«مقاله پژوهشی»
DOI: 10.30495/JFH.2022.1961380.1360

بررسی میزان شیوع پاتوتیپ‌های *اشریشیا کولای* مولد اسهال از غذاهای آماده مصرف

رافد الزبیدی[۱]، ندا فلاح[۲]، عبدالله جمشیدی[۳*]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذائی. گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ، ایران
۲. دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۳. استاد، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: ajamshid@um.ac.ir
(دریافت مقاله:۱۴۰۱/۳/۲۹ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۲۵)

چکیده

سویه‌های اسهالی *اشریشیا کولای* (DEC) پاتوژن‌های شایعی هستند که از طریق مصرف مواد غذایی آلوده باعث بیماری‌های حاد روده‌ای در انسان می‌شود. مطالعه حاضر روی ۲۴۰ نمونه شامل اشترودل، پیتزا، ساندویچ و سالاد انجام شد. جداسازی *اشریشیا کولای* به‌روش کشت و آزمون‌های بیوشیمیائی انجام گردید. جهت تأیید تشخیص از روش PCR به‌وسیله تعیین حضور ژن *uidA* که یک ژن شاخص در *اشریشیا کولای* است، استفاده گردید. از تعداد ۲۴۰ نمونه، تعداد ۱۲۳ نمونه (۵۱/۲۵درصد) از نظر آلودگی به *اشریشیا کولای* مثبت ارزیابی شد و از تعداد ۱۲۳ نمونه آلوده به *اشریشیا کولای*، تعداد ۱۰۳ نمونه (۴۲/۹ درصد) فاقد ژن‌های بیماریزای مورد بررسی بودند. تعداد ۱۱ نمونه (۴/۶درصد) پاتوتایپ EPEC، ۵ نمونه (۲ درصد) EHEC، ۲ نمونه (۰/۸ درصد) EAEC و ۲ نمونه (۰/۸ درصد) DAEC مثبت تشخیص داده شد. در هیچ یک از نمونه‌ها ETEC و EIEC مورد شناسایی قرار نگرفت. با توجه به آلودگی نمونه‌های غذائی آماده مصرف به پاتوتیپ‌های بیماری‌زای روده‌ای، پایش و نظارت مستمر بر عرصه مواد غذایی آماده مصرف پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: غذاهای آماده مصرف، *اشریشیا کولای*، PCR

مقدمه

غذاهای آماده مصرف به گروهی از غذاها اطلاق می‌شود که به‌صورت خام، نیمه یا کامل پخته شده، سرد و یا یخ‌زده می‌باشند و قبل مصرف، به‌صورت مجدد فرآیند آماده‌سازی و سالم‌سازی حرارتی ندارند (Bautista-De León *et al*., 2013) سازمان غذا و داروی آمریکا، غذاهای آماده مصرف را غذاهایی عنوان می‌کند که چون قبلاً پخته شده‌اند، نیاز به پختن ندارند و تا زمان مصرف در آشپزخانه یا یخچال نگهداری می‌شوند. همچنین سازمان خدمات بهداشت عمومی آمریکا، غذاهای آماده مصرف را غذاهایی می‌نامند که بدون شستشو، پخت و پز و آماده‌سازی اضافی، استفاده می‌شوند (Safari and Saeidi Asl, 2011). کمیسیون کدکس سازمان بهداشت جهانی این گروه از غذاها را در گروه، غذاهای پر خطر طبقه‌بندی نموده است؛ زیرا مستعدترین گروه غذایی برای رشد میکروب‌های ایجاد کننده مسمومیت غذایی هستند. از طرفی این گروه از غذاها به‌عنوان منبع مهم بیماری‌های روده‌ای در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شوند که خود این موضوع می‌تواند ناشی از نقص یا عدم وجود دستورالعمل‌های بهداشتی مدون و کارا در این زمینه باشد (McCarthy and Burkhardt III, 2012, Rezaei *et al*., 2021). از جمله پرفروش‌ترین غذاهای آماده مصرف در ایران می‌توان به انواع اشترودل، پیتزا، ساندویچ سرد و سالادها اشاره داشت.

اشریشیا کولای عضوی از خانواده انتروباکتریاسه است. این خانواده متنوع و بزرگ بوده و شامل بیش از ٦٤ جنس مختلف است که جزو میکروفلور روده انسان و حیوانات خونگرم هستند (Alizade *et al*., 2019). *اشریشیا کولای* در حالت عمومی بی‌ضرر است اما می‌تواند به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب در بیماری‌های دستگاه ادراری، کولیت هموراژیک، اسهال، آبسه‌ها و تورم پستان مطرح باشد. هم‌چنین متداول‌ترین باکتری بیماری‌زای جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری، زخم‌ها، پنومونی، مننژیت و سپتی‌سمی در انسان است. *اشریشیا کولای* به‌عنوان شاخص وضعیت بهداشتی مواد غذایی محسوب می‌شود و بیماری غذا زاد ناشی از آن از جمله اسهال‌های اپیدمیک و اندمیک در جهان مطرح است (Canizalez-Roman *et al*., 2019).

