مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ٦، بهمن و اسفند ۱۳۸۹
صفحه: ۵۲۰-۵۱۲

Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 18, No. 6, Jan-Feb 2011
Pages: 512-520

شیوع ژن‌های شیگا توکسین، اینتیمین و همولیزین در سویه‌های اشریشیاکلی O157:H7 از نمونه‌های گوشت چرخ کرده کارخانجات صنعتی شهرستان شیراز

محمد کارگر*[۱]، موسی دانشور[۲]، مریم همایون[۳]

۱- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۳،۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۵/۱۴

چکیده

چکیده: اشریشیاکلی سروتیپ O157:H7 یکی از عوامل اصلی ایجادکننده مسمومیت غذایی و بیماری‌هایی مانند کولیت خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولیتیک است. عفونت‌های انسانی ناشی از این باکتری در اثر مصرف آب و غذای آلوده ایجاد می‌شوند. هدف این پژوهش، ارزیابی ژن‌های بیماری‌زای stx_1، stx_2، eae A و hly باکتری اشریشیاکلیO157:H7 در نمونه‌های گوشت چرخ کرده شهرستان شیراز می‌باشد.

روش بررسی: در این پژوهش ۵۰۴ نمونه گوشت چرخ کرده از سه کارخانه، به مدت یکسال جمع‌آوری و در محیط کشت اشریشیاکلی براث واجد نووبیوسین در دمای ۳۷°C غنی سازی شد. سپس از محیط کشت های CT-SMAC و VRBA به منظور بررسی تخمیر سوربیتول و لاکتوز و از محیط کروموآگار برای بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی باکتریهای جداسازی شده استفاده گردید. با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی، باکتری اشریشیاکلی O157:H7 تایید و با روش Multiplex PCR وجود ژن‌های stx_1، stx_2، eaeA و hly مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: از مجموع نمونه‌های گوشت مورد ارزیابی، ۴۶۶ نمونه در محیط CT-SMAC دارای کلنی‌های سوربیتول منفی بودند(۹۲/۴۶٪). پس از انجام تست‌های تأییدی از ۲(۰/۳۹٪) نمونه، باکتری اشریشیاکلیO157:H7 جداسازی گردید که در مجموع از کل نمونه‌ها ۰/۳۹٪ دارای ژن‌های stx_1 وeaeA و ۰/۱۹٪ دارای ژن stx2 بودند.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که اشریشیاکلی O157:H7 یکی از نگرانی‌های اساسی بهداشت و سلامت گوشت محسوب می‌گردد، بایستی مورد توجه دائمی قرار گیرد. راه‌های پیشگیری می‌تواند موجب کاهش گاوهای آلوده واجد این باکتری و آلودگی گوشت در هنگام کشتار دام و خرد کردن گوشت شود.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی O157:H7- ژن‌های شیگاتوکسین- گوشت چرخ کرده

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن، ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳، نمابر: ۰۷۱۱-۶۴۷۶۱۰۶، پست الکترونیکی:mkargar@jia.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

مقدمه

سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده شیگا توکسین(Shiga toxin-producing E.coli= STEC)، که سویه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده وروتوکسین(verocytotoxin-producing E.coli =VTEC) نیز نامیده می‌شوند، از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای منتقل شونده به وسیله مواد غذایی هستند. این سویه‌ها می‌توانند علاوه بر ایجاد مسمومیت غذایی، عامل بیماری‌های شدیدی مانند اسهال خونی، کولیت خونریزی دهنده، سندرم اورمی همولیتیک، پورپورای ترومبوسیتوپنی و مرگ نیز باشند. بیشترین موارد همه گیری‌های کولیت خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولیتیک مربوط به سروتیپ O157:H7 می‌باشد که به عنوان مهمترین سروتیپ این سویه در نظر گرفته می‌شود(۱).

توانایی باکتری E.coli O157:H7 در ایجاد بیماری‌های شدید برای انسان‌ها، به دلیل ترشح شیگا توکسین‌ها(Stx1 و Stx2) یا وروتوکسین‌ها(VT1 و VT2) و واریته‌های این توکسین‌ها است(۱،۲). یکی دیگر از عوامل بیماری زای این سویه، پروتئینی به نام اینتیمین(Intimin) است که یک پروتئین 94-kDa غشای خارجی می‌باشد و به وسیله ژن eae کد می‌شود. این پروتئین مسئول اتصال نزدیک باکتری به سلول‌های اپی تلیال روده و ایجاد آسیب‌های خاصی به نام اتصال و محو شدن(Attaching/effacing) است. همچنین انتروهمولیزین که به وسیله ژن hly کد می‌شود، نیز از عوامل مؤثر بیماری زایی این سویه محسوب می‌گردد(۲).

