

میزان آلودگی گوشت گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه اصفهان به اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

دکتر محمدرضا جعفریان صدیق^۱، دکتر ابراهیم رحیمی^{۲*}، دکتر عباس دوستی^۴

^۱دانش آموخته دامپزشکی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۲عضو باشگاه پژوهشگران جوان - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۳گروه بهداشت مواد غذایی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۴مرکز 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: اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ به عنوان یک عامل اسهال، کولیت خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولیتیک در سراسر جهان شناخته شده است. گوشت آلوده به مدفوع حیوانی احتمالاً منبع اصلی عفونت اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ می باشد. این مطالعه با هدف بررسی میزان اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ در نمونه های گوشت گوسفند در اصفهان با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرز (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 تریتون سوی حاوی مکمل نوویوسین (TSB-n) به عنوان یک محیط غنی کننده و سپس محیط مک کانکی آگار سوربیتول دار حاوی مکمل سفکسیم و تلوئوریت پتاسیم (CT-SMAC) به عنوان یک محیط انتخابی کشت داده شد. کلنی های مشکوک اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ جدا شده از روش های باکتریولوژی به وسیله آزمون زنجیره ای پلیمرز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس آزمون کشت به ترتیب ۴۳ (۲۹/۱٪) و ۱۰ (۶/۸٪) نمونه از نظر اشرشیا کلی و اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ مثبت بود. اما تنها ۵ نمونه از اشرشیا کلی های سوربیتول منفی در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز به عنوان اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ تشخیص داده شدند. شیوع فصلی اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ در نمونه های 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 می تواند به عنوان یک مخزن بالقوه برای اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ مطرح باشد و گوشت گوسفند ممکن است به عنوان یک حامل در انتقال این پاتوژن به انسان عمل کند.

واژه های کلیدی: اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇، گوشت گوسفند، واکنش زنجیره ای پلیمرز.

مقدمه:

سگ، گربه، بوقلمون، جوجه و غاز نیز به عنوان مخازن این باکتری گزارش شده اند (۳، ۶).

اشرشیا کلی به عنوان یکی از مهمترین باکتری ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی نقش حائز اهمیتی را در بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی بر عهده دارد.

اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ مهمترین سروتپ در

اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری های منتقل شونده به وسیله مواد غذایی از جمله گوشت، فرآورده های گوشتی، فرآورده های 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،

* نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه- دانشگاه آزاد اسلامی- دانشکده دامپزشکی- گروه بهداشت مواد غذایی-تلفن: ۰۹۱۳۳۲۷۸۳۳۷

گلوکوروئیداز است که بیشتر انواع اشرشیا کلی قادر به انجام دادن آن می‌باشند. از این جهت با ساختن محیط‌های انتخابی نظیر سوربیتول مکانکی آگار، 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 O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ در اصفهان انجام شده است (۲۴) اما مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی لاشه گوسفندان به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ در اصفهان می‌باشد. 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 O₁₅₇:H₇ مورد آزمایش قرار گرفتند. تمام نمونه‌ها از عضلات سطحی گردن لاشه گوسفندان

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 می‌تواند 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 (۸-۱۱، ۴، ۱). 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 O₁₅₇:H₇ 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 می‌شود و برخی از محققین نقش گوسفند را به عنوان مخزن اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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، ۷/۱-۰/۷۷ و ۴ درصد گزارش شده است. لذا گوشت گاو و گوسفند را به عنوان مهمترین مخازن اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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.

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 میکرو لیتر بافر PCR با غلظت ۱۰X، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۲۰۰ میکرون مولار dNTP، ۲ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq، ۱ میکروگرم DNA از هر نمونه بود. سپس از افزودن اجزای PCR در حجم های فوق لوله ها در داخل دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار داده شدند و برنامه حرارتی به صورت زیر تنظیم شد: یک سیکل ۹۴ C° برای ۶ دقیقه، ۳۴ سیکل ۹۴ C° برای ۱ دقیقه، ۵۸ C° برای ۱ دقیقه، ۷۲ C° برای ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ C° 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 O₁₅₇:H₇ 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 (χ²) تجزیه و تحلیل گردیدند. سطح معنادار برای تحلیل آماری P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

کشتار شده در پایان مرحله کشتار در شرایط استریل گرفته شدند. تعداد نمونه های 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 اشرشیا کلی و اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇:

جهت جستجوی اشرشیا کلی و اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇، ۱۰ گرم از هر نمونه به صورت هموژن شده به ۹۰ میلی لیتر آبگوشت تریپتون سوی (TSB) (مرک آلمان) حاوی مکمل نوویوسین (۲۰ mg/l) اضافه شد و برای ۲۴-۱۸ ساعت در گرم خانه C° ۳۷ انکوبه شدند. در ادامه ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه غنی شده مورد نظر در محیط ائوزین متیلن بولو و مک کانگی سوربیتول دار (SMA) (مرک آلمان) حاوی مکمل سفکسیم و تلتوریت پتاسیم کشت و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه C° ۳۷ انکوبه شدند. جهت تأیید تشخیص پرگنه های مشکوک اشرشیا کلی از کشت بر روی محیط تریپل شوگر آبیرون (TSI) و آزمون آیم ویک (IMViC) استفاده شد (۱۶). همچنین پرگنه های سوربیتول منفی جهت تأیید تشخیص اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇ به وسیله PCR با استفاده از دو پرایمر مخصوص تشخیص ژن های O₁₅₇ و H₇ (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

