Archive of SID

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۷، زمستان ۱۳۹۱

آلودگی گوشت گوسفندان شهرستان شهرکرد به باکتری *E.coli* و سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و *E.coli* O۱۲۸ به روش PCR

• **مجتبی بنیادیان**
دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
حسین طهماسبی (نویسنده مسئول)
دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
• **ابوالفضل آخوندزاده دره،** • **ناصر صالحی و** • **سمیرا ملانوری شمسی**
دانشجویان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
• **یدالله خسروی**
کارشناس آزمایشگاه گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه شهرکرد
تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱
Email: h.Tahmasby@yahoo.com

چکیده

اطلاعاتی که وضعیت میکروبی محصولات گوشت را نشان می دهند به عنوان خط پایه برای تنظیم استانداردها و در حمایت از تشخیص عوامل خطرساز به منظور تایید عملی در سیستم نظارتی می تواند ارزشمند باشد. O۲۶، O۴۵، O۹۱، O۱۰۳، O۱۱۱، O۱۱۳، O۱۲۱، O۱۲۸، O۱۴۵ و O۱۵۷ شایع ترین سروتیپ های انتروهموراجیک *E.coli* مرتبط با بیماری های انسانی هستند. با توجه به اهمیت آنچه ذکر گردید و احتمال انتقال سروتیپ های انتروهموراجیک *E.coli* به انسان توسط گوشت گوسفند، مطالعه ی حاضر به منظور ارزیابی آلودگی گوشت گوسفندان شهرستان شهرکرد به باکتری *E.coli* و سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و *E.coli* O۱۲۸ به روش PCR انجام پذیرفت. در مجموع تعداد ۱۳۵ نمونه از لاشه های گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه جونقان واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری گردید. نمونه ها در آبگوشت تریپتون سوی غنی شدند. سپس براث های انکوبه شده بر روی محیط های مکانکی آگار سوربیتول دار و مکانکی آگار به عنوان محیط های انتخابی کشت داده شدند. کلنی های مشکوک به وسیله آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان آلودگی لاشه ها به *E.coli* ۵۰/۳۷ درصد (۶۸ از ۱۳۵) به دست آمد. ۱/۴۸ درصد (۲ از ۱۳۵) از نمونه ها آلوده به سروتیپ *E.coli* O۱۲۸ بودند. هیچ نمونه ی آلوده به سروتیپ های O۱۵۷ و *E.coli* O۲۶ یافت نشد. نتایج حاضر می توانند بیانگر عدم حضور سروتیپ های O۱۵۷ و *E.coli* O۲۶ در این منطقه باشد.

کلمات کلیدی: *E.coli*، گوشت، PCR، شهرکرد

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 97 pp: 38-41

Evaluation of sheep meat contamination to *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157, O26 and O128 serotypes in Shahrekord by PCR

By: M. Bonyadian, Associate Professor, Department of Public Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, H. Tahmasby: Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author; Tel: +989137325071), A. Akhondzadeh Dareh, N. Salehi and S. Mollanouri Shamsi: Students, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, Y. Khosravi: Lab Technician, Department of Public Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Data describing the microbiological status of a country's meat products can be of great value: in acting as a de facto validation of the country's regulatory systems, as a baseline for setting performance standards and in supporting risk assessment. O26, O45, O91, O103, O111, O113, O121, O128, O145, and O157 are the most common serotypes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with human disease. Considering the importance of what mentioned and the potential ability of sheep meat to transmit enterohemorrhagic *E. coli* to humans, the present study was conducted to evaluate sheep meat contamination to *E. coli* and E. coli O157, O26 and O128 serotypes in Shahrekord by PCR. Altogether 135 samples of sheep carcasses were collected from Jooneghan abattoir, Chaharmahalvabakhtiari, Iran. Samples enriched in Tryptone Soya Broth (TSB). Then, incubated broth culture was streaked onto Sorbitol MacConkey agar and MacConkey agar as selective plating media. Suspected colonies were tested by polymerase chain reaction. The contamination rate in sheep carcasses with *E. coli* was 50.37% (68 out of 135). 1.48% (2 out of 135) of the samples was contaminated with *E. coli* O128. *E. coli* O157 and O26 were not found in any samples. Present study suggests *E. coli* O157 and O26 are not prevalent in the region.

