Occurrence of verotoxigenic *E.coli* in cow feces and antimicrobial resistance of the isolates in cattle farms in Shahrekord area

Mojtaba Bonyadian *
Associated professor of Food Microbiology, department of food quality control, institute of zoonoses research, Shahrekord University, Shahrekord-Iran, boniadian@vet.sku.ac.ir
Hamdallah Moshtaghi
Associated professor of Food Microbiology, department of food quality control, institute of zoonoses research, Shahrekord University, Shahrekord-Iran, rmoshtaghi@vet.sku.ac.ir
Parvin Behroozi
Graduated in DVM, ShahrekordUniversity, Shahrekord, Iran, pbehroozi@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Escherichia coli* is a common bacterium in the intestinal microflora of warm-blooded animals. They are routinely shed into the environment through feces and can contaminate water and soil, and, consequently fruits and vegetables .Enterohemorrhagic *E. coli* strains are recently emerged group of food-borne pathogens that are a significant public health threat. This group causes bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS), and the disease is prevalent in developed countries. The purpose of this study was to isolate and identify the *E.coli* O157: H7 and other verotoxigenic ones and major virulence genes (*rfbE*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*) in fecal swab samples by PCR in Shahrekord area.

Materials and methods: In Spring and Summer 2015, 400 cow fecal swab samples were collected from farms in Shahrekord area. Bacteriological and biochemical examinations were done for detection of *E.coli*. PCR assay was done for identification of O157:H7 serotype and other verotoxigenic *E. coli* using *rfbE*, *eae*, *stx1* and *stx2* genes.

Results: *E. coli* O157:H7 was not detected in any strains tested. But PCR showed that out of 384 *E.coli* strain, 104(27/08%) isolates carried *stx1* gene, 36(9/37%) carried *stx2* gene and 16 (4.16%) carried both *stx1* and *stx2* genes. Intimin (*eaeA*) gene was detected in 280(72/91%) of the isolates. Among verotoxigenic strain antibiotic resistance to Tetracycline 87/1%, Ampiciline 51/62%, Cefotaxime 48/38%, Gentamycin 25/81%,, Ciprofeloxacin 3/22% and Sulfamethoxazol 3/22% were observed.

Discussion and conclusion: According to the results, although the serotype O157: H7 did not isolate from the feces of cattle but other verotoxigenic strains that showed high resistance to antibiotic were isolated so it is a risk for human health.

Key words: Verotoxigenic *Escherichia coli*, cow, feces, PCR

* Corresponding author
Received: January 1, 2017 / **Accepted:** March 8, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۸۴- ۷۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

وقوع سویه‌های وروتوکسیژن باکتری *اشریشیا کلی* در مدفوع گاو و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در گاوداری‌های اطراف شهرکرد

مجتبی بنادیان *: دانشیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک، دانشگاه شهرکرد، ایران، boniadian@vet.sku.ac.ir
حمدالله مشتاقی: دانشیار بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک، دانشگاه شهرکرد، ایران، rmoshtaghi@vet.sku.ac.ir
پروین بهروزی: دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران، pbehroozi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: رنگ‌های به‌طور معمول *اشریشیا کلی* در فلور میکروبی روده حیوانات خونگرم وجود دارد و از راه مدفوع در محیط پراکنده و موجب آلودگی آب، خاک و در نتیجه میوه و سبزیجات می‌شود. سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک، گروهی از بیماری زاهای غذازاد و تهدیدی برای سلامت عمومی هستند و باعث بروز اسهال خونی و سندروم اورمیک همولیتیک (HUS) می‌شوند. هدف مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی سروتیپ O157: H7 و سایر سویه‌های وروتوکسیژن و جستجوی ژن‌های حدت (*stx2*، *stx1*، *eaeA* و *rfbE*) در کشت سوآب مدفوعی گاو با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در منطقه شهرکرد است.

مواد و روش‌ها: در بهار و تابستان ۱۳۹۴، ۴۰۰ نمونه سوآب مدفوعی از گاوهای منطقه شهرکرد جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. پس از انجام مراحل کشت، آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی برای جداسازی باکتری *E.coli* انجام شدند. از آزمون PCR برای تشخیص سروتیپ O157: H7 و جدایه های وروتوکسیژنیک با شناسایی ژن های *rfbE*، *stx1*، *stx2* و *eaeA* استفاده شد. برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های وروتوکسیژن، آزمون آنتی‌بیوگرام برای برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج انجام شد.

