مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۳ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۸، ۴۱۸-۴۱۱

مقاله پژوهشی

شناسایی و تشخیص *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* در شیر گاوهای شهرستان بروجرد با روش مولکولی

محمد مهدی سلطان دلال[۱]، رضا زندیه مرادی[۲]، رامین مظاهری نژاد فرد[۳]، زهرا رجبی[۴]

دریافت مقاله : اردیبهشت ۱۳۹۸
پذیرش مقاله : شهریور ۱۳۹۸

* نویسنده مسئول :
محمد مهدی سلطان دلال:
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :
soltanda@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: انتقال باکتری‌های بیماری‌زا از حیوان به انسان به‌صورت مستقیم و یا از طریق مصرف گوشت و شیر و یا فراورده‌های آنها امکان‌پذیر است. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی و تشخیص *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* در شیر گاوهای شهرستان بروجرد با روش مولکولی بوده است.

روش بررسی: در یک مطالعه‌ی توصیفی و مقطعی، تعداد ۱۵۰ نمونه شیر در مدت ٤ ماه از ابتدای آبان ماه ۱۳۹۵ تا پایان بهمن ماه همان سال از گاوداری‌های موجود در شهرستان بروجرد و حومه نمونه‌برداری شد. نمونه‌های شیر پس از انجام مراحل غنی سازی، کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی EMB آگار و تست‌های افتراقی IMVIC، و کشت خطی بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار، جهت شناسایی جدایه‌های سوربیتول منفی، و تاییدشان توسط تست سرولوژی و شناسایی ژن *eaeA* به‌وسیله تست PCR بررسی گردیدند.

یافته ها: از مجموع ۳۱ ایزوله *اشریشیاکلی* جداشده، تعداد ٦ ایزوله به‌عنوان سوربیتول منفی جداسازی شد(۱۹/٤٪). از مجموع ٦ ایزوله، تعداد ۵ ایزوله(۱٦/۱٪) بر روی محیط کروم آگار از نظر فعالیت بتاگالاکتوزیدازی منفی (MUG^-) شناخته شدند. هر ۵ ایزوله در تست سرولوژیک با آنتی سرم O157:H7 تایید گردید و در بررسی مولکولی صورت گرفته دارای ژن *eaeA* بودند.

نتیجه گیری: شیوع ۱٦/۱٪ *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* در شیرخام به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد اسهال در جامعه می‌تواند از اهمیت زیادی برخوردار باشد. لذا طغیان‌های ناشی از مصرف این ماده غذایی در مناطقی از کشور که به لحاظ سنتی هنوز مصرف شیرخام را در سبدغذایی قرار می‌دهند، می‌تواند نتایج باارزشی در جهت پیشگیری از موارد بیماری‌های اسهالی به‌دست آورد.

واژه های کلیدی : *اشریشیاکلی انتروهموراژیک*، شیر، دامداری، ژن *eaeA*

۱ استاد گروه پاتوبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲ کارشناس ارشد میکروب‌شناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳ استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

مقدمه

شیر خام تولید شده در دامداری‌ها در معرض آلودگی‌های مختلفی قرار دارد که از آن جمله می‌توان به آلاینده‌های شیمیایی مانند آنتی بیوتیک‌ها، ضدعفونی کننده‌ها، نیتراتها و نیتریت‌ها، حشره کش‌ها و فلزات سمی اشاره نمود(۱).

منابع و یا عوامل بیماری‌زای شیر ممکن است از دام شیرده یا از کارگران و ابزار و یا ظروف شیر در مراحل مختلف دوشش، جمع آوری، حمل و محیط آلوده تا فرآوری باشد. بنابراین میکروارگانیسم‌ها یا عواملی که موجب انتقال بیماری از شیر می‌شوند از دو جنبه مطالعه می‌شوند.

الف- عوامل بیماری‌زایی که از طریق دام به شیر وارد می‌شوند که خود ممکن است اغلب سبب بیماری در دام شده باشند و به آلوده کننده‌های ناشی از شیر معروف هستند(۳و۲).

