مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۴۸/هفته چهارم شهریور ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱۲

بررسی ژن‌های ویرولانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های انتروهموراژیک اشریشیا کلی در نمونه‌های همبرگر دست ساز با روش Multiplex PCR در شهرستان شیراز

دکتر محمد کارگر[۱]، پیمان دیانتی[۲]، مریم همایون[۳]

خلاصه

مقدمه: اشریشیا کلی O157:H7 یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده‌ی بیماری‌های منتقل شونده به وسیله‌ی مواد غذایی در انسان است که بیماری‌هایی مانند کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک را ایجاد می‌کند. به دلیل انتقال این باکتری از طریق مواد غذایی به ویژه همبرگر به آن باکتری همبرگر می‌گویند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مارکرهای بیماری‌زای سویه‌های اشریشیاکلی O157:H7 از نمونه‌های همبرگر در شهرستان شیراز بود.

روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی و توصیفی بر روی۳۲۰ نمونه‌ی همبرگر جمع‌آوری شده از چهار منطقه‌ی شیراز انجام شد. نمونه‌ها پس از غنی سازی در محیط TSB واجد نوبیوسین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از محیط CT-SMAC و VRBA به منظور بررسی تخمیر سوربیتول و لاکتوز و از محیط کروموآگار برای بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی باکتری‌های جدا شده استفاده شد. با استفاده از آنتی سرم اختصاصی، وجود باکتری اشریشیاکلی O157 تأیید گردید. در نهایت وجود ژن‌های بیماری‌زا با استفاده از Multiplex PCR و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۲۵۹ باکتری سوربیتول منفی (۸۰/۹۳ درصد) جداسازی گردید که از این تعداد ۲۲۷ باکتری (۸۷/۶۴ درصد) توانایی تخمیر لاکتوز را داشتند. سپس به کمک روش‌های بیوشیمیایی ۱۹۲ نمونه (۸۴/۵۸ درصد) به عنوان اشریشیا کلی شناسایی شدند. همچنین میزان جداسازی اشریشیا کلی MUG منفی (۵۰ درصد) و اشریشیا کلی O157 (۳/۴۳ درصد) بود. با ارزیابی مارکرهای بیماری‌زایی، در ۳ نمونه ژن‌های stx_1 و eae، در یک نمونه ژن‌های stx_1، eae وstx_2 و در یک نمونه تنها ژن hly شناسایی شد. تمامی سویه‌های جدا شده به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند.

نتیجه‌گیری: به دلیل شدت بیماری‌زایی این باکتری و انتقال آن توسط مواد غذایی خام به ویژه همبرگر، انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر مواد غذایی گوشتی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: انتروهموراژیک اشریشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، Multiplex PCR، همبرگر.

مقدمه

زیستگاه طبیعی اشریشیا کلی (Esherchia coli یا E.coli) روده‌ی انسان و حیوانات می‌باشد. با وجود بی‌خطر بودن این باکتری بعضی از سویه های آن توکسین هایی تولید می‌کنند که باعث ایجاد اسهال می‌شود (۱). یکی از ویژگی های اشریشیای کلی تولید کننده‌ی شیگا توکسین (STEC یا Shiga Toxigenic Escherichia coli) تولید سم شیگا توکسین است. در بین بیش از ۱۰۰ گونه‌ی شناخته شده‌ی این باکتری سویه ی O157:H7 به دلیل ایجاد کولیت هموراژیک در گروه اشریشیای کلی انتروهموراژیک (EHEC یا Enterohemorrhagic Escherichia coli)

[۱] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.
[۲] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.
[۳] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد کارگر
Email: mkargar@jia.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

