Archive of SID

میزان آلودگی گوشت گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

دکتر محمدرضا جعفریان صدیق[۲،۱]، دکتر ابراهیم رحیمی*[۳،۲]، دکتر عباس دوستی[۴]

[۱]دانش آموخته دامپزشکی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲]عضو باشگاه پژوهشگران جوان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۳]گروه بهداشت مواد غذایی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۴]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۵ اصلاح نهایی: ۸۹/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۷

چکیده:

زمینه و هدف: **اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ به عنوان یک عامل اسهال، کولیت خونریزی‌دهنده و سندرم اورمی همولیتیک در سراسر جهان شناخته شده است. گوشت آلوده به مدفوع حیوانی احتمالاً منبع اصلی عفونت اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در نمونه‌های گوشت گوسفند در اصفهان با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) انجام گرفت.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ۱۴۸ نمونه گوشت گوسفند کشتار شده در کشتارگاه اصفهان از مرداد ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ به صورت تصادفی جمع آوری شدند. نمونه ها در آبگوشت تریپتون سوی حاوی مکمل نوبیوسین (TSB-n) به عنوان یک محیط غنی کننده و سپس محیط مک کانکی آگار سوربیتول دار حاوی مکمل سفکسیم و تلئوریت پتاسیم (CT-SMAC) به عنوان یک محیط انتخابی کشت داده شد. کلنی های مشکوک اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ جدا شده از روش های باکتریولوژی به وسیله آزمون زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفت.**

یافته ها: **بر اساس آزمون کشت به ترتیب ۴۳ (۲۹/۱٪) و ۱۰(۶/۸٪) نمونه از نظر اشریشیاکلی و اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ مثبت بود. اما تنها ۵ نمونه از اشرشیاکلی‌های سوربیتول منفی در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به عنوان اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ تشخیص داده شدند. شیوع فصلی اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در نمونه‌های بررسی شده بین ۰ تا ۹/۷٪ بود و بالاترین میزان آن در فصول بهار و تابستان مشاهده شد (P<۰/۰۵).**

نتیجه گیری: **نتایج این مطالعه نشان داد که گوسفند می‌تواند به عنوان یک مخزن بالقوه برای اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ مطرح باشد و گوشت گوسفند ممکن است به عنوان یک حامل در انتقال این پاتوژن به انسان عمل کند.**

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$، گوشت گوسفند، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه:

اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری های منتقل شونده به وسیله مواد غذایی از جمله گوشت، فرآورده‌های گوشتی، فرآورده‌های لبنی، سبزیجات و آب شناخته شده است (۴-۱). در بین حیوانات گاو به عنوان مهمترین مخزن این باکتری می باشد (۵). اگرچه گوسفند، بز، خوک، سگ، گربه، بوقلمون، جوجه و غاز نیز به عنوان مخازن این باکتری گزارش شده‌اند (۶،۳).

اشرشیاکلی به عنوان یکی از مهمترین باکتری‌ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی نقش حائز اهمیتی را در بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی بر عهده دارد.

اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ مهمترین سروتیپ در

*نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه- دانشکده دامپزشکی- گروه بهداشت مواد غذایی-تلفن: ۰۹۱۳۳۲۷۸۳۷۷ ،
E-mail:ebrahimrahimi55@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

گروه اشرشیاکلی انتروهموراژیک به شمار می‌رود و نقش بسزایی در وقوع بیماری‌های چون کولیت خونریزی‌دهنده، پورپورا ترومبوسیتوپنی ایدیوپاتیک و سندرم اورمی همولیتیک ایفا می‌کند (۷). بیماری‌های یاد شده می‌توانند با بروز ناگهانی، تمامی گروه‌های سنی را درگیر کند و از کشورهای زیادی از جمله آمریکا، انگلستان، ترکیه، کانادا، آفریقای جنوبی، کنگو، کنیا، نیجریه، سوئد، کامرون، مالایی و دیگر کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه گزارش شده‌اند (۱۱،۴،۱–۸). اگر چه اثبات شده است که 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 (۱۳،۱۲،۱۱).

