دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از گوشت خام دام و طیور با روش RAPD-PCR

ماندانا لطفی[1]، حسن ممتاز[2]*، الهه تاجبخش[3]

۱. دانش آموخته دکترای میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hamomtaz@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵

چکیده

باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 یکی از مهم‌ترین سویه‌های بیماری‌زای روده‌ای است که معمولا از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل می‌شود. این سویه عامل ایجاد کولیت خونریزی‌دهنده، سندرم HUS، ترومبوتیک سیتوپنیک پورپورا و در مواردی مرگ است. مخزن اصلی این باکتری نشخوارکنندگان هستند. هدف از این پژوهش دسته‌بندی ژنتیکی (ژنوتایپینگ) ایزوله‌های این سویه جدا شده از گوشت خام دام و طیور با روش RAPD-PCR است. ۳۴۴ نمونه گوشت خام نشخوارکنندگان و طیور از مراکز عرضه گوشت تازه در شهرهای اصفهان و شهرکرد جمع‌آوری و پس از کشت و جداسازی *اشریشیاکلی* از آن ها، حضور سروتیپ O157:H7 با استفاده از روش PCR تایید شد. جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله های O157:H7 جدا شده از روش RAPD-PCR استفاده شد. از مجموع ۳۴۴ نمونه گوشت خام مورد مطالعه، ۲۰۲ جدایه *اشریشیاکلی* (۵۸/۷درصد) جداسازی شد که میزان آلودگی به سویه O157:H7 در آن ها، ۱۷/۸ درصد (۳۶ نمونه) بود. دسته بندی ژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* O157:H7، ۹ پروفایل مختلف را در میان این ۳۶ جدایه نشان داد و قرابتی معادل ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد در بین ایزوله ها یافت شد. در این پژوهش تشابه مولکولی زیادی بین سویه‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از گوشت حیوانات مختلف در شهرهای اصفهان و شهرکرد دیده شد. همچنین مشخص شد که روش RAPD-PCR روشی ساده، سریع و ارزان جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* ازجمله سویه O157:H7 می‌باشد.

کلید واژه ها: *اشریشیاکلی* O157:H7، RAPD-PCR، دسته بندی ژنتیکی، گوشت خام.

مقدمه

اشرشیا کلی، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است، که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. این باکتری، ۰/۱ درصد فلور روده را به خود اختصاص داده است و از طریق مسیر مدفوعی-دهانی (oral- fecal) از یک فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود (Johnson et al., 2001). بیشتر سویه‌های *اشرشیا کلی* ، غیر بیماری زا هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند O157:H7 موجب بروز بیماری‌های مختلف و حتی مرگ می‌شوند (Kaper., 2004). سروتیپ‌های بیماری‌زای *اشرشیا کلی* ترکیبات سلولی منحصر به فردی که در ارتباط با بیماری‌زایی باکتری می‌باشند را به تدریج تولید می‌کنند. این ترکیبات شامل انتروتوکسین‌ها، سیدروفورها، وروتوکسین‌ها و همولیزین‌ها می‌باشند. که در مورد سویه *اشرشیا کلی O157:H7* مهم‌ترین عامل بیماری-زا، وروتوکسین می‌باشد، این توکسین با جلوگیری از سنتز پروتئین موجب مرگ سلول‌ها می‌شود. سروتیپ O157:H7 عامل اصلی ایجاد کولیت خونریزی‌دهنده[1] و سندرم HUS[2]است. البته در برخی منابع به وجود بیماری دیگری به نام ترومبوتیک سیتوپنیک پورپورا

۱ Hemorrhagic colitis

۲ Hemamolytic Uraemic Syndrom

(TTP) و مرگ نیز اشاره شده است (Nasonova et al., 2008). بیماری‌های یاد شده می تواند با بروز ناگهانی، تمامی گروه های سنی را درگیر سازد. این باکتری برای اولین بار در آمریکا به دنبال استفاده از گوشت های آلوده در رستوران های زنجیره ای شناسایی گردید. بزرگ ترین شیوع این باکتری در کشور ژاپن به دنبال مصرف تربچه گزارش شده است که باعث بروز بیش از ۹۰۰۰ مورد بیماری و ۷ مورد مرگ شد (Murphy et al., 2005). حیواناتی مثل گاو، گوساله و گوسفند مخزن اصلی این سویه‌ها هستند. گوشت گوساله مهمترین منبع غذایی است که معمولا در کشتارگاه‌ها و در طی مراحل مختلف کشتار آلوده می‌شود (Reinders et al., 2002). علاوه‌بر این گزارشاتی مبنی بر آلودگی گوشت گوسفند و بز نیز وجود دارد (Manning et Lan and Reeves., 2002 and al., 2008).

