

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

شیوع *E. coli* O157:H7 جداسازی شده از بیماران گاستروآنتریت حاد

چکیده

زمینه و هدف: بیماری های اسهالی در همه گروه های سنی و در تمام مناطق جغرافیایی جهان اتفاق می افتند. اشریشیا کلی *E. coli* O157: H7 یکی از مهمترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده این بیماری می باشد. هدف از این پژوهش بررسی فراوانی شیوع اسهال ناشی از این باکتری در بیماران مبتلا به اسهال حاد بود.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۱۴ نمونه مدفوع مربوط به اسهال حاد از بیماران در بیمارستان ها و آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان ملایر و در ماه های خرداد تا آبان جمع آوری شد. کشت نمونه ها در محیط کشت های غنی کننده، افتراقی، اختصاصی و انتخابی انجام و از روش های تشخیص سریع و استفاده از آنتی سرم اختصاصی جهت شناسایی *E. coli* O157:H7 استفاده شد.

یافته ها: در ۱۲/۱۵ درصد از نمونه ها تخمیر لاکتوز مشاهده و به عنوان *E. coli* تایید شد. نتایج حاصل از کشت نمونه های لاکتوز مثبت نشان داد که ۶/۵۴ درصد از نمونه ها بتا گلوکورونیداز منفی بودند. این تعداد از نمونه ها به عنوان *E. coli* O157 تایید گردید و در نهایت با استفاده از آنتی سرم *O157:H7* از ۱۴ نمونه ای که بتا گلوکورونیداز منفی بودند ۱/۸۷ درصد از نمونه ها به عنوان *E. coli* O157:H7 تایید شدند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد شیوع *E. coli* O157:H7 در افراد با سنین بالا و کودک بیشتر بوده است و آب و مواد غذایی در انتقال آن نقش بسزایی ایفا می کنند.

واژگان کلیدی: شیوع، *E. coli* O157:H7، گاستروآنتریت، بیماران

مهدی صفاری

کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم،
گروه میکروبیولوژی، قم، ایران

محمد رضا ذوالفقاری

استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه
میکروبیولوژی، قم، ایران

پگاه شکیب

دانشجوی دکتری اپیدمیولوژی ملکولی باکتری ها،
مرکز تحقیقات سلولی-ملکولی، دانشگاه علوم
پزشکی کردستان، سنندج، ایران

سمانه روحی

دانشجوی دکتری اپیدمیولوژی ملکولی باکتری ها،
مرکز تحقیقات سلولی-ملکولی، دانشگاه علوم
پزشکی کردستان، سنندج، ایران

نویسنده مسئول: محمد رضا ذوالفقاری

پست الکترونیک: microbiol_sci@yahoo.com

تلفن: ۰۹۳۵۳۹۲۹۵۷۵

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه
میکروبیولوژی، قم، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۳۰

ویرایش پایانی: ۹۳/۲/۲۹

پذیرش: ۹۳/۲/۳۱

آدرس مقاله

صفاری م، ذوالفقاری م ر، شکیب پ، روحی س " شیوع *E. coli* O157:H7 جداسازی شده از بیماران گاستروآنتریت حاد

مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۵): ۱۱۹-۱۲۳

مقدمه

اشریشیا کلی یکی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که بطور طبیعی در روده بزرگ کلونیزه می شود و یکی از شایع ترین علل عفونت های باکتریایی از جمله گاستروآنتریت و اسهال باکتریایی می باشد (۱). این باکتری بوسیله مکانیسم های مختلف سبب اسهال حاد یا مزمن در افراد می شود، از جمله این مکانیسم ها می توان به تولید انتروتوکسین در سویه های انتروتوکسیژنیک، چسبیدن به سلول های مخاطی روده کوچک و ایجاد اسهال همه گیر و آندمیک در شیرخواران در سویه های آنروپاتوژنیک، از طریق تهاجم و در نتیجه آن به وجود آمدن التهاب و اسهال دیسانتریک در سویه های آنرواینواسیو و با تولید سیتوتوکسین در سویه های انتروهموراژیک که سبب کولیت هموراژیک بدون تب و حضور گلبول های سفید در مدفوع می شود و یا از طریق چسبیدن به مخاط در سویه های آنروآگرگاتیو اشاره نمود (۲). Islam و همکاران (۲۰۰۷) در بنگلادش نشان دادند که از تعداد ۴۱۰ نمونه مدفوع جمع آوری شده ۹ مورد باکتری به عنوان *E. coli* O157:H7 شناخته و از بیماران دارای اسهال آبکی جداسازی شدند (۴). نهایی و همکاران (۱۳۸۶) در ایران نشان دادند که از میان ۱۰۲۰ نمونه مدفوع جمع آوری ۱۵ نمونه باکتری *E. coli* O157 شناسایی شد و کلیه سویه های اشریشیا کلی انتروهموراژیک جدا شده متعلق به گروه سنی کودکان زیر ۵ سال بودند (۵). با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت این بیماری و ارتباط *E. coli* O157:H7 ضرورت شناسایی و بررسی بیشتر در ارتباط با شیوع این باکتری در سنین و جوامع مختلف و شناسایی منشا و انتقال آن به انسان وجود دارد. هدف از این پژوهش بررسی شیوع *E. coli* O157:H7 جداسازی شده از بیماران گاستروآنتریت یا اسهال حاد با روش های کشت و سرولوژی بود.

روش بررسی

تعداد ۲۱۴ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به گاستروآنتریت حاد یا اسهال شدید از تمام گروه های سنی مراجعه کننده به بیمارستان امام حسین، بیمارستان دکتر غرضی، بیمارستان مهر و همچنین افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه های بالینی

شهرستان ملایر از خرداد تا آبان ماه سال ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. مشخصات هر بیمار در پرسشنامه ای شامل سن جنس و بستری یا غیر بستری بودن، منابع احتمالی مواد غذایی (نظیر گوشت چرخ کرده، سوسیس، همبرگر، شیر خام، پنیر محلی، ماست محلی، میوه، سبزیجات و منبع آب مصرفی) که بیمار با آن در تماس بود ثبت شده. به منظور غنی سازی نمونه ها، ابتدا نمونه ها بر روی محیط های کشت تریپتیکاز سوی برات Tryptic soy broth (TSB) (مرک، آلمان) و اشریشیا کلی برات *Escherichia coli* broth (ECB) (مرک، آلمان) حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر نوویوسین (های مدیا، هند) کشت داده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری انجام شد. (۵،۳).

نمونه های غنی شده در دو محیط ECB و TSB پس از گرمخانه گذاری بطور جداگانه بر روی محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار Sorbito macconkey agar (SMAC)

(مرک، آلمان) حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفکسیم Cefixime (های مدیا، هند) و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تلوریت پتاسیم Potassium tellurite (مرک، آلمان) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کلونی های سوربیتول منفی (کلونی های بی رنگ) خالص سازی شد و به منظور تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری جداسازی شده، کلونی های به دست آمده در مرحله قبل در محیط های ویولت رد بایل آگار Violet (VRBA) red bile agar (مرک، آلمان) و ائوزین متیلن بلو آگار Eosin methylene blue (EMB) (مرک، آلمان) کشت داده شد (۵). برای تعیین فعالیت گلوکوروئیدازی، کلونی های دارای جلای سبز فلزی در محیط EMB روی محیط کروم آگار Chrom agar (مرک، آلمان) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شدند. ظهور کلونی های ارغوانی رنگ روی این محیط نشان دهنده وجود *E. coli* O157:H7 می باشد (۵،۳). به منظور تأیید نهایی باکتری های سوربیتول منفی و بتاگلوکوروئیداز منفی از تست آگلوتیناسیون Agglutination با آنتی سرم Antiserum

کرده بود. همچنین آخرین نمونه ای *E. coli* O157:H7 مربوط به نوزاد دختر ۱۱ ماهه بود که ۳ تا ۵ روز قبل از بروز اسهال حاد از آب میوه سیب استفاده کرده بود.