با توجه به اینکه انتشار اصلی اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ گاو و محصولات غذایی با این منشاء است، بیشتر مطالعات و گزارش‌های موجود نتایج بررسی آلودگی در این محصولات را نشان می‌دهد (۱۵،۱۴،۶،۵) که حاکی از شیوع ۱ تا ۲۷/۸ درصدی این پاتوژن در این محصولات می‌باشد. بعد از گاو گوسفند به عنوان دومین نشخوار کننده عمده در تامین گوشت قرمز در ایران محسوب می شود و برخی از محققین نقش گوسفند را به عنوان مخزن اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ مشابه گاو می‌دانند (۱۷،۱۶). میزان آلودگی گوشت گوسفند به این پاتوژن در ایران (۱۸)، استرالیا (۱۹)، آمریکا (۲۰)، ایتالیا (۲۱) و مصر (۲۲) به ترتیب ۳/۹۳، ۰/۵، ۱/۵، ۰/۷۷–۷/۱ و ۴ درصد گزارش شده است. لذا گوشت گاو و گوسفند را به عنوان مهمترین مخازن اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ معرفی شده اند (۱۷،۱۶).

هموژن بودن این سویه از نظر ژنتیکی سبب یافتن متدهای زیادی برای جداسازی این سویه‌ها نظیر عدم قدرت تخمیر سوربیتول و عدم تولید بتا.دی. گلوکورونیداز است که بیشتر انواع اشرشیا کلی قادر به انجام دادن آن می‌باشند. از این جهت با ساختن محیط‌های انتخابی نظیر سوربیتول مکانکی‌آگار، سفی‌کسیم پتاسیم تلوریت سوربیتول مکانکی آگار و سفی‌کسیم پتاسیم تلوریت رامنوز سوربیتول مکانکی آگار می‌توان این سویه‌ها را غربالگری کرد. رشد باکتری روی این محیط‌ها به خصوصیات فنوتیپی اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$ نظیر عدم توانایی تخمیر رافینوز و مقاومت به تلوریت پتاسیم بستگی دارد. یکی دیگر از روش دقیق ردیابی این پاتوژن روش‌های ملکولی از جمله PCR می‌باشد، که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفت (۲۳).

با توجه به دوز عفونی بسیار پایین این پاتوژن و محدود بودن مطالعات ثبت شده از آلودگی مواد غذایی به این سویه در ایران، ضرورت شناسایی منابع عفونی و چگونگی انتقال آن به انسان وجود دارد. اگرچه مطالعه مشابهی در خصوص آلودگی گوشت گاو به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در اصفهان انجام شده است (۲۴) اما مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی لاشه گوسفندان به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در اصفهان می باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی شیوع این پاتوژن در گوشت گوسفند در طول چهار فصل سال طراحی و انجام شد.

روش بررسی :

جمع‌آوری نمونه‌ها:

در این مطالعه توصیفی–تحلیلی از مرداد ماه ۱۳۸۷ الی دی ماه ۱۳۸۸ در مجموع ۱۴۸ نمونه گوشت گوسفند از کشتارگاه اصفهان به طور تصادفی جمع‌آوری و در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل و حداکثر ۱۲ ساعت پس از نمونه‌گیری از نظر آلودگی به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ مورد آزمایش قرار گرفتند. تمام نمونه‌ها از عضلات سطحی گردن لاشه گوسفندان

www.SID.ir

Archive of SID

کشتار شده در پایان مرحله کشتار در شرایط استریل گرفته شدند. تعداد نمونه‌های اخذ شده در فصول تابستان، پاییز، زمستان و بهار به ترتیب ۳۰، ۴۲، ۴۵ و ۳۱ نمونه بود که بر اساس مطالعات مشابه در نظر گرفته شد (۱۸).

جداسازی اشرشیاکلی و اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$:

