مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۵، شماره ۴، زمستان ۹۴، صفحات ۲۶۹ تا ۲۷۶

Original Article

تیپینگ سرولوژیک اشریشیاکلی‌های جدا شده از فراورده‌های غذایی‌سنتی و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

پریچهر معزی[۱]، نیما بهادر[۲]، مجید باصری صالحی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز ، ایران
[۲] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران
[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون ، کازرون ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بیماری‌های منتقله توسط غذا از جمله عوامل تهدید کننده جامعه بشری هستند. در همین رابطه، اشریشیاکلی از جمله باکتری‌های مهم عامل مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید. هدف از این تحقیق، ارزیابی شیوع و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی، در نمونه‌های مواد غذایی سنتی می‌باشد.*

روش بررسی: *در طی این پژوهش، ۱۰۰ نمونه ماده غذایی تهیه شده به روش سنتی، از نظر وجود اشریشیاکلی مورد آزمون قرار گرفته و توسط تست‌های بیوشیمیایی وسرولوژیکی تایید شده و به دنبال آن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به روش دیسک دیفیوژن طبق استاندارد Kirby-Bauer و بر اساس جدول استاندارد (۲۰۱۳) CLSI تعیین گردید.*

یافته‌ها: *نتایج به دست آمده نشان داد که ۷٪ از مواد غذایی آلودگی به اشریشیاکلی داشتند که ۳٪ از جدایه‌ها پاتوژنیک اشریشیاکلی بود. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام نشان داد که ۱۰۰٪ جدایه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و وانکومایسین مقاوم بودند و پس از آن به ترتیب بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیفکسیم (۷۵٪)، تتراسایکلین (۶۲/۵٪)، سفالکسین (۵۰٪)، سفتریاکسون، جنتامایسین وکوتریموکسازول (۲۵٪)، سیپروفلوکساسین وکلرامفنیکل (۱۲/۵۰٪) وجود داشت.*

نتیجه‌گیری: *اشریشیاکلی یکی از باکتری‌های آلوده‌کننده مواد غذایی است و حضور این باکتری در غذا می‌تواند تهدیدی بر سلامت جامعه باشد. با توجه به یافته‌ها، جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی مواد غذایی، آموزش و رعایت اصول بهداشتی، مهارت‌های آماده‌سازی، حمل و نقل و ذخیره‌سازی از فاکتورهای مهم می‌باشند. هرچند سیپروفلوکساسین وکلرامفنیکل کارآیی مناسب‌تری در مهار رشد باکتری ها در این منطقه داشته اند، اما عوارض آنها نیز باید در نظر گرفته شود.*

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، آلودگی مواد غذایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.*

مقدمه

بیماری‌های ناشی از مواد غذایی به بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که در اثر مصرف غذاهای آلوده به بدن منتقل می شوند. بیشتر این عوامل معمولا باعث بیماری های دستگاه گوارش می گردند (۱). در طول دهه گذشته وقوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشور های در حال توسعه با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است و این در حالی است که وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی اغلب گزارش نشده باقی مانده و لذا تعیین آمار دقیق از میزان ابتلا، به خصوص در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نمی‌باشد. عوامل بیماری‌زای غذایی یک عامل تهدید کننده برای بهداشت عمومی این کشورها به شمار می‌آیند که می‌توان توسط رعایت ضوابط بهداشتی در پروسه‌های تهیه مواد

آدرس نویسنده مسئول: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد شیراز، دکتر نیما بهادر
(**email**: bahador@iaushiraz.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۳/۲۳

