شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی O157:H7* در تخم طیور (بلدرچین، مرغ، کبوتر و شترمرغ) بومی استان اصفهان

مهدی مرادی سرمیدانی[1*]، محسن فردعمادی[1]، ابراهیم رحیمی[2]، عبدالکریم زمانی مقدم[3]

۱. گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی. واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Bluedvm@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

چکیده

اشریشیاکلی یکی از متداول‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای در انسان و حیوانات است که باعث بروز عفونت‌های مختلفی می‌گردد. *اشریشیاکلی O157:H7* یکی از سروتیپ‌های مهمی است که در تحت گروه *اشریشیاکلی*‌های خونریزی دهنده روده‌ای قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف جستجوی سروتیپ *O157:H7* در نمونه‌های تخم طیور بومی موجود در بازار با استفاده از دو روش کشت و روش مولکولی PCR انجام و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نیز بررسی شد. در مجموع تعداد ۸۷ نمونه تخم طیور بومی (مرغ، بلدرچین، کبوتر، شترمرغ) از سه قسمت پوسته، زرده و سفیده (از هر قسمت یک نمونه مجزا) مورد بررسی قرار گرفت که بعد انجام مراحل کشت تعداد ۸ نمونه آلوده به این باکتری بودند سپس این ۸ نمونه جهت تعیین سویه مورد آزمایش با روش PCR قرار گرفتند و در نهایت تعداد ۴ نمونه واجد ژنوم سویه O157:H7 بودند. همچنین پس از انجام آزمون‌های آنتی‌بیوگرام جهت تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بیشترین حساسیت در مورد *اشریشیاکلی* به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریواکسن، انروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نالی دیکسیک اسید بود.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی* O157:H7، تخم طیور بومی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کشت، PCR.

مقدمه

مسمومیت‌های غذایی یکی از مشکلات عمده بهداشت عمومی در جهان است (Chandra et al., 1999) و از بین مطالعاتی که در این زمینه انجام پذیرفته‌اند، توانایی بالای باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان عاملی برای فساد انواع مواد غذایی، به‌مراتب بیشتر گزارش شده است (C.D.C., 1983).

تخم‌مرغ غذای کامل و مهمی است که به دلیل دارا بودن مواد مغذی ازجمله پروتئین، ویتامین E، B12، A و D در غذاهای متنوعی استفاده می‌شود (Alexandere et al., 2003).

آلودگی تخم‌مرغ به باکتری اشریشیاکلی از دو طریق عمودی و افقی امکان پذیر است. در شکل عمودی، محتویات تخم مرغ قبل از تشکیل پوسته آلوده می‌شود. انتقال افقی نیز از طریق پوسته رخ می‌دهد به‌طوری که آلودگی پوسته یا در هنگام عبور از کلواک و یا در اثر تماس با بستر آلوده رخ می‌دهد. علاوه بر این، انتقال آلودگی از پوسته به محتویات نیز امکان پذیر است و این حالت معمولاً در دقایقی پس از تخم‌گذاری که پوسته قابلیت نفوذ بیش‌تری دارد، رخ می‌دهد (CSLI et al., 2012).

در کشورهای آسیایی و آفریقایی درصد جمعیت طیور بومی در مقابل کل جمعیت طیور ۸۰ درصد است (Abatangelo et al., 1978) و این جمعیت نقش مهمی در انتقال بیماری‌های مشترک به انسان را دارند (Blanco et al., 2003). با توجه به کیفیت بالای تخم مرغ‌های بومی، مصرف کنندگان تمایل بیشتری به خرید این محصولات دارند (ادیب فر و همکاران، ۱۳۷۹)؛ بنابراین عدم نظارت و کنترل دقیق بر روی مرغ‌های بومی از یک سو و شرایط نامناسب نگه‌داری آن‌ها در مناطق روستایی از سوی دیگر سلامت جمعیت

روستایی را از نظر ابتلا به بیماری‌های مشترک تهدید می‌کند (Blanco et al., 1998).

