

بررسی مولکولی مقاومت آنزیمی بتالاکتامازی ژنهای CTX-M، TEM و SHV در جدایه‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های شیرینی سنتی یزد

محمد مهدی سلطان دلال^۱، مژگان کریمی^۲، محمد کاظم شریفی یزدی^۳،

هدروشا ملاآقامیرزایی^۴، محمد حسین مصدق^۵

چکیده

زمینه و هدف: قابلیت بالای آلوده شدن مواد اولیه شیرینی به باکتری اشریشیاکلی، تنوع شیرینی‌ها و تفاوت قابل توجه در سطح بهداشتی محل تولید و عرضه موجب شد تا این پژوهش به منظور بررسی فراوانی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در اشریشیاکلی و ژنهای TEM، SHV و CTX-M انجام شود.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی تعداد ۱۵۰ نمونه شیرینی از کارگاه‌های سنتی شیرینی پزی یزد جمع آوری گردید. پس از شناسایی جدایه‌های اشریشیاکلی با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی، آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی طبق دستورالعمل CLSI انجام گردید. جدایه‌های مولد ESBL طی روش دیسک ترکیبی بر روی محیط مولر هینتون آگار شناسایی شدند و سپس تمامی جدایه‌ها با استفاده از روش PCR برای وجود ژنهای SHV، TEM و CTX-M مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مجموع (۳۰ جدایه؛ ۲۰٪) اشریشیاکلی به‌دست آمد. نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به کلرامفنیکل (۲۲ جدایه؛ ۷۳٪) و ایمی پنم (۸ جدایه؛ ۲۶٪) بود. نتایج آزمون تست دیسک ترکیبی نشان داد که تنها ۹ جدایه مولد ESBL بودند. آنالیز مولکولی مشخص کرد که به ترتیب ۲، ۴ و ۳ جدایه برای وجود ژنهای SHV، TEM و CTX-M مثبت بودند.

نتیجه گیری: فراوانی حضور جدایه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در شیرینی‌های سنتی یزد در این بررسی، این مهم را خاطر نشان می‌کند که اقدامات نظارتی و کنترلی بیشتری در تهیه و توزیع شیرینی‌ها نیاز می‌باشد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، شیرینی، یزد

دریافت مقاله: آبان ۱۳۹۷

پذیرش مقاله: اسفند ۱۳۹۷

* نویسنده مسئول:

محمد مهدی سلطان دلال؛

دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :
soltanda@tums.ac.ir

۱ استاد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲ کارشناس ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳ استاد مرکز تحقیقات زئونوز، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴ کارشناس ارشد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵ استادیار آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

بیماری‌های منتقل شده از غذا، طیف وسیعی از بیماری‌هایی هستند که پس از خوردن غذاهای آلوده تظاهر می‌یابند (۱). طبق آخرین ارزیابی‌های مرکز کنترل و جلوگیری از بیماری‌های آمریکا (CDC)، تخمین زده می‌شود که سالانه حدود ۴۸ میلیون مورد بیماری ناشی از غذا در آمریکا به وجود می‌آید که حدود ۱۲۸۰۰۰ نفر به این دلیل بستری شده و ۳۰۰۰ مورد مرگ ناشی از آن رخ می‌دهد (۲). این بیماری‌ها هزینه‌ی هنگفتی برای جوامع و نیز برای جهان به بار می‌آورند. افزون بر این بیشتر پاتوژن‌های غذایی می‌توانند عوارض مزمن نیز ایجاد کنند (۳). *اشریشیاکلی (E. coli)* یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که هم در مواد غذایی و هم در کلینیک از اهمیت خاصی برخوردار است و باعث عفونت دستگاه ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می‌شود (۴ و ۵). این باکتری به علت اکتساب پلاسمیدهایی که کدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده‌اند (۶). مقاومت به این دسته از داروها در میان باسیل‌های گرم منفی بیشتر در رابطه با تولید بتا لاکتامازهاست (۷). این آنزیم‌ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار آنتی‌بیوتیکی، دایم در حال موتاسیون در جایگاه فعال آنزیم هستند، به طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتا لاکتامازهای با طیف وسیع (ESBL) شده است (۸). از میان این دسته آنزیم‌ها می‌توان به TEM-1، TEM-2، SHV-1 و CTX-M اشاره نمود که عمدتاً در باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه مشاهده می‌شود. به طور کلی ارگانسیم‌های تولیدکننده‌ی ESBL باعث افزایش شیوع ژن‌های عامل مقاومت می‌شوند. فراوانی جدایه‌های مقاوم در نقاط مختلف جغرافیایی همواره متفاوت بوده و انتظار می‌رود که این مقادیر در نواحی مختلف یک کشور نیز یکسان نباشد (۹). لذا بررسی فراوانی چنین ژن‌هایی (SHV، TEM، CTX-M) در نقاط مختلف و در دوره‌های متوالی امری ضروری به نظر می‌رسد (۱۰). از آنجایی که طبق استاندارد ملی ۲۳۹۵، فراورده‌های شیرینی و قنادی بخش مهمی از تولیدات غذایی کشور را تشکیل می‌دهند، که به صورت صنعتی و سنتی تولید و عرضه می‌گردند، و با توجه به مصرف زیاد این فراورده، لازم است که کنترل‌های میکروبی هم از نظر بهداشتی و هم از نظر صنعتی به منظور بالا بردن زمان ماندگاری و حفظ کیفیت فراورده به کاربرده شود (۱۱). از سوی دیگر باقلوا و قطاب به عنوان شیرینی سنتی ایرانی

