مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره اول (پیاپی ۶)، بهار ۱۳۸۹
صفحات ۴۷-۴۰

Original Article

ارزیابی شیوع ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین در فروشگاه‌های عرضه کننده آب میوه و سبزیجات در شهرستان شیراز

مرجان شاه ایلی[۱]، دکتر محمد کارگر*[۲]، عباسعلی رضاییان[۳]، مریم همایون[۴]، مهدی کارگر[۵]، صادق قربانی دالینی[۶]

[۱]مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، گروه میکروبیولوژی، [۲]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی،
[۳]مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۴]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، باشگاه پژوهشگران جوان،
[۵]کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، [۶]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین می‌توانند انسان‌ها را از طریق مصرف غذاهای حیوانی و گیاهی آلوده نمایند و عامل ایجاد مسمومیت‌های غذایی همراه با اسهال، کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیت و حتی مرگ باشند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7 از نمونه‌های آب میوه و سبزیجات شهرستان شیراز بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۸۹ نمونه آب میوه و سبزیجات جمع آوری شده از چهار منطقه شیراز انجام شد. نمونه‌ها پس از غنی سازی در محیط ECB واجد نوو بیوسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از محیط CT-SMAC و VRBA به منظور بررسی تخمیر سوربیتول و لاکتوز و از محیط کروموآگار برای بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی جدایه‌های باکتریایی استفاده شد. با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی باکتری اشریشیا کلی O157 تایید گردید. در نهایت وجود ژن‌های بیماری‌زای *stx1*، *stx2*، *eae* و *hly* با استفاده از Multiplex PCR و ژن‌های *rfb* O157 و *fliC* H7 با روش single PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۶۹ باکتری سوربیتول منفی (۷۷/۵۳٪) جداسازی گردید که پس از بررسی‌های سرولوژیکی ۲۱ باکتری (۲۳/۶۰٪) به عنوان اشریشیا کلی O157 شناسایی شدند. از باکتری‌های یاد شده ۱۷ باکتری (۸۰/۹۵٪) ژن rfb O157 و ۹ باکتری (۴۲/۸۴٪) ژن fliC H7 را داشتند. با ارزیابی مارکرهای بیماری زایی، در ۳ نمونه ژن *stx1* و در یک نمونه ژن‌های *stx1* و *eae* شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: مطالعات گسترده‌تر بر روی منابع، میزان شیوع، سرنوشت و انتقال اشریشیا کلی O157:H7 در نزدیکی محیط‌های تامین سبزیجات به منظور تعیین مکانیسم‌های آلودگی قبل از برداشت محصول و توانایی انتقال آلودگی و بیماری‌زایی برای انسان ضروری است.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی O157:H7، PCR، عوامل بیماری‌زایی

دریافت مقاله: آذر ۸۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
تلفن ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳، نمابر: ۰۷۱۱-۶۲۷۱۵۴۷
پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

مقدمه

اشریشیا کلی تولیدکننده شیگا توکسین (Shiga Toxigenic Escherichia *coli*=STEC) اولین بار در سال ۱۹۸۲ به عنوان یک پاتوژن انسانی شناسایی شد. از آن زمان به بعد، بیش از ۲۰۰ سروتیپ STEC از مواد غذایی، نمونه‌های حیوانی و منابع دیگر جداسازی شده است (۱). اشریشیا کلی O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ سویه‌های تولید کننده شیگا توکسین اشریشیا کلی می‌باشد که در ایجاد بیماری‌های منتقل شونده به وسیله مواد غذایی نقش دارد (۲). این سروتیپ عامل اصلی در ایجاد موارد تک‌گیر و همه‌گیری‌های کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک است. عفونت‌های انسانی ناشی از این باکتری در اثر مصرف آب و غذای آلوده ایجاد می‌شوند (۳ و ۴). محصولات غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه نشده، پنیر، سس مایونز، میوه‌جات، سبزیجات، کاهو، سالاد، اسفناج، جوانه ترب، آب میوه، سوسیس و کالباس، همبرگر و گوشت چرخ کرده به عنوان منابع آلودگی اشریشیا کلی O157:H7 گزارش شده است (۲ و ۴). هر میکروارگانیسمی برای رشد به یک محدوده pH خاص احتیاج دارد. از آن‌جا که میکروارگانیسم‌ها برای تنظیم pH داخلی خود ساختار خاصی ندارند، به شدت تحت تاثیر pH ماده غذایی قرار می‌گیرند. معمولا غذاهایی با pH پایین به راحتی توسط باکتری‌ها فاسد نمی‌شوند. اشریشیا کلی O157:H7 به خاطر توانایی زنده ماندن در pH پایین به خوبی شناخته شده است. اشریشیا کلی O157:H7 توانایی زنده ماندن در غذاهایی با pH پایین به ویژه آب میوه، سوسیس و کالباس تخمیری را دارد (۵).