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای ژن های O₁₅₇ و H₇ جهت تشخیص اشرشیا کلی O₁₅₇:H₇

| ژن | سکانس پرایمر | طول محصول (bp) | رفرانس |
|----------------------|--|----------------|--------|
| O ₁₅₇ | F: 5'CGGACATCCATGTGATATGG3' R: 5'TTGCCTATGTACAGCTAATCC3' | ۲۵۹ | ۲۵ |
| (fiC) H ₇ | F: 5'GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC3' R: 5'CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC3' | ۶۲۵ | ۲۶ |

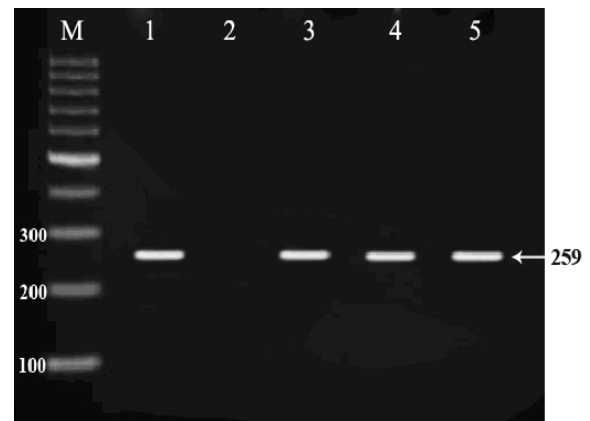
یافته‌ها:

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 سوریتول به عنوان سروتیپ مشکوک به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ شناسایی شدند. در ادامه سوش‌های سوریتول منفی جهت تأیید تشخیص اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ بوده است و در ۵ مورد اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ تأیید نشد (تصویر شماره ۱ و ۲).

میزان وقوع آلودگی لاشه‌های گوسفند به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ در فصول مختلف سال مشاهده نشد.



تصویر شماره ۲: نتایج PCR ژن H7 نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.
M: مارکر ۱ kb، ۱: کنترل مثبت، ۲: کنترل منفی، ۳ و ۵: نمونه‌های مثبت اشرشیاکلی H₇، ۴: نمونه منفی



تصویر شماره ۱: نتایج PCR ژن O₁₅₇ نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.
M: مارکر ۱۰۰۰ bp، ۱: کنترل مثبت، ۲: کنترل منفی، ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت اشرشیاکلی O₁₅₇

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 سوریتول | | آلوده به اشرشیاکلی کلی O ₁₅₇ :H ₇ بر اساس آزمون PCR | |
|---------|-------------|------------------------------|------|---|------|---|------|
| | | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد |
| بهار | ۳۱ | ۱۴ | ۴۵/۲ | ۴ | ۱۲/۹ | ۳ | ۹/۷ |
| تابستان | ۳۰ | ۳ | ۱۰ | ۲ | ۶/۶ | ۲ | ۶/۶ |
| پاییز | ۴۲ | ۸ | ۱۹/۱ | ۱ | ۲/۴ | ۰ | ۰ |
| زمستان | ۴۵ | ۱۸ | ۴۰/۰ | ۳ | ۶/۷ | ۰ | ۰ |
| مجموع | ۱۴۸ | ۴۳ | ۲۹/۱ | ۱۰ | ۶/۸ | ۵ | ۳/۴ |

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

بحث:

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 O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ 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 اساس آزمون PCR تنها نمونه‌های اخذ شده در فصول بهار و تابستان به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ آلوده بودند. Bryane و همکاران (۱۳)، Jo و همکاران (۶)، Elder و همکاران (۱۴) و Chapman و همکاران (۱۵) با استفاده از روش‌های کشت سرولوژیک و PCR اختلاف فصلی را در جداسازی اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ شناسایی شدند، در حالی که بررسی نمونه‌های سوربیتول منفی جهت تأیید تشخیص اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ با استفاده از روش PCR نشان داد از ۱۰ سوش بررسی شده، تنها ۵ مورد اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ بوده است و در ۵ مورد اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ تأیید نشد. نتایج این بخش اهمیت روش‌های مولکولی را در تشخیص این پاتوژن نشان می‌دهد. علاوه بر آن با توجه به هزینه تمام شده کمتر و سرعت بالای روش PCR این روش به عنوان روش ارجح در جداسازی اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ از مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