قابل عرضه در بازارهای جهانی است. لذا با توجه به مصرف داخلی و خارجی این محصولات، و ناآگاهی درباره‌ی فراوانی *اشریشیاکلی*‌های مقاوم به بتالاکتاماز در شیرینی‌های سنتی یزد، ضرورت این مطالعه بیشتر مشخص می‌گردد. از این رو هدف از اجرای این مطالعه بررسی مولکولی مقاومت آنزیمی بتالاکتاماز با محدودی اثر وسیع در گروه ژنی TEM، CTX-M و SHV در جدایه‌های *اشریشیاکلی* نمونه‌های شیرینی سنتی یزد با استفاده از روش PCR می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی، جامعه‌ی مورد پژوهش کارگاه‌های شیرینی‌پزی سنتی سطح شهر یزد بود. ابتدا لیست کارگاه‌های سنتی با هماهنگی معاونت غذا و داروی استان تهیه گردید، سپس به صورت تصادفی از ۱۵ کارگاه تعداد ۱۵۰ نمونه شیرینی شامل (لوز نارگیلی ۳۰ نمونه، لوز پسته ۳۰ نمونه، لوز زعفرانی ۳۰ نمونه، باقلوا ۳۰ نمونه و قطاب ۳۰ نمونه) جمع آوری شد. نمونه‌ها در اسرع وقت با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی غذایی و دارو انتقال داده شدند. جدایه‌های *اشریشیاکلی* با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی تعیین هویت و به کمک کیت API20E (بیومیو فرانسه) تایید نهایی شد. سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام بررسی مولکولی ژن‌های ESBL ذخیره شد.

• شناسایی فنوتیپی سوبه‌های تولیدکننده ESBL:

پس از تأیید وجود *E. coli*، به منظور بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این جدایه‌ها، به پیشنهاد سازمان CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، غربالگری اولیه ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL، از طریق آزمون دیسک آگار دیفیوژن (Disk Agar Diffusion/DAD) انجام گردید (۱۲). در این روش پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار (۷/۲ الی ۷/۴ PH)، سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مذکور، دیسک‌های جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)

این مطالعه از *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت و *Escherichia coli* ATCC25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

• بررسی مولکولی:

جهت انجام PCR ابتدا DNA با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد. به این ترتیب که یک کلنی از کشت شبانه (Overnight) باکتری در $200 \mu\text{l}$ از آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه در 10000 rpm سانتریفوژ شده و سپس $100 \mu\text{l}$ مایع رویی حاوی DNA به آرامی به تیوب استریل دیگر منتقل شد. DNA استخراج شده داخل میکروتیوب 0.5 در دمای 20 - فریزر نگهداری شد.

برای تهیه این محلول به 16 میکرولیتر از آب مقطر استریل به ترتیب $2/5$ میکرولیتر بافر $10x$ ، 0.5 میکرولیتر MgCl_2 ، 0.3 میکرولیتر dNTP، 0.25 میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و 0.2 میکرولیتر آنزیم 5 واحدی DNA Tag Polymerase اضافه گردید. پرایمرهای مورد استفاده شامل *blaTEM* و *blaSHV* و *blaCTX* در این آزمون (۱۳) و برنامه‌ی زمان بندی آزمون PCR که مطابق با منابع اشاره شده در بخش پرایمرها استفاده شده بود در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است.

پس از تهیه مخلوط اصلی (به حجم 20 میکرولیتر) به تعداد کافی، به تمام میکروتیوب‌ها 5 میکرولیتر DNA الگواضافه شد که در نهایت واکنش در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام گرفت. حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده‌ی واکنش در حجم نهایی 25 میکرولیتر می باشد.