آلودگی با باکتری E.coli O157:H7 اغلب به دلیل مصرف مواد غذایی آلوده مانند انواع گوشت و گوشت چرخ کرده، ساندویچ‌های گوشتی، شیر خام و پاستوریزه آلوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، سبزیجات و آب میوه‌ها ایجاد می‌شود(۱،۳).

جداسازی E.coli O157:H7 در آزمایشگاه بر اساس دو ویژگی عدم تخمیر سریع سوربیتول و عدم توانایی تولید بتاگلوکورونیداز انجام می‌شود که به جداسازی فنوتیپی E.coli O157:H7 از سویه‌های دیگر کمک می‌کند. بر همین اساس می‌توان از محیط‌های سوربیتول مک کانکی آگار و کروموآگار اختصاصی O157 به منظور شناسایی باکتری استفاده نمود(۳).

به منظور ژنوتایپینگ و بررسی همزمان ژن های بیماری‌زای این باکتری، محققینی مانند Paton و همکاران در سال ۱۹۹۷ در استرالیا(۴)، Pradel و همکاران در سال ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ در فرانسه(۵)، Blanco و همکاران در سال ۲۰۰۳ در اسپانیا(۶)، Mohsin و همکاران در سال ۲۰۰۵ در پاکستان(۷)، Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مکزیک(۸) و Santaniello و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایتالیا(۹) با استفاده از روش Multiplex PCR پرایمرهای مختلفی را برای تشخیص این ژن‌ها پیشنهاد نمودند.

با توجه به این که گاوسانان یکی از مخازن اصلی آلودگی با سروتیپ های E.coli O157:H7 محسوب می‌شوند، به همین دلیل فرآورده‌های گوشتی پتانسیل آلودگی قابل توجهی با این باکتری دارند. در کشورهای توسعه یافته توجه بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتاً واضحی از شیوع آن وجود دارد. در کشورهای در حال توسعه، میزان شیوع E.coli O157:H7 کمتر گزارش می‌شود، دلیل این مسأله انجام بررسی‌های ناقص و محدود روی میزان شیوع و اپیدمیولوژی این باکتری است. در ایران تمامی مطالعات مولکولی انجام شده بر روی این باکتری، مربوط به مواد لبنی و نمونه‌های مدفوع حیوانات بوده است. کشت سلولی که از روش‌های مورد استفاده در مطالعات محققان ایرانی بوده، علاوه بر طولانی بودن، فاقد دقت لازم برای بررسی توکسین‌های باکتری است. به همین دلیل در این پژوهش ما برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زای stx1، stx2، eaeA و hly باکتری‌های E.coli O157:H7 جدا شده از نمونه های گوشت چرخ کرده گوساله از روش Multiplex PCR استفاده نمودیم.

بنابراین هدف ما از این پژوهش، ارزیابی میزان شیوع و فراوانی ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های E.coli O157:H7 جدا شده از نمونه-های گوشت چرخ کرده گوساله در شهرستان شیراز می‌باشد.

روش بررسی

تعداد ۵۰۴ نمونه گوشت چرخ کرده گوساله از آذر ماه سال ۱۳۸۵ تا آذر ماه سال ۱۳۸۶ به صورت مقطعی- توصیفی بر اساس

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

فرمول آماری $n=\frac{NZ^2pq}{d^2(N-1)+Z^2pq}$ از سه کارخانه در استان فارس(به دلیل رعایت مسائل قانونی و اخلاقی نام کارخانجات ذکر نشده است)، که بیشترین میزان تولید و بسته‌بندی گوشت چرخ کرده را دارند، تهیه گردید و اطلاعات مربوط به مکان، زمان و فرایند تهیه نمونه در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. به این صورت که از تمامی کارخانجات صنعتی تولید کننده گوشت چرخ کرده شیراز به صورت روش Grab sampling نمونه‌گیری به عمل آمده است. در این روش، به مدت یکسال در فواصل زمانی خاص در یک ماه از تمامی محل‌های یاد شده نمونه‌گیری می‌شود.

