(مقاله پژوهشی)

بررسی میزان آلودگی سبزیجات به *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (EHEC) به روش کشت و مولتی پلکس PCR در شهرستان اهواز

ستاره شمس سولاری[1*]، محمد رعایایی اردکانی[2]، سیده الهام رضا توفیقی[3]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی.
۲-استاد گروه میکروبیولوژی.
۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی.

۱و۲و۳-گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
ستاره شمس سولاری؛ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
.تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۶۰۳۳۲۴۰
Email: setarehshams171@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین آلودگی سبزیجات به *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک و تعیین سویه O157H7 بعلت تولید اگزوتوکسین stx (شیگا توکسین) و اهمیت آن در ایجاد بیماری‌هایی همچون کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولتیک در انسان صورت گرفت.

روش بررسی: در این پژوهش تعداد ۲۵۶ نمونه سبزیجات تازه شامل کاهو، کلم و سبزی خوردن طی مدت ۸ ماه از ۴ مرکز عمده فروش سبزی در شهرستان اهواز تهیه گردید. پس از غنی سازی اولیه، کلنی های سوربیتول منفی رشد یافته بر روی محیط CT-SMAC به محیط های کشت افتراقی انتقال داده شده و با تست‌های اختصاصی بیوشیمیایی به عنوان *اشریشیا کلی* تائید شدند. سپس سویه‌های تایید شده توسط آنتی سرم‌های *E.coli* O157:H7 بررسی گردیدند. در نهایت با مولتی پلکسPCR حضور ژن های stx2,stx1 ,hlyA eaeA در سویه های سوربیتول منفی ارزیابی گردید.

یافته ها: در ۸ نمونه (۳/۱٪) باکتری *E.coli* O157 شناسایی شد و تنها ۲ ایزوله بعنوان *E.coli* O157:H7 تشخیص داده شدند. پس از مولتی پلکس PCR مشخص شد که ۴ ایزوله حاوی ژن stx1، ۲ ایزوله حاوی ژن stx2، ۱ ایزوله حاوی ژن های stx1 و eaeA، ۱ ایزوله حاوی ژن های stx1، eaeA و hlyA و ۱ ایزوله حاوی ژن های stx1 و hlyA بود. هیچ یک از ایزوله ها حاوی هر چهار ژن نبودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به احتمال انتقال عوامل پاتوژن خطرناکی مانند *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک توسط سبزیجات، عدم توجه به سالم سازی سبزیجات قبل از مصرف می تواند برای سلامت عمومی مشکل آفرین بوده و طغیان بیماریهای منتقله از غذا را به همراه داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سبزیجات، *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک ، O157:H7.

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۶/۵/۵ اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۹/۱۴

مقدمه

سبزیجات و میوه های تازه جزء مواد غذایی ضروری در رژیم غذایی انسان بوده و استفاده از سبزیجات یکی از بهترین راههای دستیابی به زندگی سالم می باشد (۱). در بسیاری از کشورها به مردم توصیه می شود که در رژیم غذایی روزانه خود حداقل روزی پنج نوبت از سبزیجات و میوه های تازه استفاده کنند. اما از طرفی بیماری های میکروبی ناشی از مصرف مواد غذایی نیز همواره یکی از عمده ترین بیماری های جهان محسوب می گردند. این بیماری ها که جزء بیماری های روده ای تقسیم بندی می شوند نه تنها در کشورهای در حال توسعه ، بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده اند (۲). *اشریشیاکلی* انترو هموراژیک (EHEC) از جمله زیر گروه های *اشریشیاکلی* تولید کننده شیگا توکسین می باشد که با دوز عفونت زای پایین (زیر ۱۰۰ ارگانیسم) سبب ایجاد عفونت شده و بیماریهای خطرناکی همچون کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) را در انسان ایجاد می کند. مهمترین راه انتقال آلودگی مصرف غذاهای تهیه شده از گوشت گاو که بطور کامل پخته نشده باشند و سبزیجات تازه آلوده به این باکتری است(۳،۴،۵). این باکتری در بیشتر موارد در کودکان و در افراد مسن ایجاد بیماری میکند. دوره نهفتگی آن ۵-۳ روز است و بیماری تا دوهفته می تواند ادامه داشته باشد. پس از ورود باکتری به بدن و تولید توکسین روده ای مسمومیت ایجاد می شود. علائم بالینی شامل استفراغ-اسهال و گاهی نیز همراه با تب می باشد. مهمترین عارضه آن سندرم همولتیک اورمیک (HUS) است که بعد از اسهال رخ می‌دهد و با آسیب حاد کلیوی، ترومبوستیوپنی، آنمی همولتیک و میکروآنژیوپاتیک همراه می باشد (۶،۷). سویه های EHEC پاتوژنهای زئونوز می باشند و چون قادر به ایجاد بیماریهای خطرناک در انسان هستند بسیار مورد توجه واقع شده اند (۸).