از بین مواد غذایی با منشأ دامی تخم طیور به‌خصوص تخم‌مرغ به دلیل نوع استفاده در تولیدات غذایی مانند سس‌ها، چاشنی‌های غذایی، بستنی و انواع غذاها که ممکن است به صورت خام یا نیم پز مورد استفاده قرار گیرد، همواره می‌تواند و به صورت بالقوه منشأ آلودگی و انتقال بیماری‌ها به انسان باشد (Cabassi et al., 2004).

اشریشیاکلی مهم‌ترین بیماری‌زای روده‌ای گرم منفی و میله‌ای شکلی است که موجب بروز مسمومیت غذایی مهلک در انسان می‌گردد (Bell C et al., 2002 و Boyd R et al., 1987). حضور این باکتری در آب و غذا به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی عامل بیماری زایی غالب پذیرفته شده است (Calderwood et al., 1997).

چندین سویه از باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان بیماری-زاهای بالقوه در غذا معرفی شده‌اند. یکی از سویه‌های مهم آن، سویه *اشریشیاکلی* O157:H7 است که به‌عنوان یکی از عمده‌ترین سویه‌های بیماری‌زای انسان معرفی شده است. این باکتری توانایی تولید سمی شبیه به سم باکتری *شیگلا* را دارد. *اشریشیاکلی* تولید کننده شیگاتوکسین در گروه باکتری‌های مولد کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتک، ایجاد اسهال خونی و غیر خونی، ترومبوسیتوپنی، آنمی همولیتیک و اختلالات کلیوی حاد قرار می‌گیرد (Bielaszewska et al., 2003 و Calderwood et al., 1997).

مطالعات نشان می‌دهند که در اکثر موارد، بیماری زایی باکتری *اشریشیاکلی* با حضور ژن‌های حدت این باکتری همراه است. از مهم‌ترین ژن‌های حدت باکتری *اشریشیاکلی* تولیدکننده شیگاتوکسین می‌توان به شیگاتوکسین ۱ (*stx1*)، شیگاتوکسین ۲ (*stx2*)، پروتئین اینتیمین (*eae*) و پلاسمید کدکننده انتروهمولیزین (*ehly*) اشاره نمود (Bar et al., 1973 و Cave et al., 1994).

متأسفانه علی‌رغم انجام درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثری همچون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، انروفلوکساسین و تتراسایکیلین، عفونت‌های ناشی از این باکتری نه تنها محدود نمی‌شوند بلکه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شدیدی نیز در آن‌ها ایجاد شده است (Beam et al., 2013).

با توجه به موارد فوق شناسایی عوامل باکتریایی موجود در تخم طیور عرضه شده به بازار از یک طرف می‌تواند امکان تدوین یک برنامه اصولی و مدون در کنترل و پیشگیری بیماری‌های ناشی از این مواد غذایی را فراهم کند و از طرف دیگر می‌تواند محکی باشد بر برنامه‌هایی که در مؤسسات تولید و عرضه تخم طیور در جهت کاهش آلودگی‌ها صورت می‌گیرد. متأسفانه علی‌رغم اهمیت بالای انواع تخم طیور در ایران، به‌خصوص تخم مرغ، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 و *اشریشیاکلی* تولیدکننده شیگا توکسین جدا شده از تخم‌های بومی طیور، انجام نگرفته است. در نتیجه مطالعه حاضر را به‌منظور شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا شده از تخم‌های بومی طیور، انجام می‌پذیرد.

