Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی، بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی‌های تولید کننده توکسین شیگا و اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن و زنیان علیه آن‌ها

دکتر ندا یعقوب‌زاده[۱]، دکتر عبدالغفار اونق[*۲]، دکتر کریم مردانی[۳]، دکتر محمد خلیلی[٤]، دکتر امیر توکمه‌چی[٥]، پویان نیک بخش[٦]

تاریخ دریافت ۹۰/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۹۰/۰٤/۰۳

چکیده

پیش زمینه و هدف: اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیگا (STEC)، یک بیماری‌زای نوپدید و مشترک بین انسان و دام است. دامنه‌ی عفونت‌هایی که توسط این باکتری ایجاد می‌شود از اسهال تا سندرم اورمی همولیتیک متغیر است. بر این اساس هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی، بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی‌های تولید کننده توکسین شیگا با منشاء دامی و ارزیابی خواص ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن و زنیان علیه آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار: تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع گاومیش از مناطق مختلف آذربایجان غربی جمع آوری و با استفاده از فن PCR وجود ژن‌های تولید کننده توکسین شیگا (stx1 و stx2) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بررسی گردید و نیز تاثیر اسانس‌های آویشن و زنیان بر باکتری فوق به روش انتشار دیسک مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۹۰ جدایه اشریشیا کلی تعداد ۱۳ جدایه تولید کننده توکسین شیگا (۶/۸ درصد) شناسایی شد. سه جدایه (۲۳/۲ درصد) حامل هر دو ژن stx1 و stx2، پنج جدایه (۳۸/۴ درصد) حامل ژن stx1 و پنج جدایه دیگر (۳۸/۴ درصد) حامل ژن stx2 بودند. در بررسی الگوی مقامت آنتی بیوتیکی، تمامی جدایه‌ها دارای مقاومت چندگانه نسبت به اریترومایسین، نئومایسین، استرپتومایسین و آمپی سیلین بودند، و ۸۴/۴ درصد سویه‌ها نسبت به تتراسایکلین و سفوتاکسیم حساس بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های حاصل از این بررسی نتیجه گیری می‌شود که در ایران گاومیش می‌تواند به‌عنوان یکی از ذخایر STEC مطرح باشد. همچنین استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند آویشن و زنیان با توجه به تاثیر ضدباکتریایی می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری از ایجاد سویه‌های مقاوم داشته باشند.

کلید واژه‌ها: اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیگا (STEC)، PCR، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، اسانس آویشن، اسانس زنیان

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره سوم، ص ۲۶۹-۲۶۲، مرداد وشهریور ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: ارومیه، پردیس نازلو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۴۴۱-۲۹۷۲۶۵۰، همراه: ۰۹۱۴۴۴۳۲۰۷۵

Email: ownagh@yahoo.com

مقدمه

اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیگا[۷] به عنوان یکی از بیماری‌زاهای با منشاء غذایی[۸] و زئونوتیک[۹] (مشترک بین انسان و دام) مطرح است (۲۷،۲۶،۸،۵،۴). دامنه‌ی عفونت‌هایی که توسط اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیگا (STEC) در

---

[۱] دانشجوی دکترای تخصصی میکربیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه و عضو گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه

[۲] استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۳] استادیار اپیدمیولوژی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٤] استادیار میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[٥] استادیار میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه

[٦] دانش آموخته کارشناسی میکروبیولوژی

[۷] Shiga toxin-producing Escherichia coli

[۸] Food Borne

[۹] Zoonotic

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

انسان ایجاد می‌شود، از یک التهاب معدی و روده‌ای[1] تا التهاب قولون خونریزی دهنده[2] (که می‌تواند به سندرم اورمیک همولیتیک[3] تبدیل شود) متغییر است. همچنین یکی از مهم‌ترین دلایل نارسایی حاد کلیوی[4] به‌خصوص در بچه‌ها و پورپورای ترومبوتیک ترمبوسیتوپنیک (TTP) این باکتری است (۲۷،۲۸،۲۲،۱۶،۱۲).