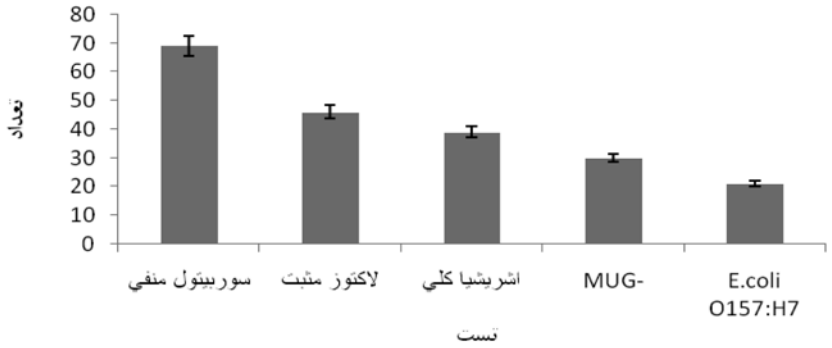
منابع آلودگی میوه و سبزیجات شامل آب آلوده و کودهای حیوانی مورد استفاده در زمین‌های کشاورزی است. زمانی که امکان ورود گاو و نشخوارکنندگان دیگری مثل گوزن به زمین‌های کشاورزی و مزارع سبزی وجود داشته باشد، شانس آلوده شدن میوه و سبزی‌های خام با باکتری اشریشیا کلی O157:H7 افزایش می‌یابد (۶ و ۷).

سویه‌های STEC دو سیتوتوکسین قوی به نام شیگا توکسین‌های ۱ و ۲ (Stx1 و Stx2) را تولید می‌کنند که ژن‌های آن توسط فاژ کد می‌شود. این توکسین‌ها دارای اثر سیتوپاتیک بر روی سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای هستند که در ایجاد اسهال خونی نقش دارد. از دیگر عوامل بیماری‌زای سویه‌های STEC، پروتئینی به نام اینتیمین (intimin) است که مسئول اتصال باکتری به روده و ایجاد آسیب‌های خاصی به نام اتصال و محو شدن (attaching/effacing) و ساختارهای فنجانی شکل (cup like) در سلول‌های اپی‌تلیال روده می‌باشد. پروتئین اینتیمین یک پروتئین ۹۴kDa غشای خارجی است. به ژن کدکننده این پروتئین eaeA (*E. coli* attaching and effacing) می‌گویند. وجود ژن eae در سویه‌های STEC به وضوح با خطر افزایش اسهال خونی در انسان همراه می‌باشد. (۱ و ۸). دوز عفونی پایین باکتری، ضرورت توسعه تکنیک‌های تشخیصی حساس را نشان می‌دهد تا بتواند ایمنی و سلامت غذا را تامین کند (۹). با وجود این که ژن‌های کدکننده شیگا توکسین‌ها (*stx1* و *stx2*) و ژن‌های *eaeA* و *hly* مهم‌ترین ژن‌های بیماری‌زایی شناخته شده سویه‌های STEC هستند، اما ارزیابی ژن‌های *rfb* O157 و *fliC* H7 در سویه‌های تائید شده با آنتی سرم، می‌تواند به تشخیص دقیق‌تر باکتری کمک نماید. هدف از این پژوهش، پایش سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7 در نمونه‌های سبزیجات و آب میوه‌های سنتی شیراز و مقایسه روش‌های سرولوژی و مولکولی به منظور شناسایی سروتیپ O157:H7 در باکتری‌های جداسازی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌گیری: این پژوهش به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۸۹ نمونه (آب هویج، تربچه، کاهو و سبزیجات دیگر) تهیه شده از فروشگاه‌های عرضه کننده این محصولات در ۴ منطقهٔ جغرافیایی غرب، شرق، شمال و جنوب شیراز در سال ۱۳۸۹ انجام شد. اطلاعات مربوط به محل جغرافیایی، زمان نمونه‌گیری و دمای نگهداری در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه‌ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به سرعت مورد آزمایش قرار گرفتند.

