سالیانه ۷۳۰۰۰ مورد عفونت و ۶۱ مورد مرگ به علت عفونت با اشریشیاکلی O157:H7 روی دهد (Baffone et al., 2001). همچنین بیماری اورمی همولیتیک (HUS) ناشی از این باکتری عامل بیشتر نارسایی‌های حاد کلیوی در کودکان این کشور می باشد (Widiasih et al., 2003). اکثر گزارشات موجود در خصوص ردیابی اشریشیاکلی O157:H7 در کشورهای مختلف نشان می دهد که گوشت گاو به عنوان مهم ترین مخزن دامی در انتقال این پاتوژن به انسان نقش دارد. این در حالی است که میزان آلودگی گوشت گاو به اشریشیاکلی O157:H7 در کشورهای مختلف بسیار متفاوت و از ۰ تا ۴۵ درصد متغیر بوده است. آلودگی سایر مواد غذایی به این پاتوژن بسیار پایین تر گزارش شده است. اما در تحقیق حاضر از بین نمونه های گوشت خام مورد مطالعه بیشترین میزان آلودگی به سویه اشریشیاکلی O157:H7 معادل ۳۳/۳۳ درصد در گوشت مرغ مشاهده شد.

میزان موارد تائید شده آلودگی به اشریشیاکلی O157:H7 در سال 2007 در اسکاتلند، ۹ مورد و در سال 2008 در ویرجینیای آمریکا، ۲۵ مورد بوده است. در سال 2008 در ۴۰ اپیدمی (۲۱ مورد در میشیگان و ۱۹ مورد در اوهایو) آلودگی مواد غذایی به سروتیپ O157:H7 تائید شده است (Dontorou et al., 2003). در ایران برای اولین بار سالک مقدم و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی ۲۰۰۰ نمونه ماده غذایی مختلف، تنها از یک نمونه سبزی، موفق به جداسازی اشریشیاکلی O157:H7 شدند (Salek Moghaddam et al., 2003). اصلانی و بوذری در سال ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳ با بررسی ۲۰۰۸ نمونه مدفوع انسان در غرب (ایلام) و



تصویر ۴- دندروگرام حاصل از دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی O157:H7 جدا شده از گوشت خام با نشانگر RAPD-PCR

بحث

یکی از مهم ترین سویه های اشریشیاکلی، سویه اشریشیاکلی O157:H7 است که به عنوان یکی از خطرناک ترین سویه های بیماری زا معرفی شده است. سویه اشریشیاکلی O157:H7 هر سال باعث بروز چندین مورد مرگ می شود این باکتری بیشتر از طریق مواد غذایی مختلف خصوصاً مواد غذایی با منشأ دامی به انسان منتقل می شود. حیوانات به ویژه نشخوارکنندگان از مخازن اصلی این باکتری هستند. با توجه به اهمیت موضوع، در نقاط مختلف جهان وقوع عفونت ها و مسمومیت های غذایی ناشی از آلودگی به اشریشیاکلی بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. از جمله این مطالعات می توان به گزارش خان و همکاران (۲۰۰۲) در شهر کلکته (کشور هندوستان)، اشاره نمود، که در طی آن میزان شیوع این باکتری در نمونه های مدفوع گاو ۱۸ درصد و در گوشت خام کشتارگاه ها ۵۰ درصد باورد گردید. گزارش های

قرار گرفتند که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا بین جدایه‌های مورد مطالعه می‌باشد. فادل و همکاران (۲۰۱۸)، /شیرشیاکلی‌های مولد شیگا توکسین را در برخی از گونه‌های پرنده‌های وحشی بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که پرنده‌های وحشی سویه-های /شیرشیاکلی مولد شیگا توکسین را حمل کرده و می‌توانند باعث انتقال و افزایش آلودگی در محیط زیست شوند (Fadel et al., 2017).