غذایی از وقوع آن‌ها جلوگیری نمود (۲). باکتری اشریشیاکلی یکی از مهم‌ترین اعضای فلور طبیعی روده انسان و حیوانات خونگرم می‌باشد. اهمیت این باکتری به دلیل وجود سویه‌های بیماری‌زایی است که عامل ایجاد بیماری‌های روده‌ای و مسمومیت‌های غذایی برای انسان می‌باشند (۳). میزان آلودگی به این باکتری در دهه گذشته دو برابر شده است. عفونت‌های گوارشی ناشی از این باکتری، بسته به سویه خاص باکتری به صورت اسهال ساده تا اسهال همراه با خون است. اغلب تیپ‌های این باکتری در روده بیماری‌زا نیستند، ولی برخی از تیپ‌های آن مانند انتروتوکسیژنیک اشریشیا کلی (Enterotoxigenic E.Coli :ETEC) با تولید سم و تیپ‌های انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (Enteropathogenic E.Coli: EPEC) با آسیب مستقیم و تیپ‌های انترو اینویسیو اشریشیاکلی (Enteroinvasive E.Coli :EIEC) با تهاجم بافتی می‌توانند ایجاد اسهال بنمایند. اسهال اغلب خفیف است، ولی در تیپ‌های مهاجم‌تر مانند انتروهموراژیک اشریشیاکلی (Enterohemorrhagic E.Coli :EHEC) می‌تواند خونی باشد. مهم‌ترین عامل اسهال مسافران اشریشیاکلی تیپ‌های انتروتوکسیژنیک می‌باشد (۴). انتقال عفونت از طریق آلودگی مواد غذایی به ویژه محصولات گوشتی رخ می‌دهد.اغلب پخت ناکافی محصولات گوشتی به ویژه همبرگر منشا اصلی انتقال این باکتری به انسان است. آلودگی گوشت می‌تواند طی کشتار آلوده رخ داده و در زمان چرخ کردن گوشت، باکتری به طور کامل در سراسر آن پراکنده گردد (۵،۶).

مصرف بی‌رویه و غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها بدون توجه به الگوهای مقاومتی میکروارگانیسم می‌تواند باعث ظهور سویه‌هایی گردد که حتی به درمان‌های جدید مقاومت داشته باشند و ظهور سویه‌های اخیر با مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها مبین این حقیقت است (۷). از طرفی الگوی مقاومت در مناطق مختلف متفاوت بوده و آگاهی از آن برای پزشکان هر منطقه به منظور بکارگیری صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماران ضروری است. این پژوهش به منظور بررسی میزان آلودگی مواد غذایی سنتی به باکتری اشریشیاکلی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری انجام گرفت.

مواد و روشها

در پژوهش حاضر، تعداد ۱۰۰ نمونه ماده غذایی که به روش سنتی تهیه شده بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. این نمونه‌ها شامل ۴۰ نمونه انواع فراورده‌های گوشتی، ۳۰ نمونه انواع فراورده‌های لبنی، ۳۰ نمونه انواع سبزیجات و سالادها بود. ابتدا از مواد غذایی، رقت اولیه تهیه شد. رقت‌ها بلافاصله (کمتر از ۱۵ دقیقه) قبل از انجام آزمون تهیه شده و در زمان کوتاهی به محیط‌های کشت تلقیح شدند. محلول رقیق کننده اغلب مواد غذایی، محلول رینگر است. برای تهیه اولین رقت ۱۰ گرم یا ۱۰میلی لیتر از نمونه به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق کننده در یک ظرف استریل افزوده شد. رقت تهیه شده کاملا مخلوط و یکنواخت گردید. جهت غنی سازی از محیط LST Broth (Lauryl sulfate tryptose Broth) با غلظت مضاعف استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر از رقت یک دهم نمونه به لوله حاوی ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت LST Broth دوبل حاوی لوله دورهام اضافه شد. سپس دردمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. درصورت مشاهده گاز یاکدورت درلوله‌ها پس از۴۸ ساعت، ۱ تا ۲ قطره از محتویات لوله به لوله حاوی ۱۰میلی‌لیتر محیط EC Broth با غلظت معمولی و لوله دورهام اضافه گردید. سپس در دمای۴۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. درصورت مشاهده گاز یا کدورت درلوله‌ها پس از ۴۸ ساعت، ۰/۱ سی سی از آن به محیط کشت پپتون واتر اضافه شد. سپس دردمای۴۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس چندقطره معرف کواکس به لوله افزوده و پس از یک دقیقه ایجاد رنگ قرمز درسطح محیط کشت (واکنش ایندول مثبت) بررسی شد. همچنین کشت خطی از EC Broth برروی محیط کشت EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar) برای دیدن کلنی‌های لاکتوز مثبت با درخشش فلزی و سپس کشت خطی ازکلنی‌های فوق برروی محیط نوترینت آگارجهت ایجادکلنی خالص برای انجام تست‌های تاییدی انجام گردید. تست‌های تاییدی شامل کشت درمحیط افتراقی TSI (Triple Sugar Iron Agar) و تست (Indol, IMVIC Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate utilization (Test که شامل کشت در محیط پپتون واتر (تست ایندول)، متیل‌رد، وگس پروسکائر و سیمون سیترات است، برای شناسایی کلنی‌های ایزوله شده انجام گرفت.

