جدا سازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی ژن‌های حدت *اشریشیا کلای* مولد شیگا توکسین (STEC) در نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

حمیدرضا بهرامی*[1]، محمد ربیعی فرادنبه[2]

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

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۵

چکیده

سالاد یکی از محبوب‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده‌ی رژیم‌های غذایی می‌باشد. *اشریشیا کلای* تولید کننده‌ی شیگا توکسین، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای غذاها مطرح می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی آلودگی نمونه‌های سالاد در استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان با سویه‌های STEC، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی ژن‌های حدت باکتری‌های جدا شده انجام شد. در این مطالعه توصیفی، هشتاد نمونه سالاد از شهرستان‌های استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان، از رستوران‌ها و مراکز فروش فست فود به طور تصادفی جمع‌آوری و متعاقب جداسازی *اشریشیا کلای* در روش کشت، آزمایش PCR به منظور تعیین عوامل حدت، باکتری‌های مولد شیگا توکسین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. سپس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها با روش استاندارد انتشار دیسک تعیین گردید. نتایج نشان داد که از ۸۰ نمونه سالاد، ۱۱ عدد(۱۳/۷۵ ٪) آلوده به *اشریشیا کلای* هستند. تمام سویه‌های جدا شده *اشریشیا کلای* حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم هستند که در این میان مقاومت به تتراسیکلین (۵۸/۸۲ درصد) بیشترین و مقاومت به نیتروفورانتوئین (۳,۹۲ درصد) کمترین فراوانی را دارا می‌باشد. و ژن *stx1* (۵۴/۵۴ درصد) بیشترین فراوانی را در ژن‌های حدت به خود اختصاص داد. اگرچه در ایران ظاهرا شیوع عفونت با سوش‌های STEC بالا نیست، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که امکان آلوده بودن سالادهای ارائه شده در مراکز عرضه فست فود و رستوران‌ها با سویه‌های گوناگون STEC وجود دارد، لذا اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از آلودگی سالاد با این باکتری ضروری بنظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلای* مولد شیگاتوکسین، الگوی مقاومت آنتی بیوتیک، سالاد.

مقدمه

اشریشیا کلای باکتری میله‌ای شکل و گرم منفی به طول ۲ تا ۶ میکرون و عرض ۱ تا ۱/۵ میکرون است که در شرایط متفاوت رشد از نظر خصوصیات ظاهری پلی‌مورفیک می باشد (Collee et al., 1990). این پاتوژن به عنوان قسمتی از فلور نرمال روده چند ساعت بعد از تولد، در سیستم گوارش انسان و حیوانات پستاندار کلنی تشکیل می‌شود و با این عمل نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارش ایفا می‌نماید. لازم به ذکر می‌باشد که برخی از سویه‌های *اشریشیا کلای* با بدست آوردن عوامل ویرولانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها، باکتریوفاژها و

لوکوس‌های پاتوژنیسیتی به صورت سویه‌های بیماری زا در می‌آیند. سروتیپ‌های مختلف *اشریشیا کلای* عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه و مکان های با فقر بهداشتی می‌باشد (Osek, 2003).

اشریشیا کلای یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیماری‌زای موجود در غذاها می‌باشد و تـاکنون در جهان چندین همه-گیری مسمومیت غذایی را با STEC مولد شیگا توکسین مرتبط دانسته‌اند. (Karmali et al., 1989; Ostroff et al., 1990). از عوارض آلودگی با این سوش از باکتری‌ها اسهال خونی و آبکی است و بدنبال پیشرفت روند بیماری-زایی و عفونت به خصوص با سروتیپ *O157:H7*، کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک همولیتیک نیز مشاهده شده است(Tarr, 1995). امروزه بالغ بر یکصد سروتیپ *E.coli* که توانایی تولید شیگاتوکسین را دارند شناسایی گردیده-است که دارای یکی از ژن‌های *stx1* یا *stx2* یا هر دوی آنها یا مشتق‌هایی از *stx2* می‌باشند که محل لوکالیزه شدن این ژن‌ها بر روی باکتریوفاژ لیزوژنیک می‌باشد. (Louie et al., 1993) علاوه بر تولید توکسین، فاکتور حدت دیگری که در رابطه با STEC وجود دارد پروتئینی به نام Intimin که توسط ژن *eae* رمز می‌شود، دارای وزن ملکولی ۹۴ کیلو دالتون و موجود در غشای خارجی باکتری است که مسئول چسبندگی این باکتری به سلول‌های اپیتلیوم روده می‌باشد (Louie et al., 1993).