ب- عوامل بیماری‌زایی که از طریق محیط و کارگران و ابزار از تولید تا فرآوری وارد شیر می‌شوند و عوامل آلوده کننده‌ی غیر شیرزاد گفته می‌شوند(۵و٤).

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) مانند اشریشیاکلی O157H7 از مهم ترین پاتوژن‌های روده ای محسوب می‌گردند و عوارضی مانند کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک و به‌ویژه نارسایی حاد کلیوی را ایجاد می‌کنند. این سویه می‌تواند از طریق مصرف آب و مواد غذایی آلوده، و از فردی به فرد دیگر از طریق مدفوعی دهانی منتقل شود(٦).

آلودگی موادغذایی مختلف از جمله گوشت، شیر خام و غیرپاستوریزه، سبزی‌ها از جمله اسفناج، سیدر و دیگر مواد غذایی با این سویه‌های پاتوژن سالانه خسارات بهداشتی قابل‌ملاحظه‌ای را به بار می‌آورد. در این بین شیر خام به‌عنوان یک ماده‌ی حیاتی و پرمصرف از اهمیت ویژه ای برخوردار است. شیر به‌عنوان اولین ماده غذایی که توسط پستانداران و از جمله انسان مصرف می‌شود، در انتقال این عوامل میکروبی نقش بسزایی را می‌تواند ایفا کند(۱۰-۷). مهمترین خصوصیت ویرولانس این ارگانیسم مربوط به حضور یک یا چند فاژ کدکننده‌ی وروتوکسین‌های VT1 و VT2 می‌باشد(۱۱). تولید توکسین توسط ارگانیسم موجب اثرات موضعی و سیستماتیک می‌گردد. اثرات موضعی روده ای موجب توسعه‌ی اسهال خونی می‌شود به‌گونه ای که توکسین وارد سلولهای روده ای شده و در آنجا موجب مهار سنتز پروتئین می‌شود و به این ترتیب موجب فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده ای در سلول می‌گردد. بیان یک یا هردوی ژنهای وروتوکسین جزو ویژگی‌های عمده‌ی سویه‌های EHEC محسوب می‌شود. با وجود این، پاتوژنز این سویه‌ها یک فرایند چندمرحله‌ای و شامل تعامل بین چندین فاکتور میزبان و باکتری می‌باشد. دوز بیماری‌زایی EHEC بسیار پایین است و در حدود 1-100 CFU موجب بیماری‌زایی می‌شود که این تعداد باکتری در مقایسه با دیگر پاتوژن‌های روده ای پایین‌تر است(۱۲). توانایی اتصال باکتری به سلولهای اپیتلیال روده و کلونیزاسیون در این ناحیه از مهم‌ترین شاخصه‌های بیماری‌زایی این باکتری به‌شمار می‌رود.

برخی از محققان نشان دادند که اشریشیاکلی و پاتوتایپ‌های آن یکی از عوامل مهم آلودگی در شیر و فراورده های آن می‌باشد. با در نظر گرفتن اینکه ژن ***eaeA*** در هردو پاتوتایپ *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* و *اشریشیاکلی انتروپاتوژن* مشترک است، می‌تواند جهت شناسایی و تشخیص *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* پس از روش‌های فنوتیپی با تایید تست سرولوژیک با آنتی سرم O157:H7، به شناسایی ژن ***eaeA*** به‌وسیله‌ی تست PCR بررسی گردد. در این حالت جدایه ژن ***eaeA*** مثبت به پاتوتایپ انتروهموراژیک تعلق خواهد داشت(١٤و١٣).

با توجه به مطالب فوق، هدف از این تحقیق شناسایی و تشخیص *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* در شیر گاوهای شهرستان بروجرد با روش مولکولی بوده است.

