مقاله اماده انتشار می باشد

میزان شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در شیر خام گوسفند در مناطق مختلف استان خوزستان در سال ۱۴۰۱

شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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، ایران

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

چکیده

اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$، 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 *(rfb)* O_{157}، *(flic)* H_7، stx_1 و stx_2 PCR انجام گرفت. در این تحقیق جداسازی *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 ایمی‌پنم، 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 *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به این آنتی‌بیوتیک‌ها است. آلودگی شیر خام گوسفند به باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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: *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، واکنش زنجیره پلی مراز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شیر خام گوسفند

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی سروتیپ* $O_{157}:H_7$، 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 $O_{157}:H_7$ است. از دیگر حیوانات مخزن *این باکتری می‌توان به* گوسفند، بز، غیر نشخوارکنندگانی مانند سگ، گربه، خوک، اسب و پرندگان اشاره کرد (Van den Brom *et al*., 2020 ؛ Smith *et al*., 2015). مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد حیوانات مخزن باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ روی گاو متمرکز است، بااین‌حال سایر حیوانات میزبان نیز شناسایی شده‌اند. در ایالت متحده، هلند و استرالیا شیوع *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در گوسفندان بالاتر از ۳۱ درصد بود که نشان می‌دهد گوسفندان نیز ممکن است نقش مهمی به‌عنوان مخزن باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ داشته باشند (Bach *et al*., 2002). در مطالعه‌ای که بین ۲۴ مزرعه‌ی گوسفند شیری در هلند صورت گرفت، باکتری *اشریشیا کلی* تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین در همه‌ی این مزارع گزارش شد (Opsteegh *et al*., 2018). هفت سروتیپ، O_{26}، O_{45}، O_{103}، O_{111}، O_{121}، O_{145} و O_{157} مسئول اکثر عفونت‌های STEC انسانی هستند (Capps *et al*., 2021 ؛ Khandaghi *et al*., 2011). محصولات غذایی مختلف ازجمله 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* $O_{157}:H_7$ به‌عنوان یک سویه انتروهموراژیک قادر به تولید شیگاتوکسین بوده و سبب ایجاد اسهال خونی یا کولیت خونریزی‌دهنده (Hemorrhagic Colitis) می‌شود. همچنین این باکتری می‌توانند 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 (Khandaghi *et al*., 2010 ؛ Kakagianni and Koutsoumanis, 2019). مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها تخمین زده است که بیمارهای ناشی از غذا توسط شیگاتوکسین *اشریشیا کلی* سروتیپ $O_{157}:H_7$، هرساله موجب ۲۶۵۰۰۰ مورد بیماری، ۰۰ ۳۶ مورد بستری و ۳۰ مورد مرگ در آمریکا می‌شود (Kakagianni and Koutsoumanis, 2019). این بیماری‌ها به‌طور مستقیم با فاکتورهای حدت مرتبط هستند. ازجمله شیگاتوکسین‌ها (Stx_1 و Stx_2)، اینتیمین (کد شده توسط *eae*) و انتروهمولیزین (*hly*A) 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 *hly*A و سرکوب سنتز پروتئین از طریق اتصال به رسپتور گلوبوتری‌آسیل‌سرامید (Globotriaosylceramide) توسط شیگاتوکسین ویژگی‌های اصلی مرتبط با حدت *اشریشیا کلی* تولیدکننده شیگاتوکسین هستند (Thierry *et al*., 2020).

باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ مهم‌ترین سروتیپ *اشریشیا کلی* تولیدکننده شیگاتوکسین، از اوایل دهه ۱۹۸۰ به‌عنوان یک پاتوژن حیاتی قابل‌انتقال از طریق آب و مواد غذایی مطرح‌شده است. این باکتری همچنین در شیر خام گزارش‌شده 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 گزارش‌شده 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 نوظهور مانند روش‌های حسگرهای زیستی، طیف‌سنجی و روش‌های دیجیتال مبتنی بر گوشی هوشمند به‌عنوان رویکردهای جدید در زمینه تشخیص باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ شناخته‌شده است (Rani *et al.*, 2021). حسگر رنگ سنجی مبتنی بر گوشی هوشمند به‌عنوان ابزاری کارآمد جهت تشخیص باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در شیر گزارش‌شده است (Yang *et al.*, 2021).

