شناسایی و تعیین ارتباط بین پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های بالینی انسان و نمونه‌های غذایی گوشتی، لبنی و سبزی با استفاده از آنتی سرم‌های پلی والان

یلدا بشرخواه[1]، افشین جوادی[2]*، بهبود جعفری[3]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲.گروه بهداست مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳.گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

***نویسنده مسئول:** *javadi@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۳/۲۵

چکیده

بیماری‌های اسهالی یکی از مشکلات بهداشتی در سرتاسر جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند. یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال اشرشیاکلی می‌باشد که مسئول بسیاری از مرگ و میرهای نوزادان است. آلودگی آب و مواد غذایی عامل اصلی ایجاد عفونت برای انسان با این باکتری می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه شناسایی پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی ایزوله شده از نمونه‌های بالینی انسانی، نمونه‌های گوشتی، لبنی و سبزی با استفاده از آنتی سرم پلی والان و تعیین ارنباط و منشا آلودگی این نمونه‌ها بود. برای این منظور ۴۰ نمونه از نمونه‌های بالینی بیمارستانی، فرآورده‌های گوشتی، لبنی و سالادهای ارسالی برای آزمایشگاه کنترل غذا انتخاب وپس از تایید با تست های بیوشیمیایی، بیماری زایی آن‌ها با آنتی سرم پلی والان مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، ۳۵٪ نمونه‌های بالینی، ۱۷/۵٪ نمونه‌های گوشتی، ۲/۵٪ نمونه‌های لبنی و ۱۷/۵٪ نمونه‌های سالاد و سبزی به عنوان اشریشیاکلی بیماری زا شناسایی شدند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اشریشیاکلی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه اسهال در کودکان در کشور ما مطرح باشد. بنابراین وجود اشریشیاکلی‌های بیماریزا در مواد غذایی لزوم کنترل و رعایت بهداشت مواد غذایی را طلب می‌کند.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، پاتوتایپ، نمونه بالینی، گوشتی، شیر، سبزی.

مقدمه

بیماری‌های اسهالی یکی از مشکلات بهداشتی در سرتاسر جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند (Estrada-Garcia et al., 2009). یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال اشریشیاکلی می‌باشد که مسئول بسیاری از مرگ و میرها و هزینه‌های مراقبت‌های پزشکی است و به عنوان فلور نرمال روده انسان و حیوانات می‌باشد از مدفوع افراد سالم هم جدا می‌شود (Kuhnet et al., 2000). نشخوارکنندگان مخصوصاً گاوها یکی از منابع مهم پخش این باکتری به محیط و انتقال به انسان از طریق مواد غذایی می‌باشد (Osman et al., 2013). با توجه به اینکه از مدفوع این حیوانات به عنوان کود برای مزارع کشاورزی استفاده می‌شود باعث آلوده شدن سبزیجات و دیگر محصولات کشاورزی و همچنین باعث آلودگی آب‌های سطحی می‌باشد که باعث انتقال عفونت به انسان توسط غذاهای با منشا دامی و گیاهی می‌باشد (Osman et al., 2013، Kuhnet et al., 2000). پاتوژن‌های روده‌ای را براساس فاکتورهای