جدول ۱: توالی جفت پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن‌های لازم

نام ژن	توالی نوکلئوتید پرایمرهای مورد استفاده	وزن محصول
<i>bla_{SHV}-F</i>	5'-GATGAACGCTTCCCATGATG-3'	747 bp
<i>bla_{SHV}-R</i>	5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3'	
<i>bla_{CTX-M}-F</i>	5'-CGTGGCGATGAATAAGCTG-3'	593 bp
<i>bla_{CTX-M}-R</i>	5'-GGTGGTATTGCCTTTCATCC-3'	
<i>bla_{TEM}-F</i>	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	445 bp
<i>bla_{TEM}-R</i>	5'-GTCACAGTTACCAATGCTTA-3'	

از سه جفت پرایمر مربوط به هر ژن که به صورت اختصاصی و از طریق توالیهای ثبت شده در بانک ژن طراحی شده بودند استفاده شد.

جدول ۲: برنامه‌ی مورد استفاده برای تکثیر ژنهای شامل *blaTEM* و *blaSHV* و *blaCTX* در واکنش PCR

تعداد سیکل برنامه	زمان	درجه حرارت	نوع عملیات	برنامه
۱	۵ دقیقه	۹۴	Primary Denaturation	۱

و استرپتومایسین (10 میکروگرم) که از شرکت Mast تهیه شده بودند، به فاصله‌ی حداقل $2/5$ سانتی متر از یکدیگر، بر روی محیط مذکور قرار گرفتند. پس از انکوباسیون 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد، با استفاده از خط کش، هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده دیسک‌ها، نمونه‌های مورد نظر به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش گردیدند. هر گونه کاهش حساسیت در این سویه‌ها می‌تواند گواهی بر وجود این مقاومت باشد. برای این منظور، به پیشنهاد سازمان جهانی CLSI از آزمون Combined disk استفاده شد. در این آزمون همانند الگوی روش DAD غربالی، پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به طور کامل در محیط مذکور پخش شد. سپس دیسک‌های سفنازیدیم (30 میکروگرم)، سفنازیدیم-کلاولانیک‌اسید ($10-30$ میکروگرم)، سفوناکسیم (30 میکروگرم) و سفوناکسیم-کلاولانیک‌اسید ($10-30$ میکروگرم) به فاصله حداقل $2/5$ سانتی متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفتند. پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد، هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک‌اسید نسبت به بدون کلاولانیک‌اسید سنجیده شد. به طوری که اگر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک سفنازیدیم-کلاولانیک‌اسید بزرگتر یا مساوی 5 میلی متر نسبت به سفنازیدیم به تنهایی باشد و یا اینکه هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک سفوناکسیم-کلاولانیک‌اسید بزرگتر یا مساوی 3 میلی متر نسبت به سفوناکسیم به تنهایی باشد، سویه مورد نظر را می‌توان بر طبق ضابطه CLSI، به عنوان مولد ESBL در نظر گرفت (۱۲). در

۲	Denaturation	۹۳	۴۰ ثانیه	۳۰
۳	Annealing	۵۳	۴۰ ثانیه	۳
۴	Extention	۷۲	۴۰ ثانیه	۳۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها با بهره‌گیری از آمار توصیفی و آمار t-test برای بررسی رابطه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

تحلیلی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام و از آزمون ANOVA و

جدول ۳: میزان فراوانی اشریشیاکلی در انواع شیرینی‌های شهر یزد

نتیجه آزمون یا P	جمع	اشریشیاکلی				نوع نمونه
		مثبت		منفی		
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
P < ۰/۰۵	۳۰	۱۵	۵۰٪	۱۵	۵۰٪	لوز پسته
	۳۰	۱۰	۳۳/۳٪	۲۰	۶۶/۷٪	باقلوا
	۳۰	۲	۶/۷٪	۲۸	۹۳/۳٪	لوز نارگیلی
	۳۰	۲	۶/۷٪	۲۸	۹۳/۳٪	لوز زعفرانی
	۳۰	۱	۳/۳٪	۲۹	۹۶/۷٪	قطاب
	۱۵۰	۳۰	۲۰٪	۱۲۰	۸۰٪	جمع

از ۱۵۰ نمونه از کارگاه‌های شیرینی پزی شهر یزد، ۳۰ جدایه اشریشیاکلی به دست آمد که در آن بیشترین مورد فراوانی مربوط به لوز پسته (۵۰٪) بود. بعد باقلوا، لوز نارگیلی و زعفرانی و در نهایت قطاب با درصدهای فراوانی کمتر قرار گرفته است (جدول ۳).