Key words: *Escherichia coli*, Meat, PCR, Shahrekord

مقدمه

E.coli به عنوان بخشی از فلور میکروبی روده انسان و بسیاری از حیوانات، نقش مهمی در میکروب شناسی غذا و آب به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی بر عهده دارد (۱). ارتباط بین *E.coli* و بیماری های حیوانی در سال ۱۸۹۰ مشخص گردید. در حالی که ارتباط آن با بیماری های انسانی در سال ۱۹۴۰ به دنبال وقوع بیماری در مهدکودک ها مشخص شد (۱).

بروز کلینیکی عفونت با *E.coli* های شیگا توکسین زا می تواند از اسهال آبکی خفیف تا کمپلکس های جدی از قبیل کولیت هموراجیک و سندروم اورمی همولیتیک تا حتی مرگ باشد (۳، ۷).

گرچه سروتیپ *E.coli* O۱۵۷ معمول ترین سروتیپ تولید کننده ی شیگا توکسین می باشد اما نشان داده شده است که بیش از ۲۵۰ سروتیپ مختلف از پادگن O شیگا توکسین تولید می کنند و بیش از ۱۰۰ عدد از آن ها با بیماری های انسانی مرتبط اند (۵).

سایر سروتیپ های شیگا توکسین زای *E.coli* (غیر از O۱۵۷) عامل ایجاد ۶۰ درصد از عفونت های *E.coli* شیگا توکسین زا هستند و در بسیاری از نقاط دنیا از قبیل آرژانتین، استرالیا، اسپانیا، دانمارک، شیلی و آلمان شایع می باشند (۵).

O۲۶، O۴۵، O۹۱، O۱۰۳، O۱۱۱، O۱۱۳، O۱۲۱، O۱۲۸، O۱۴۵ و O۱۵۷ شایع ترین سروتیپ های انتروهموراجیک *E.coli* مرتبط با بیماری های انسانی هستند (۸).

در مطالعه ی حاضر با توجه به اهمیت بیماری زایی سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و O۱۲۸ به جست و جوی این سروتیپ ها در نمونه های گوشت گوسفند در شهرستان شهرکرد به روش PCR پرداخته شد.

این مطالعه در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۹ صورت گرفت. نمونه ها از کشتارگاه صنعتی جونقان واقع در استان چهارمحال و بختیاری از عضلات سطحی گردن ۱۳۵ (۱۰۳ نمونه در فصل پاییز و ۳۲ نمونه در فصل زمستان) لاشه گوسفند ذبح شده در شرایط استریل گرفته شدند. جهت جستجوی *E.coli* ۲۵ گرم از هر نمونه به صورت هموژن شده به ۲۲۵ میلی لیتر آبگوشت تریپتون سوی (Merck) (TSB، ساخت آلمان) اضافه شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه غنی شده بر روی محیط های مکانکی آگار و سوربیتول مکانکی آگار (Merck، ساخت آلمان) به منظور ردیابی *E.coli* O۱۵۷ کشت داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید. پرگنه های مشکوک روی محیط TSB کشت داده شدند و آزمون های اندول، متیل رد، وگس پروسکوئر و سیترات (IMViC) بر روی نمونه های مشکوک انجام شد. نمونه های مشکوک به سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و O۱۲۸ تا زمان انجام PCR در

www.SID.ir

Archive of SID

محیط TSB به صورت گلیسیرینه در دمای ۲۰- نگه داری گردیدند.

کنترل مثبت ها از کلکسیون باکتری های گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند. نمونه های مشکوک جهت جست و جوی سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و O۱۲۸ *E.coli* به وسیله ی PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده توسط Lin و همکاران (۸) مورد آزمون قرار گرفتند. مواد PCR از شرکت سیناژن ساخت ایران تهیه شد و واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافرPCR ۱۰X ، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام گردید. برنامه های دمایی مطابق با برنامه حرارتی Lin و همکاران (۸) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت سیناژن، ایران) ۱/۵ درصد الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.