امکان انتقال باکتری از حیوانات به انسان، از راه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و مصرف مواد غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه آلوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت، ساندویچ های گوشتی، سبزیجات، آب میوه ها به ویژه آب سیب وجود دارد (Gould et al., 2009). این باکتری از منابع مختلف دامی نظیر شیرخام، گوشت خام، پنیر سنتی و انواع نمونه‌های کلینیکی دامپزشکی جدا شده است و در اکثر گزارشات مربوط به تحقیقات انجام شده در دامپزشکی به نقش بالقوه این باکتری در انتقال مقاومت‌های دارویی از دام به انسان اشاره شده است. از طرفی تاکنون مطالعات زیادی در خصوص ردیابی باکتریولوژی و مولکولی این ارگانیسم از منابع دامی در ایران انجام نشده است، لذا ضروری به نظر می‌رسد که علاوه بر جداسازی این باکتری از منابع غذایی دامی (گوشت و شیر) به تعیین ارتباط ژنتیکی ایزوله‌های دامی و انسانی *اشرشیا کلی O157:H7* پرداخته شود (B´ elanger et al., 2011).

از روش های تشخیصی گوناگونی جهت شناسایی این باکتری استفاده می گردد که از آن جمله می توان به روش های سرولوژیکی، کشت سلولی و روش های مولکولی اشاره کرد. در سال های اخیر با پیشرفت تکنولوژی، استفاده از روش های مولکولی بر پایه PCR به علت حساسیت بسیار بیشتر نسبت به روش های دیگر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. از مهمترین روش های بر پایه PCR می توان به روش چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA (RAPD-PCR) (Random Amplification of Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction) اشاره کرد. در این پژوهش به منظور دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌هایدامی از روش RAPD-PCR، استفاده شد. در این روش از پرایمر غیر اختصاصی به طول ۸-۱۲ یا ۵-۱۵ نوکلئوتیدی استفاده می شود. پس از الکتروفورز محصول PCR در نمونه های مختلف، برای هر نمونه یک پروفایل نسبتا منحصر به فرد به دست می آید که می توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن های باکتریایی استفاده کرد (Nasonova et al., 2008).

مطالعه حاضر با هدف ردیابی سروتیپ O157:H7 اشریشیاکلی در گوشت خام دام و طیور عرضه شده در سطح بازارهای شهرهای اصفهان و شهرکرد و دسته بندی ژنتیکی ایزوله های جدا شده با روش RAPD-PCR انجام شده است.

روش کار

جمع آوری، جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها

در این مطالعه مقطعی-توصیفی تعداد ۳۴۴ نمونه از گوشت خام نشخوارکنندگان و طیور (۹۴ نمونه گوشت گاو، ۵۶ نمونه گوشت گوسفند،۸۰ نمونه گوشت مرغ، ۴۴ نمونه گوشت بوقلمون و ۷۰ نمونه گوشت شتر) از مراکز عرضه گوشت تازه دام و طیور در نقاط مختلف

شهر اصفهان و شهرکرد در فاصله زمانی مرداد ۱۳۹۶ تا مرداد ۱۳۹۷ جمع آوری گردید.

۱۰ گرم از هر نمونه گوشت دام و طیور بعد از هموژن کردن در دستگاه Stomaker (AES Chemunex, Combourg, France) در ۹۰ میلی‌لیتر محیط مایع TSB کشت داده شد (Rahimi et al., 2008). به منظور شناسایی اولیه *اشریشیاکلی* ، کشت در محیط مک کانکی (Mac Conkey) (مرک، آلمان) و آزمایشات مختلف بیوشیمیایی مانند رشد در محیط ائوزین متیلن بلو (EMB) (مرک، آلمان)، واکنش تولید اسید در محیط TSI (مرک، آلمان)، واکنش IMViC (با کشت در محیط های SIM، MR/VP و سیمون سیترات (مرک، آلمان)) انجام شد (Mahon et al., 2007).

شناسایی مولکولی ایزوله ها به روش PCR

به منظور تأیید جدایه های احتمالی *اشریشیاکلی* تکثیر ژن*16srRNA* با روش PCR انجام گردید. جهت انجام PCR ابتدا ژنوم باکتری هایی که بر اساس تست های بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیاکلی* تشخیص داده شدند به کمک کیت استخراج DNA (سیناژن-ایران) استخراج شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *16srRNA* در جدول۱ نشان داده شده است . واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرو مول $dNTP_S$ ، ۲ میلی مول $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس ـ لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای 94^0C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ^0C ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ^0C ۵۸ به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه. درنهایت محصولات PCR در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلوباز و از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC25922 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی سروتیپ *اشریشیاکلی O157:H7*

به منظور شناسایی ملکولی جدایه‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 از پرایمرهای مربوط به ردیابی آنتی ژن سوماتیک *O157* و فلاژل *fliCH7* درج شده در جدول ۱ در قالب یک واکنش PCR چندگانه‌ای استفاده شد (Paton and Paton., 1998 and Gannon et al., 1997). واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۱۵۰ میکرو مول $dNTP_S$ ، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس ـ لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای 94^0C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ^0C ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ^0C ۵۸ به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و در پایان با دستگاه transilluminator UV مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنترل مثبت *اشریشیاکلی* O157:H7 از کلکسیون باکتری‌های گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه گردید و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ایزوله‌های O157:H7، جدا شده در این مرحله

