

Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in raw sheep milk in different regions of Khuzestan province in 2022

Maleknezhad Ahrami, SH.¹, Fazlara, A.^{2*}, Zarei, M.²

1. M.Sc. Graduate of Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author: a.fazlara@scu.ac.ir

(Received: 2024/1/30 Accepted: 2024/7/1)

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is a significant foodborne pathogen responsible for gastroenteritis, with low infectious doses, and as an enterohemorrhagic strain, it can cause hemorrhagic dysentery. Raw milk, including sheep milk, is a known source of contamination with this pathogen, posing a potential risk for severe human infections. This study aimed to evaluate the potential of raw sheep milk as a vector for the transmission of *E. coli* O157:H7 and its associated health risks. A total of 114 raw sheep milk samples were collected in Khuzestan province over four months (April–July 2022). After biochemical assays, the isolates were identified by using specific primers targeting the O157 (*rfb*), H7 (*flic*), *stx1*, and *stx2* genes for identification. The study confirmed the isolation of *E. coli* O157:H7 from 3 samples (2.63%). Antibiogram was then conducted on the confirmed isolates. The results revealed that all isolates were 100% susceptible to imipenem, ceftazidime, and ceftazidime-clavulanic acid. Sixty-six percent of the isolates were susceptible to ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, while 33% showed susceptibility to nalidixic acid and nitrofurantoin. None of the isolates were susceptible to ampicillin or clindamycin, indicating significant resistance to these antibiotics. The contamination of raw sheep milk with *E. coli* O157:H7 in the Khuzestan region suggests that consuming raw sheep milk may be associated with an increased risk of infections caused by this pathogen.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇, Polymerase chain reaction, Antibiotic resistance, Raw sheep milk

DOI: 10.71876/jfh.2024.4011438

«مقاله پژوهشی»

میزان شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇ در شیر خام گوسفند در مناطق

مختلف استان خوزستان در سال ۱۴۰۱

شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇ در شیر گوسفند

شکوفه ملک‌نژاد اهرمی^۱، علی فضل‌آرا^{۲*}، مهدی زارعی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز،

ایران

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، اهواز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: a.fazlara@scu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۱۰ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۴/۱۱)

چکیده

/شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇، یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی است. این باکتری عامل عفونت‌های گاستروانتریت با دوز عفونی کم است و به‌عنوان یک سویه انتروهموراژیک سبب ایجاد اسهال خونی می‌شود. شیر خام یکی از منابع آلودگی به این باکتری بوده و می‌تواند انسان را در معرض ابتلا به عفونت‌های شدیدی قرار دهد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی پتانسیل شیر خام گوسفند به‌عنوان شاخصی در انتقال این پاتوژن و در معرض خطر قرار دادن سلامت عمومی جامعه بود. طی ماه‌های فروردین، اردیبهشت، خرداد و تیر ۱۴۰۱ تعداد ۱۱۴ نمونه شیر خام گوسفند عرضه‌شده در خوزستان تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از انجام آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی، تشخیص قطعی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های O₁₅₇ (*rfb*)، H₇ (*flic*)، *stx1* و *stx2* PCR انجام گرفت. در این تحقیق جداسازی /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇ از ۳ نمونه (۲/۶۳ درصد) تأیید شد. بر روی جدایه‌های تأییدشده به‌منظور ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، آزمون آنتی‌بیوگرام انجام گرفت. نتایج نشان داد که صد در صد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاوونیک اسید حساس هستند. سپس به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و جنتامایسین (۶۶/۶۶ درصد)، نیتروفورانتین و نالیدیکسیک اسید (۳۳/۳۳ درصد) حساسیت مشاهده شد. در هیچ‌کدام از جدایه‌ها حساسیت به آمپی‌سیلین و کلیندامایسین مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی بیشترین مقاومت جدایه‌های /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇ به این آنتی‌بیوتیک‌ها است. آلودگی شیر خام گوسفند به باکتری /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇ در منطقه خوزستان نشان داد که مصرف شیر خام گوسفند می‌تواند احتمالاً با ریسک ابتلا به بیماری‌های ناشی از این باکتری ارتباط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: /شیریشیا کلی O₁₅₇:H₇، واکنش زنجیره پلی‌مراز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شیر خام گوسفند

مقدمه

باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O157:H7، یکی از معروف‌ترین پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی و عامل عفونت‌های گاستروانتریت با دوز عفونی کم است (Zhong and Zhao, 2018). این باکتری به علت شدت بالای بیماری‌زایی و دوز عفونی کم (کمتر از ۱۰ سلول) یکی از جدی‌ترین عوامل بیماری‌زای شناخته‌شده در مواد غذایی است (Kiranmayi et al., 2010). روده‌ی حیوانات، به‌ویژه گاو و سایر نشخوارکنندگان مخزن باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O157:H7 است. از دیگر حیوانات مخزن این باکتری می‌توان به گوسفند، بز، غیر نشخوارکنندگانی مانند سگ، گربه، خوک، اسب و پرندگان اشاره کرد (Smith et al., 2015; Van den Brom et al., 2020). مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد حیوانات مخزن باکتری اشریشیا کلی O157:H7 روی گاو متمرکز است، با این حال سایر حیوانات میزبان نیز شناسایی شده‌اند. در ایالت متحده، هلند و استرالیا شیوع اشریشیا کلی O157:H7 در گوسفندان بالاتر از ۳۱ درصد بود که نشان می‌دهد گوسفندان نیز ممکن است نقش مهمی به‌عنوان مخزن باکتری اشریشیا کلی O157:H7 داشته باشند (Bach et al., 2002). در مطالعه‌ای که بین ۲۴ مزرعه‌ی گوسفند شیری در هلند صورت گرفت، باکتری اشریشیا کلی تولیدکننده‌ی شینگاتوکسین در همه‌ی این مزارع گزارش شد (Opsteegh et al., 2018). هفت سروتیپ، O₂₆، O₄₅، O₁₀₃، O₁₁₁، O₁₂₁، O₁₄₅ و O₁₅₇ مسئول اکثر عفونت‌های STEC انسانی هستند (Capps et al., 2021)؛ (Khandaghi et al., 2011). محصولات غذایی مختلف از جمله گوشت یا شیر خام یا نیم‌پخته، میوه، سبزی‌ها و