اسهال به‌عنوان یک اختلال گوارشی است که در موارد شدید منجر به مرگ می‌شود و عامل مهم مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. به‌طور کلی سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کولای* به دو گروه تقسیم می‌شوند که از آن جمله می‌توان به پاتوژن‌های خارج روده‌ای و پاتوژن‌های روده‌ای مولد اسهال اشاره کرد (Bouzari *et al*., 2007). *اشریشیا کولای* معمولاً در دستگاه گوارش نوزاد انسان چند ساعت پس از تولد استقرار می‌یابد و به‌صورت همزیست با انسان زندگی می‌کنند. محل استقرار *اشریشیا کولای* لایه موکوسی روده بزرگ پستانداران است. چندین کلون فوق‌العاده سازگار وجود دارند که صفات ویرولانس به‌خصوصی را کسب کرده‌اند که توانایی سازگاری با محل زندگی جدید را به آن‌ها می‌دهد و به آن‌ها اجازه می‌دهد باعث بیماری‌های وسیعی شوند (Alizade *et al*., 2014). این صفات ویرولانس مکرراً توسط عوامل ژنتیکی که می‌توانند به داخل سویه‌های مختلفی حرکت کنند، کد می‌شوند و برای ساختن مخلوطی از فاکتورهای ویرولانس جدید،

عوامل ژنتیکی متحرک در داخل ژنوم به‌صورت پایدار در می‌آیند. فقط ترکیبات موفق فاکتورهای ویرولانس باعث به‌وجود آمدن پاتوتایپ‌های *اشریشیا کولای* می‌شوند که توانایی ایجاد بیماری دارند. سه سندرم کلینیکی عمومی که می‌تواند در نتیجه عفونت با پاتوتایپ‌ها به‌وجود بیاید که شامل بیماری‌های اسهالی روده‌ای، عفونت‌های دستگاه ادراری، مننزیت و سپتی‌سمی هستند (Canizalez-Roman *et al*., 2013). بهداشت و ایمنی مواد غذایی یکی از اصول مهم و مطرح برای مصرف‌کنندگان در جامعه امروز است و با رشد دانش عمومی و بالا رفتن آگاهی و نگرش مصرف‌کنندگان، حساسیت آن‌ها نیز به استفاده از غذاهای ایمن و عاری از آلودگی‌های میکروبی و شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (Eslami *et al*., 2015). از طرفی با توجه به اهمیت بیماری‌زایی این سویه باکتری، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی سلامت غذاهای آماده مصرف انجام شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی و در شرایط استریل از انواع اشترودل، پیتزا، ساندویچ سرد و سالادهای آماده مصرف در بازه زمانی اردیبهشت ماه تا مهرماه سال ۱۳۹۸ انجام شد. تعداد کلی نمونه‌ها ۲٤۰ عدد شامل ٦۰ نمونه از هریک از انواع غذاهای سرد بود. محل نمونه‌گیری از آشپزخانه مرکزی، غذاخوری‌ها، تریاها و سنتی‌سراهای وابسته به اداره تغذیه دانشگاه فردوسی مشهد بود.

- سویه‌های باکتریایی

سویه‌های مرجع مورد استفاده در این مطالعه، *اشریشیا کولای* (ATCC 25922)، EHEC (ATCC 35150)، EPEC (ATCC 2348/69)، ETEC (H10407)، EAEC (042)، *شیگلا فلکسنری* (ATCC 12122)، *اشریشیا کولای* (ATCC 11775) و *اشریشیا کولای* (ATCC 35218) بود (Fallah *et al*., 2021a). سویه‌ها در نوترینت آگار (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد کردند. DNA ژنومیEPEC ، ETEC و EAEC از آزمایشگاه ملی *اشریشیا کولای* ، موسسه پاستور ایران خریداری و به‌عنوان الگوهای کنترل مورد استفاده قرار گرفت. از آن‌جایی که *شیگلا فلکسنری* و EIEC واجد ژن‌های مشترک تهاجمی هستند، از این باکتری به‌عنوان کنترل مثبت برای EIEC استفاده شد. علاوه بر این، تشخیص DAEC بر اساس مطالعات قبلی انجام گردید (Guion *et al*., 2008). *اشریشیا کولای* (ATTC 11775) غیربیماری‌زا به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

- آنالیز میکروبی

مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه غذایی به ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) broth (Quelab, Canada) اضافه شد و به‌مدت ۱ دقیقه در استوماکر همگن شد. سوسپانسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ ساعت انکوبه شد و سپس ۲۲۵ میلی‌لیتر Tryptone Phosphate (TP) broth (Quelab, Canada) به محتویات منتقل شد و به‌عنوان مرحله غنی‌سازی در دمای ٤٤ درجه درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شد. متعاقباً یک حلقه کشت از