سویه‌های STEC به واسطه‌ی تولید یک یا تعداد زیادتری از انواع توکسین شیگا STX شناخته می‌شوند. STX که دارای دو نوع اصلی STX1 و STX2 می‌باشد، توسط ژن‌های کروموزومی stx1 و stx2 که طی فرایند ترانسدوکسیون از طریق باکتریوفاژها به ژنوم باکتری انتقال می‌یابند، کد می‌شوند. این توکسین‌ها با مهار تولید پروتئین، منجر به مرگ سلول می‌شوند (۲۴).

در اکثر نقاط دنیا نشخوارکنندگان خصوصاً گاو و گوسفند به عنوان مخازن STEC مطرح هستند (۷،۸،۴)، انتقال باکتری به انسان اغلب از طریق آب آشامیدنی، فرآورده‌های لبنی و گوشت آلوده به مدفوع حیوانات مخزن صورت می‌گیرد (۲۵،۳۰،۲۰).

در کشور ما مطالعات زیادی پیرامون جداسازی این سویه از مدفوع گاو و فراورده‌های لبنی آن انجام گرفته است. اما هیچ‌گونه پژوهشی مبنی بر این‌که گاومیش نیز می‌تواند به عنوان یکی از ذخایر STEC مطرح باشد صورت نگرفته است. گاومیش به دلیل نقش مهمی که از نظر تولید گوشت و محصولات لبنی دارد از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. از طرفی با توجه به گسترش عفونت‌های ناشی از STEC و افزایش احتمال مقاومت آنتی بیوتیکی در آن‌ها و نظر به ضایعات شدیدی که در انسان، به‌خصوص کودکان پدید می‌آورند همچنین افزایش روز افزون مقاومت‌های آنتی بیوتیکی و عوارض مصرف آن‌ها در دام وانسان تلاش برای یافتن روش‌های جایگزین طبیعی برای درمان این عفونت‌ها اجتناب ناپذیر می‌باشد. یکی از راه‌های جایگزین، استفاده از گیاهان دارویی بوده و بر این اساس هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی مولکولی، بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی‌های تولید کننده توکسین شیگا با منشا دامی و ارزیابی خواص ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن و زنیان علیه آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: در این بررسی تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع گاومیش به صورت کاملاً تصادفی و به مدت پنج ماه از اردیبهشت تا مهر ۱۳۸۸ با رعایت شرایط استریل از گاومیش‌های موجود در مناطق مختلف آذربایجان غربی جمع آوری شد. سپس نمونه‌های مدفوع توسط محیط انتقالی (بافر PBS استریل) در اسرع وقت و در کنار یخ به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انتقال یافتند.

بررسی‌های باکتری شناسی: بلافاصله پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه مقدار ۵ تا ۱۰ گرم از هر نمونه مدفوع، به لوله‌های حاوی ۵ تا ۱۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت مغذی[5] (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷°C و شرایط هوازی گرمخانه گذاری گردید. سپس لوله‌ها به صورت روزانه به منظور رشد باکتری بررسی و در صورت مشاهده کدورت از محتویات هر لوله ۵۰ میکرولیتر به محیط مک کانکی آگار (مرک، آلمان) منتقل و کشت خطی انجام شد. بلافاصله پلیت‌ها با همان شرایط گرمخانه گذاری شده و کلنی‌های لاکتوز مثبت برای انجام مراحل دیگر تشخیص انتخاب شدند. در این بررسی جهت شناسایی جدایه‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی اوره، اندل، متیل رد، وژه - پرسکور و سیمون سیترات استفاده شد (۲).

تشخیص مولکولی جدایه‌ها: در این بررسی برای تشخیص مولکولی جدایه‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[6] استفاده شد. در این روش تشخیص و جدا سازی پاتوتایپ STEC اشریشیا کلی‌های جدا شده بر اساس تکثیر ژن‌های stx1 و stx2 صورت گرفت (۱۵). لازم به ذکر است که از سویه استاندارد(ATCC 4389) E. coli به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل Dnase free به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA: در مطالعه حاضر استخراج DNA با روش جوشاندن[7] انجام گرفت. به طور خلاصه، یک لوپ از کشت تازه و ۱۸ ساعته اشریشیا کلی در محیط آبگوشت مغذی با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و از محلول رویی به عنوان DNA الگو در واکنش PCR استفاده شد.