جدول ۴: میزان فراوانی حساسیت جدایه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده به آنتی بیوتیک‌های مختلف

آنتی بیوتیک‌ها	حساس	نیمه حساس	مقاوم
جنتامایسین	۲۰ (۶۶/۶٪)	۱ (۳/۳٪)	۹ (۳۰٪)
ایمی پنم	۲۲ (۷۳/۳٪)	۰ (۰/۰٪)	۸ (۲۶/۷٪)
سیپروفلوکساسین	۱۵ (۵۰٪)	۰ (۰/۰٪)	۱۵ (۵۰٪)
کلرامفنیکل	۸ (۲۶/۷٪)	۰ (۰/۰٪)	۲۲ (۷۳/۳٪)
سفتواکسیم	۲۱ (۷۰٪)	۰ (۰/۰٪)	۹ (۳۰٪)
سفتازیدیم	۲۱ (۷۰٪)	۰ (۰/۰٪)	۹ (۳۰٪)
کوتریموکسازول	۱۰ (۳۳/۳٪)	۰ (۰/۰٪)	۲۰ (۶۶/۷٪)

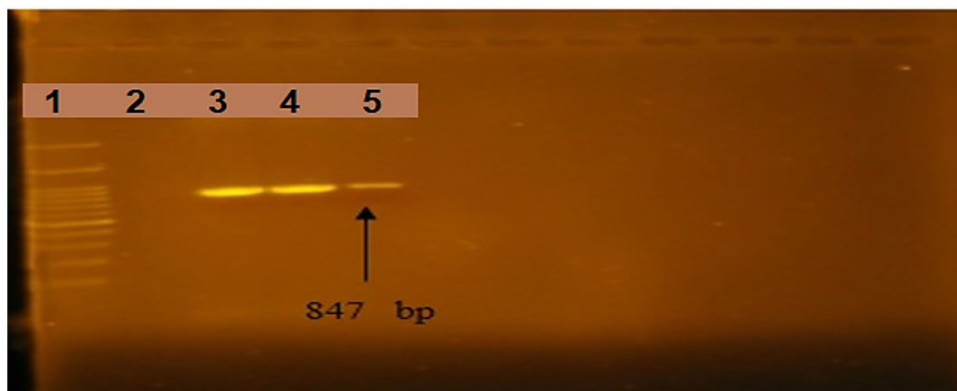
به منظور بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی جدایه‌ها، آنتی بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد و میزان درصد حساسیت و مقاومت همگی سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های مورد نظر مشخص گردید (جدول ۴).

جدول ۵: نتایج موارد منفی و مثبت جدایه‌های ESBL در نمونه‌های شیرینی شهر یزد

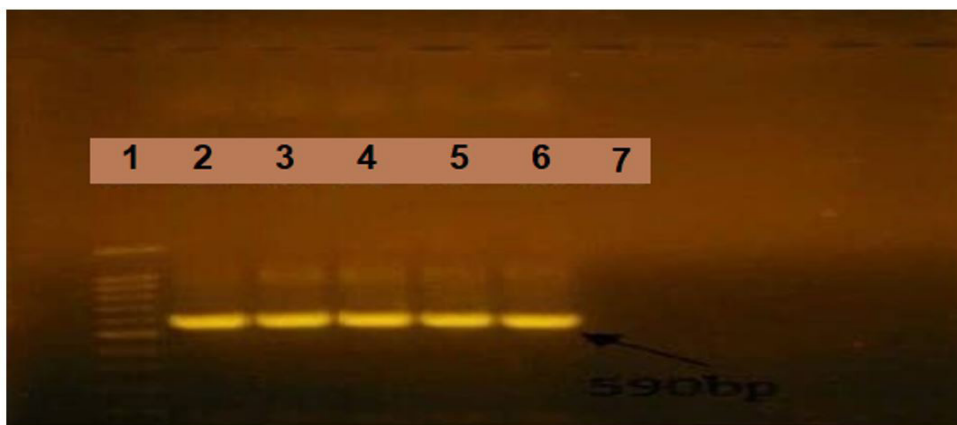
تعداد	مثبت	منفی	جمع
۷	۷	۸	۱۵
۲	۲	۸	۱۰
۰	۰	۲	۲
۰	۰	۲	۲
۰	۰	۱	۱
۹	۹	۲۱	۳۰

کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) در لوز پسته بود در حالی که موارد MDR در شیرینی نوع زعفرانی و قطاب دیده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که آلودگی موجود در شیرینی های یزد با *شریشیاکلی* دارای ارتباط معناداری $P < 0.05$ می باشد. در این مطالعه، تعداد ۹ جدایه مولد ESBL بودند که به ترتیب ۷ سویه از لوز پسته و ۲ سویه نیز از باقلوا به دست آمده بود. در تمامی نمونه های دیگر (شامل: لوز نارگیلی، قطاب و زعفرانی) هیچ جدایه ی ESBLs مثبتی به دست نیامد.