هر کیسه استوماکر حاوی سوسپانسیون ابتدا به محیط Mac-Conkey و سپس به L-EMB (Levin-Eosin Methylene blue) اضافه شد. پرگنه‌های تیپیک *اشریشیا کولای* لاکتوز مثبت بر روی محیط ائوزین میتلن بلو، دارای مرکز تیره و مسطح، با یا بدون جلای فلزی ظاهر شدند و در محیط Mac-Conkey نیز پرگنه‌های صورتی رنگ ایجاد شد. بیوتیپ‌های لاکتوز منفی روی هر دو آگار به صورت پرگنه‌های بی‌رنگ یا به‌میزان جزئی صورتی رنگ مشاهده شدند. از آن‌جایی که سویه‌های EIEC قادر به تخمیر لاکتوز نیستند و ممکن است سویه‌های لاکتوز منفی غیرتیپیک در سایر گروه‌های پاتوژنیک *اشریشیا کولای* نیز وجود داشته باشند، بنابراین از پرگنه‌های غیرتیپیک نیز به‌همراه پرگنه‌های تیپیک برای شناسایی برداشت شد (Fallah *et al*., 2021a).

- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *اشریشیا کولای*

رنگ‌آمیزی گرم و شناسایی مورفولوژیک باکتری و آزمایش‌های کلاسیک بیوشیمیایی شامل IMViC برای شناسایی به‌کار برده شد. برای این منظور از محیط‌های SIM، متیل‌رد- وگس پروسکائر براث و سیمون‌سیترات استفاده گردید. نتایج پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری مورد بررسی قرار گرفتند. از هر نمونه مثبت تعداد پنج پرگنه انتخاب گردید و با استفاده از روش جوشاندن DNA ژنومیک استخراج گردید و در دمای ۲۰- °C جهت آزمایش PCR نگهداری گردید (Amiri *et al*., 2017).

- مراحل و نحوه انجام آزمایش PCR

آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۰ µl که شامل ۳ µl DNA الگو، مسترمیکس حاوی ۱/۵ mM کلرید منیزیوم ($Mgcl_2$) و ۱۰ µM از هر پرایمر انجام گردید. وجود ژن *uidA* با انجام تعداد ۳۵ سیکل تکثیر مورد بررسی قرار گرفت. شرایط دمایی، حجم و غلظت مواد و ویژگی‌های پرایمر مربوط در جداول (۱) و (۲) آمده است. در این واکنش DNA سویه *اشریشیا کولای* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (Fallah *et al*., 2021b).

- شناسایی پاتوتیپ‌های *اشریشیا کولای*

تمام جدایه‌هایی که در آزمون PCR مرحله قبلی مثبت شدند، از نظر وجود ژن‌های متعلق به *اشریشیا کولای* مولد اسهال روده‌ای مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های پرایمر مربوط و شرایط دمایی، حجم و غلظت مواد در جدول (۱) آمده است. در این مرحله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، طبق مطالعات قبلی انجام شده، شناسایی پاتوتیپ های *اشریشیا کولای* مولد اسهال با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چند گانه (Multiplex-PCR) در طی سه مرحله انجام گردید (Fallah *et al*., 2021a).

- Multiplex-PCR برای شناسایی پاتوتایپ‌های *اشریشیا کولای*

تمام جدایه‌هایی که در آزمون PCR مرحله قبلی مثبت شدند، از نظر وجود ژن‌های *stx 1*، *stx 2*، *eaeA*، *bfpA* با انجام تعداد ۳۵ سیکل تکثیر بررسی شد. DNA سویه *اشریشیا کولای* 2348/69 و DNA سویه *اشریشیا کولای* ATCC 35150 از آزمایشگاه انستیتو پاستور ایران، تهیه شده و به عنوان کنترل مثبت پاتوتیپ‌های EPEC و EHEC استفاده شد (Fallah *et al*., 2021a). DNA سویه *اشریشیا کولای* ۱۰۴۰۷H و

DNA سویه *اشریشیا کولای* O42 از انستیتو پاستور ایران، تهیه شده و به عنوان کنترل مثبت پاتوتیپ‌هایETEC و EAEC استفاده شد. DNA سویه *شیگلا فلکسنری* ATCC 12122 و DNA سویه *اشریشیا کولای* F-1845 از انستیتو پاستور ایران، تهیه شده به بعنوان کنترل مثبت پاتوتیپ هایEIEC و DAEC استفاده شد.