اطلاعات موجود نشان می‌دهد که آلودگی با سویه‌های *اشیریشیاکلای O157:H7* در قاره اروپا و استرالیا و آمریکای لاتین نشانگر وجود پراکندگی سویه‌ها برمبنای تنوع جغرافیایی می‌باشد. دام‌ها از مهم‌ترین منابع عامل بیماری محسوب می‌شوند. آب و مواد غذایی از مهم‌ترین راه-های انتقال بیماری می‌باشند. همه‌گیری‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم معمولاً با مصرف آب و غذای آلوده با مدفوع حیوانات به ویژه شیر، فرآورده‌های لبنی، سبزیجات تازه و گوشت همراه بوده است. آلودگی با *اشریشیا کلای O157:H7* تقریباً در تمامی دنیا گزارش شده است (Mora et al., 2007). میزان همه‌گیری‌های تأیید شده آلودگی با *اشریشیا کلای O157:H7* در سال ۲۰۰۷ در اسکاتلند ۹ مورد و در سال ۲۰۰۸ در ویرجینیای آمریکا ۲۵ مورد بوده است (CDC.,www.cdc.gov).

از مهم‌ترین راه‌های آلودگی انسان به این باکتری، مصرف مواد غذایی، آب آلوده یا انتقال شخص به شخص می‌باشد (Armstrong et al., 1996) و تاکنون حضور STEC در چنـدین مـاده غـذایی از جملـه گوشـت قرمـز و گوشـت مـاهی گـزارش شـده اسـت (Doyle et al., 1987; Samadpour et al., 1994).

در کشورهای پیشرفته، تحقیق و بررسی‌های زیـادی در مـورد وضـعیت ایـن بـاکتری انجام گرفته‌است درحالیکه درکـشورهای در حال توسـعه، اطلاعـات در مـورد آن‌ها بـسیار محـدود مـی‌باشـد. با توجه به دوز عفونی بسیار پایین، گزارشات پراکنده و محدود از شیوع آلودگی مواد غذایی به سویه‌های توکسین زا در ایران و با توجه به امکان انتقال این سویه‌ها از سبزیجات به انسان این مطالعه بـا هـدف تعیـین فراوانـی آلودگی در نمونه‌های سالاد جمع-آوری شـده در استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان بـا باکتری *اشریشیا کلای* مولـد شـیگا توکـسین و تعیـین ژنوتیـپ آن‌ها انجام شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعـه توصیـفی، ۸۰ نمونه سالاد در طـی ماه-های مرداد تا دی سال ۱۳۹۳ از شهرستان‌های استان چهارمحال و بختیاری وشهر اصفهان ، از رستوران‌ها و مراکز فروش فست فود به طـور تـصادفی جمـع آوری و به منظور آزمایشات میکروب‌شناسی در شرایط استریل در کنار یخ به

آزمایشگاه تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. آزمایشات مورد نظر در همان روز ورود نمونه به آزمایشگاه انجام گرفت. غنی‌سازی نمونه‌ها بر روی محیط پپتون واتر و جداسازی بر روی محیط مک‌کانکی آگار انجام گرفت. برای ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری-های جداسازی شده از محیط ائوزین متیلن بلو آگار استفاده شد. به منظور تائید باکتری‌های جدا شده در محیط ائوزین متیلن بلو آگار [1] آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی نظیر تست IMViC، اوره و TSI انجام و باکتری‌های *اشریشیا کلای* جدا شده جهت تعیین سروتیپ‌های مورد مطالعه در محیط مایع BHI کشت شد. به منظور انجام آزمایش PCR و تعیین سروتیپ‌های مورد مطالعه از باکتری‌های جدا شده و ردیابی ژن‌های کد کننده عوامل حدت با استفاده از روش جوشاندن DNA ژنومی استخراج و با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول شماره ۱، به روش PCR چندگانه ای برای ژن‌های *eae, stx1, stx2* آزمایش شد.