شامل ایزوله های 21A, 22A, 24A, 25A, 26A, 27A, 28A, 29A, 30A, 32A, 34A, 4H, 11H, 12H, 13H (جدا شده از گوشت مرغ)، 31A, 33A, 1H, 6H, 7H, 8H, 9H, 16H (جدا شده از گوشت گاو)، 35A, 3H, 10H, 14H, 15H(جدا شده از گوشت گوسفند)، 23A, 5H(جدا شده از گوشت بوقلمون)، 19A, 20A, 36A, 2H (جدا شده از گوشت شتر)، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

دسته‌بندی ژنتیکی جدایه‌های *اشرشیاکلی O157:H7* به روش RAPD-PCR

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های O157:H7 *اشریشیاکلی* با استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی AACGCGCAAC انجام شد (Marialouis and Santhanam., 2016). واکنش نهایی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA هدف، ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میکرومول پرایمرRAPD، ۳۰۰ میکرو مول $dNTP_S$ ، ۴ میلی مول $MgCl_2$ و ۳ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (فرمنتاس ـ لیتوانی) انجام شد. برنامه دمایی دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ^0C ۹۵ به مدت ۸ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ^0C ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ^0C ۲۸ به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه. درنهایت محصولات PCR مربوط به مرحله فوق در ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز گردید و در پایان با دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز ۳۶ ایزوله با نرم افزار (Bionumerics software Applied Maths, Sint-Martems-Latem, Belgium) و ضریب تشابه دایس آنالیز شدند. ایزوله هایی با شباهت بالای ۸۰ درصد دریک پروفایل قرار گرفتند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

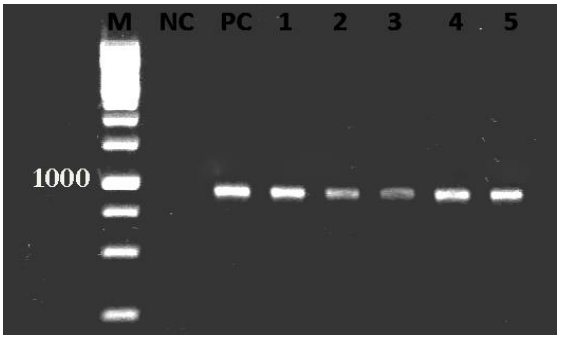
هدف	نام ژن	توالی پرایمر (۵"-۳")	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
شناسایی *اشریشیاکلی*	*16srRNA*	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	۹۱۹	(Momtaz et al., 2013a)
شناسایی O157	*O157*	CGGACATCCATGTGATATGG TTGCCTATGTACAGCTAATCC3	۲۵۹	(Momtaz et al., 2013b)
شناسایی H7	*fliCH7*	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	۶۲۵	(Momtaz et al., 2013b)

نتایج

از مجموع ۳۴۴ نمونه گوشت خام مورد مطالعه، تعداد ۲۰۲ نمونه (۵۸/۷ درصد) آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* بودند که تمام ایزوله های جدا شده در آزمایش PCR با ردیابی ژن *16srRNA* در آن ها تایید شدند (تصویر ۱).

از ۲۰۲ ایزوله *اشریشیاکلی* جدا شده، تعداد ۳۶ ایزوله معادل ۱۷/۸ درصد از نمونه‌ها (۲۲/۲۲ درصد گوشت گاو، ۱۱/۱۱ درصد گوشت گوسفند، ۳۳/۳۳ درصد گوشت مرغ، ۱۶/۶۶ درصد گوشت بوقلمون، ۱۶/۶۶ درصد گوشت شتر) به سویه *اشرشیاکلی*O157:H7 آلوده بودند (تصویر ۲). ۳۶ ایزوله مربوط به سروتیپ O157:H7 انتخاب و به روش RAPD-PCR ژنوتایپ شدند. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، ایزوله های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدوده ۱۲۰ تا بالای ۱۰۰۰۰ جفت باز بودند. آنالیز RAPD، نه پروفایل مختلف در ۳۶ ایزوله را نشان داد و قرابتی معادل ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد بین ایزوله‌ها مشاهده شد و