Archive of SID
www.SID.ir

حدت آن‌ها به ۶ پاتوتیپ اصلی تقسیم کرده اند: انتروتوکسیژیک اشریشیاکلی (ETEC)، انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (EPEC)، انتروهموراژیک اشریشیاکلی (EHEC)، انتروانیویزیو اشرشیاکلی (EIEC)، انترواگریگیتیو اشرشیاکلی (EAEC) و دیفیوزلی ادهرنت اشریشیاکلی (DAEC) (Qadriet al., 2005; Vilchez et al., 2000). اشریشیاکلی انتروتوکسیژیک معمولا توسط آب آلوده باعث ایجاد اسهال در کودکان و مسافران می‌شود و همچنین عامل اسهال در حیوانات تازه متولد شده مخصوصا در بچه خوک‌ها و گوساله‌ها و بره‌ها می‌باشد. آلودگی مدفوعی غذا و آب نوشیدنی مسیر اصلی ایجاد عفونت برای انسان می‌باشد و به نظر در حیوانات آلودگی محیط نقش مهمی را بازی می‌کند (Kuhnet et al., 2000). انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی علت عمده اسهال کودکان در کشورهای توسعه نیافته است. بیشتر کودکان زیر ۲ سال توسط این پاتوژن تحت تاثیر قرار گرفته و معمولاً بوسیله غذای آلوده منتقل می‌شود. انتروهموراژیک اشریشیاکلی عامل علائم وسیعی در انسان‌ها می‌باشد که از یک اسهال ملایم تا کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک هموراژیک کشنده متغیر می‌باشد (Kenneth et al., Kuhnet et al., 2000،2004). سویه‌های وروتوکسیژیک بیشتر در کشورهای صنعتی و فرم شدید عفونت در کودکان جوان و سالخورده می‌باشد (Kuhnet et al., 2000). گاو سانان بویژه گوساله یکی از مخازن اصلی STEC می‌باشد و انتقال باکتری از حیوانات به انسان از راه مستقیم تماس با آب، خاک، فضولات نشخوارکنندگان و مصرف مواد غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه آلوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت خورده شده، سبزیجات، آب میوه‌ها (بویژه آب سیب) وجود دارد (Schmidt et al., 1995).انتروانیویسیو اشریشیاکلی دارای ژن *ipaH* است که دلیل ایجاد دیسانتری می‌باشد این ژن توسط ۴ گونه شیگلا و همچنین انتروانیویسیو اشریشیاکلی تولید می‌شود و به نظر از راه غذا و آب آلوده انتقال می‌یابد (Kuhnet et al., 2000). پاتوتیپ انتروگر گیتیو اشریشیاکلی (EAEC) از مهمترین عوامل باکتریائی در رابطه با بیماری‌های اسهالی اندمیک و اپیدمیک در کشورهای پیشرفته و به خصوص در حال توسعه می‌باشد. اغلب سویه‌های انترواگرگیتیو اشریشیاکلی دارای پلاسمید حدت ۶۵-۶۰ مگا دالتونی است که جزء یک کیلو بازی این پلاسمید دارای ProbeEAEC می‌باشد که به طور وسیع در مطالعات اپیدمیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پاتوتایپ دیفیوزلی ادهرنت اشریشیاکلی در کودکان ۱ تا ۵ ساله اسهال غیرخونی ایجاد می‌کند. برخی گزارشات اشاره به این موضوع دارند که ممکن است این سویه‌ها نقش مهمی در اسهال در کشورهای پیشرفته داشته باشند (Zamboni et al., 2004). وجود اشریشیاکلی در غذا بیانگر آن است که سایر میکروارگانیسم‌های انتروباکتریاسه و به ویژه میکروارگانیسم‌های با منشاء مدفوعی یا روده‌ای ممکن است در غذا وجود داشته باشد که بسیاری از آن‌ها بیماری زا هستند، بنابراین نریه اینکه در امر کنترل کیفی مواد غذایی، بررسی و ارزیابی تک تک کلیفرم‌ها و نیز میکروارگانیسم‌ها امکانپذیر نمی باشد، بنابراین از اشریشیاکلی به عنوان نماینده یا شاخص کلیفرم‌ها در ارزیابی بهداشتی مواد غذایی استفاده می‌گردد (Nataro et al., 2000). با توجه به متحرک بودن ژن‌های باکتریایی توانایی کسب عناصر ژنتیکی از جمله جزایر پاتوژنیسیته و فاکتورهای ویرولانس از دیگر میکروارگانیسم‌های موجود در محیط شناسایی اشریشیاکلی پاتوژن بسیار مشکل است. استفاده از روش‌های مولکولی از جمله PCR، آنالیز سکانش DNA و ریبوتایپینگ ارزیابی ذقیقی از ساختار

Archive of SID

www.SID.ir

ژنومی جمعیت‌های اشریشیاکلی ارائه می‌دهند (Schmidt et al., 1995). انجام این تکنیک‌ها پر زحمت و گران قیمت می‌باشد، لذا امروزه در ایران در مراکز بهداشتی - تشخیصی به منظور اطمینان از سلامت عمومی و آگاهی از تهدیدهای بیولوژیک روش‌های قدیمی از جمله سروتیپ بندی براساس آنتی ژن‌های H,O,K پروفایل‌های پلاسمیدی و بیوتیپ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Johnsonet al., 2004، Jafari et al., 2013). با توجه به نتایج حاصل از مطالعات گذشته و اهمیت دانش صحیح در مورد اپیدمیولوژی پاتوژن‌های اسهالی به ویژه پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی هدف از این مطالعه شناسایی پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی ایزوله شده از نمونه‌های بالینی انسانی، نمونه‌های گوشتی، لبنی و سبزی با استفاده از آنتی سرم پلی والان و تعیین ارتباط و منشا آلودگی این نمونه‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

