# مطالعه میزان آلودگی گوشت گاو عرضه شده در سطح شهرستان سنندج به *Escherichia coli* و تعیین سویه‌های فیلوژنیک آن‌ها

**هیوا کریمی دره ابی***

استادیار گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه ازاد اسلامی ، سنندج ، ایران

نویسنده مسئول: hiva60iran@yahoo.com

**(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/٤/۱۵ پذیرش نهایی: ۱٤۰۱/۷/۲۵)**

## چکیده

اشریشیاکلی سالهاست به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی و بیماری‌های روده‌ای مطرح بوده که با تولید انواع توکسینها می تواند باعث گاستروانتریت و کولیت خونریزی کننده در انسان و حیوانات گردد و از طریق فراورده‌های غذایی به انسان قابل انتقال می‌باشد.هدف از این مطالعه بررسی میزان گروههای فیلوژنیک(D،A, B1, B2 (اشریشیاکلی جدا سازی شده از گوشت گاو توزیع شده در سطح شهرستان سنندج می باشد. برای این منظور ۸۰ نمونه گوشت گاو تازه عرضه شده در سطح قصابی ها و فروشگاه های عرضه گوشت سنندج در شرایط استریل نمونه برداری شده و برای شناسایی اشریشیاکولای با روش‌های کشت متداول جداسازی اشریشیا کلی و تاییدیه پرگنه های مشکوک به اشریشیاکلی با استفاده از روش PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن uidA و سپس برای تعیین گروه‌های فیلوژنیک (A، B1، B2 و D) با استفاده از آزمون Multiplex PCR از پرایمرهای اختصاصی دو ژن chuA و yjaA و قطعه DNA ناشناس TspE4C2 استفاده گردید. نتایج حاصل از کشت میکروبی و مولکولی نشان داد که از ۸۰ نمونه گوشت گاو ، ۳۴ نمونه (۴۲.۵٪) آلوده به اشریشیاکلی اعلام گردید.نتایج حاصل از تست Multiplex PCR نشان داده شد که از ۳۴ نمونه اشریشا کلی، 8/5 (2) B2درصد ،گروه 62/23( 8 ) D درصد ،گروه 82/8 (3) B1درصد و گروه ( 21) A 76/61 درصد قرار گرفتند.نتایج نشان داد که مواد غذایی با منشا دامی یکی از مهمترین عوامل انتقال اشریشیا کولای بیماریزا به انسان می باشد .

کلمات کلیدی: سنندج، گوشت گاو ، اشریشیا کولای ، گروههای فیلوژنیک

## مقدمه

*اشریشیاکلی* جزء فلورطبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات است که برخی از سروتیپ های آن در کودکان ایجاد آنتریت می نماید و یکی از عوامل موثر در ایجاد اسهال در مسافرین و همچنین مسمومیت غذایی می باشد. اشریشیا کولی در قسمت انتهائی روده تمام حیوانات خونگرم وجود دارد ولی در روده حیوانات خونسرد معمولا یافت نمی شود (Derakhshandeh et al.,2014). *اشریشیاکلی* شامل پاتوژن‌هایی است که مسئول انواع عفونتهای روده ای و خارج روده ای بوده که می تواند از طریق طیف وسیعی از مواد غذایی به انسان انتقال پیدا کند(Liu et al.,2014). سویه‌های *E.coli* را می‌توان در ۳ گروه اصلی تقسیم بندی کرد: سویه‌های کومنسال، سویه‌های روده‌ای و سویه‌های پاتوژن خارج روده‌ای (Johnson et al., 2009). *اشریشیاکلی‌های* کومنسال بسیار کم مورد توجه‌اند چرا که بسیار در ایجاد بیماری مورد بحث قرار نمی‌گیرند در واقع آنها باکتری‌های غیرپاتوژنیک اند که می‌توانند همچنین پناهگاه ژن‌های بیماری‌زا باشند اما قادر به ایجاد بیماری نیستند زیرا ترکیبات ژن‌های بیماری‌زای اختصاصی را ندارند ولی به صورت وسیعی از انواع مواد غذایی جداسازی شده اند( KarimiDarehabi et al., 2013). در یک تحقیقنشان داده شد که با استفاده از حضور یا عدم حضور دو ژن ( chuA و yjaA) و یک قطعه DNA ناشناس TspE4C2 در یکی از گروه‌های اصلی فیلوژنیکی مورد بررسی قرار گرفت و گروههای مختلف فیلوژنیک *اشریشیاکلی* بر اساس داشتن یک، دو، همه یا هیچ یک از ژن‌ها تقسیم بندی شدند ( Clermont al, 2000 ; Duriez et al., 2001 ).ژن chuA ، ژن ضروری برای انتقال عوامل حدت در سویه‌های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک O157:H7 می باشد ، ژن YjaA در توالی ژنومی کامل اشریشیاکلی K12 وجود دارد اما عملکرد آن ناشناخته بوده و قطعه DNA ناشناس TspE4C2 که یک قطعه از کتابخانه ژنی اشریشیاکلی می باشد (Clermont et al, 2000). طبقه بندی سویه‌های *E.oli* در یکی از ۴ گروه اصلی A،B1،B2 و D می‌باشد و از سوی دیگر سویه‌هایی که در یکی از این ۴ گروه اصلی قرار می گیرند از نظر مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی با یکدیگر اختلاف دارند (Girardini et al.,213).