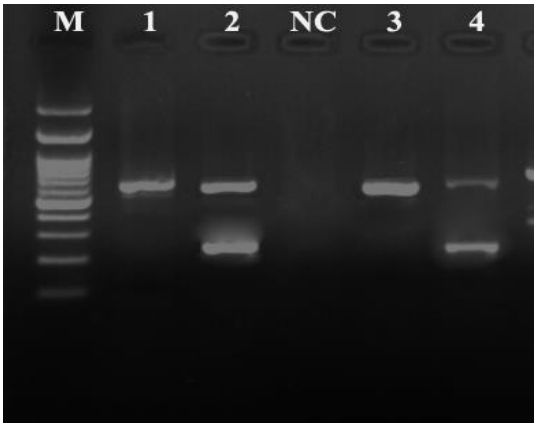
جدایه‌هایی که قرابت بالای ۸۰ درصد داشتند در یک بالای ۸۰ درصد، ایزوله‌های 2H و 20A در پروفایل نه با ضریب تشابه ۹۰/۹ درصد، ایزوله‌های 22A و 25A در پروفایل شماره یک با ضریب تشابه ۸۵/۷ درصد، ایزوله‌های 1H و6H در پروفایل چهار با ضریب تشابه ۸۴/۲ درصد، ایزوله‌های 30A,31A,32A,33A,34A در پروفایل هشت با قرابت ۸۴ درصد، ایزوله‌های 27A,28A,7H,8H,16H در پروفایل شماره دو با قرابت ۸۲/۶ درصد، ایزوله‌های 24A, 29A در پروفایل هفت با ضریب تشابه ۸۲/۴ درصد، ایزوله‌های 4H,11H,12H,13H در پروفایل سه با ضریب تشابه ۸۱/۲ درصد، ایزوله‌های 21A, 15H در پروفایل شش با قرابت ۸۰ درصد و ایزوله‌های 35A,3H,9H,14H در پروفایل پنج با ضریب تشابه ۸۰ درصد قرار گرفتند. لازم به ذکر است کمترین میزان تشابه در ایزوله 19A جدا شده از گوشت شتر با سایر ایزوله ها با قرابت ۴۳/۷



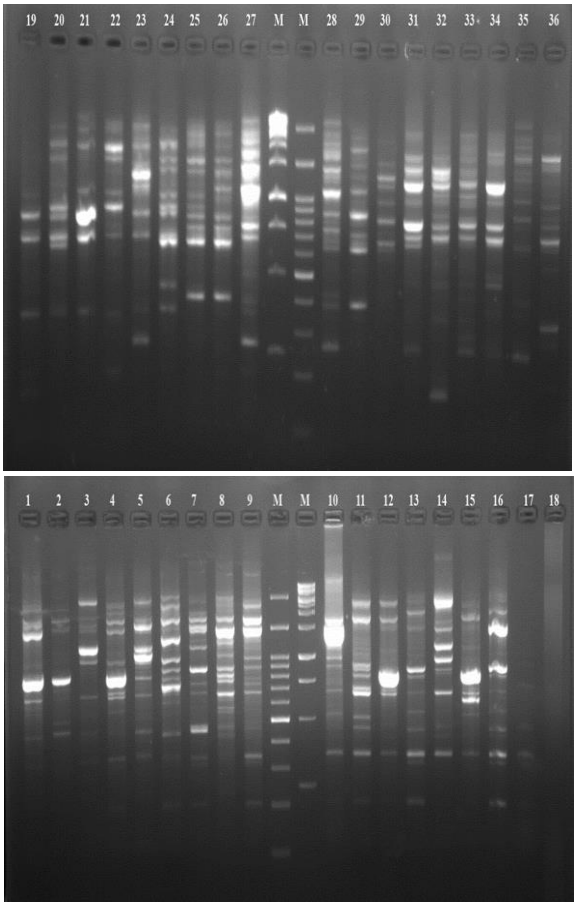
درصد مشاهده شد (تصویر ۴).

تصویر ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* (ستون M=مارکر یک کیلو بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 5-1= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

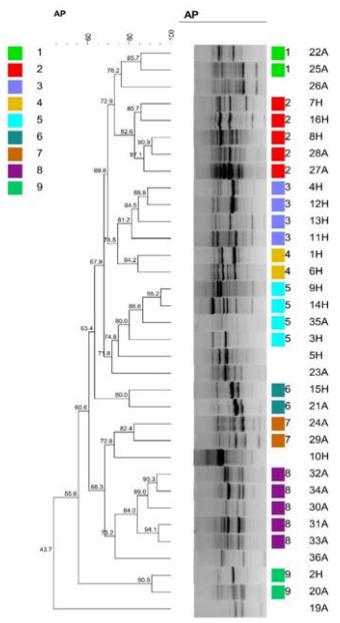
پروفایل قرار گرفتند. با در نظر گرفتن ضریب تشابه



تصویر ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن های *fliCH7* و *O157* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* (ستون M=مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون‌های 4-1= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۶۲۵ و ۲۵۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن های *fliCH7* و *O157*).



تصویر ۳- باندهای حاصل از آنالیز RAPD-PCR مربوط به *اشرشیاکلی*O157:H7 جدا شده از گوشت خام (ستون های M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی و ۱ کیلوبازی DNA).