گزارش‌هایی از وجود آلودگی به اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ در شیر در ایران وجود دارد برای نمونه یک مورد اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ در مخازن شیر شرکت شیر پاستوریزه در ایران تشخیص داده‌شده است (Brenjchi *et al.*, 2011). همچنین حضور باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در شیر خام گاو استان خوزستان، به‌خصوص در فصول گرم تأییدشده است (Morseli and Shakerian, 2023).

با توجه به دوز پایین عفونت‌زایی و ظهور سویه‌های *اشریشیا کلی* سروتیپ $O_{157}:H_7$ 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* $O_{157}:H_7$ گاو است و عمده‌ی مطالعات بر روی گوشت، شیر و سایر فرآورده‌ها با منشأ گاو انجام‌شده 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 $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش‌های کشت به‌منظور تشخیص باکتری، وجود عامل بیماری‌زای $O_{157}:H_7$ با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction) و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

-جمع‌آوری نمونه‌ها

به‌منظور بررسی پتانسیل شیر خام گوسفند به‌عنوان شاخصی در انتقال باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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، 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، ۵، ۳، ۷، ۳، ۴، ۴، ۷، ۵، ۵، ۵، ۳، ۲، ۵، ۷، ۶، ۷، ۶، ۳، 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* $O_{157}:H_7$

مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از هر نمونه‌ی شیر سانتریفیوژ و از رسوب حاصل، مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth) (Merck, Germany) غنی شده با نوبیوسین (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 (Eosin Methylene Blue Agar) (Conda, Spain)، به‌صورت خطی کشت داده می‌شد. سپس از کلنی‌های با جلای سبز فلزی در محیط ائوزین متیلن بلو آگار، بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Tryptic Soy Agar) (Merck, Germany)، نسبت به تهیه کشت خالص اقدام می‌شد. سپس ضمن نگهداری پلیت مذکور در یخچال، نسبت به انجام رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی شامل تست اکسیداز، تست IMVIC و همچنین تست TSI و LIA و PCR اقدام می‌گردید.

-شناسایی مولکولی *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$

در ابتدا جهت جداسازی DNA از روش جوشانیدن 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 هموژن 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 به‌خوبی باهم مخلوط شدند. سپس میکروتیوب‌ها با قرار دادن بر روی آب جوش، به مدت ۶-۵ دقیقه حرارت داده شدند. پس‌ازآن مجدداً میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ گشته و ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی در یک میکروتیوب دیگر ریخته می‌شد و ضمن برچسب‌گذاری در فریزر۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌گردید. در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ که توسط شرکت زیست‌فناوری پیشگام سنتز شده است مطابق جدول (۱) استفاده شد.

جدول (۱)_ پرایمرهای پیشرو و معکوس مربوط به ژن‌های O_{157}، H_7، stx_1 stx_2 در باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه پرایمر	منبع
O_{157}F	CGGACATCCATGTGATATGG	259 bp	Paton *et al*., 1998
O_{157}R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		
H_7 F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625 bp	
H_7 R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
stx_1 F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614 bp	Kudva *et al*., 1996؛ Olowe *et al*., 2014
stx_1 R	CTGAATCCCCCTCCATTATG		
stx_2 F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779 bp	
stx_2R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG		