مراحل واکنش PCR: از جفت پرایمرهای Paton and Paton تغییر یافته توسط فیتزموریس[8] (۲۰۰۳) برای تکثیر ژن‌های ژن‌های stx1 و stx2 استفاده شد. مشخصات این پرایمرها در جدول شماره ۱ اشاره شده است. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مول، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Super Taq DNA polymerase، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی

[1] Gastroenteritis
[2] Hemolytic colitis
[3] Hemorrhagic Uremic Syndrome
[4] Acute Renal Failure
[5] Nutrient Broth
[6] Polymerase Chain Reaction
[7] Boiling Method
[8] Fitzmaurice

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

مول، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها[1] با غلظت ۲۵ میکرومول، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۱/۲ میکرولیتر آب مقطر عاری از DNase بود (۱۱).

برنامه مراحل تکثیر ژن‌های stx1 و stx_2 در سیکل حرارتی شامل، واسرشتی اولیه[2] به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه شامل مراحل انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال به مدت یک دقیقه در ۵۸ درجه سانتی گراد، و گسترش[3] در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، سپس یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱۱).

الکتروفورز محصول PCR: ۵ میکرولیتر از محصول PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲درصد حاوی اتیدیوم بروماید[4] در بافر TBE با غلظت ۰/۵ و با ولتاژ ۶۰ ولت آشکارسازی شد. اندازه باندهای حاصل با استفاده از مارکر مولکولی[5] (Cinnagen, Iran) مشخص گردید. به منظور تهیه عکس از ژل از دستگاه ترانس ایلومیناتور (GelDoc 1000, Fluorescent imaging Bio– Rad system) استفاده شد.

تعیین حساسیت جدایه ها نسبت به اسانس‌ها و انجام آنتی بیوگرام: در این مطالعه از اسانس‌های آویشن و زنیان (باریج اسانس، ایران) و آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین، توبرامایسین، نئومایسین، استرپتومایسین، کانامایسین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، تتراسیکلین و سفوتاکسیم(پادتن طب، ایران) جهت تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش Kirby & Bauer اصلاح شده بر اساس رهنمودهای NCCLS استفاده گردید(۲۱). برای این منظور از روش انتشار دیسک[6] استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا از همه سویه‌های STEC سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند (CFU/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$) تهیه گردید، سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده هر جدایه روی محیط مولر- هینتون آگار (مرک، آلمان) منتقل و به صورت یکنواخت کشت داده شد. در مرحله بعد از دیسک شاهد[7] برای آغشته کردن اسانس آویشن و زنیان (۲۵ میکرولیتر به ازاء هر دیسک) استفاده شد. سپس پلیت‌ها همراه با دیسک‌های آنتی بیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. سرانجام در صورت تشکیل هاله‌ی مهار رشد برای هر جدایه قطر آن با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه گیری شد (برای هر جدایه تست تعیین الگوی مقاومت با سه تکرار انجام گرفت).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS15 انجام شد. اختلاف آماری بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون t-test و آنالیز واریانس یک طرفه[8] انجام گرفت؛ حدود اطمینان مطالعه ۹۵ درصد انتخاب شد.

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد که از مجموع ۱۹۰ باکتری اشریشیا کلی جدا شده تعداد ۱۳ سویه دارای ژن توکسین شیگا (۶/۸ درصد) بودند و به عنوان سویه‌های STEC توسط فن PCR مورد تایید قرار گرفتند. همچنین از میان جدایه‌های STEC، تعداد سه جدایه دارای هر دو ژن stx1 و stx2 (۲۳/۲ درصد)، پنج جدایه دارای ژن stx1 (۳۸/۴ درصد) و تعداد پنج جدایه نیز ژن stx2 (۳۸/۴ درصد) را دارا بودند.

یافته‌های حاصل از تست آنتی بیوگرام نشان داد که تمامی جدایه‌ها الگوی مقاومت چندگانه دارند، به نحوی که تمامی جدایه‌ها (۱۰۰ درصد) به اریترومایسین، نئومایسین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین و ۶۱ درصد آن‌ها نسبت به اریترومایسین، توبرامایسین، نئومایسین، استرپتومایسین، کانامایسین و آمپی سیلین مقاوم بودند. تتراسیکلین و سفوتاکسیم در مقایسه با سایر آنتی بیوتیک‌های استفاده شده اثر مهاری بیشتری علیه سویه‌های جدا شده داشتند طوریکه ۸۴ درصد سویه‌ها نسبت به هر دو آنتی بیوتیک مذکور حساس بودند.