آب آشامیدنی آلوده به‌عنوان منبع عفونت در انسان عمل می‌کنند (Alegbeleye et al., 2018). اشریشیا کلی O157:H7 به‌عنوان یک سویه انتروهموراژیک قادر به تولید شینگاتوکسین بوده و سبب ایجاد اسهال خونی یا کولیت خونریزی‌دهنده (Hemorrhagic Colitis) می‌شود. همچنین این باکتری می‌تواند منجر به بیماری سندروم اورمی همولیتیک (Hemolytic Uremic Syndrome) و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura) در کودکان، سالمندان و بیماران در معرض خطر شود (Kakagianni and Khandaghi et al., 2010; Koutsoumanis, 2019). مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها تخمین زده است که بیمارهای ناشی از غذا توسط شینگاتوکسین اشریشیا کلی سروتیپ O157:H7، هر ساله موجب ۲۶۵۰۰۰ مورد بیماری، ۳۶۰۰ مورد بستری و ۳۰ مورد مرگ در آمریکا می‌شود (Kakagianni and Koutsoumanis, 2019). این بیماری‌ها به‌طور مستقیم با فاکتورهای حدت مرتبط هستند. از جمله شینگاتوکسین‌ها (Stx₁ و Stx₂)، اینتیمین (کد شده توسط eae) و انتروهمولیزین (hlyA) که با دوز عفونی کم، اثرات سمی و بیماری عمومی شدید ایجاد می‌کند. ضایعات اتصال و محو شدن (A/E) ناشی از بیان eae، اختلال در گلبول‌های قرمز توسط hlyA و سرکوب سنتز پروتئین از طریق اتصال به رسپتور گلوبوتری‌آسیل‌سرامید (Glybotriaosylceramide) توسط شینگاتوکسین ویژگی‌های اصلی مرتبط با حدت اشریشیا کلی تولیدکننده شینگاتوکسین هستند (Thierry et al., 2020).

با توجه به دوز پایین عفونت‌زایی و ظهور سویه‌های *اشریشیا کلی* O157:H7 مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک، شناسایی منابع عفونی و چگونگی انتقال آن به انسان و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها ضرورت دارد. همچنین با توجه به اینکه مخزن اصلی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 گاو است و عمده‌ی مطالعات بر روی گوشت، شیر و سایر فرآورده‌ها با منشأ گاو انجام شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی این است که شیر خام گوسفند تا چه اندازه می‌تواند به‌عنوان شاخصی در انتقال این پاتوژن مطرح باشد و موجب در معرض خطر قرار دادن سلامت عمومی جامعه شود. لذا در این مطالعه امکان آلودگی شیر خام گوسفند به باکتری *اشریشیا کلی* سروتیپ O157:H7 با استفاده از روش‌های کشت به‌منظور تشخیص باکتری، وجود عامل بیماری‌زای O157:H7 با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction) و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

-جمع‌آوری نمونه‌ها

به‌منظور بررسی پتانسیل شیر خام گوسفند به‌عنوان شاخصی در انتقال باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 و در معرض خطر قرار دادن سلامت عمومی جامعه، طی ماه‌های فروردین، اردیبهشت، خرداد و تیر ۱۴۰۱ تعداد ۱۱۴ نمونه شیر خام گوسفند با توجه به تعداد مراکز ثبت‌شده عرضه شیر گوسفند در شهرهای اهواز، امیدیه، ایذه، خرمشهر، باوی، شادگان، بهبهان، هفتکل، رامشیر، کارون، شوشتر، گتوند، دشت‌آزادگان، حمیدیه، هویزه،

باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ *اشریشیا کلی* تولیدکننده شیگاتوکسین، از اوایل دهه ۱۹۸۰ به‌عنوان یک پاتوژن حیاتی قابل‌انتقال از طریق آب و مواد غذایی مطرح شده است. این باکتری همچنین در شیر خام گزارش شده است (Van den Brom *et al.*, 2020; Rani *et al.*, 2021). آلودگی شیر خام به این باکتری از طریق آلودگی شیر با مدفوع در حین شیردوشی رخ می‌دهد. اگرچه ترشح مستقیم ارگانیسم از پستان آلوده نیز گزارش شده است (Sancak *et al.*, 2015). استراتژی‌های مدیریتی مختلفی را می‌توان برای کنترل گسترش بیماری‌های ناشی از این باکتری به کار برد. تشخیص سریع و کارآمد این پاتوژن به‌منظور کاهش عوارض و مرگ‌ومیر بسیار مهم است. فناوری‌های نوپهور مانند روش‌های حسگرهای زیستی، طیف‌سنجی و روش‌های دیجیتال مبتنی بر گوشی هوشمند به‌عنوان رویکردهای جدید در زمینه تشخیص باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 شناخته شده است (Rani *et al.*, 2021). حسگر رنگ سنجی مبتنی بر گوشی هوشمند به‌عنوان ابزاری کارآمد جهت تشخیص باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در شیر گزارش شده است (Yang *et al.*, 2021).

گزارش‌هایی از وجود آلودگی به *اشریشیا کلی* O157:H7 در شیر در ایران وجود دارد برای نمونه یک مورد *اشریشیا کلی* O157:H7 در مخازن شیر شرکت شیر پاستوریزه در ایران تشخیص داده شده است (Brenjchi *et al.*, 2011). همچنین حضور باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در شیر خام گاو استان خوزستان، به‌خصوص در فصول گرم تأیید شده است (Morseli and Shakerian, 2023).