مراحل نمونه‌گیری شامل شش مرحله مختلف در چرخه تولید و بسته بندی بود که در نهایت نمونه ها به تعداد مساوی از گوشت‌های یک بار چرخ شده و دو بار چرخ شده جمع‌آوری شد. این مراحل شامل پس از خرد شدن با دستگاه خرد کننده گوشت، در زمان چرخ اول از داخل دستگاه چرخ گوشت، قبل از چرخ دوم، پس از چرخ دوم، حین بسته‌بندی و از نمونه‌های بسته بندی شده بود. مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه گوشت به منظور غنی سازی در محیط اشریشیاکلی براث(E.coli broth= ECB) شرکت Oxoid واجد ۲۰mg/l نووبیوسین(sigma) در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه دارای هم زن و در دور ۲۰۰rpm گرماگذاری شد(۱۰).

نمونه‌های غنی شده در مرحله قبل بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار(Sorbitol-MacConkey agar =SMAC) شرکت Lab.M، حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفکسیم(Oxoid) و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تلوریت پتاسیم(Oxoid) کشت داده شدند. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری‌های جداسازی شده از محیط ویولت رد بایل آگار(Violet red bile agar =VRBA) شرکت Merck استفاده شد. همچنین به منظور بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی، باکتری های تأیید شده به عنوان اشریشیاکلی بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری گردید. به منظور تایید نهایی باکتری‌های دارای واکنش بیوشیمیایی سوربیتول و بتا گلوکورونیداز منفی، از آنتی سرم اختصاصی O157 (بهارافشان) استفاده شد(۱۱).

استخراج DNA با استفاده از کیت DNP™(شرکت سیناژن) انجام گردید. برای ردیابی همزمان ژن‌های بیماری‌زا، از روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط Santaniello در سال ۲۰۰۷، استفاده شد. در جدول ۱ توالی الیگونوکلئوتیدی چهار جفت پرایمر مورد استفاده برای ژن‌های هدف و اندازه محصولات تقویت شده، نشان داده شده است(۹).

جدول ۱: توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده در Multiplex PCR

نام پرایمر	توالی الیگو نوکلئوتیدی (´۳→´۵)	اندازه محصول
stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614bp
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG	
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779bp
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
eaeA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	890bp
eaeA-R	CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	
hlyA-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165bp
hlyA-R	CTTCACGTGACCATACATAT	

حجم نهایی واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و حاوی (10 mM) Tris-HCL، (3 mM) MgCl2، (0.2 mM) dNTPs، (10mM) KCl، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، 20 Pmol از هر یک از پرایمرها و 4 µl DNA انجام شد. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر(Techne) با شرایط: حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه(Denaturation ابتدایی)، حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

۲۰ ثانیه(Denaturation)، حرارت ۵۸ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه(Annealing)، حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۹۰ ثانیه(Extension) و حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه(Extension نهایی) انجام شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز توسط دستگاه Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت از سویه 933J و به عنوان کنترل منفی از سویه E.coli K12 استفاده شد(۶،۳).

آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 13، و آزمون‌های مربع کای و دقیق فیشر انجام شد. مرز معنی‌دار نیز $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