یافته‌های حاصل از بررسی خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن و زنیان نشان داد که همه جدایه‌ها نسبت به اسانس‌های مذکور حساس بوده و هیچ گونه مقاومتی نسبت به آن‌ها دیده نشد. میانگین هاله مهار رشد در مورد آویشن ۲۸/۱۵ mm و زنیان ۲۸/۲۳ mm بود. میانگین قطر هاله مهار رشد تتراسیکلین و سفوتاکسیم که به طور معنی داری نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های مطالعه شده بیشتر بود به ترتیب برابر با ۱۹/۷ و ۱۸/۹ میلی متر می‌باشد (جدول ۲).

[1] Forward and Reverse Primers
[2] Denaturation
[3] Extention
[4] Ethidium Bromide
[5] Molecular Ladder
[6] Disk Difussion Test
[7] Blank
[8] One way analysis of variance (ANOWA)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

جدول شماره (۱): توالی، اندازه پرایمرها و ژن هدف

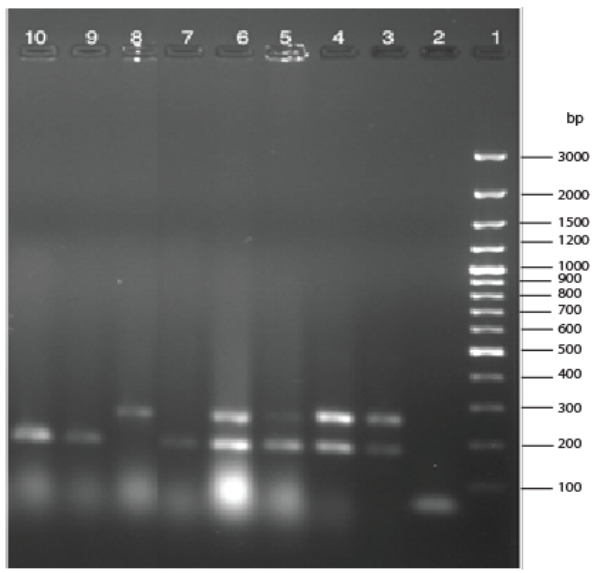
پرایمر	توالی	ژن هدف	اندازه محصول PCR	منبع
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	Stx1	۱۸۰	Paton and Paton (1989);
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC			modified by Fitmaurice (2003).
stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Stx2	۲۵۵	Paton and Paton (1989);
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCT			modified by Fitmaurice (2003).

جدول شماره (۲): میانگین قطر هاله مهار رشد اسانس‌ها (آویشن و زنیان) و آنتی بیوتیک‌های مختلف علیه جدایه‌ها و نیز تفسیر آن‌ها براساس جداول NCCLS(۲۲).

ردیف	ماده	میانگین قطر هاله مهار رشد (mm)	تفسیر
۱	اسانس آویشن	۲۸/۱۵*	S**
۲	اسانس زنیان	۲۸/۲۳	S
۳	تتراسیکلین	۱۹/۷۰	S
۴	سفوتاکسیم	۱۸/۹	S
۵	کانامایسین	۱۵/۱۴	I
۶	توبرامایسین	۱۵	S
۸	نئومایسین	۱۴	R
۹	استرپتومایسین	۱۵	R
۱۰	اریترومایسین	۱۳	R
۱۱	آموکسی سیلین	۱۴	R
۱۲	آمپی سیلین	۱۲	R

* اعداد به صورت میانگین سه تکرار نشان داده شده‌اند.