جهت جستجوی اشرشیا کلی و اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$، ۱۰ گرم از هر نمونه به صورت هموژن شده به ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشت تریپتون سوی (TSB) (مرک آلمان) حاوی مکمل نوبیوسین (۲۰mg/l) اضافه شد و برای ۲۴-۱۸ ساعت در گرم خانه C^o ۳۷ انکوبه شدند. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه غنی شده مورد نظر در محیط ائوزین متیلن بولو و مک‌کانگی سوربیتول‌دار (SMA) (مرک آلمان) حاوی مکمل سفکسیم و تلئوریت پتاسیم کشت و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه C^o ۳۷ انکوبه شدند. جهت تائید تشخیص پرگنه‌های مشکوک اشرشیا کلی از کشت بر روی محیط تریپل شوگر آیرون (TSI) و آزمون آیم ویک (IMViC) استفاده شد (۱۶). همچنین پرگنه های سوربیتول منفی جهت تائید تشخیص اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$ به وسیله PCR با استفاده از دو پرایمر مخصوص تشخیص ژن‌های O_{157} و H_7 (fiC) مورد بررسی قرار گرفت (۲۶،۲۵) (جدول شماره ۱). جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش اسپکترومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برای انجام آزمون PCR غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرو لیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰X، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۲۰۰ میکرون مولار dNTP، ۲ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۱ میکروگرم DNA از هر نمونه بود. سپس از افزودن اجزای PCR در حجم‌های فوق لوله‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Ependorf, Germany) قرار داده شدند و برنامه حرارتی به صورت زیر تنظیم شد: یک سیکل C^o ۹۴ برای ۶ دقیقه، ۳۴ سیکل C^o ۹۴ برای ۱ دقیقه، C^o ۵۸ برای ۱ دقیقه، C^o ۷۲ برای ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی C^o ۷۲ برای ۱۰ دقیقه. محصولات PCR و ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برمائید الکتروفورز گردید و با نور ماورای بنفش مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از سوش استاندارد آزمایشگاهی اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$ به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج حاصله در دو سطح آمار توصیفی شامل فراوانی و درصد و آمار استنباطی شامل آزمون مربع کای (χ^2) تجزیه و تحلیل گردیدند. سطح معنادار برای تحلیل آماری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های O_{157} وH_7 جهت تشخیص اشرشیا کلی $O_{157}:H_7$

ژن	سکانس پرایمر	طول محصول (bp)	رفرانس
O_{157}	F: 5′CGGACATCCATGTGATATGG3′ R:5′TTGCCTATGTACAGCTAATCC3′	۲۵۹	۲۵
(fliC) H_7	F:5′GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC3′ R:5′CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC3′	٦٢٥	٢٦

www.SID.ir

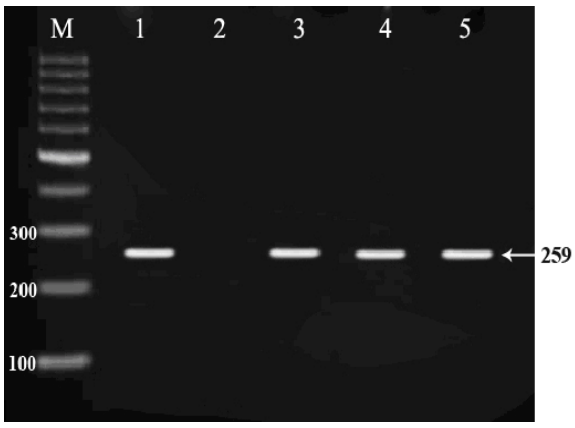
Archive of SID

یافته‌ها:

بر اساس آزمون‌های باکتری شناسی ۴۳ نمونه از مجموع نمونه‌های مورد مطالعه (۲۹/۱٪) آلوده به اشرشیاکلی بودند و از این تعداد ۱۰ نمونه (۶/۸٪) بر اساس ویژگی عدم تخمیر سوربیتول به عنوان سروتیپ مشکوک به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ شناسایی شدند. در ادامه سوش‌های سوربیتول منفی جهت تائید تشخیص اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد از ۱۰ سوش بررسی شده، ۵ مورد اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بوده است و در ۵ مورد اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ تائید نشد (تصویر شماره ۱ و ۲).

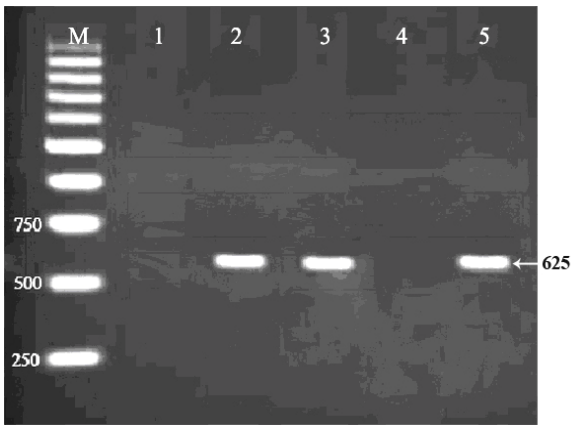
میزان وقوع آلودگی لاشه‌های گوسفند به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در طول فصل بهار و تابستان به ترتیب ۹/۷ و ۶/۶ درصد بود. این پاتوژن از نمونه‌های اخذ شده در طول فصول پاییز و زمستان جدا نشد.

