

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

چکیده

زمینه و هدف: انتقال باکتری‌های بیماری‌زا از حیوان به انسان به‌صورت مستقیم و یا از طریق مصرف گوشت و شیر و یا فرآورده‌های 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 ۴ 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 غنی‌سازی، 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.

یافته‌ها: از مجموع ۳۱ ایزوله اشریشیاکلی جداشده، تعداد ۶ ایزوله به‌عنوان سوربیتول منفی جداسازی شد (۱۹/۴٪). از مجموع ۶ ایزوله، تعداد ۵ ایزوله (۱۶/۱٪) 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.

نتیجه‌گیری: شیوع ۱۶/۱٪ 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 سبذ غذایی قرار می‌دهند، می‌تواند نتایج باارزشی در جهت پیشگیری از موارد بیماری‌های اسهالی به‌دست آورد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی انتروهموراژیک، شیر، دامداری، ژن *eaeA*

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

۱ استاد گروه پاتوبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲ کارشناس ارشد میکروبیوشناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳ استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

شیر خام تولید شده در دامداری‌ها در معرض آلودگی‌های مختلفی قرار دارد که از آن جمله می‌توان به آلاینده‌های شیمیایی مانند آنتی بیوتیک‌ها، ضد عفونی کننده‌ها، نیتراها و نیتريت‌ها، 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 (۳ و ۲).

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 (۵ و ۴).

اشریشیاکلی اتروهموراژیک (*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 (۶).

آلودگی مواد غذایی مختلف از جمله گوشت، شیر خام و غیرپاستوریزه، سبزی‌ها از جمله اسفناج، سیدر و دیگر مواد غذایی با این سویه‌های پاتوژن سالانه خسارات بهداشتی قابل ملاحظه‌ای 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 ویرولانسی این ارگانیسم مربوط به حضور یک یا چند فاز 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 هر دو ی ژنهای وروتوکسین جزو ویژگی‌های عمده‌ی سویه‌های EHEC محسوب می‌شود. با وجود این، پاتوژن 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 پایین تر 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 اتروهموراژیک و اشریشیاکلی اتروپاتوژن مشترک است، می‌تواند جهت شناسایی و تشخیص اشریشیاکلی اتروهموراژیک 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 اتروهموراژیک تعلق خواهد داشت (۱۴ و ۱۳).

با توجه به مطالب فوق، هدف از این تحقیق شناسایی و تشخیص اشریشیاکلی اتروهموراژیک 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 ۱۳۹۴ 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 (BHI) Brain Heart Infusion

شدند (۱۳). علاوه بر این، جدایه‌های سوربیتول منفی در محیط کشت کروموزنیک (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.

• واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR)

PCR بر اساس یک پروتکل که قبلاً 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.

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

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

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* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۲: پرایمر جهت انجام آزمایش PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی 3'-5'	اندازه	منبع
<i>eaeA</i>	F:ATGCTTAGTGCTGGTTAGG R:GCCTTCATCATTTTCGCTTTC	۲۴۸	Mercado و همکاران (۲۰۱۱)

روش PCR از ژن *eaeA* طبق جدول ۲ استفاده گردید.

یافته ها

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

اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۱ میلی لیتر از مخلوط قبل از غنی سازی به ۲۲۵ میلی لیتر محیط تریپتیکس سویا برات (TSB) حاوی ۲۰ میلی لیتر نوبایوسین اضافه شد و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس، بر روی اتوزین متیلن آبی (EMB) آگار کشت داده و در دمای ۳۷-۳۵ درجه 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 شوگر آبیرون (TSI)، SIM، اندول، متیل رد، Voges-Proskauer، سیمون سترات، اوره و لیزین دکربوکسیلاز (Merck, Germany) آزمایش

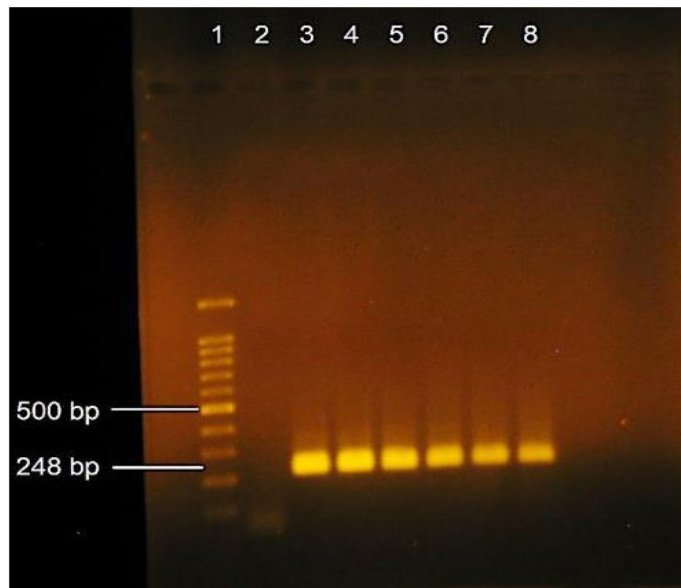
برای جداسازی DNA باکتری یک کلونی کشت شده در طول شب از هر جدایه در حجم ۲۰۰ μl آب مقطر استریل (DW) و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس، مخلوط به مدت ۵ دقیقه با $10000 \times g$ سانتریفوژ شد و مایع رویی در تست در PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای آماده سازی PCR Master (۲۰ میکرولیتر) برای هر نمونه، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (Pishgam) (کل مقدار ۱۰

