مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۲۲۰-۲۰۹

Original Article

بهینه سازی روش شناسایی *اشریشیا کلی* در بستنی بر مبنی *16S rDNA*

مریم رنجبر[۱]، محمد گلی[۲]، غلامرضا قلمکاری[۳]، مصطفی مانیان[۴]، محمدرضا مراثی[۵]، رضا ندائی نیا*[۶]

[۱] کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، [۲] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، [۳] استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، [۴] کارشناس ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، [۵] دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، [۶] کارشناس ارشد، بخش میکروبی آزمایشگاه کنترل معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: شیر و فرآورده های آن در بعضی شرایط، موجب رشد عوامل بیماری زا از جمله *اشریشیا کلی* که مهمترین آلوده کننده مواد غذایی است می گردند. این مطالعه با هدف بهینه سازی روش شناسایی *اشریشیا کلی* در بستنی بر مبنی *16S rDNA* انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی–توصیفی از ۲۰۰ نمونه بستنی جمع آوری شده از مناطق محتلف اصفهان، تعداد ۸۲ جدایه باکتریایی جداسازی گردید. از این تعداد ٤٨ جدایه اندول مثبت بودند. جداسازی بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۹٤٦ و استفاده از محیط های کروموژنیک به صورت مقایسه ای انجام شد. پس از انجام آنالیز عددی و سایر آزمون ها، به کمک PCR قطعه *16S rDNA* تکثیر و سپس توالی یابی گردید.

یافته ها: با توجه به روش ارائه شده در استاندارد ملی روش یاد شده دارای ۸۸ درصد صحت و ۱۲ درصد خطا می باشد. در این بررسی جدایه های اندول مثبت مانند *اشریشیا هرمانی*، *پروویدنشیا رتگری*، *کلبسیلا اکسی توکا* و *مورگانلا مورگانی* توانستند در نتیجه نهایی ارائه شده در استاندارد ملی ایران خطا ایجاد نمایند.

نتیجه گیری: آنالیزهای انجام شده با استفاده از محیط های کشت حاوی مواد کروموژنیک نشان داد که با صحت بالاتر، سرعت بیشتر و قیمت ارزان تر می توان *اشریشیا کلی تیپیک* را شناسایی نمود.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، کروموژنیک، بستنی، *16S rDNA* ، بهینه سازی.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹٤

مقدمه

مواد غذایی یکی از منابع مهم ایجاد آلودگی توسط عوامل شیمیایی و بیولوژیکی می باشند (۱). به طوری که تخمین زده می شود ۷۰ درصد بیماری های عفونی از طریق مواد غذایی ناسالم به انسان سرایت می کند (۲). شاخص های میکروبی اغلب به منظور ارزیابی ایمنی و بهداشت مواد غذایی به کار می روند (۳). اولین شاخص آلودگی مدفوعی *اشریشیا کلی* (*E.coli*) است (٤). اگر چه تعداد این باکتری تحت تاثیر تعداد بیشتری از باکتری های بی هوازی مانند *باکتروئیدها* (*Bacteroides*) قرار دارد ولی با این وجود میزان آن همواره غالب می باشد (۵). این باکتری از عوامل اصلی ایجاد کننده اسهال در کشورهای توسعه نیافته است. تخمین زده می شود هر ساله بیش از ۲ میلیون کودک و روزانه بیش از ٦۰۰۰ کودک به علت اسهال در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین جان خود را از دست می دهند. تعریفی متداول اسهال، آبکی شدن مدفوع و دفع بیش از ۳ بار در روز می باشد.

به طور متوسط هر کودک زیر ۵ سال در کشورهای در حال

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، بخش میکروبی آزمایشگاه کنترل معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۵٦٦۰ پست الکترونیک: Nedaeinr901@mums.ac.ir

توسعه، ۳/۳ بار درسال و در برخی نقاط حتی ۹ بار در سال به اسهال مبتلا می شوند. عوامل متعدد اپیدمیولوژیک مانند عوامل میزبانی، محیطی و تسهیلات بهداشتی در شیوع عوامل بیماری زای روده ای موثر می باشند (٦). *اشریشیا کلی* باکتری فرصت طلبی است که در روده بزرگ انسان و سایر حیوانات وجود دارد. وجود این باکتری در آب و مواد غذایی دلیل بر آلودگی آنها از طریق مدفوع می باشد. بر اساس تخمین سازمان جهانی بهداشت موارد واقعی بیماری های ناشی از آلودگی غذایی بیش از ۳۵-۳۰ برابر موارد دیگر ثبت گردیده است (۷).