نتایج: سروتیپ O157:H7 از هیچ‌یک از نمونه‌های آزمون‌شده جدا نشد، اگرچه نتایج PCR نشان دادند که از تعداد ۳۸۴ سویه جداشده، ۱۰۴ جدایه (۲۷ درصد) حاوی ژن *stx1*، ۳۶ جدایه (۹/۳۷ درصد) حاوی ژن *stx2* و ۱۶ جدایه (۴/۱۶ درصد) حاوی هر دو ژن بودند و ژن *eaeA* در ۲۸۰ جدایه (۷۲/۹۱ درصد) وجود داشت. از میان سویه های وروتوکسیژنیک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۸۷/۱ درصد)، آمپی سیلین (۵۱/۶۲ درصد)، سفتاکسیم (۴۸/۳۸ درصد)، جنتامایسین (۲۵/۸۱ درصد)، سیپروفلوکساسین(۳/۲۲ درصد) و سولفامتوکسازول (۳/۲۲ درصد) مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: اگرچه سروتیپ O157:H7 در مدفوع گاوها وجود نداشت، سایر جدایه‌های وروتوکسیژن از مدفوع گاو در محیط پراکنده می‌شوند و نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت زیادی نشان می‌دهند و بنابراین خطر جدی برای بهداشت انسان محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی* وروتوکسیژنیک، مدفوع گاو، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اشرشیا کلی باکتری گرم منفی و میله‌ای‌شکل از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در بخش تحتانی روده حیوانات خونگرم یافت می‌شود. در بین حیوانات، نشخوارکنندگان به‌ویژه گاو و گوسفند مهم‌ترین مخزن این باکتری هستند و نقش مهمی در اپیدمیولوژی عفونت‌های انسانی ایفا می‌کنند. انسان، بز، خوک، بوقلمون، جوجه و غاز نیز مخازن باکتری هستند (۱). مخاط ناحیه رکتوآنال بهترین شرایط را برای کلونیزه‌شدن و تکثیر باکتری فراهم می‌کند و میزان درگیری مخاط رکتوم بسته به تفاوت‌های فردی از حیوانی به حیوان دیگر متفاوت است. بنابراین، مدفوع از مهم‌ترین منابع پخش باکتری در محیط و ایجاد عفونت های غذازاد محسوب می‌شود (۲). *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (Enterohemohrrogic *E.coli*) یکی از پاتوژن‌های مهم مشترک است که در انسان موجب اسهال‌های شدید (کولیت هموراژیک) و گاهی سندروم اورمیک همولیتیک می‌شود. نشخوارکنندگان، مخزن اصلی EHEC هستند و آلودگی انسان به‌شکل مسقیم و غیرمستقیم از راه تماس با مدفوع و به‌ویژه مدفوع گاو رخ می‌دهد (۳ و ۴). *اشریشیا کلی* O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ در گروه EHEC است که نقش بسزایی در شیوع بیماری‌های ناشی از *اشریشیا کلی* دارد. مطالعه‌های انجام شده شیوع صفر تا ۱۵/۷ درصدی باکتری را در مدفوع نشان می‌دهند. میزان آلودگی مدفوع گاو به این پاتوژن، ۰/۵۱ درصد در ایران (۵)، ۱۵/۷ درصد در انگلستان (۶)، ۱۳/۶ درصد در ترکیه (۷)، ۸/۶ درصد دراسکاتلند (۸) و ۱۱/۱ درصد در هلند (۹) گزارش شده است. برخی EHECها سموم شیگا تولید می‌کنند و به همین علت، *اشریشیا کلی* مولد سموم شیگا (STEC) شناخته می‌شوند. شیگاتوکسین‌های *اشرشیا کلی* از دو سم Stx1 و Stx2 تشکیل شده‌اند (۱۰) و وجودداشتن یا نداشتن این توکسین‌ها در بیماری‌زایی باکتری بسیار مؤثر است. اینتیمین و انتروهمولایزین از دیگر عوامل بیماری‌زایی مهم در *اشریشیا کلی* هستند. اینتیمین، پروتئین غشای خارجی است که ژن کروموزومی *eaeA* آن را کد می‌کند و پروتئین ضروری برای ایجاد ضایعات A/E روی سلول‌های اپی‌تلیال نواحی گاستروانتریتی است (۱۱). شیوع سویه‌های وروتوکسیژن و ژن *eae* به‌ترتیب ۲۶ و ۲۹ درصد در اسپانیا (۱۲)، ۸۸/۷۹ و ۷۳/۳ درصد در فرانسه (۱۳) و شیوع *Stx*، ۲۴/۳ درصد در آمریکا(۱۴) و ۵ تا ۳۴/۹۳ درصد در ایران (۱۵ و ۱۶) گزارش شده است. با توجه به اهمیت سویه‌های وروتوکسیژن در بهداشت انسانی و همچنین بیماری‌زایی این سویه‌ها در گوساله‌های شیرخوار و نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای روی میزان آلودگی مدفوع گاوها به سروتیپ‌های یادشده در شهرکرد انجام نشده، مطالعه حاضر برای ارزیابی میزان وفور این سویه‌ها و همچنین حضور چند عامل حدت باکتری شامل *Stx1*، *Stx2* و اینتیمین در مدفوع گاوهای این منطقه طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه حاضر، تعداد ۴۰۰ نمونه سوآب مدفوعی از گاوهای مبتلا به اسهال در گاوداری‌های اطراف شهرکرد تهیه و سریع در لوله استریل و مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل و آزمون‌های لازم برای جداسازی باکتری *اشریشیا کلی* انجام شدند.

