بررسی میزان آلودگی E.coli O157:H7 در محصولات گوشتی فرآوری شده حاصل از دو کارخانه در شیراز و تهران

سید محمد حسینی [a]، حمید عزت پناه [b*]، محمود امین لاری [c]، مهناز مظاهری اسدی [d]
داوود عطایی [e]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[b] استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[c] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
[d] دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
[e] عضو هیئت علمی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱/۲۲

Archive of SID

چکیده

مقدمه: E.coli O_{157}:H7 یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده مسمومیت غذایی و بیماری‌هایی مانند اسهال، کولیت خونریزی‌دهنده، سندرم اورمیک همولتیک، پورپورای ترومبوسیتوپنیک و حتی مرگ در انسان است.

مواد و روش‌ها: غنی‌سازی نمونه‌های فرآورده‌های گوشتی در دو مرحله توسط لاکتوز براث و سپس در محیط سلنیت سیستیین انجام شد. سپس عمل تلقیح بر روی محیط کشت کروم آگار E.coli O157:H7 انجام گرفت. کلنی‌های ارغوانی رنگ نشانگر وجود این میکروارگانیسم می‌باشد. قابل توجه است که محیط کشت اختصاصی کروم‌آگار اختصاصی عمل می‌نماید و مشکلات محیط‌های کشت سوربتول مک‌کانکی آگار را ندارد. سپس موارد مثبت جداسازی شده برای آزمون تأییدی تحت تشخیص با multiplex PCR قرار گرفتند. در این روش ژن‌های stx1 و stx2 جداسازی گردیدند.

یافته‌ها: محصولات فرآوری شده شامل همبرگرهای ممتاز پس از سه ماه تولید، همبرگر معمولی پس از ۴۸ ساعت، سه ماه و شش ماه تولید است. نتایج حاصله از آزمون تشخیصی m-PCR و کشت بر روی کروم آگار حاکی از آلودگی نسبتاً بالای فرآورده‌های گوشتی مورد آزمون است که می‌تواند دلایل زیادی از جمله عدم رعایت موارد بهداشتی در مراحل تولید و آلودگی گوشت‌های ورودی به کارخانه و اضافه شدن موادی به صورت غیرقانونی به فرآورده‌ها برگردد.

نتیجه گیری: پیشنهاد می‌گردد که بکارگیری تدابیر بهداشتی ـ میکروبی تولید با دقت بیشتری صورت پذیرد و همچنین انجام تست‌های میکروبی E.coli O157:H7 در کارخانجات تولیدی فرآورده‌های گوشتی اجباری گردد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی، گوشت خام، گوشت فرآوری شده*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: hamidezzatpanah@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

برای اولین بار E.coli $O_{157}:H_7$ در سال ۱۹۸۲ در پی ابتلا ۴۷ نفر به اسهال خونی به دنبال خوردن همبرگر آلوده در رستوران‌های زنجیره‌ای در ایالات میشیگان و اورگان جداسازی گردید (Chinyu & Lawrence, 1995).

پس از سال ۱۹۸۲، E.coli $O_{157}:H_7$ به عنوان عامل شیوع عفونت روده‌ای در کشورهای کانادا، انگلیس و آمریکا معرفی گردید (Beutin *et al.*, 2003). در بسیاری از گزارش‌ها بیشترین شیوع گزارش شده از عفونت E.coli $O_{157}:H_7$ در ارتباط با محصولات گاوی آلوده مثل گوشت نیم‌پز گاو و یا شیر خام بوده است. همچنین شیوع در ارتباط با محصولاتی مثل کاهو، سیب‌زمینی و حتی آب سیب تازه گزارش شده است که احتمالاً مربوط به آلودگی آن‌ها به کود حیوانی بوده است (Cody *et al.*, 1999; Rogerie *et al.*, 2001; Urdahl *et al.*, 2003).

در سال ۱۹۹۳ گزارشی مبنی بر آلودگی ۷۳۲ نفر در آمریکا منجر به مرگ ۴ نفر گردید که همبرگر نیم‌پز علت آن معرفی شد و توصیه گردید که قطعات همبرگر، باید طوری پخته شوند که دمای قسمت مرکزی آن، حداقل به ۷۰ درجه سانتی‌گراد برسد (FSIS, 1993). در گزارش دیگری در سال ۱۹۹۷، گوشت چرخ کرده و همبرگر عامل متداول برای وقوع بیماری‌های ناشی از E.coli $O_{157}:H_7$ بیان شد و کمیته دامپزشکی، فرآورده‌های تهیه شده از گوشت چرخ کرده گوساله به خصوص بیف‌برگر را به عنوان ماده غذایی با ریسک بالا جهت ایجاد بیماری‌های ناشی از E.coli $O_{157}:H_7$ در نظر گرفت (SCV, 1997).