جهت انجام آزمایش PCR، از دستگاه Master cycler gradient Corbett Austeria Co با حجم ۵۰ میکرو لیتر واجد ۵ میکرو لیتر PCR buffer 10x، ۲ میلی مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۲ میکرو مول از زوج پرایمر های اختصاصی، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Tag DNA Polymerase(Roche applied science,Germany CO). و ۱ میکرو لیتر از DNA در هرنمونه استفاده شد که حاوی ۱۰ نانو گرم از DNA نمونه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه ۵ دقیقه ،۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۸ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۳ دقیقه. و جهت ردیابی محصول PCR در نمونه های آزمایش شده از ژل یک درصد آگاروز استفاده شد (Sambrook, 2003).

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های *اشیریشیاکلای* جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش انتشار دیسکی ساده کربی بایر طبق دستورالعمل CLSI (2006) استفاده شد (Zhao et al., 2001). در این مرحله سویه‌های میکروبی جدا شده در محیط جامد هینتون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور انواع دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل پنی‌سیلین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، سولفامتوکسازول، جنتامایسین، انروفلوکساسین، لینکومایسین، سیپروفلوکساسین، تری متوپریم، نیتروفورانتوئین و آمپی-سیلین کشت داده شد و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد حساسیت یا مقاومت باکتری به هر آنتی‌بیوتیک تعیین گردید. در این مرحله از سویه استاندارد *اشریشیاکلای ATCC 25922* به عنوان نمونه کنترل مثبت در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد (Blondeau et al., 2012) سپس اطلاعات حاصله توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ با استفاده از تست مربع کای یا دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار درنظر گرفته شد.

[1] EMB

جدول ۱- ژن‌های هدف توالی پرایمرها و طول قطعه تکثیر شده

منبع	ژن هدف	توالی پرایمر (5′-3′)	طول محصول PCR(bp)
Jenkins et al., 2008	Shiga toxin 1 (*stx1*)	AAATCGCCATTCGTTGACTACTTCT TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA	366
Jenkins et al., 2008	Shiga toxin 2 (*stx2*)	CGATCGTCACTCACTGGTTTCATCA GGATATTCTCCCCACTCTGACACC	282
Oporto et al., 2008	Enteropathogenic attachment & effacement (*eaeA*)	TGCGGCACAACAGGCGGCGA CGGTCGCCGCACCAGGATTC	629

نتایج

از ۸۰ نمونه سالاد جمع‌آوری شده مورد آزمایش ۱۱ عدد(۱۳/۷۵ درصد) نمونه در تست PCR مثبت شد. اما در این مطالعه تنها ۱۰ سویه (۱۲/۵ ٪) با موفقیت خالص گردید. توزیع فراوانی انواع ژن‌های حدت در سویه‌های *اشریشیا کلای* جدا شده از از نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان در جدول شماره ۳ نشان داده شده است بطوری که ژن *stx1* با ۵۴/۵۴٪ بیشترین و ژن *stx2* با ۱۸/۱۸٪ کمترین فراوانی را داشتند. همچنین فراوانی سویه های STEC در نمونه‌های سالاد در مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان در جدول ۴ نشان داده شده است. بطوری که بیشترین فراوانی در اصفهان (۲۵/۵٪) و کم‌ترین فراوانی در شهرستان فارسان (۱۲/۸٪) دیده شد. اما رابطه معنی داری بین فراوانی STEC در سالاد و منطقه جمع آوری نمونه‌ها وجود نداشت.

بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به تتراسیکلین (۵۸/۸۲٪) و کم‌ترین مقاومت به نیتروفورانتوئین (۳/۹۲٪) دیده شد. در حالی که مقاومت نسبی به استرپتومایسین، تتراسیکلین مشاهده شد.

