

جدا سازی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی ژن های حدت / شریشیا کلای مولد شیگا توکسین (STEC) در نمونه های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

حمیدرضا بهرامی^{۱*}، محمد ربیعی فرادنبه^۲

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 پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳

چکیده

سالاد یکی از محبوب ترین اجزای تشکیل دهنده رژیم های غذایی می باشد. / شریشیا کلای تولید کننده ی شیگا توکسین، به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری زای غذاها مطرح می باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی آلودگی نمونه های سالاد در استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان با سویه های STEC، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی ژن های حدت باکتری های جدا شده انجام شد. در این مطالعه توصیفی، هشتاد نمونه سالاد از شهرستان های استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان، از رستوران ها و مراکز فروش فست فود به طور تصادفی جمع آوری و متعاقب جدا سازی / شریشیا کلای در روش کشت، آزمایش PCR به منظور تعیین عوامل حدت، باکتری های مولد شیگا توکسین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. سپس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با روش استاندارد انتشار دیسک تعیین گردید. نتایج نشان داد که از ۸۰ نمونه سالاد، ۱۱ عدد (۱۳/۷۵٪) آلوده به / شریشیا کلای هستند. تمام سویه های جدا شده / شریشیا کلای حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم هستند که در این میان مقاومت به تتراسیکلین (۵۸/۸۲ درصد) بیشترین و مقاومت به نیتروفورانئوئین (۳،۹۲ درصد) کمترین فراوانی را دارا می باشد. و ژن *stx1* (۵۴/۵۴ درصد) بیشترین فراوانی را در ژن های حدت به خود اختصاص داد. اگرچه در ایران ظاهراً شیوع عفونت با سوش های STEC بالا نیست، یافته های این مطالعه نشان می دهد که امکان آلوده بودن سالادهای ارائه شده در مراکز عرضه فست فود و رستوران ها با سویه های گوناگون STEC وجود دارد، لذا اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از آلودگی سالاد با این باکتری ضروری بنظر می رسد.

واژگان کلیدی: / شریشیا کلای مولد شیگا توکسین، الگوی مقاومت آنتی بیوتیک، سالاد.

از فلور نرمال روده چند ساعت بعد از تولد، در سیستم گوارش انسان و حیوانات پستاندار کلنی تشکیل می شود و با این عمل نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارش ایفا می نماید. لازم به ذکر می باشد که برخی از سویه های / شریشیا کلای با بدست آوردن عوامل ویروالانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها، باکتریوفاژها و

مقدمه

/ شریشیا کلای باکتری میله ای 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 پلی مورفیک می باشد (Collee et al., 1990). این پاتوژن به عنوان قسمتی

مدفوع حیوانات به ویژه شیر، فرآورده‌های لبنی، سبزیجات تازه و گوشت همراه بوده است. آلودگی با /اشیریشیا کلای *O157:H7* تقریباً در تمامی دنیا گزارش شده است (Mora et al., 2007). میزان همه‌گیری‌های تأیید شده آلودگی با /اشیریشیا 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 چندین ماده غذایی از جمله گوشت قرمز و گوشت ماهی گزارش شده است (Doyle et al., 1987; Samadpour et al., 1994).

در کشورهای پیشرفته، تحقیق و بررسی‌های زیادی در مورد وضعیت این باکتری انجام گرفته‌است درحالی‌که در کشورهای در حال توسعه، اطلاعات در مورد آن‌ها بسیار محدود می‌باشد. 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 با هدف تعیین فراوانی آلودگی در نمونه‌های سالاد جمع-آوری شده در استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان با باکتری /اشیریشیا کلای مولد شیگا توکسین و تعیین ژنوتیپ آن‌ها انجام شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه توصیفی، ۸۰ نمونه سالاد در طی ماه-های مرداد تا دی سال ۱۳۹۳ از شهرستان‌های استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان، از رستوران‌ها و مراکز فروش فست فود به طور تصادفی جمع‌آوری و به منظور آزمایشات میکروشناسی در شرایط استریل در کنار یخ به

لوکوس‌های پاتوژنیسیته به صورت سویه‌های بیماری زا در می‌آیند. سروتیپ‌های مختلف /اشیریشیا کلای عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه و مکان‌های با فقر بهداشتی می‌باشد (Osek, 2003).