شناسایی EHEC به عنوان یک درجه متمایز از E.coli پاتوژنیک از دو مشاهده اپیدمیولوژی مهم نتیجه شده است (Riley *et al*, 1983)؛ اولی شیوع نوعی بیماری روده‌ای-معده‌ای که شخص مبتلا از دردهای شکمی حاد و شدید شکایت داشته و اسهال آبکی و به دنبال آن اسهال خونی، تب خفیف یا بدون تب در فرد مبتلا دیده می‌شود که این بیماری (Haemorrhagic Colitis) ورم خونریزی شدید مخاط روده بزرگ نامیده شد که مربوط به مصرف همبرگرهای نیم‌پخته در یک مغازه فست‌فود بوده است. دومین مشاهده مهم حالت‌های پراکنده سندرم کلیوی اورمیک همولتیک را با سیتوتوکسین وابسته به مدفوع و تولید سیتوتوکسین E.coli را در مدفوع ها گزارش داده است (Karmali *et al*., 1998).

سندرم اورمیک همولیتیک که همچنین قبلاً ذکر شد موجب بیماری اسهال خونی غیرقابل تمایز از Haemorrhagic Colitis شناخته شده است. بر اساس این دو مورد مهم، یکی بر اساس سروتایپ E.coli، نادر و کمیاب و دیگری بر اساس تولید یک سیتوتوکسین مهم امکان شناسایی درجه اهمیت نوع پاتوژن‌های روده‌ای که باعث بیماری روده ای و کلیوی می‌شود، فراهم شد (Nataro & Kaper, 1998).

اصطلاح E.coli به همراه خونریزی شدید روده‌ای (EHEC) به‌طور عمده برای مشخص کردن انواعی که باعث بیماری‌های HC و HUS می‌شوند ابداع شد (Karch *et al*., 1987).

گزارش‌های مختلف حاکی از پایین بودن دوز عفونی E.coli می‌باشد. Dolye و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش نمودند که خوردن ماده غذایی حاوی کم‌تر از ۱۰ ارگانیسم می‌تواند منجر به بروز عفونت گردد (Doyle *et al*., 1997).

در مطالعات دیگر نشان داده شده است که کم‌تر از ۲ باکتری در ۲۵ گرم از ماده غذایی برای ایجاد عفونت کافی است (FSIS, 1993; Willshaw *et al*., 1994). اهمیت دوز عفونی کم این است که بدون احتیاج به رشد و تکثیر باکتری در ماده غذایی امکان پیدایش بیماری وجود دارد (Hui *et al*., 2001). هدف از این پژوهش بررسی نتایج حاصل از آزمون میکروبی با استفاده از محیط کشت اختصاصی کروم آگار و سپس آزمون تأییدی m-PCR بین محصولات گوشتی فرآوری شده (همبرگرهای معمولی و ممتاز) در زمان‌های تولید شده گوناگون از یک طرف و محصولات فرآوری نشده (گوشت‌های خام گاوی) از طرف دیگر از نظر آلودگی به E.coli $O_{157}:H_7$ است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری به صورت جداگانه شامل انتخاب ۱۰۰ نمونه از هر محصول انجام گرفت. به عبارت

Archive of SID

www.SID.ir

دیگر، ۱۰۰ بسته همبرگر معمولی ۴۸ ساعت پس از تولید، ۱۰۰ بسته همبرگر معمولی سه ماه پس از تولید، ۱۰۰ بسته همبرگر معمولی شش ماه پس از تولید و ۱۰۰ بسته همبرگر ممتاز سه ماه پس از تولید انتخاب شدند.

نمونه‌برداری براساس استاندارد AOAC به شماره ۶۰-۹۷۳ انجام گرفت. از هر بسته، ۲۵ گرم نمونه کاملا مخلوط شده حاصل شد و نمونه‌ها به ذرات خیلی ریز تبدیل شدند.

- غنی‌سازی جهت شناسایی با کروم آگار اختصاصی

جهت تشخیص بهتر و کامل‌تر وجود E.coli $O_{157}:H_7$ در نمونه‌های مورد بررسی در دو مرحله غنی‌سازی صورت پذیرفت. غنی‌سازی اولیه نمونه‌ها در محیط لاکتوز براث انجام شد. بدین جهت ۲۵ گرم از نمونه هر بسته در شرایط کاملاً استریل برداشته شده و وارد ارلن حاوی ۲۲۵ میلی لیتر محیط لاکتوز براث شد و درب آن بسته شد. سپس محیط لاکتوز براث حاوی نمونه وارد انکوباتور شده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شد و سپس یک میلی‌لیتر از لاکتوز براث حاوی نمونه برداشته شده جهت غنی‌سازی ثانویه آماده گردید.