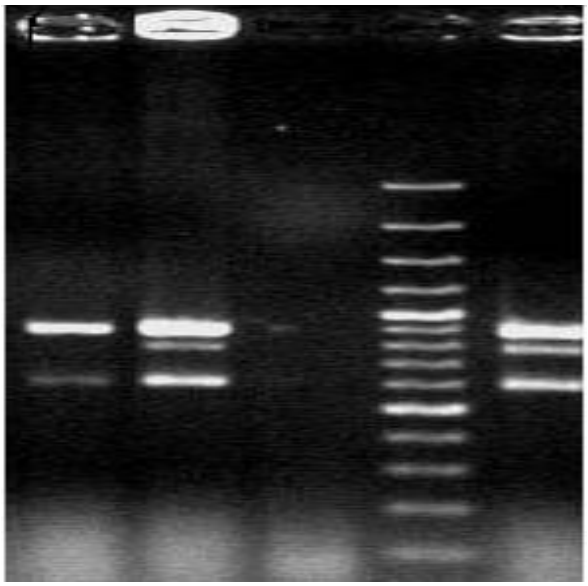
نتایج

تعداد ۵۰۴ نمونه گوشت چرخ کرده گوساله از سه کارخانه شماره ۱: ۲۲۸ نمونه (فراوانی ۴۵/۲۳٪)، شماره ۲: ۱۴۴ نمونه(فراوانی ۲۸/۵۷٪) و شماره ۳: ۱۳۲ نمونه (فراوانی ۲۶/۱۹٪) جمع‌آوری شد. با توجه به بسته‌بندی مداوم و عرضه بیشتر گوشت بسته‌بندی شده در کارخانه شماره ۱، اغلب نمونه‌ها از این مجتمع تهیه گردید. از مجموع ۵۰۴ نمونه غنی شده، ۴۶۶ نمونه(۹۲/۴۶٪) دارای کلنی‌های سوربیتول منفی در محیط CT-SMAC بودند.

در گوشت‌هایی که یک بار چرخ شده بودند تعداد و فراوانی نمونه‌های لاکتوز مثبت ۶۵ مورد(۱۲/۸۹٪) و در گوشت‌هایی که دو بار چرخ شده بودند تعداد و فراوانی نمونه های لاکتوز مثبت ۹۹ مورد(۱۳/۰۹٪) بود. با استفاده از آزمون کای دو رابطه معنادار بین دفعات چرخ کردن گوشت و فراوانی نمونه‌های لاکتوز مثبت مشاهده شد($p=۰/۰۰۴$).

در مجموع ۱۹ نمونه با تست IMViC به عنوان E.coli تعیین هویت شدند که ۲ نمونه (فراوانی ۰/۳۹٪) بتاگلوکورونیداز منفی، با آنتی سرم O157 آگلوتینه شدند(جدول ۲).

در این پژوهش ژن‌های stx1 و eaeA در یک سویه (فراوانی۰/۲٪) و ژن‌های stx1، stx2 و eaeA نیز در یک سویه(فراوانی۰/۲٪) شناسایی شدند. در نمونه کنترل مثبت باندهای 614 bp، 779 bp و 890 bp مشاهده شد که به ترتیب مربوط به ژن‌های stx1، stx2 و eaeA بودند. اما ژن hly در هیچ کدام از سویه های تأیید شده با آنتی سرم اختصاصی مشاهده نگردید(شکل ۱).



شکل(۱): ارزیابی ژن های بیماری‌زای باکتری E.coli O157:H7 با روش Multiplex PCR . (۱)کنترل مثبت، (۲)مارکر ۱۰۰bp، (۳) کنترل منفی، (۴) باکتری دارای ژنهای stx1، stx2 و eae و (۵) باکتری دارای ژن های stx1 و eae .

جدول ۲: توزیع فراوانی و نسبت باکتری‌های مشکوک به E.coli O157:H7 بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژی

تست شناسایی	SMAC	VRBA	IMViC	MUG	آنتی سرم O157:H7
مکان	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کارخانه ۱	۲۰۷(۴۱/۰۷)	۶۶(۱۳/۰۹)	۴(۰/۷۹)	۰(۰)	۰(۰)
کارخانه ۲	۱۳۴(۲۶/۵۰)	۵۳(۱۰/۵۱)	۸(۱/۵۸)	۲(۰/۳۹)	۲(۰/۳۹)
کارخانه ۳	۱۲۵(۲۴/۸۰)	۴۵(۸/۹۲)	۷(۱/۳۸)	۰(۰)	۰(۰)
جمع	۴۶۶(۹۲/۴۶)	۱۶۴(۳۲/۵۳)	۱۹(۳/۷۶)	۲(۰/۳۹)	۲(۰/۳۹)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

بحث و نتیجه گیری

اپیدمیولوژی و ژنتیک E.coli O157:H7 نسبت به اولین موارد پیدایش آلودگی در اوایل دهه ۱۹۸۰ در اثر مصرف گوشت چرخ کرده، دچار تغییرات بسیاری شده است. از مسیرهای جدید انتقال آلودگی می توان به تماس مستقیم با حیوانات و پایداری این باکتری در ابزارها و تولیدات غذایی اشاره کرد(۱۳،۱۲).

Blanco و همکاران در سال ۱۹۹۶ گزارش کردند که آلودگی با اشریشیاکلی تولید کننده وروتوکسین از صفر تا ۶۰٪ متغیراست در این شیوع O157:H7 در گاوها در زمان کشتار ۵٪ تخمین زده شده است(۶). Elder و همکاران، میزان شیوعE.coli O157:H7 را پس از فراوری، ۲٪ گزارش کردند. به نظر می‌رسد که کاهش شیوع آلودگی لاشه ها در مراحل مختلف ، به دلیل تأثیر شرایط بهداشتی بر روی ابزارهای فرآوری باشد(۱۴).