/اشیریشیا کلای یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیماری‌زای موجود در غذاها می‌باشد و تاکنون 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 بر مبنای 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 ارگانسیم معمولاً با مصرف آب و غذای آلوده با

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 سویه های /شیریشیاکلای جدا شده از نمونه های مورد مطالعه از روش انتشار دیسکی ساده کربی بایر طبق دستورالعمل CLSI (2006) استفاده شد (Zhao et al., 2001). در این مرحله سویه های میکروبی جدا شده در محیط جامد هینتون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور انواع دیسک های آنتی بیوتیکی شامل پنی سیلین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، سولفامتوکسازول، جنتامایسین، انروفلوکساسین، لینکومایسین، سیپروفلوکساسین، تری متوپریم، نیتروفورانتوئین و آمپی-سیلین کشت داده شد و با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد حساسیت یا مقاومت باکتری به هر آنتی بیوتیک تعیین گردید. در این مرحله از سویه استاندارد /شیریشیاکلای 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 در نظر گرفته شد.

آزمایشگاه تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. آزمایشات مورد نظر در همان روز ورود نمونه به آزمایشگاه انجام گرفت. غنی سازی نمونه ها بر روی محیط پپتون واتر و جداسازی بر روی محیط مک کانکی اگر انجام گرفت. برای ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری-های جداسازی شده از محیط ائوزین متیلن بلو آگار استفاده شد. به منظور تأیید باکتری های جدا شده در محیط ائوزین متیلن بلو آگار^۱ آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی نظیر تست IMViC، اوره و TSI انجام و باکتری های /شیریشیا کلای جدا شده جهت تعیین سروتیپ های مورد مطالعه در محیط مایع BHI کشت شد. به منظور انجام آزمایش PCR و تعیین سروتیپ های مورد مطالعه از باکتری های جدا شده و ردیابی ژن های 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 ژن های *eae*, *stx1*, *stx2* آزمایش شد.

جهت انجام آزمایش PCR، از دستگاه Master cycler gradient Corbett Austeria Co با حجم ۵۰ میکرو لیتر واحد 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 هر نمونه 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

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

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

نتایج

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 فارس (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.

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 اشیریشیا 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 سویه‌های STEC در نمونه‌های

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

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

جدول ۳- توزیع فراوانی انواع ژن‌های حدت در سویه‌های /شریشیا کلاهی جدا شده از نمونه‌های سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و شهر اصفهان

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

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:

O157:H7 در یک مهد کودک واقع در اونتاریو کانادا در سال ۱۹۸۵ گزارش شد (میثمی، الف، (۱۳۷۶). باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی، (Gillespie et al., 1992; Martin et al., 1997). در این 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 بنابراین این نقطه ضعف اصلی PCR عدم توانایی تمایز بین سلول‌های 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/اشیریشیا 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 /اشیریشیا کلای O157:H7 گزارش شده است (Chinen et al., 2001). هم‌چنین 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

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. بنابراین 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 می‌باشد که رتبه اول آنها به روش PCR تعلق دارد، به گونه ای که شناسایی سویه‌های STEC در مواد غذایی از راه تکثیر ژن‌های بیماری‌زا با روش PCR در چندین مطالعه گزارش شده است (Kumar et al., 2001; Khan et al., 2002 and Adwan et al., 2004).

/اشیریشیا کلای عموماً به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می‌شود. به این علت نقش مهمی را در میکروبی‌شناسی غذا و آب به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی به عهده دارد، ارتباط بین /اشیریشیا 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)، میکروبی‌شناسی 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 سروتیبی از این باکتری به نام

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 فرآوری شده گوشت به *شریشیا کلای* *O157: H7* آلوده بودند و دو مورد از نمونه‌ها به 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 *شریشیا 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 شیگاتوکسیسن (*Stx1* و *Stx2*) در شیر مخازن ذخیره گاو-داری‌ها مثبت بودند و آزمون *real-time PCR* گرفته نشان داد که ۵ نمونه به *O157:H7* آلوده هستند. در حالی که در مطالعه ما از ۱۱ نمونه مثبت از نظر *شریشیا کلای*، ۲۷/۲۷٪ دارای ژن *eae* و ۴۵/۴۵٪ هر دو ژن شبه شیگاتوکسیسن را دارند (Karns et al., 2007).

