Original Paper

Evaluation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* of outbreaks of foodborne disease by molecular method

***Mohammad Mehdi Soltan Dallal (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Professor, Food Microbiology Research Center/ Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. **E-mail: msoltandallal@gmail.com** ORCiD 0000-0002-4900-9458

Omolbanin Biglari, M.Sc Student of Food Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCiD 0000-0001-5753-938X

Zahra Rajabi, Ph.D Candidate in Microbiology, Department of Microbiology, University of Alzahra / Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCiD 0000-0003-4970-3068

Mohammad Kazem Sharifi Yazdi (Ph.D), Professor of Zoonosis Research Centre, Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCiD 0000-0001-9060-5908

Abbas Rahimi Foroushani (Ph.D), Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of PublicHealth, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCiD 0000-0003-2443-7218

Shabnam Haghighat Khajavi (Ph.D), Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran,Iran. ORCiD 0000-0001-5146-5121

Abstract

Background and Objective: The most common enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain is the O157: H7 serotype, which is one of the most important intestinal pathogens and can cause complications such as hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome and acute renal failure. The aim of this study was to evaluate the enterohemorrhagic *Escherichia coli* causing molecular outbreaks of foodborne illness in Iran.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 189 fecal swab specimens were examined during April to September 2018. All suspected isolates were tested for biochemical tests. The isolates were confirmed by molecular PCR and evaluated by antimicrobial susceptibility tests.

Results: From 189 stool swab samples studied, 98 *Escherichia coli* isolates were detected based on phenotypic tests. Most of the outbreaks occurred in summer and the prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* was 24.5%, which 4% of them were non-O157H7. Most patients were between 1 and 12 years of age and the highest antibiotic resistance to cotrimoxazole and chloramphenicol was observed at 80% and 79%, respectively.

Conclusion: This study showed an increase in enterohemorrhagic *Escherichia coli* with 24.5% and an increase in antibiotic resistance to the antibiotics of chloramphenicol, cotrimoxazole and carbapenems. Increased resistance to imipenem and meropenem antibiotics makes it difficult to treat beta-lactamase-resistant strains.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Disease Outbreaks, Foodborne Disease

Received 22 Jan 2020 **Revised** 1 Sep 2020 **Accepted** 2 Sep 2020

Cite this article as: Soltan Dallal MM, Biglari O, Rajabi Z, Sharifi Yazdi MK, Rahimi Foroushani A, Haghighat Khajavi Sh. [Evaluation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* of outbreaks of foodborne disease by molecular method]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Spring; 23(1): 108-115. [Article in Persian]

تحقیقی

ارزیابی مولکولی *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک عامل طغیان‌های ناشی از بیماری‌های منتقله از غذا

* **دکتر محمدمهدی سلطان دلال**، استاد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ORCiD 0000-0002-4900-9458

ام البنین بیگلری، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ORCiD 0000-0001-5753-938X

زهرا رجبی، دانشجوی دکتری میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه الزهراء، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ORCiD 0000-0003-4970-3068

دکتر محمد کاظم شریفی یزدی، استاد، مرکز تحقیقات زئونوز، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ORCiD 0000-0001-9060-5908

دکتر عباس رحیمی فروشانی، استاد، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ORCiD 0000-0003-2443-7218

دکتر شبنم حقیقت خواجوی، استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ORCiD 0000-0001-5146-5121

چکیده

زمینه و هدف: *شایع‌ترین سویه اشریشیاکلی انتروهموراژیک، سروتیپ O157:H7 است که از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای محسوب شده و عوارضی مانند کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک و نارسایی حاد کلیوی را ایجاد می‌کنند. این مطالعه به منظور ارزیابی اشریشیاکلی انتروهموراژیک ایجاد کننده طغیان‌های ناشی از بیماری‌های منتقله از غذا به روش مولکولی انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۱۸۹ نمونه اسهال از ۵۰ طغیان ارسال شده از مراکز بهداشتی درمانی برخی شهرستان‌های ایران طی فروردین لغایت شهریور ۱۳۹۷ انجام شد. همه جدایه‌های مشکوک از نظر تست‌های بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند. هویت جدایه‌ها به روش مولکولی PCR تایید گردید و با آزمون‌های حساسیت ضدمیکروبی ارزیابی شدند.*

یافته‌ها: *از ۱۸۹ نمونه سوآپ مدفوع مورد مطالعه، ۹۸ جدایه اشریشیاکلی بر اساس تست‌های فنوتیپی جداسازی گردید. بیشترین میزان طغیان در فصل تابستان رخ داده بود و میزان فراوانی پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک ۲۴ جدایه (۲۴/۵ درصد) بود که ۴ درصد آن non O157H7 تعیین شد. بیشترین مبتلایان بین سنین ۱ تا ۱۲ ساله بودند و بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و کلرامفنیکل به ترتیب با فراوانی ۸۰ درصد و ۷۹ درصد مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه بر اساس مقایسه با مطالعات قبلی افزایش اشریشیاکلی انتروهموراژیک و همچنین افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده کلرامفنیکل و کوتریموکسازول و کارباپنم‌ها مشاهده شد. افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم درمان سویه‌های مقاوم به بتالاکتامازها را با مشکل مواجه می‌کند.*