در ترکیه در سال ۲۰۰۶، E.coli O157:H7 از ۷۷ نمونه (۱۳/۶٪) از گاوهای کشتارگاه‌ها جداسازی گردید. از این تعداد ۶۶ (۱۱/۷٪) سویه مربوط به سروتیپ O157:H7 و ۱۱(۱/۹٪) مورد دیگر مربوط به سویه های غیر متحرک (O157:NM) بودند(۱۵).

در بررسی سال ۲۰۰۸ در بنگلادش، ۱۴/۴٪ از بوفالوها، ۷/۲٪ از گاوها و ۹/۱٪ از بزغاله ها با سویه‌های STEC O157 آلوده شده بودند. نمونه‌گیری در این حیوانات بلافاصله پس از ذبح در کشتارگاه انجام شده بود(۱۶). در بررسی حاضر از مجموع نمونه‌های مورد ارزیابی، پس از انجام تست های تاییدی از ۲(۰/۳۹٪) نمونه باکتریE.coli O157:H7 جداسازی گردید. نتایج مطالعات در ترکیه و بنگلادش نشان دهنده شیوع بالاتر این باکتری نسبت به مکان مورد پژوهش ما می‌باشد.

در همه‌گیری گسترده سال ۲۰۰۵ در فرانسه، ۶۹ مورد از آلودگی با باکتری E.coli O157:H7 در گوشت چرخ کرده مشاهده گردید. نتایج بررسی‌های مولکولی، نشان دهنده وجود ژن‌های شیگا توکسین (stx1 و stx2) و واریته‌های متنوع ژن stx2 در سویه‌های جداسازی شده بود. بعضی از زیر گروه های مرتبط با سویه‌های STEC جداسازی شده از میزبان‌های اختصاصی نظیر گوسفند(stx2d) و خوک (stx2e)،بیماری‌زایی کمتری برای انسان دارند(۱۷).

از ۲۲ سویه STEC جداسازی شده در مکزیک توسط Garcia و همکارانش در سال ۲۰۰۵، اکثر سویه‌ها یا ژن stx2 و یا ترکیبی از ژن‌های stx1 و eaeA را داشته‌اند، به طوری که ۹ سویه ژن stx2، 9 سویه ژن‌های stx1- eaeA، 3 سویه ژن stx1 و ۱ سویه هم ژن‌های stx1- eaeA- hlyA را نشان دادند(۸). در بررسی Byrne و همکاران در سال ۲۰۰۳ در آمریکا، از ۵۷ سویه E.coli O157:H7 جداسازی شده، ۳۸ سویه ژن‌های stx1، stx2، eaeA و hly، ۱۱ سویه ژن‌های stx1، eaeA و hly، ۵ سویه ژن‌های stx2، eaeA و hly و ۳ سویه هم ژن‌های stx1، stx2 و eaeA داشتند(۱۸).

ما در این پژوهش، با استفاده از روش Multiplex PCR در نمونه‌های مثبت شده با آنتی سرم اختصاصی، ژن‌های stx1، stx2 و eaeA را در سویه‌های جداسازی شده تشخیص دادیم که با نتایج Byrne همخوانی دارد. در باکتری‌های جدا شده یک سویه دارای ژن‌های stx1 و eaeA و یک سویه هم دارای ژن‌های stx1، stx2 و eaeA بود. این در حالی است که هیچ یک از نمونه‌های مثبت با آنتی‌سرم O157 ژن hly را نشان ندادند. این نتایج نشان دهنده فراوانی بیشتر ژن stx1 نسبت به ژن stx2، در باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های گوشت چرخ کرده در کشور ما می‌باشد.