سویه *E.col* O157:H7 به خاطر توانایی زنده ماندن در pH پایین به خوبی شناخته شده است و قادر به زندگی در مواد غذایی دارای اسیدیته ملایم (pH <۲/۵) می باشد. اما همین سویه نسبت به حرارت حساس بوده و در اثر گرمای مناسب یا پخت و پز از بین می رود (۹). *E.col* O157:H7 با استفاده از ساختار شلاق مانند موجود بر سطح باکتری یا همان تاژک –که بطور معمول برای حرکت استفاده می شود– به منظور نفوذ به دیواره سلولهای گیاهی استفاده می کند. تاژک این باکتری قادر است به طور مستقیم با مولکولهای چربی موجود در غشاء سلولهای گیاهی در تعامل باشد و باکتری فاقد تاژک قادر به اتصال به سلولهای گیاه نمی باشد. *E.Cohi* O157:H7 قادراست پس از برقراری اتصال، در ریشه گیاهانی مانند کاهو و اسفناج کلونی تشکیل دهد. محققان معتقدند این باکتری با همان روشی که در روده کلونیزه می شود در سطح گیاهان نیز تشکیل کلنی می دهد (۱۰). مهمترین فاکتور بیماری زایی در سویه های EHEC اگزوتوکسین Stx یا همان شیگا توکسین می باشد. سویه های EHEC، با تولید Stx_1 یاStx_2 و یا هر دو سم شیگا، منجر به ایجاد ضایعات اتصالی-تخریبی در سلولهای اپیتلیال روده می شوند که باعث بروز کولیت هموراژیک و سندروم همولتیک اورمیک در بیماران آلوده می شود (۱۱). ژن های ساختمانی stx_1 و stx_2 معمولاً روی پلاسمیدها و ترانسپوزونها قرار داشته و در جزایر بیماریزایی (PAI) در ژنوم باکتری واقع شده اند و توسط باکتریوفاژهای معتدل جابجا می شوند. ژنوم کامل stx_1 توسط فاژ H-۱۹B، و ژنوم کامل stx_2 توسط فاژ ۹۳۳W کد گذاری می شود (۱۲). فاژ در صورت داشتن گیرنده در سطح باکتری می تواند وارد باکتری شده و از این طریق ژن رمز ننده شیگا توکسین می تواند در بین سویه های مختلف یک باکتری یا حتی در بین سایر باکتری ها گسترش یابد (۱۳). عامل دیگری که سبب بیماری زایی در سویه های (EHEC) می شود اینتیمین

(Intimin) است. پروتئین اینتیمین ۹۴Da وزن داشته و مربوط به غشای خارجی باکتری است. ژن کد کننده این پروتئین (*E.coliattaching and effacing*) *eae*A نام دارد. اینتیمین موجب اتصال باکتری به روده و ایجاد آسیب هایی به نام اتصال و محو شدن (attaching/effacing) و ساختارهای فنجانی شکل (cuplike) در سلولهای اپی تلیال روده می شود. این زخم ها بواسطه وجود جزایر پاتوژنیسیتی، به نام LEE (لوکوس مخرب انتروسیتها) در ژنوم باکتری، ایجاد می شوند. وجود ژن *eae*A در این سویه ها با خطر افزایش اسهال خونی در انسان همراه می باشد. انتروهمولایزین(Ehx) است. انتروهمولایزین نیز که توسط ژن*hly* کد می شود نیز از عوامل حدت این سویه محسوب می گردد. انتروهمولایزین می تواند باعث افزایش اثر سم شیگا شده و موجب لیز گلبولهای قرمز شود، این امر با آزادسازی هم از هموگلوبین همراه است که در این حالت آهن مورد نیاز باکتری در اختیار آن قرار گفته و رشد باکتی افزایش می یابد (۱۴).

