

مطالعه فراوانی باکتری اشرشیاکولی و روتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه تبریز

منصور خاکپور^{۱*}، فرهاد ناظری^۲، جلیل خندقی^۳، جلال شایق^۴

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران
 ۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، دانش‌آموخته دکترای عمومی، تبریز، ایران
 ۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سراب، گروه صنایع غذایی، سراب، ایران
 ۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، شبستر، ایران
- * نویسنده مسئول مکاتبات: khakpour@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۵، پذیرش نهایی: ۹۰/۳/۱۸)

چکیده

اشرشیا کولای به عنوان فلور طبیعی در روده بزرگ و پاتوژن عمده مشترک میان انسان و دام قابل انتقال از طریق غذا بوده که عامل مهم عفونت‌های اسهالی در گاو به‌ویژه گوساله می‌باشد. در این پژوهش هدف شناسایی و جداسازی اشرشیا کولای و روتوکسیکوژنیک می‌باشد که با مراجعه به کشتارگاه تبریز به‌طور تصادفی ۴۳ نمونه مدفوعی از گوساله‌ها و ۱۵۱ نمونه مدفوعی از گاوها اخذ و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز منتقل گردید. پس از غنی‌سازی نمونه‌ها و کشت در محیط‌های کشت نتایج ذیل به‌دست آمد: از ۱۹۴ نمونه اخذ شده ۱۱۳ مورد اشرشیا کولای جدا شد که ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت و ۲۸ نمونه سوربیتول منفی بودند از ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت، ۱۹ نمونه گوساله و ۶۶ نمونه گاو و از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی، ۱۳ نمونه گوساله و ۱۵ نمونه گاو بودند. همچنین تست سرولوژی برای مشخص کردن سروتیپ‌های اشرشیا کولای غیر O157 روی نمونه‌های سوربیتول مثبت انجام گرفت که ۹ نمونه گوساله و ۳۳ نمونه گاوی واکنش مثبت نشان دادند. سپس روی ۲۸ نمونه سوربیتول منفی و ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت تست PCR با استفاده از سکانس ژن‌های STx1 و STx2 انجام گرفت که ۱۹ نمونه از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی و ۷ نمونه از ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت اشرشیا کولای و روتوکسیکوژنیک بودند. نتایج نشان‌دهنده وجود مقادیر نسبتاً بالای اشرشیا کولای و روتوکسیکوژنیک در مدفوع گاوها و گوساله‌های کشتاری در کشتارگاه تبریز می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۴، پیاپی ۲۰، صفحات: ۱۳۷۹-۱۳۸۶.

کلید واژه‌ها: اشرشیا کولای و روتوکسیکوژنیک، گاو، گوساله، کشتارگاه تبریز، PCR

مقدمه

معمولاً با تاژک‌های اطراف متحرک و بسیاری از سوش‌های آن حاوی پیلی هستند و برخی از آنها لایه لعابی شبه کپسولی دارند هر گرم از مدفوع انسان حاوی حدود بیش از 10^8 باکتری

جنس اشرشیا، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان جزئی از فلور طبیعی در روده بزرگ انسان و حیوانات وجود دارد. اشرشیاکولای یک باسیل گرم منفی

اشرشیا کولای می باشد/اشرشیا کولای مانند بقیه اعضای خانواده انتروباکتریاسه، بی‌هوازی اختیاری است. و به‌خوبی روی محیط‌های خیلی ساده رشد می‌کند فعالیت همولیتیک در محیط آگار خون‌دار از خصوصیات برخی از سویه‌های اشرشیا کولای است و در سطح محیط کشت آگار خون‌دار رشد کرده و کلونی‌های کروی و محدود به اندازه ۱ تا ۲ میلی‌متر با سطح صاف، قوام آبدار و به رنگ خاکستری را تولید می‌کند. دستگاه گوارش پستانداران در مدت کوتاهی پس از تولد، از محیط اشرشیا کولای را اخذ می‌کند. این اجرام به عنوان اعضای مهم فلور طبیعی روده در طول عمر حضور دارند. بسیاری از سویه‌های اشرشیا کولای حدت پایینی دارند اما می‌توانند به‌صورت فرصت طلب در خارج از دستگاه گوارش موجب بیماری‌هایی مانند بیماری‌های دستگاه ادراری و غدد پستانی گردند و به عنوان یک باکتری فرصت طلب در عفونت‌های زخم، پنومونی، مننژیت و سپتی سمی شرکت می‌کنند. از نظر اپیدمیولوژی و بیماری‌زایی اشرشیا کولای عامل بیماری‌های مهمی در انسان و دام است از جمله: بیماری‌های روده‌ای (کلی باسیلوز روده‌ای، اسهال نوزادی)، سپتی سمی نوزادان (کولی سپتی‌سمی)، بیماری‌ها دستگاه تناسلی - ادراری مثل مثانه و رحم، ورم پستان گاو، کلی باسیلوز طیور و توکسمی کلی باسیلی (۱ و ۳).