بر اساس گزارشات مرکز کنترل بیماری ها (CDC) در آمریکا هر ساله ۷٦ میلیون آمریکایی به این بیماری ها مبتلا و در اثر آن ۳۲۵۰۰۰ مورد بستری و ۵۲۰۰ مورد مرگ رخ می دهد. به طوری که هزینه پزشکی آن ۳٤/۹-٦/۵ میلیارد دلار است (۸). روش مرسوم برای از بین بردن میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی پاستوریزه کردن در دمای مناسب می باشد. بنابراین عدم رعایت موارد بهداشتی در تهیه، نگهداری و عرضه می تواند سلامت مصرف کننده را به خطر بیندازد. به دلیل آنکه جایگاه اصلی *اشریشیا کلی* کلون انسان و حیوانات خونگرم است، درصورت ورود باکتری از راه مدفوعی-دهانی اسهال ایجاد می شود.

با توجه به اینکه *اشریشیا کلی* باکتری مقاومی است که می تواند هفته ها و ماه ها در شرایط معمولی در آب و مواد غذایی به ویژه در حرارت صفر درجه زنده بماند و از آنجایی که بستنی به عنوان یک ماده غذایی توسط سنین مختلف مورد استفاده قرار می گیرد، از نظر بافری و شرایط دمایی بسیار مستعد آلودگی با این باکتری ها است (۹).

در بررسی انجام شده از نواحی تحت پوشش شهرداری منطقه ۱۱ تهران مشخص گردید که ۷۵ درصد بستنی های سنتی تهیه شده در واحدهای قنادی و ۹٤/۷ درصد از بستنی های سنتی تهیه شده در آب میوه فروشی ها آلوده می باشند (۱۰). در بررسی دیگری در شیراز نیز از ۷۰ واحد تولید و عرضه بستنی سنتی ۲۰ درصد نمونه ها به *اشریشیا کلی* آلوده بودند (۱۱).

همچنین بررسی های انجام شده در شهر ساری نشان داد که ۸٤ درصد بستنی های سنتی آلوده هستند. به طوری که میزان آلودگی به *اشریشیا کلی* ۵۲ درصد گزارش گردید (۱۲).

سویه های باکتریایی که در مواد غذایی حضور دارند تحت تاثیر فرایندهای های مختلف دمایی مانند پاستوریزاسیون، استرلیزاسیون، پخت و غیره قرار می گیرند. این فرایندها می تواند باکتری ها را وادار به تولید آنزیم هایی نماید که موجب تغییر در ویژگی های بیوشیمیایی آنها گردد. از طرفی تشخیص مبتنی بر ویژگی های بیوشیمیایی متداول نیز مشکل ساز است، چون در بسیاری از موارد باعث ایجاد مثبت یا منفی کاذب می گردد. بنابراین ارائه یک روش موثر در شناسایی و تایید آن با روش های مولکولی در مقایسه با روش های قبلی می تواند در تشخیص به موقع و دقیق تر این میکروارگانیسم در صنایع غذایی کمک کننده باشد. هدف از این مطالعه بهینه سازی روش شناسایی *اشریشیا کلی* در بستنی بر مبنی *16S rDNA* بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: به منظور تعیین آلودگی بستنی در سه ماهه تابستان بین سال های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۲ به صورت تصادفی از نقاط مختلف شهر اصفهان به صورت کاملاً تصادفی نمونه گیری انجام شد، تا تمام نمونه ها دارای شانس مساوی باشند. نمونه برداری از سطح عرضه (با توجه به برنامه آماری ارائه شده) به صورت ماهانه سه تکرار با رعایت زنجیره سرد انجام گردید. از بیش از ۲۰۰ نمونه بستنی مورد بررسی تعداد ۸۲ جدایه باکتریایی به دست آمد. از این میان ٤۸ نمونه اندول مثبت مشکوک به *اشریشیا کلی* جداسازی و بررسی دقیق تر بر روی آن انجام گرفت.