Dontorou و همکاران در یونان با استفاده از

بر اساس نتایج این مطالعه میزان شیوع آلودگی گوشت گوسفند بر اساس آزمون PCR ۳/۴ درصد می‌باشد. شکر فروش 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 O₁₅₇:H₇ 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 O₁₅₇:H₇ را به روش کشت به ترتیب ۴۳ و ۰/۵ درصد گزارش نموده‌اند (۱۹). اما میزان آلودگی نمونه‌ها به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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). Dolye و Schoeni در آمریکا به روش hydrophobic grid membrane filter-immunoblot نشان دادند از ۲۰۵ نمونه گوشت گوسفند ۴ نمونه (۱/۵ درصد) آلوده به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ بوده 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 O₁₅₇:H₇ 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 روش‌های تشخیصی مولکولی و ایمنی‌شناسی، میزان آلودگی گوشت گوسفند را به این پاتوژن ۷/۱ درصد نشان داده‌اند (۲۱). مطالعه‌ای از

گوشت گاو به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ در اصفهان انجام شده است (۲۴). اما مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی لاشه گوسفندان به اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ 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 می تواند 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 می رسد و مطالعات کامل تر در سایر مناطق کشور پیشنهاد می گردد. 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 می دارد.

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 مطالعه ای 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 می دهد که به ترتیب از ۲/۲ درصد و ۷/۴ درصد از نمونه های مدفوع گوسفند اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ جداسازی شده است. علاوه بر آن مطالعه ای در آمریکا به روش کشت و PCR حاکی از آن است که بیش از ۳۱ درصد نمونه های مدفوع جمع آوری شده از گوسفندان حامل اشرشیاکلی O₁₅₇ بوده است (۳۱). این نتایج نشان می دهد که آلودگی مدفوعی لاشه گوسفندان در طول پروسه کشتار از دلایل مهم آلودگی به این پاتوژن می باشد. Gun و همکاران به روش ایمنو- مغناطیس، کشت و سرولوژی نیز ارتباط معنی داری را بین شیوع اشرشیاکلی O₁₅₇:H₇ را در مدفوع و آلودگی لاشه ها گزارش نموده اند (۳۲).

نتیجه گیری:

اگرچه مطالعات مشابه در خصوص آلودگی

منابع:

- 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.
- Hiko A, Asrat D, Zewde G. Occurrence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in retail raw meat products in Ethiopia. J Infect Dev Countries. 2008; 2: 389-93.
- Kenneth J, Ryan MD, Cray MD. Sherrie's medical microbiology. 4th ed. London: Mc Grow Hill; 2004. p: 354-7.
- Murphy BP, Murphy M, Buckley JF, Gilroy D, Rowe MT, McCleery D, et al. In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O₁₅₇ surveillance of milk production holdings. Int J Hyg Environ Health. 2005; 208: 407-13.
- Varela-Hernández JJ, Cabrera-Díaz E, Cardona-López MA, Ibarra-Velázquez LM, Rangel-Villalobos H, Castillo A, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ and non- O₁₅₇ from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. Int J Food Microbiol. 2007; 113: 237-41.

6. Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, et al. *Prevalence and characteristics of Escherichia coli* O₁₅₇ 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* O₁₅₇. Kinshasa. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 968.
8. Olorunshola ID, Smith SI, Coker AO. Prevalence of EHEC O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ and other intestinal pathogens in patients with diarrhoeal disease. *Eur J Epidemiol.* 2001; 17: 97-9.
10. Çadırcı O, Sırken B, Inat G, Kevenk TO. The prevalence of *Escherichia coli* O₁₅₇ and O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇ 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* O₁₅₇ 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* O₁₅₇ 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 O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇ and O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* (O₁₅₇:H₇) isolated from of urinary and stool specimens by multiplex-PCR. *Lorestan Univ Med Sci.* 2006; 8: 21-8.] Persian

24. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. The prevalence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇, *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 rfbO₁₅₇. 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 H₇ 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* O₁₅₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇: H₇ in sheep meats using cultural and PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011 June, July; 13(2): 61-68.]Persian

Received: 6/March/2010

Revised: 14/June/2010 Accepted: 18/Aug/2010

Isolation of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in sheep meats using cultural and PCR method

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

Background and aim: *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ is now recognized as an important cause of diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome worldwide. Meat contaminated with animal feces is probably the major source of the *E. coli* O₁₅₇:H₇. In this study, we investigated the prevalence of *E. coli* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ using the standard cultural and polymerase chain reaction (PCR) methods. Bacteriological examinations were performed by using Tryptone 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* O₁₅₇:H₇, 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* O₁₅₇:H₇, respectively. Only 5 sorbitol negative *E. coli* strains were identified as *E. coli* O₁₅₇:H₇, using polymerase chain reaction. The seasonal prevalence of *E. coli* O₁₅₇:H₇ 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* O₁₅₇:H₇ and sheep meat may serve as a vehicle for the pathogen transmission to human.

Keywords: *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇, Sheep meat, PCR.

Cite this article as: Jafareyan-Sedigh MR, Rahimi E, Doosti A. [Isolation of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in sheep meats using cultural and PCR method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011 June, July; 13(2): 61-68.] Persian

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