روش بررسی

این مطالعه به صورت آینده نگر و توصیفی– مقطعی بوده و نمونه گیری از ابتدای فرودین تا پایان آبان ماه سال ۹۳ انجام شد. اولین اقدام مشخص نمودن بازارچه های اصلی توزیع سبزی و تره بار در اهواز، برای جمع آوری نمونه ها بود. برای این منظور چهار بازارچه در چهار منطقه اهواز (شمال، جنوب، شرق و غرب) در نظر گرفته شد؛ شامل بازارچه ترنج (منطقه کیان آباد)، بازارچه صدف (منطقه آخر آسفالت)، بازارچه عامری و بازارچه کیان. در مجموع ۲۵۶ نمونه سبزیجات شامل ۶۲ نمونه کاهو، ۷۴ نمونه کلم و ۹۰ نمونه سبزی خوردن از مناطق تعیین شده تهیه گردید. برای هر نمونه اطلاعات مربوط به محل نمونه گیری و تاریخ نمونه برداری ثبت شد. نمونه ها پس از تهیه به صورت جداگانه در کیسه های استریل تقسیم بندی شده و به آزمایشگاه منتقل و در آنجا توسط تیغ پیستوری استریل به قطعات کوچکتر تقسیم شدند.

غنی سازی و کشت: ۲۵ گرم از هر نمونه توسط ترازو توزین و به ۲۲۵ میلی لیتر محیط تریپتون سویا براث اصلاح شده به همراه نوبیوسین اضافه گردید. (محیط کشت مذکور در ارلن مایر۵۰۰ میلی لیتری قرار داشت) و سپس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. از آنجایی که *E.col* O157:H7 قاد به تخمیر سوربیتول نیست و به تلوریت پتاسیم و سفکسیم نیز مقاوم است، از محیط تریپتون سویا براث توسط لوب حلقوی استریل بر روی محیط CT-SMAC به صورت خطی کشت داده شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس از کلنی های بی رنگ (سوربیتول منفی) بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد برای اطمینان از *E.coli* بودن باکتری مورد نظر، از کلنی های مذکور به محیطTSIوSIM انتقال داده شده و مجدداً ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس حضور باکتری *E.coli* با اضافه کردن معرف کواکس به لوله حاوی محیط SIM (تست اندول) مورد تایید قرار گرفت.

تعیین سروتایپ: در مرحله بعد با استفاده از آنتی سرم های*O157*و *H7* حضور *E. Coli* O157H7 بررسی شد. به این صورت که مقداری از کلنی ۱۸–۲۴ ساعته در یک قطره آنتی سرم مخلوط شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید سپس لام به مدت ۶۰ ثانیه به آرامی به صورت دورانی حرکت داده شد، ایجاد آگلوتیناسیون واضح و مشخص در قطره آنتی سرم نشان دهنده مثبت بودن واکنش بود. از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی ژن های بیماری زا: از روش جوشاندن (Boiling) برای استخراج DNA باکتری استفاده گردید. به منظور بررسی حضور همزمان ژن های بیماری زا شامل *stx1*

hlyA, eaeA, stx_2، از روش مولتی پلکس PCR که یک روش تغییر یافته PCR معمولی و با استفاده از چندین جفت پرایمر اختصاصی است، استفاده شد. در این پژوهش از پرایمرهای معرفی شده توسط سانتانیلوا (۲۰۰۷) استفاده گردید (۱۵). توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ارائه شده است. حجم نهایی واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر بوده و از Tris-HCL(10mM),Mgcl2(3mM),dNTPs(0.2mM),KCl(10mM)، آنزیم DNA پلی مراز Taq ۱ واحد، ρ mol ۰/۴ از هریک از پرایمرها و ۴ میکرولیتر DNA استفاده شد. پروفایل حرارتی بکار رفته در این تحقیق در جدول ۲ ارائه گردیده است.

میزان ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده (LoadingBuffer۶۰ X) مخلوط گردید و با استفاده از سمپلر به چاهکهایی که در درون ژل آگارز ۱٪ تهیه شده بود انتقال داده شد. به همراه نمونه ها از مارکر مولکولی ۱۰۰ bp DNA Ladder RTU نیز استفاده شد، این مارکر استاندارد می باشد و برای مقایسه سایز DNAو اثبات حضور محصول بر روی ژل بکار می رود. ولتاژ مورد استفاده در این آزمایش ۸۰ ولت و مدت زمان ۶۰ دقیقه بود. پس از اتمام زمان الکتروفورز جریان برق قطع و ژل به دستگاه ترانس لومیناتور انتقال داده شد. توسط این دستگاه کیفیت و میزان حرکت DNA مشاهده شد، و باند ۶۱۴bp برای *stx1*، باند ۷۷۹bp برای*stx2*، باند ۸۹۰bp برای *eaeA* و باند ۱۶۵bp برای *hlyA* مشاهده شدند.