مواد و روش کار

در مجموع تعداد ۸۷ تخم طیور بومی (تعداد ۲۵ تخم مرغ، ۲۵ تخم کبوتر، ۲۵ تخم بلدرچین و ۱۲ تخم شترمرغ) از مراکز فروش و مراکز پرورشی تهیه و جهت بررسی آزمایش‌های بیوشیمیایی، مولکولی و بررسی الگوی مقاومت دارویی به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

تهیه نمونه از پوسته تخم‌ها، بدون تمیز کردن سطح آن‌ها و با کشیدن سواب استریل به سرتاسر پوسته انجام و به محیط کشت پیش غنی شده آب پپتونه

قلیایی منتقل گردید. برای اخذ نمونه از محتویات زرده و سفیده، پوسته‌ی تخم‌مرغ‌ها شسته و جهت ضدعفونی کردن آن‌ها از روش غوطه‌ورسازی در اتانول ۳۶٪ استفاده شد تا بدین وسیله با از بین رفتن هرگونه جرم موجود بر روی پوسته از تداخل در بررسی محتویات جلوگیری شود. پس از خشک شدن تخم مرغ‌ها با استفاده از دستکش و قیچی استریل، پوسته آهکی آن‌ها شکسته و در ظروف استریل، زرده و سفیده از هم جدا گردید.

پس از غنی سازی در محیط آب پپتونه قلیایی، در محیط کشت مک کانکی آگار، پرگنه‌های ارغوانی رنگ را جدا و به محیط کشت EMB انتقال داده شدند. پرگنه هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند را به‌عنوان باکتری‌های تیپیک در نظر گرفته و با آزمون‌های بیوشیمیایی اندول، متیل‌رد، سیترات، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI و آزمون اوره‌آز، مورد ارزیابی قرار داده شد. بعد از انجام آزمون‌های تشخیصی و افتراقی بر روی پرگنه‌های مشکوک و تأیید وجود این باکتری، سویه‌هایی که به‌عنوان *اشریشیا کلی* مورد تائید قرار گرفت.

جدول ۱- آزمون‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی *اشریشیاکلی*

نوع باکتری	نوع آزمون						
	تولید اندول	متیل رد	VP	سیترات	H2S	اوره	لیزین دکربوکسیلاز
اشریشیا کلی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی

به‌منظور تشخیص *اشریشیاکلی* O157 H7 مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. به‌منظور تشخیص مولکولی DNA آن‌ها استخراج شده و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با پرایمرها اقدام به بررسی مولکولی شد، در پایان کارایی روش PCR در تشخیص‌های *اشریشیاکلی* O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان فراوانی موارد مثبت بر حسب درصد گزارش گردید. در تمام واکنش‌های PCR، از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی و از باکتری *اشریشیاکلی* O157: K88ac:H19 (***ATCC*** 25922) به‌عنوان کنترل مثبت واکنش، استفاده شد. واکنش PCR به‌منظور ردیابی باکتری *اشریشیاکلی* O157: H7 صورت گرفت.

جدول ۲- لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژن‌های حدت باکتری *اشریشیا کلی*

ژن حدت	توالی نوکلئوتیدی پرایمرها	اندازه محصول(bp)
E. coli 16S rRNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	۹۱۹
O157- RfbF O157- RfbR	GTGTCCATTTATACGGACATCCATG CCTATAACGTCATGCCAATATTGCC	۲۹۲
H7- FLICh7-F H7- FLICh7-R	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTATCGCCATTCC	۶۲۵

برنامه دمایی برای تکثیر ژن‌های O157 و H7 صورت زیر بود: ۹۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه.

هم‌چنین در صورت جداسازی باکتری‌های *اشریشیاکلی*، برای تعیین الگوی حساسیت جدایه‌های *اشریشیاکلی* از روش انتشار دیسک با به‌کارگیری دیسک‌های (از شرکت پادتن طب ایران) استفاده شد و تفسیر نتایج حاصل مطابق با استانداردهای CLSI, 2012 (۳۱)

انجام گرفت. به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی*، دیسک‌هایی با غلظت استاندارد شامل سیپروفلوکساسین (Cp5)، تتراسیکلین (TE30)، داکسی‌سایکلین (D30)، ونکومایسین (V30)، سفتریواکسن (CRo30)، پنیسیلین (PE)، استرپتومایسین (ST)، انروفلوکساسین (ENRO10)، آمیکاسین (AN 30)، آمپی سیلین (AM 30)، آموکسی‌سیلین (AMX 25)، نالی دیکسیک اسید (Na 30) از شرکت پادتن طب– ایران مورد استفاده قرار گرفتند.