در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از محیط غنی شده در مرحله قبل وارد ۹ میلی‌لیتر سلنیت سیستیین گردید. محیط ساخته شده جدید به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. در ابتدای گرمخانه‌گذاری رنگ محیط جدید بی‌رنگ است اما در انتهای کار رنگ آن قرمز شد.

جهت به دست آوردن محیط کشت اختصاصی‌تر، محلول تلوریت پتاسیم ۱ به محیط کشت اضافه شده تا به غلظت ۲/۵ mg/Lit در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد برسد. یک لوپ از محیط غنی شده ثانویه برداشته شده و در زیر هود لامینار و شرایط کاملاً استریل بر روی محیط کشت اختصاصی کروم‌آگار به صورت خطی کشت داده شد. سپس محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های ارغوانی رنگ به وجود آمده نشان از وجود E.coli $O_{157}:H_7$ در نمونه است (Stampi *et al.*, 2004). لازم به ذکر است که این محیط کشت فوق‌العاده اختصاصی عمل می‌نماید (Afnor & Alonso, 2004; Hara -kudu *et al.*, 2002) و مشکلات محیط های کشت سوربیتول مک کانکی آگار را ندارد (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

در مرحلهٔ بعد نمونه‌هایی که در مرحلهٔ تلقیح بر روی کروم آگار اختصاصی آلودگی به E.coli $O_{157}:H_7$ را نشان داده بودند را جداً ساخته و غنی‌سازی نموده تا جهت انجام آزمایش multiplex PCR آماده گردند.

- غنی‌سازی نمونه‌ها جهت m-PCR

نمونه‌ها را در modified tryptic (m-TSB) soy broth حاوی ۰/۰۵ mg/l Cefixime کشت داده و آن‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده (Oksuz et al, 2004) و سپس هر کدام از آن‌ها به روش زیر مورد آزمون قرار گرفتند.

تخلیص ژنوم: برای استخراج و تخلیص DNA ژنومیک از روش (Cetyltrimethylammonium bromide CTAB) استفاده گردید. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط نمونهٔ غنی شده را به یک Microtube تمیز منتقل ساخته و عمل سانتریفوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس رسوب (pellet) حاصل شده را در ۵۶۷ میکرولیتر (lμ) بافر TE (10 mM Tris Hcl, 10mM EDTA)، ۳۰ میکرولیتر بافر SDS ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر آنزیم proteinase k (۲۰ mg/ml) حل شده و سپس آن‌ها را در دمای ۳۷ °C به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. سپس به مخلوط حاصل ml ۱۰۰ نمک NaCl ۵ مولار و lμ ۸۰ محلول CTAB/NaCl (۴/۱ گرم NaCl، ۱۰ گرم CTAB و ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در مرحلهٔ بعد به مخلوط حاصل ۷۸۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه شد و پس از تکان دادن به مدت ۲۵ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوب دیگری منتقل گردید و هم حجم آن مخلوط فنل-کلروفرم-

Archive of SID
www.SID.ir

ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱/۲۴/۲۵) اضافه گردید و پس از عمل سانتریفوژ به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۲۵۰۰، عمل ترسیب DNA به وسیله ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد در دمای ^{o}C ۲۰- انجام شد و در انتها DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (pH=۸) و ۳ میکرولیتر آنزیم Rnase A حل گردید (Sambrook & Russell, 2001).

اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده: برای این منظور از دستگاه UV Spectrophotometer استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه DNA ژنومیک ابتدا ژنوم به نسبت $\frac{۴}{۵۰}$ با آب مقطر رقیق شد. پس از تهیه رقت ژنوم تخلیص شده، میزان جذب نمونه ژنومیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج قابل جذب برای DNA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری OD غلظت DNA از رابطهٔ زیر محاسبه گردید:

غلظت DNA = ۵۰ × رقت ضریب عکس × OD

m-PCR assay: جهت شناسایی ژن های stx/stx1 و stx2، پرایمرهای اختصاصی برنامه‌ریزی شده استفاده گردید (جدول ۱). پرایمرهای SFI و SRI قطعه‌ای را تکثیر کردند که این قطعه مربوط به ژن آنزیم مالات دهیدروژناز می‌باشد و به عنوان کنترل مثبت داخلی از آن استفاده گردید. برای بررسی خصوصیات این قطعات و پرایمرهای آن از نرم‌افزار مولکولی Oligo، BLAST و DNASIS استفاده گردید.