جدول ۲- الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های STEC جدا شده از نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
پنی سیلین	٪۵۳/۹۳	-	٪۴۶/۰۷
تتراسیکلین	٪۲۲/۷۸	٪۱۸/۴	٪۵۸/۸۲
استرپتومایسین	٪۵۲/۷۵	٪۱۰	٪۳۷/۲۵
کلرامفنیکل	٪۶۴/۷۱	-	٪۳۵/۲۹
سولفامتوکسازول	٪۶۸/۶۳	-	٪۳۱/۳۷
جنتامایسین	٪۸۰/۴	-	٪۱۹/۶
انروفلوکساسین	٪۵۴/۹۱	-	٪۴۵/۰۹
لینکومایسین	٪۵۸/۸۳	-	٪۴۱/۱۷
سفالوتین	٪۶۵/۶۹	-	٪۳۴/۳۱
سیپروفلوکساسین	٪۹۲/۱۶	-	٪۷/۸۴
تری متوپریم	٪۵۹/۸۱	-	٪۴۰/۱۹
نیتروفورا نتوئین	٪۹۶/۰۸	-	٪۳/۹۲
آمپی سیلین	٪۷۳/۵۳	-	٪۲۶/۴۷

جدول۳- توزیع فراوانی انواع ژن‌های حدت در سویه های *اشریشیاکلای* جدا شده از نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

تعداد eae	تعداد stx2	تعداد stx1	محل نمونه گیری
۰	۱	۲	شهر اصفهان
۱	۱	۱	شهرستان شهرکرد
۱	۰	۱	شهرستان بروجن
۱	۰	۰	شهرستان فارسان
۰	۰	۲	شهرستان لردگان
۳	۲	۶	جمع

جدول ۴- فراوانی STEC جدا شده از نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

ردیف	محل نمونه گیری	درصد فراوانی STEC
۱	شهر اصفهان	۲۵،۵
۲	شهرستان شهرکرد	۲۳،۴
۳	شهرستان بروجن	۱۹،۱
۴	شهرستان فارسان	۱۲،۸
۵	شهرستان لردگان	۱۹،۱

بحث:

بیماری‌های ناشی از غذا یکی از مشکلات عدیده بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان می‌باشد و در این بین سویه‌های STEC به عنوان یکی از پاتوژن‌های مهم ناشی از غذا در اپیدمی‌ها و حتی در موارد تک‌گیر به حساب می‌آید. بنابر این روش‌های تشخیص و شناسایی دقیق این باکتری در بیماران و منابع غذایی دارای اهمیت ویژه می‌باشد. امروزه با توجه به کم دقت و زمان بر بودن روش‌های شناسایی کلاسیک، روش‌های مولکولی در حال گسترش می باشد که رتبه اول آنها به روش PCR تعلق دارد، به گونه ای که شناسایی سویه‌های STEC در مواد غذایی از راه تکثیر ژن های بیماری‌زا با روش PCR در چندین مطالعه گزارش شده است (Kumar et al., 2001; Khan et al., 2002 and Adwan et al., 2004).

اشریشیا کلای عموماً به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می‌شود. به این علت نقش مهمی را در میکروب‌شناسی غذا و آب به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی به عهده دارد، ارتباط بین *اشریشیا کلای* و بیماری‌های حیوانی در سال ۱۸۹۰ مشخص گردید در حالی‌که ارتباط آن با بیماری‌های انسان در سال ۱۹۴۰ به دنبال وقوع بیماری در مهد کودک‌ها مشخص شد. این میکروب به واسطه دارا بودن ژن‌های حدت قادر به تولید بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای می‌باشد. (ادیب‌فر، پرویز،(۱۳۷۹)، میکروب‌شناسی پزشکی ، مرتضوی علی، قدس روحانی محسن، جوینده حسین.(۱۳۸۸)، تکنولوژی شیر و فرآورده های لبنی. و میثمی، اسماعیل (۱۳۷۶)، باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی.)

یکی از بیماری‌های حاصل از آلودگی مواد غذایی با این باکتری در سال‌های اخیر وقوع سندرم کولیت خونریزی-دهنده می‌باشد که توسط سروتیپی از این باکتری به نام $O_{157}:H_7$ در یک مهد کودک واقع در اونتاریوی کانادا در سال ۱۹۸۵ گزارش شد (میثمی، الف، (۱۳۷۶)، باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی، (Gillespie et al., 1992; Martin et al., 1997).