روش بررسی

تهیه نمونه: در این مطالعه‌ی توصیفی و مقطعی، تعداد ۱۵۰ نمونه شیر نمونه گاو خام(حداقل ۲۵۰ میلی لیتر) از مناطق شهری و روستایی بروجرد، ایران، در آبان و آذر سال ۱۳۹٤ جمع آوری شد. پرسش‌نامه برای هر نمونه از جمله اطلاعات حیوان و تغذیه تهیه شد. نمونه‌ها به سرعت به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در شرایط سرد منتقل شدند.

جداسازی و شناسایی: جداسازی باکتری‌ها با استفاده از دستورالعمل WHO,FAO انجام شد(۱۵). به‌طور خلاصه، ۲۵ میلی لیتر از هر نمونه شیر به ۲۲۵ میلی لیتر از محیط Brain Heart Infusion (BHI)

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۱ میلی لیتر از مخلوط قبل از غنی سازی به ۲۲۵ میلی لیتر محیط تریپتیکیس سویا براث (TSB) حاوی ۲۰ میلی لیتر نوبایوسین اضافه شد و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس، بر روی ائوزین متیلن آبی (EMB) آگار کشت داده و در دمای ۳۷-۳۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کلنی‌هایی با جلای فلزی بر روی محیط Sorbitol-MacConkey (SMAC) agar کشت داده شدند و سپس با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، از جمله اکسیداز، تست تریپل شوگرآیرون (TSI)، SIM، اندول، متیل رد، Voges-Proskauer، سیمون سیترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز (Merck,Germany) آزمایش شدند(۱۳). علاوه بر این، جدایه‌های سوربیتول منفی در محیط کشت کروموژنیک (bioMérieux,France) برای تایید بیشتر و آزمایش‌های سرولوژی استفاده گردیدند (Mast.UK). ایزوله‌های E.coli پس از تایید، در TSB حاوی گلیسرول تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول ۱: دما و زمان مراحل مختلف PCR برای شناسایی *اشریشیاکلی انتروهموراژیک*

مرحله		زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتیگراد)
واسرشت		۱۸۰	۹۵
۳۵ چرخه	واسرشت	۳۰	۹۵
	اتصال پرایمر	۴۰	۵۶
	طویل سازی	۶۰	۷۲
طویل سازی نهایی		۳۰۰	۷۲

برای جداسازی DNA باکتری یک کلونی کشت شده در طول شب از هر جدایه در حجم µl ۲۰۰ آب مقطر استریل (DW) و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس، مخلوط به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰×g سانتریفوژ شد و مایع رویی در تست در PCR مورد استفاده قرارگرفت. برای آماده سازی PCR Master (۲۰ میکرولیتر) برای هر نمونه، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (Pishgam) (کل مقدار ۱۰ پرمول) با ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix در میکرو تیوب استریل مخلوط شد. سپس، ۵ میلی لیتر از آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده به مخلوط اضافه شد و با استفاده از ترموسایکلر (VWR، آلمان) انجام شد. ترموسایکلر طبق جدول ۱ برنامه ریزی شد.

در این تحقیق از *E.coli ATCC 7852* حاوی ژن *eaeA* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۲: پرایمر جهت انجام آزمایش PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی 3'-5'	اندازه	منبع
eaeA	F:ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG R:GCCTTCATCATTTCGCTTTC	۲۴۸	Mercado و همکاران(۲۰۱۱)

برای تأیید جدایه‌های اشریشیاکلی انتروهموراژیک با استفاده از روش PCR از ژن *eaeA* طبق جدول ۲ استفاده گردید.

- **تحلیل آماری**

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز کااسکوئر و نرم افزار SPSS (USA ،v.14 (IBM Analytics انجام شد. مقادیر آماری $P\leq ۰/۰۵$ به‌عنوان معنی‌دار گزارش شده است.