ب) جداسازی اشریشیا کلی بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۹٤٦: مقدار ۵ گرم از آزمونه به ٤۵ میلی لیتر محلول رینگر اضافه و به مدت ۱۰-۵ دقیقه تکان داده شد تا کاملاً حل گردد. مقدار ۱۰ میلی لیتر از رقت ۰/۱ از سوسپانسیون اولیه به ۱۰ میلی لیتر لوله حاوی لوریل سولفات تریپتوز براث

(Lauryl Sulfate Tryptose (LST) Broth) (مرک، آلمان) با غلظت دوبرابر حاوی لوله درهام اضافه و به مدت ٢٤ ساعت در ٣٥ درجه سلیسیوس نگهداری گردید. در صورت عدم مشاهده گاز زمان گرمخانه گذاری تا ٤٨ ساعت دیگر ادامه و چنانچه پس از گرمخانه گذاری در هر کدام از لوله ها گاز مشاهده گردید چند قطره از آن به محیط کشت *اشریشیا کلی* برات (EC broth=*Escherichia coli*) (مرک، آلمان) تلقیح گردید. نمونه ها در حمام آب گرم در دمای ٤٤ درجه سلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

در صورتی که در این مرحله هیچ گازی در لوله EC مشاهده نشود، آزمون منفی است. در غیر این صورت چند قطره از محیط *اشرشیا کلی* براث به محیط تریپتون واتر برات (Tryptone Water Broth) (مرک، آلمان) منتقل و به طور همزمان توسط حلقه کشت روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ٤٨ تا ٢٤ ساعت در ٤٤ درجه سلیسیوس نگهداری گردید.

٠/٥ میلی لیتر از معرف کواکس (مرک، آلمان) به لوله های تریپتون واتر برات اضافه و به خوبی مخلوط گردید. پس از یک دقیقه بررسی، مشاهده رنگ قرمز در فاز الکلی نشان دهنده اندول مثبت در غیر این صورت اندول منفی است (١٣).

به منظور نگهداری جدایه ها، پرگنه های با جلای سبز فلزی از روی محیط EMB انتخاب و بر روی محیط آگار مغذی (Nutrient agar) کشت خطی داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٥ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند.

ج) جداسازی اشریشیا کلی با استفاده از محیط Fluorocult® LMX broth (LMX): به کمک پیپت سترون مقدار ١٠ میلی لیتر از آزمونه با رقت ٠/١ به ١٠ میلی لیتر لوله حاوی محیط LMX با غلظت دوبرابر محتوی لوله دورهام اضافه گردید و به مدت ٧ تا ٢٤ ساعت در ٣٥ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد.

تغییر رنگ محیط مایع به سبز آبی و ایجاد گاز می تواند نشان دهنده وجود *اشریشیا کلی* در محیط کشت باشد. در ادامه به هر یک از لوله ها مقدار ٠/٥ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید اضافه گردید. در صورت ایجاد نور فلورسانس در طول موج ٣٦٦ نانومتر فرابنفش و ایجاد حلقه قرمز بعد از افزودن معرف کواکس، حضور *اشریشیا کلی* تایید می گردد. در صورت عدم تغییر رنگ و گاز، گرمخانه گذاری تا ٢٤ ساعت دیگر ادامه می یابد.

قبل از اضافه نمودن معرف اندول به منظور جداسازی جدایه ها با استفاده از یک لوپ سترون روی محیط کروموکالت آگار (ChromoCult® Coliform Agar) (مرک، آلمان) کشت خطی داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در ٣٥ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری گردید. *اشریشیا کلی* به صورت کلنی آبی تیره و بنفش، سایر کلی فرم ها به صورت کلنی های قرمز رنگ و میکروفلورها به صورت بی رنگ مشاهده می شوند. کلنی های بنفش و آبی پس از خالص سازی انتخاب و بر روی محیط آگار مغذی کشت داده شد. در نهایت به مدت ٢٤ ساعت در ٣٥ درجه سلیسیوس نگهداری گردید (١٤).