تصویر۴- دندروگرام حاصل از دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از گوشت خام با نشانگر RAPD-PCR

بحث

یکی از مهم‌ترین سویه های *اشریشیاکلی*، سویه *اشریشیاکلی* O157:H7 است که به عنوان یکی از خطرناک ترین سویه های بیماری‌زا معرفی شده است. سویه *اشریشیاکلی* O157:H7 هر سال باعث بروز چندین مورد مرگ می‌شود این باکتری بیشتر از طریق مواد غذایی مختلف خصوصاً مواد غذایی با منشاء دامی به انسان منتقل می‌شود. حیوانات به ویژه نشخوارکنندگان از مخازن اصلی این باکتری هستند. با توجه به اهمیت موضوع، در نقاط مختلف جهان وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی ناشی از آلودگی به *اشریشیاکلی* بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. از جمله این مطالعات می توان به گزارش خان و همکاران (۲۰۰۲) در شهر کلکته (کشور هندوستان)، اشاره نمود، که در طی آن میزان شیوع این باکتری در نمونه‌های مدفوع گاو ۱۸ درصد و درگوشت خام کشتارگاه‌ها ۵۰ درصد بآورد گردید. گزارش های متفاوتی در مورد میزان جداسازی باکتری یاد شده در کشورهای مختلف منتشر شده است. دربعضی از مناطق میزان شیوع این سویه را مشابه با *شیگلا* و در برخی کمتر و یا بیشتر از آن نیز گزارش کرده اند (Khan and Yamasaki., 2002). در ایالت متحده تخمین زده می شود که سالیانه ۷۳۰۰۰ مورد عفونت و ۶۱ مورد مرگ به علت عفونت با *اشریشیاکلی* O157:H7 روی دهد (Baffone et al., 2001). همچنین بیماری اورمی همولیتیک (HUS) ناشی از این باکتری عامل بیشتر نارسایی‌های حاد کلیوی در کودکان این کشور می باشد (Widiasih et al., 2003). اکثر گزارشات موجود در خصوص ردیابی *اشریشیاکلی* O157:H7 در کشورهای مختلف نشان می دهد که گوشت گاو به عنوان مهم ترین مخزن دامی در انتقال این پاتوژن به انسان نقش دارد. این در حالی است که میزان آلودگی گوشت گاو به *اشریشیاکلی* O157:H7 در کشورهای مختلف بسیار متفاوت و از ۰ تا ۴۵ درصد متغییر بوده است. آلودگی سایر مواد غذایی به این پاتوژن بسیار پایین‌تر گزارش شده است. اما در تحقیق حاضر از بین نمونه های گوشت خام مورد مطالعه بیشترین میزان آلودگی به سویه *اشرشیاکلی* O157:H7 معادل ۳۳/۳۳ درصد در گوشت مرغ مشاهده شد.

میزان موارد تائید شده آلودگی به *اشریشیاکلی* O157:H7در سال 2007 در اسکاتلند، ۹ مورد و در سال 2008 در ویرجینیای آمریکا، ۲۵ مورد بوده است. در سال 2008 در ۴۰ اپیدمی (۲۱ مورد در میشیگان و ۱۹ مورد در اوهایو) آلودگی مواد غذایی به سروتیپ O157:H7 تائید شده است (Dontorou et al., 2003). در ایران برای اولین بار سالک مقدم و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی ۲۰۰۰ نمونه ماده غذایی مختلف، تنها از یک نمونه سبزی، موفق به جداسازی *اشریشیاکلی* O157:H7 شدند (Salek Moghaddam et al., 2003). اصلانی و بوذری درسال ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳ با بررسی ۲۰۰۸ نمونه مدفوع انسان در غرب (ایلام) و

شمال ایران (مازندران و گلستان) میزان شیوع *اشریشیاکلی* تولیدکننده وروتوکسین را به ترتیب ۴/۹ و ۰/۷ درصدگزارش کردند. اما هیچ کدام از نمونه ها سروتیپO157:H7 نبودند (Aslani and Bourzari., 2003). نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که میزان شیوع این باکتری از سال ۱۹۹۸ تا کنون در ایران بسیار بالا رفته است، متاسفانه پژوهش های انجام شده در کشور ما بیشتر محدود به نمونه های کلینیکی بوده است و با توجه به مخازن این سویه خطرناک که عمدتا گوشت خام دام و طیور و محصولات لبنی می-باشد، لازم است پژوهش‌های بیشتری به منظور بررسی آلودگی در این نمونه ها انجام شود.

در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی امروزه روش‌های تایپینگ مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند که بسیار کارآمدتر از روش های قبلی می‌باشند. در روش RAPD-PCR برای هر نمونه یک پروفایل نسبتا منحصر به فرد به دست می آید که می توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن های باکتریایی استفاده کرد. از نقاط قوت این روش این است که برای به دست آوردن پروفایل RAPD نیاز به داشتن اطلاعات قبلی از توالی DNA مورد نظر نیست و این مزیت باعث کاربرد گسترده این تکنیک در تست‌های میکروبیولوژیک شده است (Durmaz et al., 2009). در مطالعه حاضر جدایه‌های *اشریشیاکلی O157:H7* با نشانگر RAPD-PC آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آن‌ها با ضریب دایس و الگوریتم UPGMA تعیین گردید. بیشترین و کمترین درصد قرابت از ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد بین جدایه‌های مورد مطالعه دیده شد و همانگونه که در تصویر ۳ مشهود است، جدایه‌های *اشریشیاکلی*O157:H7 مورد بررسی در سطح تشابه بالای ۸۰ درصد در ۹ پروفایل قرار گرفتند که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا بین جدایه‌های مورد مطالعه می‌باشد. فادل و همکاران (۲۰۱۸)، *اشریشیاکلی*‌های مولد شیگا توکسین را در برخی از گونه‌های پرنده‌های وحشی بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که پرنده‌های وحشی سویه-های *اشریشیاکلی* مولد شیگا توکسین را حمل کرده و می‌توانند باعث انتقال و افزایش آلودگی در محیط زیست شوند (Fadel et al., 2017).