بر پایه این نتایج اختلاف آماری معنی داری بین وقوع آلودگی نمونه‌ها به اشرشیاکلی و اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در فصول مختلف سال مشاهده شد ($P<0/05$) (جدول شماره ۱). بر پایه نتایج به دست آمده از آزمون کشت اختلاف آماری معنی داری بین وقوع آلودگی نمونه‌ها به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در فصول مختلف سال مشاهده نشد.



تصویر شماره ۱: نتایج PCR ژن O_{157} نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.

M: مارکر bp ۱۰۰، ۱ : کنترل مثبت، ۲ : کنترل منفی، ۳، ٤ و ۵: نمونه‌های مثبت اشرشیاکلی O_{157}



تصویر شماره ۲: نتایج PCR ژن H_7 نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.

M: مارکر kb۱، ۱ : کنترل منفی، ۲ : کنترل مثبت، ۳ و ۵: نمونه‌های مثبت اشرشیاکلی H_7، ٤ : نمونه منفی

جدول شماره ۲: میزان آلودگی نمونه‌های گوشت گوسفندان کشتار شده در اصفهان در فصول مختلف سال

فصل	تعداد نمونه	نمونه‌های آلوده به اشرشیاکلی		آلوده به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بر پایه عدم تخمیر سوربیتول		آلوده به اشرشیاکلی کلی $O_{157}:H_7$ بر اساس آزمون PCR	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بهار	۳۱	۱٤	٤۵/۲	٤	۱۲/۹	۳	۹/۷
تابستان	۳۰	۳	۱۰	۲	٦/٦	۲	٦/٦
پاییز	٤۲	۸	۱۹/۱	۱	۲/٤	۰	۰
زمستان	٤۵	۱۸	٤۰/۰	۳	٦/۷	۰	۰
مجموع	۱٤۸	٤۳	۲۹/۱	۱۰	٦/۸	۵	۳/٤

$P<0/05$ در مقایسه بین فصول مختلف بر اساس آزمون PCR

www.SID.ir

Archive of SID

بحث:

بر اساس نتایج این مطالعه میزان شیوع آلودگی گوشت گوسفند بر اساس آزمون PCR ۳/۴ درصد می باشد. شکرفروش و همکاران طی مطالعه‌ای به روش PCR، میزان شیوع آلودگی گوشت گوسفند (n=۱۵۳) را در شیراز ۳/۹۲ درصد گزارش نموده است که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۱۸). به طور مشابهی Abdul-Raouf و همکاران از مصر میزان آلودگی گوشت گوسفند به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ را به روش کشت، ۴ درصد گزارش نموده است. در همین مطالعه آلودگی گوشت گاو، مرغ و شیرخام به روش کشت، به ترتیب ۶، ۴ و ۶ درصد ذکر شده است (۲۲).

Phillips و همکاران در استرالیا میزان آلودگی گوشت گوسفند را به اشرشیاکلی و اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ را به روش کشت به ترتیب ۴۳ و ۰/۵ درصد گزارش نموده‌اند (۱۹). اما میزان آلودگی نمونه ها به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در مطالعه ما به طور معنی داری بالاتر بوده است. مطالعه مشابهی در آمریکا توسط Doffy و همکاران میزان آلودگی لاشه گوسفندان به اشرشیاکلی ۶۶/۲ درصد گزارش نموده‌اند (۲۷). Schoeni و Dolye در آمریکا به روش hydrophobic grid membrane filter-immunoblot نشان دادند از ۲۰۵ نمونه گوشت گوسفند ۴ نمونه (۱/۵ درصد) آلوده به اشریشیاکلی $O_{157}:H_7$ بـوده است که در مقایسه با نتایج مطالعه ما در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (۲۰).