اما در پژوهشی که در سال ۱۳۸۴ در جهرم توسط Kargar و همکاران بر روی ۵۰۰ نمونه شیر خام انجام شد، از ۱۷ نمونه مثبت با آنتی‌سرم تنها، در یک سویه ژن stx2 مشاهده گردید(۱۱). همچنین در پژوهش دیگر بر روی نمونه مدفوع کودکان زیر ۵ سال در شهرستان مرودشت، از ۶۱۵ نمونه مورد بررسی از ۷ کودک، باکتری E.coli O157:H7 جدا سازی گردید(فراوانی ۱/۱۴٪). از این تعداد تنها در یک سویه جداسازی شده، ژن‌های stx1 و eaeA (فراوانی ۰/۱۶٪)شناسایی گردید(۱۹).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

یکی از ویژگی‌های باکتری E.coli O157:H7 تفاوت در فاکتورهای ویرولانس سویه‌های مختلف آن می‌باشد. با اینکه وجود تمامی ژن‌های بیماری زای مورد بررسی در یک سویه می‌تواند دلیلی بر بیماری زایی محسوب شود، اما شباهت فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های جدا شده مناطق مختلف می‌تواند نشان دهنده شیوع یک سویه در مکان مورد پژوهش و معیاری برای اندازه‌گیری شدت بیماری‌زایی باکتری‌های در حال چرخش باشد. در همین راستا ما پژوهش‌های گسترده‌ای را در سطح کشور بر روی نمونه‌های کلینیکی و مواد غذایی مانند گوشت، شیر و پنیر در محیط‌های مختلف کشور انجام داده‌ایم. این پژوهش نیز مانند سایر تحقیقات قبلی در اصل مقدمه‌ای برای ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی این باکتری در ایران محسوب می‌گردد. پژوهش‌های قبلی ما در مورد نمونه‌های کلینیکی و مواد غذایی نشان داده که فراوانی ژن stx1 بیشتر از stx2 است و این نشان می‌دهد که در مناطق مختلف شیوع سویه‌ها می‌تواند متفاوت باشد. اما برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر در این مورد نیاز به مطالعات گسترده‌تری در مدت زمان طولانی‌تر و همچنین در سایر مناطق کشور می‌باشد(۱۹،۱۱).

با توجه به نمونه‌گیری در ۶ مرحله از چرخه تولید، در این پژوهش مشخص شد که با افزایش دفعات چرخ کردن گوشت میزان آلودگی افزایش می‌یابد. شاید بتوان افزایش سطح مقطع گوشت پس از چرخ شدن مجدد، چرخش و مخلوط شدن گوشت پس از چرخ شدن مجدد و عدم امکان تمیز کردن و جرم‌گیری ابزار فرآوری و چرخ گوشت بین دو مرحله چرخ کردن را از دلایل افزایش آلودگی‌ها دانست.

به دلیل محدودیت تحقیقات انجام شده در مورد نقش عوامل بیماری‌زایی باکتری E.coli O157:H7 و عدم تدوین یک پروتکل مدون و استاندارد در زمینه کنترل محصولات گوشتی و غذایی، این پژوهش می‌تواند زمینه ساز ارزیابی‌های دقیق‌تر در این مورد باشد.

همچنین با توجه به امکان آلودگی انواع فراورده‌های دامی با باکتری E.coli O157:H7 و تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها، ارزیابی ژن‌های بیماری‌زا و مقایسه ژنوتایپینگ سویه‌های جدا شده از مواد غذایی با نمونه‌های کلینیکی در سایر مناطق کشور توصیه می‌شود.

منابع:

1- Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López 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; 1(7):1-9.

2- Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, et al. ***Characterisation of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand.*** BMC Microbiology 2008;8(46):1-8.

3- Kim JY, Kim S, Kwon N, Bae WK, Lim JY, Koo HC, 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):7-19.

4- Paton AW, Paton JC. ***Detection and characterization of Shiga toxigenic escherichia coli by using multiplex PCR assay for stx1, stx2, eaeA, enterrohemorrhagic Escherichia coli hlyA, rfbO111, rfbO157.*** J Clin Microbiol 1998; 36(2):598-602.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

5- Pradel N, Liverlli V, Champs CD, Palcoun J, Reynaud A, Scheutz F, et al. ***Prevalence and characterization of Shiga-toxin producing Escherichia coli isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France.*** J Clin Microbiol 2000;38(3):1023-31.

6- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al. ***Serotypes, virulance genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)- producing Escherichia coli isolates from healthy sheep in spain.*** J Clin Microbiol 2003;41(4):1351-6.

7- Mohsin M, Hussain A, Butt MA, Bashir S, Tariq A, Babar S, et al. ***Prevalence of Shiga toxin- producing Escherichia coli in diarrheal patients in faisalabad region of pakistan as determined by multiplex PCR.*** J Infect Developing Countries 2007;1(2):164-9.