در نهایت ارتباط آماری (جهت تجزیه و تحلیل داده ها) با استفاده از نرم افزار آماری SPSS حاصل از نتایج به دست آمده با عوامل مرتبط احتمالی از جمله نوع نمونه و نوع تخم، مورد بررسی آماری قرار گرفت. در این بررسی $P < 0.05$ به‌عنوان معنی‌دار، معرفی شد.

نتایج

در این تحقیق تعداد ۸۷ تخم طیور بومی (تعداد ۲۵ تخم مرغ، ۲۵ تخم کبوتر، ۲۵ تخم بلدرچین و ۱۲ تخم شترمرغ) از مراکز فروش و مراکز پرورشی تهیه شده و از نظر آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی* مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت که در نهایت پس از انجام آزمون تشخیصی کشت ۸ نمونه (۹ درصد) از کل نمونه‌ها در محیط کشت EMB دارای جلای سبز متالیک بوده که نشان دهنده وجود باکتری *اشریشیاکلی* بوده است. سپس این ۸ نمونه تحت روش تشخیصی دقیق و حساس PCR جهت تعیین سویه O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت که از این ۸ نمونه فقط ۴ نمونه دارای ژنوم این سویه بودند.

جدول ۳- درصد آلودگی به باکتری *اشریشیا کلی* با روش کشت در قسمت‌های مختلف در نمونه‌های تحت مطالعه

تخم طیور	آلودگی	پوسته	سفیده	زرده	سطح معنی‌داری
مرغ	آلوده	۴	۴	۰	۰/۵۹۸ns
	سالم	۹۶	۹۶	۱۰۰	
بلدرچین	آلوده	۴	۰	۰	۰/۳۶۳ns
	سالم	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	
کبوتر	آلوده	۸	۴	۰	۰/۳۵۳ns
	سالم	۹۲	۹۶	۱۰۰	
شترمرغ	آلوده	۱۶/۷	۰	۰	۰/۱۲ns
	سالم	۸۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	

ns: تفاوت بین بخش‌های مختلف معنی‌دار نیست.

هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مابین قسمت‌های مختلف تخم‌های مورد مطالعه وجود ندارد.

طبق نتایج به دست آمده آلودگی در تخم‌های طیور بومی مورد مطالعه هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

از تعداد ۲۵ عدد تخم مرغ، هر تخم مرغ به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۱ عدد (۴ درصد) مثبت و در سفیده نیز ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود.

بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ گونه اختلاف آماری معنی داری مشخص نشد.

از تعداد ۲۵ عدد تخم کبوتر، هر تخم کبوتر به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده وجود

نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۲ عدد (۸ درصد) مثبت و در سفیده نیز ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود. بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها با نرم افزار SPSS، هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی داری مشخص نشد.

از تعداد ۲۵ عدد تخم بلدرچین، هر تخم به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده و سفیده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۱ عدد (۴ درصد) مثبت بود. بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی-داری مشخص نشد.

از تعداد ۱۲ عدد تخم‌شترمرغ، هر تخم به سه قسمت مجزا (پوسته، سفیده، زرده) هر کدام جهت کشت نمونه‌گیری شد و بعد از انجام مراحل کشت مشخص شد که آلودگی به این باکتری در زرده و سفیده وجود نداشته (صفر درصد) و در پوسته ۲ عدد (۱۶/۷ درصد) مثبت بود.

بعد از انجام محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری مشخص نشد.