مقدار ۲۵ گرم از نمونه‌های مواد غذایی اعم از گوشتی، لبنی و سبزیجات در آزمایشگاه کنترل مواد غذایی را بعد از یکنواخت کردن به بطری‌های حاوی ۲۲۵ میلی لیتر Lactose (Merck, Germany) broth انتقال داده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. سپس با استفاده از لوپ تلقیح نمونه‌ها را در پلیت‌های حاوی محیط کشت انتخابی Eosin Methylene Blue (Marck, Germany) و محیط کشت Mac Conkey (Merck, Germany) کشت خطی داده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند. برای تاییدیه کلونی هایی که در محیط EMB جلای سبز متالیک و در محیط مک کانکی کلنی هایی به رنگ صورتی تشکیل داده بودند بر روی محیط کشت‌های افتراقی (سیمون سیترات، متیل رد (MR)، وگس پروسکوئر (Vp)، TSI (Triple Suger Iron agar) و اندول کشت داده شدند. نمونه‌های سیترات منفی، MR مثبت، Vp منفی، TSI مثبت و اندول مثبت به عنوان نمونه‌های آلوده به اشریشیاکلی فرض گردیدند (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۹۴۶)(Nataroet al., 2000).همچنین، از نمونه‌های بالینی انسانی (نمونه اسهال) آزمایشگاه تشخیص طبی که از نظر اشریشیاکلی مثبت بودند به آزمایشگاه محل انجام تحقیق انتقال داده شد. سپس از هر کدام از گروه‌های مواد غذایی و نمونه بالینی ۴۰ نمونه مثبت انتخاب شده و با آنتی سرم‌های پلی والان با مارک Sifin ساخت کشور آلمان برای شناسایی پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی به روش آگلوتیناسیون روی لام استفاده گردید (Hajra et al., 2007).

جدول ۱- آنتی سرم‌های پلی والان موجود در کیت Sifin

آنتی سرم	سر گروپ هایی که شناسایی می‌شوند
Anti-coli 1	O26:K60;O44:K47;O114:K90;O125;K70;O142:K86;O158;K-
Anti-coli 2	O55:K59;O86:K61;O91:K-; O111:K85;O119:K69;O126:K71;O127:K63;O128:K67
Anti-coli 3	O25:K11;O78:K80;O103:K-;O118:K-;O124:K72;O145:K-;O157:K-;O164:K-

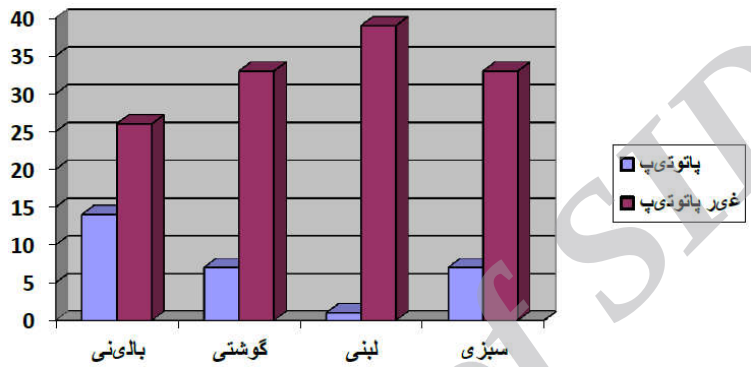
روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

در خصوص تعیین میزان آلودگی، داده‌ها به صورت توصیفی و در مورد تعیین ارتباط نیز از آزمون correlation با نرم افزار SPSS استفاده خواهد گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

براساس نتایج جداول یک تا چهار این فصل طی روش آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های موجود در کیت سیفین از اشریشیاکلی جدا شده، ۱۴ نمونه پاتوتیپ از نمونه‌های بالینی، ۷ نمونه از نمونه‌های گوشتی، ۱ نمونه از نمونه‌های لبنی و ۷ نمونه از نمونه‌های سبزی به عنوان اشریشیاکلی بیماریزا شناسایی می‌شدند (نمودار ۱).



نمودار ۱- فراوانی پاتوتیپ‌های شناسایی شده در نمونه‌های بالینی و غذایی با آنتی سرم

از مجموع نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۸ نمونه مربوط به آنتی سرم ۱ و ۱ نمونه مربوط به آنتی سرم ۲ و ۵ نمونه مربوط به آنتی سرم ۳ و بقیه غیرقابل سروتایپینگ بودند (جدول ۲).