بحث

عوامل باکتریایی حدود ۲۴ درصد از اسهال ها را ایجاد می کنند و بیش از ۷۰ درصد مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال در اثر بیماری های اسهالی اتفاق می افتد. باکتری گرم منفی روده ای *اشریشیا کلی* عامل حدود ۰/۶ تا ۲/۴ درصد از موارد اسهالی بوده و ۱۵ تا ۳۶ درصد از موارد اسهال خونی مربوط به *E. coli* O157:H7 می باشد (۶). در این مطالعه از مجموع ۲۱۴ نمونه با استفاده از آنتی سرم O157:H7، ۴ (۱/۸۷٪) نمونه به عنوان *E. coli* O157:H7 تایید شدند. Konno و همکاران (۲۰۱۲) طی شیوع اسهال در ژاپن به وسیله آزمون های بیوشیمیایی و PCR که روی ۱۹ نمونه مدفوع جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد، ۱۶ نمونه مدفوع از کارکنان رستوران و ۱۰ نمونه محیطی در گروه های سنی مختلف انجام دادند موفق به جداسازی یک نمونه *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک از نمونه های مدفوع افراد بیمار شدند (۷). در پژوهش حاضر از ۲۱۴ نمونه اسهال حاد جمع آوری شده ۱۲۵ (۵۸/۴۱٪) نمونه مربوط به کودکان زیر ۵ سال و ۸۹ (۴۱/۵۹٪) نمونه مربوط به سایر گروه های سنی بود. بیشترین موارد اسهال حاد و عوارض ناشی از آن در کودکان و به ویژه در کودکان کمتر از ۵ سال اتفاق می افتد و از علل عمده مرگ و میر و سوء تغذیه و عقب ماندگی های جسمی و ذهنی در کودکان است (۸). همچنین کارگر و همکاران (۱۳۹۲) در ایران از ۴۲۸ نمونه همبرگر، ۵ (۱/۱۷٪) نمونه را به عنوان *E. coli* O157:H7 شناسایی کردند و به این ترتیب نشان دادند این باکتری در محصولات حیوانی مصرف شده توسط انسان نیز قادر به خطر انداختن سلامت می باشد (۹).

در اکثر مطالعات بیشترین شیوع این سویه در فصل گرم سال گزارش شده و بطور کلی عفونت ایجاد شده با *E. coli* O157:H7 به عنوان بیماری تابستانی در نظر گرفته می شود. در این پژوهش نیز جمع آوری نمونه ها در ماه های گرم سال یعنی در خرداد ماه تا آبان ماه انجام شد. متأسفانه در مورد فراوانی این باکتری اطلاعات محدودی در ایران وجود دارد

اختصاصی O157:H7 استفاده گردید (بهار افشان، ایران) (۵). محاسبات آماری ارتباط بیماری و جنس، سن و بستری بودن یا نبودن بیمار به وسیله نرم افزار SPSS 18 و با استفاده از آزمون های من-ویتنی (آزمون u) ($p < 0/05$) انجام شد.

یافته ها

کشت نمونه های سوربیتول منفی بر روی محیط های انتخابی VRBA و EMB نشان داد که ۲۶ (۱۲/۱۵٪) نمونه تخمیر لاکتوزشان مثبت بود و به عنوان *E. coli* تایید شدند. از نمونه هایی که در آنها تخمیر لاکتوز صورت گرفته بود در محیط کروم آگار اختصاصی O157 کشت داده شد که ۱۴ (۶/۵۴٪) نمونه بتا گلوکورونیداز منفی بودند که این تعداد از نمونه ها به عنوان *E. coli* O157 تایید گردید و در نهایت با استفاده از آنتی سرم O157:H7 از ۱۴ نمونه ای که بتا گلوکورونیداز منفی بودند ۴ (۱/۸۷٪) نمونه به عنوان *E. coli* O157:H7 تایید شدند.