میزان حضور ژن‌های شبه شیگاتوکسیسن در مطالعه‌ی ما (۷۲/۷۲٪) بود که بسیار بالاتر از مطالعه‌ای است که در Iowa 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 *eae* و *Stx1* و *Stx2* بالاترین میزان شیوع را به ترتیب در کشتارگاه با ۶۹٪، صنایع بسته بندی با ۳۲٪ و در قصابی‌ها با 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 *شریشیا کلای*‌های جداسازی شده را دارد.

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٪ *شریشیا کلای*‌های جدا شده از سالاد نسبت به تتراسایکلین مقاوم هستند و همان‌طور که در تحقیق دیگری نشان داده شده بود تعداد متناهی از *شریشیا کلای*‌های 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 *شریشیا کلای*‌های جدا شده از انسان، گاو، خوک و غذاهای مختلف طی سال‌های ۱۹۸۵ تا ۲۰۰۰ نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک آزمایش شده مقاوم بودند و ۲۷٪ از آن‌ها نسبت به تتراسایکلین، ۲۶٪ نسبت به سولفامتوکسازول، ۱۷٪ نسبت به سفالوتین و ۱۳٪ نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم هستند (Schroeder et al., 2002).

مطالعه ما مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *شریشیا کلای*‌های جدا شده از سالاد بیشتر از دیگر مطالعات می‌باشد. مطالعه‌ای در اسکاتلند نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی *شریشیا کلای* در ۱۰/۶٪ نمونه‌های شیرخام وجود دارد و نشان داد که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *شریشیا کلای* جدا شده از شیر گاوهای نگهداری شده در بهار بندها بیشتر از گاوهای چرا آزاد می‌باشد. مطالعه‌ی دیگری در اسکاتلند توسط Johnston et al. (۱۹۸۳) نشان داد (Johnston et al., 1983) که از مجموع ۱۲۵ *شریشیا کلای* جدا شده ۲۲/۲٪ نسبت به آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده و از بین *شریشیا کلای*‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک، ۴۲/۴٪ به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند. در مطالعه‌ای که توسط Rahimi et al. (۲۰۱۱) و همکاران در سال ۲۰۱۱ (Rahimi et al., 2011) انجام شده است نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی *شریشیا کلای*‌هایی که از پنیر سنتی، بستنی و ماست جدا شده بیش از همه نسبت به آمپی‌سیلین و

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 ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی و عوامل حدت باکتری‌ها یک روش ایمن، سریع و دقیق در آزمایشگاه می‌باشد.

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)، میکروبیولوژی پزشکی برای دانشجویان گروه پزشکی، پیراپزشکی و رشته‌های تخصصی. چاپ اول، انتشارات نور دانش، ص ۸۵ تا ۱۰۰.
۲. مرتضوی علی، قدس روحانی محسن، جوینده حسین. (۱۳۸۸)، تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی. چاپ هفتم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۱۳.
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 Microbiology. Churchill Livingstone. P. 456-481
5. Osek, J. 2003. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-

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

متأسفانه 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 بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها شاهد حضور این گروه از باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک در سالادهای آماده مصرف هستیم که رعایت موازین بهداشتی و عدم استفاده از فاضلاب جهت آبیاری مزارع می‌تواند 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 اش‌ریشیاکلائی نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل در این تحقیق نشان از استفاده غیر قانونی و بدون مجوز این دارو در درمان‌های 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

- 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*. *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:

- 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 *Escherichia coli O157:H7* from retail meats in Argentina. *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.
- 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 -toxigenic *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

- 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.
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.

Archive

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, M²

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