S= حساس، I=متوسط، R= مقاوم



تصویر شماره (۱): الکتروفورز محصول PCR ژن‌های stx1 و stx2. شماره ۱ مارکر (Ladder) با وزن مولکولی bps ۱۰۰، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳ کنترل مثبت برای ژن‌های stx1 و stx2، شماره ۴، ۵ و ۶ نمونه‌های بالینی مثبت برای stx1 و stx2، شماره ۷، ۹ و ۱۰ نمونه‌های بالینی مثبت برای stx1 و شماره ۸ نمونه بالینی مثبت برای stx2

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیگا تهدید بزرگی برای سلامت عمومی و یک مشکل جدی در عرصه اقتصاد محصولات لبنی محسوب می‌گردد. با توجه به اهمیت بیماری حاصل از سویه STEC اشرشیا کولی به ویژه در کودکان، پیشگیری از عفونت با این پاتوژن دارای اهمیت می‌باشد. از این رو، تشخیص مخازن آلودگی و درمان عفونت در دام‌هایی که به عنوان ذخایر این سویه مطرح می‌باشند، می‌تواند اقدامی اساسی در زمینه‌ی پیشگیری از عفونت با STEC باشد. بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا اهمیت نشخوار کنندگان مانند گاو و گوسفند را به عنوان منابع آلودگی این باکتری در طبیعت ثابت نموده است، اما اطلاعات محدودی در مورد نقش گاومیش به عنوان یک مخزن وجود دارد. بر این اساس مطالعه حاضر نخستین پژوهشی است که وجود STEC را در گاومیش و در ایران به اثبات می‌رساند. مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط دنیا نشان می‌دهد که گاومیش می‌تواند مخزن مهمی برای STEC باشد. برای مثال اسلام و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان شیوع STEC را در گاومیش‌های ذبح شده در بنگلادش ۳۷/۹ درصد گزارش کردند(۱۵). در مطالعه دیگر الیویرا و همکاران در سال۲۰۰۷ برای نخستین بار وجود STEC را در گاومیش در برزیل اعلام نمودند، این محققان نشان دادند میزان شیوع این سویه بسته به نوع مزرعه بین صفر تا ۶۴ درصد متغیر است(۲۳). در مطالعه دیگری که توسط مانا و همکاران در سال ۲۰۰۶ در هند انجام گرفت STEC از دو درصد گاوهای کشتار شده و ۷/۶ درصد گوساله‌های مبتلا به اسهال جدا شد(۱۷). در بررسی حاضر میزان شیوع این باکتری در گاومیش‌های آذربایجان غربی ۶/۸ درصد گزارش گردید. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات سایر محققان همخوانی دارد. منصوری نژاد و همکاران در سال ۲۰۰۷ فراوانی این سویه را در پنیرهای تهیه شده از شیر خام گاو در کرمان چهار درصد گزارش نمودند(۱۸). همچنین در همدان علیزاده و همکاران در سال ۲۰۰۷ فراوانی STEC را در بیماران مبتلا به اسهال حاد ۱۰/۴ درصد اعلام کردند(۳). علی‌خانی و همکاران در سال ۲۰۰۷ طی مطالعه‌ای در مورد شیوع این پاتوژن در بیماران اسهالی و افراد غیر اسهالی در آبادان، میزان شیوع این باکتری را به ترتیب در بیماران اسهالی ۸/۷ درصد و در افراد غیر اسهالی دو درصد گزارش کردند(۲). مقایسه نتایج حاصل از مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام گرفته در ایران بیانگر این واقعیت است که میزان شیوع STEC در ایران پایین بوده و این نکته می‌تواند به دلیل شرایط جغرافیایی، عادات غذایی، تفاوت در فلور و وجود آنتی بادی‌های طبیعی در بدن حیوانات و انسان باشد. هرچند میزان شیوع STEC در ایران پایین است اما به دلیل اهمیت بالینی اشریشیا کلی‌های تولید کننده توکسین شیگا و پیدایش سویه‌های جدید و مقاوم به آنتی بیوتیک، لازم است این سویه مورد توجه و اهمیت بیشتری قرار گیرد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر در زمینه تعین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی STEC نشان داد که تمامی جدایه‌ها الگوی مقاومت چند گانه‌ای نسبت به آنتی بیوتیک‌های بررسی شده دارند و نسبت به آموکسی سیلین، نئومایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین مقاوم هستند. در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۰۷ دراصفهان توسط فاضلی و همکاران انجام گرفت ۶۶درصد سویه‌های STEC جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال نسبت به سه آنتی بیوتیک رایج یعنی آموکسی سیلین، تتراسایکلین و تری متوپریم سولفومتوکسازول مقاوم بودند(۱۰). همچنین در مطالعه اکبری و همکاران در سال ۱۳۸۷، ۴۴/۴ درصد از سویه‌های جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، الگوی مقاومت چندگانه داشتند(۱). با توجه به نتایج حاصل از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمده در مطالعه حاضر، در صورت عدم وجود برنامه درمانی مناسب در دام‌ها، احتمال انتقال این آلودگی به انسان افزایش یافته و ممکن است مشکل مقاومت‌های آنتی بیوتیک از طریق مصرف گوشت و محصولات لبنی که حاوی باقیمانده‌های دارویی هستند در انسان مشکل ساز باشد. بر اساس آنچه که ذکر شد تلاش برای یافتن راه‌های جایگزین مانند استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان اینگونه عفونت‌ها لازم به نظر می‌رسد. با توجه به ماهیت طبیعی گیاهان دارویی یعنی سازگاری بیشتر با بدن و عدم وجود عوارض جانبی باعث شده که انسان طی سالیان متمادی از آن‌ها برای درمان بیماری‌ها مختلف استفاده نماید. از طرف دیگر در ایران نیز اساس طب سنتی استفاده از گیاهان دارویی بوده، بنابراین در بررسی حاضر خاصیت ضدباکتریایی اسانس دو گیاه آویشن و زنیان مورد مطالعه قرار گرفت. یافته‌های حاصل نشان داد همه سویه‌های STEC جدا شده نسبت به این اسانس‌ها حساس بودند و هیچ سویه مقاومی در میان جدایه‌ها مشاهده نشد. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای پیرامون خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌ها علیه اشریشیا کلی‌های تولید کننده توکسین شیگا صورت نگرفته است. از طرف دیگر مطالعات بسیاری تاثیر ضدباکتریایی اسانس آویشن را علیه باکتری‌های مختلف ثابت می‌نماید. ایملوان و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند اسانس آویشن خاصیت ضد باکتریایی خوبی علیه سویه‌های دیگری از اشریشیا کلی داشته ولی تاثیری بر استافیلوکوکوس اورئوس[1]