برای انجام فرایند M-pcr ۰/۵ میکرولیتر از DNA تخلیص شده باکتری E.coli $O_{157}:H_7$ (با غلظت ۲۱۰ ng/µl با ۲۴/۵ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط گردید. این اجزا عبارتند از:

۱- ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت P ۵ mol/ml)در مجموع ۶ میکرولیتر.

۲- ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت mM ۲/۵، ۳/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت mM ۱۰.

۳- ۲/۵ میکرولیتر از X PCR buffer ۱۰، ۱۰/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل (DDW) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5 unit/µl).

برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۰ چرخه تکثیر DNA (۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Loading buffer) توسط ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد.

تأیید محصولات واکنش: برای این منظور هم از هضم آنزیمی محصولات واکنش توسط آنزیم های محدود کننده و هم تعیین توالی استفاده شد. پس از بررسی توالی سه قطعه مورد انتظار توسط نرم افزار DNASIS سه آنزیم Hind III برای هضم قطعه stx/stx1، Hae III برای هضم قطعه stx2 و EcoR V برای هضم قطعه کنترل داخلی در نظر گرفته شدند. پس از تکثیر هر یک از قطعات به صورت مجزا، ۶ میکرولیتر از آن ها توسط ۱ میکرولیتر از آنزیم مربوطه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت و محصول هضم آنزیمی توسط ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفوز شد.

تعیین میزان اختصاصی بودن: برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از باکتری های خانواده انتروباکتریاسهٔ زیر انجام شد. این باکتری ها عبارتند از:

Shigella dysenteriae (bio type: 4, 7, 8) , *Shigella flexneri* (biotype 2a), *Shigella sonnei, Shigella boy dii, Salmonella paratyphi C, Vibrio cholerae* (strain: ogava and inaba).

پس از انجام واکنش با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد.

تعیین میزان حساسیت: میزان حساسیت واکنش طراحی شده هم براساس میزان ژنوم تخلیص شده و هم براساس تعداد باکتری محاسبه گردید. برای این منظور ژنوم باکتری E.coli $O_{157}:H_7$ با غلظت ۲۱۰ ng/ml تا رقت 10^{-9} توسط بافر TE(ph=8) رقیق شد و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شده و محصول واکنش توسط ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

برای محاسبه حساسیت واکنش براساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری در محیط LB و اندازه‌گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط موردنظر تا 10^{-10} رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد و جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرایند شمارش باکتری (Colony Count) انجام گرفت.

- آنالیز آماری

نتایج بدست آمده با استفاده از روش جداول توافقی، آزمون‌های دقیق فیشر و پیرسون تحت نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آزمون پیرسون با ۱۰۰۰۰ بار تکرار به روش مونتکارلو انجام شده است. آزمون پیرسون براساس توزیع مربع کای می‌باشد، مبنای سطح معنی‌دار بودن در این آزمون‌ها روی $P<0/05$ قرار داده شده است.

یافته‌ها

کلنی‌های ارغوانی رنگ بدست آمده بر روی محیط کشت کروم‌آگار اختصاصی نشان از وجود E.coli $O_{157}:H_7$ است. اما از آن‌جا که روش کشت می‌تواند با خطا روبرو باشد و علاوه بر خطای دید برخی از سروتایپ‌های غیر بیماری زای E.coli $O_{157}:H_7$ که مثبت نشان داده می شود، m-PCR انجام گردید که می‌تواند با اختصاصیت بالا نتایج را گزارش نماید.

پس از تخلیص DNA ژنومیک باکتری E.coli $O_{157}:H_7$ میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که حاصل آن ۰/۳۳۶ بود و غلظت نهایی نمونه به صورت زیر محاسبه گردید:

$$۵۰\times\frac{۵}{۴۰}\times۰/۳۳۶=۲۱۰ng/\mu l$$

واکنش PCR با DNA ژنومیک تخلیص شده: هر سه قطعه stx/stx1 و stx2 و control در مورد E.coli $O_{157}:H_7$ تکثیر شده‌اند.

تأیید محصولات PCR: پس از بررسی قطعات تکثیر شده توسط نرم‌افزار DNASIS، سه آنزیم Hind III، Hae III و E coR V جهت هضم این قطعات در نظر گرفته شد که پس از انجام هضم آنزیمی بر روی هر یک از قطعات نتایج بدین‌صورت است:

آنزیم Hind III: قطعه stx1 را در جایگاه ۳۳۵ مورد بررسی قرار داده که نتیجه این فرایند دو قطعه ۲۸۷ bp و ۳۳۵ bp ایجاد شده است.