قرار می‌گیرد (۳-۲). این باکتری در سال ۱۹۸۲ از مدفوع دو بیمار که بر اثر خوردن همبرگر آلوده، به کولیت هموراژیک مبتلا شده بودند جداسازی گردید (۴). بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری شامل اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک (Hemorrhagic colitis یا HC)، ترومبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورا (Thrombotic thrombocytopenic purpura یا TTP)، سندرم اورمی همولیتیک (HUS یا Hemolytic uremic syndrome) و در موارد شدید مرگ می‌باشد (۵). حیوانات اهلی به ویژه گاوسانان اصلی‌ترین مخزن این باکتری هستند. اما سایر حیوانات اهلی مانند گوسفند، خوک، بز، سگ، گربه و پرندگان نیز ممکن است با این سویه آلوده شوند (۶، ۲). انتقال عفونت از طریق آلودگی مواد غذایی به ویژه محصولات گوشتی رخ می دهد. اغلب پخت ناکافی محصولات گوشتی به ویژه همبرگر منشأ اصلی انتقال این باکتری به انسان می‌باشد. آلودگی گوشت می‌تواند طی کشتار آلوده رخ دهد و در زمان چرخ کردن گوشت، باکتری به طور کامل در سراسر آن پراکنده شود. گوشت های آلوده رنگ، ظاهر، بو و مزه‌ای طبیعی دارند (۸-۷). در میان دیگر منابع عفونت می‌توان به گوشت خشک شده‌ی گاو یا خوک، کاهو، آب میوه و شیر غیر پاستوریزه اشاره نمود (۲-۱). علاوه بر آن، انتقال فرد به فرد و همچنین انتقال از طریق مصرف آب آلوده یا شنا کردن در این آب‌ها نیز ممکن است سبب بروز عفونت با این باکتری شوند (۷، ۲). اگرچه تعداد ارگانیسم لازم برای ایجاد بیماری در انسان مشخص نیست، اما به دلیل دوز عفونی بسیار پایین این باکتری (صد تا چند صد باکتری) امکان انتقال آن به آسانی وجود دارد. پخت کامل گوشت و فراورده های گوشتی به ویژه همبرگر می تواند مانع انتقال این باکتری از طریق غذا به انسان شود (۸-۷). یکی از شاخص های مهم بیماری‌زایی این باکتری وروتوکسین است که به دلیل اثر سیتو توکسیک آن بر روی رده‌ی سلولی ورو (Vero cell) به این نام معروف است. این توکسین می تواند آنتی‌بادی ضد توکسین شیگا را خنثی کند (۹). به دلیل شباهت ساختمانی وروتوکسین این باکتری با شیگا توکسین، آن را مشابه با شیگا توکسین (SLT یا Shiga like toxin) می‌نامند. E.coli O157:H7 دو نوع شیگا توکسین SLT_1 (stx_1) و SLT_2 (stx_2) تولید می‌کند. برخی از سویه‌ها یکی از این دو نوع توکسین و برخی دیگر هر دو نوع توکسین را تولید می‌کنند (۱۰، ۳). از دیگر عوامل بیماری‌زایی باکتری انتروهمولیزین hly است که به وسیله‌ی مجموعه‌ی ژنی hlyABCD کد می‌شود. این همولیزین که توسط Beutin و همکاران کشف شده است، به وسیله‌ی بسیاری از سویه‌های STEC تولید می‌شود و نقش اصلی آن دخالت در فرایندهای التهابی و یا شاید تشدید اثرات بیماری‌زایی STX و LPS می‌باشد. stx_2 نسبت به stx_1 ارتباط بیشتری با سویه های EHEC ایجاد کننده‌ی HUS دارد. به دلیل وجود گیرنده‌های توکسین بر روی سلول‌های کلیه، انتشار شیگاتوکسین به کلیه می‌تواند عامل نقص حاد کلیوی و هموراژی کلیه باشد (۳). تخمین زده شده است که حدود ۰/۶ تا ۲/۴ درصد از موارد اسهال و ۱۵ تا ۳۶ درصد از موارد اسهال خونی مربوط به سویه‌ی E.coli O157:H7 می‌باشند. با پژوهش های انجام شده در آمریکا نشان داده شده است که ۵۰ درصد مبتلایان به HUS نیاز به دیالیز پیدا می کنند. هر چند طی دو دهه‌ی اخیر میزان مرگ و میر مبتلایان به HUS از ۵۰ درصد به ۱۰ درصد کاهش

Archive of SID
www.SID.ir

یافته است با این حال تعداد قابل توجهی از بازماندگان (حدود ۳۰ درصد) از ناتوانی دایمی شامل نارسایی مزمن کلیوی، فشار خون بالا و ناراحتی های عصبی رنج می برند (۱۱). به دلیل زندگی این ارگانیسم در روده‌ی دام های سالم، توجه به پیشگیری در هنگام فرایند تهیه‌ی گوشت ضروری است. همچنین با توجه به شیوع گسترده‌ی این باکتری در حیوانات مزرعه و آلودگی محصولات گوشتی، استفاده از تکنیک های تشخیصی سریع و حساس مانند روش‌های سرولوژیکی و مولکولی می‌تواند به تشخیص عفونت E.coli O157:H7 کمک نماید. با وجود این که ژن‌های hly، eae، stx_1 و stx_2 مهم‌ترین ژن‌های بیماری‌زای شناخته شده‌ی سویه‌های EHEC هستند، اما ارزیابی جداگانه این ژن‌ها با تکنیک PCR (polymerase chain reaction) بسیار پر هزینه و زمان‌بر است. لذا با استفاده از روش Multiplex PCR و به کارگیری پرایمرهای مختلف به طور همزمان می‌توان این ژن‌ها را تشخیص داد. در ایران مطالعات اپیدمیولوژیکی انجام شده بر روی باکتری E.coli O157:H7 در نمونه‌های مواد غذایی بر خلاف نمونه‌های مدفوع حیوانی بسیار محدود است. پژوهشگرانی مانند جمشیدی و باغبانی مطالعاتی را بر روی این باکتری با روش PCR در نمونه های گوشت انجام داده‌اند، اما تاکنون بررسی همزمان ژن‌های بیماری‌زای آن در منطقه‌ی مورد پژوهش بر روی نمونه های همبرگر انجام نشده است. با توجه به این که همبرگر یکی از مهم‌ترین منابع انتقال آلودگی با این باکتری است و این ماده‌ی غذایی در سطح شهر بزرگی مانند شیراز مصرف بالایی دارد، شناسایی میزان آلودگی در آن ضرورت دارد. هدف از این پژوهش، پایش سویه‌های E.coli O157:H7 جدا شده از نمونه‌های همبرگر شهرستان شیراز و تعیین ژن‌های بیماری‌زای hly، eae، stx_1 و stx_2 به منظور پیشنهاد یک پروتکل مدون به اداره‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی بود.