جدول (۱)- فهرست پرایمرها، توالی آنها و اندازه محصولات PCR

ارگانیسم هدف	ژن هدف	توالی پرایمر 3´→5´	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (°C)	منبع
E. coli	*uidA*	f ATGGAATTTCGCCGATTTTGC r ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC	۱۸۷	۵۸	(Cebula *et al*., 1995)
STEC	*stx1*	f CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG r CACCAGACAATGTAACCGCTG	۳۴۸	۶۱	(Cebula *et al*., 1995)
	stx2	f CAGTCGTCACTCACTGGTTTCATCA r GGATATTCTCCCCACTCTGACACC	۲۸۳		(Brian *et al*., 1992)
EPEC	*eaeA*	f TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT r GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	۴۸۲		(Vidal *et al*., 2004)
	bfpA	f GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT r GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT	۳۰۰		(Vidal *et al*., 2005)
ETEC	*st*	f AAAGGAGAGCTTCGTCACATTTT r AATGTCCGTCTTGCGTTAGGAC	۱۲۹	۶۱	(Vidal *et al*., 2004)
EAEC	*lt*	f TCTCTATGTGCATACGGAGC r CCATACTGATTGCCGCAAT	۳۲۲		(Rappelli *et al*., 2001)
	aggR	f GTATACACAAAAGAAGGAAGC r ACAGAATCGTCAGCATCAGC	۲۵۴	۶۰	
EIEC	*ipaH*	f CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGGGTG r GAG AGC TGA AGT TTC TCT GC	۹۳۳	۶۰/۳	(Vidal *et al*., 2005)
DAEC	*daaD*	f TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG r GTCCGCCATCACATCAAAA r ACAGAATCGTCAGCATCAGC	۳۷۱		(Guion *et al*., 2008)

- الکتروفورز

محصولات به‌دست آمده از PCR پس از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد، مورد آنالیز قرار گرفتند. به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل، رنگ DNA Green viewer اضافه گردید. مقدار ۲ میکرولیتر از 100 bp DNA Ladder Plus (دارای ۱۲ قطعه DNA با سایز 100 bp تا 3000 bp) به منظور ارزیابی اندازه قطعات محصولات به‌دست آمده در یکی از چاهک‌ها لود گردید. ولتاژ روی ۱۰۰ ولت و زمان روی ۳۰ دقیقه تنظیم شد. با استفاده از اشعه ماوراء بنفش، حضور احتمالی قطعات DNA با اندازه مورد نظر در ژل، بر اساس تصویر حاصل، روی مانیتور تجزیه و تحلیل شد(Fallah *et al*., 2021a).

- تحلیل آماری

ارزیابی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس انجام شد. لازم به ذکر است تمام تحلیل‌های آماری به روش فشر با نرم‌افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت. معنی‌داری داده‌ها در سطح P<۰/۰۵ بررسی شد.

یافته‌ها

تمامی جدایه‌های *اشریشیا کولای* که الگوی ایندول و متیل رد مثبت، وگس پروسکائر و سیترات منفی نشان دادند به عنوان *اشریشا کولای* در نظر گرفته شدند. این جدایه شامل ۱۲۵ جدایه از ۲٤۰ نمونه غذاهای آماده مصرف شامل انواع اشترودل، پیتزا، ساندویچ سرد و سالاد با ٦۰ نمونه از هر ماده غذایی ذکر شد.

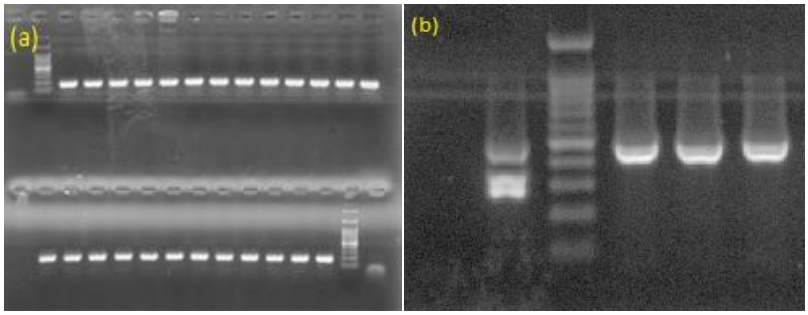
جدول (۲)- فراوانی آلودگی به *اشریشیا کولای* در بین انواع غذاهای آماده مصرف

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد آلودگی در هر گروه	درصد آلودگی در کل نمونه‌ها
اشترودل	٦۰	۱۵	۲۵	٦/۲۵
پیتزا	٦۰	۲۰	۳۳/۳	۸/۳
ساندویچ سرد	٦۰	۳۵	۵۸/۳	۱٤/٦
سالاد	٦۰	۵۵	۹۱/٦	۲۲/۹
تعداد کل	۲٤۰	۱۲۵	-	۵۲