جهت ارزیابی جدایه ها به کمک آزمون های سرولوژیک از آنتی سرم‌های پلی والان I /II /III / IV اشریشیاکلی‌های پاتوژن ساخت شرکت بهارافشان استفاده گردید. در آنتی سرم‌های مذکور از ترکیب Thiomersal به عنوان

نگهدارنده استفاده شده است که می تواند در تماس با آلومینیوم ایجاد خوردگی کند و در صورت بلع ایجاد مسمومیت نماید. از آن جایی که صحت و دقت این تایپینگ با کیفیت آنتی سرم در ارتباط است بنابراین جهت جلوگیری از رسوب دادن و یا از دست رفتن توان آنتی‌سرم باید از ذوب و انجماد آن پرهیز نمود. جهت استفاده از این آنتی سرم، از کشت هایی استفاده می شود که به طریق بیوشیمیایی و خصوصیات مرفولوژیک مورد تایید قرار گرفته اند. به این ترتیب که آگلوتیناسیون بر روی لام (Slide Agglutination) با افزودن یک قطره از هر آنتی سرم به لام و یک لوپ کامل از پرگنه های اشریشیا کلی از کشت تازه (۱۸-۱۶ ساعته) انجام شده و از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید، بدین طریق که روی یک لام تمیز دیگر نیز یک قطره سرم فیزیولوژی ریخته شد و یک لوپ کامل از پرگنه های اشریشیا کلی از به آن اضافه گردید. لام‌ها به صورت دورانی حرکت داده شدند و واکنش قبل از ۳۰ ثانیه در مقابل یک صفحه سیاه ومات از نظر آگلوتیناسیون به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت. لخته شدن مشخص و یا آگلوتیناسیون کامل در این مدت بدون مشاهده لخته در قطره کنترل به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد و در صورتی که این زمان افزایش می‌یافت، واکنش منفی در نظر گرفته می‌شد. در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ یک از قطره‌ها، احتمال دارد سویه از جمله سویه‌های کپسول‌دار باشد، بنابراین جهت اجتناب از واکنش منفی کاذب، حتما آزمون بر روی میکروب با حرارت کشته شده انجام گردید (۸).

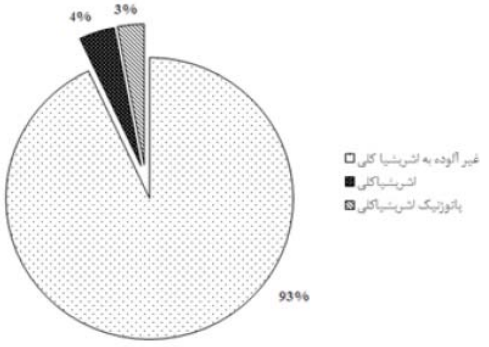
تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی در کنار سویه استاندارد PTCC 1399، به روش دیسک دیفیوژن طبق استاندارد Kirby-Bauer در محیط مولرهینتون آگار تهیه شده از شرکت مرک آلمان و بر اساس استاندارد جهانی CLSI ۲۰۱۳ [Clinical and Laboratory Standards Institute] و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت پادتن طب ایران انجام شد(جدول۱). آزمون آنتی‌بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با استاندارد نیم‌مک‌فارلند برای هر جدایه طی سه تکرار انجام گردید. بدین صورت که سوسپانسیون تهیه‌شده به وسیله سوآپ استریل روی محیط کشت مولرهینتون آگار به صورت متراکم کشت داده شد، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را با پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده و محیط‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. سپس قطر هاله ممانعت از رشد به وسیله خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و مقاومت یا حساسیت باکتری با استفاده ازجدول استاندارد(CLSI (۲۰۱۳ مشخص گردید.

جدول ۱. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده جهت تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اشریشیاکلی

آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری و غلظت (µg)
آمپی‌سیلین	AMP 10
سفتریاکسون	CRO 30
وانکومایسین	V 30
تتراسایکلین	TE 30
جنتامایسین	GM 10
سیپروفلوکساسین	CP 5
سیفکسیم	CFM 5
کلرامفنیکل	C 30
کوتریموکسازول	SXT
سفالکسین	CN 30

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که تعداد ۷ مورد از ۱۰۰ نمونه غذایی سنتی جمع آوری شده (۷٪) آلودگی به اشریشیاکلی داشتند که پس از انجام تست سرولوژی با آنتی سرم پلی‌والان اشریشیاکلی، ۳٪ جدایه‌ها اشریشیاکلی پاتوژنیک تشخیص داده شدند (نمودار ۱).