فاکتورهای متعددی در سویه‌های بیماری‌زای اشرشیا کولای به آنها اجازه می‌دهد که در سطوح مخاطی استقرار یافته و متعاقباً ایجاد بیماری نمایند. عوامل مستعد کننده‌ای که اجازه استقرار باکتری و حساس شدن حیوانات جهت بروز بیماری‌های بالینی است شامل سن، وضعیت ایمنی، ماهیت جیره غذایی و نیز مواجهه با بار میکروبی بالا از سویه‌های بیماری‌زا می‌باشد. از عوامل حدت سویه‌های پاتوژن/اشرشیا کولای، کپسول، فیمبری، آندوتوکسین، ساختارهای مسئول کلونیزه شدن باکتری، آنتروتوکسین، وروتوکسین و دیگر مواد ترشعی می‌باشد. در سال‌های اخیر، اشرشیا کولای آنتروهموراژیک سویه O₁₅₇:H₇ به عنوان پاتوژن عمده مشترک میان انسان و دام که قابل انتقال

از طریق غذا می‌باشد مسئول سندرم اورمیک همولیتیک-کولیت خونریزی دهنده^۱ شناخته شده است و EHEC عامل کولیت هموراژیک در اطفال کمتر از پنج سال می‌باشد. کلی باسیلوز روده‌ای در گوساله‌ها و بره‌های تازه متولد شده که توسط سروتیپ‌های خاصی بروز می‌کنند در هفته اول زندگی مسأله بسیار مهمی است، البته اسهال می‌تواند در گوساله‌های ۲ تا ۳ هفته نیز مهم باشد. بیماری در تمامی نژادهای گوشتی و شیری اتفاق می‌افتد. امروزه تست‌های سرولوژی و روش‌های مولکولی برای تشخیص آزمایشگاهی باکتری‌ها وجود دارد روش‌های جدید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) که بر پایه سکانس ژن می‌باشند به خوبی و با موفقیت برای تشخیص اشرشیا کولای بکار می‌رود. به همین منظور در این تحقیق جداسازی و شناسایی اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوزنیک از مدفوع گاو و گوساله‌ها به روش کشت و PCR انجام شده است (۱، ۲ و ۳).

مواد و روش‌ها

مراحل نمونه برداری و کشت:

طی مراجعه به کشتارگاه تبریز در زمستان ۱۳۸۶ به‌صورت تصادفی تعداد ۴۳ نمونه مدفوعی از گوساله‌ها و تعداد ۱۵۱ نمونه مدفوعی از گاوها مجموعاً ۱۹۴ نمونه اخذ و پس از قرار دادن در ظروف استریل در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی ارجاع شد.

در آزمایشگاه در شرایط کاملاً استریل در کنار شعله از هر نمونه مدفوعی ۲۵ گرم به‌دقت وزن شده و به داخل ۲۲۵ میلی‌لیتر پپتون برات استریل اضافه گردید سپس ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا غنی‌سازی انجام شود.

۵ لوله آزمایش برای هر نمونه تهیه شد که هر کدام حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل شده بودند از محیط کشت پپتون برات حاوی مدفوع به‌مقدار ۱ میلی‌لیتر برداشت کرده و به لوله آزمایش اول منتقل شده و رقت 10^{-1} تهیه گردید بعد از

¹ - Hemorrhagic colitis – hemolytic uremic syndrome

نمودیم سپس محلول حاصل را در 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده دوباره مایع رویی را برداشت و به میکرو تیوب $1/5 \text{ ml}$ جدید منتقل شد، هم حجم مایع رویی ایزوپروپانول سرد اضافه گردید، نیم ساعت در یخچال گذاشته سپس در 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده مایع رویی را دور ریخته و بر روی رسوب باقی مانده در میکروتیوب به مقدار ۲۵۰ ماکرولیت اتانول 70% ریخته و سپس دوباره با اتانول شستشو دادیم، در 12000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده، اتانول را بیرون ریخته و به مقدار ۵۰ ماکرولیت آب مقطر یا بافر تریس اضافه کرده و به عنوان استوک DNA استفاده نمودیم (۷).