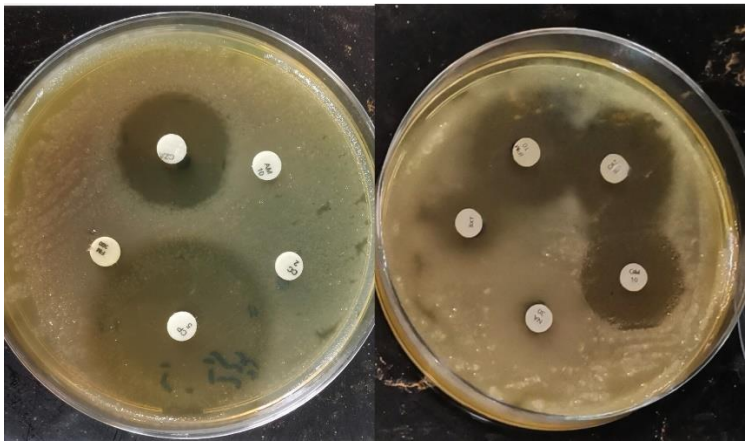
سپس طی دو مرحله نسبت به انجام PCR اقدام گردید. در مرحله نخست، مواد موردنیاز که شامل پنج میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، ۲۰ میکرولیتر مستر میکس (Ampliqon, Denmark) حاوی یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس (Cinnagen, Iran) (درمجموع چهار میکرولیتر)، ۱۲/۵میکرولیتر از مسترمیکس پایه و ۳/۵ میکرولیتر 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) قرارگرفته 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 تهیه‌شده و یک نمونه کنترل منفی به همراه نمونه‌های مشکوک گذاشته شود. در آزمون PCR، از DNA مربوط به باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ (سویه‌ی ATCC 43895) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در PCR مرحله نخست، با مشاهده هر دو باند O_{157} و H_7 در یک واکنش PCR، سویه مربوطه ازنظر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ مثبت گزارش‌شده و سپس نسبت به انجام PCR مرحله دوم اقدام می‌گردید تا بدین‌وسیله نسبت به ارزیابی و تشخیص توکسین‌زا بودن سویه‌های باکتریایی تأییدشده در مرحله نخست، ازنظر دارا بودن ژن‌های stx_1 و stx_2 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 موردنظر 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 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 نورUV، باندهای ژل ازنظر 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 *اشریشیا کلی*

$O_{157}:H_7$، در سرم فیزیولوژی تلقیح شده و با مقایسه سوسپانسیون باکتریایی حاصل با کدورت لوله ۰/۵ مک‌فارلند، مقدار کدورت موردنیاز تشخیص داده می‌شد. سپس سواب استریل به سوسپانسیون حاصل آغشته شده و به‌طور کامل تمام سطح محیط مولر هینتون 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)، ایمیپنم (۱۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، تریمتوپریم سولفامتاکسازول (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم کالوونیک 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 موردبررسی 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. درنتیجه میزان حساسیت یا مقاومت ایزوله‌ها به هرکدام از آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین می‌گردید.



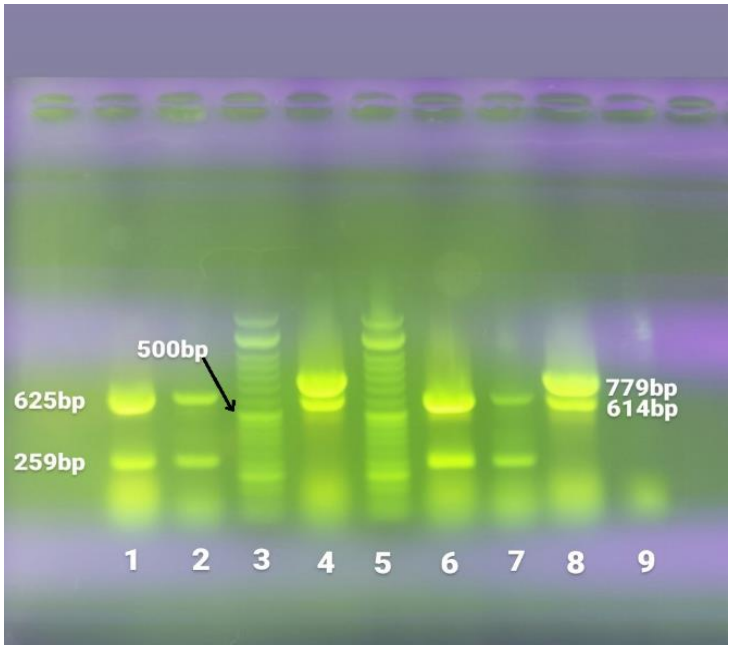
شکل (۱)_سنجش آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشاکلی* $O_{157}:H_7$