آنزیم Hae II: نیز قطعه stx2 را در جایگاه ۲۸۸ برش داده که دو قطعه ۹۳ bp و ۲۸۸ bp ایجاد شده است.

آنزیم E coR V: نیز قطعه کنترل را در جایگاه ۹۶ برش داده که دو قطعه ۹۶ bp و ۱۰۳ bp ایجاد شده است.

تعیین توالی قطعات تکثیر شده و مقایسه نتایج حاصل از آن با توالی قطعات که از بانک ژنوم استخراج شده بود صحت قطعات تکثیر شده را تأیید کرد.

میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: نتیجه حاصل از m-PCR با باکتری‌های دیگر از خانواده انتروباکتریاسه سه قطعه مورد نظر تکثیر نشد.

میزان حساسیت واکنش PCR: پس از تهیه رقت از ژنوم E.coli $O_{157}:H_7$ با غلظت ۲۱۰ ng/ml و انجام واکنش برای هر یک از رقت ها نتیجه بدین‌صورت بود که واکنش تا رقت 10^{-5} از DNA ژنومیک انجام شده است. با توجه به این‌که غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه ۲۱۰ ng/µl بوده است، حساسیت واکنش برابر ½ pg/ml خواهد بود.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای m-PCR (www.stechome.com)

Primer	Target	Sequence (5'-3')	Amplicon size
SFI	Control (mdh)	CTAACCCGGTTAACACCACAGT	199bp
SRI	Control (mdh)	GGAAGAATGACACCAGAGT	
Ka1F	Stx1	GGGATAGATCCAGAGGAAGG	622bp
Ka1R	Stx1	CCGGACACATAGAAGGAAACTC	
Ka2F	Stx2	CTGGCGTTAATGGAGTTCAG	381bp
Ka2R	Stx2	CCTGTCGCCAGTTATCTGAC	

Archive of SID
www.SID.ir

پس از تهیه رقت از کشت باکتری در محیط LB وانجام واکنش برای هر یک از رقت‌ها نتیجه حاصله بدین‌صورت بود که تکثیر قطعه مورد نظر تا رقت 10^{-3} از محیط کشت باکتری انجام شده است که در این رقت تعداد باکتری ۳۲۰ cfu/µl می‌باشد که نشاندهنده حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری است.

تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین محصولات کارخانه تولیدی فرآورده‌های گوشتی در شیراز و تهران از نظر آلودگی به E.coli $O_{157}:H_7$ وجود ندارد. به عبارت دیگر سطح توزیع پراکندگی آلودگی در بین فرآورده‌های گوشتی تولیدی در شیراز و تهران مشابه است.

تجزیه و تحلیل آماری نیز نشان می دهد که تفاوت آلودگی در سطح ۰/۰۵ بین همبرگرهای معمولی ۴۸ ساعت تولید شده، سه ماه تولید شده و شش ماه تولید شده معنی‌دار نیست. به عبارت دیگر فاکتور زمان در این پژوهش تأثیر معنی داری بر افزایش یا کاهش آلودگی به این میکروارگانیسم ندارد.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می گردد ژن‌های stx/stx1 و STX2 در آزمون m-PCR به تفکیک آمده است.

همان‌طورکه در جدول ۳ مشخص است ۲۸/۵ درصد موارد جداسازی شده حاوی ژن stx1 و حدود ۸۳ درصد حاوی ژن stx2 بوده‌اند. این موضوع بیانگر آن است که فرآورده‌ها به تعداد بسیار بیشتری آلوده به ژن stx2 بوده‌اند که می‌توان در روش‌های جداسازی PCR به صورت تک‌ژنی با بررسی های بیشتر به جداسازی این ژن پرداخت که البته جداسازی یک ژن نمی‌تواند به دقیقی جداسازی به روش multiplex PCR باشد.

جدول ۲- نتایج حاصل از آلودگی روی فرآورده‌های گوشتی به E.coli $O_{157}:H_7$

نوع محصول	محل کارخانه	تعداد آزمایش	موارد مثبت به آلودگی	موارد مثبت به آلودگی به روش تشخیصی m-PCR
همبرگر معمولی ۴۸ ساعت پس از تولید	شیراز	۵۰	۱۸(٪۳۶)	۸
همبرگر معمولی ۴۸ ساعت پس از تولید	تهران	۵۰	۱۲(٪۲۴)	۵
همبرگر معمولی سه ماه پس از تولید	شیراز	۵۰	۱۲(٪۲۴)	۴
همبرگر معمولی سه ماه پس از تولید	تهران	۵۰	۱۸(٪۳۶)	۷
همبرگر معمولی شش ماه پس از تولید	شیراز	۵۰	۱۵(٪۳۰)	۹
همبرگر معمولی شش ماه پس از تولید	تهران	۵۰	۱۸(٪۳۶)	۶
همبرگر ممتاز سه ماه پس از تولید	شیراز	۵۰	۱۵(٪۳۰)	۶
همبرگر ممتاز سه ماه پس از تولید	تهران	۵۰	۱۰(٪۲۰)	۴

* تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از روش آزمون کشت اختصاصی و m-PCR از لحاظ آلودگی به E.coli $O_{157}:H_7$ وجود دارد.