- **واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR)**

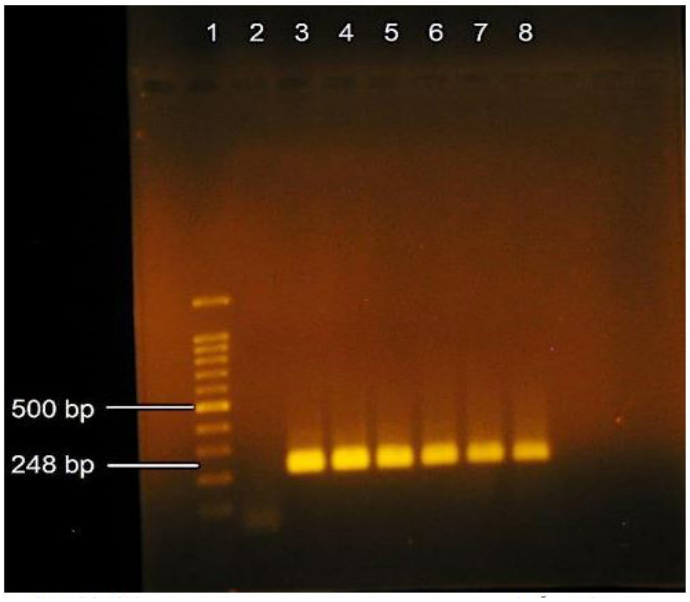
PCR بر اساس یک پروتکل که قبلا توسط Mercado و همکاران(۱۶) در سال ۲۰۱۱ معرفی شده بود، انجام شد. DNA های ژنومی E.coli با استفاده از پرایمرهای خاص بر اساس جدول ۱ تکثیر شدند.

یافته ها

مجموعا ۱۵۰ نمونه به‌روش استاندارد فنوتیپی بررسی گردید. تعداد ۴۲ ایزوله انتروباکتر(۲۸ درصد)، تعداد ۳۰ ایزوله سیتروباکتر(۲۰درصد)، تعداد ۴۷ ایزوله کلبسیلا(۳۱/۳۳ درصد) و تعداد ۳۱ ایزوله *اشریشیاکلی*

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

جداسازی شد(۲۰/٦ درصد). از مجموع ۳۱ ایزوله *اشریشیاکلی* جداشده، تعداد ٦ ایزوله از آن‌ها به‌عنوان سوربیتول منفی جداسازی شد. (۱۹/٤ درصد) از مجموع ٦ ایزوله سوربیتول منفی جداشده تعداد ۵ ایزوله بر روی محیط کروم آگار از نظر فعالیت بتاگالاکتوزیدازی منفی (MUG^-) شناخته شدند که در تست سرولوژیک با آنتی سرم O157:H7 این مسئله تایید شد. در بررسی مولکولی صورت گرفته هر ۵ ایزوله(۱٦/۱ درصد) دارای ژن *eaeA* بودند(شکل ۱).



شکل۱: الکتروفورز حاصل از PCR ژن آمپلیکون *eaeA* لاین ۱، ۱۰۰ bp لدر، لاین ۲ کنترل منفی، لاین ۳ E. coli ATCC 7852 کنترل مثبت، لاین‌های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ *eaeA* 248-bp نمونه‌های مثبت

بحث

در مطالعات متعدد از پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک پاتوژن انسانی یاد شده است و این عوامل همواره از نظر بهداشت عمومی مطرح می‌باشند. شناسایی فلور بیماری‌زا از فلور نرمال و غیربیماری‌زای این گروه از میکروارگانیسم‌ها، آسان نیست و همواره محدودیت‌هایی در روش تشخیص بالینی وجود دارد. در اغلب آزمایشگاه‌ها جهت شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و مولد اسهال *اشریشیاکلی* از آزمایش‌های فنوتیپی استفاده می‌شود، حال آنکه این‌گونه روش‌ها به تنهایی جوابگوی تشخیص هویت این پاتوتایپ‌ها نمی‌باشد(۱۸و۱۷). اسهال‌های عفونی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی در مناطق مختلف جهان مسئول تعداد قابل ملاحظه‌ای از موارد مرگ و میر به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد. سویه‌های ایجادکننده‌ی اسهال *اشریشیاکلی* در دسته‌های مختلفی قابل تقسیم بندی هستند که در این میان پاتوتیپ انتروهموراژیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(۲۰و۱۹).