به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی*، دیسک‌هایی با غلظت استاندارد شامل سیپروفلوکساسین (Cp5)، تتراسیکلین (TE30)، داکسی‌سایکلین (D30)، ونکومایسین (V30)، سفتریواکسن (CRo30)، پنیسیلین (PE)، استرپتومایسین (ST)، انروفلوکساسین (NOR10)، آمیکاسین AN (30)، آمپی‌سیلین (30AM)، آموکسی‌سیلین AMX (25)، نالی‌دیکسیک‌اسید Na - (30) از شرکت پادتن طب– ایران مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام آزمون‌های آنتی‌بیوگرام جهت تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، بیشترین حساسیت در مورد اشریشیاکلی به آنتی-بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریواکسن، انروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نالی دیکسیک اسید بود.

پس از انجام مراحل کشت و محرز شدن آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه‌ها، جهت جداسازی سویه O157:H7، ۸ نمونه مثبت شده در کشت مورد بررسی توسط روش مولکولی PCR قرار گرفتند. بعد از انجام PCR مشخص گردید که همه‌ی موارد مثبت در کشت، *اشریشیاکلی* بوده ولی فقط ۴ نمونه (۴/۵ درصد) از کل نمونه‌ها به این سویه خاص (O157:H7) آلوده بودند.

جدول ۴- درصد آلودگی به باکتری *اشریشیا کلی* در بخش‌های مختلف با روش PCR

دام	آلودگی	پوسته	سفیده	زرده	سطح معنی‌داری
مرغ	آلوده	۴	۰	۰	۰/۳۶۳ns
	سالم	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	
بلدرچین	آلوده	۰	۰	۰	۱ns
	سالم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	
کبوتر	آلوده	۰	۴	۰	۰/۳۶۳ns
	سالم	۱۰۰	۹۶	۱۰۰	
شترمرغ	آلوده	۱۶/۷	۰	۰	۰/۱۲ns
	سالم	۸۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	

ns: تفاوت بین بخش‌های مختلف معنی‌دار نیست.

جدول ۵- درصد آلودگی به باکتری اشریشیا کلی با روش PCR در تخم طیور بومی مختلف در نمونه‌های تحت مطالعه

دام	آلودگی	پوسته	سفیده	زرده
مرغ	آلوده	۴	۰	۰
	سالم	۹۶	۱۰۰	۱۰۰
بلدرچین	آلوده	۰	۰	۰
	سالم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
کبوتر	آلوده	۰	۴	۰
	سالم	۱۰۰	۹۶	۱۰۰
شترمرغ	آلوده	۱۶/۷	۰	۰
	سالم	۸۳/۳	۱۰۰	۱۰۰
کل	آلوده	۳/۴	۲/۳	۰
	سالم	۹۶/۶	۹۷/۷	۱۰۰
سطح معنی‌داری		۰/۰۴*	۰/۴۷۴ns	۱ns

*: تفاوت بین تخم‌های مختلف با احتمال ۹۵٪ معنی‌دار است ($p<0.05$)

ns: تفاوت بین تخم‌های مختلف معنی‌دار نیست.

اختلاف معنی‌داری بین بخش‌های مختلف تخم طیور بومی مورد مطالعه در روش PCR وجود نداشت.

پس از انجام محاسبات آماری مشخص شد تنها در پوسته با روش PCR الودگی در شترمرغ به طور معنی‌داری از سایر طیور بیشتر بود.

این میزان آلودگی به‌طور محسوس در قسمت پوسته تخم شتر مرغ (۰/۰۴ درصد) در مقایسه با سایر طیور مورد مطالعه وجود داشت.

بحث

اشریشیاکلی یک باکتری بسیار مهم است که جزء فلور دستگاه گوارش انسان و حیوانات است و برخی از سویه‌های این باکتری به‌واسطه دارا بودن ژن‌های حدت قادر به ایجاد بیماری در روده و حتی خارج از روده می‌باشند(Bell et al., 2002).