ب) غنی‌سازی: به منظور غنی‌سازی، ۲۵ گرم از نمونه‌های کاهو و سبزیجات و ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های آب میوه جداسازی و پس از کشت در ۲۲۵ میلی لیتر محیط اشریشیا کلی براث



نمودار ۱: توزیع فراوانی و نسبت باکتری‌های مشکوک به اشریشیاکلی O157:H7 بر اساس تست‌های بیوشیمیایی.

(ECB) تهیه شده از شرکت دیفکو (آمریکا) حاوی ۲۰ mg/l نوبیوسین تهیه شده از شرکت سیگما (آمریکا) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرم‌خانه‌گذاری گردید (۱۰).

ج) جداسازی باکتری: تمام نمونه‌های غنی شده بر روی محیط سوربیتول مک‌کانکی آگار (SMAC) تهیه شده از شرکت مرک (آلمان) حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر سفیکسیم (Oxoid, UK) و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تلوریت پتاسیم (Oxoid) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ºC، کلنی‌های سوربیتول منفی خالص‌سازی گردید. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری‌های جداسازی شده محیط‌های ویولت رد بایل آگار (VRBA) و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) هر دو تهیه شده از شرکت مرک مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین به‌منظور بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی، باکتری‌های تایید شده به عنوان اشریشیا کلی بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 تهیه شده از شرکت هایمدیا (هند) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ºC گرم‌خانه‌گذاری گردید (۱۰ و ۱۱).

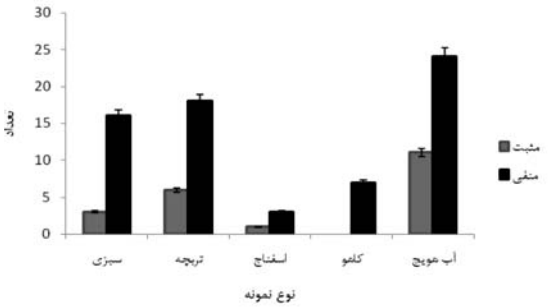
د) تعیین سروتایپ: به منظور تایید نهایی کلنی‌های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی، از تست آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم اختصاصی O157 (بهار افشان، ایران) استفاده شد (۸).

ه) ارزیابی ژن‌های بیماری‌زا: استخراج DNA با استفاده از کیت DNP^{TM} (سیناژن، ایران) انجام گردید. برای ردیابی هم‌زمان ژن‌های بیماری‌زای *hly*، *eae*، *stx1* و *stx2* از روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط Santaniello در سال ۲۰۰۷ استفاده شد. حجم نهایی واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و حاوی Tris-HCL (۱۰mM)، $MgCl_2$ (۳mM)، dNTPs (۰/۲mM)، KCl (۱۰mM)، ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq*، ۲۰pM از هر یک از پرایمرها و ۴µl DNA انجام شد. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne, UK) با شرایط حرارت: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۹۰ ثانیه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز توسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. به‌عنوان کنترل مثبت از سویه 933J اشریشیا کلی O157:H7 و به‌عنوان کنترل منفی از سویه اشریشیا K12 استفاده شد (۱۲). هم‌چنین به منظور تعیین هویت دقیق ویروتیپ O157:H7 از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *rfb* O157 و *fliC* H7 استفاده شد (۱).