یکی از موادغذایی که در انتقال این‌گونه عفونت‌ها نقش اساسی دارد، شیر و محصولات لبنی است. ازآنجایی‌که گاو به‌عنوان یک مخزن برای *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* مطرح است و باتوجه به اینکه این باکتری در گاوهای بالغ مشکلی ایجاد نمی‌کند و فقط ممکن است درگوساله‌ها ایجاد اسهال خفیف نماید، همواره خطر آلودگی شیر و انتقال این عوامل عفونی از شیر به مصرف کنندگان وجود دارد(۱۰و۳).

در این مطالعه با استفاده از روشهای پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی و کشت بر روی محیط‌های انتخابی ابتدا اقدام به جداسازی *اشریشیاکلی* از شیر خام شد. در این مرحله از کار از میان ۱۵۰ نمونه شیر مورد بررسی، تعداد ۳۱ ایزوله *اشریشیاکلی* شناسایی شد و سپس با استفاده از ۱ زوج پرایمر اختصاصی، *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* مورد شناسایی قرارگرفت. بررسی‌ها و مطالعات گسترده ای در کشورهای غربی بر روی EHEC صورت گرفته که به‌واسطه‌ی آن‌ها میزان شیوع EHEC در آن کشورها در میان دسته گاوها مشخص شده است(۲۱). در میان کشورهای آسیایی، ژاپن تحقیقات گسترده ای را بر روی شیوع EHEC در میان گاوها و محصولات غذایی به‌دست آمده از آنها انجام داده است(۷)، حال آنکه در منطقه خاورمیانه میزان این مطالعات به‌مراتب کمتراست. Virpari و همکاران در دانشگاه آناند هند با بررسی ۲۵۰ نمونه از شیر و محصولات شیر نظیر بستنی و پنیر میزان آلودگی *اشریشیاکلی* را ۳۲٪ گزارش نمودند. در این مطالعه میزان آلودگی شیر به‌طور مستقل ۵۲٪ گزارش گردید؛ همچنین ٦/۲۵٪ از ایزوله‌ها هر دو ژن stx1 و stx2 را داشتند، ۸/۷۵٪ از

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

نظر stx1، ۱۵٪ از نظر stx2، ۸/۷۵٪ از نظر *eaeA*، مثبت و هیچ نمونه‌ای از نظر ژن rfbO157 مثبت نبود(۱۳). Asmahan و همکاران با بررسی ۱۰۰ نمونه شیر خام در مناطق مختلف خارطوم میزان آلودگی *اشریشیاکلی* را ۶۳٪ گزارش نمودند. این آلودگی بیشتر به مناطق شمال خارطوم ربط داشت. در این پژوهش، *اشریشیاکلی* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شد(۲۲). Soomro و همکاران در سال ۲۰۰۲ در یک مطالعه در منطقه ماوا در پاکستان به بررسی ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۶۰ نمونه محصولات شیر پرداخته که نتایج نشان می‌دهد که ۵۷٪ نمونه‌های شیر خام و ۵۱/۶۶٪ نمونه‌های تولید شده از محصولات شیر آلوده به *E.Coli* بودند(۱۴). با بررسی مطالعات اشاره شده در بالا و مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از این تحقیقات با مطالعه‌ی حاضر مشاهده می‌شود که در مطالعه‌ی حاضر میزان جداسازی *اشریشیاکلی* از شیرخام ۲۰/۶ درصد می‌باشد که نسبت به مطالعات مورد اشاره، این میزان جداسازی پایین‌تر است که دلایل آن می‌تواند به فصل نمونه‌برداری مربوط باشد. چراکه نمونه‌برداری در مطالعه‌ی حاضر در فصل پاییز و شروع سرما در منطقه مورد نمونه‌برداری صورت گرفت. این مساله به‌خصوص باتوجه به این‌که مطالعات اشاره شده به‌صورت غالب در مناطقی گرم‌تر از محل مورد بررسی در مطالعه اخیر، انجام شده‌اند، رخ نمایی می‌کند.