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 کلنی-های 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 سروتیپ $O_{157}:H_7$ در مواد غذایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌عنوان روش استاندارد در نظر گرفته می‌شود. کلنی‌های مشکوک برای تشخیص قطعی و حضور ژن‌های O_{157}، H_7، stx_1 و stx_2 به‌وسیله‌ی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. طی بررسی‌ها در مورد حضور ژن‌های O_{157} و H_7 باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگارز نشان داد که از تعداد ۲۱ نمونه مثبت مرحله‌ی قبل، ۳ نمونه (۲/۶۳درصد) دارای ژن‌های O_{157} و H_7 بودند. طی مرحله بعد جدایه‌ها از نظر وجود ژن‌های stx_1 و stx_2 مورد بررسی قرار گرفتند که صرفاً یک نمونه (۰/۸۷درصد) بر روی آگارز باندهای حاوی هر دو ژن stx_1 و stx_2 را تشکیل داد. این نمونه مربوط به شهر اندیمشک بود. در دو نمونه (۱/۷۵درصد) دیگر (مربوط به شهرهای شوشتر و گتوند) فقط ژن‌های O_{157} و H_7 حضور داشت و آثاری از حضور ژن‌های بیماری‌زای stx_1 و stx_2 مشاهده نشد (شکل ۲).

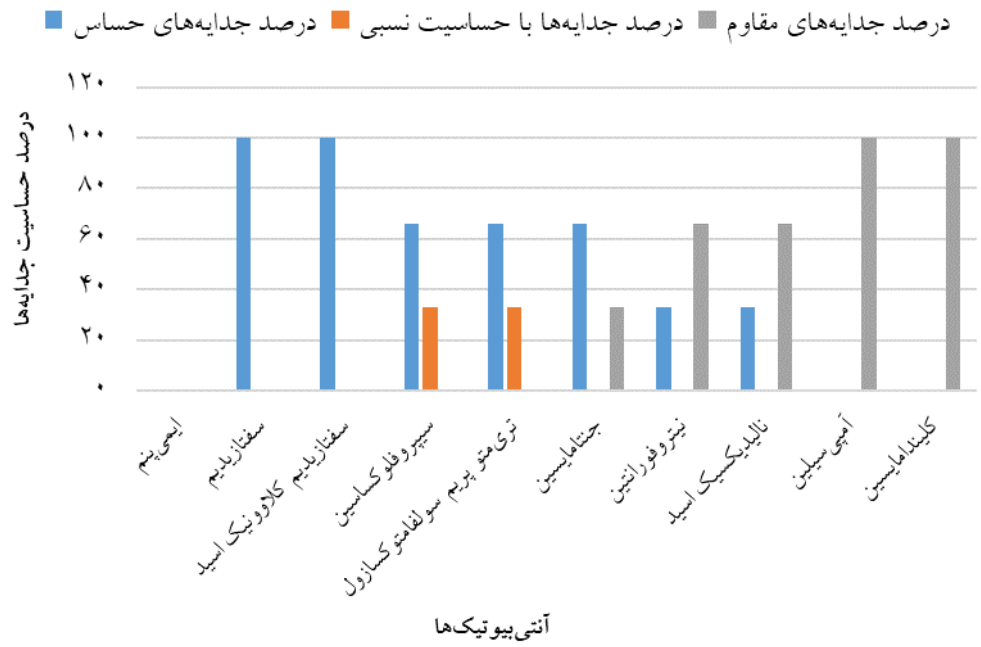


شکل (۲)_ موارد مثبت باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به همراه کنترل مثبت و منفی مربوط به ژن‌های O_{157}، H_7، stx_1 و stx_2 در PCR

ستون شماره ۱: *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، ستون شماره ۲: *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ ، ستون شماره ۳: نردبان ژنی ۵۰bp، ستون شماره ۴: کنترل مثبت باکتری دارای ژن‌های stx_1 (۶۱۴bp) و stx_2 (۷۷۹bp)، ستون شماره ۵: نردبان ژنی ۵۰bp، ستون شماره ۶: کنترل مثبت باکتری دارای ژن‌های O_{157} (۲۵۹bp) و H_7 (۶۲۵bp)، ستون شماره ۷: *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، ستون شماره ۸: ژن‌های stx_1 و stx_2 در نمونه مثبت *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$، ستون شماره ۹: کنترل منفی.

در نهایت نتایج آزمون سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که صد در صد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاوونیک اسید حساس هستند. سپس به‌ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و جنتامایسین (۶۶/۶۶ درصد)، نیتروفورانتین و 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 *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ به این آنتی‌بیوتیک‌ها است (نمودار ۱).