یافته‌ها

از نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۹ نمونه (۲۱/۳۵٪) مربوط به سبزی، ۲۴ نمونه (۲۶/۹۷٪) تربچه، ۴ نمونه (۴/۴۹٪) اسفناج، ۷ نمونه (۷/۸۶٪) کاهو و ۳۵ نمونه (۳۹/۳۳٪) مربوط به آب هویج بود. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی در محیط CT-SMAC، ۶۹ مورد (۷۷/۵۳٪)، کلنی‌های سوربیتول منفی و ۴۶ مورد (۵۱/۶۹٪) کلنی‌های لاکتوز مثبت در محیط VRBA جداسازی گردید. پس از کشت بر روی محیط‌های اختصاصی، ۳۹ نمونه (۴۳/۸۲٪) به عنوان اشریشیاکلی تعیین هویت شدند.

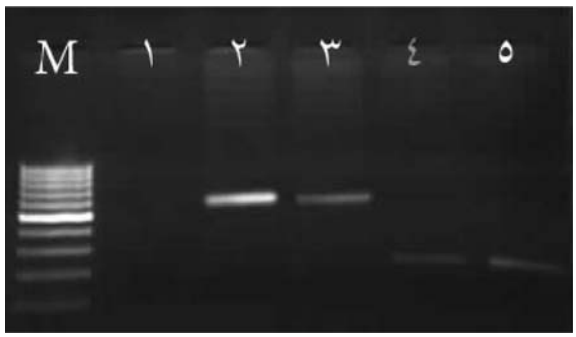
پس از بررسی فعالیت بتاگلوکورونیدازی بر روی محیط



نمودار۲: فراوانی مطلق و نسبت باکتری‌های جدا شده با روش سرولوژیکی بر اساس نوع نمونه.

اختصاصی کروموآکار، ۳۰ باکتری اشریشیا کلی بتاگلوکورونیداز (MUG) منفی (۳۳/۷۱٪) و با استفاده از آنتی سرم اختصاصی، ۲۱ باکتری اشریشیا کلی *O157:H7* (۲۳/۶۰٪) جداسازی شد (نمودار ۱).

بیشترین سروتیپ‌های شناسایی شده با روش سرولوژی مربوط به آب هویج و کم‌ترین آن‌ها مربوط به اسفناج به ترتیب با فراوانی ۵۲/۳۸٪ و ۴/۷۶٪ بود (نمودار ۲). پس از بررسی‌های مولکولی، از مجموع نمونه‌های تائید شده با آنتی سرم ۱۷ نمونه (۸۰/۹۵٪) دارای ژن O157 *rfb* و ۹ نمونه (۴۲/۸۶٪) دارای ژن H7 *fliC* بودند (شکل ۱). هم‌چنین در ۳ نمونه (۳/۳۷٪) ژن *stx1* و در ۱ نمونه (۱/۱۲٪) ژن‌های *stx1* و *eae* مشاهده گردید که هر ۴ مورد مربوط به سویه‌هایی بود که با ژن‌های O157 *rfb* و H7 *flic* نیز به عنوان اشریشیاکلی O157:H7 تائید شده بودند (شکل ۲).



شکل ۱: نمایش ژن‌های اختصاصی سروتیپ در باکتری اشریشاکلی O157:H7 بر روی ژل آگاروز. ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف‌های ۲ و ۳ نمونه‌های واجد ژن H7 *fliC* و ردیف‌های ۴ و ۵ نمونه‌های واجد ژن O157 *rfb*.

بحث

باکتری اشریشیاکلی O157:H7، چهارمین عامل بیماری‌های منتقل شونده از طریق مواد غذایی در آمریکا محسوب می‌شود. شمار موارد بیماری‌های مرتبط با مصرف انواع آب میوه و سبزیجات خام نیز طی سال‌های اخیر افزایش یافته است (۱۳).

با توجه به بقای طولانی مدت باکتری در محیط، امکان انتقال غیرمستقیم و جا به جایی باکتری از طریق حشرات وجود دارد. حشرات در نتیجه ارتباطی که با کود و مدفوع حیوانات دارند، موجب انتشار این باکتری در محیط می‌شوند. جانوران کندرو (مانند حلزون) از آفت‌های کشاورزی هستند که معمولا سبزیجات پر برگ را آلوده می‌کنند. این جانوران به طور مداوم باکتری‌های خاک و محیط خود را می‌بلعند. بنابراین پتانسیل آلودگی با سویه O157 را دارند. این بی مهرگان ممکن است در انتقال سویه O157 به میوه و سبزیجات از طریق تماس مستقیم آلودگی با مدفوع نقش داشته باشند. پژوهش‌های مختلف نشان داده که اشریشیاکلی بیشتر در کناره‌ها و شکاف‌های سبزیجات و میوه‌ها و یا در جایگاه‌های تغذیه‌ای جانوران کندرو مستقر می‌شوند. این نواحی نه تنها نقش محافظت باکتری را در برابر عواملی مانند شستشو و مواد پاک‌کننده دارد، بلکه مکان‌هایی برای انتقال هستند (۱۴).