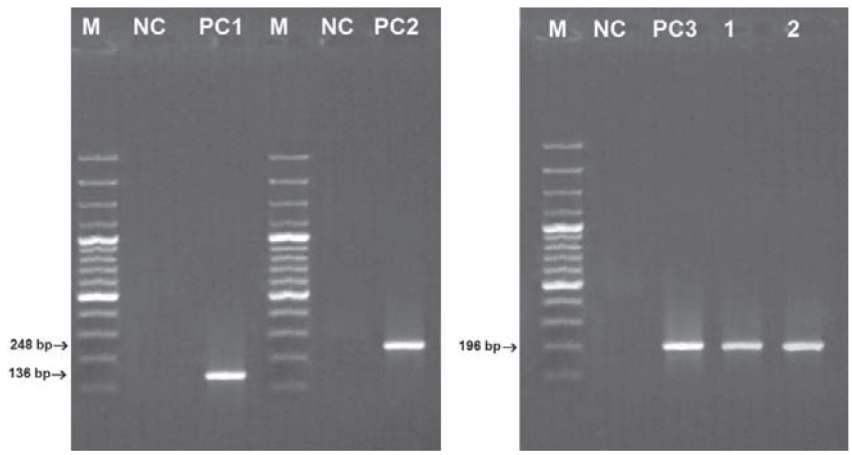
میزان آلودگی لاشه های گوسفندان مورد مطالعه به *E.coli* در کل ۵۰/۳۷ درصد (۶۸ از ۱۳۵) بود. آلودگی لاشه ها در فصل پاییز ۴۷/۶ درصد (۴۹ از ۱۰۳) و در فصل زمستان ۵۹/۴ درصد (۱۹ از ۳۲) به دست آمد. ۱/۴۸ درصد (۲ از ۱۳۵) از نمونه ها آلوده به سروتیپ *E.coli* O۱۲۸ بودند که این دو نمونه در فصل پاییز اخذ شده بودند. اما هیچ نمونه ی آلوده به سروتیپ های O۱۵۷ و O۲۶ *E.coli* یافت نشد (شکل ۱).

Jafareyan-Sedigh و همکاران طی مطالعه ای در اصفهان میزان آلودگی گوشت گوسفندان را به *E.coli* ۲۹/۱ اعلام نمودند (۴).

در مطالعات صورت گرفته توسط Jordan و همکاران (۶)، Sierra و همکاران (۱۱) و Phillips و همکاران (۹) میزان آلودگی گوشت گوسفندان به *E.coli* به ترتیب ۴۳، ۵۶/۶ و ۴۳ درصد اعلام گردید که نتایج آن ها با نتایج به دست آمده در این مطالعه تشابه دارد.

Shekarfroush و همکاران در شیراز (۱۰) و Jafareyan-Sedigh و همکاران (۴) در اصفهان میزان آلودگی به سروتیپ *E.coli* H۷:O۱۵۷ را در گوشت گوسفند به ترتیب ۳/۹۲ و ۶/۸ درصد گزارش نمودند.