جدول ۲- فراوانی سویه‌های شناسایی شده نمونه‌های بالینی با آنتی سرم

ایجاد آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های موجود در کیت	تعداد	درصد نمونه‌های قابل سروگروپ	درصد سروگروپ‌های شناسایی شده
Anti-coli 1	۸	۲۰	۵۷/۱
Anti-coli 2	۱	۲/۵	۷/۱۴
Anti-coli 3	۵	۱۲/۵	۳۵/۷۱
غیرقابل سروتایپینگ	۲۶	۶۵	-

همچنین از مجموع نمونه‌های مربوط به فرآورده‌های گوشتی مورد بررسی، ۴ نمونه مربوط به آنتی سرم ۱ و ۲ نمونه مربوط به آنتی سرم ۲ و ۱ نمونه مربوط به آنتی سرم ۳ و بقیه قابل سروتایپینگ بودند (جدول ۳).

جدول ۳- فراوانی سویه‌های شناسایی شده نمونه‌های گوشتی با آنتی سرم

ایجاد آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های موجود در کیت	تعداد	درصد نمونه‌های قابل سروگروپ	درصد سروگروپ‌های شناسایی شده
Anti-coli 1	۴	۱۰	۵۷/۱
Anti-coli 2	۲	۵	۷/۱۴
Anti-coli 3	۱	۲/۵	۳۵/۷۱
غیرقابل سروتایپینگ	۳۳	۸۲/۵	-

Archive of SID

www.SID.ir

ولی از مجموع نمونه‌های مربوط به فرآورده‌های لبنی، تنها ۱ نمونه مربوط به آنتی سرم ۳ بوده و بقیه غیرقابل سروتایپینگ بودند (جدول ۴).

جدول ۴- فراوانی سویه‌های شناسایی شده نمونه‌های لبنی با آنتی سرم

ایجاد آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های موجود در کیت	تعداد	درصد نمونه‌های قابل سروگروپ	درصد سروگروپ‌های شناسایی شده
Anti-coli 1	۰	۰	۰
Anti-coli 2	۰	۰	۰
Anti-coli 3	۱	۲/۵	۱۰۰
غیرقابل سروتایپینگ	۳۹	۹۷/۵	-

در حالیکه از مجموع نمونه‌های مربوط به سالاد و سبزی مورد بررسی، ۴ نمونه مربوط به آنتی سرم ۱ و ۱ نمونه مربوط به آنتی سرم ۲ و ۲ نمونه مربوط به آنتی سرم ۳ و بقیه غیرقابل سروتایپینگ بودند (جدول ۵).

جدول ۵- فراوانی سویه‌های شناسایی شده نمونه‌های سالاد و سبزی با آنتی سرم

ایجاد آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های موجود در کیت	تعداد	درصد نمونه‌های قابل سروگروپ	درصد سروگروپ‌های شناسایی شده
Anti-coli 1	۴	۱۰	۵۷/۱۴
Anti-coli 2	۱	۲/۵	۱۴/۲۸
Anti-coli 3	۲	۵	۲۸/۵۷
غیرقابل سروتایپینگ	۳۳	۸۲/۵	-

نتایج نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین نمونه‌های بالینی انسانی، گوشتی، لبنی و سبزی و نوع آنتی‌سرم می‌باشد.

جدول ۶- آزمون مربع کای برای نمونه‌های بالینی، گوشتی، لبنی و سبزی

pected counts are printed below observed counts
uare contributions are printed below expected counts

	انسانی	گوشتی	لبنی	سبزی	Total
1	8	4	0	4	16
	4.00	4.00	4.00	4.00	
	4.000	0.000	4.000	0.000	
2	1	2	0	1	4
	1.00	1.00	1.00	1.00	
	0.000	1.000	1.000	0.000	
3	5	1	1	2	9
	2.25	2.25	2.25	2.25	
	3.361	0.694	0.694	0.028	
4	26	33	39	33	131
	32.75	32.75	32.75	32.75	
	1.391	0.002	1.193	0.002	
Total	40	40	40	40	160

Chi-Sq = 17.366; DF = 9; P-Value = 0.043

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به جدول شماره ۶ ضریب همبستگی توافقی کرامر داده‌های این مطالعه برابر ۰/۴۵۷۶ می‌باشد که نشانگر وجود ارتباط بین آلودگی فاکتورهای تحت مطالعه می‌باشد.