جداسازی *اشریشیا کلی*: برای جداسازی باکتری *اشریشیا کلی*، سوآب های مدفوعی مستقیم روی محیط مک‌کانکی آگار کشت شدند و پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آزمون‌های تأیید تشخیصی شامل کشت در محیط افتراقی EMB، آزمون حرکت، اندول، سیترات، MR و VP روی کلونی های مشکوک (کلونی تک صورتی) انجام شدند (۱۷). سپس نمونه‌هایی که در محیط EMB، کلونی‌های با جلای سبز فلزی تولید کردند و حرکت مثبت، اندول مثبت، سیترات منفی، MR مثبت، VP منفی بودند به‌عنوان باکتری *اشریشیا کلی* برای آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در محیط TSB (مرک، آلمان) کشت و پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در یخچال نگهداری شدند.

آزمون PCR: آزمون PCR برای بررسی وجود ژن‌های کدکننده سروتیپ O157:H7 و همچنین وجود ژن‌های کدکننده تعدادی عوامل حدت (*stx1*، *stx2* و *eae*) باکتری *اشریشیا کلی* با استفاده از پرایمرهای سنتزشده شرکت سیناژن (۱۸) روی نمونه‌های مشکوک انجام شد (جدول ۱). در این آزمون، باکتری *E.coli*O157:H7 تهیه‌شده از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران شاهد مثبت و آب مقطر استریل شاهد منفی بود.

آزمون PCR: آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master Mix Red (شرکت سیناژن)، ۱۲ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر F، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر R با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۲ میکرولیتر DNA (استخراج DNA با کیت تهیه‌شده از شرکت سیناژن) تهیه شد و برای اجرای سیکل حرارتی (جدول ۲) داخل دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) قرار گرفت (۱۲).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده‌شده در آزمون PCR (تهیه‌شده از شرکت سیناژن)

Gene	Primer	Oligonucleotid sequence (5̀-3̀)	Fragment(bp)	Anielingtempreture
rfbE	O157F	CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG	۲۵۹	۵۸
	O157R	TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC		
stx1	VT1F	CGC TGA ATG TCA TTC GCT CTGC	۳۰۲	۶۴
	VT1R	CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC		
stx2	VT2F	CTT CGG TAT TCC TAT TCC CGG	۵۱۶	۶۴
	VT2R	CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC		
eaeA	eaeF	GGA ACG GCA GAG GTT AAT CTG CAG	۷۷۵	۵۸
	eaeR	GGC GCT CAT CAT AGT CTT TC		

جدول ۲- برنامه حرارتی مربوط به هر پرایمر

پرایمر	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	طویل‌شدن	تعداد سیکل	ساخت پایان
VT1	۹۴°C	°C۹۲	۶۰°C	۷۲°C	۳۵	۷۲°C
	۴ دقیقه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه		۴ دقیقه
VT2	۹۴°C	۹۲°C	۶۱°C	۷۲°C	۳۰	۷۲°C
	۴ دقیقه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه		۴ دقیقه
Eae	۹۴°C	۹۴°C	۵۷°C	۷۲°C	۳۰	۷۲°C
	۴ دقیقه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه		۴ دقیقه
O157	۹۴°C	۹۴°C	۵۵°C	۷۲°C	۳۰	۷۲°C
	۳ دقیقه	۳۰ ثانیه	۴۰ ثانیه	۴۰ ثانیه		۴ دقیقه

الکتروفورز: الکتروفورز با استفاده از ژل دارای غلظت ۱/۵ درصد، جریان برق ۱۰۰ ولت، به میزان ۱۰ میلی‌آمپر به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل از Safe Red (سیناژن) و برای خواندن از دستگاه ترانس لومیناتور UV (UV Tech, Canada) استفاده شد.

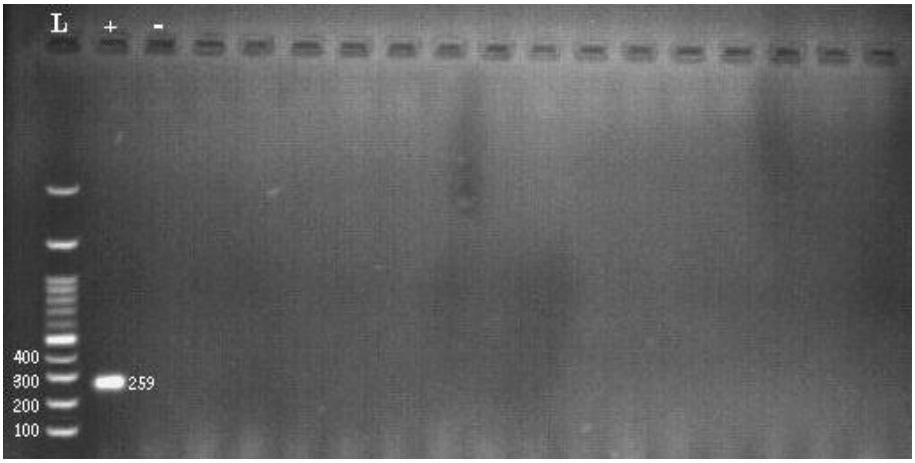
آنتی‌بیوگرام: آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های گوارشی دام یا انسان با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Diffiusion Disc) روی سویه‌های وروتوکسیژنیک جداشده انجام شد (۱۹). به این منظور، از نمونه‌های وروتوکسیژنیک در محیط TSB، کشت تازه تهیه و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد تا غلظت ۰/۵ مکفارلند حاصل شود. سپس باکتری با سوآب استریل آغشته به محیط، متراکم در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله مناسب از یکدیگر در محیط کشت قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس، قطر هاله ممانعت رشد حاصل از هر دیسک با خط‌کش اندازه‌گیری و با جدول‌های موجود مقایسه شد. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده عبارتند از: جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، سفتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم).

