

بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به اشريشیاکلی با روش MPN و تشخیص سویه O157:H7 در نمونه‌های جدا شده به روش PCR

بهزاد نیکبخت^۱، محسن نجیمی^{۱*}، سعید سالاری^۱

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

آلودگی گوشت گاو معمولاً در فرایند کشتار اتفاق می‌افتد، یکی از باکتری‌های روده‌ای که آلودگی ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است، باکتری اشريشیاکلی است. یکی از سروتیپ‌های مهم این باکتری Ecoli O157:H7 است که عامل ایجاد عفونت و بیماری در انسان می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به اشريشیاکلی با روش MPN و تشخیص سویه O157:H7 در نمونه‌های جدا شده به روش PCR است. در طی این مطالعه از بهمن ماه ۱۳۹۶ لغایت تیرماه ۱۳۹۷ در طی شش ماه تعداد ۳۶۰ نمونه گوشت گاو از بسته‌بندی‌های گوشت قرمز شهرستان زاهدان، از قسمت‌های مختلف لاشه جمع‌آوری شد و در آزمایشگاه به روش MPN، جداسازی باکتری اشريشیاکلی مقاوم به حرارت انجام شد. تعداد ۷ ایزوله در نهایت جداسازی شد. تأیید نهایی با استفاده از آغازگر اختصاصی *rfb* برای تشخیص O157:H7 با استفاده از واکنش PCR بود. تنها یک ایزوله از نظر این سروتیپ تأیید شد که نشان‌دهنده وضعیت مناسب بهداشتی گوشت‌های تولید شده در شهرستان زاهدان می‌باشد. در مطالعه حاضر با بررسی مولکولی تعداد ۲ ایزوله از باکتری/اشريشیاکلی مقاوم به حرارت به دست آمد که در بررسی ژن *rfb* تنها یک جدایه از نظر/اشريشیاکلی سروتیپ O157:H7 تأیید شد. با این مطالعه حضور این باکتری در نمونه‌های گوشت گاو تأیید می‌شود که بیانگر این می‌تواند باشد که حضور این باکتری در سایر فراورده‌های خام دامی در این استان نیز باید بررسی و ردیابی شود.

واژگان کلیدی: اشريشیاکلی، O157:H7، MPN، روش PCR، زاهدان

مقدمه

آلودگی‌های باکتریایی در مواد غذایی از مهم‌ترین مسائل مورد بحث در حوزه سلامت عمومی است. بر خلاف افزایش سطح ایمنی در حوزه مواد غذایی، مسمومیت ایجاد شده از مواد غذایی و فراورده‌های خام دامی پیوسته در حال افزایش است (۳).

تشخیص و شناسایی باکتری‌های ایجادکننده بیماری به منظور ارتقا سلامت و ایمنی غذا اهمیت ویژه‌ای دارد. یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم در انسان / شریشیالکی است. چندین سویه از این باکتری به عنوان پاتوژن‌های بالقوه در فراورده‌های غذایی معرفی شده است. یکی از سویه‌های بیماری‌زای مهم / شریشیالکی *O157H7** است که به عنوان یکی از عمده‌ترین عوامل ایجاد بیماری در انسان مورد توجه است. سویه / شریشیالکی *O157H7* سالیان به باعث بروز مواردی از مرگ می‌شود که از طریق مواد غذایی مختلف به ویژه فراورده‌های خام دامی به انسان انتقال می‌یابد. این باکتری قادر به تولید سمی است که شبیه به سم باکتری شیگلا است. / شریشیالکی تولیدکننده شیگاتوکسین در دو گروه باکتری‌های مولد کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک قرار می‌گیرد (۵).