هندیجان، باغملک، شوش، مسجد سلیمان، دزفول، اندیمشک، لالی و رامهرمز از استان خوزستان به روش نمونه‌برداری تصادفی ساده به ترتیب تعداد ۶، ۴، ۵، ۶، ۳، ۷، ۳، ۴، ۳، ۷، ۵، ۵، ۵، ۷، ۴، ۴، ۳، ۷، ۳، ۵، ۶ نمونه تهیه و سریعاً در شرایط سرما به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و در همان روز مورد آزمایش قرار می‌گرفتند.

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی *اشریشیا کلی* **O157:H7**

مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از هر نمونه‌ی شیر سانتریفیوژ و از رسوب حاصل، مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر تریپتیک سوی برات (Tryptic Soy Broth) (Merck, Germany) غنی شده با نوویوسین (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. پس از سپری شدن این زمان، مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی خارج و رسوب آن در یک میلی‌لیتر از محیط باقی‌مانده مخلوط و در محیط کشت اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار (Sorbitol MacConkey Agar) (Merck, Germany)، حاوی آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر) و محلول تلوریت پتاسیم (۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس تعداد ۳ تا ۵ عدد از کلنی‌های بی‌رنگ (سوربیتول منفی) یا کلنی‌های بی‌رنگ با هسته مرکزی دودی خاکستری از محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار حاوی آنتی‌بیوتیک سفکسیم انتخاب و در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار

می‌گردید.

شناسایی مولکولی *اشریشیا کلی* O157:H7

در ابتدا جهت جداسازی DNA از روش جوشاندن استفاده شد. بدین نحو که مقداری کلنی را با لوپ استریل، در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی یک سی‌سی آب مقطر استریل، حل و کاملاً هموزن شد. میکروتیوب‌ها شماره‌گذاری و در سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج و به رسوب باقی‌مانده ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید و به خوبی باهم مخلوط شدند. سپس میکروتیوب‌ها با قرار دادن بر روی آب جوش، به مدت ۵-۶ دقیقه حرارت داده شدند. پس از آن مجدداً میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ گشته و ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی در یک میکروتیوب دیگر ریخته می‌شد و ضمن برچسب‌گذاری در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌گردید. در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 که توسط شرکت زیست‌فناوری پیشگام سنتز شده است مطابق جدول (۱) استفاده شد.

جدول (۱) _ پرایمرهای پیشرو و معکوس مربوط به ژنهای O₁₅₇:H₇، stx₁، stx₂ در باکتری اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇

منبع	اندازه پرایمر	توالی پرایمر	پرایمر
Paton <i>et al.</i> , 1998	259 bp	CGGACATCCATGTGATATGG TTGCCTATGTACAGCTAATCC	O ₁₅₇ F O ₁₅₇ R
	625 bp	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	H ₇ F H ₇ R
Kudva <i>et al.</i> , 1996; Olowe <i>et al.</i> , 2014	614 bp	ACACTGGATGATCTCAGTGG CTGAATCCCCCTCCATTATG	stx ₁ F stx ₁ R
	779 bp	CCATGACAACGGACAGCAGTT CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	stx ₂ F stx ₂ R

O₁₅₇:H₇ مثبت گزارش شده و سپس نسبت به انجام PCR مرحله دوم اقدام می‌گردید تا بدین وسیله نسبت به ارزیابی و تشخیص توکسین‌زا بودن سویه‌های باکتریایی تأیید شده در مرحله نخست، از نظر دارا بودن ژن‌های stx₁ و stx₂ اقدام گردد. برنامه حرارتی PCR شامل سه بخش بود: بخش اول دناتوره کردن اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و به مدت ۳ دقیقه (برای باز شدن دو رشته‌ی DNA) انجام شد. بخش دوم خود شامل ۳۵ سیکل و هر سیکل شامل سه مرحله می‌شد: ابتدا دناتوره شدن در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، سپس اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و در ادامه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و به مدت یک دقیقه انجام شد که آنزیم Taq (Cinnagen, Iran) در این مرحله با اضافه کردن نوکلئوتیدها به انتهای آغازگرها، با توجه به ردیف نوکلئوتیدی DNA الگو، باعث تکثیر قطعه مورد نظر شد. بخش سوم، سنتز نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه انجام شد تا در طی آن قطعاتی که به‌طور کامل سنتز نشده‌اند، کامل گردند.

محصولات PCR با الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد. جهت بررسی و مشاهده محصول PCR از

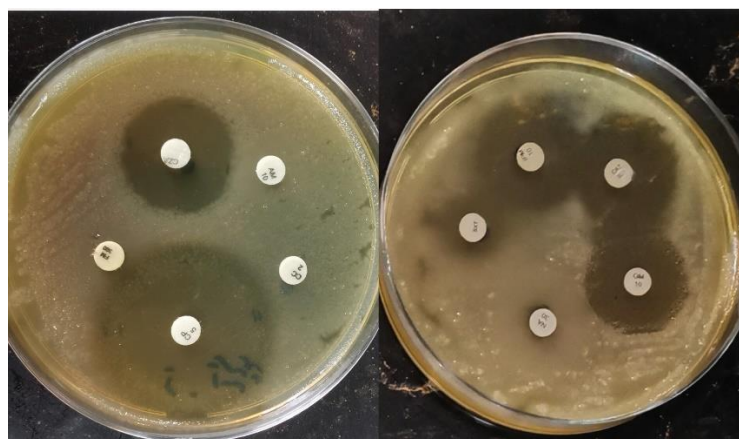
سپس طی دو مرحله نسبت به انجام PCR اقدام گردید. در مرحله نخست، مواد مورد نیاز که شامل پنج میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۲۰ میکرولیتر مستر میکس (Ampliqon, Denmark) حاوی یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس (Cinnagen, Iran) (در مجموع چهار میکرولیتر)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس پایه و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری باهم مخلوط شده و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکلر (Bioer, China) قرار گرفته و دستگاه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس تنظیم گردید. برای هر بار انجام واکنش PCR لازم است یک نمونه کنترل مثبت کنترل مثبت که از آرشیو میکروارگانیسم‌های گروه بهداشت مواد غذایی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شده و یک نمونه کنترل منفی به همراه نمونه‌های مشکوک گذاشته شود. در آزمون PCR، از DNA مربوط به باکتری اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇ (سویه‌ی ATCC 43895) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در PCR مرحله نخست، با مشاهده هر دو بانده O₁₅₇ و H₇ در یک واکنش PCR، سویه مربوطه از نظر اشریشیا کلی