نمودار ۱. درصد فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی در مواد غذایی سنتی

جدول ۲: میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در جدایه‌های اشریشیاکلی و سوش استاندارد PTCC 1399 با توجه به میانگین و انحراف معیار هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر

	آنتی بیوتیک									
باکتری	AM10	CRO30	V30	TE30	GM10	CP5	CFM5	C30	SXT	CN30
E.C PTCC 1399	11±0.33 R	30±0.23 S	11±0.30 R	23±0.33 S	14 ±0.23 I	31±0.33 S	24±0.34 S	23±0.22 S	25±0.33 S	14±0.21 R
E.C-Y	12±0.21 R	32±0.25 S	12 ±0.21 R	21±0.33 S	21±0.25 S	28±0.26 S	10±0.33 R	21±0.26 S	28±0.26 S	16±0.33 I
E.C-V	11±0.50 R	22±0.33 I	12±0.50 R	7±0.33 R	12 ±0.23 I	26±0.34 S	18±0.35 I	26±0.33 S	10±0.34 R	17±0.23 I
E.C-H1	10±0.32 R	11±0.32 R	10 ±0.32 R	2±0.33 R	18±0.32 S	27±0.32 S	12±0.32 R	17±0.14 I	27±0.32 S	17±0.32 I
E.C-H2	8±0.25 R	8±0.32 R	10±0.38 R	8±0.33 R	22±0.32 S	22±0.18 I	14±0.10 R	10±0.18 R	21±0.18 S	12±0.00 R
E.C-K	11±0.33 R	22±0.14 I	8±0.33 R	10±0.35 R	14±0.33 I	32±0.23 S	7±0.23 R	21±0.41 S	8±0.23 R	21±0.16 S
E.C-M	6± 010 R	25±0.50 S	6± 0.20 R	11±0.33 R	11±0.44 R	14±0.24 R	11±0.18 R	16±0.23 I	24±0.24 S	11±0.44 R
E.C-I	10± 0.20 R	18±0.60 I	10± 0.00 R	17±0.33 I	10 ±0.30 R	33±0.41 S	12±0.42 R	14±0.50 I	23±0.41 S	10±0.34 R

اشریشیاکلی همبرگر دست‌ساز ۱: E.C-H1، اشریشیا کلی سبزی: E.C-V، اشریشیاکلی ماست: E.C-Y، اشریشیاکلی گوشت چرخ‌کرده پخته: E.C-M، اشریشیاکلی کباب کوبیده: E.C-K، اشریشیاکلی همبرگر دست‌ساز ۲: E.C-H2 ، اشریشیاکلی بستنی سنتی: E.C-I، سوش استاندارد: E.C PTCC 1399 Resistant: R، Intermediate: I، S : Sensetive

* نتایج فوق بر اساس سه بار تکرار برای هر آزمون و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

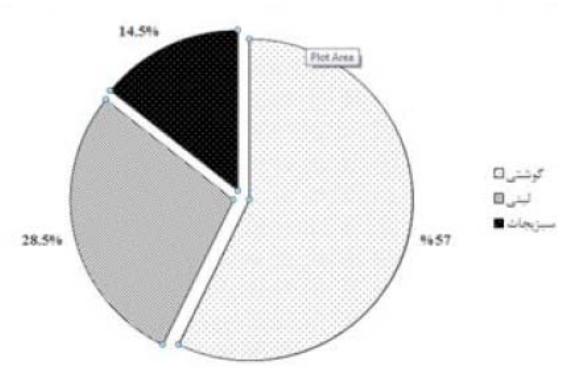
جدول ۳. الگوی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در جدایه‌های اشریشیاکلی و سوش استاندارد PTCC 1399