جدول ۳- نتایج حاصل از ژن‌های تشخیصی در آزمون m-PCR به تفکیک

نوع محصول	محل کارخانه	Stx1	Stx2
همبرگر معمولی ۴۸ ساعت پس از تولید	شیراز	۳	۷
همبرگر معمولی ۴۸ ساعت پس از تولید	تهران	۲	۴
همبرگر معمولی سه ماه پس از تولید	شیراز	–	۴
همبرگر معمولی سه ماه پس از تولید	تهران	۲	۶
همبرگر معمولی شش ماه پس از تولید	شیراز	۳	۷
همبرگر معمولی شش ماه پس از تولید	تهران	۲	۵
همبرگر ممتاز سه ماه پس از تولید	شیراز	۳	۵
همبرگر ممتاز سه ماه پس از تولید	تهران	۱	۳

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

عدم معنی‌دار بودن تفاوت آلودگی به این میکروارگانیسم بین همبرگرهای ۴۸ ساعت، سه ماه و شش ماه تولید شده نشانگر این موضوع است که می‌بایست به اصول تولید بهداشتی و در واقع فاکتورهای گوشت خام مصرفی در فرآورده‌ها، تولید با رعایت موازین بهداشتی-میکروبی و استفاده از مواد مجاز مصرفی در فرمول ترکیبی همبرگرها توجه نمود چرا که اگر از ابتدای تولید فرآورده های گوشتی، محصولی با بار میکروبی پایین تولید گردد امری کارساز انجام گرفته است و زمان تأثیر خاصی بر افزایش یا کاهش آلودگی به E.coli O_{157}:H_7 ندارد و در واقع میزان اختلاف آلودگی بین محصولات تولیدی در زمان‌های مختلف قابل چشم‌پوشی است و باید به اصول تولید پرداخت.

در پژوهشی که در مورد گوشت گوساله در انتهای خط کشتار در کشتارگاه صنعتی شیراز صورت گرفته بود مشخص گردیده بود که آلودگی به E.coli O_{157}:H_7 در بین گوشت‌های کشتار شده وجود دارد اما این آلودگی در حد بالایی نمی‌باشد و بین صفر تا ۸ درصد نوسان دارد (Tahamtan *et al*., 2006). در تولید همبرگر گوشت ورودی به کارخانهٔ تولیدی از اهمیت بالایی برخوردار است. در صورت آلوده بودن گوشت ورودی به این میکروارگانیسم می‌تواند در قسمت میکسر سایر گوشت‌ها و در نهایت همبرگر تولیدی را آلوده سازد. از آن‌جا که تست E.coli O_{157}:H_7 نه در کشتارگاه و نه در کارخانجات ایران صورت می‌پذیرد لذا امکان آلوده شدن فرآورده‌های گوشتی به این میکروارگانیسم بالا می‌رود. شاید بهترین راه را بتوان در مهار این میکروارگانیسم جداسازی گوشت آلوده و عدم اجازهٔورود آن‌ها به خط تولید معرفی نمود؛ لذا پیشنهاد می‌گردد که تست E.coli O_{157}:H_7 در کارخانجات اجباری گردد. از طرف دیگر نظارت صحیح، مکرر و دقیق از سوی مراجع ذی‌صلاح در کارخانجات امری ضروری به نظر می‌رسد. آموزش کارگران خطر تولید، جداسازی کارگران قسمت پاکسازی و شستشو از قسمت‌های تولید و بسته‌بندی در کاهش آلودگی می‌تواند مؤثر باشد چرا که در صورت وجود آلودگی به E.coli O_{157}: H_7 در گوشت‌های ورودی، کارگران قسمت پاکسازی و شستشو می‌توانند به راحتی آلودگی را به سایر قسمت‌ها منتقل سازند.