بحث

اشرشیا سال‌هاست که عامل بیماری‌های روده‌ای شناخته شده است و به عنوان مهمترین عامل مسمومیت غذائی قابل گزارش، مطرح بوده است و در بررسی‌های انجام شده، مصرف فرآورده‌های لبنی، گوشت قرمز و گوشت طیور آلوده و مصرف سبزیجات تازه به عنوان منابع آلودگی مطرح می‌باشند که انسان از طریق عمل آوری نادرست باعث اشاعه آن می‌گردد. باکتری اشرشیاکلی از جمله باکتریهایی است که توجه محققان و دست اندرکاران بهداشتی را به خود معطوف کرده است با توجه به اینکه عامل اصلی انتشار و مخزن اصلی اشریشیا، مدفوع است بیشتر مطالعات و گزارش‌های موجود مربوط به آلودگی سبزیجات پرورش یافته در خاک‌های آلوده بوده است. اشریشیاکلی باعث طیف گسترده‌ای از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای از قبیل اسهال، عفونت ادراری، سپتی سمی و منژیت می‌شود. اهمیت بیماری زایی اشریشیاکلی در زمینه بهداشت عمومی در سراسر جهان روبه افزایش است، بنابراین تشخیص سویه‌های بیماری زای آن می‌تواند سهم قابل توجهی در بهداشت عمومی کل مناطق جهان داشته باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اشریشیاکلی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه اسهال در کودکان در کشور ما مطرح باشد که بایستی برای شناسایی آن‌ها از تکنیک‌های مختلف جدید و مبتنی بر DNA بهره گرفت. شناسایی سویه‌های عامل اسهال از چند نظر حائز اهمیت است که عبارتند: ۱- پیدایش سروتایپ‌های بیماریزایی جدید و در راستای آن مقاومت روزافزون این سویه‌های به آنتیبیوتیک‌های کلاسیکک ۲- عدم وجود تکنیک‌های تشخیصی مناسب و متداول جهت شناسایی دقیق سویه‌های تولیدکننده توکسین شیگا و تمایز آن‌ها از میکروفلور طبیعی مدفوع و در نتیجه عدم توجه کافی به آن‌ها ۳- ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و عفونت‌ها در مصرف کننده مواد غذایی دارای آلودگی به انواع تیپ‌های بیماریزای اشریشیاکولای شود. بیماری‌های اسهالی یکی از مشکلات بهداشتی در سرتاسر جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند (Estrada-Garcia et al., 2009). یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال اشریشیاکلی می‌باشد که مسئول بسیاری از مرگ و میرهای نوزادان و هزینه‌های مراقبت‌های پزشکی است. اکثر سویه‌های اشریشیاکلی معمولا توسط آب آلودخ باعث ایجاد اسهال در کودکان و مسافران می‌شود و همچنین عال اسهال در حیوانات تازه متولد شده مخصوصاً در بچه خوک‌ها و گوساله‌ها و بره‌ها می‌باشد. آلودگی مدفوعی غذا و آب نوشیدنی مسیر اصلی ایجا عفونت برای انسان می‌باشد. در مطالعه‌ای که محمد کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۳ انجام دادند از مجموع ۲۸۵ نمونه اسهالی که مورد آزمون قرار گرفتند، ۴۹ مورد (۱۷٪) براساس آزمون‌های شیمیایی به عنوان اشریشیاکلی اسهال زا شناسایی شدند. همچنین در مطالعه مشابه دیگر که توسط مرضیه بیات و همکاران در سال ۹۳ انجام گرفت از ۴۵۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال زیر ۵ سال مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر زنجان طی سال‌های ۹۱-۹۲، ۱۴۰ ایزوله (۳۱/۱٪) اشریشیاکلی بیماریزا شناسایی شد. از سوی دیگر سبزیجات تازه یکی از مواد غذایی مهم در رژیم غذایی هستند، و این به دلیل دارا بودن مواد مغذی ضروری از قبیل