در فاصله سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰، آب میوه (شامل شربت سیب و آب سیب) و محصولاتی مانند جوانه‌های یونجه، کاهو و کلم همه‌گیری‌های گسترده‌ای را در مناطق مختلف جهان ایجاد نموده است که معروف‌ترین آن‌ها در سال ۱۹۹۶ در ژاپن به دنبال مصرف جوانه‌های تربچه روی داده است (۱۵).

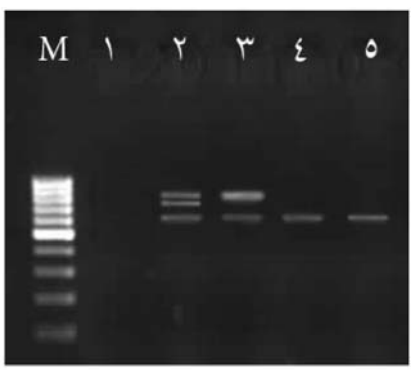
در ایالات متحده افزایش مصرف میوه و سبزیجات خام با افزایش همه‌گیری‌های ایجاد شده توسط این باکتری در ارتباط بوده است. در سال ۲۰۰۵ یک همه‌گیری مربوط به مصرف محصولات بسته بندی شده از جمله کاهو و در سال ۲۰۰۶ یک همه‌گیری بزرگ‌تر نیز در ارتباط با مصرف اسفناج گزارش گردید. سویه‌های جدا شده در هر دو همه‌گیری یاد شده اشریشیاکلی O157:H7 بود (۱۶).

نتایج ما در این پژوهش نشان داد که از ۲۱ باکتری تائید شده با آنتی‌سرم، ۴/۷۶٪ مربوط به اسفناج، ۱۴/۲۹٪ مربوط به سبزی،

۲۸/۵۷٪ مربوط به تربچه و ۵۲/۳۸٪ مربوط به آب هویج بودند. با توجه به این که بیشترین تعداد نمونه‌های جمع آوری شده مربوط به آب هویج بوده و احتمال آلودگی هویج در هنگام برداشت در مزارع کشاورزی و عدم شستشوی مناسب نیز وجود داشته، این نتایج قابل پیش‌بینی بود.

نتایج مطالعات مختلف نشان‌دهنده بقای بهتر باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در دماهای پایین، در خاک‌های رس و تقویت شده باکود حیوانی و در نزدیکی ریشه گیاهان می‌باشد. هم‌چنین با توجه به این که این باکتری می‌تواند به مدت ۴ تا ۸ هفته در زمین زنده بماند و در محیط منتشر شود، پیشنهاد شده است که حداقل فاصله زمانی بین استفاده از کود حیوانی و برداشت محصول ۱۲۰ روز باشد (۱۶).

آلام (Alam) و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آمریکا، به منظور بررسی بهتر اکولوژی باکتری اشریشیاکلی O157:H7 میزان شیوع و ارتباط آن را با مگس‌های خانگی مورد مطالعه قرار دادند. محققین یادشده تعداد ۳۴۴۰ مگس خانگی از ۲ مزرعه گاوداری طی مدت ۴ ماه جمع‌آوری نمودند. تمامی نمونه‌ها از نظر آلودگی با این باکتری بررسی شدند. میزان شیوع باکتری در مگس‌های جمع‌آوری شده از آخور و محل‌های نگهداری غذای دام به ترتیب ۲/۹٪ و ۱/۴٪ تخمین زده شد. هم‌چنین میزان آلودگی در مگس‌های آلوده بین $1/5\times10^5$CFU تا 3×10^5 گزارش گردید. با روش PCR ژن‌های 2 و*stx1*، *eae* و *fliC* در باکتری اشریشیا کلی O157:H7 جداسازی شد و نتایج مثبت به ترتیب ۹۰/۴٪، ۹۲/۲٪ و ۱۰۰٪ گزارش گردید. جمعیت بسیار زیاد مگس‌ها در مزارع پرورش گاو به عنوان یک عامل مهم انتشار اشریشیا کلی O157:H7 در بین حیوانات و محیط زندگی آن‌ها محسوب می‌شود (۱۷).