نتایج

از ۴۰۰ نمونه مدفوع آزمایش‌شده، ۳۸۴ جدایه *اشریشیا کلی* تشخیص داده شدند و برای آزمون PCR خالص‌سازی شدند. با توجه به نتایج آزمون PCR و مندرجات جدول ۳، از ۳۸۴ باکتری *اشریشیا کلی* جداشده از مدفوع، هیچ‌یک از جدایه‌ها سروتیپ O157: H7 نبودند (شکل ۲) هرچند سایر سویه‌های دارای ژن‌های وروتوکسین شناسایی شدند و۳۶ نمونه (۹/۳۷ درصد) ژن کدکننده توکسین Stx2، ۱۰۴ نمونه (۲۷ درصد) ژن کدکننده توکسین Stx1 و ۱۶ نمونه (۴/۱۶ درصد) هر دو ژن را داشتند (شکل‌های۱، ۲ و ۳). همچنین ۲۸۰ نمونه (۷۲/۹۱ درصد) حاوی ژن *eae* بودند که از این تعداد، ۷۲ نمونه (۱۸/۷۵ درصد) حاوی ژن *stx1*، ۲۴ نمونه (۶/۲۵ درصد) حاوی ژن *stx2* و ۱۶ نمونه (۴/۱۲ درصد) حاوی هر دو ژن *stx1* و *stx2* بودند (شکل ۴).

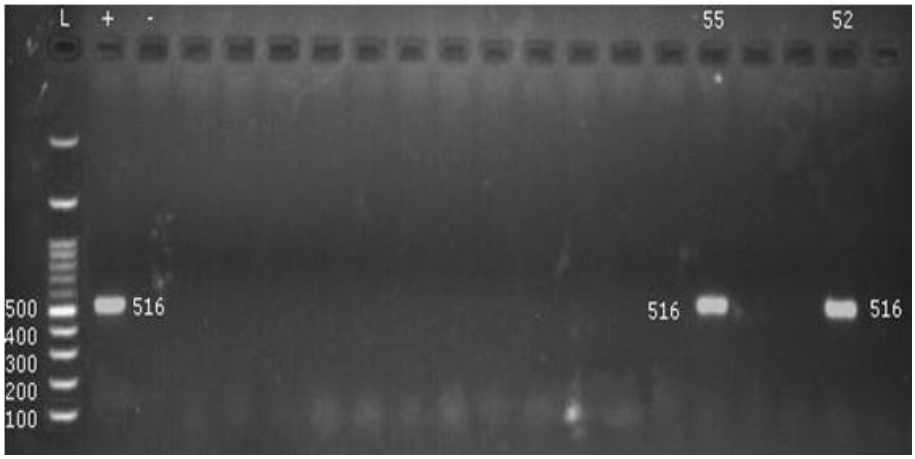
جدول ۳- نتایج جستجوی ژن‌های حدت در باکتری‌های *E. coli* جداشده از مدفوع گاو

	E.coli	STEC	*E.coli* O157:H7	*stx1*	*stx2*	*stx1,2*	*eaeA*	*eaeA stx1*	*eaeA stx2*	*eaeA,stx 1 stx2*
تعداد	۳۸۴	۱۲۴	۰	۱۰۴	۳۶	۱۶	۲۸۰	۷۲	۲۴	۱۶
درصد	۹۶	۳۲/۲۹	۰	۲۷	۹/۳۷	۴/۱۶	۷۲/۹۱	۱۸/۷۵	۶/۲۵	۴/۱۶



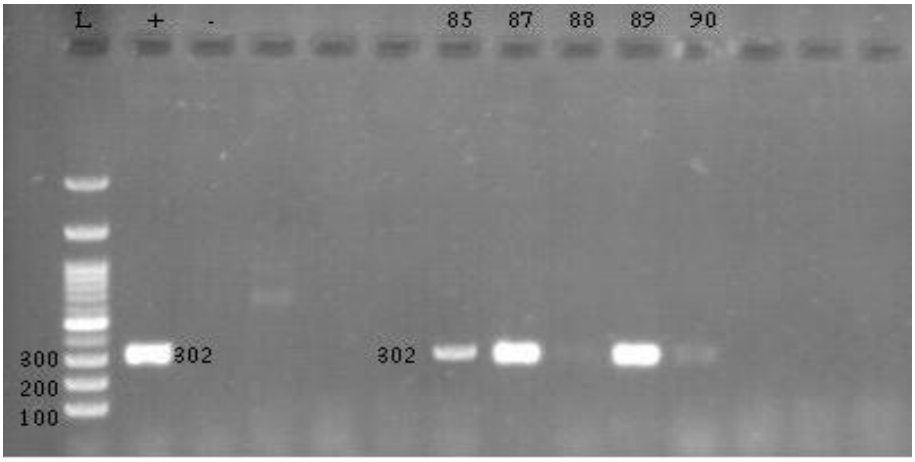
شکل ۱- نتیجه PCR/*شریشیا کلی* جداشده از مدفوع گاو با استفاده از پرایمر *bp* 259 :O157،