انجام PCR:

در این بخش اجزاء و مواد تشکیل دهنده واکنش PCR و نیز برنامه دمایی و زمانی انجام آن به صورت فهرست وار آورده شده است. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش بر مبنای سکانس ژن stx_1 و stx_2 و ساخته شرکت سیناژن مورد استفاده قرار گرفت (۷).

Primer 1 : stx_1 :

Forward: CAT TGT CTG GTG ACA GTA GCT

Reverse : CCC TGT AAT TTG CGC ACG GAG

Primer 2 : stx_2 :

Forward: CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT

Reverse : CCT GTC AAC TGA GCA CTG TTG

PCR materials :

Tamplate DNA (from BHI medium)	1 μl
dNTP _s (10 mM)	1 μl
Enzyme (<i>Taq</i> DNA polymerase)	0.5 μl
Buffer (10X)	2.5 μl
MgCl ₂	1.2 μl
Primer	1 μl
D.W	17.8 μl

بهم زدن ، مجدداً به مقدار ۱ میلی لیتر از لوله اول برداشت و به لوله دوم اضافه شد و رقت 10^{-2} به دست آمد و این عمل را تا لوله پنجم ادامه داده تا رقت 10^{-5} حاصل گردید. از لوله حاوی رقت 10^{-5} به مقدار $0/1$ میلی لیتر برداشت کرده و روی محیط کشت مکانیکی آگار، ریخته و به شکل یکنواخت کشت داده شد، سپس محیط های کشت را به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی گراد انکوبه کرده و در ادامه پس از انکوباسیون محیط های کشت جهت خالص سازی و شناسایی ای کولای، از پرگنه های لاکتوز مثبت (صورتی تا قرمز) ۵ کلونی به شکل تصادفی برداشت کرده و به محیط کشت BHI آگار انتقال داده شد و سپس این محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. بعد از رشد کلونی ها در محیط BHI A تست اکسیداز و کاتالاز بر روی هر کلونی به صورت جداگانه انجام گرفت و از بین کلونی هایی که تست اکسیداز منفی و تست کاتالاز مثبت داشتند با انجام آزمایش های تکمیلی IMViC و بعد از تأیید در آن به محیط های افتراقی همچون اوره، لیزین، اورنیتین، ONPG، تولید گاز از گلوکز، تخمیر سوربیتول و محیط SIM از جهت وجود حرکت انتقال داده و مورد بررسی قرار داده شد و از اشرشیا کولای بودن آنها اطمینان حاصل شد (۴). در ادامه تحت آزمایش PCR قرار گرفتند.

روش کار مولکولی (استخراج DNA و PCR):

از هر یک از نمونه های تأیید شده یک پلیت BHI A تهیه و کدگذاری شده و جهت PCR آماده شدند.

استخراج DNA :

ابتدا یک کلونی از پلیت باکتری برداشت و به داخل میکروتیوب $1/5 \text{ ml}$ انتقال دادیم سپس مقدار ۵۰۰ مایکرولیتر بافر لیزکننده به آن اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری $65-60^{\circ}\text{C}$ قرار دادیم. در ادامه در 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم مایع رویی را برداشته و به یک میکروتیوب $1/5 \text{ ml}$ دیگر انتقال داده و هم حجم مایع رویی انتقال داده شده مخلوط کلروفرم- ایزوآمیلیک الکل اضافه