شکل ۲: نمایش ژن‌های بیماری‌زای تعیین شده با روش Multiplex PCR توسط پرایمرهای اختصاصی بر روی ژل آگاروز. ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰جفت بازی، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲: کنترل مثبت، ردیف۳: نمونه واجد دو ژن *eae* و *stx1* و ردیف های ۴ و ۵ نمونه های واجد ژن *stx1*.

بلانکو (Blanco) و همکارانش در اسپانیا در سال ۲۰۰۳ از روش Multiplex PCR به منظور بررسی ژن‌های *stx1* و *stx2* و از PCR برای ردیابی جداگانه ژن‌های *eaeA* و *hlyA* استفاده کردند. از مجموع ۳۸۴ سویه تولید کننده شیگا توکسین (STEC) شناسایی شده، در ۵۵٪ ژن *stx1*، در ۳٪ ژن *stx2*، در ۴۲٪ ژن‌های *stx1* و *stx2*، در ۶٪ ژن *eae* و در ۲۸٪ ژن *hlyA* مشاهده گردید. فراوانی بالای ژن *stx1* در این مطالعه قابل توجه است (۱۸).

اُسیک (Osek) در پژوهش سال ۲۰۰۳ خود در لهستان با استفاده از روش Multiplex PCR، وجود ژن‌های بیماری‌زای *stx1* و *stx2* (به همراه واریانت‌های آن) و *eaeA*، *hlyA*، O157 *rfb* و H7 *fliC* را در باکتری‌های جداشده از نمونه‌های کودکان و نمونه‌های مدفوع گاو، مورد ارزیابی قرار داد. نتایج این پژوهش نشان‌دهنده فراوانی ۱۲/۴ درصدی ژن‌های شیگا توکسین بود. از این ۲۵ سویه دارای ژن‌های *stx*، تعداد ۶ ایزوله مربوط به سروتیپ اشریشیا کلی O157:H7 و ۴ ایزوله مربوط به سروتیپ اشریشیا کلی O157:NM بودند. در ۲۰ سویه STEC نیز ژن‌های *eaeA* و *ehlyA* تشخیص داده شد (۱۹).

اهلیخ (Uhlich) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در آمریکا دو همه‌گیری به دلیل مصرف اسفناج و کاهوی آلوده با باکتری اشریشیاکلی O157:H7 را گزارش نمودند. سویه های جداسازی شده در این همه‌گیری‌ها ارتباط ژنتیکی نزدیکی با هم داشته و پس از انجام PCR، تمام سویه‌ها دارای ژن‌های *hly*، *eae*، wyzO157 و یکی از ژن‌های *stx1* و *stx2* و یا هر دو ژن یاد شده بودند (۲۰).

فراتامیکو (Fratamico) در سال ۲۰۱۰ در ایالات متحده از روش Multiplex Real-Time PCR برای تشخیص باکتری اشریشیا کلی O157:NM (NM=غیرمتحرک و یا H^-) از نمونه‌های مواد غذایی استفاده نمود. این محقق پژوهش خود را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای بررسی وجود ژن‌های *stx1*، *stx2*، *wzy*O157، *fliC* H7 و *eae* در سویه‌های جداسازی شده انجام داد (۹).

کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۶ در شیراز از ۳ سویه تائید شده با آنتی‌سرم، در دو سویه ژن‌های بیماری‌زای *stx1* و *eaeA* را مشاهده نمودند (۲۱).