در مطالعه ای که توسط سواردانا و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد، تنوع ژنتیکی *اشریشیاکلی*O157:H7 با روش RAPD بررسی شد، که نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله های مختلف انسانی که از بیماران و افراد سالم جداسازی شده بودند، کلاستر های ژنتیکی مشابهی با ایزوله های حیوانی که از گوشت گاو، گوساله و مرغ جداسازی شده بودند، دارند و ضریب همبستگی ژنتیکی آنها بیش از ۷۰ درصد بود. این نتایج نشان داد که *اشریشیاکلی*O157:H7 می تواند از حیوانات اهلی به انسان منتقل شود (Suardana et al., 2013). هاپکینز و هیلتون (۲۰۰۱) تنوع ژنتیکی *اشریشیاکلی O157:H7* مولد شیگا توکسین را با استفاده از روش RAPD-PCR بررسی کردند. آنها در این تحقیق بیان کردند که تکنیک RAPD-PCR، روشی بسیار سریع و کاربردی است آنها همچنین به منظور تمایز بین سویه-های مشابه، اثر یک آنزیم اندونوکلئاز محدود الاثر را روی قطعات حاصل از RAPD-PCR بررسی نمودند (Hopkin and Hilton., 2001). چنسیریپورن چای و همکاران (۲۰۰۱)، با استفاده از روش RAPD تایپینگ ژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا در مرغ ها را بررسی کردند. در این مطالعه ۵۵ سویه *اشریشیاکلی* مرغی با روش RAPD بررسی شد. آنالیز RAPD نشان داد که سویه های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از مرغ ها در تایلند و سوئد می توانند به ۵۰ الگوی RAPD-Type تنها با استفاده از دو سری پرایمر

تقسیم شوند. بیشتر این پروفایل ها، محدود به منطقه جغرافیایی خاصی نبودند و همانطور که انتظار می رفت ارتباط ژنتیکی زیادی بین سویه های جداسازی شده از یک مزرعه وجود داشت. در این مطالعه روش RAPD به عنوان یک روش سریع، ارزان، ساده و به عنوان یک ابزار قوی برای بررسی اپیدمیولوژیکی سویه های اشریشیاکلی بیماری زا در مرغ ها پیشنهاد شد (Chansiripornchai et al., 2001). نیلسن و همکاران (۲۰۱۴)، *اشریشیاکلی* با منشا مدفوعی را در بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری با باکتری *اشریشیاکلی*، بررسی کردند. در این مطالعه افراد سالم که هرگز عفونت ادراری نداشتند به عنوان کنترل بررسی شدند. بیش از ۲۰ کلنی *اشریشیاکلی* از هر سواپ رکتال با روش RAPD بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۴۲ ایزوله از ۴۸ سویه جداسازی شده از مجاری ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری، مشابه ایزوله های موجود در فلور روده است.این اولین مطالعه ای بود که نشان داد *اشریشیاکلی* با منشا مدفوعی با عفونت ادراری در ارتباط است (Nielsen et al., 2014). در یک مطالعه، رادو و همکاران (۲۰۰۱) موفق به دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از مواد غذایی گوشتی مثل همبرگر، مرغ و غیره شدند. به این منظور آن‌ها از روش RAPD-PCR استفاده کردند که ایزوله‌ها در ۲ کلاستر قرار گرفتند(Radu et al., 2001). دارکازانیل و همکاران (۲۰۱۸) تنوع ژنتیکی سویه *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از گیاهان آبیاری شده با آب رودخانه آلپو را با استفاده از روش RAPD-PCR بررسی نمودند نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که سویه‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 جداسازی شده تنوع ژنتیکی بسیار بالایی را نشان می‌دهند. آن‌ها همچنین اذعان داشتند که تکنیک RAPD-PCR روشی بسیار سریع و کاربردی است (Darkazanli et al., 2018). افشاری و همکاران (۲۰۱۵)، تنوع ژنتیکی در *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از انسان و گوساله را با روش RAPD-PCR بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که درصد پلی‌مورفیسم در *اشریشیاکلی* جدا شده از افراد مبتلا به عفونت ادراری ۵۴/۷ درصد، در گوساله‌های مبتلا به اسهال ۶۲/۲۲ درصد و در گوساله‌های مبتلا به سپتی‌سمی نوزادان ۶۲/۵ درصد بود (Afshari et al., 2015). کومار و همکاران (۲۰۱۸)، آنالیز ژنتیکی *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از دو منبع محیطی (فاضلاب شهری و فضولات حیوانات آزمایشگاهی) را با روش RAPD-PCR انجام دادند. که در این مطالعه *اشریشیاکلی*‌های جدا شده در دو کلاستر اصلی با شباهت ۸۵ درصد (فضولات حیوانات آزمایشگاهی) و ۷۱ درصد (نمونه‌های فاضلاب) قرار گرفتند. همچنین آن‌ها اذعان داشتند که روش RAPD-PCR روشی کاربردی و ساده برای بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه‌هاست (Kumar et al., 2018). انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک RAPD-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 به عنوان یکی از خطرناک‌ترین سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیاکلی* استفاده شد و قرار گرفتن جدایه‌های مورد مطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ *اشریشیاکلی* می‌باشد.