روش‌ها

این پژوهش به صورت مقطعی و توصیفی پس از محاسبه‌ی حجم قابل قبول نمونه بر روی ۳۲۰ نمونه همبرگر دست ساز تهیه شده از فست فودهای (رستوران های زنجیره‌ای) ۴ منطقه‌ی جغرافیایی غرب، شرق، شمال و جنوب شیراز در سال ۱۳۸۷انجام شد. اطلاعات مربوط به محل جغرافیایی، زمان نمونه‌گیری و دمای نگهداری در پرسش‌نامه‌ی تنظیمی ثبت گردید. نمونه‌ها با رعایت زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم منتقل شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به سرعت مورد آزمایش قرار گرفتند.

غنی‌سازی: به منظور غنی‌سازی، ۲۵ گرم نمونه از پنج نقطه ی همبرگر (بالا، پایین، چپ، راست و مرکز) جداسازی و پس از کشت در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) تهیه شده از شرکت دیفکو حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نووبیوسین تهیه شده از شرکت سیگما کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری گردید (۱۰).

جداسازی باکتری: تمام نمونه های غنی شده بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC) تهیه شده از شرکت مرک حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر سفیکسیم (Oxoid) و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تلوریت پتاسیم (Oxoid) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت

Archive of SID
www.SID.ir

گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، کلنی های سوربیتول منفی خالص‌سازی گردید. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری‌های جداسازی شده، محیط‌های ویولت رد بایل آگار (VRBA) و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) تهیه شده از شرکت مرک مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی، باکتری های تأئید شده به عنوان E.coli بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 تهیه شده از شرکت های مدیا کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری گردید (۱۰، ۵).

تعیین سروتایپ: به منظور تأیید نهایی کلنی های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی، از تست آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم اختصاصی O157 (بهار افشان) استفاده شد (۱۱).

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده، با روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Diffusion disk) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده از شرکت مرک با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) ساخت شرکت پادتن طب، انجام گردید (۱۲).

ارزیابی ژن های بیماری‌زا: استخراج DNA با استفاده از کیت DNP™ (شرکت سیناژن) انجام گردید. برای ردیابی همزمان ژن‌های بیماری‌زا، از روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط Santaniello در سال ۲۰۰۷ استفاده شد (۱۳). حجم نهایی واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و حاوی ۱۰ میکرومول Tris-HCL، ۳ میکرومول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول dNTPs، ۱۰ میکرومول KCl، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۴ میکرولیتر DNA انجام شد. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne) با شرایط حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۹۰ ثانیه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه (گسترش نهایی) انجام گردید. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز توسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت از سویه‌ی 933J اشریشیا کلی O157:H7 و به عنوان کنترل منفی از سویه‌ی E.coli K12 استفاده شد (۱۴).

آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون χ^2 و آزمون دقیق فیشر انجام شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

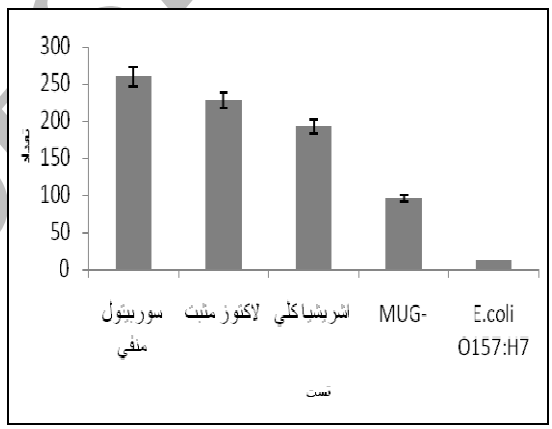
یافته‌ها

در این پژوهش تعداد ۳۲۰ نمونه‌ی همبرگر از مناطق مختلف جغرافیایی شیراز مورد مطالعه قرار گرفت. از مجموع نمونه های مورد بررسی از ۲۵۹ نمونه (۸۰/۹۳ درصد)، در محیط CT-SMAC کلنی‌های سوربیتول منفی جداسازی گردید. از این تعداد ۶۲ نمونه (۲۳/۹۳