در مطالعه Battisti و همکاران در ایتالیا، میزان آلودگی گوشت گوسفند به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ به روش PCR کمتر از ۱ درصد (۰/۷۷٪) گزارش شده است (۲۸). در همین کشور Franco و همکاران توسط تکنیک ایمنو– مغناطیس و شمارش تعداد پاتوژن در نمونه‌های مثبت در کنار روش های تشخیصی مولکولی و ایمنی شناسی، میزان آلودگی گوشت گوسفند را به این پاتوژن ۷/۱ درصد نشان داده‌اند (۲۱). مطالعه‌ای از Hiko و همکاران از اتیوپی به روش کشت و سرولوژی حاکی از آن است که به ترتیب ۲/۵ و ۲ درصد از گوشت گوسفندان و بزهای بررسی شده آلوده به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بوده اند (۲). در مجموع مقایسه این نتایج با نتایج پژوهش ما مشابه است و نشان می‌دهد اگر چه میزان آلودگی نمونه‌های گوشت گوسفند در اصفهان به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بالا نیست اما خطر انتقال این باکتری از لاشه‌های آلوده به لاشه‌های سالم و از گوشت آلوده به سایر مواد غذایی آماده مصرف در منزل وجود دارد.

در این مطالعه بر اســاس آزمون PCR تنها نمونه های اخذ شده در فصول بهار و تابستان به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ آلوده بوداند. Bryane و همکاران (۱۳)، Jo و همکاران (۶)، Elder و همکاران (۱۴) و Chapman و همکاران (۱۵) با استفاده از روش های کشت سرولوژیک و PCR اختلاف فصلی را در جداسازی اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بین ۴/۸ تا ۳۸/۸ درصد گزارش نموده اند. مطابق با نتایج مطالعه حاضر بالاترین میزان شیوع آلودگی در فصول گرم گزارش شده است.

در مطالعه حاضر ۱۰ نمونه (۶/۸٪) بر اساس ویژگی عدم تخمیر سوربیتول به عنوان سروتیپ مشکوک به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ شناسایی شدند، در حالی که بررسی نمونه های سوربیتول منفی جهت تائید تشخیص اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش PCR نشان داد از ۱۰ سوش بررسی شده، تنها ۵ مورد اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ بوده است و در ۵ مورد اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ تائید نشد . نتایج این بخش اهمیت روش های مولکولی را در تشخیص این پاتوژن نشان می دهد. علاوه بر آن با توجه به هزینه تمام شده کمتر و سرعت بالای روش PCR این روش به عنوان روش ارجح در جداسازی اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ از مواد غذایی پیشنهاد می گردد.

Dontorou و همکاران در یـونان با استفـــاده از

www.SID.ir

Archive of SID

تکنیک کشت، سرولوژی و PCR نشان دادند که از میان ۳۵۱ نمونه مدفوع گوسفند، بز و گاو تنها ۱ نمونه از نمونه های مدفوع بز (۰/۲٪) حامل این پاتوژن بوده است (۲۹). همچنین مطالعه‌ی از Chapman و همکاران از انگلستان به روش ایمنو- مغناطیس و کشت (۲۵) و Johnsen و همکاران به روش ایمنو- مغناطیس و PCR در نروژ (۳۰) نشان می‌دهد که به ترتیب از ۲/۲ درصد و ۷/۴ درصد از نمونه‌های مدفوع گوسفند اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ جداسازی شده است. علاوه‌بر آن مطالعه‌ای در آمریکا به روش کشت و PCR حاکی از آن است که بیش از ۳۱ درصد نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری‌شده از گوسفندان حامل اشرشیاکلی O_{157} بوده است (۳۱). این نتایج نشان می‌دهد که آلودگی مدفوعی لاشه گوسفندان در طول پروسه کشتار از دلایل مهم آلودگی به این پاتوژن می‌باشد. Gun و همکاران به روش ایمنو– مغناطیس، کشت و سرولوژی نیز ارتباط معنی‌داری را بین شیوع اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ را در مدفوع و آلودگی لاشه‌ها گزارش نموده‌اند (۳۲).

نتیجه گیری :

اگرچه مطالعات مشـــابه در خصوص آلودگـــی گوشت گاو به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در اصفهان انجام شده است (۲۴). اما مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی لاشه گوسفندان به اشرشیاکلی $O_{157}:H_7$ در اصفهان می باشد و حاکی از آن است که مصرف گوشت نیم پز شده گوسفند می تواند در انتقال این پاتوژن به انسان نقش داشته باشد. لذا ضرورت کنترل، نظارت دقیق و رعایت اصول بهداشت در طول پروسه کشتار، حمل و نقل و نگهداری می‌تواند در کاهش آلودگی متقاطع مؤثر باشد همچنین با توجه به مخاطرات ناشی از این باکتری در مواد غذایی ضرورت بررسی اتیولوژیکی این باکتری در مواد غذایی و راه-های انتقال آن به انسان لازم به نظر می‌رسد و مطالعات کامل‌تـر در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد. همچنین پخت کامل گوشت قبل از مصرف توصیه می شود.