بنیادیان و همکاران در یک مطالعه بر روی ۲۰۰ نمونه شیر خام تولیدی در استان چهار محال و بختیاری به‌منظور تعیین میزان آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی* O157H:7 با استفاده از محیط غنی‌کننده و محیط کشت اختصاصی و روش سرولوژی پرداختند. از ۲۰۰ نمونه شیر خام مورد آزمایش ۸۳ مورد مشکوک به سروتیپ O157H:7 شناسایی شد، که در نهایت ۹ مورد *اشریشیاکلی* O157 جدا گردید، که هیچ‌یک H7 نبودند(۲۳). نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با مطالعه ما از لحاظ جداسازی *اشریشیاکلی* O157، تعداد بیشتری را نشان می‌دهد ولی در مطالعه‌ی ما میزان شناسایی H7 با روش سرولوژی نسبت به این مطالعه افزایش دارد.

در مطالعه‌ی دیگری، بنیادیان و همکاران نشان دادند که از ۲۰۰ نمونه شیر غیرپاستوریزه و ۸۰ نمونه پنیر غیرپاستوریزه، ۳۸ جدایه باکتری *اشریشیاکلی* از نمونه‌های شیر غیرپاستوریزه و ۱۴ جدایه از نمونه‌های پنیر غیرپاستوریزه جدا گردید. جدایه‌های *E.coli* جدا شده از نظر وجود سروتیپ O157H:7 و ژن *eaeA* بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که از بین ۳۸ جدایه باکتری *E.coli* از نمونه‌های شیر غیرپاستوریزه، ۲ سروتیپ O157H:7 جدا گردید که هر دو دارای ژن *eaeA* بودند. از بین ۱۴ جدایه باکتری *E.coli* جدا شده از نمونه‌های پنیر غیرپاستوریزه، هیچ‌کدام دارای ژن مذکور نبودند و سروتیپ O157H:7 جدا نگردید(۲۴).

برخلاف انتظار که در بیماری‌های عفونی مشاهده می‌شود که میزان شیوع در مناطق شلوغ و پرجمعیت بیشتر است اما در دامداری‌های بزرگ، به علت رعایت نکات بهداشتی و ایمنی و تهیه علوفه و غذای مناسب، وجود تهویه مناسب، تهیه علوفه پروبیوتیک، واکسیناسیون دام، نظافت محل نگهداری دام، نظارت افراد متخصص و دامپزشکان، استفاده از شیردوشهای مکانیکی و حذف دخالت دست و شستشوی مداوم پستانهای گاو نسبت به گاوداری‌های سنتی و خانگی که حاوی طویله‌های مرطوب، سرپوشیده و غیراستاندارد بوده و دام‌ها به حال خود رها شده و چرای آزاد دارند، میزان آلودگی‌ها کمتراست(۴).

از محدودیتهای مطالعه، کافی نبودن منابع مالی جهت بررسی سایر پاتوژن‌های میکروبی در نمونه‌های مورد مطالعه بود.