مطالعات نشان داد که *E.coli* پاتوژن خارج روده‌ای معمولاً متعلق است به گروه‌های $B_2$ و D در صورتی که سویه‌های کومنسال در گروه‌های A و $B_1$ قرار دارند ( Asai et al, 2011) و سویه‌های پاتوژن روده‌ای معمولاً به گروه‌های A، B1 و D مربوط‌اند و سویه‌هایی از گروه‌های $B_2$ و D ویژگی‌های بیماری‌زایی فراوانی را در مقایسه با سویه‌های گروه A و $B_1$ دارند (Nakhaee et al., 2015). مواد غذایی با منشا دامی یکی از مهمترین عوامل انتقال سویه های بیماریزا اشریشیاکولای به انسان بوده و با توجه به اینکه بیشتر گونه های بیماریزای اشریشیا کولای منشا دامی داشته لذا می تواند امنیت غذایی و بهداشتی مصرف کننده را به صورت جدی به خطر بیندازد (Sabarinath et al., 2011). هدف از انجام این تحقق بررسی میزان آلودگی گوشتهای توزیع شده در سطح شهرستان سنندج به اشریشیا کولای و تعیین گروههای فیلوژنیک آنها می باشد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه ۸۰ نمونه گوشت گاو از قصابی ها و فروشگاه‌های عرضه گوشت در سطح شهرستان سنندج

در شرایط استریل نمونه برداری و در مجاورت یخ به ازمایشگاه ارسال گردید. مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های اخذ شده را بعد از یکنواخت کردن و تلقیح به محیط کشت Lactose Broth به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کرده و سپس بر روی محیط کشت انتخابی EMB کشت خطی داده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. برای تاییدیه کلنی‌هایی رشد کرده از محیط کشت‌های افتراقی (سیمون سیترات، متیل رد (MR)، وگس پروسکوئر (Vp)،) کشت داده شد. ( Ghanbarpour and Salehi .,2010 ).

هر کدام از کلنی‌های خالص شده را به ۱/۵ میلی لیتر را به صورت جداگانه در محیط کشت Lactose Brothتلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرم‌خانه‌گذاری کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ کرده و سپس استخراج DNA نمونه ها توسط کیت سیناژن و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش در مرحله بعد به روش PCRtriplex اقدام شد. ژن هدف برای تشخیص اولیه جنس *اشریشیاکلی* در کلنی‌های جدا شده uidA است که پس از استخراج ژنوم نمونه‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* و انجام PCR و دیدن باند اختصاصی ژن هدف uidA ، تاییدیه پرگنه‌های جداشده با استفاده از روش مولکولی اخذ شد . واکنش Multiplex PCR برای گروه‌بندی فیلوژنیک جدایه‌ها با هدف قرار دادن دو ژن chuA و yjaA و قطعه ناشناس TspE4C2 انجام گرفت (جدول شماره ۱). تست PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل:PCR buffer (۲/۵ $\mu$ l)، (۰/۲ $\mu$TaqDNApolymerase)، Mgcl2 ($\mu$ l ۱)، d NTPs ($\mu$ l ۱)، هر کدام از پرایمرها (جدول۱) به میزان ( $\mu$l۱) و DNA استخراج شده از هر نمونه به میزان ( $\mu$l ۳)، مخلوط واکنش با افزودن آب یون زدایی شده به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید.