برخی از سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* قادر به تولید وروتوکسین و ایجاد کولیت خونریزی دهنده و سندرم همولیتیک‌اورمیک می‌باشند (Cabassi et al., 2004 و Endoy et al., 2002).

بر طبق نتایج به دست آمده از تحقیق Bruce و همکاران در سال ۱۹۷۸ عمده باکتری‌های آلوده کننده پوسته تخم‌مرغ‌های هچ نشده شامل: *استرپتوکوک*، *استافیلوکوک*، *سودوموناس*، *میکروکوک*، *باسیلوس* و خانواده انتروباکتریاسه بودند.

در سال ۲۰۰۳، Cook و همکاران با انجام مطالعه‌ای بر روی عفونت‌های منتقل شونده از طریق پوسته تخم مرغ، گزارش نمودند که در ۱۶ درصد موارد، باکتری-های خانواده انتروباکتریاسه از پوسته جدا شده‌اند که در این بین بیش‌ترین موارد شامل *اشریشیاکلی* و *پروتئوس* و در درجه بعدی اهمیت، *سراتیا*، *سیتروباکتر*، *انتروباکتر* و *یرسینیا* بودند. هم چنین باکتری *سودوموناس* در ۱۵ درصد پوسته‌ها و ۲۲ درصد زرده‌ها گزارش شده است و *باسیلوس*ها با ۳۹ درصد فراوانی بیش‌ترین باکتری جداشده از پوسته بودند.

Cabassi و همکاران در سال ۲۰۰۴، شیوع بالای *اشریشیاکلی* و گونه‌های *انتروباکتر* را در تخم‌های شترمرغ با اختلالات باروری گزارش نمودند.

De Reu و همکاران در سال ۲۰۰۶ با انجام تحقیقی نشان دادند که اغلب باکتری‌های نفوذی به زرده، جزو دسته گرم منفی‌ها، متحرک و غیرخوشه‌ای (تکی) بودند و بیش‌ترین سهم را *سودوموناس* ها تشکیل می-دادند.

De Chousalkar و همکاران در سال ۲۰۱۰، باکتری-های *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* را از پوسته تخم‌مرغ‌های تجاری در کشور استرالیا جداسازی کردند.

در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۱ توسط Loongyai و همکاران در تایلند صورت گرفت، به جداسازی باکتری‌های *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* به روش مولکولی PCR از پوسته تخم‌مرغ و محتویات تخم‌مرغ، مرغ‌های تخم‌گذار پرداختند.

Knöbl و همکاران در سال ۲۰۱۲ در برزیل به جداسازی *انتروباکترها* از تخم شترمرغ‌ها پرداختند و میزان شیوع *اشریشیاکلی* را ۱۵ درصد گزارش نمودند.

مطالعات متعددی بیانگر این نکته می‌باشند که علاوه بر سروتیپ O157:H7 سایر سروتیپ‌های این باکتری که وروتوکسین تولید می‌کنند قادر هستند باعث ایجاد بیماری در انسان شوند (Boyd et al., 1987 و Doyle et al., 1987).

اگرچه سروتیپ O157: H7 اغلب در دستگاه گوارش حیوانات و بخصوص گاو موجود است و این حیوان به‌عنوان مخزن اصلی این سروتیپ محسوب می‌شود ولی درباره منبع سایر سروتیپ‌هایی که قادر به تولید وروتوکسین می‌باشند اطلاعات کمی در دست است (Cody et al., 1999).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر که به‌منظور شناسایی باکتری‌های *اشریشیاکلی* سویه O157: H7 که باعث آلودگی تخم طیور بومی می‌گردد انجام شد، نشان دهنده این است که حدود۴/۵ درصد از موارد مشکوک جدا شده از نمونه‌ها دارای ژنوم این سویه بودند.