ژل آگارز ۱/۵ درصد (Cinnagen, Iran) استفاده گردید. ژل را درون تانک الکتروفورز (Paya Pajouhesh, Iran) قرار داده و مخزن تانک با محلول بافر TAE 1X پر گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR از هر نمونه درون چاهک ژل تزریق شد. چاهک وسط به تزریق نردبان ژنی ۵۰bp (۳ میکرولیتر) (Cinnagen, Iran)، اختصاص داده شد. الکتروفورز ژل درون بافر TAE 1X با استفاده از جریان برق ۱۰۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه انجام گردید. پس از پایان الکتروفورز، باندهای تفکیک‌شده ژل در دستگاه ترانس لومیناتور، Kiagen (Iran) قرار داده‌شده و با تابش نور UV، باندهای ژل از نظر صحت طول قطعه، با مارکر مولکولی و کنترل مثبت مورد مقایسه قرار گرفتند.

-آنتی بیوگرام

جهت سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از روش دیسک دیفیوژن آگار منطبق با استانداردهای موسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی (Clinical Laboratory Standards Institute) اقدام شد (CLSI, 2019). در ابتدا نسبت به تهیه ۰/۵ مک‌فارلند اقدام (Padtan Teb, Iran) شد. سپس از کشت خالص ۲۴ ساعته هر یک از جدایه‌های / شریشیا کلی O157:H7، در سرم فیزیولوژی تلقیح شده و با مقایسه سوسپانسیون باکتریایی حاصل با کدورت لوله ۰/۵ مک‌فارلند، مقدار کدورت مورد نیاز تشخیص داده می‌شد. سپس سواب استریل به سوسپانسیون حاصل آغشته شده و به‌طور کامل تمام سطح محیط مولر هیتون آگار (Mueller-Hinton agar) (Merck, Germany)، در داخل پلیت کشت داده شد. پس از جذب رطوبت سطح محیط کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (Padtan Teb, Iran)، با

فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از دیواره‌ی پلیت و ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در سطح محیط کشت گذاشته شد. در این تحقیق برای هر جدایه مجموعاً از ده نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف شامل آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، ایمپینم (۱۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، تریمتوپریم سولفامتاکسازول (۵ میکروگرم)، جتتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم کالونیک اسید (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، نیتروفورانتین (۳۰۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) (Padtan Teb, Iran) در دو پلیت ده سانتی‌متری استفاده شد (شکل ۱) بعد از قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شده و پس از ۲۴ ساعت نتایج مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از خط‌کش قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری و بر اساس میلی‌متر ثبت‌شده و با جدول استاندارد تهیه‌شده از شرکت فراهم‌کننده‌ی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و جدول CLSI (CLSI, 2021) مقایسه می‌شد. در نتیجه میزان حساسیت یا مقاومت ایزوله‌ها به هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین می‌گردید.

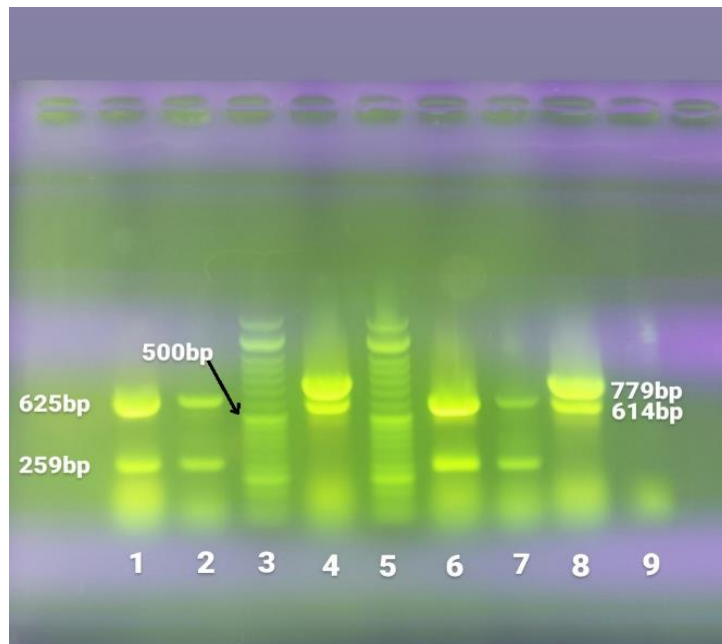


شکل (۱) - سنجش آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇

یافته‌ها

از تعداد ۱۱۴ نمونه کشت داده شده در محیط سوربیتول مک‌کانکی آگار حاوی سفکسیم و تلوریت پتاسیم، تعدادی کلنی سوربیتول منفی به‌عنوان کلنی‌های مشکوک (Garbaj *et al.*, 2016) مشاهده و جهت تشخیص تفریقی کلنی‌ها در محیط EMB کشت داده شدند. کلنی‌های اشریشیا کلی بر روی محیط کشت EMB جلای سبز فلزی داشتند. سپس بر روی آن‌ها رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست IMVIC و همچنین تست TSI و LIA انجام شد. در مجموع کلنی‌های مربوط به تعداد ۲۱ نمونه شیر (۱۸/۴۲ درصد)، به‌صورت اکسیداز منفی، اندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیترات منفی مشاهده گردید. کلنی‌های مشکوک همچنین در لوله‌های TSI به‌صورت اسید/اسید بوده و همچنین در LIA به‌صورت قلیایی/قلیایی مشاهده شدند.