Archive of SID
www.SID.ir

درصد) مربوط به ناحیه‌ی شمال، ۷۰ نمونه (۲۷/۰۳ درصد) مربوط به ناحیه‌ی جنوب، ۷۱ نمونه (۲۷/۴۱ درصد) مربوط به ناحیه‌ی شرق و ۵۵ نمونه (۲۱/۶۲ درصد) مربوط به ناحیه‌ی جنوب بود. با استفاده از آزمون χ^2 مشخص شد بین نمونه های سوربیتول منفی و ناحیه‌ی نمونه برداری رابطه‌ی معنی‌داری وجود نداشت (P = ۰/۵۰۷).

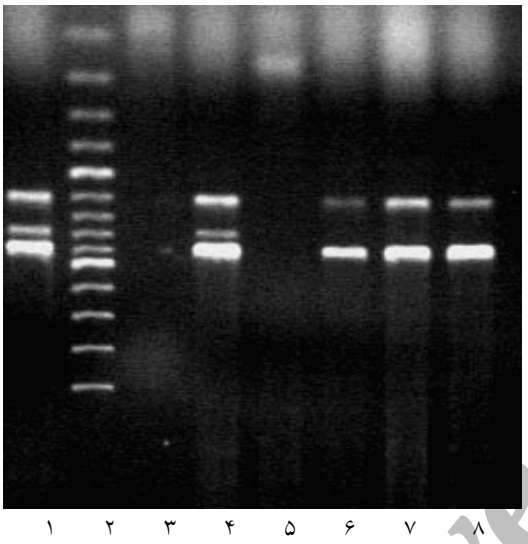
پس از کشت بر روی محیط‌های اختصاصی، از ۲۲۷ نمونه‌ی لاکتوز مثبت، ۱۹۲ نمونه (۸۴/۵۸ درصد) E.coli جداسازی شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. توزیع فراوانی و نسبت باکتری‌های مشکوک به E.coli O157:H7 بر اساس تست‌های بیوشیمیایی

از تعداد ۹۶ نمونه E.coli بتاگلوکورونیداز MUG منفی با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی باکتری، ۱۱ باکتری E.coli O157:H7 (۱۱/۴۶ درصد) جداسازی شد. از این تعداد ۱ نمونه (۹/۰۹ درصد) مربوط به ناحیه‌ی شمال، ۲ نمونه (۱۸/۱۸ درصد) مربوط به ناحیه‌ی جنوب، ۷ نمونه (۶۳/۶۳ درصد) مربوط به ناحیه‌ی شرق و ۱ نمونه (۹/۹۰ درصد) مربوط به ناحیه‌ی جنوب شهر شیراز بود. بین جداسازی E.coli O157:H7 و ناحیه‌ی نمونه برداری رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت (P =۰/۰۲۹).

پس از ارزیابی مولکولی مارکرهای بیماری‌زایی مشخص شد که ۳ نمونه دارای ژن های stx_1 و eae، ۱ نمونه دارای سه ژن stx_1، eae و stx_2 و یک نمونه دارای ژن hly بودند (شکل ۱).

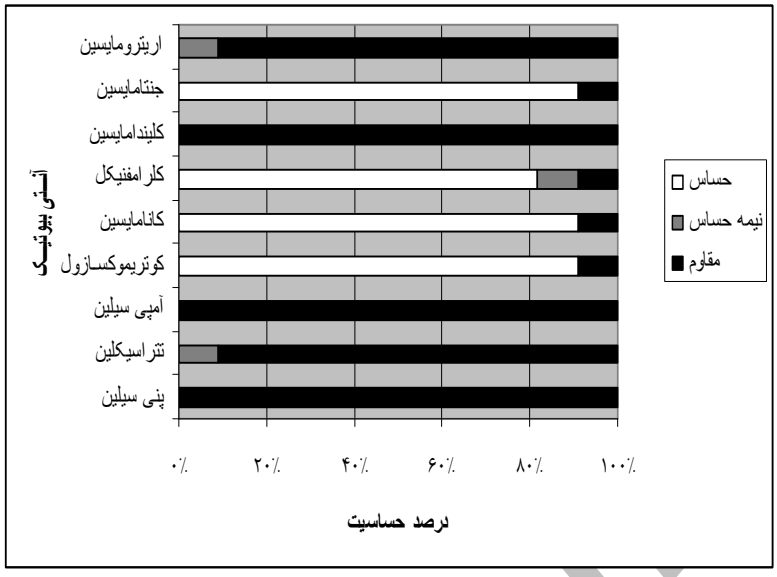


شکل ۱. نمایش ژن‌های بیماری‌زای تعیین شده با روش Multiplex PCR توسط پرایمرهای اختصاصی بر روی ژل آگاروز. کنترل مثبت دارای ژن‌های stx_1 (614 bp)، stx_2 (779 bp)، eaeA(890 bp) (۱)، مارکر 100 bp (۲)، کنترل منفی (۳)، نمونه‌ی مثبت دارای ژن‌های stx_1، stx_2 و eaeA (۴)، نمونه‌ی منفی (۵) و نمونه‌های مثبت دارای ژن‌های stx_1 و eaeA (۶، ۷ و ۸).