L: مارکر وزن مولکولی، +: شاهد مثبت، -: شاهد منفی



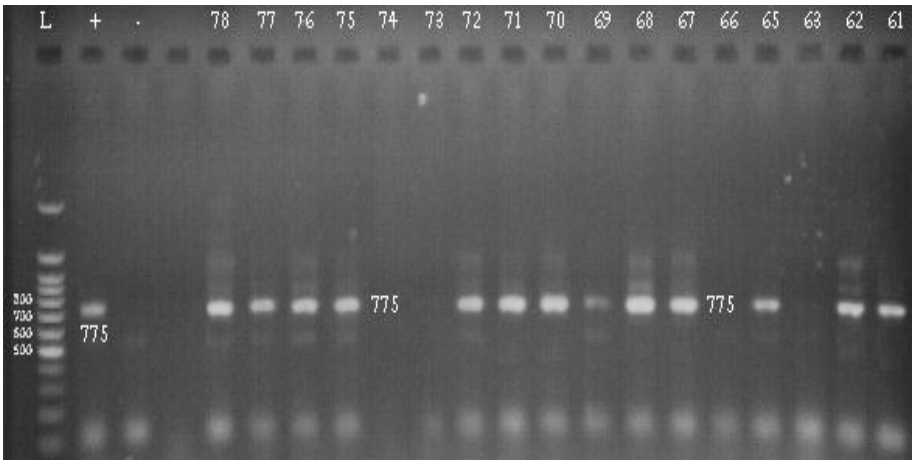
شکل ۲- نتیجه PCR/*شریشیا کلی* جداشده از مدفوع گاو با استفاده از پرایمر *bp*516 :VT2،

L: مارکر وزن مولکولی، +: شاهد مثبت، -: شاهد منفی، ستون‌های ۵۵ و ۵۲ دارای ژن کدکننده *Stx2*



شکل ۳- نتیجه PCR/*شریشیا کلی* جداشده از مدفوع گاو با استفاده از پرایمر *bp* 302 :VT1،

L: مارکر وزن مولکولی، +: شاهد مثبت، -: شاهد منفی، ستون‌های ۸۷، ۸۵، ۸۸، ۸۹ و ۹۰ حاوی ژن کدکننده *Stx1* (ستون‌های ۸۸ و ۹۰ باند ضعیف دارند)



شکل ۴- نتیجه PCR/*شریشیا کلی* جداشده از مدفوع گاو با استفاده از پرایمر *eae*: 775 *pb*

L: مارکر وزن مولکولی، +: شاهد مثبت، -: شاهد منفی، ستون‌های ۶۱-۶۲-۶۵-۶۷-۶۸-۷۰-۷۱-۷۲-۷۵-۷۶-۷۷-۷۸ واجد ژن *eae* هستند.

نتایج آنتی‌بیوگرام: با توجه به نتایج آنتی‌بیوگرام، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۲۵/۸۰ درصد)، سفتاکسیم (۴۸/۳۸ درصد)، تتراسایکلین (۸۷/۰۹ درصد)، آمپی‌سیلین (۵۱/۶۲ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳/۲۲ درصد) و سولفامتوکسازول (۳/۲۲ درصد) مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام سویه‌های وروتوکسیژنیک

آنتی بیوتیک	کد دیسک	مقاوم		متوسط		نیمه‌حساس		حساس	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Gentamycin	GM 10	۸	۲۸/۸	۱۰	۳۲/۲۵	-	-	۱۳	۴۱/۹۳
Cefotaxime	CTX 30	۱۵	۴۸/۴	-	-	۱۶	۵۱/۶۲	-	-
Tetracycline	TE 30	۲۷	۸۷	۴	۱۲/۹	-	-	-	-
Ampicilin	AM 10	۱۶	۵۱/۶	-	-	-	-	۱۵	۴۸/۳۸
Ciprofloxacin	CP 5	۱	۳/۲۲	۲۸	۹۰/۳۲	-	-	۲	۶/۴۵
Sulfamethoxazol	SXT	۱	۳/۲۲	۲	۶/۴۵	-	-	۲۸	۹۰/۳۲

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش ها نشان می‌دهند که گاو، مخزن اصلی سروتیپ O157:H7 و دیگر سویه‌های *اشریشیا کلی* است. البته درصد شیوع این سروتیپ در دام‌های نوزاد به ویژه گوساله‌های اسهالی و در درجه بعد گاوهای اسهالی به شکل چشمگیری بیشتر از گاوهای سالم است.