باکتری / شریشیالکی جز فلور طبیعی در روده تمام حیوانات خون گرم است به‌طوری که تعداد این باکتری در روده انسان و گوشت‌خواران از روده علف‌خواران بیشتر است. حضور این باکتری در آب و غذا می‌تواند به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و احتمال حضور پاتوژن‌های بیماری‌زا باشد. این باکتری عمدتاً مسئول سه نوع عفونت بالینی در انسان، اسهال و بیماری‌های روده‌ای، عفونت مجرای ادراری و

سپتی‌سمی و مننژیت است. این پاتوژن‌ها عمدتاً از مواد غذایی مانند گوشت و فراورده‌های گوشتی نپخته، شیر و فراورده‌های غیرپاستوریزه آن منتقل می‌شود (۵).

گوشت لاشه گاو پس از کشتار عاری از میکروارگانیسم است. معمولاً در طی انجام فرآیندهای کشتاری، اثر تماس گوشت با پوست، چاقو، دست و لباس کارگران، وسایل و تجهیزات کشتار و آب استفاده شده برای شستشوی لاشه‌ها آلودگی لاشه با باکتری‌ها اتفاق می‌افتد. بررسی بار میکربی گوشت قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده امری ضروری است که از این بین باکتری‌هایی که در سلامت و بهداشت عمومی مهم هستند در اولویت می‌باشند (۴).

استفاده از روش‌های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، می‌تواند جایگزین مطمئنی برای روش‌های فنوتیپی در جهت شناسایی میکروارگانیسم‌های مورد نظر باشد. به دلیل بیماری‌زایی و دوز عفونی اندک، سازمان بهداشت جهانی، تأکید زیادی را بر پایش مستمر سویه‌های *EColiO157:H7* دارد (کارگر و همکاران، ۱۳۸۸). اما متأسفانه تاکنون در کشور ما به ویژه در مورد ارزیابی این باکتری باهدف تشخیص سویه *O157H7* در فراورده‌های خام دامی به ویژه گوشت قرمز، برنامه غربالگری خاصی اجرا نشده است. با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آلودگی گوشت گاو تولیدی در شهرستان زاهدان به باکتری / شریشیالکی با روش MPN و تشخیص سویه *O157H7* در نمونه‌های جدا شده به روش PCR است.

مواد و روش کار

از بهمن ماه سال ۱۳۹۶ لغایت تیر ماه سال

**Escherichia coli* O157:H7

تعداد لوله‌های مثبت دو لوله حاوی ده سی‌سی محیط کشت بریلا براث[□] به همراه لوله دورهام و یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت تریپتون واتر[□] برداشته شد و میزان ۱ میلی‌لیتر از لوله‌های مثبت لوریل سولفات براث به هر لوله تحت شرایط استریل در کنار شعله اضافه شد. یک لوله حاوی بریلا براث و یک لوله تریپتون واتر در انکوباتور با دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و یک لوله بریلا براث برای تأیید کلی‌فرم مرحله اول در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

بعد از این زمان لوله‌های بریلا براث مثبت از نظر کدورت و تشکیل گاز در دورهام در ۳۷ درجه با نتایج اول به‌دست آمده از لوله‌های لوریل سولفات براث مطابقت داده شد و در صورت مثبت بودن مشابه نمونه‌ها وجود کلی‌فرم از مرحله احتمالی تأیید شد. لوله‌های تریپتون واتر گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ درجه بعد از ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج شد و به آن چند قطره معرف ایندول[□] اضافه شد. ایجاد حلقه ارغوانی ایندول نشانه حضور باکتری اشرشیاکلی مقاوم به حرارت است. همچنین لوله‌های بریلا براث گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد نیز از زمان ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار می‌گیرد و لوله‌های مثبت از نظر تولید گاز و کدورت ثبت شدند.

برای تأیید نهایی اشرشیاکلی از محیط کشت حاوی بریلا براث بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار^{**} کشت خطی داده شد. در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شد. وجود جلای فلزی در محیط کشت EMB آگار وجود

۱۳۹۷ در یک دوره زمانی ۶ ماهه، تعداد ۳۶۰ نمونه گوشت گاو از بسته‌بندی‌های گوشت قرمز شهرستان زاهدان (شامل ۶ بسته‌بندی) هر ماه ۱۰ نمونه اخذ گردید. نمونه‌ها شامل سردست، ران، راسته، گردن و قلوه‌گاه بود. مورد آزمایش برای جدا سازی باکتری اشرشیاکلی قرار گرفت. تعیین هویت توسط روش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه انجام گرفت. برای جدا سازی باکتری به روش بیوشیمیایی از روش MPN استفاده شد.