تکثیر ژن هدف در ترموسایکلر با برنامه سیکل‌های حرارتی شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد در ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت (Clermont et al, 2013).

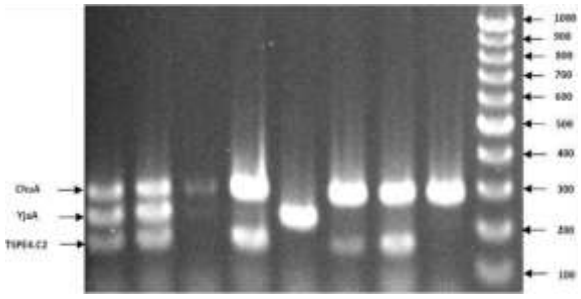
جدول۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص جنس اشریشیاکلی (Clermont et al, 2000).

| ژن هدف | پرایمر | نوکلوتید | وزن(bp) |
|---|---|---|---|
| ChuA | ChuA.F | 5´–GACGAACCAACGGTCAGGAT-3´ | ۲۷۹ |
| | ChuA.R | 5´-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3´ | |
| YjaA | YjaA.F | 5´-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3´ | ۲۱۱ |
| | YjaA.R | 5´-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3´ | |
| TspE4C2 | TspE4C2.F | 5´- GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3´ | ۱۵۲ |
| | TspE4C2.R | 5´- CGCGCCAACAAAGTATTACG-3´ | |
| uidA | uidA.F | 5´-GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG-3´ | ۵۰۳ |
| | uidA.R | 5´- GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT-3´ | |

## نتایج

در این تحقیق ، بر اساس روش کشت از مجموع ۸۰ نمونه، تعداد ۳٤ نمونه (٤۲.۵ درصد) آلوده به اشریشیاکلی تشخیص داده شد. براساس آزمایش PCR روی جدایه‌های حاصله، در نهایت همه ۳٤ نمونه به عنوان جدایه‌های آلوده به *اشریشیاکلی* مورد تایید قرار گرفتند. از این تعداد بعد از تعیین گروه‌های فیلوژنیکی، از ۳٤ نمونه اشریشا کلی، $B_2$ (۲) ۵/۸درصد ،گروه D ( ۸ )۲۳/٦۲ درصد ،گروه $B_1$ (۳) ۸/۸۲درصد و گروه A (۲۱ ) ٦۱/۷٦ درصد قرار گرفتند. (شکل ۱).

نتایج آزمایش مولتی پلکس PCR مشخص شده در ژل الکتروفوز نشان داد که زمانی که اصلا باند ندهد و یا فقط تنها باند۲۱۱ بدهد نشان دهنده گروه A می باشد زمانی که تنها باند ۱۵۹ را بدهد گروه B1در حالی که تنها باند ۲۷۹ بدهد و یا باند ۲۷۹ را با ۱۵۹ را بدهد گروه D و اگر که ۲۷۹ را با ۲۱۱ بدهد و یا اینکه سه تا باند را با هم بدهد مربوط به گروهB2 می باشد(Clermont et al, 2000).




تصویر ۱. تنیجه آزمایش multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای اختصاصیChuA، YjaA و TspE4C2 . ستون ۱: نشانگرbp 100 DNA- ستون ۲،۳،٤،٦ گروه D، ستون 5 و ۷ گروه A ، ستون ۷ و ۸ گروه B2