آنتی بیوتیک	حساس(تعداد-درصد)	نیمه حساس(تعداد-درصد)	مقاوم (تعداد-درصد)
آمپی سیلین	۰	۰	۸(۱۰۰)
سفتریاکسون	۳(۳۷/۵۰)	۳(۳۷/۵۰)	۲(۲۵)
وانکومایسین	۰	۰	۸ (۱۰۰)
تتراسایکلین	۲(۲۵)	۱(۱۲/۵۰)	۵ (۶۲/۵۰)
جنتامایسین	۳(۳۷/۵۰)	۳(۳۷/۵۰)	۲(۲۵)
سیپروفلوکساسین	۶(۷۵)	۱(۱۲/۵۰)	۱(۱۲/۵۰)
سیفکسیم	۱(۱۲/۵۰)	۱(۱۲/۵۰)	۶ (۷۵)
کلرامفنیکل	۴(۵۰)	۳(۳۷/۵۰)	۱(۱۲/۵۰)
کوتریموکسازول	۶(۷۵)	۰	۲ (۲۵)
سفالکسین	۱(۱۲/۵۰)	۳(۳۷/۵۰)	۴ (۵۰)

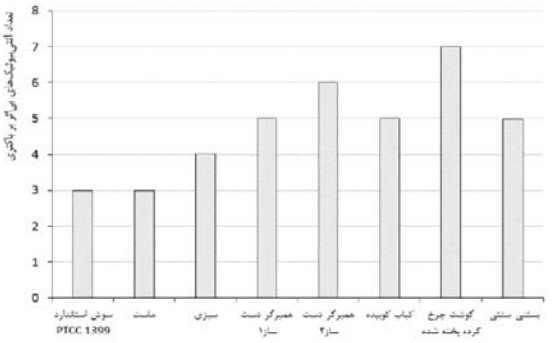
از هفت جدایه اشریشیاکلی ،چهار مورد از فراورده‌های گوشتی شامل (گوشت چرخ کرده پخته شده، همبرگر دست‌ساز۱ ، همبرگر دست‌ساز۲ و کباب کوبیده)، دو مورد از فراورده‌های لبنی شامل (ماست و بستنی‌سنتی) و یک مورد از سبزیجات (سبزی منجمد خرد شده) جدا گردید (نمودار ۲). همچنین آزمایشات سرولوژیکی نشان دادند که جدایه‌های اشریشیاکلی از همبرگر دست‌ساز ۱ و ۲ و ماست پاتوژنیک بودند.

تعیین حساسیت جدایه‌های اشریشیاکلی در کنار سوش استاندارد PTCC 1399 در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن بر اساس سه بار تکرار برای هر آزمون و با توجه به میانگین و

انحراف معیار هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر در جدول ۲ نشـان داده شده است.



نمودار ۲. درصد فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی براساس نوع مواد غذایی سنتی



نمـــودار ۳. نمـودار فراوانـی الگـوی مقاومـت آنتـی بیـوتیکی در جدایه‌هـای اشریشـیاکلی و سـوش اسـتاندارد اشریشـیاکلی PTCC 1399

الگوی مقاومت نسبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای مختلـف در جدایـه‌هـای اشریشیاکلی و سوش استاندارد نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک در جـدول ۳ نشان داده شده است . نتایج بدست آمده بیانگر متفـاوت بـودن الگـوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایـه‌هاسـت بـه طـوری کـه بیشـترین حساسـیت نسـبت بـه آنتـی بیوتیـک‌هـای سیپروفلوکساسـین و کوتریموکسازول وجود دارد که ۷۵٪ موارد را شامل می شود. پس ازآن بیشترین حساسیت به ترتیـب مربـوط بـه کلرامفنیکـل، جنتامایسـین، سفتریاکسون، سیفکسیم و سفالکسین است. همچنین ۱۰۰٪ جدایه‌ها و سوش استاندارد PTCC 1399 نسبت به آمپی‌سیلین و وانکومایسین مقاوم هستند و پس از آن به ترتیب بیشترین مقاومت نسبت به آنتـی-بیوتیک‌های سیفکسـیم (۷۵ ٪)، تتراسـایکلین (۶۲/۵ ٪)، سفالکسـین (۵۰٪)، سفتریاکسون (۲۵٪)، جنتامایسین (۲۵٪) وکوتریموکسازول (۲۵٪)، سیپروفلوکساسـین (۱۲/۵۰٪) وکلرامفنیکـل (۱۲/۵۰٪) وجوددارد.

فراوانی الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدایه‌های اشریشیاکلی و سـوش اسـتاندارد در نمـودار ۳ نشـان داده شـده اسـت.

بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشـیاکلی جـدا شـده از گوشـت چرخ کرده پخته دیده شد که به ۷۰٪ از آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده مقاوم است وکمترین مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایـه اشریشـیاکلی از ماست و در سوش استاندارد اشریشیاکلی PTCC 1399 دیده می‌شود که به ۳۰٪ آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده مقاوم است.