در مطالعه حاضر، سروتیپ O157:H7 در نمونه‌های *اشریشیا کلی* جداشده یافت نشد. در مطالعه‌ای که اسدیان و همکاران (۱۳۸۵) در شهرکرد روی ۱۰۲ نمونه مدفوعی گوساله‌های اسهالی و ۱۶ نمونه مدفوعی گوساله‌های سالم انجام دادند، از ۳۵ نمونه مشکوک به *اشریشیا کلی* O157:H7، ۶ نمونه (۱۷/۱۴ درصد)

سروتیپ O157:H7 شناخته شدند، همچنین فراوانی سویه‌های وروتوکسیژنیک، ۱۰/۹ درصد گزارش شد (۲۰). همچنین شیرانی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که ۵ درصد جدایه‌های *اشریشیا کلی* جداشده از گوساله‌های اسهالی حاوی ژن‌های *stx2*، *stx1* و *eae* بودند (۱۶). از نتایج مطالعه‌های پیشین به نظر می‌رسد که بیشتر حیوانات سالم آزمون‌شده از نظر سروتیپ O157:H7 منفی بوده‌اند (۶). با وجود این، درصد شیوع این سروتیپ در مناطق مختلف از ۰/۱ تا ۶۲ درصد تخمین زده شده است (۹ و ۲۱). در مطالعه‌هایی که در آمریکا و اروپا انجام شده‌اند، میزان آلودگی از صفر تا بیش از ۱۰ درصد گزارش شده است (۸ و ۱۴). این تفاوت در میزان آلودگی به دلایل مختلفی روی می‌دهد؛ برای نمونه، در مطالعه‌ای که در شمال انگلستان انجام شد با تخمین شیوع ۱۵/۷ درصدی این باکتری نتیجه‌گیری شد که شیوع سروتیپ O157:H7 در تابستان و بهار (ماه‌های گرم سال) بیشتر از فصل‌های سرد سال است (۲۲). در مطالعه Aslantas و همکاران در ترکیه نیز شیوع باکتری، ۱۳/۶ درصد و بیشترین شیوع در جولای و نوامبر و کمترین شیوع در فوریه گزارش شد (۷). در مطالعه سامی و همکاران (۲۰۰۶) در ایران روی مدفوع گاوهای جمع‌آوری‌شده از مزارع مختلف شیراز، شیوع O157:H7 در ۹۷۵ نمونه جمع‌آوری‌شده تنها ۰/۵۱ درصد گزارش شد (۵). در دیگر مطالعه‌های انجام‌شده نیز با توجه به تعداد نمونه‌های تهیه‌شده، زمان تهیه نمونه‌ها، سالم یا اسهالی‌بودن حیوانات آزمون‌شده، روش‌های استفاده‌شده برای اجرای آزمون و نحوه نمونه‌گیری، میزان شیوع سروتیپ O157:H7 در مکان‌ها و سال‌های مختلف متفاوت بوده است. برای نمونه، مطالعه‌ها در سال‌های ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ شیوع ۱ تا ۴ درصد را در آلمان و انگلستان نشان می‌دهند (۸ و ۹)، در حالی که در سال ۲۰۰۹ شیوع این سروتیپ در اسکاتلند، ۸/۶ درصد گزارش شد (۲۳). در مطالعه دیگری که Omisakin و همکاران (۲۰۰۲) در انگلستان انجام دادند، شیوع باکتری در ۵۸۹ نمونه جمع‌آوری‌شده از رکتوم گاوها پیش از کشتار طی ماه مه تا جولای، ۷/۵ درصد گزارش شد (۲۴). در سایر مطالعه‌های انجام‌شده در مناطق مختلف نیز میزان شیوع سروتیپ O157:H7 از صفر تا ۱۵/۷ درصد مشاهده شده است (۵، ۸، ۲۵-۲۹). با توجه به اینکه شهرکرد از مناطق سرد و کوهستانی کشور است و نمونه‌گیری در بهار انجام شد و سایر مطالعه‌های انجام شده در ایران (۵، ۱۷ و ۱۹) نیز میزان زیاد آلودگی را نشان نداده‌اند، وجودنداشتن سروتیپ O157:H7 در مطالعه حاضر توجیه‌پذیر است. اگرچه سویه O157:H7 وجود نداشت، سایر سویه‌های تولیدکننده وروتوکسین از نمونه‌های آزمون‌شده جدا شدند. شیوع ژن‌های *stx* در مطالعه حاضر، ۳۲/۲۹ درصد تخمین زده شد؛ تقریباً مشابه آنچه تهمتن و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند و از ۴۰ نمونه تهیه‌شده، ۳۴/۹۳ درصد نمونه‌ها حاوی ژن‌های *stx*، ۵۳/۴۲ درصد حاوی ژن *stx2* و ۱۰/۲۷ درصد حاوی *stx1* بودند و مشخص شد که فصل در شیوع سویه‌های واجد ژن‌های تولیدکننده شیگاتوکسین دخالت دارد، در فصل گرم ۲۴/۲۸ تا ۴۰/۹ درصد از می تا آگوست (در ایران) و در زمستان ۸/۹۶ تا ۱۱/۱۱ درصد در شیوع ژن‌ها تفاوت وجود دارد. همچنین شیوع سروتیپ O157:H7 را ۳/۵۷ درصد گزارش کردند (۱۵). مطالعه Blanco و همکاران (۲۰۰۲) در اسپانیا نشان داد که از تعداد ۵۱۴ STEC جداشده از گاوهای اسهالی و سالم، ۲۰ درصد حاوی ژن *stx1*، ۵۴ درصد حاوی ژن *stx2* و ۲۶ درصد حاوی