در مطالعه ای که توسط سواردانا و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد، تنوع ژنتیکی /شیرشیاکلی O157:H7 با روش RAPD بررسی شد، که نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های مختلف انسانی که از بیماران و افراد سالم جداسازی شده بودند، کلاسترهای ژنتیکی مشابهی با ایزوله‌های حیوانی که از گوشت گاو، گوساله و مرغ جداسازی شده بودند، دارند و ضریب همبستگی ژنتیکی آنها بیش از ۷۰ درصد بود. این نتایج نشان داد که /شیرشیاکلی O157:H7 می‌تواند از حیوانات اهلی به انسان منتقل شود (Suardana et al., 2013). هاپکینز و هیلتون (۲۰۰۱) تنوع ژنتیکی /شیرشیاکلی O157:H7 مولد شیگا توکسین را با استفاده از روش RAPD-PCR بررسی کردند. آنها در این تحقیق بیان کردند که تکنیک RAPD-PCR، روشی بسیار سریع و کاربردی است آنها همچنین به منظور تمایز بین سویه-های مشابه، اثر یک آنزیم اندونوکلاز محدود الاثر را روی قطعات حاصل از RAPD-PCR بررسی نمودند (Hopkin and Hilton., 2001). چنسیریپورن چای و همکاران (۲۰۰۱)، با استفاده از روش RAPD تایپینگ ژنتیکی سویه‌های /شیرشیاکلی بیماری‌زا در مرغ‌ها را بررسی کردند. در این مطالعه ۵۵ سویه /شیرشیاکلی مرغی با روش RAPD بررسی شد. آنالیز RAPD نشان داد که سویه‌های /شیرشیاکلی جداسازی شده از مرغ‌ها در تایلند و سوئد می‌توانند به ۵۰ الگوی RAPD-Type تنها با استفاده از دو سری پرایمر

شمال ایران (مازندران و گلستان) میزان شیوع /شیرشیاکلی تولیدکننده وروتوکسین را به ترتیب ۴/۹ و ۰/۷ درصد گزارش کردند. اما هیچ کدام از نمونه‌ها سروتیپ O157:H7 نبودند (Aslani and Bourzari., 2003). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که میزان شیوع این باکتری از سال ۱۹۹۸ تا کنون در ایران بسیار بالا رفته است، متأسفانه پژوهش‌های انجام شده در کشور ما بیشتر محدود به نمونه‌های کلینیکی بوده است و با توجه به مخازن این سویه خطرناک که عمدتاً گوشت خام دام و طیور و محصولات لبنی می‌باشد، لازم است پژوهش‌های بیشتری به منظور بررسی آلودگی در این نمونه‌ها انجام شود.

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکرووب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه روش‌های تایپینگ مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند که بسیار کارآمدتر از روش‌های قبلی می‌باشند. در روش RAPD-PCR برای هر نمونه یک پروفایل نسبتاً منحصر به فرد به دست می‌آید که می‌توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی استفاده کرد. از نقاط قوت این روش این است که برای به دست آوردن پروفایل RAPD نیاز به داشتن اطلاعات قبلی از توالی DNA مورد نظر نیست و این مزیت باعث کاربرد گسترده این تکنیک در تست‌های میکروبیولوژیک شده است (Durmaz et al., 2009). در مطالعه حاضر جدایه‌های /شیرشیاکلی O157:H7 با نشانگر RAPD-PC آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آنها با ضریب دایس و الگوریتم UPGMA تعیین گردید. بیشترین و کمترین درصد قرابت از ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد بین جدایه‌های مورد مطالعه دیده شد و همانگونه که در تصویر ۳ مشهود است، جدایه‌های /شیرشیاکلی O157:H7 مورد بررسی در سطح تشابه بالای ۸۰ درصد در ۹ پروفایل