تشکر و قدردانی :

نگارندگان مقاله مراتب سپاس خود را از همکاری آقایان مجید ریاحی، منوچهر مؤمنی، محمد داوود رحیمیان و حمیدرضا کاظمینی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، اعلام می‌دارد.

منابع:

1. Galane PM, Le Roux M. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from young South African children with diarrhoeal diseases. J Health Popul Nutr. 2001; 19: 31-7.

2. Hiko A, Asrat D, Zewde G. Occurrence of *Escherichia coli* $O_{157}:H_7$ in retail raw meat products in Ethiopia. J Infect Dev Countries. 2008; 2: 389-93.

3. Kenneth J, Ryan MD, Cray MD. Sherrie's medical microbiology. 4th ed. London: Mc Grow Hill; 2004. p: 354-7.

4. Murphy BP, Murphy M, Buckley JF, Gilroy D, Rowe MT, McCleery D, et al. In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O_{157} surveillance of milk production holdings. Int J Hyg Environ Health. 2005; 208: 407-13.

5. Varela-Hernández JJ, Cabrera-Diaz E, Cardona-López MA, Ibarra-Velázquez LM, Rangel-Villalobos H, Castillo A, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* $O_{157}:H_7$ and non- O_{157} from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. Int J Food Microbiol. 2007; 113: 237-41.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, et al. *Prevalence and characteristics of Escherichia coli* O_{157} from major food animals in Korea. Int J Food Microbiol. 2004; 95: 41-9.

7. Koyange L, Ollivier G, Muyembe JJ, Kebela B, Gouali M, Germani Y. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* $O_{157.}$ Kinshasa. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 968.

8. Olorunshola ID, Smith SI, Coker AO. Prevalence of EHEC O_{157}:H_7 in patients with diarrhea in Lagos. Nigeria: APMIS. 2000; 108: 761-3.

9. Baffone W, Ciaschini G, Pianetti A, Brandi G, Casaroli A, Bruscolini F. Detection of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 and other intestinal pathogens in patients with diarrhoeal disease. Eur J Epidemiol. 2001; 17: 97-9.

10. Çadırcı O, Sırıken B, Inat G, Kevenk TO. The prevalence of *Escherichia coli* O_{157} and O_{157}:H_7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR. Meat Sci. 2009; 84: 553-6.

11. Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G, et al. Isolation of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 from foods in Greece. Int J Food Microbiol. 2003; 82: 273-9.

12. Aslantaş O, Erdogan S, Cantekin Z, Gulacti I, Evrendilek GA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O_{157} from Turkish cattle. Int J Food Microbiol. 2006; 106: 338-42.

13. Bryane CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Burge DR, Hiemke CJ, et al. Characterization of *E. coli* O_{157}:H_7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 4683-468.

14. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy–Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O_{157} prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97: 2999-3003.

15. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan-Malo AT, Harkin MA. A 1-year study of *Escherichia coli* O_{157} in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol Infect. 1997; 119: 245-50.

16. Stampi S, Caprioli A, De Luca G, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F. Detection of *Escherichia coli* O_{157} in bovine meat products in northern Italy. Int J Food Microbiol. 2004; 90: 257-62.

17. Aktan I, Woodward MJ, Laragione RM. Interaction between attaching-effacing *Escherichia coli* O26:K60 and O_{157}:H_7 in young lambs. Res Vet Sci. 2009; 87: 13-15.

18. Shekarfroush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. Detection and frequency of Stx2 gene in *Escherichia coli* O_{157} and O_{157}:H_7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. Pak J Bioch Sci. 2008; 11: 1085-92.

19. Phillips D, Jordan D, Morris S, Jenson I, Sumner J. Microbiological quality of Australian sheep meat in 2004. Meat Sci. 2006; 74: 261-6.

20. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 from retail fresh meats and poultry. Appl Environ Microbiol. 1987; 53: 2394-6.

21. Franco A, Lovari S, Cordaro G, Di Matteo P, Sorbara L, Iurescia M, et al. Prevalence and concentration of verotoxigenic *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in adult sheep at slaughter from Italy. Zoonoses Public Health. 2008; 56: 215-20.

22. Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. Isolation of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 from some egyptian foods. Int J Food Microbiol. 1996; 29: 423-6.