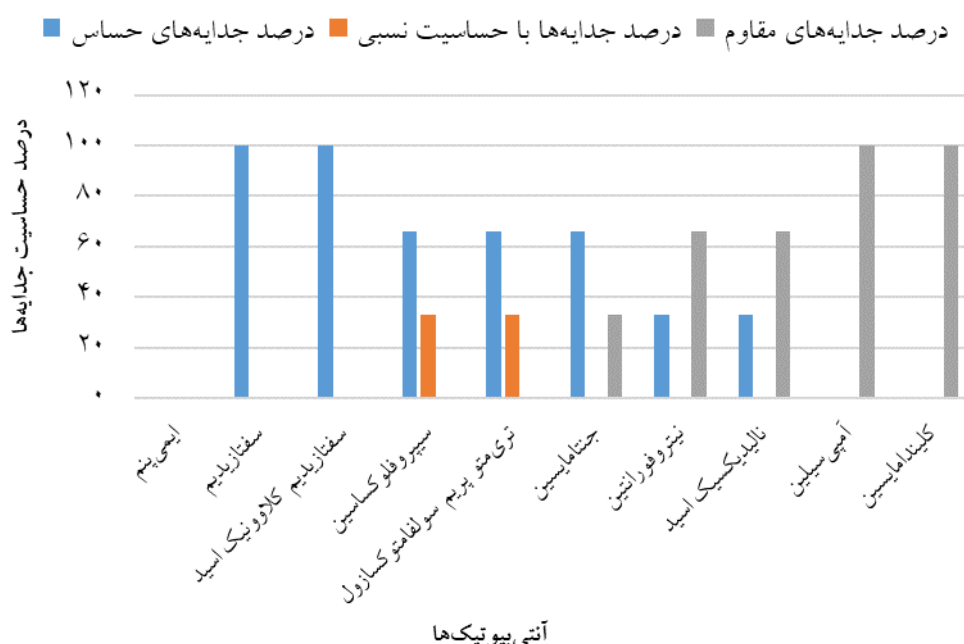
برای شناسایی باکتری اشریشیا کلی سروتپ O₁₅₇:H₇ در مواد غذایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌عنوان روش استاندارد در نظر گرفته می‌شود. کلنی‌های مشکوک برای تشخیص قطعی و حضور ژن‌های O₁₅₇، H₇، *stx1* و *stx2* به‌وسیله‌ی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. طی بررسی‌ها در مورد حضور ژن‌های O₁₅₇ و H₇ باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگارز نشان داد که از تعداد ۲۱ نمونه مثبت مرحله‌ی قبل، ۳ نمونه (۲/۶۳ درصد) دارای ژن‌های O₁₅₇ و H₇ بودند. طی مرحله بعد جدایه‌ها از نظر وجود ژن‌های *stx1* و *stx2* مورد بررسی قرار گرفتند که صرفاً یک نمونه (۰/۸۷ درصد) بر روی آگارز باندهای حاوی هر دو ژن *stx1* و *stx2* را تشکیل داد. این نمونه مربوط به شهر اندیمشک بود. در دو نمونه (۱/۷۵ درصد) دیگر (مربوط به شهرهای شوشتر و گتوند) فقط ژن‌های O₁₅₇ و H₇ حضور داشت و آثاری از حضور ژن‌های بیماری‌زای *stx1* و *stx2* مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل (۲) - موارد مثبت باکتری / شیریشیا کلی O157:H7 به همراه کنترل مثبت و منفی مربوط به ژن‌های O157, H7, stx1 و stx2 در PCR. ستون شماره ۱: / شیریشیا کلی O157:H7. ستون شماره ۲: / شیریشیا کلی O157:H7، ستون شماره ۳: نردبان ژنی ۵۰bp، ستون شماره ۴: کنترل مثبت باکتری دارای ژن‌های stx1 (۶۱۴bp) و stx2 (۷۷۹bp)، ستون شماره ۵: نردبان ژنی ۵۰bp، ستون شماره ۶: کنترل مثبت باکتری دارای ژن‌های O157 (۲۵۹bp) و H7 (۶۲۵bp). ستون شماره ۷: / شیریشیا کلی O157:H7. ستون شماره ۸: ژن‌های stx1 و stx2 در نمونه مثبت / شیریشیا کلی O157:H7. ستون شماره ۹: کنترل منفی.

نالیدیکسیک اسید (۳۳/۳۳ درصد) حساسیت مشاهده شد. همچنین در هیچ‌کدام از جدایه‌ها حساسیت به آمپی‌سیلین و کلیندامایسین مشاهده نشد که نشان دهنده‌ی بیشترین مقاومت جدایه‌های / شیریشیا کلی O157:H7 به این آنتی‌بیوتیک‌ها است (نمودار ۱).

در نهایت نتایج آزمون سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که صد در صد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاوونیک اسید حساس هستند. سپس به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و جنتامایسین (۶۶/۶۶ درصد)، نیتروفورانتین و



نمودار (۱)_ نتایج آزمون سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇ به‌عنوان یک نگرانی بهداشت عمومی در بسیاری از کشورهای جهان مطرح است. عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری *اشریشیا کلی* تولیدکننده شینگاتوکسین سروتیپ O₁₅₇:H₇، چهارمین بیماری پرهزینه در کانادا و ایالت متحده است. *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ به علت شدت بالای بیماری‌زایی و دوز عفونی کم (کمتر از ۱۰ سلول) یکی از جدی‌ترین عوامل بیماری‌زای شناخته شده در مواد غذایی است. این باکتری عمدتاً برای انسان بیماری‌زا است اما در گاو و سایر حیوانات هیچ‌گونه علائم بالینی و بیماری به‌جز اسهال ایجاد نمی‌کند. بنابراین این حیوانات به‌عنوان ناقل عمل می‌کنند (Kiranmayi et al., 2010).