Archive of SID

www.SID.ir

ویتامین‌ها، مواد معدنی و فیبرها و دارای بسیاری فواید سلامتی هستند. مصرف سبزیجات توسط متخصصین تغذیه به شدت توصیه می‌شود زیرا سبزیجات خطر ابتلا به برخی بیماری‌ها نظیر بیماری‌های قلبی عروقی، چاقی و سرطان را کاهش می‌دهند. از طرفی سبزیجات تازه به دلیل استفاده از کودهای آلی بیشتر در معرض آلودگی میکروبی هستند. از آنجاییکه سبزیجات بصورت خام و بدون اعمال هیچگونه فراوری مصرف میشود بنابراین میتواند منبع آلودگی میکروبی باشد. عوامل مختلفی که می‌تواند در ماندگاری میکروارگانیسم‌ها در سبزی هی تازه موثر باشد از جمله میزان کود حیوانی مورد استفاده در خاک که سبزی در آن کاشت میشود، میزان pH سبزیجات، میزان آلودگی اولیه آب‌های مورد استفاده در آبیاری این نوع سبزیها، مدت زمان نگهداری سبزی‌ها قبل از مصرف و استفاده از انواع ضد عفونی کننده‌ها برای کاهش سطح آلودگی و کاهش ماندگاری انواع میکروی‌های عامل بیماریزا از جمله اشریشیاکولای می‌باشد. در یک پژوهش انجام گرفته توسط آندرسون و همکاران در سال ۲۰۱۲ که روی سبزیجات تازه با حداقل پردازش عرضه شده در بازار برزیل بوده است در این مطالعه در مجموع ۱۷۲ نمونه از سبزیجات با حداقل پردازش جمع آوری شده از سوپرمارکت‌های شهر کامپیناز برزیل انجام شد که ۱۰ نمونه به باکتری اشریشیاکلی آلوده بودند که این نتیجه بطور کلی رضایتبخش است. پس در این صورت می‌توانیم بگوییم که حداقل پروسه کم می‌تواند روی بار میکروبی سبزیجات تا حدی تاثیرگذار باشد. در یک تحقیق دیگر از التراسوند جهت کاهش بار میکروبی سبزیجات تازه در مراحل شستشو و ضدعفونی کردن استفاده شده که توسط SedaErsus و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ترکیه انجام گرفته که اثر رضایت بخشی داشته است. در پژوهشی دیگر که در برزیل توسط دانیل فرنا ندا مافی و همکاران روی سبزی ازگانیک انجام گرفت ۱۳۰ نمونه مختلف از سبزیجات ارگانیک فروخته شده در برزیل جهت بررسی باکتری‌های مزوفیل، مخمرها و کپک‌ها مورد بررسی قرار گرفت که میزان آلودگی این سبزیجات به اشریشیاکلی ۴۱/۵ درصد گزارش شده است.

در تحقیقی دیگر اشریشیاکلی را توانسته‌اند از سبزیجات خام جدا کنند، این باکتری‌ها قادرند سبزیجات و میوه جات را در مراحل کاشت و برداشت نگهداری و شستشو و توزیع آلوده کنند. هر ساله تعداد زیادی اپیدمی در اثر مصرف سبزیجات و میوه‌های تازه گزارش میشود. در مجموع سالادها از نظر رشد باکتری‌های مزوفیل و اشریشیاکلی بیشترین درصد آلودگی را دارا بوده و به عنوان آلوده کننده ترین ماده غذایی شناخته شدند. کنترل‌ای مصرفی در اماکن فوق و توصیه عدم مصرف سالاد و سبزی‌های خام در رستوران‌ها و اماکن عمومی، به ویژه در غذاخوری‌های بین راه نیز به ما کمک می‌کند. سبزیجات و میوه‌های تازه جزو مواد غذایی ضروری در رژیم غذایی انسان می‌باشد و امروزه به خوبی ثابت شده است که این مواد ارزش تغذیه‌ای زیادی دارند و مصرف آن‌ها در سلامت انسان موثر است. در بسیاری از کشورها به مردم توصیه می‌کنند که در رژیم غذایی روزانه خود حداقل روزی پنج نوبت از سبزیجات و میوه‌های تازه استفاده کنند (Abadias et al., 2008). علت این توجه زیاد به مواد غذایی تازه ارزش تغذیه‌ای بالای آنهاست. این محصولات تازه میتوانند یک ناقل مناسب برای انتقال باکتری‌های بیماریزا به انسان باشند گزارشات متعددی وجود دارد که سبزیجات خام عامل انتقال عوامل بیماریزا هستند (Beuchat, 1997). بنابراین سبزیجات و میوه‌های تازه یکی از عوامل مهم ریسک پذیر برای سلامتی انسان هستند چون به صورت خام مصرف