[1] Staphylococcus aureus

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

ندارد(۱۴). توکمه‌چی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که اسانس آویشن و زنیان قادر است رشد باکتری Aeromonas hydrophila را مهار نماید، در مطالعه آن‌ها حداقل غلظت مهار رشد (Minimal Inhibittory Concentration) اسانس‌ها به ترتیب ۳۱۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عنوان شده است(۲۹).

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که در ایران گاومیش می‌تواند به عنوان یکی از ذخایر STEC مطرح باشد. با توجه به اهمیت بالینی این سویه به ویژه در کودکان و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شده در این باکتری نوپدید، لزوم انجام مطالعات تشخیصی گسترده و اصلاح برنامه تجویز آنتی بیوتیک پیشنهاد می‌شود. هرچند تاثیر اسانس‌های آویشن و زنیان علیه این باکتری حائز اهمیت است، اما کاربرد بالینی این اسانس‌ها نیازمند بررسی‌های میدانی بوده و در صورت کسب نتایج مطمئن می‌توان آن‌ها را به عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات جناب آقای علی کاظم نیا کارشناس محترم بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر مساعدت در انجام کارهای عملی تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه ارومیه، وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری ابراز می‌دارند.

References:

1. Akbari A, Pourmand M, Saneai fard F, Soltan Dallal M. Identification of Shiga toxin producing Escherichi coli in specimen of Diarrhea in child under five years old. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2009; 17 (4):279-84. (Persian)
2. Alikhani MY, Mirsalehian A, Fatollahzadeh B, Poursharifie MR, Aslani MM. Prevalence and characteristics of Shiga toxin- producing E. coli (S) serotypes isolated from subjects with and without Diarrhea. J Health Popul Nutr 2007; 25(1): 88-93.
3. Alizadeh AHM, Behrouz N, Salmanzadeh S, Ranjbar M, Azimian MH, Habibi, Jaafari F, et al. Escherichia coli, Shigella and Salmonella species in acute diarrhoea in Hamedan, Islamic Republic of Iran. Health J 2007; 13(2): 243-9.
4. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol 1993; 31: 2483-8.
5. Bielaszewska M, Karch H. Non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. World J Microbiol Biotechnol 2000; 16: 711-18.
6. Caplin JL, Allan I, HanlonGW. Enhancing the in vitro activity of Thymus essential oils against Staphylococcus aureus by blending oils from specific cultivars. Int J Essential Oil Therap 2009; 3: 35-9.
7. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. A 1-year study of Escherichia coli O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol Infect 1997; 119: 245-50.
8. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramalia M, Godofredo E, et al. Verocytotoxin producing Escherichiacoli O157 in minced beef and dairy products in Italy. Int J Food Microbiol 2004; 96: 67-73.
9. Ebrahimi Nejad S, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of Thymus caramanicus at different phonological stages. Food Chem 2008; 110: 927-31.
10. Fazeli H, Saheli R. Antibiotic resistance pattern in Shiga toxin producing Escherichia coli from