کلید واژه‌ها: *اشریشیاکلی انتروهموراژیک ، طغیان غذایی ، بیماری های منتقله از غذا*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدمهدی سلطان دلال ، پست الکترونیکی msoltandallal@gmail.com

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی / بخش میکروب شناسی غذایی

تلفن و نمابر ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۶/۱۱، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۶/۱۲

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه عموماً به عنوان نرمال فلور روده انسان و حیوانات محسوب می‌شوند؛ اما برخی گونه‌های جنس‌های این خانواده می‌توانند سبب ایجاد بیماری‌های گوارشی خفیف تا اسهال‌های شبه وبا گردند. برخی نیز از این فراتر رفته و عوارضی شبیه سندروم همولیتیک اورمیک (HUS)، پورپوراترومبوتیک- ترومبوسایتوپنیا در انسان می‌گردند (۱و۲). به صورت پایه درعفونت‌های روده‌ای ۶ پاتوتایپ از *اشریشیاکلی*ها شامل انترواگرگیتیو (EAEC)، انتروپاتوژنیک (EPEC)، انتروتوکسیژنیک (ETEC)، انتروهموراژیک (EHEC)، انتروانویسیو (EIEC) و دیفیوزلی ادهرنت *اشریشیاکلی* (DAEC) نقش دارند (۳).

اشریشیاکلی انتروهموراژیک در دهه اخیر به عنوان عامل اسهال شدید خونی و همچنین کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمیک هموراژیک (HUS) به ویژه در میان کودکان شناخته شده است. اهمیت غربالگری EHEC در بین کودکان و بالغین با علایم وخیم کاملاً مشخص است (۴). مشخصه گونه‌های تحت عنوان EHEC عبارت است از تولید سایتوتوکسینی که تحت عنوان سم شیگا یا وروتوکسین نام گذاری شده است. این توکسین که تحت عنوانVTX یا STX شناخته می‌شود؛ قادر است سنتز پروتئین در سلول هدف را مختل نماید. علت نام گذاری این سم به نام Vero به خاطر تاثیر این سم بر روی رده سلول‌های Vero است و در مورد نام شیگاتوکسین به این خاطر است که این سم، شبیه سمی است که