دراین مطالعه روش PCR برای بررسی حضور STEC در نمونه‌های سالاد استفاده گردید. در روش PCR باکتری‌های زنده و مرده موجود در ماده غذایی قابل شناسایی است بنابر این نقطه ضعف اصلی PCR عدم توانایی تمایز بین سلول-های زنده و مرده است. برای برطرف کردن این نقص در این مطالعه بعد از کشت و غنی‌سازی تست PCR انجام شد که نتایج به دست آمده باکتری‌های زنده موجود در ماده غذایی را مشخص می‌کند.

بررسی وجود سویه‌های STEC در مواد غذایی به ویژه گوشت و محصولات وابسته در کشورهای مختلف انجام شده است اما در ایران بر اساس اطلاعات موجود این اولین مطالعه است که بر روی سالادهای آماده مصرف انجام می‌گیرد. در دانمارک ۰/۳ درصد از ۱۵۸۴ نمونه مورد آزمایش با *اشریشیا کلای O157:H7* آلوده بود (Boel et al., 1997) و میزان آلودگی با STEC در سوییس از بین ۲۱۲ نمونه مورد مطالعه، ۲/۸ درصد گزارش شده است (Fantelli et al., 2001).

در آرژانتین نیز ۳/۵ درصد آلودگی به *اشریشیا کلای O157:H7* گزارش شده است (Chinen et al., 2001)، هم چنین در مطالعه ای در هند که با استفاده از روش PCR شناسایی صورت گرفته بود ۵۰ درصد آلودگی با STEC گزارش شده‌است در حالی که تنها ۴ سویه (۳/۶ ٪) خالص سازی شده بود (Khan et al., 2002). در حالی که در این تحقیق ۱۱ نمونه (۱۳/۷۵ ٪) در تست PCR مثبت شد و تنها ۱۰ سویه(۱۲/۵ ٪) با موفقیت خالص

گردید. این اختلاف نشانگر عیب تست PCR در عدم توانایی تفریق بین باکتری‌های زنده و غیر زنده می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ۵۸/۸۳٪ *اشریشیا کلای‌های* جدا شده از سالاد نسبت به تتراسایکلین مقاوم هستند و همان‌طور که در تحقیق دیگری نشان داده شده بود تعداد متنابهی از *اشریشیاکلای‌های* جدا شده از انسان نسبت به تتراسایکلین مقاوم هستند (Schroeder et al., 2002). مطالعه‌ی Schroeder و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان می‌دهد که ۶۱٪ از *اشریشیاکلای‌های* جدا شده از انسان، گاو، خوک و غذاهای مختلف طی سال‌های ۱۹۸۵ تا ۲۰۰۰ نسبت به ۱۳ آنتی بیوتیک آزمایش شده مقاوم بودند و ۲۷٪ از آن‌ها نسبت به تتراسایکلین، ۲۶٪ نسبت به سولفامتوکسازول، ۱۷٪ نسبت به سفالوتین و ۱۳٪ نسبت به آمپی سیلین مقاوم هستند (Schroeder et al., 2002). در مطالعه ما مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشریشیاکلای‌های* جدا شده از سالاد بیشتر از دیگر مطالعات می‌باشد. مطالعه‌ای در اسکاتلند نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی *اشریشیاکلای* در ۱۰/۶٪ نمونه‌های شیرخام وجود دارد و نشان داد که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در *اشریشیاکلای* جدا شده از شیر گاوهای نگهداری شده در بهار بندها بیشتر از گاوهای چرا آزاد می‌باشد. مطالعه‌ی دیگری در اسکاتلند توسط Johnston و همکاران ۱۹۸۳ نشان داد (Johnston et al., 1983) که از مجموع ۱۲۵ *اشریشیاکلای* جدا شده ۲۲/۲٪ نسبت به آنتی بیوتیک مقاوم بوده و از بین *اشریشیاکلای*-های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک، ۴۲/۴ ٪ به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم هستند. در مطالعه‌ای که توسط Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۱ (Rahimi et al., 2011) انجام شده است نشان می‌دهد که مقاومت آنتی بیوتیکی *اشریشیا کلای* هایی که از پنیر سنتی، بستنی و ماست جدا شده بیش از همه نسبت به آمپی سیلین و جنتامایسن (۴۴/۴۴٪) و بعد از آن اریترومایسین با ۳۳/۳٪ و آموکسی سیلین ۱۱/۱، تتراسایکلین با ۱۱/۱٪ و نالیدیکسیک اسید با ۱۱/۱٪ فراوانی می‌باشد.