کمترین سن بیمار نوزادی ۸ ماهه و بیشترین سن بیمار فردی ۷۰ ساله بود. بیشترین تعداد نمونه های جمع آوری شده مربوط به کودکان کمتر از ۴ سال و در بین محدوده های سنی دیگر بیشترین تعداد نمونه های جمع آوری شده مربوط به افراد مسن و بالای ۵۲ سال بود. از ۲۱۴ نمونه جمع آوری شده ۱۶۲ (۷۵/۷٪) نمونه مربوط به بیماران غیر بستری و ۵۲ (۲۴/۰۳٪) نمونه نیز مربوط به بیماران بستری بود. از ۴ نمونه ای که از آنها سویه انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* جدا شد ۳ (۷۵٪) نمونه مربوط به بیماران سرپایی و تنها ۱ (۲۵٪) نمونه مورد مربوط به بیماران بستری شده در بیمارستان بود. و جداسازی باکتری ارتباط معنی داری وجود نداشت ($p > 0/05$). اولین نمونه ای که حاوی باکتری *E. coli* O157:H7 بود مربوط به نوزاد دختر ۸ ماهه بود که ۳ تا ۵ روز قبل از بروز اسهال از شیر مادر استفاده کرده و تنها ماده مصرفی نوزاد شیر مادر بوده است. دومین نمونه اسهال حاد که باکتری *E. coli* O157:H7 بود که مربوط به پسری ۴۴ ماهه بود، این کودک در حدود ۳ تا ۵ روز قبل از بروز اسهال حاد پنیر محلی مصرف کرده بود. سومین نمونه نیز مربوط به مردی ۶۲ ساله که در حین آبیاری مزرعه یونجه که در نزدیکی محل نگهداری دام هایش ۳ تا ۵ روز قبل از بروز اسهال حاد برای نوشیدن از آب چاه استفاده

E. coli O157:H7 تایید شدند. همچنین بیشترین میزان شیوع این بیماری در کودکان زیر ۵ سال دیده شد که ۵۸/۴۱ درصد از کل بیماران را تشکیل دادند. با توجه به تحقیقات انجام شده و نتایج ما، منابع آب و مواد غذایی آلوده تاثیر بسزایی در شیوع اسهال بوجود آمده توسط *E. coli* O157:H7 داشتند. از آنجایی که تشخیص این باکتری در شروع اسهال کمک شایانی به درمان و نجات بیماران می کند، بنابراین توصیه می شود که در آزمایشگاه های بالینی از روش های ساده تر، دقیق تر و با هزینه کمتر جهت شناسایی این باکتری استفاده شود.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاران و مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که در این پژوهش ما را یاری نمودند اعلام می دارند.

زیرا اغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی به صورت روزمره این ارگانیزم را ردیابی نمی کنند و نتایج اغلب پژوهش های انجام شده نشان دهنده حضور موارد تک گیر باکتری می باشد. بنابراین توصیه می شود که در آزمایشگاه های بالینی نیز محیط کشت های کروم آگار و سوربیتول مک کانکی آگار و آنتی سرم های اختصاصی را برای تشخیص دقیق *E. coli* O157:H7 استفاده کنند. زیرا یکی از جدیدترین روش های شناسایی سریع عوامل بیماریزا در آب و مواد غذایی محیط های کشت کروموژن است. با توجه به موارد ذکر شده بررسی بیشتر جهت شناسایی و رفع منابع و عوامل موثر در شیوع این بیماری مورد نیاز است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که از ۲۱۴ نمونه مدفوع بیمار مبتلا به اسهال شدید ۱/۸۷ درصد از آن ها به عنوان