شیگلا دیسانتری تولید می‌کند. EHEC یک زیر مجموعه از VTEC است که به عنوان یک پاتوژن انسانی در نظر گرفته می‌شود. واژه EHEC برای توصیف سویه‌های Stx مثبت (ژن تولیدکننده توکسین شیگا) به کار می‌رود که دارای لوکوس تخریب انتروسیتی (LEE) است. از خصوصیات اصلی EHEC تولید وروتوکسین VT1 و VT2 است (۵و۶). EHEC زیر مجموعه VTEC و EPEC است و مانند VTEC می‌تواند VT تولید کند و قادر است آسیب‌های مقابله‌ای و اتصالی روی سلول‌های اپیتلیال به وجودآورد که یکی از ویژگی‌های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک است. *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک مانند *اشریشیاکلی* O157:H7 می‌تواند از طریق مصرف آب و مواد غذایی آلوده و از فردی به فرد دیگر از طریق مدفوعی - دهانی منتقل شود. انتقال باکتری از حیوان به انسان از راه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و همچنین مصرف موادغذایی آلوده مانند شیر، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت چرخ شده، ساندویچ‌های گوشتی، سبزیجات و آبمیوه‌ها امکان‌پذیر است (۷-۵). از فاکتورهای بیماری‌زایی مهم که در پاتوتایپ O157 وجود دارد؛ لوکوس LEE و نیز پلاسمید بزرگ O157 است. hlyA ژن تولیدکننده همولیزین، flicH7 ژن کدکننده آنتی‌ژن فلاژنی H7 در سویه O157H7، eaeA ژن کد کننده پروتئین اینتیمین است (۸). امروزه به علت افزایش مراکز تهیه و توزیع مواد غذایی در خارج از منزل نظیر رستوران‌ها، اغذیه فروشی‌ها و مراکزی که به طور عمده در عرضه مواد غذایی آماده دخالت دارند و استفاده هر چه بیشتر غذاهایی نظیر فست فودها که نیاز به طبخ طولانی مدت و حرارت بالا ندارند؛ باعث زیاد شدن آمار مبتلایان به این قبیل بیماری‌ها شده است. همچنین دلایل دیگری نظیر تحول در فناوری مواد غذایی، تغییر در سبک زندگی، خرید مواد غذایی در حجم زیاد و استفاده طولانی مدت از مواد غذایی نگهداری شده در یخچال و عدم اطلاعات کافی در زمینه بهداشت مواد غذایی تا نحوه نگهداری و طبخ آنها سبب بروز روزافزون طغیان‌های ناشی از مواد غذایی شده است که این قبیل مشکلات به عنوان یک چالش جهانی مطرح بوده و کشورها در تلاشند تا با بررسی‌های آگاهانه در جهت شناخت عوامل و کنترل و پیشگیری آنها بر آیند و با جلوگیری از وقوع این طغیان ها باعث صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی شده و سلامت جامعه را با رعایت بهداشت مواد غذایی تامین کنند (۱۱-۹). بهمن‌آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۴ فراوانی *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک از نمونه‌های اسهال کشوری ناشی از طغیان‌های غذایی در کودکان زیر ۵ سال را با روش مولکولی PCR بررسی کردند. از ۴۵ نمونه طغیان کشوری، ۲۸ جدایه *اشریشیاکلی* شناسایی شدند که از بین آنها یک جدایه (۶/۳ درصد) به عنوان *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک شناسایی شد (۱۲). Hall و همکاران در بررسی بیماری‌های منتقله از غذا، گاستروانتریت را به عنوان شایع‌ترین علایم مسمومیت‌ها و یا عفونت‌های غذایی معرفی کرده و اسهال و استفراغ را به عنوان اولین نشانه‌های بیماری بیان می‌کنند که می‌تواند از یک بیماری خفیف تا بیماری‌های جدی که منجر به مرگ شوند؛ بروز کنند. همچنین با تغییراتی که در نحوه زندگی و روش‌های تولید و توزیع مواد غذایی به وجود آمده، باعث شیوع گسترده‌تر بیماری‌های منتقله از غذا شده و پیشگیری و کنترل بیماری‌های ناشی از مواد غذایی همچنان به عنوان یک چالش باقی مانده است (۱۳). طبق ارزیابی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC)، به طور تقریبی سالانه ۷۶ میلیون مورد بیماری‌های منتقله از غذا، در آمریکا گزارش می‌شود که منجر به بستری شدن ۳۲۵۰۰۰ نفر در بیمارستان و مرگ حدود ۵۰۰۰ نفر می‌گردد (۱۴). طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی بیماری‌های منتقله از غذا یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است که به‌طور متوسط سالانه یک سوم از جمعیت این کشورها به بیماری‌های منتقله از راه آب و مواد غذایی مبتلا شده که از این جمعیت تقریباً ۱/۸ میلیون نفر توسط این قبیل بیماری‌ها جان خود را از دست می‌دهند که اکثریت قربانیان کودکان گزارش شده‌اند (۱۵). تخمین بازتاب بین‌المللی بیماری‌های منتقل شونده از طریق غذا مشکل است. با این وجود در حدود ۲/۱ میلیون بچه در کشورهای در حال توسعه در نتیجه بیماری‌های مرتبط با اسهال سالانه جان خود را از دست می دهند که غذا یا آب ناقل بسیاری از این بیماری‌ها هستند (۱۶). سازمان بهداشت جهانی طغیان غذایی (Outbreak) را این‌گونه تعریف می‌کند که اگر دو نفر یا بیشتر از یک منبع غذایی یا آشامیدنی مشترک استفاده کرده و علایم بیماری مشترکی داشته باشند؛ اصطلاحاً می‌گویند یک طغیان غذایی رخ داده است (۱۷). لذا با توجه به اهمیت مطالب گفته شده از آنجایی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ایران در زمینه بررسی *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک در طغیان‌های غذایی صورت نگرفته است؛ این مطالعه به منظور ارزیابی *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک در طغیان‌های غذایی با استفاده از روش مولکولی PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی درآنها انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۱۸۹ نمونه اسهال از ۵۰ طغیان ارسال شده از مراکز بهداشتی درمانی برخی شهرستان‌های ایران به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران طی فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۷ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش (IR.TUMS.VCR.REC.1397.937) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران قرار گرفت.

جداسازی و شناسایی باکتری: در ابتدا نمونه سوآپ مدفوع یا رکتال بر روی محیط مک کانکی سوربیتول آگار و ائوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام شد. روز بعد پرگنه‌های بیرنگ یا صورتی رنگ از روی محیط مک کانکی سوربیتول آگار برداشته شد و با استفاده از محیط‌های افتراقی و تست‌های بیوشیمیایی از جمله سیمون سیترات، اوره، لیزین، MR VP، SIM، TSI سویه‌های *اشریشیاکلی* شناسایی شدند. جدایه با ویژگی‌های بیوشیمیایی گلوکز و لاکتوز مثبت، حرکت مثبت، واکنش لیزین مثبت، سیترات منفی، هیدرولیز اوره منفی، اندول مثبت، متیل رد مثبت، VP منفی و SH2 منفی به عنوان یک جدایه متعلق به جنس اشریشیا قلمداد گردید. همچنین برای بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی، باکتری‌های تأیید شده به عنوان *اشریشیاکلی* بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند (۱۸). به منظور تأیید نهایی کلنی‌های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی، شناسایی اشریشیاکلی O157: H7 با استفاده از آنتی‌سرم‌های Oو H با مارک Mast ساخت کشور انگلستان و به روش آگلوتیناسیون اسلایدی انجام گردید.