**بحث و نتیجه گیری:**

اشریشیا کلی باعث طیف گسترده ای از بیماری های روده ای و خارج روده ایی از قبیل اسهال ، عفونت ادراری، سپتی سمی و مننژیت می شود.اهمیت بیماری زایی اشریشیا کلی در زمینه بهداشت عمومی در سراسر جهان رو به افزایش است ، بنابراین تشخیص سویه های بیماریزا می تواند سهم قابل توجه ای در کنترل بیماریها و بهداشت عمومی جامعه باشد ( Vanessa et al.,2007). این باکتری به چندین گروه فیلوژنیک تقسیم می شوند که هر کدام خصوصیات اکولوژیکی متفاوتی دارند و قادر به ایجاد بیماری های متفاوتی می شوند ، بنابراین شناسایی جمعیت میکروبی جهت شناسایی اپیدمیولوژی بیماریها ضروری می باشد(Walk et al.,2007). سویه های جدا شده اشریشیاکولای را با توجه به ترکیبی از سه ژن *chuA* *yjaA* و.TspE4.C2 به یکی از چهار گروه نژادی اصلی A,D,B1,B2 اختصاص داده می شوند ، دو گروه نژادی A و B1 , گروه خواهری هستند در حالی که B2 مربوط به شاخه های اجدادی هستند(Escobar et al.,2006). تحقیقات نشان می دهد که سویه های متعلق به گروهای B2 و D دارای عوامل حدت بیشتری نسبت به سویه های گروه B1 می باشد (Johnson et al., 2009). تحقیقات انجام شده درباره پستانداران و پرندگان نشان می دهد که در پرندگان بیشتر ما شاهد گروه های D ، A و B1 بوده در حالی که در پستانداران انسانی A وB2 بوده و در پستانداران غیر انسانی بیشتر B1 می باشد (Escobar et al.,2006). در یک مطالعه که بر روی گروه های فیلوژنتیک در مدفوع انسانی در سه منطقه جغرافیایی به وسیله PCR انجام شد نتایج بدست آمده نشان می دهد که بیشترین مقدار گروه ها مربوط به A و B1 بوده و کمترین گروه مربوط به گروه B2 می باشد که این توزیع خاص می تواند بدلیل اثر تغذیه ای و منطقه جغرافیایی محل سکونت افراد باشد (Duriez et al.,2001) . در مطالعه که در سال ۹۲ بر روی اشریشیاکولاهای جداسازی شده از غذاهای منجمد با منشا دامی و سویه های جدا سازی شده از اسهال کودکان صورت گرفت و گروههای فیلوژنیک انها بررسی گردید نتایج نشان دادند که بیشترین گروه فیلوژنیک یافت شده در هر دو گروه ، تیپ A بوده که می تواند نشان دهنده انتقال این سویه از مواد غذایی به کودکان باشد (KarimiDarehabi et al., 2013 ).مطالعات نشان داد که تغییر اکوسیستم ، تغییرات تغذیه ای ، فرایند های انسانی و زیست محیطی میتواند بر فلور طبیعی حیوانات و انسان تاثیر بگذارد بدین صورت که حیوانات اهلی دارای فلور میکروبی شبیه انسان دارد و دارای میزان بالای گروه های Aو B1 و نسبت پایین تری از گروه های B2,D را نسبت به حیوانات وحشی دارند و بیان کردند که پاتوژن های خارج روده ای معمولا به گروه های B2 و D تعلق دارند و بیشتر آنها منشا دامی دارند در حالی که سویه های کامنسال مربوط به گروه B1 در انسان است( et Escobar al.,2006) . با توجه به بررسی گروه های فیلو ژنتیک، مقاوم ترین گروه های زیست محیطی مربوط به $B_2$ می باشد یا به عبارتی دیگر سویه های اشریشیا کولای موجود در گروه B2 مهمترین عوامل بیماریزایی شناخته می شوند (Xia et al., 2011 ). نتایج ما در این تحقیق نشان داد که متداول‌ترین گروه

فیلوژنیک شناسایی شده در نمونه های گوشت گروه D و A می‌باشد.هر چند تعداد سویه های اشریشا کولای قرار گرفته شده در گروه B2 هم حائز اهمیت می باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می رسد اشریشیاکلی می تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد بیماری های مختلف بویژه اسهال در کودکان در کشور ما مطرح باشد که بایستی برای شناسای ی آنها از تکنیک های مختلف جدید و مبتنی برDNA بهره گرفت. در این راستا مطالعه ما با هدف شناسایی این سویه ها و تعیین گرو های فیلوژنتیک در گوشت های عرضه شده در شهرستان سنندج و مقایسه ان با نمونه های بیمارستانی و اتخاذ برنامه های پیشگیری و درمانی مناسب و تجویز آنتی بیوتیک های موثر صورت گرفت.