نمودار (۱)_ نتایج آزمون سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ به‌عنوان یک نگرانی بهداشت عمومی در بسیاری از کشورهای جهان مطرح است. عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری *اشریشیا کلی* تولید کننده شیگاتوکسین سروتیپ $O_{157}:H_7$، چهارمین بیماری پرهزینه در کانادا و ایالت متحده است. *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 عمدتا برای انسان بیماری‌زا است اما در گاو و سایر حیوانات هیچ‌گونه علائم بالینی و بیماری به‌جز اسهال ایجاد نمی‌کند. بنابراین این حیوانات به عنوان ناقل عمل می‌کنند (Kiranmayi *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر تعداد ۱۱۴ نمونه شیر خام گوسفند به منظور جداسازی و شناسایی باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 شیگاتوکسین stx_1 و stx_2 و همچنین تایید سروتایپ (O_{157} و H_7) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت یک جدایه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ دارای ژن‌های stx_1 و stx_2 (۰/۸۷ درصد) و ۲ جدایه *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ فاقد ژن‌های stx_1 و stx_2 (۱/۷۵ درصد) تشخیص داده شد. سنجش آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، سفتازیدیم کلاوونیک اسید و سفتازیدیم (۱۰۰درصد) نشان داد. همچنین بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلیندامایسین (۱۰۰درصد) مشاهده شد.

در مطالعه‌ایی در ایران که تحت عنوان شناسایی مستقیم باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و ژن‌های فاکتور حدت در مدفوع حیوانات کشتاری در زمان کشتار انجام شد، باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 *اشریشیا کلی* وروتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه انجام شد که نتایج نشان‌دهنده وجود مقادیر نسبتاً بالای باکتری *اشریشیا کلی* وروتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه تبریز بود (Khakpour *et al*., 2012).

در مطالعه‌ای دیگر وجود باکتری *اشریشیا کلی* سروتیپ $O_{157}:H_7$ در غذاهای مختلف با منشا دامی در شمال غربی یونان مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها جهت تشخیص سروگروپ $O_{157}:H_7$ با استفاده از روش‌های استاندارد کشت و جداسازی ایمونومغناطیسی بررسی شدند. نتایج در مورد شیر گوسفند، پاتوژن را یک مورد از ۱۰۰ نمونه (۱درصد) گزارش داد. سویه‌ی جدا شده سوربیتول منفی و تولید کننده وروتوکسین بوده و هر دو ژن stx_1 و stx_2 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 یک مورد $O_{157}:H_7$ حامل ژن‌های stx_1 و stx_2 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 *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ حامل ژن‌های شیگاتوکسین یک درصد بود اما در تحقیق حاضر از تعداد ۱۱۴ نمونه شیر گوسفند مورد بررسی، فراوانی باکتری *اشریشیا کلی* حامل ژن‌های شیگاتوکسین، ۰/۸۷ درصد گزارش شد. در هر دو مطالعه، جدایه‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند. اختلاف در نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در مطالعات مختلف نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند تحت تأثیر منطقه جغرافیایی، نوع و نحوه فرآوری و مصرف مواد غذایی، بیماری های باکتریایی شایع و فرهنگ مصرف داروها و به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گیرد. علاوه بر این، احتمالا مقاومت سویه‌های مختلف *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ *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 *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ را در نمونه‌های شیر غیرپاستوریزه میش مورد بررسی قرار داد. در بررسی وجود ژن‌های (O_{157} *(rfb)* و H_7 *(flic)*، از بین تمام نمونه‌های شیر میش، ۳ مورد (۳/۵ درصد) از نظر *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ مثبت بودند. سپس با استفاده از مولتی‌پلکس PCR برای حضور ژن‌های حدت *ehx*A، *eae*A، stx_1 و stx_2 تجزیه و تحلیل شدند. تمام جدایه‌های $O_{157}:H_7$ دارای سم شیگاتوکسین بوده و واجد ژن‌های حدت *ehx*A و *eae*A 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* $O_{157}:H_7$ 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* $O_{157}:H_7$ 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 آنتی بیوتیکی 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 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 مطالعه‌ایی 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 (۱۰/۸درصد) مخزن شیر فله شناسایی شدند. درحالی‌که سروتیپ $O_{157}:H_7$ از یک (۰/۳ درصد) مخزن فله جدا شد. در کل ۸ سویه سروتیپ غیر O_{157} و یک سویه سروتیپ $O_{157}:H_7$ 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 $O_{157}:H_7$ و $O_{157}:NM$ (Non-Motile) از شیر گاو، شتر، گاومیش، بز و گوسفند در ایران انجام شد. به‌طور کلی ۱۷ مورد از ۷۳۴ نمونه شیر خام (۲/۳ درصد) آلوده به *اشریشیا کلی* O_{157} مشخص شد. بالاترین میزان شیوع در نمونه‌های شیر گاومیش (۵/۵ درصد) و به دنبال آن شیر گاو (۳/۹ درصد)، گوسفند (۱/۴ درصد) و بز (۱ درصد) مشاهده شد (Rahimi *et al*., 2012). مطالعات بسیاری شیوع *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک سروتیپ $O_{157}:H_7$ را مخصوصا 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 *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک سروتیپ $O_{157}:H_7$ مثبت بودند (Franco *et al*., 2009).