در این پژوهش تشابه مولکولی زیادی بین سویه‌های *اشرشیاکلی O157:H7* جدا شده از حیوانات مختلف دیده شد که این امر ممکن است به علت تماس نزدیک بین گاو و مرغ، گاو و بوقلمون و انتقال سویه‌های *اشرشیاکلی O157:H7* با همان تیپ مولکولی باشد. متأسفانه، دام‌پروران ایرانی اغلب گونه‌های مختلف حیوانات در مجاورت همدیگر نگهداری و پرورش می‌دهند. این ممکن است باعث انتقال آسان سویه‌های این باکتری بین گونه‌های مختلف دامی شود. همانطور

که انتظار می‌رفت تشابه ژنتیکی زیادی بین نمونه‌های جدا شده از شهر اصفهان و شهرکرد وجود داشت که این امر به دلیل فاصله نزدیک دو شهر، استفاده از چراگاه‌های مشترک در فصول گرم سال و انتقال دام از شهرکرد به اصفهان و بالعکس می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های *اشرشیاکلی O157:H7* از فراوانی قابل‌توجهی در نمونه‌های گوشت خام دام و طیور برخوردار بودند که بسیار قابل‌توجه است. بالا بودن فراوانی باکتری در نمونه‌های گوشت نشان‌دهنده امکان انتقال باکتری از این نمونه‌ها و از طریق خوردن گوشت نپخته و نیم‌پز و بروز عفونت گوارشی در انسان می‌باشد. درمجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش RAPD-PCR روشی ساده، سریع و ارزان جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* ازجمله سویه *O157:H7* می‌باشد اما توصیه می‌گردد که مطالعات بیشتری روی نمونه-های گوشت خام دام و طیور در سطح کشور انجام شده و روش RAPD-PCR با روش‌های مولکولی جدیدتر مثل PFGE مقایسه گردد امید است که نتایج مطالعه ما در بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه *اشریشیاکلی* O157:H7 و ارتقای سلامت عمومی جامعه استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری مفید باشد.

منابع

1. Afshari A, Rad M, Seifi H.A, Ghazvini K .2015. Genetic variation among *Escherichia coli* isolates from human and calves by using RAPD PCR. Ir J of Vete Med. 10(1): 33-40
2. Aslani M.B and Bourzari S. 2003. An epidemiological study on VTEC infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). Eur J Epidemiol. 18: 345-349.
3. Baffone W, Ciaschini G, Pianetti A.2201. Detection of *Escherichia coli O157:H7* and other intestinal pathogens in pationswith diarrheal disease. Eur Epidemiol. 17:97-99.
4. B elanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M , Nadeau E, Dozois C. 2011. *Escherichia coli* fromanimal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. FEMS Immunol Med Micro. 62:1–10.
5. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreeyajan J, Svenson S. 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplifed polymorphic DNA (RAPD) analysis. Veterinary Micro. 80:75-83.
6. Darkazanli M, Kiseleva I, Darkazanli K. 2018. Genetic Diversity of *E. coli O157:H7* Isolated from Some Leafy Greens, Irrigated by Aleppo River, Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker. Rus Agri Sci. 44:146–152.
7. Dontorou C, Papado P, Filioussis G. 2003. Isolation of *Escherichia coli O157:H7* from foods in Greece. Int J Food Micro. 82: 273-279.
8. Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy N.C, Caliskan A. 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and Klebsiella spp. Jpn J Infect Dis. 62:372-7.
9. Fadel H.M, Afifi , Al-Qabili D.M. 2017. Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. Vete World. 10: 1118-1128.
10. Gannon V.P, D'Souza S, Graham T, King R.K, Rahn K, Read S. 1997. Use of the flagellar H7 genes as a target in multiplex PCR assay and improved specificity in identification of enterohemorrhagic E. coli strains. J of Clin Micro. 35(3): 656-662.
11. Gould LH, Demma L, Jones TF. 2009. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli O157:H7* infection, foodborne diseases active