8- Estrada-Garcia T, Cerna JF, Paheco-Gil L, Velazquez RF, Ochoa TJ, Torres J, et al. ***Drug- resistant diarrheogenic Escherichia coli , Mexico.*** Emerging Infectious Disease 2005;11(8):1306-8.

9- Santaniello A, Gargiulo A, Borrelli L, Dipineto L, Cuomo A, Sensale M, et al. ***Survey of Shiga-toxin producing Escherichia coli in urban pigeons(Columba Livia) in the city of Napoli, Italy.*** Ital J Anim Sci 2007; 6(2): 313-6.

10- Hepburn NF, Macrae M, Johnston M, Mooney J, Ogden ID. ***Optimizing enrichment conditions for the isolation of Escherichia coli O157 in soils by immunomagnetic separation.*** Letters in Applied Microbiology 2002;34(5): 365-9.

11- Kargar M, Heidary S, Abbasian F, Shekarforosh Sh. ***Survey of prevalence and antibiotic susceptibility & Verotoxin production of E.coli verotoxigenic (E.coli O157:H7) in row milk of Jahrom Cows***. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2006; 34:7-11. [Persian]

12- Lui Y, Gilchrist A, Zhang J, Li XF. ***Detection of viable but nonculture able Escherichia coli O157:H7 bacteria in drinking water and river water***. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(5): 1502-7.

13- Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. ***Variation in virulence among clades of Escherichia coli O157:H7 associated with disease outbreaks.*** Proc Natl Acad Sci 2008;105(12): 4868-73.

14- Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Lagreid WW. ***Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing***. Proc Natl Acad Sci 2000; 97(7): 2999-03.

15- Aslantas O, Erdogan S, Cantekin Z, Gulacti I, Evrendilek GA. ***Isolation and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from Turkish cattle.*** Internatinal Journal of Food Microbiology 2006; 1o6(3): 338-42.

16- Islam MA, Mondol AS, Boer ED, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, et al. ***Prevalence and genetic characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from slaughtered animals in Bangladesh.***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(17):5414-21.

17- Pradel N, Bertin Y, Martin C. ***Molecular analysis of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France.*** Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(7): 2118-28.

18- Byrne CM, Erol I, Call JA, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ, et al. ***Characterization of Escherichia coli O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper midwest region of the united states.*** Applied and Environmental Microbiology 2003; 69(8): 4683-8.

19- Kargar M, Homayoon M, Yaghoobi R, Manookians A. ***Prevalence of virulence genes stx1, stx2, hly and eaeA with multiplex PCR from E.coli O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in Marvdasht.*** Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2009;14(44):7-12. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]

Prevalence of Shiga Toxins, Intimin and Hemolysin Genes of Escherichia coli O157:H7 Strains from Industrial Ground Meat in Shiraz

Kargar M(PhD)*[1], Daneshvar M(MSc)[2], Homayoon M(MSc)[3]

[1-3]*Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom, Iran*

Received: *18 Apr 2010* ***Accepted:*** *5 Aug 2010*

Abstract

Introduction: Escherichia coli O157:H7 is one of the major foodborne illness and sporadic case of human disease, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. The purpose of this study is to survey the prevalence of Escherichia coli O157:H7 virulence genes from ground meat in Shiraz.

Methods: In this research 504 samples of ground meat were collected from three main factories of meat products and enriched in Escherichia coli broth with novobiocin medium in 37ºC. Fermentation of sorbitol and lactose and β-glucoronidase activity of isolated strains were examined by CT-SMAC, VRBA and chromogenic media respectively. Then isolation of E.coli O157:H7 have been confirmed with the use of specific antisera and with multiplex PCR method presence of E.coli O157:H7 virulence genes including: stx_1, stx_2, eaeA, hly has been analysed.

Results: Out of specimens that have been supplied, 466 sorbitol negative bacteria were isolated in CT-SMAC medium(92.46%). The stx_1 and eaeA genes were diagnosed in two case of these samples(0.39 %) and stx_2 gene was detected in one case(0.19%) of isolated E.coli O157:H7 strains.

Conclusion: E.coli O157:H7 will continue to be an important public health concern as long as it contaminates meat. Preventive measures may reduce the number of cattle that carry it and the contamination of meat during slaughter and grinding.

Keywords: Escherchia coli; Meat; Shiga- Toxigenic Escherchia coli; Escherchia Coli In Fections

*** Corresponding author: Tel: +98 9173149203, Fax: +98 711 6476106, Email: mkargar@jia.ac.ir***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-13]