بحث

ایمنی مواد غذایی یک هدف جهانی است و بیماری‌های ناشـی از مواد غذایی یک مشکل عمده برای سلامتی است و به همین دلیل تشخیص پاتوژن‌های میکروبی در مـواد غـذایی راه حلـی برای پیشگیری و شناخت مشکلات مربوط به سلامت و ایمنی است (۹). انواع زیادی از میکروارگانیسم‌ها یا توکسین‌های آنها، با مکانیسم‌های مختلف در ایجاد بیمـاری‌هـای منتقلـه از غـذا نقش دارند (۱۰).

از جمله بیماری‌هـای باکتریـایی منتقلـه توسـط مـواد غـذایی می‌توان به بوتولیسم، کمپیلوباکتریوزیس، عفونت اشریشیاکلی، سالمونلوزیس و شیگلوزیس اشاره کرد. بر اساس برآورد انجـام شده توسط مرکـز کنتـرل و پیشـگیری از بیمـاری در ایـالات متحده امریکا سالانه ۷۵ میلیون نفر از بیمـاری‌هـای منتقلـه توسط غذا رنج مـی‌برنـد (۱۲-۱۱). از بـین عوامـل باکتریـایی بیماری‌زا، اشریشیا کلی مولد اسهال یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می‌باشد (۱۴-۱۳). اشریشـیاکلی EPEC عامل عمده اسهال درکشورهای‌توسعه نیافته است، امـا به‌طـور روزافـزون درکشـورهای توسـعه یافتـه نیـز شناسـایی می‌شود. EPEC بر روی سطح اپی‌تلیال کلونیزه شـده و اثـرات بیماری‌زایی خود را در وهله اول با اتصال به سطح انتروسیت‌ها اعمال می‌کند و موجب تغییـرات هیسـتوپاتولوژیک مـی‌شـود (۱۵،۱۶).

در مطالعه‌ای کـه توسـط Gomes و همکـارانش بـر روی ۱۲۰ نمونه ماده غذایی، شامل شیر خام و پاسـتوریزه، فـراورده‌هـای گوشتی، پنیر و سبزیجات، صورت گرفـت گـزارش گردیـد کـه گوشت و پنیر بیشترین آلـودگی بـه انتروکـک (۵۲/۵٪) را دارا بودند و آلودگی به کلی‌فرم و اشریشیا کلی در نمونه‌های شـیر ۴/۳٪ گزارش گردیـد (۱۷). در مطالعـه‌ای کـه توسـط سـالک مقدم و همکاران انجـام شـد، در ۱۵٪ از نمونـه‌هـا کـه شـامل سبزیجات تازه، فراورده‌های لبنـی و بسـتنی‌هـای سـنتی بـود اشریشیاکلی جدا گردید (۱۸). در بررسی انجـام شـده توسـط محمد رضایی و همکارانش بر روی پنیرهای سنتی ۳۴ درصد نمونه‌ها از نظر اشریشیاکلی دارای آلودگی بودند، همچنـین در ۲۴ درصد نمونه‌ها آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده

شد. درصد آلودگی نمونه‌ها به سالمونلا نیز ۸/۷۵ درصد بود (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط Wu و همکاران در چین بر روی میزان آلودگی مرغ در خرده‌فروشی‌ها انجام گردید نشان داد که ۶۹/۱٪ آلودگی به اشریشیاکلی داشتند که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنها متفاوت بود و بیشترین میزان مقاومت مربوط به تترا سایکلین (۸۴/۴٪) و پس از آن نالیدیکسیک اسید (۷۴/۱٪)، آمپی سیلین (۷۱/۱٪)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۷۰/۱٪)، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید (۶۸/۸٪)، استرپتومایسین (۵۸/۵٪) و آمیکاسین (۱۲/۶٪) بود و کمترین مقاومت مربوط به سفوکسیتین (۷/۸٪) گزارش گردید (۲۰).