22. Momtaz H., Safarpoor Dehkordi F., Rahimi E., Ezadi H., Arab R. 2013 b. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. Meat Science, 95: 381-388.
23. Murphy B.P, Murphy M, Buckley J.F. 2005. In Line milk filter analysis: *Escherichia coli O157:H7* surveillance of milk production holding. Int J Hyg Environ – Healthy. 521-4528.
24. Nasonova ES. 2008. Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications. Tsitologiia. 50 (11):927-35.
25. Nielsen K, Dynesen P, Larsen P, Frimodt-Møller N. 2014. Faecal *Escherichia coli* from patients with E. coli urinary tract infection and healthy controls who have never had a urinary tract infection. J of Med Micro. 63:582–589.
26. Paton A.W., Paton J.C. 1998. Detection an characterization of shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assay for stx1, stx2, eae A, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111 and rfbO157. J of Clin Micro. 36: 598-602.
27. Radu S, Ling O.W, Rusul G, Karim M.I, Nishibuchi M. 2001. Detection of *Escherichia coli O157:H7* by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. J Micro Meth. 46(2):131-9.
28. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. 2008. The prevalence of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Campylobacter spp. on bovine carcasses in Isfahan, Iranian Vete J of Research 9: 365-70.
29. Reinders R.D and Barama A. 2002. Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation method for detection of shiga toxin – producing *E.coli O157:H7* in milk. J of App Micro. 92: 1015-1020.
30. Salek Moghaddam A, Forouhesh Tehrani M, Davoodian P. 2003. Survey of the bacterial contaminants of Iranian foods in searches of *E.coliO157:H7* in medical surveillance network sites. Clin Infect Dis. 49: 1480–1485.
12. Hopkin k, Hilton A. 2001. Restriction endonuclease analysis of RAPD-PCR amplicons derived from shiga-like toxin – producing *E.coli O157:H7* isolates. Med microbial. 50:90-95.
13. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 183:78–88.
14. Khan A and Yamasaki S. 2002. Prevalence and genetic profiling of virulence determinates of Non-O157 STEC isolate from cattle, beef and humans Calcutta India . Emerg Inf Dis. 8 (1): 54-62.
15. Kaper J.B, Nataro J.P, Mobley HL. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Micro. 2: 123–140.
16. Kumar S, Kumar M, Raj A, Prakash J. 2018. Evaluation of Genetic Analysis of ESCHERICHIA COLI Isolated from Two Different Environmental Sources. Bio & App Sci. 60:1-10.
17. Lan R and Reeves P.R. 2002. *Escherichia coli* in disguise molecular origins of Shigella. Microbes Infect. 4 (11): 1125–32.
18. Mahon C.R, Lehman D.C, Manuselis G.2007. Textbook of diagnostic microbiology. 3th ed: New York: Saunders.
19. Manning S.D, Motiwala A.S, Springman A.C. 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli O157:H7* associated with disease outbreaks. P Natl Acad Sci USA. 105:4868–4873.
20. Marialouis X.A and Santhanam A. 2016. Antibiotic resistance, RAPD-PCR Typing of Multiple Drug resistant strain of *E.coli* coliform urinary tract infection. J Clin Diagn Res. 10(3): 5-9.
21. Momtaz H., Karimian A., Madani M., Safarpoor Dehkordi F., Ranjbar R., Sarshar M., Souod N. 2013 a. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 12: 8-15.

laboratory sciences researches center. Iranian J of Inf Dis and Trop Medicine.; 18(21) : 5 – 8.
31. Suardana I, Artama W, Widiasih D, Mahardika I. 2013. Genetic Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Inter Research J of Micro. 4(2): 72-78.
32. Widiasih D.A., Ido N, Omoe K. 2003. Duration and magnitude of faecal shedding of shiga toxin – producing *Escherichia coli* from naturally infected Cattle. Epidemiol. Infect. 132: 67-75.

Genotyping of *Escherichia coli* O157: H7 strains isolated from raw ruminant and poultry meat samples by RAPD-PCR

Lotfi M[1], Momtaz H[2*], Tajbakhsh E[3]

1. Graduated of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3 Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

[*]**Corresponding author:** *hamomtaz@iaushk.ac.ir*

Received: 5 January 2020 Accepted: 3 April 2020

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is one of the most important enteric pathogenic strains that is usually transmitted to humans through contaminated water and food. These strains cause hemorrhagic colitis, HUS syndrome, cytopenic purpura thrombosis, and, in some cases, death. The main repository of these bacteria is ruminants. The aim of this study was genetic classification (genotyping) of isolates of this strain isolated from raw meat and poultry by RAPD-PCR method. 344 samples of ruminants and poultry were collected from fresh meat supply centers in Isfahan and Shahrekord. Genetic classification of O157:H7 isolates was performed by the RAPD-PCR method. Of 344 raw meat samples studied, 202 *Escherichia coli* isolates (58.7%) were isolated. The rate of O157: H7 strain was 17.8% (36 samples). Genetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 isolates showed 9 different profiles among these 36 isolates and found an affinity of 43.7 to 100% among the isolates. This study showed high molecular similarity between *E. coli* O157: H7 strains isolated from different animals in Isfahan and Shahrekord. It was also found that RAPD-PCR is a simple, fast, and inexpensive method for describing the genetic diversity of different *E. coli* strains including strain O157:H7.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, RAPD-PCR, Genetic Classification, Raw meat.