23. Nayebi Aghaei SM, Mansouri Sh. [Detection of shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* (O_{157}:H_7) isolated from of urinary and stool specimens by multiplex-PCR. Lorestan Univ Med Sci. 2006; 8: 21-8.]Persian

www.SID.ir

Archive of SID

24. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. The prevalence of *Escherichia coli* O_{157}:H_7, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. on bovine carcasses in Isfahan, Iran. Iranian Vet J Res. 2008; 9: 365-70.

25. 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, rfbO111, and rfbO_{157}. J Clin Microbiol. 1998; 36: 598-602.

26. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H_7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 1997; 35: 656-62.

27. Duffy EA, Belk KE, Sofos JN, Levalley SB, Kain ML, Tatum JD, et al. Microbial contamination occurring on lamb carcasses processed in the United States. J Food Prot. 2001; 64: 503-8.

28. Battisti A, Lovari S, Franco A, Di Egidio A, Tozzoli R, Caprioli A, et al. Prevalence of *Escherichia coli* O_{157} in lambs at slaughter in Rome, central Italy. Epidemiol Infect. 2006; 134: 415-19.

29. Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou V, Kansouzidou A, et al. Isolation of a rare *Escherichia coli* O_{157}:H_7 strain from farm animals in Greece. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 2004; 27: 201-7.

30. Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H. *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in feces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. Int J Food Microbiol. 2001; 10: 193-200.

31. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in microbial flora of sheep. J Clin Microbiol. 1996; 34: 431-3.

32. Gun H, Yilmaz A, Turker S, Tanlasi A, Yilmaz H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in Istanbul. Int J Food Microbiol. 2003; 84: 339-44.

Cite this article as: Jafareyan-Sedigh MR, Rahimi E, Doosti A. [Isolation of Escherichia coli O_{157}: H_7 in sheep meats using cultural and PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011 June, July; 13(2): 61-68.]Persian

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences **(J Shahrekord Univ Med Sci)**

Received: 6/March/2010 Revised: 14/June/2010 Accepted: 18/Aug/2010

Isolation of *Escherichia coli* O_{157}: H_7 in sheep meats using cultural and PCR method

Jafareyan-Sedigh MR (DVM)[1], Rahimi E (PhD)*[1,2], Doosti A (PhD)[3]
[1]Member of Young Researchers Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, [2]Food Hygiene Dept., Branch, Shahrekord Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, [3]Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Background and aim: *Escherichia coli* O_{157}:H_7 is now recognized as an important cause of diarrhea, hemorrhagia colitis and hemolytic-uremic syndrome worldwide. Meat contaminated with animal feces is probably the major source of the *E. coli* O_{157}:H_7. In this study, we investigated the prevalence of *E. coli* O_{157}:H_7 in meat samples of sheep in Isfahan from August 2008 to January 2010.

Methods: A total of 148 sheep carcasses in Isfahan slaughterhouse were assessed for *E. coli* O_{157}:H_7 using the standard cultural and polymerase chain reaction (PCR) methods. Bacteriological examinations were performed by using Triptone Soya Broth containing Novobiocin (TSB-n) as an enrichment media and then sorbitol MacConkey agar plates supplemented with Cefixime and Tellurite (CT-SMAC) a selective plating media. Suspected colonies of *E. coli* O_{157}:H_7, identified by bacteriological methods, were tested by PCR.

Results: Using cultural method, 43 (29.1%) and 10 (6.8%) samples were positive for *E. coli* and *E. coli* O_{157}:H_7, respectively. Only 5 sorobitol negative *E. coli* strains were identified as *E. coli* O_{157}:H_7, using polymerase chain reaction. The seasonal prevalence of *E. coli* O_{157}:H_7 in samples were 0-9.7% and it was at its highest level in Spring and Summer.

Conclusion: These results indicate that sheep can be a reservoir for *E. coli* O_{157}:H_7 and sheep meat may serve as a vehicle for the pathogen transmission to human.

***Keywords: Escherichia coli* O_{157}:H_7, Sheep meat, PCR.**

***Corresponding author**:
Food and Hygiene Dept., Veterinary faculty, Islamic Azad University, Rahmateh, Shahrekord, Iran.
Tel:
0098-09133278377
Email:
Ebrahimrahimi55@yahoo.com

Cite this article as: Jafareyan-Sedigh MR, Rahimi E, Doosti A. [Isolation of *Escherichia coli* O_{157}: H_7 in sheep meats using cultural and PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011 June, July; 13(2): 61-68.]Persian