ذخیره سازی و نگهداری جدایه ها: برای استفاده از جدایه‌های جمع‌آوری شده در مراحل بعدی، جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت ذخیره داده شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تایید هویت جدایه ها به روش مولکولی: ابتدا DNA با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد. به این ترتیب که یک کلونی از کشت شبانه باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس برای ۵ دقیقه در RPM ۶۰۰۰-۷۰۰۰ سانتریفوژ شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی حاوی DNA به آرامی به تیوپ استریل دیگر منتقل شد. DNA استخراج شده داخل میکروتیوپ ۰/۵ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریزر نگهداری شد (۱۹و۲۰).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl شامل: ۵۰ mM، ۲µl Mgcl2، ۲/۵µl بافر ۱۰x، ۱۰ mM، ۱µl dNTP، ۱/۵µl پرایمر ۵۰ Pmol/µl از هر کدام (۵U/µl)، ۱µl DNA Tag Polymerase، ۲µl DNA الگو ۵۰ Pmol/µl و ۱۴/۵µl H2O بودند. پرایمرهای مورد استفاده شامل STX1، STX2، hlyA، fliH7، eaeA و O157 بودند. برنامه زمان‌بندی آزمون PCR در جداول ۱و۲ ذکر شده است. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد در حضور مارکر bp ۱۰۰ با ولتاژ ۸۰-۷۰ انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با DNA Green Viewer، عکسبرداری ژل توسط ژل داکیومنتیشن انجام شد. در این تحقیق از E.coli ATCC 7852 حاوی ژن eaeA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

ژن	پرایمر	سایز باند	رفرنس
Stx1	***ATGTCATTCGCTCTGCAATAGGTAC*** ***GAAGAAGAGACTGAAGATTCCATCTG***	۱۰۲۰	۲۲
Stx2	***GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT*** ***ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC***	٦۲٥	۲۲
hlyA	***AGCTGCAAGTGCGGGTCTG*** ***TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC***	٥٦۹	۲۳
fliH7	***TACCATCGCAAAAGCAACTCC*** ***GTCGGCAACGTTAGTGATACC***	۲٤۷	۲۰
O157	***TCGAGGTACCTGAATCTTTCCTTCT*** ***ACCAGTCTTGGTGCTGCTCTGACA***	۸۹۰	۲٤
eae	***ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG*** ***GCCTTCATCATTTCGCTTTC***	۲٤۸	۱۹

جدول ۲: برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن های مورد بررسی با واکنش PCR

برنامه	نوع عملیات	زمان	درجه حرارت	تعداد سیکل برنامه
۱	*بازشدن اولیه دو رشته*	*٤ دقیقه*	*۹٤ سانتی گراد*	
۲	*بازشدن دو رشته*	*۳۰ ثانیه*	*۹٤ سانتی گراد*	*۳۵ چرخه*
۳	*اتصال پرایمر*	*٤۰ ثانیه*	*٥٤ سانتی گراد*	*۳۵ چرخه*
٤	*طویل سازی*	*۳۰ ثانیه*	*۷۲ سانتی گراد*	*۳۵ چرخه*
٥	*طویل سازی نهایی*	*۱۰ دقیقه*	*۷۲ سانتی گراد*	

تست حساسیت ضد میکروبی: بعد از تعیین پاتوتایپ *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک با آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR برای انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸ (Clinical and Laboratory standards institute) استفاده گردید (۲۱). آزمایش انتشار دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۴۰ میکروگرم) و مروپنم (۴۰ میکروگرم) انجام گردید.

داده ها با بهره‌گیری از آمار توصیفی و آمار تحلیلی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و آزمون ANOVA و t-test برای بررسی رابطه‌ها در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از کل ۱۸۹ نمونه مورد مطالعه، ۹۸ جدایه (۵۱/۸درصد) *اشریشیاکلی* بر اساس تست‌های فنوتیپی جداسازی گردید.

نتایج آلودگی به *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک: از ۹۸ جدایه *اشریشیاکلی* بر اساس روش مولکولی ۲۴ (۲۴/۵درصد) *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک شناسایی شد. براساس نتایج، بیشترین میزان طغیان در فصل تابستان و در ماه‌های شهریور، مرداد و تیر به ترتیب با فراوانی ۱۰ جدایه (۱۰/۲درصد)، ۸ جدایه (۸/۲ درصد) و ۶ جدایه (۶/۱ درصد) رخ داده بود. با توجه به جدول ۳ و شکل یک بیشترین میزان فراوانی در بین ژن‌های hylA و eaeA با فراوانی ۲۴ جدایه (۲۴ درصد) دیده شد. کمترین میزان فراوانی در بین ژن‌های stx1 و O157 مشاهده گردید. در این مطالعه ۴ سویه فاقد ژن O157 ، ولی دارای ژن flicH7 بودند که Non O157-H7 نام گذاری شدند.

جدول ۳: فراوانی ژن ها در پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک

نام ژن ها	تعداد (درصد)
stx1	۱ (۱)
stx2	۱۰ (۱۰/۲)
hlyA	۲۴ (۲۴/۵)
O157	۰ (۰)
fliH7	٤ (٤/۱)
eaeA	۲۴ (۲۴/۵)

با توجه به جدول ۴ بیشترین گروه سنی مبتلایان به *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک بین ۱ تا ۱۲ ساله مشاهده شد.

نتایج تست حساسیت ضد میکروبی: با توجه به نتایج جدول ۵ بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و کلرامفنیکل به ترتیب با فراوانی ۸۰ درصد و ۷۹ درصد مشاهده گردید.

بین بیماری‌های منتقله از غذا و گروه‌های سنی مختلف ارتباط آماری معنی‌داری یافت شد (P<۰/۰۲۳).