ما در این پژوهش، با استفاده از روش Multiplex PCR در نمونه‌های تایید شده با آنتی‌سرم اختصاصی، ژن‌های *stx1* و *eaeA* را در سویه‌های جدا شده تشخیص دادیم. از بین جدایه‌ها سه سویه دارای ژن *stx1* و یک سویه دارای ژن‌های *stx1* و *eaeA* بود که با نتایج پژوهش‌های قبلی ما مطابقت دارد. در پژوهش‌های قبلی ما بر روی نمونه‌های کلینیکی (۸) و نمونه‌های غذایی (۲۱ و ۲۲) در سطح استان فارس ژن *hly* مشاهده نشده بود و الگوی ژنتیکی غالب نشان دهنده وجود هم‌زمان ژن‌های *stx1* و *eaeA* در سویه‌های جداسازی شده بود.

خطرات ناشی از عفونت با اشریشیاکلی O157:H7 و تجربیات موارد آلودگی با این باکتری، اهمیت انجام آزمایش‌های دقیق برای شناسایی سروتیپ O157:H7 را نشان می‌دهد. در صورت شناسایی سریع این باکتری، منبع شیوع آن نیز زودتر شناسایی و درمان می‌گردد. بررسی‌های مولکولی هم‌زمان بر روی نمونه‌های محیطی (مانند آب و خاک) و سبزیجات، می‌تواند ارتباط ژنتیکی سویه‌ها و درنتیجه سبب شناسی عامل بیماری را بهتر نشان دهد (۱۶).

با توجه به بقای طولانی مدت این ارگانیسم در خاک و در محیط‌های دارای pH پایین، خطر آلودگی مواد غذایی به ویژه در هنگام جدا شدن میوه از درخت و افتادن بر روی زمین بالا می‌رود. بنابراین ضرورت توجه و مراقبت بیشتر و پیشگیری در هنگام برداشت محصول وجود دارد. روش‌هایی که بر کاهش جمعیت باکتری اشریشیاکلی O157:H7 قبل از ورود به زنجیره غذایی انسان تاکید دارند می‌توانند نقش مهمی را در کاهش بیماری‌های انسانی ایفاکنند (۲۳).

نتیجه گیری

با توجه به دوز اندک عفونی و امکان آلودگی سبزیجات و میوه‌ها به باکتری O157:H7 ضرورت پایش مواد غذایی در مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت و عرضه آن به بازار وجود دارد.

تشکر وقدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان و جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1 Badouei MA, Zahraei Salehi T, Rabbani Khorasgani M, Tadjbakhsh H, Nikbakht Brujeni G. Occurrence and characterisation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic calves. Comp Clin Pathol. 2010;19:295-300.

2. Kargar M, Homayoon M. Outbreaks of infection sources and antibiotic resistance in EHEC strains among children under 5 years old in Marvdasht. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University Tehran Medical Branch. 2010;19:268-73 [In Persian].

3. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Lopez C, Justel P. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiol. 2007; 1(7):1-9.

4. Grant M, Hedberg C, Johnson R, Harris J, Logue C, Meng J, Sofos J, Dic kson J. The significance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. Food Protection Trends. 2011; 63:3-45.

5. Small DD. Evalution of an amperometric biosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. Master's Thesis. The Department of Biological and Agricultural Engineering. Louisiana State University in Shreveport. Louisiana. USA. 2006. 1-93.

6. Turutoglu H, Ozturk D, GulerL, Pehlivanoglu F. Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. Vet Med. 2007; 52:301-7.

7. Wu G, Carter B, Mafura M, Liebana E, Woodward M, Anjum M. Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates and identification of genes linked to human infections. Infection and Immunity. 2008; 76(2):845-56.

8. Kargar M, Homayoon M, Yaghoobi R, Manookians A. Prevalence of virulence genes stx1, stx2, hly and eaeA

with multiplex PCR from *E. coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in Marvdasht. Iran J Infec dis and Trop Med. 2009; 44:7-12 [In Persian].