میزان ۲۵ گرم گوشت با ترازو با دقت یک دهم گرم وزن شد و در داخل پاکت استوماکر ریخته شد و به آن تحت شرایط استریل در کنار شعله ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط آب پیتونه استریل اضافه شد. سپس در داخل دستگاه استوماکر به مدت ۳۰ ثانیه همگن و یک دست شد. از محلول همگن شده در کنار شعله و زیر هود رقت‌سازی انجام شد سپس برای کشت به صورت MPN سه سری لوله سه‌تایی که هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریل سولفات براث^{*} استریل حاوی لوله دورهام است برای کشت آماده شد.

در ۳ لوله اول میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک دهم اضافه شد. در ۳ لوله دوم میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک صدم اضافه شد و در ۳ لوله سوم میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت یک هزارم اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و از زمان ۲۴ ساعت برای رشد و تولید گاز مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت تعداد لوله‌های مثبت از نظر کدورت و تولید گاز به ترتیب رقت برای رشد احتمالی کلی‌فرم ثبت شد. برای تأیید این مرحله به

[□]Keuvax

^{**} (Eosin Methylen Blue) EMB

^{*}Lauryl sulfate Broth

[□]Brila Broth

[□]Trypton Water

اشریشیاکلی را تأیید نمود.

برای استخراج DNA از باکتری‌های تأیید شده اشریشیاکلی در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده می‌شود و از یک پرگنه تکی از هر محیط برای استخراج DNA استفاده می‌شود. در مرحله بعد،

استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد و سپس با استفاده از آغازگرهای rfb (پیشگام، ایران) با روش واکنش پلیمر از باکتری‌های اشریشیاکلی سروتیپ O۱۵۷:H۷ شناسایی و ارزیابی شد. جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن rfb

ژن هدف	توالی آغازگر 5'-3'
rfb	CGTGATGATGTTGAGTTG
	AGATTGGTTGGCATTACTG

غلظت DNA استخراجی با دستگاه بیوفوتومتر (اپندورف، آلمان) اندازه‌گیری شد. DNA استخراجی با غلظت میانگین ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر ۱/۸، به‌دست آمد.

جهت انجام واکنش PCR از مخلوط آماده Taq DNA 2x master (پیشگام، ایران) استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه نیز برای ردیابی ژن rfb از شرکت پیشگام تهیه شد. در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مواد مورد استفاده در واکنش PCR

نام معرف	غلظت	حجم به میکرولیتر
Taq DNA 2x master	۱۰ برابر	۲۵
آغازگر پیش رو	۱۰۰ پیکومول	۱
آغازگر پس رو	۱۰۰ پیکو مول	۱
آب عاری از ژنوم	-	۲۲
استخراجی DNA	۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر	۱
حجم نهایی		۵۰

حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر شامل Taq DNA 2x master به میزان ۲۵ میکرولیتر، آغازگر پیش رو و پس‌رو هر کدام یک میکرولیتر با غلظت ۱۰ پیکومول، DNA نمونه با غلظت ۱۰۰ نانوگرم ۱ میکرولیتر و ۲۲ میکرولیتر آب عاری از ژنوم بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر (MWG AG BIOTECH primus96 plus) در ۳۵ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام

گرفت. واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ثانیه صورت گرفت. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد.

مرحله احتمالی در لوله‌های لوریل سولفات براث گاز و کدورت مثبت نشان دادند.