## منابع


- Asai et al.: 2011.Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of Escherichia coli from diseased food-producing animals in Japan. Acta Veterinaria Scandinavica 53:52.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol 66: 4555–4558.
- Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur and D. M.Gordon.(2013). The Clermont Escherichia coli phylotyping method revisit-ed: improvement of specificity and detection of new phylo-groups;Env Microbiol Reports; 5: 58-65.
- Derakhshandeh, A., R. Firouzi and Z Naziri. (2014). Phylogenet-ic group determination of faecal Escherichia coli and comparativeanalysis among different host; IJVR; 15( 1): 13-17.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventre´, A., Elion, J., Picard, B. & Denamur, E. 2001 Commensal Escherichia coli isolates are phylogeneticallydistributedamong geographically distinct human populations. Microbiology 147, 1671–1676.
- Escobar-Pژramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D, Denamur E: 2006. Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ Microbiol, 8:1975-1984.
- Ghanbarpour, R. and M. Salehi. (2010). Virulence genotyping of Escherichia coli isolates from avian cellulitis in relation to phy-logeny; Comp Clin Pathol; 19(2): 147–153.
- Girardini L.K., Siqueira F.M., Krewer C.C., Krewer C.C., Costa M.M. & Vargas A.C. 2012. Phylogenetic and pathotype analysis of Escherichia coli swine isolates from Southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 32(5):374-378.
- Johnson, T. J., Logue, C. M., Wannemuehler, Y., Kariyawasam, S., Doetkott, C., DebRoy, C., White, D. G. and Nolan, L. K. 2009. Examination of the source and extended virulence genotypes of Escherichia coli contaminating retail poultry meat. Food-borne Pathog. Dis. 6: 657-667.
- KarimiDarehabi, H., M. H. Naseri, S. Menbari, J. Mobaleghiand E. Kalantar. (2013). Antibiotic resistance patterns of Esche-richia coli groups A, B1, B2 and D isolated from frozen foods and children with diarrhea in Sanandaj, Iran; Int J Enter Pathog; 1(1):1-4.
- Liu, Y., Liu, G., Liu, W., Liu, Y., Ali, T., Chen, W., Han, B. (2014). Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial re- sistance of Escherichia coli associated with bovine mastitis. ResMicrobiol ; 165(4), 273-277.

- Nakhaee, P., S. M. Peighambari and J. Razmyar. (2015). Phylo-genetic group determination of Escherichia coli isolated from broil-ers and layers with colibacillosis; Iran J Vet Sci Tech; 7( 1): 12-21
- Sabarinath, A., K. P. Tiwari, C. Deallie, G. Belot, G. Vanpee,V. Matthew, R. Sharma and H. Hariharan. (2011). Antimicrobialresistance and phylogenetic groups of commensal Escherichia coliisolates from healthy pigs in Grenada. Webmed Central VeterinaryMedicine 2(5): 1942
- Vanessa B, Marcelo Palma S, Carla Romano T, Maurilio FS, Marcia Regina F, Marina Baquerizo M,Suzana Ramos F. 2007 . Diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz Nov; 102(7): 839-44.
- Walk, S. T., E. W. Alm, EW, L. M. Calhoun, J. M. Mladonicky and T. S. Whittam. (2007). Genetic diversity and population struc- ture of Escherichia coli isolated from freshwater beaches; Environ Microbiol; 9: 2274-2288.
- Xia, X., Meng, J., Zhao, S., Bodeis-jones, S., Gaines, S. A., Ayers, S. L. and Mcdermott, P. F. 2011. Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic Escherichia coli from retail meats. J. Food Prot. 74: 38-44.

# Survey infection of Genetic diversity of *E. coli* strains isolated from beef cattle in sanandaj

*Hiva karimi darhabi* *

* *1-Assistant Professor of Food Hygiene Department, College of Veterinary Science, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.*

*Corresponding Author's E.Mail: hiva60iran@yahoo.com

(***Received:*** *Jun. 2022* ***Accepted:*** *Oct. 2022* **)**

**Abstract**

*Escherichia coli* often lead to foodborne pathogen and generally considered public health importance. *Escherichia coli* can be produce one or more Shiga toxins, which may produce diarrhea, hemorrhagic colitis and life-threatening hemolytic uremic syndromein humans and animals .The aim of the present work was to investigate the *Escherichia coli* groups A, B1, B2 and D of 80 samples from beef cattle in sanandaj . result shows that 34 samples(42.5%) E. coli isolated and identified based on standard procedures and PCR method with uidA gene .phylogenetic group of each strain was determined by using multiplex PCR method with chuA ,yjaA and segment of DNA TspE4C2. In this study, Among the strains isolated *e.coli* from beef cattle were allocated into phylogenetic group A (61.76%), B2 (5.8%), D(26.62%) and group $B_1$ (8.82%). Detection of E.coli isolation is very important and shows that food of animal origin can be of a reservoir that potentially could be transferred to humans the food chain.

**Key words:** beef cattle **,** *Escherichia coli,* phylogenetic groups