در مطالعاتی که جهت تعیین سروتیپ های ایزوله های *E.coli* از گوشت گوسفند توسط Urdahl و همکاران در نروژ (۱۲) و Bennett و Bettelheim در نیوزیلند (۲) صورت گرفت، آلودگی به سروتیپ O۱۲۸ به ترتیب در ۱۰ ایزوله از ۱۰۲ ایزوله و ۲ ایزوله از ۴۰ ایزوله یافت گردید. در مطالعات ذکر شده هیچ یک از سروتیپ های O۱۵۷ و O۲۶ یافت نشد که از این نظر نتایج آن ها با نتایج به دست آمده در این مطالعه تشابه دارد.از علل میزان پایین آلودگی به سروتیپ O۱۲۸ و یافت نشدن سروتیپ های ذکر شده شاید بتوان این مسئله را ذکر کرد که از آنجایی که یکی از منابع مهم این باکتری مدفوع این حیوانات که خصوصا پوست و پشم آن ها بدان آلوده است می تواند باشد اما صنعتی بودن این کشتارگاه، استفاده از دستگاه های اتوماتیک، تماس کمتر دست با لاشه ها و رعایت سطح بالاتر شرایط بهداشتی احتمال آلودگی به این باکتری ها را کاهش داده است. همچنین سرد و خشک بودن آب و هوا بر کاهش بقای میکروب ها بسیار موثر است و این مطالعه در فصل پاییز و زمستان که بقای میکروب ها در آن کاهش می یابد و همچنین در شهرکرد که منطقه ای است با آب و هوای سرد و خشک انجام شده است. مسائلی که ذکر گردید می توانند بر نتیجه بدست آمده در این مطالعه بسیار موثر باشند.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای سروتیپ های O۱۵۷ ، O۲۶ و O۱۲۸ . M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC۱: کنترل مثبت سروتیپ *E.coli* O۱۵۷ (۱۳۶ جفت باز)، PC۲: کنترل مثبت سروتیپ *E.coli* O۲۶ (۲۴۸ جفت باز)، PC۳: کنترل مثبت سروتیپ *E.coli* O۱۲۸ (۱۹۶ جفت باز)، ۱و۲: ایزوله های مثبت برای سروتیپ *E.coli* O۱۲۸.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

۱- رضویلـر، و. (۱۳۷۸) میکروب های بیمـاری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسـمومیت های غذایی، موسسـه انتشـارات و چاپ دانشـگاه تهـران. صفحات ۸۴-۹۰.

2- Bennett, J., Bettelheim, K.A. (2002) Serotypes of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from meat in New Zealand. Comparative Immunology, *Microbiology & Infectious Diseases.* 25(2),77-84.

3- Gyles, C.L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science.* 85, 45–62.

4- Jafareyan-Sedigh, M.R., Rahimi, E., Doosti, A. (2011) Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 in sheep meats using cultural and PCR method. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 13(2), 61-68.

5- Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L. (2006) The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli. Clinical Infectious Diseases.* 43, 1587–1595.

6- Jordan, D., Phillips, D., Sumner, J., Morris, S., Jenson, I. (2007) Relationships between the density of different indicator organisms on sheep and beef carcasses and in frozen beef and sheep meat. *Journal of Applied Microbiology*.102, 57–64

7- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H., Wachsmuth, K. (1987) A DNA probe to identify enterohemorrhagic Escherichia coli of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Infectious Diseases.* 156, 175–182.

8- Lin, A., Nguyen, L., Lee, T., Clotilde, L.M., Kase, J.A., Son, I., Carter, J.M., Lauzon, C.R. (2011) Rapid O serogroup identification of the ten most clinically relevant STECs by Luminex microbead-based suspension array. *Journal of Microbiological Methods*. 87, 105–110

9- Phillips, D., Jordan, D., Morris, S., Jenson, I., Sumner, J. (2004) Microbiological quality of Australian sheep meat in. *Meat Science.* 74, 261-6.

10- Shekarfroush, S., Tahamtan, Y., Pourbakhsh, A. (2008) Detection and frequency of Stx2 gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. *Pakistan Journal of Biochemistry.* 11, 1085-92.

11- Sierra, M.L., Gonzalez-Fandos, E., Garcia-Lopez, M.L., Garcia-Fernandez, M.C. and Prieto, M. (1995) Prevalence of Salmonella, Yersinia, Aeromonas, Campylobacter, and Cold-Growing *Escherichia coli* on Freshly Dressed Lamb Carcasses. *Journal of Food Protection.* 58 (11), 1183-1185

12- Urdahl, A.M., Beutin, L., Skjerve, E., Wasteson, Y. (2002) Serotypes and virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Norwegian sheep. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (6):1026-33.

www.SID.ir