لوله‌های کدورت مثبت و دارای گاز در لوله‌های دورهام وارد مرحله تأییدی شدند در این مرحله هر ۱۱۸ مورد در لوله‌های بریلا براث، کدورت و گاز مثبت شدند ولی تنها ۷ مورد از نظر/شریشیالکی مقاوم به حرارت دارای واکنش ایندول مثبت در دمای ۴۴ درجه بودند. کشت از لوله‌های تریپتون واتر و قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جلای سبز فلزی مربوط به باکتری/شریشیالکی را نشان دادند (شکل ۱).

الکتروفورز محصولات PCR به دست آمده روی ژل آگارز یک و نیم درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای اندازه‌گیری سایز قطعه از DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران) استفاده شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مدل (M02 2661 made in EEC) مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفت.

نتایج

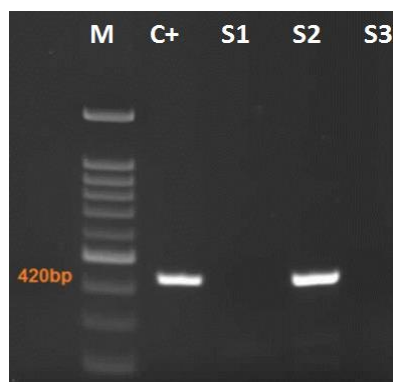
در این مطالعه از تعداد ۳۶۰ نمونه اخذ شده از واحدهای بسته‌بندی که به صورت منجمد بودند بعد از انجام آزمایش کلی‌فرم کانت تعداد ۱۱۸ نمونه در



شکل ۱- کلنی اشریشیالکی بر روی محیط EMB آگار

تشخیص وجود سویه *H7 : O157* ژنوم به روش جوشاندن (۱۰) استخراج شد و با استفاده از ژن *rfb* وارد واکنش PCR شد.

از تعداد ۱۱۸ مورد مثبت در مرحله احتمالی تنها ۷ مورد دارای واکنش ایندول مثبت در محیط کشت تریپتون واتر بودند. از این باکتری‌ها برای



شکل ۲- تصویر باندهای مربوط به جدایه اشریشیاکلی C+, H:1570V کنترل مثبت، S1، S2 و S3 نمونه‌های مورد آزمایش است. مارکر ۱۰۰ جفت بازی است.

است که با روش‌های متداول آزمایشگاهی بیوشیمیایی تشخیص آن زمان‌بر و مشکل است بنابراین روش PCR ابزاری قدرتمند برای شناسایی دقیق این باکتری از بین سویه‌های اشریشیاکلی است.

در این مطالعه پس از انجام آزمون‌های میکروبی‌شناسی و نیز آزمون‌های اولیه بیوشیمیایی، از میان سویه‌های اشریشیاکلی جدا سازی شده با استفاده از روش PCR ردیابی باکتری مورد نظر انجام شد. در روش PCR به دلیل استفاده از آغازگرهای اختصاصی، توانایی ازدیاد و شناسایی ژن خاص شناسایی‌کننده باکتری وجود دارد.

اشریشیاکلی سروتیپ O157H7 باکتری بیماری‌زای مضر مرتبط با بیماری‌های منتقله از غذا است که باعث سندروم اورمیک هولیتیک می‌شود. جدا سازی اشریشیاکلی O157H7 از نمونه مواد غذایی نیاز به غنی‌سازی و جدا سازی با محیط‌های کشت اختصاصی و تفریقی دارد اما این محیط‌ها اشریشیاکلی نیستند. برای همین شناسایی سروتیپ‌ها از غذا و محیط نیاز به استفاده از روش‌های حساس‌تر و دقیق‌تر دارد. در کنار روش‌های کشت سنتی و بیوشیمیایی، روش‌های مولکولی برای شناسایی اختصاصی سویه‌ها به کمک آمده است که برای شناسایی باکتری‌ها بسیار کاربردی می‌باشند (۸).