در مطالعه حاضر تعداد ۱۱۴ نمونه شیر خام گوسفند به منظور جداسازی و شناسایی باکتری *اشریشیا*

کلی O₁₅₇:H₇ مورد بررسی قرار گرفت. از روش کشت در محیط‌های مغذی و انتخابی برای جداسازی استفاده شد و سپس ایزوله‌ها با روش PCR از نظر حضور ژن‌های شینگاتوکسین *stx*₁ و *stx*₂ و همچنین تایید سروتیپ (O₁₅₇ و H₇) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت یک جدایه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ دارای ژن‌های *stx*₁ و *stx*₂ (۰/۸۷ درصد) و ۲ جدایه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ فاقد ژن‌های *stx*₁ و *stx*₂ (۱/۷۵ درصد) تشخیص داده شد. سنجش آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، سفتازیدیم کلارونیک اسید و سفتازیدیم (۱۰۰ درصد) نشان داد. همچنین بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلیندامایسین (۱۰۰ درصد) مشاهده شد.

یک مورد O157:H7 حامل ژن‌های *stx1* و *stx2* در شیر خام گوسفند تشخیص داده شد. با این تفاوت که در مطالعه ایشان تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام گوسفند مورد بررسی قرار گرفته شد و فراوانی باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 حامل ژن‌های شیگاتوکسین یک درصد بود اما در تحقیق حاضر از تعداد ۱۱۴ نمونه شیر گوسفند مورد بررسی، فراوانی باکتری /شیریشیا کلی حامل ژن‌های شیگاتوکسین، ۰/۸۷ درصد گزارش شد. در هر دو مطالعه، جدایه‌های /شیریشیا کلی O157:H7 حاوی ژن‌های شیگاتوکسین، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول حساس بودند. البته در مورد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در نتایج تفاوت وجود داشت به این صورت که جدایه‌ها در مطالعه‌ی حاضر، نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند. اختلاف در نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های /شیریشیا کلی O157:H7 در مطالعات مختلف نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند تحت تأثیر منطقه جغرافیایی، نوع و نحوه فرآوری و مصرف مواد غذایی، بیماری‌های باکتریایی شایع و فرهنگ مصرف داروها و به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گیرد. علاوه بر این، احتمالاً مقاومت سویه‌های مختلف /شیریشیا کلی O157:H7 با یکدیگر متفاوت بوده و این امر منجر به تاثیر متفاوت یک آنتی‌بیوتیک خاص بر روی سویه‌های مختلف می‌گردد (Dontorou et al., 2003).

تحقیقی در اسپانیا، مشابه مطالعه‌ی حاضر وجود باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 را در نمونه‌های شیر غیرپاستوریزه میش مورد بررسی قرار داد. در بررسی وجود ژن‌های *(rfb)* O157 و *(flic)* H7، از بین تمام نمونه‌های شیر میش، ۳ مورد (۳/۵ درصد) از نظر

در مطالعه‌ای در ایران که تحت عنوان شناسایی مستقیم باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 و ژن‌های فاکتور حدت در مدفوع حیوانات کشتاری در زمان کشتار انجام شد، باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 در ۴/۲ درصد گاوها و ۲/۱ درصد گوسفندان مشاهده شد (Jalil et al., 2011). همچنین پژوهشی دیگر در منطقه آذربایجان شرقی تحت عنوان فراوانی باکتری /شیریشیا کلی وروتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه انجام شد که نتایج نشان‌دهنده وجود مقادیر نسبتاً بالای باکتری /شیریشیا کلی وروتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه تبریز بود (Khakpour et al., 2012).

در مطالعه‌ای دیگر وجود باکتری /شیریشیا کلی سروتپ O157:H7 در غذاهای مختلف با منشا دامی در شمال غربی یونان مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها جهت تشخیص سروگروپ O157:H7 با استفاده از روش‌های استاندارد کشت و جداسازی ایمونومغناطیسی بررسی شدند. نتایج در مورد شیر گوسفند، پاتوزن را یک مورد از ۱۰۰ نمونه (۱درصد) گزارش داد. سویه‌ی جدا شده سوربیتول منفی و تولید کننده وروتوکسین بوده و هر دو ژن *stx1* و *stx2* را حمل می‌کرد. همچنین از نظر حساسیت ضد میکروبی، نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک (نالیدیکسیک اسید، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، کانامایسین، نورفلوکساسین، استرپتومایسین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول و تتراسایکلین) حساس بود (Dontorou et al., 2003). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. از این جهت که با روش کشت و PCR بر روی ایزوله‌ها، در هر دو مطالعه تنها

که فرکانس تشخیص عوامل بیماری‌زا در شیر خام گوسفند و بز مشابه و در مورد باکتری *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین (۴/۸-۴/۳ درصد) است. میزان آلودگی به *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین در پنیرهای شیر خام (۱۰ درصد) نسبت به شیر پاستوریزه (۴/۷ درصد) بالاتر بود (Gonzales-Barron et al., 2017). بنابراین آلودگی شیر و پنیر خام گوسفند و بز در این مطالعه، لزوم اقدامات پیشگیرانه مانند نظارت دقیق بر بهداشت در دامداری‌ها را نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر شیوع سروتیپ‌ها و ژن‌های حدت *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین جدا شده از شیر گوسفند و بز و دیگر محصولات لبنی در اسپانیا بررسی شد. در مجموع ۵۰۲ محصول لبنی مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین در ۳۹ (۱۰/۸ درصد) مخزن شیر فله شناسایی شدند. در حالی که سروتیپ *O157:H7* از یک (۰/۳ درصد) مخزن فله جدا شد. در کل ۸ سویه سروتیپ غیر *O157* و یک سویه سروتیپ *O157:H7* شناسایی شد. این مطالعه نشان داد که فرآورده‌های لبنی مخزن مهم پاتوژن *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین برای انسان است (Rey et al., 2006).