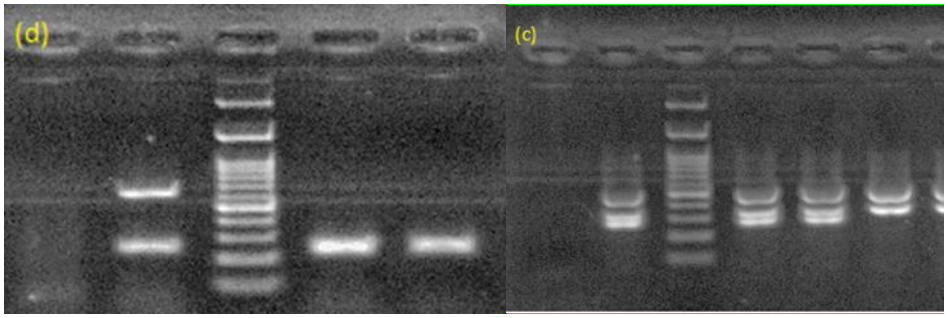
تعداد ۲ جدایه از نمونه اشترودل از نظر آزمایشات بیوشیمایی مثبت ارزیابی شدند ولی در PCR از نظر حضور ژن *uidA* منفی بود. از میان ۱۲۳ نمونه که حاوی ژن *uidA* بودند، تعداد ۱۰۳ جدایه واجد هیچ یک از ژن‌های بیماری‌زا نبود.

جدول (۳)- فراوانی آلودگی به پاتوتیپ‌های روده‌ای مثبت در بین انواع غذاهای آماده مصرف

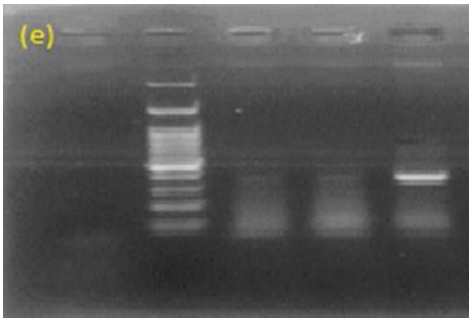
پاتوتایپ	میزان (درصد) آلودگی در نمونه‌های مختلف				
	اشترودل	پیتزا	ساندویچ سرد	سالاد	کل
EPEC	-	-	۳ (۵درصد)	۸ (۱۳/۳درصد)	۱۱ (٤/٦درصد)
EHEC	-	-	۲ (۳/۳درصد)	۳ (۵درصد)	۵ (۲/۱درصد)
ETEC	-	-	-	-	-
EAEC	-	۱ (۱/٦درصد)	۱ (۱/٦درصد)	-	۲ (۰/۸درصد)
EIEC	-	-	-	-	-
DAEC	-	۱ (۱/٦درصد)	۱ (۱/٦درصد)	-	۲ (۰/۸درصد)



شکل (۱)- (a): نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به جدایه‌های ژن *iduA* نشان‌دهنده DEC، (b): نتایج الکتروفورز محصولm-PCR1 مربوط به جدایه‌های ژن *eaeA* نشاندهنده EPEC، تصویر a) ۱: کنترل منفی PCR ۲: مارکر DNA 100 bp plus، ۳: کنترل مثبت (*E. coli* ATCC 25922)، ٤-۱۵: نمونه‌های مثبت (*uidA*) سایز باند 187 bp، باند اول و دوم مارکر 100 bp و 200 bp؛ تصویر b) ۱: کنترل منفی (*E. coli* ATCC 11775)، ۲: کنترل مثبت (*E. coli* ATCC 35150)، ۳: مارکر DNA 100 bp plus، ٤-٦: نمونه‌های مثبت (*eaeA*) سایز باند 482 bp، باند چهارم و پنجم مارکر 400 bp و 500 bp



(c): الکتروفوز محصول m-PCR1 مربوط به ژن *eaeA, stx1, stx2* نشان‌دهنده EHEC، (d): الکتروفوز محصول m-PCR2 مربوط به ژن *aggR* نشان‌دهنده EAEC. تصویر c) ۱: کنترل منفی (*E. coli* ATCC 11775)، ۲: کنترل مثبت (*E. coli* ATCC 35150)، ۳: مارکر DNA 100 bp plus، ٤-٦: نمونه‌های مثبت (*eaeA, stx1, stx2*) سایز باند 482, 348, 283 bp، باند دوم، سوم، چهارم و پنجم مارکر 200 bp، 300 bp و 400 bp و 500 bp. تصویر d) ۱: کنترل منفی (*E. coli* ATCC 11775)، ۲: کنترل مثبت (NCBI accession number O42)، ۳: مارکر DNA 100 bp plus، ٤ و ۵: نمونه‌های مثبت (*aggR*) سایز باند 254 bp، باند دوم و سوم مارکر 200 bp و 300 bp



(e): الکتروفوز محصول m-PCR3 مربوط به ژن *daa* (D/E) نشان‌دهنده DAEC. تصویر e) ۱: کنترل منفی (*E. coli* ATCC 11775)، ۲: مارکر DNA 100 bp plus، ۳و ٤: نمونه‌های مثبت (*daaD*) ۵: کنترل مثبت (NCBI accession number F-1845) سایز باند 444 bp، باند چهارم و پنجم مارکر 400 bp و 500 bp