در مطالعه‌ی دیگری در آفریقای جنوبی در سال ۲۰۰۷ که توسط بنارد و همکاران انجام شد، ۵ مورد (۲/۸٪) از ۱۸۰ نمونه گوشت و محصولات فراوری شده گوشت به *اشریشیا کلای O157: H7* آلوده بودند و دو مورد از نمونه‌ها به ۸ نوع آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (Erickson et al., 2007).

مطالعه‌ای در ایالات متحده آمریکا توسط Karns و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ژن *eae* در *اشریشیا کلای*‌ها در ۲۳٪ نمونه‌ها قابل ردیابی است (Karns et al., 2007). ۴/۲٪ نمونه‌ها از نظر ژن *eae* و یکی یا دو تا از ژن‌های شبیه شیگاتوکسین (Stx1 و Stx2) در شیر مخازن ذخیره گاو-داری‌ها مثبت بودند و آزمون real-time PCR صورت گرفته نشان داد که ۵ نمونه به *O157:H7* آلوده هستند. در حالی‌که در مطالعه ما از ۱۱ نمونه مثبت از نظر *اشریشیاکلای*، ۲۷/۲۷٪ دارای ژن eae و ۴۵/۴۵٪ هر دو ژن شبه شیگاتوکسین را دارند (Karns et al., 2007).

میزان حضور ژن‌های شبه شیگاتوکسین در مطالعه‌ی ما (۷۲/۷۲٪) بود که بسیار بالاتر از مطالعه‌ای است که در Lowa توسط Moon و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۴/۰۸٪) انجام پذیرفته است (Moon et al, 1999). مطالعه دیگری توسط Oses و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی گوشت گوسفندان نشان داد که هر سه نوع ژن حدت eae و Stx1 و Stx2 بالاترین میزان شیوع را به ترتیب در کشتارگاه با ۶۹٪ ، صنایع بسته بندی با ۳۲٪ و در قصابی‌ها با ۹ تا ۱۰٪ دارا هستند (Osés et al., 2010). اما نتایج مطالعه ما حاکی از آن است که در نمونه‌های سالاد *Stx1* با میزان وقوع ۵۴/۵۴٪ بیشترین میزان شیوع ژن‌های حدت در *اشریشیاکلای*‌های جداسازی شده را دارد.

متأسفانه، در ایران تجویز غیر اصولی و بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها در علم دامپزشکی بسیار رایج است و تحقیق van den Boggard در سال ۱۹۹۷ در هلند نشان می‌دهد (Bogaard., 1997) که در حدود ۳۰۰ هزار کیلوگرم آنتی-بیوتیک به صورت سالیانه در حیوانات و پرندگان استفاده می‌شود. این استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند باعث مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها در بدن حیوانات شود، سپس ژن‌های مقاومت باکتریایی توسط شیر و گوشت به جوامع بشری منتقل شده و باعث ایجاد مقاومت دارویی در انسان می‌گردد.

نتیجه‌گیری

متاسفانه به دلیل عدم رعایت موازین بهداشتی از سوی پرسنل زنجیره تولید سالادهای آماده مصرف و استفاده از فاضلاب جهت آبیاری مزارع کشاورزی و هم چنین تجویز بی رویه آنتی بیوتیک‌ها شاهد حضور این گروه از باکتری های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک در سالادهای آماده مصرف هستیم که رعایت موازین بهداشتی و عدم استفاده از فاضلاب جهت آبیاری مزارع می تواند از شیوع این باکتری بکاهد.