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017

diarrhoeal Patients in Al-Zahra Hospital, Isfahan, Iran. Res Pharm Sci 2007; 2: 29-33. (Persian)

11. Fitzmaurice J. Molecular diagnostic assay for Escherichia coli O157:H7. Ireland: National University of Ireland Press; 2003.P. 26-43
12. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 1991; 13: 60-98.
13. Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review Vet Microbiol 1992; 31: 221-233.
14. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, Bachiri AE. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco. Int J Agric Biol 2009; 11: 205-8.
15. Islam MA, Mondol AS, de Boer E, Beumer ER, Zwietering MH, Talukder KA, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli isolates from Slaughtered Animals in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 2008; 74(17): 5414-21.
16. Karmali MA. Infections by verotoxin-producing Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 15-38.
17. Manna SK, Brahmane MP, Manna C, Batabyal K, Das R. Occurrence, virulence characteristics and antimicrobial resistance of Escherichia coli O157 in slaughtered cattle and diarrhoeic calves in West Bengal, India. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 405-9.
18. Mansouri-Najand L, Khalili M. Detection of shiga-like toxigenic Escherichia coli from raw milk cheeses produced in Kerman-Iran. Vet Arhiv 2007; 77(6): 515-22.
19. Mehrgan H, Mojab F, Pakdaman S, Poursaeed M. Antibacterial activity of thymus pubescens methanolic extract. Iran J Pharm Res 2008; 7(4): 291-5.(Persian)
20. Meng J, Doyle MP. Microbiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli in foods. American Society for Microbiology; 1998. P. 92-108.
21. National Committee Clinical Laboratory Standards(NCCLS). Performans for antimicrobial disk. Susceptibility Tests. Wayne (PA): The Institute; 2003. P. 1-42
22. Mohammad A, Peiris GSM, Wijetwanta WA. Serotypes of verocytotoxigenic Escherichia coli from cattle and buffalo calf diarrhea. FEMS Microbiol Lett 1986; 35: 261-5.
23. Oliveira MG, Brito JRF, Carvalho RR, Guth BEC, Gomes TAT, Vieira MAM, et al. Water Buffaloes (Bubalus bubalis) Identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing Escherichia coli in Brazil. APPL Environ Microbiol 2007; 73(18): 5945-8.
24. Paton JC, PatonAW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 450-79.
25. Pennington TH. VTEC: lessons learned from British out breaks. J Appl Microbiol 2000; 88: 90-8.
26. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WA. Shiga toxin producing Escherichia coli and hemolytic uremic syndrome. Lancet 2005; 365: 1073-86.
27. Tarr PI. Escherichia coli O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin Infect Dis 1995; 20: 1-8.
28. Tarr PI, Neill MA. The problem of non-O157 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli. J Infect Dis 1996; 174: 1136-9.
29. Tukmechi A, Malakinejad H, Bazargani gilani B, Ebrahimi H. Antibacterial activity of Zataria

producing Escherichia coli O157 in beef burgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. Lett App Microbiol 1994; 19: 304-7.

moltiflora and Carum copticum essential oil on Aeromonas hydrophilla. Guilan: 11th Iranian Microbiology Congress; 2010. P. 35 (Persian)

30. Willshaw GA, Thirlwell J, Jones AP, Parry S, Salmon RL, Hickey M. Vero cytotoxin-

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:46 +0330 on Sunday December 24th 2017