آلودگی شیر خام گوسفند به باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در منطقه خوزستان نشان داد که مصرف شیر خام گوسفند می‌تواند احتمالا با ریسک ابتلا به بیماری‌های ناشی از این باکتری ارتباط داشته باشد. با توجه جداسازی و شناسایی باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در شیر و به اثبات رسیدن توکسین‌زایی آن، مصرف شیر خام گوسفند یک خطر بالقوه برای سلامت عمومی جامعه و مصرف کنندگان به‌حساب می‌آید. حضور *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و سایر سروتیپ‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده‌ی شیگاتوکسین در شیر، می‌تواند نشان دهنده‌ی آلودگی ثانویه در طی زنجیره‌ی تولید و انتقال شیر باشد (Smith *et al*., 2015; Farrokh *et al*., 2013; Gomes *et al*., 2016). شیر خام باید تحت نظارت‌های معمول درمورد شاخص‌های آلودگی مدفوعی، از جمله *اشریشیا کلی* و باکتری‌های کلی‌فرم قرارگیرد. چنین رویکردهایی می‌توانند کیفیت بهداشتی بهبود یافته‌ایی را در عرضه شیر خام به دست آورد. اما از آنجایی که سطح کم یا فرکانس پایین آلودگی گاهی اجتناب ناپذیر 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 اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ 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 منافعی برای اعلام ندارند.

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 O_{157}: H_7 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 0_{157} 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 O_{157}: H_7 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 O_{157}: H_7 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 O_{157}: H_7 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 O_{157}: H_7 in Ramhormoz city, Khouzestan. 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 zoönosen 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 enterohaemorragic 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 Persion]
- 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.

Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in raw sheep milk in different regions of Khuzestan province in 2022

Presence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in sheep milk

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: //Accepted: //)

Abstract

Escherichia coli O_{157}:H_7 is one of the most important foodborne pathogens. This bacteria is the cause of gastroenteritis infections with low infectious doses and as an enterohemorrhagic strain, it causes hemorrhagic dysentery. Raw milk is one of the sources of contamination with this bacteria and can expose humans to severe infections. This study aimed to investigate the potential of raw sheep milk as an indicator of transmitting this pathogen and endangering community health. To accomplish this study, during April, May, June, and July 2022, 114 samples of raw sheep milk were collected in Khuzestan province within 4 months. The collected samples were transferred to the food hygiene laboratory in cold conditions. After biochemical diagnostic tests, PCR was performed in the next step for diagnosis using specific primers related to O_{157} (*rfb*), H_7 (*flic*), stx_1, and stx_2 genes. The present study confirmed the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from 3 samples (2.63%). Finally, Antibiogram tests were performed on the confirmed isolates to assess antibiotic susceptibility. The results showed that the sensitivity of isolates was 100% to imipenem, ceftazidime, and ceftazidime clavulanic acid, 66.66% were susceptible to ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and 33.33% were susceptible to nalidixic acid and nitrofurantoin respectively. None of the isolates were susceptible to ampicillin and clindamycin indicating that the isolates of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 have the most resistance against these antibiotics. Contamination of raw sheep milk with *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in Khuzestan region showed that consuming raw sheep milk may be associated with the risk of diseases caused by this bacterium.
Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Escherichia coli* O_{157}:H_7, Polymerase chain reaction, Antibiotic resistance, Raw sheep milk