از طرف دیگر در مطالعه‌ای که توسط رحیمی و همکارانش در شهرکرد ایران انجام شد، تعداد ۲۹۰ نمونه پنیر، ماست و بستنی سنتی از نظرآلودگی اشریشیاکلی O157:H7 مورد بررسی قرار گرفتند که ۹ نمونه، شامل ۵ نمونه پنیر سنتی و ۴ نمونه خامه سنتی، به اشریشیاکلی O157 آلودگی داشتند، ولی اشریشیاکلی O157:H7 مشاهده نگردید. علاوه بر این، از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به آمپی‌سیلین و جنتامایسین بیشترین یافته (۴۴/۴٪) وپس ازآن مقاومت در برابر اریترومایسین (۳۳/۳٪)، آموکسی سیلین (۱۱/۱٪)، تتراسایکلین (۱۱/۱٪) و نالیدیکسیک اسید (۱۱/۱٪) مشاهده شد و تمامی باکتری‌های E.coli O157 به کلرامفنیکل، سفورکسیم و استرپتومایسین حساسیت نشان دادند که با سویه‌های به دست آمده از تحقیق حاضر تا حدودی مغایرت دارد، به طوری که سویه های جدا شده از این پژوهش به وانکومایسین و آمپی سیلین ۱۰۰٪ مقاومت نشان دادند (۲۱). اشریشیاکلی از جمله باکتری‌هایی است که در طول زمان مطالعات مختلفی روی تایپینگ آن انجام گرفته است. این باکتری با دارا بودن بیش از ۱۵۶ نوع آنتی ژن O، ۵۶ نوع آنتی‌ژن H و ۸۰ نوع آنتی‌ژن K دارای تنوع ژنتیکی زیادی بوده و علاوه بر روش سروتایپینگ، انواع روش های مولکولار بیولوژی نظیر PFGE، روش‌های مبتنی بر برش آنزیمی مثل RFLP، آنالیز پلاسمیدی، ریبوتایپینگ و روش های مبتنی بر PCR جهت دسته‌بندی سویه‌های مختلف این باکتری استفاده شده است (۲۲).

به طوری‌که Ahmed و همکارانش استفاده از روش‌های مختلفی مانند الیزا و آنتی‌بادی‌های پلی والان را برای جداسازی انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی O157:H7 گوشت گوساله تازه، شیر خام، شیر پر چربی پاستوریزه شده و پنیرهای مختلف مورد ارزیابی قرار دادند (۲۳). از طرف دیگر البرزی و همکارانش نیز به دنبال جداسازی اشریشیاکلی پاتوژن در نمونه‌های خونی با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌والان و نیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بودند (۲۴). درراستای پژوهش‌های انجام شده، در پژوهش ما نیز تشخیص حضور این ارگانیسم بیماری‌زا با استفاده از کیت آنتی بادی پلی والان شرکت بهار افشان انجام گردید، زیرا این کیت به راحتی قابل دسترس بوده و پروتکل انجام و تفسیر آن نیز موجود می باشد و درعین حال می تواند سروگروه‌های متعددی از اشریشیاکلی را شناسایی نماید.

در پژوهش حاضر، درصد فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی در فراورده‌های گوشتی ۵۷٪ و فراورده‌های لبنی ۲۸/۵٪ و در سبزیجات ۱۴/۵٪ به دست آمد(نمودار ۲). این امر نشان می‌دهد که فراورده‌های گوشتی در مقایسه با سایر مواد غذایی به دلیل غنی بودن بیشتر در معرض آلودگی میکروبی قرار دارند. از آنجایی که اشریشیاکلی به حرارت حساس بوده، بنابراین اگر فراورده‌های گوشتی در هنگام پخت حرارت کافی دریافت کنند باکتری از بین می‌رود، ولی اگر گوشتی که برای تهیه کباب و همبرگر و...مصرف می‌شود، دارای آلودگی اولیه بوده و یا توسط دست افراد تهیه‌کننده آلودگی ثانویه پیدا کند و حرارت پخت هم کافی نباشد باعث آلودگی مواد غذایی و پیامدهای بعدی آن می‌گردد. بر اساس نتایج این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی در فراورده‌های گوشتی دیده شد که می‌تواند به علت مصرف بی-رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامداری‌ها و مرغداری‌ها باشد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و امکان انتقال اشریشیاکلی از طریق مواد غذایی به انسان و با توجه به تمایل زیاد مردم به خرید مواد غذایی سنتی آماده، لذا یافتن راه‌هایی مناسب، جهت کنترل آلودگی مواد غذایی سنتی، آموزش افراد شاغل و نظارت در مرحله تهیه ،بسته‌بندی، حمل و نقل، نگهداری و عرضه این فراورده‌ها باید در اولویت کار قرار گیرد؛ همچنین نظر به افزایش روز افزون جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، توصیه می‌گردد از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در دامداری‌ها و مرغداری‌ها اجتناب شود، زیرا این جدایه‌های مقاوم می‌توانند از طریق مصرف گوشت به انسان منتقل گردند.