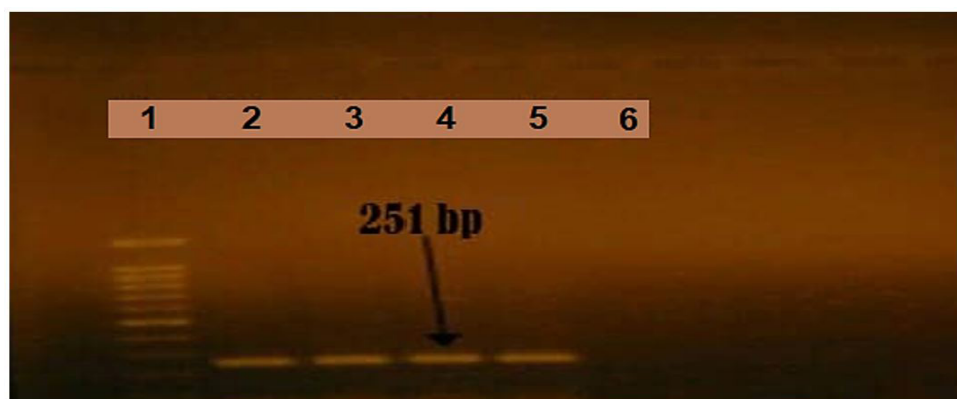
بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۷۳/۳٪ (۲۲ جدایه) و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به آنتی بیوتیک ایمی پنم ۲۶/۷٪ (۸ جدایه) گزارش شد. نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی در این مطالعه نشان داد که بیشترین موارد MDR مربوط به فنوتیپ سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (پنج میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵/۱ میکروگرم)،



شکل ۱: PCR ژن TEM با اندازه ی ۸۴۷ bp. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰-bp، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳: کنترل مثبت، چاهک های ۴ و ۵: جدایه های مثبت



شکل ۲: PCR ژن SHV با اندازه ی ۵۹۰ bp. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰-bp، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک های ۳، ۴، ۵، ۶: جدایه های مثبت، چاهک ۷: کنترل منفی



شکل ۳: PCR ژن CTX با اندازه ی ۲۵۱ bp. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰-bp، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک های ۳، ۴، ۵: جدایه های مثبت، چاهک ۶: کنترل منفی

نتایج نشان داد که وجود موارد ESBL در نمونه‌های شیرینی معنادار نمی‌باشد. به این صورت که درصد توزیع فراوانی جدایه‌های مولد ژنهای ESBLs در لوز پسته ۶۷٪ و در باقلوا ۲۰٪ بود. در این مطالعه تمامی ۹ جدایه مولد ESBLs که وجود آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در آنها در تست فنوتایپی با روش دیسک ترکیبی تایید شده بودند، طی آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز بیشترین و کمترین فراوانی ژن‌ها را به ترتیب نسبت به گروه SHV و TEM نشان دادند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های هدف تحت مطالعه در اشکال ۱ تا ۳ نشان داده شده است.

بحث

مصرف غذا امکان انتقال بسیاری از عوامل بیماری زا به بدن انسان را فراهم می‌کند. بروز بیماری‌های ناشی از غذا به‌عنوان یک مشکل عمده بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان محسوب می‌شود. اطلاعات به دست آمده از دیگر کشورها به ویژه انگلستان و ایالات متحده حاکی از آن است که ۴۰-۲۰٪ بیماری‌ها ناشی از مصرف غذاهای آلوده می‌باشد (۴). بر اساس استاندارد شماره ۲۳۹۵ موسسه استاندارد تحقیقات صنعتی ایران، انواع شیرینی در سه گروه تر، نیمه خشک و خشک طبقه بندی شده اند. بر اساس این استاندارد، هر نوع شیرینی باید کاملاً عاری از میکروب/شریشیالکی باشد (۱۱). در مطالعه‌ی فعلی تعداد ۱۵۰ نمونه مختلف شامل لوز پسته، نارگیلی، لوز زعفرانی، قطاب و باقلوا از شیرینی پزی‌های سنتی شهر یزد جمع آوری گردید که از این تعداد، ۳۰ نمونه/شریشیالکی به‌دست آمد که بیشترین تعداد از لوز پسته (۱۵ نمونه؛ ۵۰٪) و کمترین تعداد نیز از نمونه‌های قطاب (۱ نمونه، ۳/۳٪) جداسازی گردید. نتایج مطالعه‌ی انجام شده توسط سلطان دلال و همکاران در زمینه‌ی آلودگی میکروبی شیرینی‌های تر جنوب تهران (n=۱۱۲) حاکی از آن است که در زمان انجام مطالعه، ۷/۷۲٪ از شیرینی‌های عرضه شده در منطقه‌ی جنوب تهران به میکروب‌های مختلف آلوده بوده اند؛ به‌طوری‌که خانواده‌ی انتروباکتریاسه (۴۰٪)، مخمرها (۳۳٪) و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۲٪) رتبه‌های اول تا سوم آلودگی را به خود اختصاص داده اند (۱۴) که این امر می‌تواند ناشی از عدم رعایت بهداشت فردی کارکنان در کارگاه‌های شیرینی پزی و انتقال باکتری‌های موجود در مدفوع از طریق دست به دلیل روش سنتی