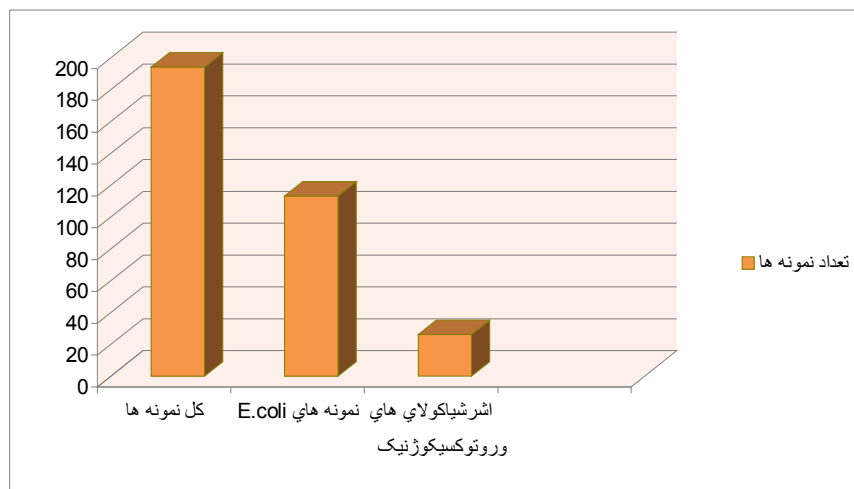
۲-۵-۳- الکتروفورز DNA با ژل آگاروز:

درصد ژل آگاروز استفاده شده، ۱٪ بود. پس از انحلال کامل و کاهش دمای ژل، ژل تهیه شده در ظرف الکتروفورز مناسب (سینی الکتروفورز) که قبلاً شانه‌گذاری شده بود، ریخته می‌شد. پس از آماده شدن ژل و جدا کردن شانه، ظرف به تانکر الکتروفورز انتقال یافت. نمونه‌های DNA به نسبت ۵ به ۱ با بافر بارگذاری ۶ x (Loading Buffer) مخلوط شده و در چاهک‌های ژل ریخته شدند. ولتاژ دستگاه در حدود ۸۵ mv تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت ۱-۱/۵ ساعت روی ژل حرکت می‌کردند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از تانک خارج گردید و در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ mg/ml قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه ژل از محل رنگ خارج شده و از ژل مورد نظر در دستگاه ژل داکيومنت عکس‌برداری شد. (۷ و

(۹)

PCR program:

94 °C	4 min
(initial denaturation)	
94 °C	40 s
(denaturation)	
62 °C	30 s
(annealing)	
72 °C	75 s
(extension)	
Go to 2	35 cycles
72 °C	10 min
(final extension)	



نمودار ۱- نتایج تعداد اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوژنیک

یافته‌ها

۳-۱-۱- نتایج حاصل از کشت میکروبی:

پس از کشت و انجام آزمایشات تکمیلی تعداد ۱۱۳ نمونه معادل ۵۸/۲۴٪ از کل نمونه‌ها، اشرشیا کولای جدا شد که از این نمونه‌ها ۸۵ نمونه معادل ۷۵/۲۲٪ سوربیتول مثبت و ۲۸

از مجموع ۱۹۴ نمونه اخذ شده، ۴۳ نمونه مربوط به گوساله و ۱۵۱ نمونه مربوط به گاو بودند (نمودار ۱).

وروتوکسیکوژنیک جدا شد که از نمونه‌های فوق ۹ مورد مربوط به گاو و ۱۰ مورد مربوط به گوساله ها بودند. از ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت، ۱۹ نمونه مربوط به گوساله و ۶۶ نمونه مربوط به گاو و از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی نیز ۱۳ نمونه مربوط به گوساله و ۱۵ نمونه گاوی بودند (نمودارهای ۲ و ۳).

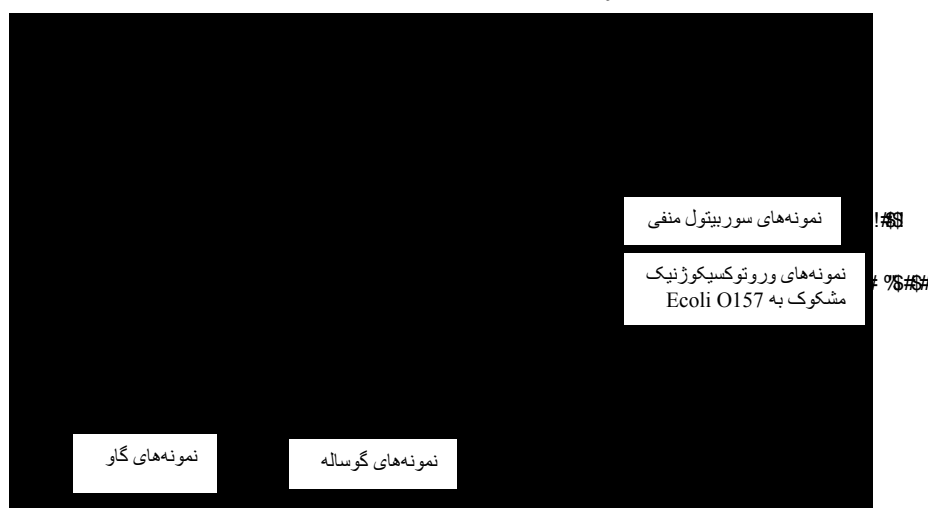
نتایج PCR:

در ادامه ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت و ۲۸ نمونه سوربیتول منفی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی تعداد ۱۹ نمونه معادل ۱۶٫۸٪ اشرشیا کولای

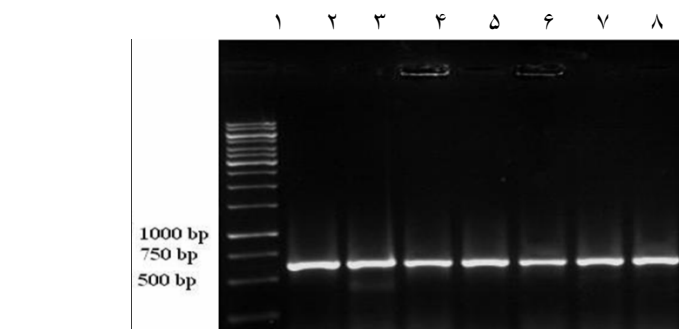
وروتوکسیکوژنیک جدا شد که از نمونه‌های فوق ۹ مورد مربوط به گاو و ۱۰ مورد مربوط به گوساله ها بودند. از ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت، ۱۹ نمونه مربوط به گوساله و ۶۶ نمونه مربوط به گاو و از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی نیز ۱۳ نمونه مربوط به گوساله و ۱۵ نمونه گاوی بودند (نمودارهای ۲ و ۳).

نتایج PCR:

در ادامه ۸۵ نمونه سوربیتول مثبت و ۲۸ نمونه سوربیتول منفی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که از ۲۸ نمونه سوربیتول منفی تعداد ۱۹ نمونه معادل ۱۶٫۸٪ اشرشیا کولای

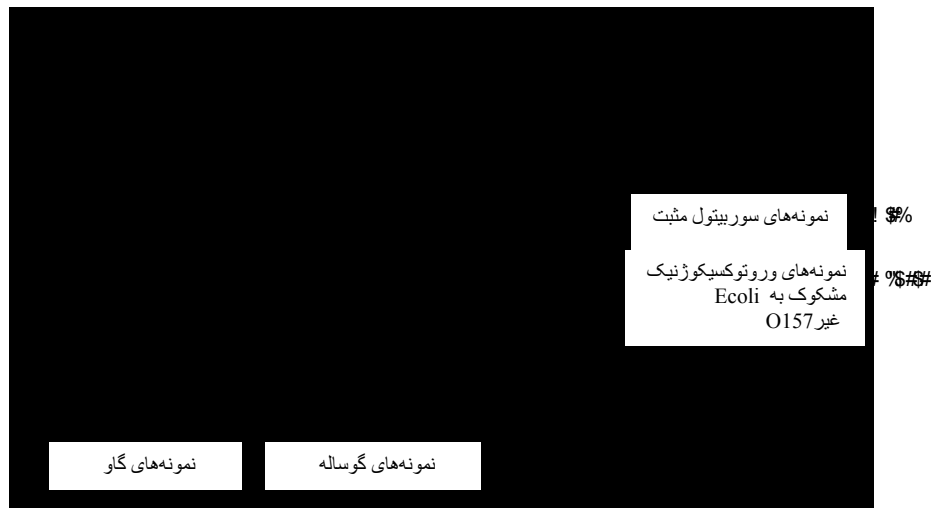


نمودار ۲- مقایسه نتایج تعداد E.coli وروتوکسیکوژنیک در نمونه‌های سوربیتول منفی در گاو و گوساله



نگاره ۱- باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR. اندازه باند معادل ۷۳۲ bp که مربوط به قطعه STx₁