Marshall و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای برای بررسی محصولات گوشت تازه در طی فرایند کشتار با اشریشیاکلی جدایه O157H7 انجام دادند، نمونه‌هایی از ۲۰ گاو گوشتی نمونه‌برداری شدند و ۱۱۳ جدایه باکتریایی به دست

در این باکتری‌ها، با استفاده از روش PCR بر روی DNA استخراج شده از باکتری‌های اشریشیاکلی تأیید شده و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، باند جدایه‌های مثبت اشریشیاکلی با استفاده از ژن *rfb* در محدوده ۴۲۰ bp قرار گرفت و این ایزوله‌ها از نظر اشریشیاکلی H7 : O157 مورد تأیید قطعی قرار گرفت. این باند تنها در ۱ جدایه از ۱۱۸ باکتری دیده شد. درحالی‌که در ارزیابی فنوتیپی تعداد ۱۱۸ جدایه مورد تأیید اشریشیاکلی بودن قرار گرفت. نتایج تکثیر DNA با ژن *rfb* تنها یک باکتری از ۷ باکتری اشریشیاکلی H7 : O157 را تأیید نمود (شکل ۲).

باکتری‌های اشریشیاکلی باسیل‌های گرم منفی، اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت هستند که در محیط TSI، سطح و عمق محیط را اسیدی و زرد می‌کند و همراه با تولید گاز است. از نظر آزمون سیترات و آزمون VP منفی است و واکنش MR و آزمون ایندول آن مثبت است. این ارگانیزم‌ها از نظر آزمون لیزین دکربوکسیلاز* مثبت بوده و در مجموع متحرک هستند و تست هیدرولیز اوره آنها نیز منفی است (۶).

بحث و نتیجه‌گیری

اکثر گزارش‌های موجود درباره جستجوی اشریشیاکلی O157H7 نشان می‌دهد که گوشت گاو به عنوان مهم‌ترین محصول دامی در انتقال این باکتری بیماری‌زا به انسان است. این مطالعات نشان می‌دهد که آلودگی گوشت گاو به این باکتری در کشورهای مختلف بسیار متفاوت و از صفر تا ۴۲ درصد در نمونه‌ها متغیر است (۵). از عمده‌ترین چالش‌های شناسایی این باکتری در آزمایشگاه این

*Lysine Decarboxylase

موارد، بهبود حساسیت PCR در شناسایی باکتری بیماری‌زا است، اما بیشترین اطلاعات گزارش شده به اختصاصیت و حساسیت آغازگر برمی‌گردد. بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفته است بر اساس ردیابی ژن‌های ویروالانس (Virulence) و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سطحی که عامل تهاجم است، بوده است. مقایسه بین نتایج کشت و PCR نشان می‌دهد که حساسیت، دقت و اختصاصیت روش PCR بسیار بیشتر از روش کشت است. در روش PCR ژنوم میکروارگانیسم مورد نظر ردیابی و احتمال ردیابی ارگانیسم غیر فعال یا مرده نیز وجود دارد که از تفاوت جدا سازی فنوتیپی و ژنوتیپی به شمار می‌رود.

سیاحی و همکاران در سال ۱۳۹۵ با احتمال آلودگی گوشت به مدفوع حیوانی که منبع اصلی عفونت اشریشیاکلی *O157:H7* در نمونه‌های گوشت است، مطالعه‌ای باهدف بررسی میزان شیوع اشریشیاکلی سروتیپ *O157:H7* در نمونه‌های گوشت گاو کشتار شده در کشتارگاه شهرستان کازرون انجام دادند. این مطالعه به صورت توصیفی-تحلیلی انجام پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ لاشه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها از برش سطحی عضله گردن گرفته شد و پس از نمونه‌برداری سریعاً کشت و آنالیز میکروبی بر روی نمونه‌ها صورت گرفته و کلنی‌های مشکوک به اشریشیاکلی *O157:H7* توسط روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آلودگی نمونه‌ها به اشریشیاکلی بر اساس آزمون کشت ۲۰٪ مثبت بود (۱۲).