آنالیز آماری: نتایج بدست آمده در این مطالعه، با هدف روشن شدن وجود یا عدم وجود ارتباط معنی دار بین یافته ها، مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. برای این منظور داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ بررسی شدند. تحلیل داده ها با آزمون مربع کایو آزمون دقیق فیشر انجام شد. مرز معنی دار روی P<۰/۰۵ قرار داده شد.

جدول ۱: توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای استفاده شده

پرایمر	توالیالیگونوکلئوتید ۵´ ⟶ ۳´	اندازه محصول
stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614bp
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG	
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779bp
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
eaeA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	890bp
eaeA-R	CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	
hlyA-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165bp
hlyA-R	CTTCACGTGACCATACATAT	

جدول ۲: برنامه حرارتی مولتی پلکس PCR

سیکل ها		دما(oc)	زمان	تعداد تکرار هر سیکل
سیکل اول		۹۵	۳ دقیقه	۱
سیکل دوم	واسرشت سازی	۹۵	۲۰ ثانیه	۳۵
	اتصال	۵۸	۴۰ ثانیه	
	سنتز	۷۲	۹۰ ثانیه	
سیکل سوم		۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۳: مراحل جداسازی اشرشیا کلی انتروهموراژیک

مرحله اول	غنی سازی در محیط تریپتون سویا براث	
مرحله دوم	کشت بر روی محیط CT-SMAC	رشد کلنی های سوربیتول منفی
مرحله سوم	کشت بر روی محیط TSI	اندول + ، حرکت +/- , A/A G
	کشت بر روی محیط SIM	
مرحله چهارم	سرولوژی با آنتی سرم O157:H7	
مرحله پنجم	مولتی پلکسPCR برای ژن های *stx1,stx2,hlyA,eaeA*	

یافته ها

بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، در فاصله بین ماه های فروردین تا آبان، از میان تمامی نمونه های تهیه شده، آلودگی به اشریشیا کلی در سبزیجات مختلف شامل کاهو، کلم و سبزی خوردن در همه این ماه ها مشاهده شد. اما پراکندگی آلودگی سبزیجات به سویه های اشریشیا کلی انتروهموراژیک در ماه های مختلف نمونه گیری، متفاوت بوده و از الگوی خاصی پیروی نمی کند و این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. نتایج فراوانی جدایه های اشریشیا کلی و سویه های *E.coli* O157 به تفکیک ماه نمونه برداری در جدول ۴ ارائه گردیده است.

از ۲۵۶ نمونه سبزیجات تهیه شده در این مطالعه، آلودگی به *E.coli* O157 در ۴ نمونه مربوط به بازارچه صدف، ۱ نمونه مربوط به بازارچه عامری، ۳ نمونه مربوط به بازارچه کیان مشاهده گردید. در نمونه های اخذ شده از بازارچه ترنج آلودگی به این باکتری تشخیص داده نشد.

از مجموع نمونه های تهیه شده، شامل ۹۲ نمونه کاهو، ۷۴ نمونه کلم و ۹۰ نمونه سبزی خوردن، ۹۸ نمونه (۳۸/۲٪) روی محیط کشت SMAC کلنی های سوربیتول منفی ایجاد کردند. پس از کشت کلنی های مذکور روی محیط های تشخیصی TSI,SIM و انجام تست اندول ، ۵۳ جدایه (۲۰/۷٪) به عنوان اشریشیا کلی تشخیص داده شدند. پس از سروتایپینگ جدایه های *اشرشیا کلی* توسط آنتی سرم های O157 وH7 ، در نهایت ۸ جدایه (۳/۱٪) باآنتی سرم O157، و از بین آنها ۲ جدایه (۰/۷٪) با هر دو آنتی سرمO157:H7 واکنش مثبت نشان دادند. بیشترین آلودگی به *E.coli* O157 در کاهو با ۴/۳٪ و کمترین آلودگی به این باکتری در کلم با ۱/۳٪ مشاهده شد. اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. تعداد جدایه های آلوده به *E.coli* O157 به تفکیک نوع سبزی در جدول ۵ ارائه گردیده است.