در پژوهشی که در سال ۲۰۰۲ صورت گرفته است اشاره شده است که آلودگی لاشه‌های گاوها معمولاً به صورت مستقیم یا غیرمستقیم در طول کشتار و یا در زمان حمل و نقل اتفاق می‌افتد و در بین مراحل کشتار-پوست‌کنی-تخلیه امعاء و احشاء، انتقال به سردخانه و حمل و نقل بیشترین امکان انتقال آلودگی به لاشه وجود دارد (EC, 2002). این موضوع نشانگر این واقعیت است که کنترل بهداشتی در کشتارگاه تا رسیدن به کارخانه باید طبق ضوابط خاصی که اداره دامپزشکی معین نموده است صورت پذیرد. در تحقیقی که در سال ۱۹۸۳ صورت پذیرفت وجود این میکروارگانیسم در همبرگرها مشخص گردید و علت بسیاری از اختلالات معده‌ای روده ای مصرف همبرگرهای نیم‌پز و به دنبال آن آلودگی به E.coli O_{157}:H_7 معرفی گردید (Riley *et al*., 1983). هم‌چنین در سال ۱۹۹۳ نیز وجود این آلودگی در همبرگرها به اثبات رسید و گزارش مبنی بر آلودگی ۷۳۲ نفر در آمریکا که منجر به مرگ ۴ نفر گردید صادر شد که علت آن وجود آلودگی همبرگرهای مصرفی به E.coli O_{157}:H_7 معرفی شد و پیشنهاد گردید که دمای همبرگرهای مصرفی باید در قسمت مرکزی در حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برسد.

در سال ۲۰۰۱ نیز در پژوهشی محصولات با منشأ گاوی علت آلودگی و عفونت به E.coli O_{157}:H_7 معرفی گردیدند. در این پژوهش طیف گسترده‌ای (صفر تا هفتاد درصد) از شیوع انفرادی O_{157}:H_7 در نمونه‌های مدفوع نژادهای مختلف گاو تعیین گردید (Duffy *et al*., 2001).

نتیجه‌گیری

روش تشخیصی m-PCR بسیار دقیق تر از روش‌های کشت اگرچه اختصاصی مانند کروم‌آگار در شناسایی E.coli O_{157}:H_7 عمل می‌نمایند. طبق هر دو روش بررسی آلودگی‌هایی در فرآورده‌های گوشتی مورد آزمون مشاهده گردید. این آلودگی در زمان‌های مختلف تولید نوسان شدیدی نداشت و در واقع زمان

Archive of SID
www.SID.ir

عامل گسترش شیوع این آلودگی به شمار نمی رود. لزوم کنترل‌های بهداشتی در خط کشتارگاه و سپس خط تولید و هم‌چنین آزمون‌های شناسایی در انتهای تولید لازم و ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین تست سواپ مقعدی از گاوها در کشتارگاه می تواند در شناسایی گاوهای آلوده و کشتار آن‌ها در شرایط خاص کمک نماید.

سپاسگزاری

در نهایت از سرکار خانم مهندس آلاله آریا، دکتر سیدعلی حسینی و بیمارستان نمازی شیراز تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Afnor, S. & Alonso, B. (2004). Detection of *E.coli* O_{157}:H_7 in wafer Samples by chromogenic media. Journal Applied and Environ Microbiology, 69, 6103-6110.

Beutin, L., Krause, G. & Zimmerman, S. (2003). Characterization of shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany. Over a 3-years period. Journal of Clinical Microbiology, 42, 1099-1108.

Chinyu, S. U. & Lawrence, J. B. (1995). Escherichia coli o157: H7 Infection in Humans. *Annals of Internal Medicine,* 123, 698-707.

Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P. M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A. S., Lewis, J. H., Swaminathan, B., Bryant, R. G. & Vugia, D.J. (1999). An outbreak of *Escherichia Coli* O_{157}:H_7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine,* 130, 3, 202-209.

Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, T. & Zhao Z. (1997). *Escherichia Coli* O_{157}:H_7. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds. M.P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville, Washington D.C. ASM Press pp: 171-191.

Duffy, G., Gravey, P., Wasteson, Y., Coia, J. E. & McDowell, D. A. (2001). Epidemiology of Verocytotoxigenic E. coli. A tehnical booklet produced for an Eu Concerted Action (CT 98-3935). ISBN 1.

EC European Commission (2002). Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway n 20000. Prepared by the Community Reference Laboratory on the Epidemiology of Zoonoses Bg VV, Berlin, Germany. Working documents SANCO/927/2002, Part 1.

FSIS, Food Safety and Inspection service. (1993). Report on the *Escherichia Coli* O_{157}:H_7 outbreak in the Western State. United States Department of Agriculture.