در پژوهشی که تحت عنوان جداسازی و بررسی خصوصیات باکتری انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* سروتیپ‌های *O157:H7* و *O157:NM* (Non-Motile) از شیر گاو، شتر، گاو میش، بز و گوسفند در ایران انجام شد. به طور کلی ۱۷ مورد از ۷۳۴ نمونه شیر خام (۲/۳ درصد) آلوده به *اشریشیا کلی O157* مشخص شد. بالاترین میزان شیوع در نمونه‌های شیر گاو میش (۵/۵ درصد) و به دنبال آن شیر گاو (۳/۹ درصد)، گوسفند

اشریشیا کلی O157:H7 مثبت بودند. سپس با استفاده از مولتی پلکس PCR برای حضور ژن‌های حدت *ehxA*، *stx1*، *stx2* تجزیه و تحلیل شدند. تمام جدایه‌های *O157:H7* دارای سم شیگاتوکسین بوده و واجد ژن‌های حدت *ehxA* و *eaeA* بودند (Caro et al., 2006). این نتایج نشان داد که شیر خام میش مورد استفاده در تولید پنیر، با سویه‌های بالقوه بیماری‌زا آلوده است. درصد آلودگی شیر میش به *اشریشیا کلی O157:H7* در تحقیق ایشان نسبت به مطالعه حاضر بالاتر گزارش شده است. در توضیح این عدم تشابه در نتایج مطالعات مختلف، دلایل متعددی از جمله عدم رعایت اقدامات بهداشتی در حین شیردوشی، پراکندگی جغرافیایی، فصول متفاوت، روش‌های نمونه‌برداری و روش‌های جداسازی مختلف باکتری *اشریشیا کلی O157:H7* می‌تواند مطرح باشد. در یک مطالعه فراتحلیل، عوامل بیمای‌زای موجود در شیر خام و پنیر گوسفند و بز مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه‌ای دیگر، مجموع ۱۳ سویه *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین جدا شده از شیر خام و پنیر گوسفندی مورد بررسی قرار گرفت و صفات بیوشیمیایی و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها تعیین شد. تمام سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین نسبت به باسیتراسین، کلوکساسیلین، پنی‌سیلین و تایلوزین مقاومت نشان دادند. این مطالعه، انواع مختلف بیوتایپ و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین جدا شده از لبنیات گوسفند را نشان داد (Caro et al., 2007). داده‌های تجزیه و تحلیل که از ۳۷ مطالعه انجام شده از کشورهای مختلف استخراج شده بود، نشان داد

کلی فرم قرارگیرد. چنین رویکردهایی می‌توانند کیفیت بهداشتی بهبود یافته‌ای را در عرضه شیر خام به دست آورد. اما از آنجایی که سطح کم یا فرکانس پایین آلودگی گاهی اجتناب‌ناپذیر است، این کار نمی‌تواند عدم وجود عوامل بیماری‌زا را در تهیه شیر خام تضمین کند. یکی از راه‌های موثر در حذف این باکتری از زنجیره غذایی حرارت دادن است. با کنترل دقیق پاستوریزاسیون شیر می‌باید این اطمینان حاصل شود که مصرف آن برای فرد ضرری نداشته باشد. حضور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک این باکتری نیز می‌تواند احتمال بروز بیماری را افزایش دهد و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با شکست روبه‌رو شود. از این‌رو بررسی میزان شیوع آلودگی به /شیریشیا کلی O157:H7 به منظور اطلاع از وضعیت اپیدمیولوژیکی این باکتری و ایجاد روش‌های مناسب کنترلی و همچنین تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها برای جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آن‌ها به زنجیره غذایی انسان ضروری است.

سپاسگزاری

هزینه‌های انجام مطالعه حاضر از طریق پژوهانه سال ۱۴۰۰ دانشگاه شهید چمران اهواز تامین شده است که بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی برای اعلام ندارند.

(۱/۴ درصد) و بز (۱ درصد) مشاهده شد (Rahimi et al., 2012). مطالعات بسیاری شیوع /شیریشیا کلی انتروهموراژیک سروتیپ O157:H7 را مخصوصاً در گاو و گاهاً در گوسفند کشتارگاهی اندازه‌گیری کرده‌اند. در انگلستان، این باکتری در ۴/۷ درصد گاوها و ۱/۷ درصد گوسفندان (Paiba et al., 2002)، ۱۵/۷ درصد گاوها و ۲/۲ درصد گوسفندان (Chapman et al., 1994) و ۴/۷ درصد گاوها و ۰/۷ درصد گوسفندان گزارش شده است (Milnes et al., 2008). در مطالعه‌ای در ایتالیا، بیشتر گوسفندان بالغ مورد آزمایش در کشتارگاه، از نظر /شیریشیا کلی انتروهموراژیک سروتیپ O157:H7 مثبت بودند (Franco et al., 2009).

آلودگی شیر خام گوسفند به باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 در منطقه خوزستان نشان داد که مصرف شیر خام گوسفند می‌تواند احتمالاً با ریسک ابتلا به بیماری‌های ناشی از این باکتری ارتباط داشته باشد. با توجه جداسازی و شناسایی باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 در شیر و به اثبات رسیدن توکسین‌زایی آن، مصرف شیر خام گوسفند یک خطر بالقوه برای سلامت عمومی جامعه و مصرف‌کنندگان به حساب می‌آید. حضور /شیریشیا کلی O157:H7 و سایر سروتیپ‌های /شیریشیا کلی تولیدکننده‌ی شینگاتوکسین در شیر، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی آلودگی ثانویه در طی زنجیره‌ی تولید و انتقال شیر باشد (Farrokh et al., 2013; Smith et al., 2015; Gomes et al., 2016). شیر خام باید تحت نظارت‌های معمول درمورد شاخص‌های آلودگی مدفوعی، از جمله /شیریشیا کلی و باکتری‌های