ردیف ۱ حاوی سایز مارکر DNA ladder plus شرکت Fermentas و ردیف ۲ کنترل مثبت و در خانه‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ نمونه مثبت



نمودار ۳- مقایسه نتایج تعداد *E. coli* وروتوکسیکوژنیک در نمونه‌های سوربیتول مثبت در گاو و گوساله

بحث و نتیجه گیری

توجه ویژه به خطر بالقوه آلودگی انسان از طریق مصرف گوشت در منطقه تبریز احساس می‌شود. در ضمن خطر آلودگی مستقیم کارگران کشتارگاه و افرادی که با گوشت خام و به‌ویژه آلایش‌های کشتارگاهی سرو کار دارند به‌عنوان یک عفونت منتقل شونده از حیوان قابل بررسی است. پژوهش‌های مشابه در مناطق دیگر نتایج قابل مقایسه‌ای را با نتایج پژوهش حاصل گزارش کردند. به‌عنوان نمونه در پژوهشی که در سال ۱۹۸۸ توسط Blanco و همکاران در شمال اسپانیا بر روی ۲۸۹ نمونه /اشرشیا کولای جدا شده از مدفوع گاوها انجام گرفته گزارش نموده که ۲۰/۵٪ نمونه‌ها /اشرشیا کولای وروتوکسیکوژنیک می‌باشند و در ادامه اثرات بیماری‌زای این باکتری‌ها بر روی موش را مطالعه نموده است (۵).

Fukushima و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ژاپن در مطالعه‌ای بر روی نمونه مدفوعی ۶۰۵ رأس گاو و گوساله به روش کشت و PCR برای جستجوی /اشرشیا کولای‌های تولید کننده شیگا

در پژوهش حاضر با کار بر روی ۱۱۳ /اشرشیا کولای جدا شده از نمونه‌های مدفوعی گاوهای کشتاری کشتارگاه تبریز بعد از انجام کشت و PCR مشخص شد تعداد ۲۶ نمونه معادل ۲۳٪ از موارد، جزء /اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوژنیک بودند. این درصد بالا از دو جنبه حائز اهمیت می‌باشد. از یک سو به دلیل اینکه /اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوژنیک عامل بیماری‌های بسیار مهم اقتصادی در دامپزشکی از قبیل اسهال کلی باسیلی گوساله‌ها، ورم پستان کلی باسیلی گاو و... می‌باشند، وجود درصد نسبتاً بالای این باکتری‌ها در مدفوع گاوهایی که ظاهر سالم منطقه نشان دهنده این موضوع می‌باشد که مدفوع گاوها یکی از مهم‌ترین مخازن انتقال این بیماری‌ها در اپیدمیولوژی کلی باسیلوز گاو و گوساله در منطقه می‌باشد. از طرف دیگر درصد بالای این باکتری‌ها در مدفوع گاوهایی کشتاری و احتمال نسبتاً بالای آلودگی گوشت به مدفوع در جریان کشتار و توجه به این موضوع که یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا در انسان /اشرشیا کولای O157، H7 جزو /اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوژنیک می‌باشد، لزوم

Sergent و همکاران در سال ۲۰۰۴ با کار بر روی این باکتری گزارش نموده‌اند از ۵۲٪ آغل‌های نمونه برداری شده و ۹۵/۹٪ جایگاه‌های پروراندی مورد بررسی، اشرشیا کولای O157 H7 جداسازی شده است. از سوی دیگر فراوانی بیشتر این باکتری در مدفوع گوساله‌های پروراری در مقایسه با گاوها موید نتایج پژوهشی حاضر می‌باشد (۱۰).

در پژوهش Muffling و همکاران در آلمان در سال ۲۰۰۷ گزارش شده است که میزان فراوانی اشرشیا کولای وروتوکسیکوژنیک در مدفوع خوک‌های مورد مطالعه بسیار بیشتر از گاوها می‌باشد اما فراوانی سویه‌های مرتبط با بیماری‌های انسان در نمونه‌های گاوی بسیار بیشتر بوده و اغلب سروتیپ O157 می‌باشد (۹) این نتایج نشان دهنده اهمیت بالای گاو از نظر بهداشت عمومی می‌باشد.