تشکروقدردانی

این پژوهش حاصل بخشی از تحقیقات انجام شده بر روی پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی پریچهر معزی به راهنمایی سرکارخانم دکتر نیما بهادر با موضوع " ارزیابی

کاربرد نانو ذره دی اکسید تیتانیوم در صنعت بسته بندی محصولات غذایی: پیشگیری از فساد میکروبی و افزایش زمان ماندگاری" در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می‌باشد.

REFERENCES

1. Fadaei AM, Jamshidi A, Kheiri S. Comparison of bacterial contamination of raw and pasteurized milk used in Shahrekord in 2006. Shahrekord University of Medical Sciences Journal 2008;10: 37-44. [In Persian]
2. World Health Organization. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control, 2008. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547222_eng.pdf. [Accessed at 2011 Sep 15]
3. Xia X, Meng J, McDermott PF, Ayers S, Blickenstaff K, Tran TT, et al. Presence and characterization of shiga toxinproducing producing Escherichia coli and other potentially Diarrheagenic E. coli in retail meats. Appl Environ Microbiol 2010;76: 1709-17.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, eds. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia: Mosby; 2005. P.221-36.
5. 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;86:852-60.
6. Byrne CM, Erol I, Call JE, CW Kaspar, Buege DR, Hiemke CJ. characterization of *Escherichia Coli* O157:H7 from downer and healthy dairy cattele in the upper Midwest region of the United State. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 852-60.
7. Parry CM, Tinhhien T, Dougan G, white NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. N Engl J Med 2002; 20: 1770-80.
8. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods American Public Health Association. Washington DC: American Public Health Association; 2001. P.76-79.
9. Velusmy V, Ashak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnol Adv 2002; 28:232-54.
10. Mozafari NA, Forouhesh Tehrani T, Salek Moghadam A. The prevalence of *Enterobacteriaceae* producing heat-stable enterotoxin in food sent to the microbiology laboratory of. Pejouhesh dar Pezeshki 2002;26: 65-69. [In Persian]
11. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases- the challenges The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol 2010;139: 3-15.
12. Mosaferi M, Hajizadeh Y, Ostad rahimi A, Hashemi A. Importance of water quality control in food safety, case study:drinking, dairy and caning industries of east Azerbaijan. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences 2007; 29: 93-97. [In Persian]
13. Olesen B, Neimann J, Bottiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. J Clin Microbiol 2005; 43: 3636-41.
14. Hunter PR. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. J Water Health 2003: 1: 65-72.
15. Soltan-Dallal MM. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. Arch Iran Med 2001; 4: 201-203.
16. Prere MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O. Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. Pathol Biol (Paris) 2006; 54:600-602.
17. Gomes, BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol 2008; 25: 668-75.
18. Salek Moghadam A, Forouhesh Tehrani H, Mozafari NA, Ansari H. Prevalence of virulence factors among *E.coli* isolated from food materials from Iran University of Medical Sciences' food microbial laboratory. KAUMS Journal (FEYZ) 2000; 4: 32-40. [In Persian]
19. Rezaii M, Yahyaii M, Parviz M, Khodaii Motlagh M. A survey of microbial contamination in traditional cheese distributed in Markazi province in 2010. Journal of Health and Environment, Iran 2014;7: 115-22. [In Persian]
20. Wu Q, Meili Xi, Xiaoying LV, Yunfeng XU, Yuqing F, Qiong Li, et all. Presence and Antimicrobial Susceptibility of Escherichia coli Recovered from Retail Chicken in China. J Food Protect 2014; 77: 1773-77.
21. Rahimi E, Chaleshtori SS, Parsaei P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran. Afr J Microbiol Res 2011; 22: 3706-10. [In Persian]

22. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9: 430-40 .

23. Ahmed A, Egwu GO, Garba HS, Magaji AA. Prevalence of bacterial pathogens and serotyping of E. coli isolates from diarrhoeic lambs in Sokoto state, Nigeria. Sokoto Journal of Veterinary Sciences 2010;8: 42-45.

24. Alborzi A, Aelami MH, Astaneh, B, Pourabbas B, Farshad S, Kalani, et al. Is *Escherichia coli* O157: H7 a common pathogen in children with bloody diarrhea in Shiraz, Iran. Turk J Pediatr 2008; 50: 349-53.