مولتی پلکس PCR برای بررسی ژنهای *stx1*، *stx 2*، *eaeA* و *hlyA*، بر روی DNA استخراج شده از جدایه های *اشریشیا کلی* انجام گرفت. نتایج بدست آمده به شرح زیر است:

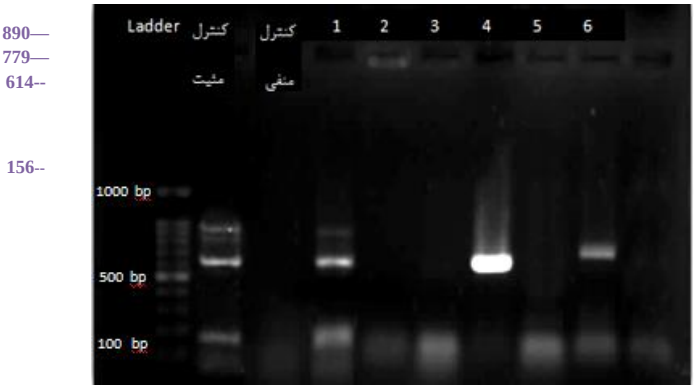
۴ جدایه حاوی ژن *stx1* (۷/۵٪)، ۲ جدایه حاوی ژن *stx2*(۳/۷٪)، یک جدایه حاوی ژن های *stx1* و *eaeA* (۱/۸٪)، یک جدایه حاوی ژن های *stx1*، *eaeA* و *hlyA*(۱/۸٪)و یک جدایه حاوی ژن های *stx1* و *hlyA*(۱/۸٪) تشخیص داده شدند. هیچ یک از جدایه ها حاوی هر ۴ ژن نبودند. از میان جدایه هایی که با آنتی سرم واکنش ندادند، تنها یک جدایه حاوی ژن *stx2* بود.

جدول ۴: تعداد نمونه های سبزیجات اخذ شده، فراوانی جدایه های اشریشیا کولی، *E.coli* O157 تشخیص داده شده به تفکیک از فروردین تا آبان سال ۱۳۹۳

	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان
تعداد نمونه های سبزیجات	۳۴	۳۶	۳۱	۲۵	۳۳	۳۷	۳۱	۲۹
جدایه های *اشریشیا کلی*	۹	۶	۸	۳	۷	۹	۵	۶
E.coli O157	۱	۰	۲	۰	۱	۳	۱	۰

جدول ۵: جدایه های آلوده به اشریشیا کلی و سویه O157 به تفکیک نوع سبزی

	کاهو	کلم	سبزی خوردن
کل نمونه تهیه شده	۹۲	۷۴	۹۰
اشرشیا کولی	۲۱	۱۵	۱۷
E.coli O157	۴	۱	۳



تصویر ۱: حضور ژن های بیماری زای تعیین شده با روش مولتی پلکس PCR؛ به ترتیب از چپ به راست، ستون اول مارکر، ستون دوم کنترل مثبت حاوی ژنهای *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA*، ستون سوم کنترل منفی، ستون چهارم (شماره ۱) سویه حاوی ژن های *stx1*، *eaeA* و *hlyA*، ستون هفتم (شماره ۴) سویه حاوی ژن *stx1* ، ستون نهم (شماره ۶) سویه حاوی ژن *stx2*

بحث و نتیجه گیری

ظهور *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک بعنوان یک پاتوژن منتقله از طریق غذا، صدمات چشمگیری را در صنایع غذایی بر جا نهاده است (۱۶). این باکتری یک پاتوژن نو ظهور بوده که قادر به ایجاد موارد تک گیر و اپدمی پک اسهال، کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولتیک می باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشانگر تنوع جغرافیایی شیوع عفونت با EHEC است. همچنین فراوانی حیوانات مخزن نیز عامل دیگری برای افزایش موارد آلودگی محسوب می‌شود (۱۷). در کشورهای توسعه یافته، توجه بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتاً واضحی از شیوع آن وجود دارد. در کشورهای

در حال توسعه شیوع *E.coli* O157:H7 کمتر گزارش می-شود و دلیل این مسئله انجام بررسی های ناقص و محدود در خصوص میزا ن شیوع و اپیدمیولوژی این باکتری است.