در پژوهش حاضر تعداد ۸۵ نمونه از ۱۱۳ نمونه مورد آزمایش سوربیتول مثبت بودند که از این تعداد ۷ نمونه با آزمایش PCR در گروه وروتوکسیکوژنیک قرار گرفتند که همگی از نمونه‌های مدفوعی اخذ شده از گاو به دست آمده‌اند. این نمونه‌ها از سروتیپ‌های وروتوکسیکوژنیک غیر O157 می‌باشند. نتایج پژوهش‌های دیگر هم از جدا شدن این سروتیپ‌ها از مدفوع گاو و گوساله حکایت می‌کند. سروتیپ‌های جدا شده شامل O26، O126، O111 و O121 می‌باشند (۵، ۶ و ۹).

در سال ۲۰۰۳ Laven و همکاران در انگلستان با کار بر روی گوساله‌های کشتاری در ۳ کشتارگاه لندن در خلال سال‌های ۱۹۹۹ و ۲۰۰۰ به روش PCR جهت جستجوی اشرشیا کولای O157 گزارش نموده‌اند. میزان این باکتری در قسمت‌های مختلف گوشت و دستگاه گوارش گوساله‌ها متفاوت بوده به طوری که میزان جداسازی و کلونیزه شدن باکتری در قولون بیشتر از شکمبه بوده همچنین میزان اتصال آن به دیواره روده‌ها بیشتر می‌باشد. از سوی دیگر فراوانی این باکتری در خلال ماه‌های زمستان نسبت به سایر فصول به طور معنی‌داری کمتر

لایک توکسین گزارش نموده‌اند که تعداد ۳۱ رأس (۱/۵٪) آلوده به اشرشیا کولای وروتوکسیکوژنیک بودند (۶).

در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۷ Muffling و همکاران در آلمان با مطالعه روی گاو و خوک اشرشیا کولای‌های جدا شده از مدفوع جمعیت مورد مطالعه را مورد PCR قرار داده و گزارش نموده‌اند ۲۲/۲۲٪ اشرشیا کولای جدا شده از ۲۶۴ نمونه گاوی مورد آزمایش، معادل ۸/۳٪ کل نمونه‌ها از گروه وروتوکسیکوژنیک می‌باشند، در صورتی که از ۷۶ نمونه خوکی مورد آزمایش تعداد ۲۳ نمونه معادل ۳۰/۲۶٪ کل نمونه‌ها وروتوکسیکوژنیک بودند (۹).

در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۴ توسط Sergent و همکاران در آمریکا روی نمونه‌های متعدد باکتریایی جدا شده از مدفوع گاوها و گوساله‌ها، آغل‌های نگه‌داری و جایگاه پروراندی بعد انجام PCR در نهایت ۱۰/۲٪ اشرشیا کولای‌های جدا شده از نمونه‌های مدفوعی از نوع اشرشیا کولای وروتوکسیکوژنیک بوده‌اند. در حالی که درصد آلودگی در سطح آغل و جایگاه پروراندی بسیار بالاتر گزارش شده است (۱۰).

از میان ۱۱۳ نمونه مورد بررسی در پژوهش حاضر تعداد ۲۸ نمونه سوربیتول منفی بوده‌اند (معادل ۲۴/۷۷٪ کل نمونه‌ها) که از این تعداد، ۱۹ مورد با آزمایش PCR در گروه اشرشیا کولای وروتوکسیکوژنیک طبقه‌بندی شده‌اند. از ۱۹ مورد فوق ۹ مورد از مدفوع گاو و ۱۰ مورد از مدفوع گوساله جداسازی شده‌اند. با توجه به اینکه اشرشیا کولای O157 H7 جزو اشرشیا کولای‌های وروتوکسیکوژنیک سوربیتول منفی می‌باشند و نظر به اهمیت بسیار بالای این باکتری در بهداشت عمومی، نتایج موید ریسک نسبتاً بالای انتقال این باکتری از طریق مدفوع گاو به انسان می‌باشد. همچنین درصد بالای این باکتری در مدفوع گوساله‌ها نشان‌دهنده اهمیت بیشتر گوساله‌ها به عنوان مخزن این باکتری برای انسان است.

می‌باشد (۸).

این نتایج نشان دهنده این است که اولاً افرادی که با آرایش‌های دامی سروکار دارند بیشتر در معرض آلوده شدن با این باکتری‌ها قرار داشته و از طرف دیگر در فصول گرم سال ریسک آلودگی بالاتر است.