Archive of SID
www.SID.ir

میشوند و در معرض آلودگی در هر نقطه از مسیر مزرعه تا سفره می‌باشند. در یک تحقیق که توسط دانشجویان دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام گرفته آلودگی سالادهای توزیع شده در غرب تهران از نظر اشریشیاکلی سالادها (۳۳/۵۸ درصد) آلوده بودند (فرامرزی و همکاران ۱۳۹۰). روده حیوانات زیستگاه‌های طبیعی برای گونه‌های مختلف باکتری اشریشیا هستند. مودا غذایی به دست آمده از این حیوانات ممکن است با اشریشیاکلی در طول کشتار آلوده شوند. در مطالعات مختلف آلودگی به *E.coli* در گوشت گزارش شده که (Xia et al., 2010) بسیار معمول نیز می‌باشد. با توجه به پتانسیل‌های مختلف بیماری زایی پاتوتیپ‌های مختلف از *E.coli*، بسیاری از این مطالعات متمرکز بر O157 STEC، هستند در حالی که دیگر سروگروپ‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند(Hazarika et al.,2007). اگرچه به طور کلی گوشت به عنوان وسایل نقلیه برای انتقال اسهال اشریشیاکلایی در نظر گرفته شده، ولی تحقیقات اخیر نشان داد که گوشت می‌تواند با گونه‌های مختلف ExPEC آلوده و حتی ممکن است یک وسیله مهم نشان دهنده انتشار سویه ExPEC باشد(Jinneman et al., 2003). علاوه بر این، شواهد اپیدمیولوژیک وجود دارد که مصرف گوشت با عفونت‌های دستگاه ادراری همراه است (Chu, 2011). در مطالعه‌ای که جمشیدی و همکاران در سال ۱۳۸۶ انجام دادند از تعداد یکصد نمونه گوشت چرخ کرده که به صورت تصادفی در ماه‌های خرداد و تیر سال ۱۳۸۴ از فروشگاه‌های عرضه گوشت در سطح شهرستان جمع آوری گردیده بود، ۷ نمونه، باکتری اشریشیاکولای غیر تخمیر کننده سوربیتول جداسازی گردید و در تست PCR فقط یک نمونه به عنوان سروتیپ O157:H7 مورد تایید قرار گرفت. همچنین در مطالعه مشابه توسط شاهرخ آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۲ میزان آلودگی گوشت گاوی به اشریشیاکلی ۲۴/۳۲ درصد در رفسنجان گزارش گردید. کلی فرم‌ها می‌توانند به عنوان درجه بندی میزان آلودگی فراورده‌های خام مورد بررسی قرار گیرند. منبع اصلی آن‌ها روده حیوانات خون گرم است. نمونه بارز آن اشریشیا است، که در این دسته جای می‌گیرد. جنس اشریشیا شامل شش گونه است که گونه اشریشیاکلی گونه شاخص آن می‌باشد. اشریشیاکلی معمولترین میکروارگانیسم هوازی در دستگاه گوارش برخی حیوانات و انسان است و به عنوان معیار آلودگی آب و مواد غذایی به مدفوع مطرح می‌باشد.

کلی فرم‌ها طی فرآیند پاستوریزاسیون و با حرارت سریع از بین می‌روند و بعد از حرارت دادن، تکثیر نمی یابند و حضورشان در شیر بیانگر آلودگی ثانویه است. اشریشیاکلی از طریق آب، شیر و فراورده‌های آن و گوشت به انسان منتقل می‌شود. وجود کلی فرم‌های مدفوعی مانند دلالت بر آلودگی شیرخام با مدفوع حیوانی و انسانی است. وجود آن در شیر پاستوریزه نشانه ناسالم بودن آن شیر برای مصرف انسانی است. بنا به گزارش صادقی فرد و همکاران در سال ۱۳۸۵ حدود ۱۹/۷ درصد شیرهای خام ایلام آلوده به اشریشیاکلی بودند که این آلودگی در طی مراحل حمل و فروش افزایش می‌یافت.

در مطالعه دیگری که توسط سالک مقدم و همکاران در سال ۱۳۸۰ انجام یافت چنین گزارش کردند که ۷/۸ درصد فراورده‌های لبنی ارجاعی به آزمایشگاه‌های اداره کنترل مواد غذایی آلوده به اشریشیاکلی بیماریزا بودند. یافته‌های فوق در خصوص نمونه‌های بالینی، گوشتی، لبنی و سبزی همسو با نتایج این تحقیق می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اشریشیاکلی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه اسهال در

Archive of SID

www.SID.ir

کودکان در کشور ما مطرح باشد لذا وجود اشریشیا کلی‌های بیماریزا در مواد غذایی لزوم کنترل و رعایت بهداشت مواد غذایی را طلب می‌کند.

منابع

۱. فرامرزی طاهره، جنیدی جعفری احمد؛ دهقانی سمیه، میرزابیگی مریم، ناصح منیره و رهبرآراسته حمیرا (۱۳۹۰). بررسی آلودگی باکتریایی مواد غذایی در سطح عرضه مناطق غرب تهران. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، سال دوم، شماره ۱۵ ، صفحات ۱۸-۱۲.

2. Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. andVinas, I. 2008. Microbiological quality of fresh minimally processed fruit and vegetables, and sprouts from retail estabilishments. Food Microbiol.123:121-129.

3. Beuchat, L.R. and Ryu, J.H. 1997. Produce handling and processing practices. Emerg Infect Dis. 3: 459-465.

4. Cherry Chu, Y.L. 2011. Genotyping *Escherichia coli* isolates from duck, goose, and gull fecal samples with phylogenetic markers using Multiplex Polymerase Chain Reaction for application in microbial source tracking. J Exp Microbiol Immunol. 15: 130-135.