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد از ۱۲۵ نمونه مورد بررسی دو نمونه فاقد ژن *uida* بودند. به این ترتیب از تعداد ۱۲۳ نمونه ایزوله تعداد ۱۱ نمونه از نظر ژن *eaeA* (EPEC)، و برای EHEC، دو نمونه *stx1 eaeA,stx1,stx2* مثبت و یک نمونه *stx1,stx2* مثبت بود. از جدایه EAEC، دو نمونه از نظر ژن *aggR* مثبت بود و از جدایه DAEC، تعداد دو نمونه از نظر ژن *daa* مثبت بودند. یافته‌های مطالعه‌ای بر روی ۱۸٦ نمونه غذای آماده مصرف از نظر آلودگی به *اشریشیا کولای* و سپس بررسی حضور پاتوتیپ‌های DEC با روش سرولوژی و multiplex PCR نشان داد که تقریباً نیمی از نمونه‌های غذاهای آماده مصرف در تایلند دارای آلودگی به *اشریشیا کولای* بالاتر از سطح استاندارد قابل قبول بودند اما هیچ‌کدام از جدایه‌ها جز DEC نبودند (Chomvarin *et al*., 2005). طی مطالعه دیگری با استفاده از روش mPCR، سویه‌های *اشریشا کولای* جدا شده از نمونه‌های غذایی جمع‌آوری شده از سوپرمارکت‌ها و فروشگاه‌های عرضه مواد غذایی آماده مصرف را بررسی نمودند. در این تحقیق از پنیرهای محلی، سوپ جوجه، سس مایونز و سبزیجات آماده مصرف، سویه‌هایی جداسازی شد که فقط حاوی ژن‌های مولد شیگاتوکسی *stx1* و *stx2* بودند (Burton *et al*., 2004). در مطالعه دیگری با بررسی ۷٦ نمونه گوشت و سبزیجات توانستند پاتوتیپ‌های EAEC و STEC را شناسایی نمایند (Rúgeles *et al*., 2010). هم‌چنین DEC و تعیین پاتوتیپ‌های آن در سالادهای سبزیجات آماده مصرف بررسی شد. از تعداد ۱۳۰ نمونه مورد بررسی، ۹۹ درصد آلودگی مدفوعی نشان دادند که ۸۵ درصد آن‌ها *اشریشیا کولای* بودند. از میان جدایه ها ۷ درصد به‌عنوان DEC شناحته شدند که STEC، EIEC و ETEC را شامل می شدند (Castro-Rosas *et al*., 2012).

تحقیقات انجام شده روی نمونه‌های شیر خام از نظر حضور ژن‌های حدت *اشریشیا کولای*، نشان داد شیر و مدفوع گاوهای سالم می‌توانند محتوی پاتوتیپ‌های *اشریشیا کولای* مولد اسهال باشند (Agazzi *et al*., 2012). مطالعه روی نمونه‌های مواد غذایی و نوشیدنی برای ردیابی گروه‌های DEC نشان داد فرآورده‌های شیری بیشترین میزان آلوگی را داشتند. سویه‌های پاتوژنیک شناسایی شده شامل ۷۸/۵ درصد EPEC، ۱۰/۷درصد EAEC، ۸/۹ درصد STE و ۱/۷درصد ETEC بوده است. ۸۰ درصد EPEC و EAEC های جداشده به‌عنوان غیرتیپیک طبقه‌بندی شدند (Canizalez-Roman *et al*., 2013). جستجوی DEC و تعیین پاتوتیپ‌های آن در سالادهای سبزیجات آماده مصرف نیز در مطالعه دیگری بررسی شد. از ۲۲۰ نمونه آنالیز شده ۹۸/۲ درصد آلوده به کلی‌فرم مدفوعی بودند که ۷۲/۳ درصد آن‌ها *اشریشیا کولای* تشخیص داده شدند. فراوانی ٤/۱ درصد DEC درصد تعیین گردید که به‌ترتیب شامل پاتوتیپ‌های STEC,ETEC,EPEC بود (Bautista-De León *et al*., 2013). جداسازی سویه‌های EPEC از دام و گوشت های خرده‌فروشی نشان داد ۸۰ جدایه از ٤۵۰ جدایه *اشریشیا کولای* از منابع دامی به‌عنوان aEPEC شناخته شدند (Comery *et al*., 2013). در مطالعه‌ای وجود خطر احتمالی برای انسان به‌واسطه حضور aEPEC در شیر میش و یک مسیر انتقال برای این پاتوژن از راه آب آلوده را تأیید نمودند (Morfín-Otero *et al*., 2013). نتیجه مطالعه‌ای ۸۸/٤ درصد آلودگی کلی‌فرمی، ۵۳ درصد حضور *اشریشیا کولای* و ۲/۱

اشریشیا کولای پاتوژن در مواد غذایی آماده مصرف را مشخص نمود. گوشت گاو و پنیر تنها نمونه‌های آلوده به پاتوتیپ‌های روده‌ای EPEC، STEC و ETEC بودند (Amézquita-Montes *et al*., 2015). شیوع ژن‌های STEC (stx1, stx2, eaeA, ehxA) در ۸۷ جدایه *اشریشیا کولای* شیر پاستوریزه بررسی شد. نتایج حاکی از عدم حضور ژن‌های فوق در جدایه‌ها بود (Hoffmann *et al*., 2014).