از آنجایی که امروزه ضرورت استفاده از روشهای مولکولی مانند PCR در تشخیص پاتوژنها و عوامل حدت آنها بیش از پیش احساس میگردد و نیز استفاده از این تکنیک در سایر مطالعات مشابه بعنوان یک روش مناسب برای تشخیص و تعیین مقدار پاتوژن زنده در سبزیجات تازه معرفی شده است (۱۸،۱۹).در این پژوهش نیز از تکنیک مولتی پلکس PCR برای شناسایی ژنهای *stx1,stx2,hlyA,eaeA* در جدایه های سوربیتول منفی استفاده شد.

نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج مطالعه رباطی و همکاران در تهران که حاکی از آلودگی اسفناج، سبزی، تربچه و آب هویج با انتروهموراژیک *اشریشیاکلی* بوده در این بین ۷ نمونه حاوی ژن *stx1* و ۳ نمونه حاوی ژن های *stx1,eaeA* بودند، همخوانی دارد (۹).

در مطالعه که توسط اوزپینار و همکاران در استامبول انجام شد، ۱۸۰ نمونه گیاهی از چند بازار منطقه ای در استامبول جمع آوری شده و با روش زمان واقعی PCR بررسی شدند، نتایج بدست آمده آلودگی به اشریشیاکلی را در سبزیجاتی مانند اسفناج، کاهو، جعفری، هویج، خیار و گوجه فرنگی نشان می داد، و از بین ۱۸۰ نمونه ۱۳ نمونه آلوده به STEC بودند . سروتیپ O157 در جعفری، کاهو و هویج یافت شد (۲۰). مطالعه تزکوپ در آلمان به استفاده از روش PCR برای تشخیص و جداسازی اشریشیاکلی انتروهموراژیک در سبزیجات اشاره دارد و مشخص نموده که دانه های تازه جوانه زده آلوده به این باکتری هستند، بیشترین آلودگی در این مطالعه مربوط به سویه O104:H4 می باشد (۶). در پژوهش دیگری که توسط چانگو و همکاران در مالزی بر روی تعیین آلودگی سبزیجات و جوجه به *E.coli* O157:H7 صورت گرفته بود، مشخص گردید که بیشترین شیوع *E.coli* O157:H7 در مرغهای ارگانیک و سپس در، لوبیا و تربچه سفید است (۲۱). در جمهوری چک نیز اسکوکووا و همکاران بر روی آلودگی سبزیجات خام و دانه های جوانه زده مطالعه کردند و از ۹۱ نمونه مورد بررسی، ۲۴ نمونه از نظر وجود باکتری *E.coli* مثبت بودند، در ۳ نمونه ژن *eaeA* از سبزیجات وارداتی به این کشور جدا شد، هیچ یک از نمونه ها حاوی ژنهای *stx1,stx2,hlyA* نبودند (۲۲). اما علی یحی سعید در کرکوک عراق در مطالعه ای که بر روی تشخیص *E.coli* O157:H7 در سبزیجات بود، موفق به شناسایی سویه O157 در نمونه های گیاهی نشد (۲۳).

بطور کلی عوامل مؤثر در آلودگی میکروبی سبزیجات را می توان به سه دسته تقسیم کرد:

۱-کیفیت آب مصرف شده در آبیاری

۲-کیفیت زمین کشاورزی و کود مورد استفاده

۳-کیفیت محل نگهداری سبزیجات هنگام عرضه

سبزیجات تهیه شده در این مطالعه همگی در استان خوزستان کشت شده اند، در این استان با توجه به وجود منابع عظیم آبی، استفاده از فاضلاب برای آبیاری مزارع معمول نیست، اما طبق مطالعات صورت گرفته آب رودخانه ها نیز بدلیل ورود پساب های صنعتی و شهری بار آلودگی بالایی دارند (۲۴). در مطالعه مرعشی و همکاران که بروی عوامل بیولوژیکی و میکروبیولوژیکی رودخانه کارون صورت گرفت مشخص گردید که با توجه به حجم و نوع پسابها و فاضلابهای ورودی به رودخانه کارون در تمام ایستگاه های مورد بررسی باکتری های بیماری زا از جمله *سالمونلا*، *شیگلا* و *اشریشیاکلی* در آب دیده شدند (۲۵). این مسئله می تواند بر کیفیت میکروبی محصولات کشاورزی منطقه موثر باشد. در مطالعه لیبوک در هلند که در مورد اثر آب و کود مورد استفاده در مزارع سبزیجات تحقیق نموده، آلودگی سبزیجات

به *E.coli* O157:H7 و *سالمونلا* را گزارش نموده است (۲۶). در مطالعه کراتا در غنا نقش تأثیرگذار استفاده از فاضلاب تصفیه نشده در آلودگی میکروبی کاهو مشخص شد (۲۷).