شیرشیکلی‌های جدا شده از انسان و گوساله را با روش RAPD-PCR بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که درصد پلی‌مورفیسم در /شیرشیکلی جدا شده از افراد مبتلا به عفونت ادراری ۵۴/۷ درصد، در گوساله‌های مبتلا به اسهال ۶۲/۲۲ درصد و در گوساله‌های مبتلا به سپتی‌سمی نوزادان ۶۲/۵ درصد بود (Afshari et al., 2015). کومار و همکاران (۲۰۱۸)، آنالیز ژنتیکی /شیرشیکلی‌های جدا شده از دو منبع محیطی (فاضلاب شهری و فضولات حیوانات آزمایشگاهی) را با روش RAPD-PCR انجام دادند. که در این مطالعه /شیرشیکلی‌های جدا شده در دو کلاستر اصلی با شباهت ۸۵ درصد (فضولات حیوانات آزمایشگاهی) و ۷۱ درصد (نمونه‌های فاضلاب) قرار گرفتند. همچنین آن‌ها اذعان داشتند که روش RAPD-PCR روشی کاربردی و ساده برای بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه‌هاست (Kumar et al., 2018). انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک RAPD-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی سویه‌های /شیرشیکلی O157:H7 به عنوان یکی از خطرناک‌ترین سویه‌های بیماری‌زای /شیرشیکلی استفاده شد و قرار گرفتن جدایه‌های مورد مطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ /شیرشیکلی می‌باشد.

در این پژوهش تشابه مولکولی زیادی بین سویه‌های /شیرشیکلی O157:H7 جدا شده از حیوانات مختلف دیده شد که این امر ممکن است به علت تماس نزدیک بین گاو و مرغ، گاو و بوقلمون و انتقال سویه‌های /شیرشیکلی O157:H7 با همان تیپ مولکولی باشد. متأسفانه، دام‌پروران ایرانی اغلب گونه‌های مختلف حیوانات در مجاورت همدیگر نگهداری و پرورش می‌دهند. این ممکن است باعث انتقال آسان سویه‌های این باکتری بین گونه‌های مختلف دامی شود. همانطور

تقسیم شوند. بیشتر این پروفایل‌ها، محدود به منطقه جغرافیایی خاصی نبودند و همانطور که انتظار می‌رفت ارتباط ژنتیکی زیادی بین سویه‌های جداسازی شده از یک مزرعه وجود داشت. در این مطالعه روش RAPD به عنوان یک روش سریع، ارزان، ساده و به عنوان یک ابزار قوی برای بررسی اپیدمیولوژیکی سویه‌های /شیرشیکلی بیماری‌زا در مرغ‌ها پیشنهاد شد (Chansiripornchai et al., 2001). نیلسن و همکاران (۲۰۱۴)، /شیرشیکلی با منشأ مدفوعی را در بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری با باکتری /شیرشیکلی، بررسی کردند. در این مطالعه افراد سالم که هرگز عفونت ادراری نداشتند به عنوان کنترل بررسی شدند. بیش از ۲۰ کلنی /شیرشیکلی از هر سوپ رکتال با روش RAPD بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۴۲ ایزوله از ۴۸ سویه جداسازی شده از مجاری ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری، مشابه ایزوله‌های موجود در فلور روده است. این اولین مطالعه ای بود که نشان داد /شیرشیکلی با منشأ مدفوعی با عفونت ادراری در ارتباط است (Nielsen et al., 2014). در یک مطالعه، رادو و همکاران (۲۰۰۱) موفق به دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های /شیرشیکلی O157:H7 جدا شده از مواد غذایی گوشتی مثل همبرگر، مرغ و غیره شدند. به این منظور آن‌ها از روش RAPD-PCR استفاده کردند که ایزوله‌ها در ۲ کلاستر قرار گرفتند (Radu et al., 2001). دارکازانلی و همکاران (۲۰۱۸) تنوع ژنتیکی سویه /شیرشیکلی O157:H7 جدا شده از گیاهان آبیاری شده با آب رودخانه آلیو را با استفاده از روش RAPD-PCR بررسی نمودند نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که سویه‌های /شیرشیکلی O157:H7 جداسازی شده تنوع ژنتیکی بسیار بالایی را نشان می‌دهند. آن‌ها همچنین اذعان داشتند که تکنیک RAPD-PCR روشی بسیار سریع و کاربردی است (Darkazanli et al., 2018). افشاری و همکاران (۲۰۱۵)، تنوع ژنتیکی در

other intestinal pathogens in patients with diarrheal disease. Eur Epidemiol. 17:97-99.

4. Belanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois C. 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Micro. 62:1-10.

5. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreeyajan J, Svenson S. 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Veterinary Micro. 80:75-83.

6. Darkazanli M, Kiseleva I, Darkazanli K. 2018. Genetic Diversity of *E. coli* O157:H7 Isolated from Some Leafy Greens, Irrigated by Aleppo River, Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker. Rus Agri Sci. 44:146-152.

7. Dontorou C, Papado P, Filioussis G. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Int J Food Micro. 82: 273-279.

8. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy N, Caliskan A. 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Jpn J Infect Dis. 62:372-7.

9. Fadel H.M, Afifi, Al-Qabili D.M. 2017. Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. Vete World. 10: 1118-1128.

10. Gannon V.P, D'Souza S, Graham T, King R.K, Rahn K, Read 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. J of Clin Micro. 35(3): 656-662.

11. Gould LH, Demma L, Jones TF. 2009. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active

که انتظار می‌رفت تشابه ژنتیکی زیادی بین نمونه‌های جدا شده از شهر اصفهان و شهرکرد وجود داشت که این امر به دلیل فاصله نزدیک دو شهر، استفاده از چراگاه‌های مشترک در فصول گرم سال و انتقال دام از شهرکرد به اصفهان و بالعکس می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های اشریشیاکلی O157:H7 از فراوانی قابل توجهی در نمونه‌های گوشت خام دام و طیور برخوردار بودند که بسیار قابل توجه است. بالا بودن فراوانی باکتری در نمونه‌های گوشت نشان‌دهنده امکان انتقال باکتری از این نمونه‌ها و از طریق خوردن گوشت نپخته و نیم‌پز و بروز عفونت گوارشی در انسان می‌باشد. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش RAPD-PCR روشی ساده، سریع و ارزان جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف اشریشیاکلی از جمله سویه O157:H7 می‌باشد اما توصیه می‌گردد که مطالعات بیشتری روی نمونه‌های گوشت خام دام و طیور در سطح کشور انجام شده و روش RAPD-PCR با روش‌های مولکولی جدیدتر مثل PFGE مقایسه گردد امید است که نتایج مطالعه ما در بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه اشریشیاکلی O157:H7 و ارتقای سلامت عمومی جامعه استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری مفید باشد.

منابع

1. Afshari A, Rad M, Seifi H.A, Ghazvini K. 2015. Genetic variation among *Escherichia coli* isolates from human and calves by using RAPD PCR. Ir J of Vete Med. 10(1): 33-40
2. Aslani M.B and Bourzari S. 2003. An epidemiological study on VTEC infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). Eur J Epidemiol. 18: 345-349.
3. Baffone W, Ciaschini G, Pianetti A. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and