اشریشیا کولای به‌عنوان شاخص وضعیت بهداشتی مواد غذایی خام و محصولات فرآوری شده محسوب می‌گردد. به‌رغم این‌که از زمان شناسایی و توصیف *اشریشیا کولای* کارهای گسترده‌ای روی تمامی جنبه‌های آن انجام شده است اما ایجاد چالش‌های جدید در ایمنی مواد غذایی توسط این ارگانیسم به‌دلیل تنوع گسترده تیپ‌های درون گونه‌ای مانند پاتوژن‌های خطرناک انسانی که تغییر می‌کنند، هم‌چنان ادامه دارد. تفاوت‌هایی که در مطالعات مختالف وجود دارد می‌تواند به‌خاطر تفاوت زمانی و جغرافیایی مطالعات صورت گرفته و ناهمگونی در پراکندگی پاتوتایپ‌های *اشریشیا کولای* و روش مطالعه باشد. نتایج حاصل از مطالعات حاضر و سایر مطالعات مشابه در نواحی مختالف حضور قابل ملاحظه پاتوتایپ‌های روده‌ای *اشریشیا کولای* در میان جدایه‌های *اشریشیا کولای* که از نمونه‌های مواد غذایی به‌دست می‌آید را نشان می‌دهد (Aminshahidi *et al*., 2017).

با توجه به نقش پررنگ فرآورده‌های مواد غذایی آماده مصرف در انتقال این نوع عفونت، نیاز به استفاده از این روش‌ها به‌عنوان راهکار سریع و دقیق شناسایی پاتوتیپ، نقش کمک کننده‌ای در فرآیند درمان و پیشگیری ایفا می‌نماید. با توجه به وجود آلودگی‌های احتمالی به *اشریشیا کولای* در نمونه‌های غذاهای آماده مصرف، که خود نیاز به نظارت مستمر و تهیه یک برنامه دقیق برای شناسایی این باکتری در مشهد و کل کشور وجود دارد.

سپاسگزاری

این مطالعه نتیجه تز دکتری بوده و بدینوسیله نویسندگان از دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Alizadeh, H., Ghanbarpour, R. and Aflatoonian, M.R. (2014). Molecular study on diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from under 5 years old children in southeast of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4, S813-S817.
- Alizadeh, H., Teshnizi, S. H., Azad, M., Shojaf, S., Gouklani, H., Davoodian, P. and Ghanbarpour, R. 2019. An overview of diarrheagenic *Escherichia coli* in Iran: A systematic review and meta-analysis. Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences, 24.

- Amezquita-Montes, Z., Tamborski, M., Kopsombut, U. G., Zhang, C., Arzuza, O. S. and Gomez-duarteE, O. G. 2015. Genetic relatedness among *Escherichia coli* pathotypes isolated from food products for human consumption in Cartagena, Colombia. Foodborne pathogens and disease, 12, 454-461.
- Aminshahidi, M., Arastehfar, A., Pouladfar, G., Arman, E. and Fani, F. 2017. Diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella with high rate of extended-spectrum Beta-lactamase production: two predominant etiological agents of acute diarrhea in Shiraz, Iran. Microbial Drug Resistance, 23, 1037-1044.
- Amiri, H.S., Ranjbar, R., Sohrabi, N. and Khamesipour, F. (2017). Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients by REP-PCR. Современные технологии в медицине, 9, 71-75.
- Bautista-de Leon, H., Gomez-Aldapa, C., Rangel-Vargas, E., Vazquez-Barrios, E. and Castro-rosas, J. (2013). Frequency of indicator bacteria, S almonella and diarrhoeagenic E scherichia coli pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from M exican restaurants. Letters in applied microbiology, 56, 414-420.
- Bouzari, S., Jafari, A. and Zarepoor, M. (2007). Distribution of genes encoding toxins and antibiotic resistance patterns in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates in Tehran. EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal, 13 (2), 287-293, 2007.
- Brian, M., Frosolono, M., Murrani, B., Miranda, A., Lopez, E., Gomez, H. and Cleary, T. (1992). Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 30, 1801-1806.
- Burton, A. K., Balague, F., Cardon, G., Eriksen, H., Henrotin, Y., Lahad, A., Leclerc, A., Muller, G. and Van der beek, A. (2004). European guidelines for prevention in low back pain.
- Cnizalez-Roman, A., Gonzalez-Nunez, E., Vidal, J. E., Flores-Vlllasenor, H. and Leno-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. International Journal of Food Microbiology, 164, 36-45.
- Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Valdez-Flores, M.A., Flores-Villasenor, H., Viadl, J.E., Muro-Aador, S., *et al*. (2019). Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. International journal of food microbiology, 304, 1-10.
- Castro-Rosas J., Cerna-Cortes, J.F., Mendez-Reyes, E., Lopez-Hernandes, D., Gomer-Aldapa, C.A. and Estrada-Garsia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic E. coli pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. International Journal of Food Microbiology, 156, 176-180.
- Cebula, T. A., Payne, W. L. and Feng, P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33, 248-250.
- Chomvarin, C., Ratchtrachenchai, O., Chntarasuk, Y., Srigulbutr, S., Chaicumpar, K., Namwat, W. and Kotimanusvanij, D. (2005). Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in Khon Kaen, Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 36, 931-939.
- Comety, R., Thanabalasuriar, A., Garneau, P., Portt, A., Boeriin, P., Reid-Smith R.J. (2013). Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. Applied and Environmental Microbiology, 79, 3892-3896.
- Eslami, H., Marzban, A., Akramimohajeri, F., Rezaei, Z. and Rafati Fard, M. (2015). Students' knowledge and attitude of hygiene and food safety at Shahid Sadoughi University of Medical Sciences in Yazd, Iran. Journal of Community Health Research, 4, 159-167.