5. Estrada-Garcia, T., Lopez-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R. , Abonce, M., Lopez-Hernandez, D., Ignacio Santos, J., Rosado, J.L., DuPont, H.L., and Long K.Z. 2009. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. J Clin Microbiol. 47: 93–98.

6. Hajra, T.K., Bag, P.K., Das, S.C., Mukherjee, A., Khan, A. and Ramamurthy, T. 2007. Development of a Simple Latex Agglutination Assay for detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. Clin Vac Imm. 14(5):600-604.

7. Hazarika, R.A., Singh, D.K., Kapoor, K.N., Agarwal, R.K., Pandey, A.B. and Purusottam. 2007. Verotoxic *Escherichia coli* (STEC) from beef and its products. Indian J Exp Biol. 45:207-11.

8. Jafari, A., Aslani, M.M., Bouzari, S. 2013. Enteroaggregative *Escherichia coli*, a heterogeneous and under-diagnosed *E. coli* pathotype in Iran. Gastroentrol Hepatol Bed Bench. 6:71-79.

9. Jinneman, K.C., Yoshitomi, K.J. and Weagant, S.D. 2003. Multiplex real-time PCR method to identify Shiga toxin genes stx1 and stx2 and *Escherichia coli* O157:H7/H- serotype. Appl Environ Microbiol. 69:6327-6333.

10. Johnson, L.K., Brown, M.B., Carruthers, E.A., Ferguson, J.A., Dombek, P.E. and Sadowsky, M.J. 2004. Sample size, libray composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. Appl Environ Microbiol. 70:4478-4485.

11. Kenneth, J., Ryan, M.D., Cray, M.D. 2004. Sherries Medical Microbiology. 4th ed. :354-357.

12. Kuhnet, P., Boerlin, P. and Frey, J. 2000. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food

Archive of SID
www.SID.ir

24:107-117. .

13. Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Microbial. Reviews.11:142-201.
14. Osman, K.M., Mustafa, A.M., Elhariri, M. and AbdElhamed, G.S. 2013. The distribution of *Escherichia coli* serovars, virulence genes, gene association and combinations and virulence genes encoding serotypes in pathogenic *E. coli* recovered from diarrhoeic calves, sheep and goat. Trans Emerg Dis. 4: 69-78.
15. Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S.G., Sack, R.B. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, Treatment, and prevention. Clin Microbiol Reviews. 18: 465-83
16. Schmidt, H., Beutin, L. and Ackerman, E.J. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. Infect Immun 63:1055-1061.

and the environment. Fems Mic Rev.

17. Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., M□by, R. and Weintraub, A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. J Med Microbiol. 58: 630–7.
18. Xia, X., J. Meng, P.F., McDermott, S., Ayers, K., Blickenstaff, T.T., Tran, J., Abbott, J. Zheng, and Zhao, S. 2010. Presence and characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. Appl Environ Microbiol. 76:1709-17.
19. Zamboni, A., Fabbricotti, S.H., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C.A. 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. J Clin Microbiol. 42:1058-1063.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of Escherichia coli and study of relationship between Pathotypes in human clinical specimens and samples of meat, dairy and vegetable by Polyclonal Antisera

Basharkhah Y[1], Javadi A[2*], Jafari B[3]

1- M.sc Student in Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2- Department of Food Hygiene, College of Veterinary Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

* Corresponding Author email: *javadi@iaut.ac.ir*

Received: 7April 2015 Accepted: 15June 2015

Abstract

Diarrheal diseases are a major health problem worldwide, especially in developing countries are considered. One of the most important agents of diarrhea are Escherichia coli which responsible for many deaths of infants. Contamination of water and food is the main cause of human infection with this bacterium. The aim of this study was to identify pathotypes of *Escherichia coli*, isolated from human clinical specimens, samples of meat, dairy and vegetables using polyvalent antisera to determine the relationship between the origins of the contamination of the samples. For this purpose, 40 samples from hospital clinical specimens, meat products, milk and salad sampled and sent to the laboratory for food control selected and confirmed by Imvic test and their pathogenicity with polyvalent antisera were studied. According to the results, 35% of clinical specimens, 17.5% of meat, 2.5% of milk samples and 17.5% of salad and vegetables were identified as vector of pathogenic *E. coli*. So, *E.coli* could be introduced as a common agent of infant diarrhea in our country. Thus, food hygiene and food control necessity demands for the control of presence of pathogenic E.coli.

Keywords: *Escherichia coli*, pathotype, clinical specimens, meat, dairy, vegetables

Archive of SID

www.SID.ir