22. Momtaz H., Safarpour Dehkordi F., Rahimi E., Ezadi H., Arab R. 2013 b. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. *Meat Science*, 95: 381-388.
23. Murphy B.P, Murphy M, Buckley J.F. 2005. In Line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157:H7 surveillance of milk production holding. *Int J Hyg Environ – Healthy*. 521-4528.
24. Nasonova ES. 2008. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. *Tsitologiya*. 50 (11):927-35.
25. Nielsen K, Dynesen P, Larsen P, Frimodt-Møller N. 2014. Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy controls who have never had a urinary tract infection. *J of Med Micro*. 63:582–589.
26. Paton A.W., Paton J.C. 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx1*, *stx2*, *eae* A, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. *J of Clin Micro*. 36: 598-602.
27. Radu S, Ling O.W, Rusul G, Karim M.I, Nishibuchi M. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J Micro Meth*. 46(2):131-9.
28. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. 2008. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. on bovine carcasses in Isfahan, Iranian *Vete J of Research* 9: 365-70.
29. Reinders R.D and Barama A. 2002. Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation method for detection of shiga toxin – producing *E.coli* O157:H7 in milk. *J of App Micro*. 92: 1015-1020.
30. Salek Moghaddam A, Forouhesh Tehrani M, Davoodian P. 2003. Survey of the bacterial contaminants of Iranian foods in searches of *E.coli*O157:H7 in medical surveillance network sites. *Clin Infect Dis*. 49: 1480–1485.
12. Hopkin k, Hilton A. 2001. Restriction endonuclease analysis of RAPD-PCR amplicons derived from shiga-like toxin – producing *E.coli* O157:H7 isolates. *Med microbial*. 50:90-95.
13. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 183:78–88.
14. Khan A and Yamasaki S. 2002. Prevalence and genetic profiling of virulence determinates of Non-O157 STEC isolate from cattle, beef and humans Calcutta India . *Emerg Inf Dis*. 8 (1): 54-62.
15. Kaper J.B, Nataro J.P, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro*. 2: 123–140.
16. Kumar S, Kumar M, Raj A, Prakash J. 2018. Evaluation of Genetic Analysis of *ESCHERICHIA COLI* Isolated from Two Different Environmental Sources. *Bio & App Sci*. 60:1-10.
17. Lan R and Reeves P.R. 2002. *Escherichia coli* in disguise molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect*. 4 (11): 1125–32.
18. Mahon C.R, Lehman D.C, Manuselis G.2007. Textbook of diagnostic microbiology. 3th ed: New York: Saunders.
19. Manning S.D, Motiwala A.S, Springman A.C. 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *P Natl Acad Sci USA*. 105:4868–4873.
20. Marialouis X.A and Santhanam A. 2016. Antibiotic resistance, RAPD-PCR Typing of Multiple Drug resistant strain of *E.coli* coliform urinary tract infection. *J Clin Diagn Res*. 10(3): 5-9.
21. Momtaz H., Karimian A., Madani M., Safarpour Dehkordi F., Ranjbar R., Sarshar M., Souod N. 2013 a. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 12: 8-15.

(RAPD). Inter Research J of Micro. 4(2): 72-78.

32. Widiasih D.A., Ido N, Omoe K. 2003. Duration and magnitude of faecal shedding of shiga toxin – producing *Escherichia coli* from naturally infected Cattle. Epidemiol. Infect. 132: 67-75.

laboratory sciences researches center. Iranian J of Inf Dis and Trop Medicine.; 18(21) : 5 – 8.

31. Suardana I, Artama W, Widiasih D, Mahardika I. 2013. Genetic Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains using random amplified polymorphic DNA

Genotyping of *Escherichia coli* O157: H7 strains isolated from raw ruminant and poultry meat samples by RAPD-PCR

Lotfi M¹, Momtaz H^{2*}, Tajbakhsh E³

1. Graduated of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author: hamomtaz@iaushk.ac.ir

Received: 5 January 2020

Accepted: 3 April 2020

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is one of the most important enteric pathogenic strains that is usually transmitted to humans through contaminated water and food. These strains cause hemorrhagic colitis, HUS syndrome, cytopenic purpura thrombosis, and, in some cases, death. The main repository of these bacteria is ruminants. The aim of this study was genetic classification (genotyping) of isolates of this strain isolated from raw meat and poultry by RAPD-PCR method. 344 samples of ruminants and poultry were collected from fresh meat supply centers in Isfahan and Shahrekord. Genetic classification of O157:H7 isolates was performed by the RAPD-PCR method. Of 344 raw meat samples studied, 202 *Escherichia coli* isolates (58.7%) were isolated. The rate of O157: H7 strain was 17.8% (36 samples). Genetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 isolates showed 9 different profiles among these 36 isolates and found an affinity of 43.7 to 100% among the isolates. This study showed high molecular similarity between *E. coli* O157: H7 strains isolated from different animals in Isfahan and Shahrekord. It was also found that RAPD-PCR is a simple, fast, and inexpensive method for describing the genetic diversity of different *E. coli* strains including strain O157:H7.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, RAPD-PCR, Genetic Classification, Raw meat.