نتایج حاصل از بررسی حساسیت ۱۱ سویه E.coli O157:H7 در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، نشان دهنده‌ی مقاومت تمامی باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، کلیندامایسین و آمپی‌سیلین بود (نمودار ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲. الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های E.coli O157:H7 جداسازی شده از نمونه‌های همبرگر در شیراز

بحث

E.coli O157:H7 یک پاتوژن انسانی موسوم به گاوسانان است و بنابراین توانایی آلوده کردن گوشت قرمز را دارد. حدود ۳۰ درصد گاوسانان ناقلین بدون علامت این باکتری هستند. غذاهایی با منشأ گاوی به ویژه گوشت چرخ کرده و همبرگر عامل اصلی موارد تک گیر و همه گیری های این پاتوژن هستند؛ به طوری که حدود ۷۵ درصد همه گیری‌ها به علت مصرف این نوع محصولات می‌باشد (۱۵، ۸). اطلاعات به دست آمده در کشورهای مختلف نشان دهنده‌ی این است که باکتری E.coli O157:H7 یک مشکل جهانی می‌باشد و میزان شیوع آن در گوشت بین ۰/۱ تا ۷۶ درصد گزارش شده است (۱۰).

Nart و همکاران در پژوهش سال ۲۰۰۸ نشان دادند که E.coli O157:H7 یک باکتری کامنسال در میزبان گاوی نیست و تخریب مخاطی ایجاد شده که به دلیل استقرار این سویه در انتهای رکتوم روی می‌دهد منجر به القای پاسخ ایمنی ذاتی و تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی مخاطی می‌شود (۱۶).

Brashears و همکاران در سال ۱۹۹۵، در آمریکا نشان دادند که ۶۳ درصد از نمونه‌های گرفته شده از آخور گاوها به باکتری E.coli O157:H7 آلودگی دارند. محققین یاد شده در سال ۲۰۰۲ نیز نشان دادند که از میان ۹۱ مرکز نگهداری گاوهای شیری ۲۴/۲ درصد و از ۹۷ محل فرآوری محصولات لبنی در ۱۹ ایالت مختلف میزان آلودگی با E.coli O157:H7، ۳۰/۹ درصد می‌باشد (۱۷). همچنین نشان داده شد که با وجود دفع مقادیر کم باکتری از گاوهای شیری میزان شیوع در اغلب مناطق مورد بررسی، به ویژه در فصول گرم‌تر و گاوهای جوان تازه از شیر گرفته شده قابل توجه می‌باشد (۱۰).

در ترکیه در سال ۲۰۰۶، باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از ۷۷ نمونه (۱۳/۶ درصد) گاوهای کشتارگاه‌ها جداسازی گردید. از این تعداد ۶۶ سویه مربوط به سروتیپ O157:H7 و ۱۱ مورد دیگر مربوط به سویه‌های غیر متحرک (O157:NM) بود (۱۸).

Archive of SID
www.SID.ir

جمشیدی و همکاران در ایران با جمع‌آوری تصادفی یک صد نمونه گوشت چرخ کرده در ماه‌های خرداد و تیر سال ۱۳۸۴ از فروشگاه های عرضه ی گوشت در سطح شهرستان مشهد و ارزیابی با روش PCR، یک نمونه را به عنوان سروتیپ O157:H7 شناسایی کردند (۱۹).

Alam و Zurek در سال ۲۰۰۴ در آمریکا، به منظور بررسی بهتر اکولوژی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 میزان شیوع و ارتباط آن را با مگس های خانگی مورد مطالعه قرار دادند. تعداد ۳۴۴۰ مگس خانگی از ۲ مزرعه گاوداری طی مدت ۴ ماه جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها از نظر آلودگی با این باکتری بررسی شدند. میزان شیوع باکتری در مگس های جمع‌آوری شده از آخور و محل های نگهداری غذای دام به ترتیب ۲/۹ درصد و ۱/۴ درصد تخمین زده شد. همچنین میزان آلودگی در مگس‌های آلوده بین $۱۰^{۵} \times ۳$ تا $۱۰^{۵} \times ۱/۵$ CFU گزارش گردید. با روش PCR ژن‌های $stx_{1,2}$، eae و fliC در باکتری اشریشیا کلی O157:H7 جداسازی شد و نتایج مثبت به ترتیب ۹۰/۴ درصد، ۹۲/۲ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش گردید. جمعیت بسیار زیاد مگس ها در مزارع پرورش گاو به عنوان یک عامل مهم انتشار اشریشیا کلی O157:H7 در بین حیوانات و محیط زندگی آن‌ها محسوب می‌شود (۲۰).