از این تعداد ۱ نمونه (۱٪) در آزمون PCR به اشریشیاکلی *O157:H7* تشخیص داده شد. شیوع فصلی اشریشیاکلی *O157:H7* نشان داد که بیشترین شیوع آلودگی نمونه‌های اخذ شده در فصل

آمد. ۱۳ مورد از این جدایه‌ها نشان‌دهنده چهار جنس، *Enterobacter*، *Escherichia*، *Providencia* و *Serratia* شناسایی شد. اشریشیاکلی جدا شده بر اساس ویژگی‌های رشد و بیوشیمیایی شبیه به جدایه *E. coli O157:H7* بود. حساسیت درجه حرارت برای جدایه‌های جدایه *E. coli O157:H7* در ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. آنها شاخص *E. coli O157:H7* برای تأیید اثربخشی کنترل‌های فرآیند در مؤسسات کشتار جمعی را مفید دانستند (۹).

Beneduce و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای بر روی *E. coli O157:H7* به خصوصیات کلی این باکتری، جدا سازی و روش‌های شناسایی آن پرداختند. از آنجایی که این باکتری یکی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی منتقل شده از مواد غذایی است و به علت انتشار وسیع آن، عفونت با دوز کم همراه با علائم شدید را به همراه دارد. آنها در نظر گرفتند که جدا سازی باکتری را بر مبنای عواملی مانند دما، PH و AW قرار دهند که ممکن است رشد و بقای *E. coli O157:H7* را در مواد غذایی و در محیط از سال‌های قبل تحت تأثیر قرار دهد. آنها روش‌های تشخیصی با مبنای مولکولی را مناسب دانستند. تکنیک‌های PCR، امکان دستیابی به ویژگی و حساسیت جدا سازی حتی در نمونه‌های پیچیده مانند غذا و مدفوع در میزان کم را فراهم می‌کند. همچنین پیشنهاد کردند که مطالعات بیشتری باید در مورد بررسی اثر aw بر روی بقا و رشد باکتری *E. coli O157:H7* لازم است (۷).

جهت شناسایی این بیماری نیز فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده‌های PCR در نمونه، شناسایی سلول‌های زنده و غیره زنده، اختصاصیت آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی‌کننده می‌توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تأثیر قرار دهند. هدف اصلی در تمام

تابستان است. نتایج این مطالعه نشان داد که گوشت گاو می‌تواند به‌عنوان یک مخزن بالقوه برای اشریشیاکلی *O157:H7* مطرح باشد و گوشت گاو ممکن است به‌عنوان یک حامل در انتقال این باکتری به انسان عمل کند. که نتیجه جدا سازی باکتری مشابه این تحقیق است.

Ashgan و همکاران در سال ۲۰۱۵ به‌منظور تعیین شیوع و شناسایی مولکولی باکتری اشریشیاکلی سروتیپ *O157:H7* از گوشت خام و محصولات گوشتی جمع‌آوری شده از عربستان سعودی مطالعه‌ای انجام دادند. طی دوره از ۲۵ ژانویه ۲۰۱۳ تا ۲۵ مارس ۲۰۱۴، ۳۷۰ نمونه گوشت از کشتارگاه‌ها و بازارهای واقع در ریاض، عربستان سعودی شامل ۲۰۰ نمونه گوشت خام و ۱۷۰ نمونه محصولات گوشتی جمع‌آوری شد. تجزیه باکتریولوژیکی نمونه‌های گوشتی و سروتیپ‌های *E.coli* جدا شده، جداسازی جدایه‌های ۱۱ (۲/۹۷٪) سویه *H:157O* را نشان داد. جدا سازی *H:157O* در گوشت گاو، گوشت مرغ و گوشت خام به ترتیب ۲، ۲/۵ و ۲/۵٪ بود، اما در بوقلمون خام جدا سازی نشد (۱۱).

جمشیدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در مطالعه‌ای جدا سازی و تشخیص باکتری اشریشیاکلی سروتیپ *O157:H7* از نمونه‌های چرخ گوشت چرخ‌کرده، جمع‌آوری شده از فروشگاه‌های عرضه گوشت در شهرستان مشهد، به دو روش کشت مرسوم و PCR انجام دادند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت چرخ‌کرده به صورت تصادفی در فصل تابستان از فروشگاه‌های عرضه گوشت در سطح شهرستان جمع‌آوری کردند و بعد از کشت در محیط‌های غنی‌کننده، ابتدا آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تأیید باکتری اشریشیاکلی صورت گرفت، سپس تست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کدکننده

آنتی‌ژن‌های *O157:H7* انجام گردید. در این مطالعه از تعداد ۷ نمونه، باکتری اشریشیاکلی غیر تخمیرکننده سوربیتول جداسازی گردید که در تست PCR فقط یک نمونه به عنوان سروتیپ *O157:H7* مورد تأیید قرار گرفت. آنها نتیجه گرفتند روش PCR ممکن است به عنوان جایگزینی برای تست‌های ایمونولوژیک که حضور آنتی‌ژن‌های پیکری و تاژکی را مشخص می‌کنند مورد استفاده قرار بگیرد.

در مجموع با مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده در داخل و خارج می‌توان نتیجه گرفت که حضور باکتری اشریشیاکلی سروتیپ *O157:H7* تقریباً در بسیاری از فراورده‌های خام دامی از جمله گوشت گاو، گوسفند و سایر حیوانات تولیدکننده گوشت قرمز و همچنین در گوشت طیور و ماهی جدا سازی شده است که درصد شیوع این باکتری در فراورده‌های خام و پخته هم متفاوت است. به‌طوری که در نمونه‌های خام بیشتر بوده است. همچنین ثابت شده است که استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند بسیار کارآمد در ردیابی و جستجوی باکتری اشریشیاکلی *O157:H7* حتی به میزان کم در نمونه‌های مختلف باشد.

در مطالعه حاضر با بررسی مولکولی تعداد ۲ ایزوله از باکتری/اشریشیاکلی مقاوم به حرارت به‌دست آمد که در بررسی ژن *rfb* تنها یک جدایه از نظر/اشریشیاکلی سروتیپ *O157:H7* تأیید شد. با این مطالعه حضور این باکتری در نمونه‌های گوشت گاو تأیید می‌شود که بیانگر این می‌تواند باشد که حضور این باکتری در سایر فراورده‌های خام دامی در این استان نیز باید بررسی و ردیابی شود.

با استفاده از این مطالعه مشخص شد که استفاده از روش PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش اختصاصی برای شناسایی باکتری اشریشیاکلی *O157:H7* معرفی شود، زیرا استفاده از روش‌هایی

پایش این باکتری در مراحل مختلف کشتار دام در خط تولید انجام پذیرد تا نقطه بحرانی حضور این باکتری در خط کشتار مشخص گردد و اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از انتقال این باکتری به سایر محصولات صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از مدیر کل و معاونین محترم و پرسنل خدوم آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان که موجبات انجام این تحقیق را فراهم نموده و کمال همکاری را مبذول داشتند.

مانند MPN و کشت‌های تفریقی شناسایی باکتری تنها به جداسازی باکتری اشریشیاکلی مقاوم به حرارت منتهی می‌شود و تشخیص سروتیپ‌های خاص با روش PCR سریع‌تر نتیجه را حاصل می‌کند و این نتایج نشان‌دهنده کیفیت نسبتاً مطلوب این نوع بسته‌بندی در شهر زاهدان را نشان می‌دهد.