جدول ٤: فراوانی پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک براساس سن

گروه‌های سنی (سال)	تعداد (درصد)
کمتر از ۱	۰ (۰)
۱ – ۷	۹ (۳۷/۵)
۷ – ۱۲	۸ (۳۳/۳۳)
۱۲ – ۱۸	۳ (۱۲/۵)
۱۸ – ۲۵	۲ (۸/۳۳)
۲۵ – ۳۵	۲ (۸/۳۳)
۳۵ – ٤۵	۰ (۰)
٤۵ – ۵۵	۰ (۰)
۵۵ – ٦۵	۰ (۰)
بیشتر از ٦۵	۰ (۰)
جمع	۲٤ (۱۰۰)

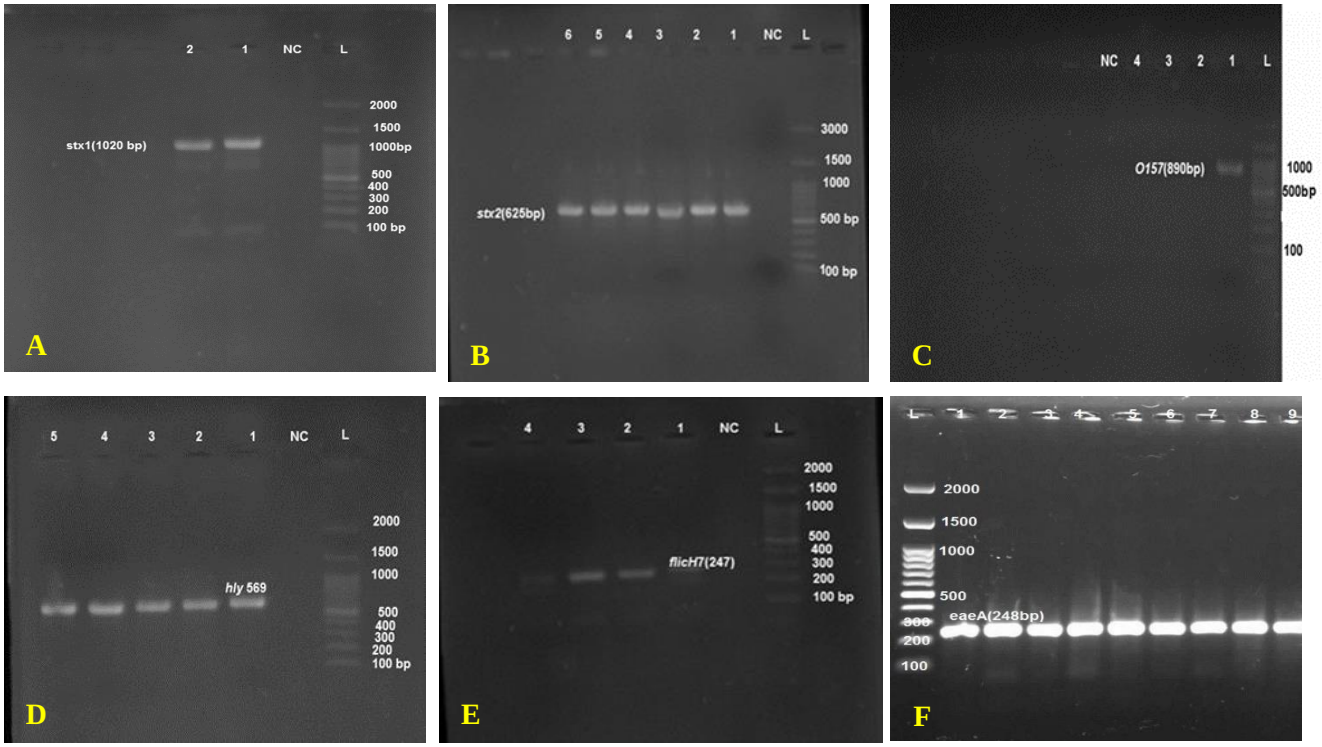
بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، ۹۸ جدایه *اشریشیاکلی* بر اساس تست‌های فنوتیپی جداسازی گردید که میزان فراوانی پاتوتایپ *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (EHEC) با روش مولکولی PCR، ۲۴ جدایه (۲۴/۵ درصد) و ۴ جدایه (۴/۱ درصد) آن non O157H7 بود.

علیزاده و همکاران در سال ۲۰۱۷ فراوانی سویه‌های EHEC را در بیماران مبتلا به تالاسمی و HIV با استفاده از روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار دادند. از ۶۸ بیمار مورد بررسی، ۳۰/۸ درصد بیماران دارای سویه EHEC تیپیک بودند. بیشترین ژن مشاهده شده در هر دو گروه stx1 با فراوانی ۲۹/۱ درصد بود. در حالی که ژن stx2 فقط در یک بیمار مبتلا به تالاسمی مشاهده گردید (۲۲) که نتایج بدست آمده از آن مطالعه با نتایج مطالعه ما مطابقت ندارد. علت این امر می‌تواند جمعیت بیماران مورد مطالعه باشد. در این مطالعه ژن stx1 در ۰/۹ درصد مشاهده گردید در صورتی که ژن stx2 در ۱۰/۲ درصد جدایه‌ها مشاهده گردید. میری و همکاران در سال ۲۰۱۷، ۱۷۰ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال را از لحاظ پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* از شهرهای مختلف ایران با روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه فراوانی پاتوتایپ‌های مختلف *اشریشیاکلی* به ترتیب EPEC، ETEC وEHEC با فراوانی ۱۱ درصد، ۶ درصد و ۴ درصد گزارش شد (۲۳). نتایج بدست آمده از آن مطالعه در مقایسه با مطالعه ما، نشان‌دهنده افزایش شیوع پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* در بیماری‌های ناشی از طغیان‌های آب و مواد غذایی نسبت به اسهال‌های