Hara-kudu, Y., Ikedo, M., Komatsu, O., Yamamoto, S. & Kumagai S. (2002). Evaluation of a chromogenic agar medium for isolation of *Escherichia Coli 026.* Food Control, 13, 6-7, 377-379.

Hui, Y. H., Pierson, M. D. & Gorham, J. R. (2001). *Food-borne Disease Handbook*, 1, 169-196.

Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., O'Brien, A. D., Tacket, C. O. & Levine M. M. (1987). A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O_{157}:H_7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infectious Immunity,* 55, 455-461.

Karmali, M. A., Petric, M. & Bielaszewska, M. (1998). Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia Coli, Journal of Clinical Microbiology,* 37, 396-399.

Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escheichia coli. Clinical Microbiology Reviews,* 1, 142-201.

Oksuz, O., Arici, M., Kurultay, S. & Gumus, T. (2004). Incidence of *Escherichia coli* O_{157} in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. Food Control, 15, 453-456.

Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hevbert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. & Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia Coli s*erotype. *New England Journal Medicicne*, 308, 681-685.

Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubiois, P. & Lange, M. (2001). Characterization of shiga toxin producing *Escherichia Coli* O_{157} serotype *E. coli* isolated in france from healthy domestic cattle. *International Journal of Food Microbiology,* 63, 217-223.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Moleculor Cloning, A laboratory Manual. 3th ed. New York: Coldspring Harbor Laboratory Press, 6.61-6.62.

SCV. Scientific Veterinary Committee (1997). Verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). XXIV/B3/ScVC/0013/1997 Final.

Stampi, S., Caprioli, A., De Luca, G., Quaglio, P., Sacchetti, R. & Zanetti, F. (2004). Detection of *Escherichia Coli* O_{157} in bovine meat Products in northern Italy.

Archive of SID

www.SID.ir

International Journal of Food Microbiology, 90, 3, 257-262.

Tahamtan, Y. E., Pourbakhsh, S. A. & Shekarforoush, S. S., (2006). PCR detection of Escherichia coli O_{157}:H_7 directed from slaughtered Cattle in Shiraz, Iran. Archives of Razi Institue, 61, 1-6.

Urdahl, A. M., Beutin, L., Skjerve, E., Zimmermann, S. & Wasteson, Y. (2003). Animal host associated differences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattleon the same farm. Journal of Applied Microbiology, 95, 92-101.

Vanderzant, C., Splittstoesser D. (1992). Compendium of methods for the microbiological examination. 3rd ed. American Public Health Association, 36, 605 -609.

Willshaw, G. A., Thirlwell, J., Jones, A.P., Parry, S., Salmon, R. L. & Hichey, M. (1994). "Verocytotoxin-producing *Escherichia Coli* O_{157} in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, haemorrhagic

Archive of SID

www.SID.ir

Investigating the Contamination of E.coil O157:H7 in Processed Meat Products Produced in Two Factories at Shiraz and Tehran

S. M. Hosseini [a], H. Ezzatpanah [b*], M. Aminlari [c], M. Mazaheri Assadi [d] D. Ataie [e]

[a] M. Sc. of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

[b] Assistant Professor of the Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[c] Assistant Professor of the Department of Food Science & Technology, Shiraz University, Shiraz, Iran

[d] Assistant Professor of the College of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology

[e] Academic Member of the Department of Food Science & Technology, Kazeron Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Received: 21September 2009 Accepted: 9 March 2010

Archive of SID

Abstract

Introduction: E.coil O157:H7 is one of the main factors leading to food toxicity and diseases such as diarrhea, bleeding coliris, uremic hemolytic syndrome, thrombocytopenic purpura and even death in man.

Materials and Methods: Enrichment was made in two stages by lactose broth and selenite cystein and then cross over was made on chrome agar E.coil O157:H7 media. The purple-color colonies represent the presence of this microorganism. It is worth to mention that the chrome agar specific culture media acts selectively and dose not have the problems of mechanical agar sorbitol culture media. The positive separated cases underwent confirmation tests detection by multiplex PCR. In this method, STX1 and STX2 genes were separated.

Results: The products consisted of premium hamburgers (after 3 months of production) and ordinary hamburgers (after 48 hours, 3 months and 6 months of production). The findings obtained by m-PCR diagnostic test and culture on chrome agar indicated high contamination of tested meat products, that might be due to various reasons namely failure to follow up the health procedure and mechanism and the addition of illegal additive to the products.

Conclusion: We suggest strict microbiological tests to be carried out and E.coil O157:H7 tests become mandatory in meat production plants.

Keywords: *E.coil O157:H7 Processed Meat, Raw Meat.*

**Corresponding Author:* hamidezzatpanah@yahoo.com

www.SID.ir