و همچنین وجود هاگ‌های قارچی شناور در هوا و نهایتاً قرار گرفتنشان در روی مواد در هر مرحله از تهیه باشد. ناصحی نیا و همکاران در سال ۱۳۹۴ در یزد در پژوهشی با عنوان «ارزیابی آلودگی میکروبی شیرینی‌های سنتی شهر یزد در سال ۱۳۹۴»، دریافتند که از ۳۲۲ نمونه‌هایی که از شیرینی‌های سنتی عرضه شده توسط شیرینی پزی‌های شهر یزد به طور تصادفی انتخاب شده بودند، ۳۸٪ دارای آلودگی میکروبی بودند. بیشترین میزان آلودگی مربوط به شیرینی لوز پسته (۸۸/۸٪) بود که اصولاً افزودنی‌ها از جمله خود پسته می‌تواند منبع آلودگی باشد. با توجه به اینکه از پسته‌هایی که کیفیت بهداشتی پایین دارند و بر خلاف نارگیل در پوسته‌ی محکمی محافظت نمی‌شوند، امکان آلودگی بالاتری نسبت به سایر افزودنی‌های شیرینی مانند نارگیل و زعفران دارد و کمترین میزان آلودگی مربوط به شیرینی حاجی بادام بدون هیچ‌گونه آلودگی میکروبی بود. میزان آلودگی نمونه‌ها به انتروباکتریاسه،/شریشیالکی، کپک‌ها و مخمرها به ترتیب ۱۳/۲٪، ۵٪، ۲۱/۷٪ و ۱۱/۴٪ بود (۱۵). نتایج مطالعه‌ی ناصحی نیا و همکاران با مطالعه‌ی پیش رو مطابقت دارد. در مطالعه‌ی حاضر ۵۰٪ نمونه‌های کسب شده از شیرینی لوز پسته آلوده به/شریشیالکی بوده که می‌توان نتیجه گرفت، با توجه به میزان بالای آلودگی میکروبی شیرینی‌های سنتی به ویژه لوز پسته عرضه شده در شهر یزد، اقدامات نظارتی و کنترلی بیشتری در تهیه و توزیع این قبیل شیرینی‌ها نیاز می‌باشد. در اصفهان، رضایی و همکاران در مطالعه‌ی با عنوان «فراوانی جمعیت/شریشیالکی در شیرینی‌های عرضه شده در شهر اصفهان» دریافتند که از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از سطح شهر اصفهان، میزان آلودگی ۱۹٪ بود (۱۶). در یک مطالعه‌ی توصیفی مقطعی که در تهران توسط فرامرزی و همکاران انجام شد (۱۷)، تعداد ۶۴۲ نمونه مواد غذایی مختلف از مناطق غرب تهران به طور تصادفی نمونه برداری و به آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی ایران ارسال شد و سپس نمونه‌ها از نظر آلودگی باکتریایی مورد آزمایش قرار گرفتند، نتایج نشان داد که ۱۳/۵٪ از شیرینی‌ها به کلیفرم آلوده بودند. این آلودگی‌ها در ضمن اینکه می‌تواند باعث ایجاد بیماری و مشکلات دیگر بهداشتی شوند، موجب پایین آمدن کیفیت محصول هم می‌شوند. با کنترل راه‌هایی که منجر به فساد میکروبی مخصوصاً رشد باکتری‌ها به صورت کلیفرم می‌شوند و همچنین بالا بردن کیفیت مواد اولیه غذایی و همچنین آگاهی افراد مشغول کار در

تنوع فراوان در سراسر جهان و مصرف بالایی دارند. با توجه به مصرف زیاد این فرآورده‌ها لازم است که کنترل میکروبی از نظر بهداشتی و صنعتی به منظور بالابردن زمان ماندگاری و حفظ کیفیت این فرآورده‌ها به کار برده شود.

نتیجه گیری

در این مطالعه، ژن SHV بیشترین فراوانی را در بین ژن‌های مورد بررسی داشت. همچنین بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومتی در سویه‌ای به دست آمده از لوز پسته بود که نشان می‌دهد با توجه به فراوانی بالای /شرشیاکلی در شیرینی لوز پسته، می‌توان نتیجه گرفت که این ماده غذایی می‌تواند به ویژه عامل انتقال ارگانسیم و بروز بیماری به ویژه در افراد با نقص سیستم ایمنی باشد. بنابراین توصیه می‌گردد که در طبخ، تهیه، توزیع و بسته بندی این نوع شیرینی حداکثر دقت به کار برده شود. مخصوصاً پروسه تولید باید مورد مطالعه و بازبینی قرار گرفته و دخالت دست در مراحل تولید و بسته بندی به حداقل برسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه‌ی بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۳۱۴۰۷ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که از نظر مالی حامی این طرح تحقیقاتی بوده‌اند، کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم. همچنین مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانه مدیریت و کارکنان محترم آزمایشگاه کنترل غذا و داروی مرکز یزد و شهرستان اردکان دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ابراز می‌داریم.