- Fallah, N., Ghaemi, M., Ghazvini, K., Rad, M. and Jamshidi, A. (2021a). Occurrence, pathotypes, and antimicrobial resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains in animal source food products from public markets in Mashhad, Iran. Food Control, 121, 107640.
- Fallah, N., Rad, M., Ghazvini, K., Ghaemi, M. and Jamshidi A. (2021b). Molecular typing and prevalence of extended-spectrum β-lactamase genes in diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from foods and humans in Mashhad, Iran. Journal of Applied Microbiology, 131, 2033-2048.
- Guion, C.E., Ochoa, T.J., Walker, C.M., Barlita, F. and Cleary, T.G. (2008). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 46, 1752-1757.
- Hoffmann T.C., Glasziou, P.P., Boutron, I., Milne, R., Perera, R., Moher, D.,*et al*. (2014). Better reporting of interventions: template for intervention description and replication (TIDieR) checklist and guide. BMJ, 348.
- Mccarthy, S. and Burkhardt III, W. (2012). Efficacy of electrolyzed oxidizing water against Listeria monocytogenes and Morganella morganii on conveyor belt and raw fish surfaces. Food Control, 24, 214-219.
- Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazaran, S., Sllva-Sanchez, J., Rodriguez-Noriega, E., Laca-diaz, J., Tinoco-Carrillo, P., *et al*. (2013). Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum β-lactamase. Microbial Drug Resistance, 19, 378-383.
- Rappelli, P., Maddau, G., Mannu, F., Colombo M., Fori, P. and Cappuccinelli P. (2001). Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli*. New Microbiologica, 24, 77-83.
- Rezaei, Z., Salari, A. and Khnzadi, S. (2021). Biofilm formation and antibacterial properties of *Lactobacillus* isolated from indigenous dairy products. Journal of Food Quality and Hazards Control, 8, 162-168.
- Rugelus, L.C., Bai, J., Martinez, A.J., Vanegas, M.C. and Gomez-Duarte, O.G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. International Journal of Food Microbiology, 138, 282-286.
- Safari, R. and Saeidi Asl, M. (2011). The effect of nisin A and sodium benzoate on behavior of *Listeria monosytogenes* and some microbial and chemical parameters in silver carp (hypophtalmichtys molitrix) fillet stored at 4 c. Food Hygiene, 1, 1-13.
- Vidal, M., Kruger, E., Duran, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., *et al*. (2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. Journal of Clinical Microbiology, 43, 5362-5365.
- Vidal, R., Vidal, M., Lagos, R., Levinv, M. and Prado, V. (2004). Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, 42, 1787-1789.

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1961380.1360**

Occurrence of diarrhea-causing *Escherichia coli* pathotypes from ready-to-eat foods

Al-Zubaidi, R.[1], Fallah, N.[2], Jamshidi, A.[3*]

1. PhD. student of Food Hygiene. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. PhD. of Food Hygiene, Veterinary Head Office of Khorasan-Razavi Province, Mashhad, Iran
3. Professor. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[*]Corresponding author: ajamshid@um.ac.ir

(Received: 2022/6/19 Accepted: 2022/8/16)

Abstract

Diarrheal strains of *Escherichia coli* (DEC) are common pathogens that cause acute intestinal diseases in humans through the consumption of contaminated food. The present study was conducted on 240 samples including strudel, pizza, sandwiches, and salad. *E. coli* was isolated by conventional culture tests and confirmed by PCR (using *uidA* gene). Out of 240 samples, 123 isolates (51.25%) were found positive as *E. coli*. *Amongst* 103 isolates (42.9%) contained no pathogenic genes. 11 isolates (4.6%) were identified as EPEC, 5 isolates (2%) as EHEC, 2 isolates (0.8%) as EAEC. ETEC and EIEC were not detected in any of the samples. Due to the contamination of ready-to-eat food samples with intestinal pathogenic pathotypes, continuous monitoring of the field of ready-to-eat food is suggested.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: ready-to-eat foods, *Escherichia coli*, PCR