نکته دوم که بسیار حائز اهمیت است توجه به محیط کشاورزی و کیفیت کود بکار رفته در زمین های کشت سبزیجات است (۲۸). نکته سوم، محل نگهداری سبزی هنگام عرضه در بازار است، بر اساس مشاهدات صورت گرفته در این پژوهش، در مناطقی که سبزیجات در محل نامناسبی از نظر بهداشتی نگهداری می شدند آلودگی میکروبی بالاتری تشخیص داده شد.

با توجه به اهمیت تغذیه سالم ، استفاده روزانه از سبزیجات تازه در رژیم غذایی ضروی بنظر می رسد اما در عین حال باید نقش سبزیجات در انتقال عوامل پاتوژن خطرناکی مانند *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک را در نظر گرفته و به شرایط کشت و نگهداری سبزیجات و سالم سازی آنها قبل از مصرف توجه شود.

منابع

1-Delbeke, S., Ceuppensa, S., Holvoeta, K.(2015). Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basilInternational. Journal of Food Microbiology. 193:1–7.

2-Aparecida de Oliveira,M., Maciel de Souza,V., Bergamini, M., Cristina, E.(2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil . Food Control. 22(8):1400-1403.

3-Banerjee, R., Hersh,AL., Jason Newland, J.(2011). Streptococcus pneumoniae-associated Hemolytic UremicSyndrome Among Children in North America.The Pediatric Infectious Disease Journal. 30(9):127-135.

4-AskariBadouei, M., ZahraeiSalehi, T., RabbaniKhorasgani, M., Tadjbakhsh, H., NikbakhtBrujeni, G. (2010). Occurrence and characterisation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic calves. Comp Clin Pathol. 19:295–300.

5-James, L., Evoy, M., Luo,Y., Conway,W., Zhou, B., Feng, H .(2009). Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to grow on field-cored lettuce as impacted by postharvest storage time and temperature. international Journal of Food Microbiology. 128: 506–509.

6-Tzschoppea, M., Martinb, A., Beutin, L.(2012). A rapid procedure for the detection and isolation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. International Journal of Food Microbiology. 152(3):19-30.

7-Lee, CF., Liu, SC., Lue, KH., Chen, JP., Sheu, JN.(2006). Pneumococcal Pneumonia with Empyema and Hemolytic Uremic Syndrome in Children: Report of Three Cases. J Microbiol Immunol Infect. 39:348-352.

8-Pina,DG., Johannes,L.(2005). Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. Toxicon .45: 389–393.

9-Robati, R., Gholami, S.(2013). Estimation of virulence genes of Shiga toxin producing *Escherchia coli* from juice purchase and vegetables in Tehran/Iran. Journal of Experimental Biology. 3(2):457-462.

10-UK Standards for Microbiology InvestigationsIdentification of *Escherichia coli* O157.(2012). Bacteriology – Identification. 22(3.2):1-18.

11-Obrig, TG.(2010). *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. Toxins. 2(12): 2769-2794.

12-Welinder-Olsson, C., Kaijser, B.(2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Scandinavian J Infect Dis . 37(6-7):405-416.

13-Li, F., Zhao, C., Zhang, W., Cui, S., Meng ,J., Wu, J.(2005). Use of Ramification Amplification Assay for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Other *Escherichia coli* Shiga Toxin- Producing Strains. J Clin Microbiol. 43: 6086 -6090.

14-Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., Karch, H.(2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. International Journal of Medical Microbiology. 304(5-6): 521–529.

15-Santaniello, A., Gargiulo, A., Borrelli, L., Dipineto, L., Cuomo, A., Sensale, M.(2007). Survey of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in urban pigeons (Columba Livia) in the city of Napoli, Italy. Ital J Anim Sci . 6: 313-16.