هر دو ژن و ۲۹ درصد حاوی ژن *eaeA* بودند (۱۲)؛ در حالی که در مطالعه حاضر، شیوع ژن *stx1*، ۲۷ درصد و شیوع ژن *stx2*، ۹/۳۷ درصد است. در مطالعه Bibbal و همکاران (۲۰۱۴) در فرانسه ، شیوع ژن‌های *eaeA* و *stx*، به‌ترتیب ۷۳/۳ و ۸۸/۷۹ درصد برآورد شد (۱۳). در مطالعه حاضر نیز ۷۲/۹۱ درصد جدایه‌ها حاوی ژن *eaeA* بودند. اطلاعات مشخصی درباره نسبت *stx1* و *stx2* در انسان و حیوان و ارتباط آن با بیماری HUS در ایران وجود ندارد. بیشتر مشاهده‌ها نشان می‌دهند ژن *stx2* نسبت به ژن *stx1* خطرناک‌تر است و برخی مطالعه‌ها نیز نشان می‌دهند که به‌احتمال سویه‌های حاوی ژن *stx2* نسبت به سویه‌های حاوی *stx1* و حتی *stx1,2* بیماری‌زاتر هستند. همچنین پژوهش‌ها اثبات کرده‌اند که *stx2* ۴۰۰ برابر از *stx1* سمی‌تر است (۲). در مطالعه اصلانی و همکاران در تهران، در سویه‌های STEC، شیوع ژن *stx2*، ۹۶ درصد و ژن *stx1*، ۳/۵ درصد بود و ژن *eaeA* از هیچ سویه‌ای جدا نشد (۱۷).

همان‌گونه که در پیشینه پژوهش اشاره شد، الگوی منظمی در شیوع ژن‌های حدت این باکتری مشاهده نشده ولی ژن *stx2* در بیشتر اوقات در سروتیپ O157:H7 موجود بوده است. با توجه به مطالعه حاضر مدفوع گاوها به سروتیپ O157:H7 آلوده نیست ولی سایر جدایه های وروتوکسیژن از مدفوع گاو در محیط پراکنده می شوند و نسبت به آنتی‌بیوتیک های رایج نسبتاً مقاوم هستند. در مطالعه حاضر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک های تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم و جنتامایسین به‌ترتیب ۸۷/۰۹، ۵۱/۶۲، ۴۸/۳۸ و ۲۵/۸۰ درصد مشاهده شد. در سایر مطالعه‌های انجام‌شده نیز نتایج تقریباً مشابهی یافت شد و بر اساس مطالعه‌های منتشرشده، مقاومت‌های چندگانه میکروبی به‌شکل گسترده‌ای در جدایه‌های *اشریشیا کلی* دام‌ها ازجمله گاو مشاهده می‌شود. در مطالعه روی حساسیت ۴۸ جدایه گاوی STEC نسبت به آنتی‌بیوتیک های مختلف از جمله سولفانامید، آمپی‌سیلین و جنتامایسین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد (۳۰). بهزادیان‌نژاد و همکاران در مطالعه خود روی *اشریشیا کلی* بجز O157 جداشده از گاو بیان کردند که تمام جدایه‌ها دارای مقاومت‌های چندگانه نسبت به دو یا چند آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین (۲۹ درصد)، اریترومایسین (۳۸ درصد)، پلی‌میکسین-ب (۲ درصد)، تتراسایکلین (۲۶ درصد)، سولفامتاکسازول (۲۹ درصد) و جنتامایسین (۶ درصد) هستند (۱۰). در مطالعه مولانا و همکاران بیان شد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس مانند آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین و کوتریموکسازول بسیار شایع است در حالی‌که مقاومت نسبت به عواملی که تنها در بیمارستان‌ها به کار برده می‌شوند مانند جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و نسل سوم سفالوسپورین‌ها بسیار کمتر است. در این مطالعه، مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۹۶ درصد)، سفالوتین (۶۸ درصد)، آمیکاسین (۱۶ درصد)، جنتامایسین (۲۷ درصد) و کوتریموکسازول (۵۱ درصد) گزارش شد (۳۱).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، اگرچه سروتیپ O157:H7 درمدفوع گاوها وجود نداشت، سایرجدایه های وروتوکسیژن از مدفوع گاو در محیط پراکنده می‌شوند، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم هستند و بهداشت انسان را تهدید می‌کنند.

سپاسگزاری: مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است و نویسندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌کنند.

References

(1) Synge B., Paiba G. Verocytotoxin producing *E. coli* O157. *Veterinary Research* 2000; 147: 27.

(2) Sheng H., Davis MA., Knecht MJ., Hovde CJ. Rectal administration of *Escherichia Coli* O157:H7 Novel model for colonization of ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(8): 4588-4595.