کلرامفنیکل به عنوان یک آنتی بیوتیک ممنوعه در دامپزشکی محسوب می‌شود اگر چه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بسیار بالای سویه‌های *اشریشیا کلای* نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل در این تحقیق نشان از استفاده غیر قانونی و بدون مجوز این دارو در درمان های تجویزی دامپزشکان ایران دارد. متأسفانه دامپزشکان در بسیاری از شاخه‌های دامپزشکی از جمله درمان دام بزرگ، درمان طیور و حتی پرورش نه تنها از این آنتی بیوتیک به عنوان یک درمان قطعی و مؤثر نهایی بهره می‌برند بلکه گاهی اوقات به عنوان اولین دارو در درمان محسوب می‌گردد. بنابراین بدیهی است که در مدت زمانی کوتاه این چنین مقاومت آنتی بیوتیکی به وجود آید.

این تحقیق توصیه به کاربرد PCR به عنوان یک روش سریع، دقیق و مطمئن در تشخیص آلودگی‌های شیر و محصولات لبنی می‌کند و نتایج نشان می‌دهد که استفاده از آزمون PCR جهت تشخیص ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و عوامل حدت باکتری ها یک روش ایمن، سریع و دقیق در آزمایشگاه می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه افرادی که در طول انجام این تحقیق به ما یاری رسانده‌اند به ویژه جناب آقای دکتر حسن ممتاز و پرسنل محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

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

۲. مرتضوی علی، قدس روحانی محسن، جوینده حسین. (۱۳۸۸)، تکنولوژی شیر و فرآورده های لبنی. چاپ هفتم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص۱۳.

۳. میثمی، اسماعیل (۱۳۷۶)، باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی. مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی، ص ۲۱۵-۲۰۱.

4. Collee J.G., Duguid J.P., Fraser A.G., Marmion B.P. 1990. Machie and Mac Cartney. Practical Medical Microbology. Churchill Livingstone. P. 456-481

5. Osek, J. 2003. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-

Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol Rev. 18:29-51.

13. Doyle MP, Schoeni JL. 1987. Isolation of *Escherichia coli O157:H7* from retail fresh meats and poultry. Appl Environ Microbiol. 53:2394-6.
14. Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS, Wilson RA, Tarr PI. 1994.Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl Environ Microbiol. 60:1038-40.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Mainatis T.2003. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY,U.S.A
16. Zhao S, White DG, Beilei Ge. 2001. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. Appl Environ Microbiol. 67(4): 1558–64.
17. Blondeau, J.M., Borsos S, Blondeau LD, Blondeau BJ, Hesje CE., 2012. Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of Mannheimia haemolytica.
18.. Vet Microbiol. http://dx.doi.org/10.1016/j .vetmic.2012.05.006

toxin producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J Appl Microbiol. 95: 1217-1225.

6. Karmali MA. 1989 .Infection by Verocytotoxin-producing- *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2:15-38.
7. Ostroff SM, Griffin PM, Tauxe RV, Shipman LD, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA, Kobayashi JM. 1990 .A statewide outbreak of *Escherichia coli O157:H7* infections in Washington State. Am J Epidemiol. 132:239-47.
8. Tarr PI. 1995. *Escherichia coli O157:H7* clinical diagnostic and epidemiological aspects of human infection. Clin Infect Dis. 20:1-8.
9. Louie M, de Azavedo JCS, Handelsman MYC. 1993.Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli serotype O157:H7*. Infect Immun. 61:4085-92.
10. Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., López, C., Justel, P. 2007. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiol. 1: 1-9.
11. Center for Disease Control (CDC). Multistate outbreak of *E. coli O157* infection Michigan and Ohio. Available from: http://www.cdc.gov/
12. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. 1996. Emerging foodborne pathogens:

19.C. Jenkins, M. C. Pearce, A. W. Smith, Knight HI, Shaw DJ, Cheasty T, Foster G, Gunn GJ, Dougan G, Smith HR, Frankel G.., 2003. "Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques," Lett Appl Microbiol. vol. 37, no. 3: pp. 207–212,

20.B. Oporto, J. I. Esteban, G. Aduriz, R. A. Juste, and A.Hurtado, 2008. "*Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain," Zoonoses and Public Health. vol. 55, no. 2: pp. 73–81,

21.Kumar SH, Otta SK, Karunasagar I. 2001. Detection of shigs –toxingenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. J Microbiol. 33: 334-8.