9. Fratamico PM, DebRoy C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food using Real-time multiplex PCR assays targeting the *stx1, stx2, wzy*O157, and the *fli*Ch7 or *eae* genes. Food Anal. Methods. 2010; 3(4):330-7.
10. Kargar M, Heidary S, Abbasian F, Shekarforoosh S. Survey of prevalence and antibiotic susceptibility & verotoxin production of *E. coli* verotoxigenic (*E. coli* O157:H7) in row milk of Jahrom cows. Iran J Infec dis and Trop Med. 2006;34:7-11 [In Persian].
11. Vimont A, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Lazizzera C, Bavai C, Delignete-muller ML. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. App Environ Microbiol. 2006; 72:261-8.
12. Kim JY, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. J Vet Sci. 2005; 6:7-9.
13. Namdar N, Tahamtan Y, Kargar M, Hoseini MH. Evaluation of antagonistic effect of probiotics *Bifidobacteria* spp. on *E. coli* O157:H7 *in vitro*. J Microb World. 2009; 2(3):161-168 [In Persian].
14. Sproston EM ,Ogden ID, Wilson MJ. Slugs: potential novel vectors of *Escherichia coli* O157. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(1):144-9.
15. Kodaka H, Uesaka Y, Kashitani F. Nissui Glucose fermentative gram-negative rod identification system EB-20 gives a unique profile for typical non-sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol. 2004; 42(1):354-8.
16. Cooley M, Carychao D, Crawford-Miksza L, Jay MT, Myers C, Rose C, Keys C, Farrar J, Mandrell RE. Incidence and tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a major produce production region in California. PLoS ONE. 2007;2(11): e1159. doi: 10.1371/journal .pone.0001159.
17. Alam MJ, Zurek L. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with houseflies on a cattle farm. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:7578-80.
18. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, Gonzolez EA, Bernardez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (Verotoxin) - producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in spain. J Clin Microbiol. 2003; 41:1351-6.
19. Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J App Microbiol. 2003; 95:1217-25.
20. Uhlich, GA, Sinclair, JR, Warren, NG, Chmielecki, WA, Fratamico, PM. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with two multi-state foodborne outbreaks in 2006. Appl Environ Microbiol. 2008; 74:1268-72.
21. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Survaillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin producing *E. coli* O157:H7 strains from meats purchase in Shiraz. Iranian South Med J. 2011; 14(2):76-83 [In Persian].
22. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins, intimin and hemolysin genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains from industrial ground meat in Shiraz. Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences. 2011; 18:512-20 [In Persian].
23. Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC, Nisbet DJ. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a Review. J Dairy Sci. 2003; 86:852-60.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 1, May 2010

Evaluation of virulance genes of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from juice purchase and vegetables in Shiraz

Marjan Shah Illi[1], Mohammad Kargar[2], Abbas Ali Rezaeian[3], Maryam Homayoon[4], Mehdi Kargar[5], Sadegh Ghorbani-Dalini[6]

[1]M.Sc. Department of Microbiology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3]Lecturer, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[4]M.Sc. Department of Microbiology, Marvdasht Branch, Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
[5]B.Sc. Department of Microbiology, Science and Researches Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[6]M.Sc. Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Introduction: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) strains can infect humans via vegetal and animal food consumption and cause food poisoning with diarrhoeas, hemorrhagic colitis, haemolytic uraemic syndrome that can lead to death. The purpose of this study is isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes from Juice Purchase and vegetables in Shiraz.

Material and Methods: This cross- sectional study was performed on 89 samples of Juice Purchase and vegetables collected from Shiraz. Isolates were enriched in ECB with novobiocin medium in temperature 37°C. After, in order to examine the fermentation of sorbitol and lactose the CT-SMAC and VRBA media and the activities of β-glucoronidase of separated bacteria were examined using the choromoagar medium. Then, the existence of *E.coli* O157:H7 was confirmed with the spesific antiserum. Finally, virulence genes *stx1, stx2*, eae and *hly* were tested by multiplex PCR and *rfb* O157 ang *fliC* H7 were tested by single PCR.

Results: Out of all examined samples 69 (77.53%) sorbitol negative bacteria were separated that after evaluation with specific antiserum 21 (23.60%) *E.coli* O157:H7 was detected. The molecular markers, *stx1* genes in 3 samples and *eae* , *stx1* in 1 sample were detected.

Conclusion: Intensive studies of the sources, incidence, fate and transport of *E.coli* O157 near produce production are required to determine the mechanisms of pre-harvest contamination and potential risks for human.

Keywords: E.coli O157:H7, Multiplex PCR, Virulence genes.

Correspondence to: Mohammad Kargar
Fax: +98 711 6271547; Tel: +98 917 314 9203
E-mail: mkargar@jia.ac.ir
Journal of Microbial World 2010 3(1): 40-47