(3) McNeilly TM., Naylor SW., Mahajan A., Mitchell MC., McAteer S., Deane D., et al. *Escherichia Coli* O157:H7 in cattle following systemic mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infection and Immunity* 2008; 76: 2594-2602.

(4) Lejeune J., Besser T., Rice D. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in food lot cattle: predominance and persistence of specific clonal type despite massive cattle population turnover. *Applied and Environment Microbiology* 2004; 70(1): 377-384.

(5) Sami M., Firouzi R., Shekarforoush SS. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Shiraz, Iran by immunomgnetic separation and multiplex PCR. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2007; 8(4): 319-324.

(6) Chapman PA., Siddons CA., Cerdan AT., Harkin MA. A 1-year study of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, sheep pigs and poultry. *Epidemiology and Infection* 1997; 119: 245-250.

(7) Aslantas O., Erdogan S., Cantekin Z., Gulact I., Evrendilek, GA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *E. coli* O157 from Turkish cattle. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 106: 338-342.

(8) Paiba GA., Gibbens SJS., Pascoe JW., Kidd SA., Byrne C., Ryan JBM., et al. Fecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Veterinary Research* 2002; 150: 593-598.

(9) Heuvelink AE., Biggelaar F., Boer E., Herbes RG., Melchers WJG., Monnens LAH. Isolation and characterization of verotxin-producing *Echerichia coli* O157:H7 strain from Dutch cattle and sheep. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(4): 878-882.

(10) Behzadian nejad G., Zahraie salehi T., Mazaherienejad far R., Shams N., Shirani D. Prevalence of virulence genes *stx1*, *ehxA*, *stx2* in non O157 *E. coli* isolated from cattle and determination of antibiotic resistance of the isolates. *Journal of Veterinary Research* 2011; 4: 331-335.

(11) Madic J., Garam1 C., Vingadassalon N., Oswald E., Fach P., Jamet E., et al. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 109: 1696-1705.

(12) Blanco M., Blanco JE., Mora A., Dahbi G., Alonso MP.,González A., et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* isolates from Cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(2): 645-651.

(13) Bibbal D., Loukiadis E., Kérourédan M., Garam CP., Ferre F., Cartier P., et al. Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in Cattle Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; 80(3): 1177-1184.

(14) Bosilevac GM., Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Commercial Ground Beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(6): 2103-2112.

(15) Tahamtan Y., Hayati M., Namavari MM. Prevalence and distribution of the *stx1,stx2* gene in shiga toxin producing *E.coli* (STEC) isolation from cattle. *Iranian Journal of Microbiology* 2010; 2(1): 8-13.

(16) Shahrani M., Safarpoor Dehkordi F. and Momtaz H. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biological Research* 2014; 47: 28.

(17) Alehashem S., Aghajani R., Dara M. *Microbiology*, 1th ed, Vol. 2, Ayandesazan Publication; 1987, 506-507.

(18) Aslani MM., Bouzari S. Characterization of virulence genes of non- O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Tow provinces of Iran. *Japanese Journal of Infection Diseases* 2009; 62: 16-19.

(19) CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard-Ninth Edition (M2-A9). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

(20) Asadian F. Study on verotoxigenic and enterotoxigenic *E. coli* in cattle faeces affected diarrhea in Shahrekord. DVM thesis. Shahrekord: Shahrekord univ; 2006: 97-102.

(21) Jackson SG., Goodbrand RB., Jahnson RP., Odorico VG., Alives D., Rahn K., et al. *Escherichia coli O157:H7* diarrhea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiology and Infection* 1998; 120: 17-20.

(22) Chapman PA., Siddons CA., Wright P., Norman P., Fox J., Crick E. Cattle as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in man. *Epidemiology and Infection* 1993; 111: 439-447.

(23) Reinstein S., Fox T., Shi X., Alam MJ., Renter DJ., Nagaraja TG. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in organically and naturally raised beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75(16): 5421-5423.

(24) Omisakin F., Mcrae M., Ogden ID., Strachan NJC. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces at slaughter. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(5): 2444-2447.

(25) Gansheroff LJ., Brien AD. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 97: 2959-2961.

(26) Christopher J., Mckendrick I., Mckechnie C., McKechnie C., Fenlon D., Naylor SW., et al. Rectal carriage enterohemorragic *Escherichia coli* O157:H7 in slaughtered cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(1): 93-97.

(27) Johnsen G., Wasteson Y., Heir E., Berget OI., Herikstad H. *Escherichia coli* O157:H7 in feces from cattle, sheep and pigs in the Southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 65: 193-200.

(28) Laven RA., Ashmore A., Stewart CS. *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157. *The Veterinary Journal* 2003; 165: 78-83.

(29) Armstrong GL., Hollingsworth J., Morris J. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiology* 1996; 18: 29-51.

(30) Kargar M., Daneshvar M., Homayun M. Monitoring of virulence markers and antibiotic resistance of shiga- toxin producing *E. coli* isolated from meats in Tehran. *Tebe Junoob* 2012; 2: 766-83.

(31) Molana Z., Shahande Z., Hajiahmad M. Influence of heat on antibiotic resistance of *S. aureus* and *E. coli*. *Journal of Medical Sciences University of Babul* 2006; 4: 26-31.