22.Khan AS, Yamasaki TS. 2002. Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non- O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef and human cases in

23.Calcutta, India. Emerg Infect Dis. 8:54-62.

24.Adwan GM and Adwan KM. 2004. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. Int J Food Microbiol. 97:81-4.

25.Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Adak, G. K., Cheasty, T., Willshaw, G. 2005. Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli O157* in England and Wales 1992-2002: where are the risks? Epidemiol Infect. 133: 803-808.

26.. Martin, C., Rousset, E., De Greve, H.1997. Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F17-related adhesin. Res Microbiol. 148: 55-64.

27.Boel J, Aabo S, Mariager B. 1997. Prevalence of *Escherichia coli O157* in meat in Denmark. Abstr V129/II in VTEC97 3rd International Symposium and Workshop on shiga toxin (vero toxin)- producing *Escherichia coli* infection, Baltimore, MD, USA.

28.Fantelli K, Stephan R. 2001. Prevalence and characterization of shiga-toxin producing *Escherichia coli* and *listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland.

29.Int J Food Microbiol. 70:63-9.

30.Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. 2001. Isolation and characterization of *Escherchia coli O157:H7* from retail meats in Argentin. J Food Prot. 64: 1346-51.

31.Schroeder, C. M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D., Meng, J. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. Appl Environ Microbiol. 68: 576-581.

32. Johnston, D. W., Bruce, J., Hill, J. 1983. Incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in milk produced in the west of Scotland. J Appl Bacteriol. 54: 77-83.

33. Rahimi, E., Shekarchian Chaleshtori, S., Parsaei, P. 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli O157* isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran. Afr J Microbiol. Res, 5: 3706-3710.

34. International Dairy Federation (IDF), 1995. Milk and Milk Products – Guidance on Methods of Sampling. IDF Standard 50C. Brussels, Belgium.

35. Erickson, M. C., Doyle, M. P. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Food Prot. 70: 2426-2449.

36. 33- Karns, J. S., Van Kessel, J. S., McClusky, B. J., Perdue, M. L. 2007. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. J Dairy Sci. 90: 3212-3219.

37. 34- Moon, H. W., Hoffman, L. J., Cornick, N. A., Booher, S. L., Bosworth, B. T. 1999. Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. J Vet Diagn Invest. 11: 557-560.

38. 35 - Osés, S. M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Jaime, I., Rovira, J. 2010. Prevalence and quantification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* along the lamb food chain by quantitative PCR. Int J Food Microbiol. 141: S163-169.

Isolation of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and antibiotic resistance pattern determination in the salad samples collected from Chaharmahal va Bakhtiari and Isfahan Provinces

Hamidreza, B[1*], Rabiei-Faradonbeh, M[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

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

Accepted: 27 July 2015 Received: 24 June 2015

Abstract

Salad is one of the most popular components of the diets. *E. coli* Shiga toxin producing STEC is considered as one of the most important food pathogens. This study aimed to investigate the prevalence of salad contamination with this pathogen in Isfahan city and Chaharmahal va Bakhtiari Province STEC, determine the pattern of antibiotic-resistant and tracking virulence genes in bacteria were isolated. In this study, eighty samples of salad were randomly collected from Chaharmahal va Bakhtiari Province and Isfahan city from fast food restaurants and shopping malls. Following isolation of *E. coli* in the culture, PCR test to determine the virulence factors, Shiga toxin-producing bacteria was performed using specific primers. Then antibiotic resistance patterns were determined by standard methods and disk diffusion. The results showed that 80 salads, 11 samples (13/75 percent) are infected with *E. coli*. All strains of *E. coli* are resistant to at least one antibiotic. The highest and the lowest resistance were observed in tetracycline (58.82 percent) and nitrofurantoin (3.92%), respectively. The lowest prevalence and *Stx1* had the highest frequency in the virulence genes. However STEC strains are not highly virulent in Iran, the findings of this study showed the possibility of contamination of the salads offered at fast food centers and restaurants. Therefore, preventive measures to avoid salad contamination with these bacteria are necessary.

Keywords: Shiga-toxin producing *Escherichia coli*, antibiotic resistance patterns, salads