منابع

۱. جاوز، ۲۰۰۱. میکروب شناسی پزشکی، ترجمه ارجمند، م. و ستوده نیا، ع.، انتشارات ارجمند، صفحات: ۳۴۶-۳۲۶.
۲. طباطبایی، ع. و فیروزی، ر. ۱۳۸۰. بیماری‌های باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۲۳۱-۲۰۶.
۳. کوئین، مارکی، کارتر، دونلی، لئونارد، ۱۳۸۶. میکروب شناسی دامپزشکی و بیماری‌های میکروبی، ترجمه زهرایی صالحی، ت. و شایق، ج.، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۱۹۹-۱۵۷.
۴. مک فادین، جی. ۱۳۸۳. آزمایش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری‌های پزشکی، ترجمه رحمتی، ا.، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تبریز. صفحات: ۸۰۴-۸۷۳.
5. Blanco, J., Gonzalez, E.A., Garcia, S., Blanco, M., Regueiro, B., Bernardez, I. 1988. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain), *Veterinary Microbiology*, Vol 18, pp: 297-311.
6. Fukushima, H. and Seki, R. 2004. High numbers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine feces collected at slaughter in Japan, *FEMS Microbiology Letters*, Vol 238, pp: 189-197.
7. Gannon, V.P.J., D'souza, S., Graham, T., King, R.K., Rahn, K. and Read, S. 1996. Use of the Flagellar H7 Gene as a Target in Multiplex PCR Assays and Improved Specificity in Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains, *Animal Diseases Research Institute, Agriculture and Agri-Food Canada, Canada T1J 3Z4, Canada N1G 3W4*.
8. Laven, R.A., Ashmore, A. and Stewart, C.S. 2003. *Escherichia coli* in the Rumen and Colon of Slaughter Cattle, with Particular reference to *E.coli* O157, *The Veterinary journal*, Vol 165, pp: 78-83.
9. Muffling, T.V., Smajilovic, M., Nowak, B., Sammet, K., Bulte, M. and Klein, G. 2007. Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxicogenic *Escherichia coli* (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products, *International Journal of Food Microbiology*, Vol 117, pp: 185-191.
10. Sergeant, J.M., Sanderson, M.W., Smith, R.A., Dee Griffin, D. 2004. Associations between management, climate, and *Escherichia coli* O157 in the feces of feedlot cattle in the Midwestern USA, *Preventive Veterinary Medicine*, Vol 66, pp: 175-206.

Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on slaughtered cattle and calves in Tabriz abattoir

Khakpour, M.^{1*}, Nazeri, F.², Khandagi, J.³, Shaieg, J.⁴

1-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2-Graduate of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3-Department of Food Industry, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

4-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

*Corresponding author's email: khakpour@iaut.ac.ir

(Received: 2011/2/14, Accepted: 2011/8/8)

Abstract

E. coli is natural flora in large intestine and main common pathogen between human and animal, and its transportable by food, that its important cause of diarrhea infections in cows, particularly in calves. The aim of this survey is identify and separating *E. coli* and verotoxigenic, that by referring to Tabriz slaughterhouse in chance 43 excrement samples from calves and 151 excrement samples from cows has been taken and transport to microbiology laboratory of veterinary faculty of Islamic azad Tabriz University. After in riching the samples and culturing in plates this results has been taken: From 194 taken samples, 113 *E. coli* samples were separated that were 85 positive sorbitol samples and 28 negative sorbitol samples. From 85 positive sorbitol samples were 19 samples of calves and 66 samples of cows and from 28 negative sorbitol samples were 13 samples of calves and 15 samples of cows. Also serological test accomplished for determining *E. coli* non O₁₅₇ serotypes on the positive sorbitol samples that 9 samples of cows and 42 samples of cows demonstrate positive reaction, then on 28 negative sorbitol samples and 85 positive sorbitol samples, the PCR test accomplished by using secans of stx₁, stx₂ gens, that 15 samples of 28 negative sorbitol samples and 19 samples of 42 positive sorbitol samples were *E. coli* and verotoxigenic. The result demonstrated that high amount of *E. coli* and verotoxigenic exist in excrement of cows and calves slaughtered in Tabriz slaughterhouse.

Keywords: Verotoxigenic *E. coli*, Cow, Calve, Tabriz slaughterhouse, PCR