تخم پرندگان به دلیل داشتن مواد غذایی فراوان و منبع ارزان پروتئین، مصرف جهانی بالایی دارد و یکی از پرمصرف‌ترین مواد غذایی است. پرمصرف بودن این ماده غذایی سبب می‌شود که هرگونه تغییر فیزیکی و شیمیایی در آن از نظر متخصصین تغذیه مهم تلقی شود و اقداماتی در جهت کاهش آن انجام دهند.

با توجه به این مطالعه و سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر نقاط دنیا می‌توان این‌گونه برداشت کرد که استفاده از روش‌های مدرن نگهداری در کلیه مراحل پرورش و نگهداری طیور مادر و تخم‌گذار باعث کاهش تماس با آلودگی و افزایش بیشتر سطح بهداشت و در نتیجه کاهش آلودگی‌های باکتریایی شده؛ اما این کاهش تماس کاملاً باعث از بین رفتن آلودگی نشده و در برخی مناطق آلودگی هرچند مختصر وجود دارد.

همچنین استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره طیور و وارد شدن این مواد به تخم‌مرغ خود علت دیگری است در کاهش آلودگی باکتریایی تخم‌مرغ‌ها ولی این موضوع خود باعث مشکلاتی خواهد شد.

همان‌طوری که در قسمت نتایج ذکر شده از ۸۷ نمونه تخم پرندگان مورد آزمایش تعداد ۸ مورد یعنی ۹/۱٪ آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* بوده‌اند که این میزان آلودگی اگرچه میزان کمی است اما با توجه به مصرف بالای تخم پرندگان قابل توجه است.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و توجه به این نکته که باکتری جدا شده عمدتاً جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش پرندگان بومی بوده و با پاستوریزاسیون حرارتی از بین می‌رود. لذا توصیه می‌شود از مصرف تخم خام یا عسلی مخصوصاً در اطفال خودداری شود و تخم به صورت کاملاً پخته مصرف شود.

منابع

۱. ادیب فر، پرویز. (۱۳۷۹). میکروب‌شناسی پزشکی (برای دانشجویان گروه پزشکی، پیراپزشکی و رشته‌های تخصصی)، چاپ اول، انتشارات نور دانش، ص ۸۵ تا ۱۰۰.

۲. پناهی، دهقان. (۱۳۷۴). فیزیولوژی پرندگان. انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر،۶۸۹ صفحه.

۳. جیمزو ام. جی، ترجمه مرتضوی، سیدعلی، معتمدزادگان، علی. اعلمی، مهران. گوهری اردبیلی، اشرف. (۱۳۸۲). میکروبیولوژی مواد غذایی مدرن، جلد دوم، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۴۵۵ تا ۴۷۵.

۴. زعیم کهن، حمید، ۱۳۸۰، بیماری‌های عفونی هاریسون ترجمه‌ی اصول طب داخلی هاریسون، چاپ اول، انتشارات سماط، ص ۳۷۳ تا ۳۸۱.

5. Abatangelo, G.D. Daga-Gordini, I. Castellani, and R. Cortivo. (1978). Some observation on the calcium ion binding to the eggshell matrix. Calcif Tissue Res. 26: 247.

6. Alexandere M., (2003). Detection of shiga toxin-producing *Escerichia coli* in food. Expert. Rev. Mol. Diagon. 3(1): 105-115.

7. Bar, A., and S.Hurwitz. (1973). Calcium restriction and intestinal calcium-binding protein in the laying fowl. Comp. Biochem. Physiol. A, 45, 571.

8. Beam A, Garber L, Sakugawa J, Kopral C. *Salmonella* awareness and related management practices in U.S. urban backyard chicken flocks (2013). PVM. 110: 481-488.

9. Bell C., (2002) Approach to the control of enteroheamorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Int J Food Microbiol. 78(3): 197-216.