زمینه تولید و توزیع، می‌توان این عامل را کاهش داد. در سال ۲۰۰۶ در مطالعه ای مشابه در امریکا توسط Jayarao و همکاران دریافتند که از مجموع ۲۴۸ نمونه، ۲/۴٪ به /شرشیاکلی آلوده بودند (۱۸).

نتایج آزمون انتشار از ژل (دیسک دیفیوژن) بیشترین و کمترین تعداد فراوانی مربوط به کلرامفنیکل به میزان ۷۳/۳٪ (۲۲ جدایه) و ایمی پنم ۲۶/۶٪ (۸ جدایه) گزارش شد.

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۹ سویه مولد ESBL بودند که به ترتیب ۷ سویه از لوز پسته و ۲ سویه نیز از باقلوا به دست آمده بود. در تمامی نمونه‌های دیگر (شامل: لوز نارگیلی، قطاب و زعفرانی) هیچ ایزوله ESBLs مثبتی به دست نیامد. ملاعباس زاده و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مطالعه ای، ۴۷ نمونه (۳۱/۳٪) از نمونه‌ها به /شرشیاکلی آلوده بودند (۱۹). در تحقیق صورت گرفته توسط El-Sharef و همکاران در سال ۲۰۰۶ در کشور لیبی بر روی /شرشیاکلی‌های جدا شده از بستنی‌های سنتی، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین با ۵۰٪ و کمترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین با صفر درصد گزارش شد (۲۰). امروزه این مقاومت نه تنها در نمونه‌های غذایی، بلکه در نمونه‌های بالینی گزارش شده است. به طوری که در مطالعه‌ی شجاع پور و همکاران ۵۸ درصد از سویه‌های مولد بتالاتامازهای وسیع الطیف دارای ژن TEM-1 بودند (۲۱). بختیاری و همکاران نشان دادند که ۸/۸۹٪ جدایه‌های /شرشیاکلی ESBL مثبت بودند (۲۲). در میان مواد غذایی، فرآورده‌های شیری، فرآورده‌های قنادی و فرآورده‌های گوشتی از جمله مواد غذایی هستند که بیشتر در ایجاد مسمومیت ناشی از غذا دخالت دارند. شیرینی‌های سنتی به دلیل نوع ترکیبات، روش تهیه و تزئین آن‌ها احتمال آلودگی با عوامل بیماری‌زا مانند /شرشیاکلی، انتروباکتریاسه، کپک و مخمر را دارند. شیرینی‌ها دارای اقلام مغذی گوناگونی هستند که

منابع

- Hanson LA, Zahn EA, Wild SR, Döpfer D, Scott J & Stein C. Estimating global mortality from potentially foodborne diseases: An analysis using vital registration data. *Population Health Metrics* 2012; 10(1): 5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of foodborne illness in the United States. Available at: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/index.html>. 2018.
- Buzby JC & Roberts T. The economics of enteric infections: Human foodborne disease costs. *Gastroenterology* 2009; 136(6): 1851-62.