نتیجه گیری

شیوع *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* سروتایپ O157:H7 در شیرخام می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد اسهال در جامعه مطرح باشد. ازاین‌رو بررسی طغیان‌های ناشی از مصرف این ماده‌غذایی در مناطقی از کشور که به لحاظ فرهنگی مصرف شیر خام را در سبدغذایی قرار می‌دهند، می‌تواند نتایج باارزشی در جهت پیشگیری از موارد بیماری‌های اسهالی به‌دست آورد. همچنین مطالعه گسترده‌تر برروی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی*(به تفکیک) در نمونه‌های غذایی و انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد این پاتوتایپ‌ها در جامعه، ارتباط میان این پاتوتایپ‌ها را با طغیان‌ها و عفونت‌های غذایی بهتر مشخص می‌کند.بنابراین پیشنهاد می‌گردد که در برنامه‌ریزی‌های پیشگیری از طغیان‌های‌غذایی به سروتایپ *اشریشیاکلی* O157:H7 و سایر پاتوتایپ‌های آن توجه خاصی معطوف گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی ۳۹۱۲۴ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق IR.TUMS.REC.1394.1623 بوده است. نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

منابع

1. Aytenfsu S, Mamo G & Kebede B. Review on chemical residues in milk and their public health concern in Ethiopia. Journal of Nutrition & Food Sciences 2016; 6(4): 1-11.

2. Parra-Flores J, Aguirre J, Juneja V, Jackson EE, Cruz-Córdova A, Silva-Sanchez J, et al. Virulence and antibiotic resistance profiles of Cronobacter sakazakii and Enterobacter spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico. Journal Frontiers in Microbiology 2018; 9(1): 2206.

3. Vasquez AK, Ganda EK, Capel MB, Eicker S, Virkler PD, Bicalho RC, et al. The microbiome of *Escherichia coli* and culture-negative nonsevere clinical mastitis: Characterization and associations with linear score and milk production. Journal of Dairy Science 2019; 102(1): 578-94.

4. Tsai K, Simiyu S, Mumma J, Aseyo RE, Cumming O, Dreibelbis R, et al. Enteric pathogen diversity in infant foods in low-income neighborhoods of Kisumu, Kenya. International Journal of Environmental Research and Public Health 2019; 16(3): e506.

5. Gradmann C. Robert Koch and the invention of the carrier state: Tropical medicine, veterinary infections and epidemiology around 1900. Journal Studies in History and Philosophy of Science 2010; 41(3): 232-40.

6. Gossman W, Wasey A & Salen P. *Escherichia Coli* (E Coli 0157 H7). Available at: https://europepmc.org/article/NBK/NBK507845. 2019.

7. Wang L, Zhang S, Zheng D, Fujihara S, Wakabayashi A, Okahata K, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 2017; 70(4): 464-9.

8. Singh G, Vajpayee P, Ram S & Shanker R. Environmental reservoirs for enterotoxigenic *Escherichia coli* in south Asian Gangetic riverine system. Environmental Science & Technology 2010; 44(16): 6475-80.

9. Vojdani JD, Beuchat LR & Tauxe RV. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. Journal of Food Protection 2008; 71(2): 356-64.

10. Bernini V, Sgarbi E, Bove CG, Gatti M & Neviani E. A polyphasic approach to detect enterotoxigenic Staphylococcus aureus and diarrheagenic *Escherichia coli* in raw milk Italian cheeses by multiplex PCR. Journal of Food Protection 2010; 73(12): 2281-4.

11. Wang LYR, Jokinen CC, Laing CR, Johnson RP, Ziebell K & Gannon VPJ. Multi-Year Persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a closed Canadian beef herd: A Cohort Study. Frontiers in Microbiology 2018; 9(1): 2040.

12. Nandi RDS, Campos AC, Puño-Sarmiento JJ, Maluta RP, Rocha SPD, Kobayashi RKT, et al. Detection of stx2 and elt genes in bovine milk by using a multiplex PCR. Journal of Dairy Science 2017; 100(10): 7897-900.

13. Virpari PK, Nayak JB, Brahmbhatt MN & Thaker HC. Study on isolation, molecular detection of virulence gene and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from milk and milk products. Veterinary World 2013; 6(8): 541-5.

14. Kehl SC. role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40(8): 2711-5.

15. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: Attribution, characterization, and monitoring: report. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272871/9789241514279-eng.pdf. 2018.

16. Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, et al. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology 2011; 49(4): 1376-81.

17. Paneto B, Schocken-Iturrino R, Macedo C, Santo E & Marin J. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinariae Zootecnia 2007; 59(2): 508-12.

18. Chantangsi C, Lynn DH, Brandl MT, Cole JC, Hetrick N & Ikonomi P. Barcoding ciliates: A comprehensive study of 75 isolates of the genus Tetrahymena. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007; 57(Pt 10): 2412-25.

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

19. Sire JM, Garin B, Chartier L, Fall NK, Tall A, Seck A, et al. Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal. Paediatrics and International Child Health 2013; 33(3): 139-44.

20. Trainor E, Iturriza-Gómara M, Ngwira B & Cunliffe N. Detection of enterotoxigenic E. Detection of enterotoxigenic *E. Coli* in hospitalised children with and without diarrhoea in Blantyre, Malawi. Paediatrics and International Child Health 2016; 36(2): 102-5.

21. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Lopez C, Justel P, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiology 2007; 7(1): 13.

22. Asmahan AA & Warda SA. Incidence of *Escherichia coli* in raw cow's milk in Khartoum state. British Journal of Dairy Sciences 2011; 2(1): 23-6.

23. Bonyadian M, Moshtaghi H & Akhavan Taheri M. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. Veterinary Research Forum 2014; 5(1): 29-34.

24. Bonyadian M, Zahraei Salehi T , Mahzounieh M R & Akhavan Taheri F. Virulance genes of verotoxigenic *E.coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheese. Journal of Veterinary Research Shahrekord University 2011; 66(3): 223-8[Article in Persian].

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]

Identification and Diagnosis of Enterohemorrhagic *E. Coli* by Molecular Method in Boroujerd City Cows' Milk

Mohammad Mehdi Soltan Dallal[1] (Ph.D.) - Reza Zandieh Moradi[2] (M.S.) - Ramin Mazaheri Nezhad Fard[3] (Ph.D.) - Zahra Rajabi[4] (M.S.)

1 Professor, Department of Pathobiology, Food Microbiology Research Center, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Master of Science in Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Assistant Professor, Department of Pathobiology, Food Microbiology Research Center, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Master of Science in Microbiology, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received: Apr 2019

Accepted: Aug 2019

Background and Aim: Transmission of pathogenic bacteria from animals to humans is possible directly or through the consumption of meat and milk or their products. The aim of this study was to identify and diagnose *Enterohemorrhagic Escherichia coli(E. coli)* by molecular method in cows' milk in Boroujerd city.

Materials and Methods: In a descriptive cross-sectional study, 150 milk samples were sampled from dairy farms in Boroujerd and its suburbs in four months from the beginning of November 2016 until the end of February 2017. After enrichment, culturing and biochemical tests on EMB agar and IMVIC differential tests, and doing linear culture on Sorbitol McConkey Agar medium to identify negative sorbitol isolates and confirm them by serological testing and eaeA gene identification, milk samples were analyzed by PCR test.

Results: Out of 31 isolates of *Escherichia coli* species, 6 were isolated as negative sorbitol(19.4%). Of these six isolates, five(16.1%) were identified as negative beta-galactosidase(MUG^-) on chrome agar medium. In serological test, all 5 isolates were confirmed by O157: H7 antiserum antibody; besides, in molecular analysis, they had eaeA gene.

Conclusion: The outbreak of 16.1% of enterohemorrhagic *E. coli* in milk can be of great importance as one of the factors causing diarrhea in the community. Therefore, the outbreaks of consumption of this foodstuff in areas of the country that traditionally still put raw milk in food basket can provide valuable results for the prevention of diarrheal diseases.

Keywords: *Enterohemorrhagic Escherichia Coli*, Milk, Animal Husbandry, eaeA Gene

*** Corresponding Authors:**
Soltan Dallal MM
Email :
soltanda@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from payavard.tums.ac.ir on 2024-05-22]