10. Bielaszewska, M. Clarke I., Kamaliu, M.A and Petric, M (2003). Localization of interavenously administered Verocytotoxins (Shga-Like Toxins) 1 and 2 in Rabbits immunized and Tonxin Subunits. Infect Immune. 65(7): 2509-2516.

11. Blanco, J. E., Blanco, M and Blanco, J. Et al. (1998). Seogroups, Biotypes, and eae Genes in *Escherichia coli* Strains isolated from Diarrheic and Healthy Rabbits. J Clin Microbiol. 34(12): 3107-3110.

12. Board, R.G., S.G. Tullett, and H.R. Perrott. (1977). An arbitrary classification of the pore system in avian eggshells. J Zool. 182: 251.

13. Boyce, T.G., Swerdlow, D. L and Girffin, P. M. (2006). *Escherichia coli* 0157: H7 and the hemolytic-Uremic syndrome. N Engl J Med. 333: 364-368.

14. Boyd R.F, Haerl B.G. (1987). B.M.M. 3 rd ed. Little Brown and company.

15. C.D.C. (1983). Infections motes outbreak of heamorrhagic colitis-Ottawa-Canada. MMWR. 32 (10): 133-4.

16. C.D.C. (1993). Multistste outbreak of *Escherichial coli* 0157:H7 infections from heamorrhagic colitis Unites states. MMWR. 42 (14): 258-263.

17. Cabassi CS, Taddei S, Predari G, Galvani G, Ghidini F, Schiano E, Cavirani S. (2004). Bacteriological findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. Avian Diseases. 48 (3): 716-722.

18. Calderwood, S.B. (1997) Structure-Function realationsheaps of Shiga toxin and the shiga- like toxins to bacterial enterotoxins and ribosome- inactivating proteins. Recent Advance In VTED Infections. 119- 122.

19. Cave, H and Bingen E. (1994) Differentitation of *E. coli* strains using DNA analysis. Res Microbiol. 145: 141-150.

20. Chandra, B., Louise, G and Tom, G. (1999). Specific Intraction of *Escherichia coli* 0157: H7 derived shiga like toxin II with human renal endothelial cells. J Infect Dis. 172: 1397-1401.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. M100 S21. Wayne Pa: CLSI; 2012.

22. Cody SH. (1999). An outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Ann Intern Med. 130: 202-9.

23. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry. (1987). Appl Environ Microbiol. 53: 2394-2396.

24. Endoy, T. and Rsyrugi, K. (2002). Site of action of Verotoxin from *E. coli* on eucharistic ribosome·s. Euro J Briche. 13: 683-721.

Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from avian eggs

Moradi Sarmeidani M[1*], Farde Emadi M[1], Rahimi E[2], Zamani Moghadam A[3]

1. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Department of Poultry Dieses, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, shahrekord, Iran

***Corresponding author:** *Bluedvm@gmail.com*

Received: 7 September 2017 Accepted: 7 November 2017

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) are one of the most common intestinal pathogenic bacteria that cause various infections among men and animals. *E. coli* O157:H7 is one of the major serotypes which are placed in the group of Enterohemorrhagic *E. coli* or EHEC. The purpose of this study was searching for serotype O157:H7 in samples of domestic birds' egg in the market by culture method and PCR molecular method and the antibiotic resistance of this bacterium was investigated. Totally, 87 samples of domestic poultry eggs (chicken, quail, pigeons, ostriches) three parts of shell, yolk and white (from each part a separate sample) were examined and after culturing steps, 8 samples were infected with this bacterium. Then, these 8 samples were tested with PCR strain and finally, 4 samples had O157: H7 strain genotype. Also after conducting antibiogram tests to determine the sensitivity toward different antibiotics, the most sensitivity of *E. coli* was belonged to antibiotics ciprofloxacin, ceftiroxone, enrofloxacin, enrofloxacin and nalidixic acid.

Keywords: *E. coli* O157:H7, native poultry eggs, antibiotic resistance, cultivation, PCR