16-Taban, BM., Aytac, SA., Akkoc, N., Akcelik ,M.(2013). Characterization of antibiotic resistance in Salmonella enterica isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. Braz J Microbiol. 44(2):385-391.
17-Kim, J., Kim, S., Kwon, N., Bae, W., Lim, J., Koo, H. (2005) . Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Using Different Detection Methods and Molecular Determination by Multiplex PCR and RAPD . J Vet Sci. 6: 7-9.
18-Kargar, M., Dianati, P., Homayoon, M., Jamali, H.(2013). Isolation,Eharacterization and Antibiotic Resistance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Hamburger and Evolution of Virulence Genes *stx1, stx2, eaeA* and *hly* by Multiplex PCR. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 31(3):208-214.
19-Kawasaki, S., Fratamico, P., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima,T., Kawamoto, S. (2009) Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. Foodborne Pathogens and Disease.6(1): 81-89.
20-Ozpınar, H., Turan, B., Tekiner, IH., Tezmen, G., Gökçe ,I., Akıneden, O.(2013). Evaluation of pathogenic Escherichia coli occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. LettApplMicrobiol. 57(4):362-367.
21-Chang, W.S., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Khatib, A., Lye, Y L.(2013). Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in organic vegetables and chickens. International Food Research Journal. 20(2): 1023-1029.
22-Skockova, A., Karpískova ,R., Koláčková, I., Cupakova, S. (2013). Characteristics of Escherichia coli from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. Int J Food Microbiol. 167(2):196-201.
23-Saeed, AY., Mazin, H., Saadi,A., Hussein, SO. (2013).Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables.ournal of Agriculture and Veterinary Science. 6(2):16-18.
24-Mohammadi, P. (1390). A review of the standards and practices of wastewater for irrigation. Environmental working group of the National Committee on Irrigation and Drainage: 8-1.
25-Marashi, S, Mobed, P, Jafarzadeh, N. (1387). Karun River land affected by biological factors (area of study: Karun River in the city of Ahvaz). Second Conference on Environmental Engineering.
26-Liu, C., Hofstra, N., Franz, E. (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella spp*. International Journal of Food Microbiology. 163(2-3):119–128.
27-Keraita.B., Konradsen.F., Drechsel.P. (2007).Effect of low-cost irrigation methods on microbial contamination of iettuce irrigated with untreated wastewater. Trop Med Int Healt. 12(6):15-22.
28-Farhangi, M B., Mosaddeghi, MR., Safari Sinegani, A., Mahboubi,A. (2012). nsaturated Transport of Cow Manure-Borne Escherichia Coli Through the Field Soil. J. Sci. & Technol. Agric. &Natur. Resour. Water and Soil Sci. 16(59).

Study of the Contamination Rate of Vegetables by Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Using Multiplex PCR and Cultivation Methods in Ahvaz Province

Setareh Shams Solari[1*], Mohammad Roayaei Ardekani[2], Seyedeh Elham Rezatofighi[3]

1-M.Sc Student in Microbiology.
2-Ph.D in Microbiology.
3-Assistant Professor of Microbiology.

1,2,3-Department of Microbiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Setareh Shams Solari; Department of Microbiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel: +989166033240
Email: setarehshams171@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* is a pathogen that can be transmitted to humans through food products and causes dangerous diseases such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans because of shiga toxin production.

Materials and Method: In this research, 256 samples of fresh vegetables including lettuce, cabbage and eating herbs were prepared from 4 vegetable wholesale centers in the city of Ahvaz during 8 months. After primary enrichment, Sorbitol negative colonies grown on CT-SMAC medium were subcultured on differential culture media and confirmed as *E. coli* by specific biochemical tests. Confirmed strains were then investigated by *E.coli* O157:H7 antiserum. Finally, the presence of stx2, stx1, eaeA and hlyA genes was evaluated in sorbitol negative strains using multiplex PCR.

Result: 8 *E.coli* O157 (3.1%) bacteria were detected, only 2 isolates were identified as *E.coli* O157:H7. After multiplex PCR it became clear that 4 isolates contained stx1 gene, 2 isolates stx2 gene, 1 isolate stx1 and eaeA genes, 1 isolate stx1, eaeA and hlyA genes and 1 isolate stx1 and hlyA genes. None of the isolates contained all four genes.

Conclusion: The presence of *E.coli* bacteria in vegetables is problematic for public health and can cause food-borne diseases.

Keywords: Vegetables, Enterohemorrhagic Escherichia coli, O157:H7.

►*Please cite this paper as:*
Shams Solari S, Roayaei Ardekani M, Rezatofighi SE. Study of the Contamination Rate of Vegetables by Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Using Multiplex PCR and Cultivation Methods in Ahvaz Province. Jundishapur Sci Med J 2017; 16(6):673-682.

Received: Feb 7, 2017 **Revised: Aug 6, 2017** **Accepted: Dec 5, 2017**