برای تایید جدایه‌های اشریشیاکلی انتروهمورازیک با استفاده از

• تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز کاسکوئر و نرم افزار SPSS (USA, v.14 IBM Analytics) انجام شد. مقادیر آماری $P \leq 0.05$ به عنوان معنی دار گزارش شده است.

شدند که در تست سرولوژیک با آنتی سرم O157:H7 این مسئله تایید شد. در بررسی مولکولی صورت گرفته هر ۵ ایزوله (۱۶/۱ درصد) دارای ژن *eaeA* بودند (شکل ۱).



شکل ۱: 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، ۸ و *eaeA* 248-bp نمونه‌های مثبت

گاوهای بالغ مشکلی ایجاد نمی‌کند و فقط ممکن است در گوساله‌ها ایجاد اسهال خفیف نماید، همواره خطر آلودگی شیر و انتقال این عوامل عفونی از شیر به مصرف کنندگان وجود دارد (۳ و ۱۰).

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 اتره‌هموراژیک مورد شناسایی قرار گرفت. بررسی‌ها و مطالعات گسترده‌ای در کشورهای غربی بر روی EHEC صورت گرفته که به واسطه‌ی آن‌ها میزان شیوع EHEC در آن کشورها در میان دسته گاوها مشخص شده است (۲۱). در میان کشورهای آسیایی، ژاپن تحقیقات گسترده‌ای را بر روی شیوع EHEC در میان گاوها و محصولات غذایی به دست آمده از آنها انجام داده است (۷)، حال آنکه در منطقه خاورمیانه میزان این مطالعات به مراتب کمتر است. 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 به طور مستقل ۵۲٪ گزارش گردید؛ همچنین ۲۵٪ از ایزوله‌ها هر دو ژن *stx1* و *stx2* را داشتند، ۸/۷۵٪ از

بحث

در مطالعات متعدد از پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی به عنوان 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 این گونه روش‌ها به تنهایی جوابگوی تشخیص هویت این پاتوتایپ‌ها نمی‌باشد (۱۷ و ۱۸). اسهال‌های عفونی به عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی در مناطق مختلف جهان مسئول تعداد قابل ملاحظه‌ای از موارد مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد. سویه‌های ایجادکننده‌ی اسهال اشریشیاکلی در دسته‌های مختلفی قابل تقسیم بندی هستند که در این میان پاتوتیپ اتره‌هموراژیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۹ و ۲۰).

یکی از مواد غذایی که در انتقال این گونه عفونت‌ها نقش اساسی دارد، شیر و محصولات لبنی است. از آنجایی که گاو به عنوان یک مخزن برای اشریشیاکلی اتره‌هموراژیک مطرح است و باتوجه به اینکه این باکتری در

O157H:7 جدا گردید که هر دو دارای ژن *eaeA* بودند. از بین ۱۴ جدایه باکتری *E. coli* جدا شده از نمونه‌های پنیر غیرپاستوریزه، هیچ کدام 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 کمتر است (۴).

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

نتیجه گیری

شیوع *اشریشیاکلی انتروهموراژیک* سروتیپ O157:H7 در شیرخام می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد اسهال در جامعه مطرح باشد. از این رو بررسی طغیان‌های ناشی از مصرف این ماده غذایی در مناطقی از کشور که به لحاظ فرهنگی مصرف شیر خام را در سبد غذایی قرار می‌دهند، می‌تواند نتایج بارزتری در جهت پیشگیری از موارد بیماری‌های اسهالی به‌دست آورد. همچنین مطالعه گسترده‌تر بر روی 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 طغیان‌های غذایی به سروتیپ *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.

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 با توجه 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 چهارمحال 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

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, Brahmabhatt 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.

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. 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. Virulence 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].

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

Mohammad Mehdi Soltan Dallal¹ (Ph.D.) - Reza Zandieh Moradi² (M.S.) - Ramin Mazaheri Nezhad Fard³ (Ph.D.) - Zahra Rajabi⁴ (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