4. Olaimat AN & Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* 2012; 32(1): 1-19.
5. Paterson DL & Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(4): 657-86.
6. Soltan Dallal MM, Mobasser G, Fallah J, Eshraghian MR, Rasteragr Lari A, MollaAgha Mirzaei H, et al. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Tehran University Medical Journal* 2011; 69(1): 16-21 [Article in Persian].
7. Nakhaei Moghaddam M, Beidokhti MH, Jamehdar SA & Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β -lactamase genes in clinical isolates of enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iranian journal of basic medical sciences* 2014; 17(5): 378-83.
8. Silva J, Agullar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-1: A new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44(4): 997-1003.
9. Riyahi Zaniani F, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iranian journal of basic medical sciences* 2012; 15(1): 654-60.
10. Fang H, Ataker F, Hedin G & Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(2): 707-12.
11. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiologic characteristics of sweets products, No 2395. Available at: <http://www.isiri.gov.ir/portal/files/std/2395.htm>. 1993.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-Eleventh Edition. Available at: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58139aa4615e27240754da03&asset-Key=AS%3A422233756704774%401477679780485>. 2012.
13. Soltan Dallal MM, Fani F, Rajabi Z, Karami-Talab M & Molla Agha Mirzaei H. Prevalence of bla CTX-M, bla SHV and bla TEM β -lactamase genes among *Escherichia coli* isolates in foodborne outbreak in Iran. *International Journal of Enteric Pathogens* 2018; 6(2): 48-52.
14. Soltan Dallal MM, Fazelifard P, Tababtabaei Bafroei A, Rashidi S & Zarin M. Determination the part of microbial contamination of cream pastry from confectionaries in south of Tehran. *Quarterly Journal of Microbial Biotechnology* 2010; 2(6): 7-12 [Article in Persian].
15. Nassehinia H, Rahimi S, Kiani M, Ghaneapur MR & Ajam F. Assessment of Microbial Contamination of Traditional Sweets in Yazd, Iran, in 2015. *Journal of Health Research in Community* 2017; 2(4): 26-34 [Article in Persian].
16. Rezaei R, Sadeghi M, Ghasemian Safaei H, Mirlohi M & Hasanzadeh A. Frequency distributions of *Escherichia coli* in the confectionery products offered in retail market in Isfahan. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 5(17): 27-34.
17. Faramarzi T, Jonidi Jafari A, Dehghani S, Mirzabeygi M, Naseh M & Rahbar Arasteh H. A survey on bacterial contamination of food supply in the west of Tehran. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2012; 2(1): 11-8 [Article in Persian].
18. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV & Brown J. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science* 2006; 89(7): 2451-8.
19. Molaabaszadeh H, Molaazadeh M, Hajizadeh N & Mohammadzadeh Gheshlaghi N. Prevalence and antibiotic profile of traditionally made ice cream in retails of Khoy. *Quarterly Journal of Food Hygiene* 2012; 2(2): 31-8 [Article in Persian].
20. El-Sharef N, Ghenghesh KS, Abognah YS, Gnan SO & Rahooa A. Bacteriological quality of ice cream in tripoli—Libya. *Food Control* 2006; 17(8): 637-41.
21. Shojapour M, Shariati L, Karimi A & Zamanzad B. Prevalence of TEM-1 type beta-lactmase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn infections using duplex PCR in Shahrekord. *Arak Medical University Journal* 2011; 14(54): 55-61 [Article in Persian].

22. Bakhtiari R, Fallah Mehrabadi J, Molla Aghamirzaei H, Sabbaghi A & Soltan Dallal MM. Evaluation of extended expectrum beta lactamazse enzymes prevalece in clinical isolates of *Esherichia coli*. Microbiogy Research 2011; 2(1): e8.

Molecular Analysis of Broad Spectrum Beta-Lactams Resistance Genes TEM, CTX-M and SHV in *Escherichia coli* Isolates from Traditional Pastry Samples in Yazd

Mohammad Mehdi Soltan Dallal¹ (Ph.D.) - Mojgan Karimi² (M.S.) - Mohammad Kazem Sharifi Yazdi³ (Ph.D.) - Hedrosha Molla Aghamirzaei⁴ (M.S.) - Mohammad Hossein Mosadegh⁵ (Ph.D.)

1 Professor, Food Microbiology Research Center, Department of Pathobiology, Microbiology Division, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Master of Science in Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Professor, Zoonosis Research Center, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Master of Science in Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 Assistant Professor, Food and Hygiene Control Laboratory, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Abstract

Received: Oct 2018

Accepted: Feb 2019

Background and Aim: The variety of sweets along with significant difference level of hygiene in the production, supplies and high potential contamination of sweets ingredients with *Escherichia coli*, led to investigate the frequency of broad-spectrum beta lactamase strains of *E. coli* in sweets and determine the presence of SHV, TEM and CTX-M genes.

Material and Methods: In this descriptive cross-sectional study, 150 confectionery samples were collected from traditional confectionery workshops in Yazd. Detection of *E. coli* strains was carried out by standard biochemical tests and antibiotic susceptibility test was performed using CLSI guidelines. Via combined ESBL disk method on the muller hinton agar medium producing strains were identified. All the ESBL producing strains were evaluated using the PCR test for the existence of SHV, TEM and CTX-M genes.

Results: In 30 isolates, (20%) *E. coli* was obtained. The results of antibiotic susceptibility test showed that the highest and the lowest antibiotic resistance was related to chloramphenicol I (22 isolates, 73.3%) and Imipenem (8 isolates, 26.6%). The results of the combined disk test was showed that only 9 isolates produced ESBL. The molecular analysis on considered genes indicated that 2, 4 and 3 isolates were positive for presence of TEM, SHV, and CTX-M genes, respectively.

Conclusion: The prevalence of antibiotic-resistant isolates in traditional Yazd sweets in this study highlights the importance of more observing and control measures in the preparation and distribution of sweets.

Keywords: *Escherichia coli*, Broad-Spectrum β -Lactamases, Sweets, Yazd

* Corresponding Author:
Soltan Dallal M M
Email:
soltanda@tums.ac.ir