References

- Xia X, Meng J, McDermott P, Ayers S, Blickenstaff K, Tran T, et al. *Presence and characterization of shiga toxin producing Escherichia coli and other potentially Diarrheagenic E. coli in retail meats*. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(6): 1709-717.
- Morris SK, Bassani DG, Awasthi S, Kumar R, Shet A, Suraweera W, et al. *Diarrhea, pneumonia, and infectious disease mortality in children aged 5 to 14 years in india*. PLoS ONE. 2011; 6(51): e20119.
- Stampi S, Caprioli A, De Luca G, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F. *Detection of Escherichia coli O157 in bovine meat products in northern Italy*. Int J Food Microbiol. 2004; 90(3): 257-262.
- Islam MA, Heuvelink AE, de Boer E, Sturm PD, Beumer RR, Zwietering MH, et al. *Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli Isolated From Patients with Diarrhoea in Bangladesh*. J Med Microbio. 2007; 56(Pt 3): 380-85.
- Nahaei M, Akbari Dibavar M, Sadeghi J, Nikvash S. *Frequency of enterohaemorrhagic Escherichia coli isolated from patients with acute diarrhea in Tabriz hospitals*. Iranian J Med Microbiolo. 2007; 1(3): 39-46.[Persian]
- Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. *Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin producing E.coli O157:H7 strains from meats purchase in Shiraz*. HBI_Journals –ISMJ. 2011; 14(2): 76-83.[Persian]
- Mohsin M, Hussain A, Butt MA, Bashir S, Tariq A, Babar S, et al. *Prevalence of Shiga Toxin- Producing Escherichia coli in Diarrheal Patients in Faisalabad Region of Pakistan as Determined by Multiplex PCR*. J Infect Developing Countries. 2007; 1(2): 164-69.
- Konno T, Yatsuyanagi J, Takahashi S, Kumagai Y, Wada E, Chiba M, et al. *Isolation and Identification of Escherichia albertii from a Patient in an Outbreak of Gastroenteritis*. Jpn J Infect Dis. 2012; 65(3): 203-7.
- Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM. *Nelson text book of pediatrics*. 16th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. 2000; 765-842.
- Kargar M, Dianati P, Homayoon M, Jamali H. *Isolation, Eharacterization and Antibiotic Resistance of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Hamburger and Evolution of Virulence Genes stx1 , stx2 , eaeA and hly by Multiplex PCR*. J Fasa Univ Med Sci. 2013; 3(31): 208-14. [Persian]

Prevalence of *E. coli* O157: H7 Isolated from Patients with Acute Gastroenteritis**Safaari, M. (MSc)**

MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Iran

Zolfaghari, MR. (PhD)

Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Iran

Shakib, P. (MSc)

PhD Student of Molecular Epidemiology of Bacteria, Cellular & Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Rouhi, S. (MSc)

PhD Student of Molecular Epidemiology of Bacteria, Cellular & Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Corresponding Author: Zolfaghari, MR.**Email:** microbiol_sci@yahoo.com**Received:** 19 Apr 2014**Revised:** 19 May 2014**Accepted:** 21 May 2014**Abstract****Background and Objective:** Diarrheal diseases may occur in all age groups, worldwide. *Escherichia coli* (*E. coli* O157: H7) is one of the most important bacterial agents causing this disease. The purpose of this study was to assess the prevalence of diarrhea in patients with acute diarrhea caused by this bacterium.**Material and Methods:** In this study, 214 stool samples were collected from acute diarrheic patients in hospitals and clinical laboratories of Malayer city, Iran. The samples were cultured in rich, differentiation, specific and selective medium. To detect *E. coli* O157: H7, rapid detection method and antisera were used**Results:** In 12.15% of the samples, lactose fermentation was observed and *E. coli* was affirmed. The results of lactose positive samples showed that 6.54% were negative- β - Glucuronidases and were confirmed as *E. coli* O157. Finally, by using O157: H7 antisera, 1.87% of 14 samples that were negative- β -Glucuronidases were asserted as *E. coli* O157.**Conclusion:** based on the results, the prevalence of *E. coli* O157: H7 is higher in children and elders than the others. Food and water play a significant role in transferring *E. coli*.**Keywords:** Prevalence, *E. coli* O157: H7, Gastroenteritis, Patients