جدول ۵: تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک

نام آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	نیمه حساس تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
کلرامفنیکل	(۲۱)۵	(۰)۰	(۷۹)۱۹
سیپروفلوکساسین	(۹۱/۷)۲۲	(۰)۰	(۸/۳)۲
سفتریاکسون	(۶۲/۵)۱۵	(۱۶/۷)۴	(۲۱)۵
سفوتاکسیم	(۹۲)۲۲	(۸)۲	(۰)۰
سفتازیدیم	(۶۶/۷)۱۶	(۴/۱)۱	(۲۹/۲)۷
آموکسی سیلین	(۱۰۰)۲۴	(۰)۰	(۰)۰
کوتریموکسازول	(۷/۵)۲	(۱۲/۵)۳	(۸۰)۱۹
نالیدیکسیک اسید	(۸۷/۵)۲۱	(۴/۲)۱	(۸/۳)۲
لووفلوکساسین	(۸۷/۵)۲۱	(۰)۰	(۱۲/۵)۳
ایمی پنم	(۳۷/۵)۹	(۲۱)۵	(۴۲)۱۰
مروپنم	(۸)۲	(۲۱)۵	(۷۱)۱۷



شکل ۱ : فراوانی ژن‌ها در پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک

A: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف NC: کنترل منفی، ردیف ۱ کنترل مثبت دارای باند ۱۰۲۰ bp ژن stx1، ردیف ۲ جدایه اشریشیاکلی دارای باند ژن stx1، ردیف‌های ۳ و ٤ و٥ جدایه‌های اشریشیاکلی فاقد باند ژن stx1

B: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف NC: کنترل منفی، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف‌های ۲ تا ٦ جدایه‌های اشریشیاکلی دارای باند 625bp ژن stx2

C: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف NC: کنترل منفی، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف‌های ۲ تا ٤ جدایه‌های اشریشیاکلی دارای باند 890bp ژن O157

D: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف NC: کنترل منفی، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف‌های ۲ تا ٥ جدایه‌های اشریشیاکلی دارای باند 569bp ژن hly

E: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف‌های ۲ تا ٤ جدایه‌های اشریشیاکلی دارای باند 247bp ژن flicH7

F: ردیف L: مارکر DM2300، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف‌های ۲ تا ۹ جدایه‌های اشریشیاکلی دارای باند 248bp ژن eaeA

بیمارستانی است. در مطالعه نهایی و همکاران در تبریز در سال ۱۳۸۶ فراوانی *اشریشیاکلی* انتروهموازیک ۳/۳ درصد (۲۷) و در مطالعه اکبری و همکاران در تهران در سال ۱۳۸۸ این فراوانی ۳/۲ درصد (۲۵) گزارش شد که در مطالعه ما شاهد افزایش فراوانی پاتوتایپ *اشریشیاکلی* انتروهموازیک نسبت به مطالعات انجام شده در سال‌های قبل هستیم. در حالی که در مطالعه ما شیوع این پاتوتایپ در گروه سنی بین ۱ سال تا ۱۲ سال بالا بوده است. نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که بیماری‌های منتقله از غذا در تمام گروه‌های نژادی، سنی و جنسی رخ می‌دهد و از لحاظ فصلی در تمام فصول گرم سال اتفاق می‌افتد. همچنین راه انتقال در تمام موارد