منابع

- Alegbeleye, O.O., Singleton, I. and Sant'Ana, A.S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: a review. *Food Microbiology*, 73: 177-208.
- Brenjchi, M., Jamshidi, A., Farzaneh, N. and Basami, M. (2011). Identification of shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in raw cow milk sample from dairy farms in Mashhad multiplex PCR assay. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 12(2): 145-148.
- Capps, K. M., Ludwig, J. B., Shridhar, P. B., Shi, X., Roberts, E., DebRoy, C., ... & Nagaraja, T. G. (2021). Identification, Shiga toxin subtypes and prevalence of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feedlot cattle feces. *Scientific Reports*, 11(1): 8601.
- Caro, I., Fernandez-Barata, V.M., Alonso-Llamazares, A. and Garcia-Armesto, M.R. (2006). Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from raw ewe's milk in Spain. *Journal of Food Protection*, 69(4): 920-924.
- Caro, I., Mateo, J. and García-Armesto, M.R. (2007). Phenotypical characteristics of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from sheep dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3): 295-300.
- Chapman, P.A., Wright, D.J. and Siddons, C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 40(6): 424-427.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100 standard, 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Delaquis, P., Bach, S. and Dinu, L.D. (2007). Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 70(8): 1966-1974.
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G. et al., (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3): 273-279.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., et al. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2): 190-212.
- Franco, A., Lovari, S., Cordaro, G., Di Matteo, P., Sorbara, L., Iurescia, M. et al., (2009). Prevalence and concentration of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 in adult sheep at slaughter from Italy. *Zoonoses and Public Health*, 56(5): 215-220.
- Gomes, F., Saavedra, M. J. and Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74(3).
- Gonzales-Barron, U., Gonçalves-Tenório, A., Rodrigues, V. and Cadavez, V. (2017). Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. *Current Opinion in Food Science*, 18(1): 7-13.
- Jalil, K., Vadood, R., and Abolfazl, B. (2011). Direct detection of *Escherichia coli* O157 and its major virulence factor genes in animal feces at slaughter using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *African Journal of Microbiology Research*, 5(14): 1763-1767.
- Kakagianni, M. and Koutsoumanis, K.P. (2019). Assessment of *Escherichia coli* O157: H7 growth in ground beef in the Greek chill chain. *Food Research International*, 123: 590-600.
- Khandaghi, J., Razavilar, V., & Barzgari, A. (2010). Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from manure fertilized farms and raw vegetables grown on it, in Tabriz city in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9): 891-895.
- Khakpour, M., Nazeri, F., Khandaghi, J., and Shayegh, J. (2012). Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on slaughtered cattle and calves in Tabriz abattoir. *The Veterinary Journal of the Islamic Azad University, Tabriz*, 5(4): 1379-1385.

- Kiranmayi, C., Krishnaiah, N. and Mallika, E.N. (2010). *Escherichia coli* O157: H7-An Emerging Pathogen in foods of Animal Origin. *Veterinary World*, 3(8): 382-391.
- Kudva, I.T., Hatfield, P.G. and Hovde, C. J. (1996). *Escherichia coli* O157: H7 in microbial flora of sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2): 431-433.
- Milnes, A.S., Stewart, I., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Newell, D.G., Sayers, A.R. et al., (2008). Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology and Infection*, 136(6): 739-751.
- Morsel, M. and Shakerian, A. (2023). Investigation the contamination of raw milk with *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157: H7 in Ramhormoz city, Khuzestan. *Journal Zoonosis*, 3(2): 57-69
- Olowe, O.A., Aboderin, B.W., Idris, O.O., Mabayoje, V.O., Opaleye, O.O., Adekunle, O.C. et al., (2014). Genotypes and phenotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Abeokuta, Southwestern Nigeria. *Infection and Drug Resistance*, 7: 253-259.
- Opsteegh, M., van Roon, A., Wit, B., Hagen-Lenselink, B., van Duijkeren, E., Dierikx, C. et al., (2018). Surveillance zoonosen in de melkgeiten-en melkschapenhouderij in 2016 (Surveillance zoonoses in dairy goat and dairy sheep industry in 2016). The Dutch National Institute for Public Health and the Environment, 1-72.
- Paiba, G.A., Pascoe, S.J.S., Wilesmith, J.W., Kidd, S.A., Byrne, C., Ryan, J.B. M. et al., (2002). Fecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Veterinary Record*, 150(19): 593-598.
- Paton, A.W., and Paton, J.C. (1998). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx 1, stx 2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2): 598-602.
- Rahimi, E., Khamesipour, F., Yazdi, F. and Momtaz, H. (2012). Isolation and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and EHEC O157: NM from raw bovine, camel, water buffalo, caprine and ovine milk in Iran. *Kafkas Universitesi Veterinetr Fakultesi Dergisi*, 18(4): 559-564. [In Persian]
- Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157: H7 in food and water. *International Journal of Food Microbiology*, 349: 109233.
- Rey, J., Sanchez, S., Blanco, J.E., De Mendoza, J.H., De Mendoza, M.H., Garcia, A. et al., (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2): 212-217.
- Sancak, Y.C., Sancak, H. and Isleyici, O. (2015). Presence of *Escherichia coli* O157 and O157: H7 in raw milk and Van herby cheese. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(4): 511-514.
- Thierry, S.I.L., Gannon, J.E., Jaufeerally-Fakim, Y. and Santchurn, S.J. (2020). Shiga-toxigenic *Escherichia coli* from animal food sources in Mauritius: Prevalence, serogroup diversity and virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology*, 324\, 108589.
- van den Brom, R., de Jong, A., van Engelen, E., Heuvelink, A. and Vellema, P. (2020). Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk-borne transmission. *Small Ruminant Research*, 189: 106123.
- Yang, T., Wang, Z., Song, Y., Yang, X., Chen, S., Fu, S., ... & Jiang, Y. (2021). A novel smartphone-based colorimetric aptasensor for on-site detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *Journal of Dairy Science*, 104(8): 8506-8516.
- Zhong, J. and Zhao, X. (2018). Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 by PCR in combination with propidium monoazide. *Three Biotechnology*, 8(1): 28-32.