Blanco و همکاران در اسپانیا در سال ۲۰۰۳ از روش Multiplex PCR به منظور بررسی ژن‌های stx_1 و stx_2 و از PCR برای ردیابی جداگانه ژن های eaeA و hlyA استفاده کردند. از مجموع ۳۸۴ سویه STEC شناسایی شده، در ۵۵ درصد ژن stx_1، در ۳ درصد ژن stx_2، در ۴۲ درصد ژن های stx_1 و stx_2، در ۶ درصد ژن eae و در ۲۸ درصد ژن hlyA مشاهده گردید. فراوانی بالای ژن stx_1 در این مطالعه قابل توجه است (۲۱).

در بررسی Byrne و همکاران در سال ۲۰۰۳ در امریکا، از ۵۷ سویه E.coli O157:H7 جداسازی شده، ۳۸ سویه ژن‌های stx_1 ، stx_2، eaeA و hly، ۱۱ سویه ژن های stx_1، eaeA و hly، ۵ سویه ژن های stx_2، eaeA و hly و ۳ سویه هم ژن‌های stx_1، stx_2 و eaeA را داشتند (۷).

در فرانسه اولین شیوع گسترده ای که شناسایی شد ۶۹ مورد در ارتباط با O157:H7 در گوشت چرخ کرده بود که در سال ۲۰۰۵ اتفاق افتاد و مشخصه‌ی اصلی STEC مرتبط با بیماری تولید شیگاتوکسین‌های stx_1، stx_2 و واریته‌های stx_2 بود. شاید بعضی از واریته‌های در ارتباط با سویه‌های STEC جدا شده از میزبان‌های اختصاصی مانند گوسفند (stx_{2d}) و خوک (stx_{2e})، بیماری‌زایی کمتری برای انسان دارند. بر اساس شیوع و ارتباط سویه‌های STEC با سندرم اورمی‌همولیتیک، Pradel و همکاران، آن‌ها را به ۵ سروپاتوتیپ (A تا E) طبقه‌بندی کردند (۲۲).

در پژوهش دیگری در پاکستان در سال ۲۰۰۵، از میان ۲۰۰ کودک مورد بررسی با Multiplex PCR، در مجموع ۲۲ نفر (۱۱ درصد) دارای یک یا هر دو ژن شیگا توکسین بودند؛ به طوری که فراوانی بیماران دارای ژن‌های stx_1 و stx_2 با هم (۵۷/۱ درصد) گزارش گردید. ژن های eae و hly نیز به ترتیب با فراوانی ۴۲/۸ درصد و ۲۱/۴ درصد گزارش گردید (۱۱).

کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۴ در جهرم از روش PCR برای ردیابی شیگاتوکسین استفاده کردند که از ۱۷ نمونه مثبت با آنتی سرم تنها در یک سویه ژن شیگا توکسین stx_2 را مشاهده نمودند (۲۳).

Uhlich و همکاران در امریکا دو همه گیری به

Archive of SID
www.SID.ir

علت مصرف اسفناج و کاهوی آلوده با باکتری E.coli O157:H7 را گزارش نمودند. سویه‌های جداسازی شده در این همه گیری ها ارتباط ژنتیکی نزدیکی با هم داشته و پس از انجام PCR، تمام سویه‌ها دارای ژن های hly، eae، wyz و یکی از ژن های stx_1، stx_2 و یا هر دوی آن‌ها بودند (۲۴).

ما در این پژوهش، با استفاده از روش Multiplex PCR در نمونه‌های تأیید شده با آنتی‌سرم اختصاصی، ژن‌های stx_1، stx_2 eaeA و hly را در سویه‌های جداسازی شده تشخیص دادیم. در باکتری های جدا شده سه سویه دارای ژن های stx_1 و eaeA و یک سویه دارای ژن های stx_1، stx_2 و eaeA و یک سویه نیز دارای ژن hly بود که با نتایج Byrne و همکاران (۷) مطابقت داشت. این نتایج نشان دهنده‌ی تنوع ژنتیکی سویه های جداسازی شده از نمونه های همبرگر در کشور ما بود. همچنین در پژوهش‌های قبلی ما بر روی نمونه های کلینیکی (۱۱) و نمونه های غذایی (۲۶–۲۵، ۲۳، ۱۰) در سطح استان فارس ژن hly مشاهده نشده بود، اما در این پژوهش هر ۴ مارکر بیماری‌زایی باکتری جداسازی گردید.