گوارشی و دهانی گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بیجاری و همکاران در سال ۱۳۸۹ در استان خراسان جنوبی بر روی الگوی اپیدمیولوژیک ثبت شده از بیماری‌های منتقله از غذا انجام دادند؛ تعداد ۵ طغیان در آن استان گزارش شد که در طی آن ۱۱۴ نفر مبتلا شدند و از این تعداد ۵ نفر در بیمارستان بستری و مواردی از مرگ گزارش نگردید. بیشترین موارد طغیان در ماه‌های خرداد و شهریور و مرداد رخ داده بود که بیشترین گروه سنی درگیر افراد زیر ۵ سال به میزان ۲۸/۹ درصد بود و ۶۳ نفر (۵۵/۲ درصد) آنها مرد بودند. علایم بالینی شایع در بین مبتلایان شامل درد شکمی ۸۶ درصد، تهوع و استفراغ ۶۴/۹ درصد اعلام گردید و در ۲۷ نفر ۲۳/۹ درصد اسهال خونی مشاهده شد. پر مصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان افراد بیمار سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول گزارش گردید. در این مطالعه هم تشابهاتی از نظر علایم بالینی ایجاد کننده این قبیل بیماری‌ها دیده می‌شود (۲۶). در مطالعه شریفی یزدی از ۳۰۰ نمونه مدفوعی مورد مطالعه، ۳۹ نمونه توسط تست‌های بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیاکلی* شناسایی شدند و برای آنها سروتایپینگ انجام شد. شایع‌ترین سروتیپ در بین جدایه‌ها به ترتیب سروگروه IV، I و II بود. شاخص‌ترین سویه، EPEC (۵۵/۶ درصد) و پس از آن STEC (۲۵ درصد) و EIEC (۱۹/۴ درصد) بود (۲۷). Fratamico و همکاران در سال ۲۰۰۰ در پنسیلوانیا آمریکا فراوانی سویه‌های *اشریشیاکلی* O157H7 را در نمونه‌های مواد غذایی و مدفوع گاو با استفاده از روش مولکولی PCR با استفاده از ژن‌های stx1، stx2، flicH7 و O157 مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه نشان داده شد سویه‌های دارای ژن O157 که فاقد flicH7 هستند؛ تحت عنوان سویه‌های *اشریشیاکلی* O157 NM یا Non Motile نامگذاری شده‌اند. از طرفی سویه‌هایی که دارای ژن flicH7 و فاقد ژن O157 بودند؛ تحت عنوان Non O157-H7 نام گذاری شده‌اند (۲۸). در مطالعه ما ۴ سویه فاقد ژن O157 بودند؛ در حالی که دارای ژن flicH7 بودند که Non O157-H7 نام گذاری شدند. یافته‌های محققین مختلف حاکی از اهمیت *اشریشیاکلی* O157H7 یا *اشریشیاکلی* O157 NM یا Non O157-H7 در نمونه‌های غذایی و طغیان‌های ناشی از آن است. وجود ژن‌های مختلف در این سروتایپ توانایی خاصی در تولید توکسین و ایجاد مسمومیت‌های غذایی به آن داده است (۲۹و۳۰).

در مطالعه Moyenuddin و همکاران مقاومت به استرپتومایسین ۶۴/۳ درصد و تتراسایکلین ۵۳/۶ درصد بود و هیچیک از سویه‌ها به نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول مقاوم نبودند. مقاومت به آموکسی سیلین ۳۹/۳ درصد و کلرامفنیکل ۱۰/۷ درصد بود (۳۱). این تفاوت‌ها نشان‌دهنده افزایش روز افزون مقاومت به برخی از این آنتی بیوتیک‌ها نظیر نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول و کلرامفنیکل است. به طوری که در مطالعه ما بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کلرامفنیکل و کوتریموکسازول مشاهده گردید.

امروزه به دلایل متعدد بیماری‌های منتقله از آب و غذا و طغیان‌های ناشی از آن در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می شود. حتی در کشورهای صنعتی هر سال بیشتر از ۳۰ درصد مردم به بیماری‌های منتقله از غذا مبتلا می شوند. بیماری‌های منتقله از غذا یکی از چالش‌های مهم بهداشتی در سطح جهان است. از دلایل رایج شدن این قبیل بیماری‌ها می‌توان به تغییر در نقش زنان و اشتغال آنها، افزایش مسافرت‌ها و گردشگری، رشد فزاینده صادرات و واردات مواد غذایی و عادت به مصرف غذا در خارج از منزل اشاره کرد که نسبت به گذشته رواج و عمومیت بیشتری پیدا کرده است (۱۶).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه بر اساس مقایسه با مطالعات قبلی شاهد افزایش *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک با فراوانی ۲۴ جدایه (۲۴/۵ درصد) و همچنین افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده کلرامفنیکل و کوتریموکسازول و کارباپنم‌ها بودیم. افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم درمان سویه‌های مقاوم به بتالاکتامازها را با مشکل مواجه می کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه خانم ام البنین بیگلری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروب شناسی مواد غذایی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. همچنین حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی (شماره ۳۹۱۲۴) مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan; 11(1): 142-201.

2. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. Curr Top Microbiol Immunol. 2013; 358: 3-32. DOI: 10.1007/82_2012_303

3. Kayode Saka H, Tukur Dabo N, Muhammad B, García-Soto S, Ugarte-Ruiz M, Alvarez J. Diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes From Children Younger Than 5 Years in Kano State, Nigeria. Front Public Health. 2019 Nov; 7: 348. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00348

4. Kozub Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli strains from stool samples

of children with diarrhoea in Germany. Journal of Applied of Microbiology. 2008; 104(2): 403-10. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03545.x

5. Rumore J, Tschetter L, Kearney A, Kandar R, McCormick R, Walker M, et al. Evaluation of whole-genome sequencing for outbreak detection of Verotoxigenic Escherichia coli O157:H7 from the Canadian perspective. BMC Genomics. 2018 Dec; 19(1): 870. DOI: 10.1186/s12864-018-5243-3

6. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga Toxin Producing Escherichia coli. Clin Lab Med. 2015 Jun; 35(2): 247-72. DOI: 10.1016/j.cll.2015.02.004

7. Silagyi K, Kim SH, Lo YM, Wei CI. Production of biofilm and quorum sensing by Escherichia coli O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. Food Microbiol. 2009 Aug; 26(5): 514-19. DOI: 10.1016/j.fm.2009.03.004