پیشنهاده‌ها

این مطالعه اقدامی اولیه برای بررسی حضور باکتری / اشریشیا کلی O157: H7 در گوشت‌های تولیدی به دو روش MPN و مولکولی است. از آنجایی که تشخیص خاص این باکتری در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌شود پیشنهاد می‌شود که

References

- 1- Jafareyan-Sedigh M, Rahimi E, Doosti A. Isolation of Escherichia coli O157: H7 in sheep meats using cultural and PCR method, Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(2): 61-68. [In Persian]
- 2- Jamshidi A, Bassami M.R, Rasooli M. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain reaction in Mashhad, northeastern Iran, IRANIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH (IJVR). 2008; 9(22): 72-76.
- 3- RAJABZADEH S, BAHREINI M, SHARIFMOGHADAM M.R. Simultaneous detection of foodborn pathogenes Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. By Multiplex PCR in ready-to-eat vegetables, Iranian Food Science and Technology Research Journal; 2017 ; 13(1): 105- 111. [In Persian]
- 4- Koohdar V.A. Study of Beef Carcass Bacterial Contamination in Karajrak Slaughterhouse , Journal of Food Hygiene. 2013; 3(10): 43-51. [In Persian]
- 5- Safarpour F, Rahimi A, ghobadi M, Yahaghi, A. Escherichia coli producing shigatoxin in sheep cheese, IRANIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE. 2013; 19(66): 25-29. [In Persian]
- 6- Noroozi J. Practical Methods for Identifying Bacteria , 1nd ed. Tehran: Hayan Publications; 2010.
- 7- Beneduce L, Spano G, Massa S. Escherichia coli O157:H7 general characteristics, isolation and identification techniques. Annals of Microbiology. 2003; 53(4): 511-527.
- 8- Kim J, Kim S, Kwon N, Bae W, Lim J, Koo H. and et. al. Isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. J. Vet. Sci. 2005; 6(1): 6-19.
- 9- Marshall K.M. Identification of Escherichia coli O157: H7 meat processing indicators for fresh meat through comparison of the effects of selected antimicrobial interventions. Journal of food protection. 2005; 68(12): 2580-2586.
- 10- Nikbakht B, Sani A. Identification Of Salmonella sp. From Contaminated Meat Samples by MultiplexnPCR-BASED Assay. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2016; 4(5): 513-518
- 11- Ashgan M, Abdullah A. A, Adel M, Jakeen K. J, Onizan G. Z, Hassan A. and et al. Molecular characterization of Escherichia coli O157:H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 2015; 22(6): 725-729.
- 12- Korbandeh M, Emadi M, Hoseinizadeh ghasemi A, saiahi A. Isolation of Escherichia coli O157: H7 from cattle meat in slaughter house of Kazeroon By PCR. 12th Iranian Veterinary students Congress 04-05 September 2018, Semnan University-Iran. [In Persian]

Investigating the rate of pouring of beef produced in Zahedan to Escherichia Coli using MPN and detection of O157:H7 by PCR

Behzad Nikbakht¹, Mohsen Najim*¹, Saeed Salari¹

1 - Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: March 11, 2019; Revise: April 22, 2019; Accept: May 10, 2019

Summary

Beef contamination usually occurs in the killing process. One of the intestinal bacterial pathogen that causes disease in human and animals everywhere is bacterial pathogen *E. coli*. One of the important serotypes of this bacterium is *E. coli* O157: H7. The aim of this study was to determine the rate of contamination of beef produced in Zahedan to *E. coli* by MPN Method and also O157:H7 strains isolated by PCR. During this study, conducted within six months from July 1396 to July 1397, 360 beef samples from cattle meat packages of Zahedan City, from different parts of the carcasses isolates of the heat-resistant *E. coli* in the laboratory was carried out using the MPN method. Seventy isolates were finally detected. The final test was performed using a specific primer as *rfb* to detect *E. coli* O157:H7 using a PCR reaction. Only one isolate was confirmed based on this serotype, which indicates the proper health status of the meat produced in Zahedan. In the present study, a molecular study of 2 isolates of heat-resistant *Escherichia coli* bacteria was done. In the study of *rfb* gene, only one isolate in terms of *Escherichia coli* serotype 7H: 157O was confirmed. With this study, the presence of this bacterium in beef samples is confirmed, which can indicate that the presence of this bacterium in other raw animal products in this province should also be investigated and tracked.

Keywords: *Escherichia coli*, O157:H7, MPN, PCR, Zahedan