باغبانی و همکاران در مطالعه‌ای توصیفی بر روی نمونه‌های گوشت خام از قصابی‌های مناطق مختلف تهران طی سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ از بین ۲۵۰ نمونه، ۱۸ نمونه باکتری E.coli O157:H7 را با روش PCR شناسایی کردند. در تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمام سویه‌ها به جنتامایسین، نوروفلوکساسین، انروفلوکساسین، ایمی‌پنم، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکسازین و سفتازیدیم حساس بودند (۲۷).

در این پژوهش تمامی سویه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، کلیندامایسین و آمپی‌سیلین مقاومت و به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، کانامایسین و کلرامفنیکل حساسیت داشتند. حساسیت سویه‌های جدا شده نسبت به جنتامایسین با نتایج باغبانی و حساسیت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و کلرامفنیکل با پژوهش قبلی ما در مرودشت (۲۸) مطابقت داشت.

با توجه به بقای بیش از ۵۰ روز این باکتری در مخازن آب شهری، رودخانه و نیز در بدن ناقلین بدون علامت (گوساله)، خطر انتقال آن از گوساله‌های ناقل به حیوانات سالم وجود دارد. در نتیجه می‌تواند باعث آلودگی مواد غذایی دامی نظیر محصولات گوشتی و لبنیات نیز شود (۱۰). بنابراین روش‌هایی که بر کاهش جمعیت باکتری E.coli O157:H7 در غذاهای حیوانی قبل از ورود به زنجیره‌ی غذایی انسان تأکید دارند، نقش مهمی را در کاهش بیماری‌های انسانی ایفا می‌کنند (۸).

به نظر می‌رسد که با افزایش میزان گوشت گوساله در نمونه‌های همبرگر در ایران، میزان آلودگی به E.coli O157:H7 نیز بیشتر شود. با توجه به افزایش روزافزون موارد E.coli O157:H7 جدا شده، انجام کنترل‌های دقیق بهداشتی به ویژه در مناطق دارای سابقه‌ی شیوع ضروری است. همچنین از آن جایی که امکان ایجاد عفونت اپیزوتیک در میان گوساله‌ها (حیوانات مخزن اصلی باکتری) وجود دارد، کنترل فرایند تهیه، تولید و بسته‌بندی محصولات گوشتی، بایستی با حوصله و دقت بیشتری انجام شود. از طرفی، تدوین برنامه‌های پایش و ارایه‌ی پروتکل‌های مشترک به وسیله‌ی اداره‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی، سازمان دامپزشکی و بهداشت کشور، می‌تواند نقش مؤثری در کنترل و پیش‌گیری از شیوع این باکتری داشته باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به شماره‌ی ۱۹۳۳۰۵۰۷۸۶۲۰۰۱ بود. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت های مالی و اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 142-201.
2. Islam MA, Mondol AS, de BE, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, et al. Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from slaughtered animals in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 2008; 74(17): 5414-21.
3. Price SB, Cheng CM, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, et al. Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of Escherichia coli O157:H7. Appl Environ Microbiol 2000; 66(2): 632-7.
4. Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJ. Concentration and prevalence of Escherichia coli O157 in cattle feces at slaughter. Appl Environ Microbiol 2003; 69(5): 2444-7.
5. Vimont A, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Lazizzera C, Bavai C, Delignette-Muller ML. Modeling and predicting the simultaneous growth of Escherichia coli O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. Appl Environ Microbiol 2006; 72(1): 261-8.
6. Best A, La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ. Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chicks by shiga toxin-negative Escherichia coli O157:H7. Infect Immun 2005; 73(3): 1836-46.
7. Byrne CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ, et al. Characterization of Escherichia coli O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States. Appl Environ Microbiol 2003; 69(8): 4683-8.
8. Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC, Nisbet DJ. Forage feeding to reduce preharvest Escherichia coli populations in cattle, a review. J Dairy Sci 2003; 86(3): 852-60.
9. Su C, Brandt LJ. Escherichia coli O157:H7 infection in humans. Ann Intern Med 1995; 123(9): 698-714.
10. Kargar M, Heidary S, Abbasian F, Shekarforoosh Sh. Survey of different enrichment methods, prevalence and antibiotic resistance of E. coli O157:H7 in raw milk of Jahrom cow. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2006; 11(34): 7-11.
11. Kargar M, Homayoon M, Yaghoobi R, Manookians A. Prevalence of virulence genes stx_1, stx_2, hly and eaeA with Multiplex PCR from E. coli O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in Marvdasht. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2009; 14(44): 7-12.
12. Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, et al. Characterization of Escherichia coli O157 : H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 1): 71-5.
13. Santaniello A, Gargiulo A, Borrelli L, Dipineto L, Cuomo A, Sensale M, et al. Survey of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 in urban pigeons (Columba livia) in the city of Napoli, Italy. Ital J Anim Sci 2007; 6(3): 313-6.
14. Kim JY, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, et al. Isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. J Vet Sci 2005; 6(1): 7-19.
15. Vogt RL, Dippold L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. Public Health Rep 2005; 120(2): 174-8.
16. Nart P, Naylor SW, Huntley JF, McKendrick IJ, Gally DL, Low JC. Responses of cattle to gastrointestinal colonization by Escherichia coli O157:H7. Infect Immun 2008; 76(11): 5366-72.
17. Brashears MM, Galyean ML, Loneragan GH, Mann JE, Killinger-Mann K. Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given Lactobacillus direct-fed microbials. J.Food Prot 2003; 66(5): 748-54.
18. Aslantas O, Erdogan S, Cantekin Z, Gulacti I, Evrendilek GA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from Turkish cattle. Int J Food Microbiol 2006; 106(3): 338-42.
19. Jamshidi A, Bassami MR, Rasooli M. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain

Archive of SID
www.SID.ir

reaction in Mashhad, northeastern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 2008; 9(1): 72-6.
20. Alam MJ, Zurek L. Association of Escherichia coli O157:H7 with houseflies on a cattle farm. Appl Environ Microbiol 2004; 70(12): 7578-80.
21. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1351-6.
22. Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V. Molecular analysis of shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. Appl Environ Microbiol 2008; 74(7): 2118-28.
23. Kargar M, Heidary S, Kafilzade F, Sadeghipour S. Isolation & Characterization of Verotoxin Producing *E.coli* O157:H7 Strains in Row Milk of Jahrom Cows. Journal of Food Technology & Nutrition 2009; 2: 62-9.
24. Uhlich GA, Sinclair JR, Warren NG, Chmielecki WA, Fratamico P. Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates associated with two multistate food-borne outbreaks that occurred in 2006. Appl Environ Microbiol 2008; 74(4): 1268-72.
25. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Prevalence of Shiga Toxins, Intimin and Hemolysin Genes of Escherichia *coli* O157:H7 Strains from Industrial Ground Meat in Shiraz. Journal of Shaeed Sdoughi University of Medical Sciences Yazd 2011; 18(6): 512-20.
26. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin producing E. coli O157:H7 strains from meat purchase in Shiraz. Iranian South Medical Journal 2011; 14(2): 76-83.
27. Baghbani Arani F, Salmanzadeh Ahrabi S, Jafari F, Habibi E, Zali MR. Isolation of Shigatoxin-Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Samples by PCR in Tehran and Evaluation of Antibacterial Patterns of Isolated Strains. Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2007; 12(2): 107-14.
28. Kargar M, Homayoon M. Outbreaks of Infection Sources and Antibiotic Resistance in EHEC Strains among Children Under 5 Years Old in Marvdasht. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity Tehran Medical Branc 2010; 19(4): 268-73.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

Vol 29, No 148, 4th week, September 2011 Received: 7.5.2011 Accepted: 3.7.2011

Evolution of Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enterohemorrhagic Escherichia coli Isolated from Hamburger by Multiplex PCR in Shiraz

Mohammad Kargar PhD[1], Peyman Dianati MSc[2], Maryam Homayoon MSc[3]

Abstract

Background: Escherichia coli O157:H7 have emerged as pathogens that can cause food-borne infections and severe illnesses in humans, such as hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS). Since this bacterium is transferred by the foodstuff, especially hamburger it is called "hamburger bacteria". The aim of this study was isolation and identification of E.coli O157:H7 from hamburger samples in Shiraz, Isfahan.

Methods: In this cross- sectional study, 320 samples of Hamburger were collected and enriched in TSB with novobiocin medium in 37ºC temperature. Fermentation of sorbitol and lactose and activities of β-glucoronidase of separated bacteria were examined by using the SMAC and VRBA media and choromoagar medium. Then the existence of E.coli O157:H7 was confirmed with the specific antiserum. At the end existence of virulence genes and antibiotic resistance strains were tested with multiplex PCR and disk diffusion methods.

Findings: Out of all examined samples, 259 (80.93%) sorbitol negative bacteria were separated. From which 227 (87.64%) had ability of lactose fermentation. Then by using biochemical tests, 192 samples (84.58%) were identified as E.coli. Also the rate of recognition of MUG negative and E.coli O157:H7 were 50.00% and 3.43% respectively. By evaluation of virulence markers, eae and stx_1 genes were identified in 3 samples and eae, stx_1 and stx_2 identified in 1 sample. Also in 1 sample only hly gene was detected. All isolated strains were resistant to most antibiotics.

Conclusion: Since this bacterium is an high risk pathogene and hamburger was a common source in recent outbreak, monitoring of all kinds of meat products is recommended.

Keywords: Enterohemorrhagic Escherichia coli, Antibiotic Resistance, Multiplex PCR, Hamburger.

Archive of SID

[1] Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3] Department of Microbiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
Corresponding Author: Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir

www.SID.ir