8. Al-Ajmi D, Rahman S, Banu S. Occurrence, virulence genes, and antimicrobial profiles of Escherichia coli O157 isolated from ruminants slaughtered in Al Ain, United Arab Emirates. BMC Microbiol. 2020 Jul; 20(1): 210. DOI: 10.1186/s12866-020-01899-0

9. Fung F, Wang HS, Menon S. Food safety in the 21st century. Biomed J. 2018 Apr; 41(2): 88-95. DOI: 10.1016/j.bj.2018.03.003

10. Soltan Dallal MM, Motalebi S, Masoumi Asl H, Rahimi Forushani A, Sharifi Yazdi MK, Rajabi Z, et al. [Analysis of epidemiological data of foodborne outbreak reported in Iran]. Tehran Univ Med J. 2015 Feb; 72(11): 780-88. [Article in Persian]

11. Greig JD, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int J Food Microbiol. 2009 Mar; 130(2): 77-87. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.031

12. Bahmanabadi R, Khalili MB, Soltan Dallal MM. [The Study of Enteropathogenic Escherichia Coli Prevalence by PCR Method in Under-5-Year-Old Children's Diarrheal Samples Caused by the Country's Food]. Payavard Salamat. 2018; 11(6): 715-22. [Article in Persian]

13. Hall G, Kirk MD, Becker N, Gregory JE, Unicomb L, Millard G, et al. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. Emerg Infect Dis. 2005 Aug; 11(8): 1257-64. DOI: 10.3201/eid1108.041367

14. Health Protection Agency Centre for Infections. Communicable disease and health protection quarterly review: January to March 2005: from the Health Protection Agency Centre for Infections. J Public Health (Oxf). 2005 Sep; 27(3): 303-307. DOI: 10.1093/pubmed/fdi045

15. Tirado MC, Clarke R, Jaykus LA, McQuatters-Gollop A, Frank JM. Climate change and food safety: A review. Food Res Int. 2010 Aug; 43(7): 1745-65. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.07.003

16. Bertolatti D, Theobald C. Food Safety and Risk Analysis. Encyclopedia of Environmental Health. 2011; pp: 792-802. DOI: 10.1016/B978-0-444-52272-6.00620-6

17. Paudyal N, Anihouvi V, Hounhouigan J, Ignatius Matsheka M, Sekwati-Monang B, Amoa-Awua W, et al. Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries - A meta-analysis. Int J Food Microbiol. 2017 May; 249: 35-43. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.002

18. Winn WC, Koneman EW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006.

19. Aranda KRS, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett. 2007 Feb; 267(2): 145-50. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x

20. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in Escherichia coli of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002 Oct; 40(10): 3613-19. DOI: 10.1128/jcm.40.10.3613-3619.2002

21. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015 Jan; 35(3): M100-S25.

22. Alizade H, Hosseini Teshnizi S, Azad M, Shojae S, Gouklani H, Davoodian P, et al. An overview of diarrheagenic Escherichia coli in Iran: A systematic review and meta-analysis. J Res Med Sci. 2019; 24: 23. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_256_18

23. Miri ST, Dashti A, Mostaan S, Kazemi F, Bouzari S. Identification of different Escherichia coli pathotypes in north and north-west provinces of Iran. Iran J Microbiol. 2017 Feb; 9(1): 33-37.

24. Nahaei M, Akbari Dibavar M, Sadeghi J, Nikvash S. [Frequency of enterohaemorrhagic Escherichia coliisolated from patients with acute diarrhea in Tabriz hospitals]. Iran J Med Microbiol. 2007; 1(3): 39-46. [Article in Persian]

25. Akbari A, Pourmand M, Fard Sanei F, Mardani N, Soltan Dallal M. [Detection of E.Coli Strains Containing Shiga Toxin (Stx1/2) Gene in Diarrheal Specimens from Children Less than 5 Years Old by PCR Technique and Study of the Patterns of Antibiotic Resistance]. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2009; 17(4): 279-85. [Article in Persian]

26. Bijari B, Abassi A, Shayeste M, Zeraatkar V. Epidemiological survey of food-borne outbreaks in southern Khorasan province. Zahedan J Res Med Sci. 2012; 13(suppl 1): e94383.

27. Sharifi Yazdi MK, Akbari A, Soltan Dallal MM. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay forsimultaneous detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eae) and invasive plasmid antigen H (ipaH) genes in diarrheagenic Escherichia coli. Afr J Biotechnol. 2011 Feb; 10(9): 1522-26. DOI: 10.5897/AJB10.1443

28. Fratamico PM, Bagi LK, Pepe T. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of Escherichia coli O157:H7 in foods and bovine feces. J Food Prot. 2000 Aug; 63(8): 1032-37. DOI: 10.4315/0362-028x-63.8.1032

29. Li B, Liu H, Wang W. Multiplex real-time PCR assay for detection of Escherichia coli O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing E. coli. BMC Microbiol. 2017 Nov; 17(1): 215. DOI: 10.1186/s12866-017-1123-2

30. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. World Health Organization. Report. Rome. 2018.

31. Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseley SL, Bopp CA, Blake PA. Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of Escherichia coli strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States. J Clin Microbiol. 1989 Oct; 27(10): 2234-39. DOI: 10.1128/JCM.27.10.2234-2239.1989