د) ویژگی های کشت و واکنش بیو شیمیایی: در این مطالعه تمامی جدایه ها با سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC1399 در آزمون بیوشیمیایی مقایسه شدند. در نهایت میزان دقت روش معمول با روش پیشنهادی مقایسه گردید. واکنش گرم باکتری ها به دو روش رنگ آمیزی بر اساس روش اصلاح شده هاکر (Hucker) و حلالیت در سه درصد هیدروکسید پتاسیم بر اساس روش بارون (Baron) و همکاران انجام گردید (١٥). به منظور بررسی مورفولوژی میکروارگانیسم از رنگ آمیزی ساده کریستال ویولت استفاده گردید (١٦). آزمون های کاتالاز، اکسیداز، ذوب ژلاتین، تولید گاز از گلوکز به روش شاد انجام گرفت (١٧). برای تمایز بین متابولیسم تخمیری از اکسیدی از محیط O/F (مرک، آلمان) استفاده گردید. تولید متیل رد و استوئین (Clark and Lubs medium) در محیط آماده MR/VP انجام شد (١٨). احیای نیترات در محیط آماده نیترات براث (مرک، آلمان) استفاده گردید. به منظور آزمون تولید اوره آز از محیط پایه اوره آگار (Christensen) (مرک، آلمان) حاوی ٤٠ درصد اوره فیلترشده (٠/٢٢ میکرون) استفاده گردید (١٩). بقیه آزمون ها مانند تولید سولفور، ایندول، حرکت (SIM)، مصرف

سیترات، TSI بر روی محیط آماده انجام گردید (۱۵). به منظور دسته بندی جدایه ها بر اساس متغیرهای بیوشیمیایی مهم و ترسیم دندروگرام از روش آنالیز عددی (Numerical analysis) استفاده گردید (۲۰).

ه) آزمون کروماتوگرافی لایه نازک (TLC=Thin-layer chromatography): برای این منظور از روش ماتسویاما (Matsuyama) و همکاران استفاده گردید. ابتدا جدایه های مورد نظر به مدت دو روز بر روی محیط King B Agar (مرک، آلمان) کشت و در ۲۸ °C نگهداری شدند. یک لوپ کامل از باکتری از محیط کشت برداشته و بر روی صفحه سیلیکاژل خشک گردید. سپس به طور یکنواخت در ظرف کروماتوگرافی حاوی کلروفرم و متانول (CM) به نسبت ۱:۲ (۲۲۵ ml کلروفرم، ۱۱۲/۵ ml متانول) قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ °C نگهداری شد. پس از صعود محلول CM تا فاصله ٦ سانتی متری از محل نمونه، صفحه از ظرف کروماتوگرافی خارج و در جریان هوا خشک گردید. محلول اول باعث استخراج لیپیدها از باکتری می گردد. سپس صفحه در محلول تفکیک کننده دوم شامل کلروفرم، متانول، آب نسبت ٦۰:۲۵:٤ (کلروفرم ۲٤۰، متانول ۱۰۰، آب ۱٦) به مدت ۲ ساعت در ۲۸ °C قرار گرفت. در ادامه صفحه خشک گردید و با محلول نین هیدرین ۲ درصد اسپری و در آون (۱۲۰ °C) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. لکه های ایجاد شده با جدایه های استاندارد مقایسه و Rf آنها محاسبه گردید (۲۱).

$$Rf: \frac{\text{فاصله طی شده توسط ماده مورد آزمایش بر حسب سانتی متر}}{\text{فاصله طی شده توسط محلول تفکیک کننده بر حسب سانتی متر}}$$

و) استخراج و تخلیص DNA از کشت های سوسپانسیونی باکتری برای استخراج DNA استفاده گردید. به منظور استخراج و تخلیص DNA از کیت (Qiagen, Hilden, Germany) QIAamp DNA Mini Kit استفاده شد.

ز) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ناحیه 16S rDNA از پرایمرهای 16s27F :5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 و 16s1492R :5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3 استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر بافر PCR (1X)، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (غلظت ۰/۳ میکرومولار به ازای هر کدام)، ۳ میکرولیتر dNTPs (غلظت ۰/٦ میلی مولار)، ۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲/۵ mM)، ۰/٤ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA Polymerase (۲ U)، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (غلظت ۲۰ نانوگرم) و ۳۲/٦ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد.

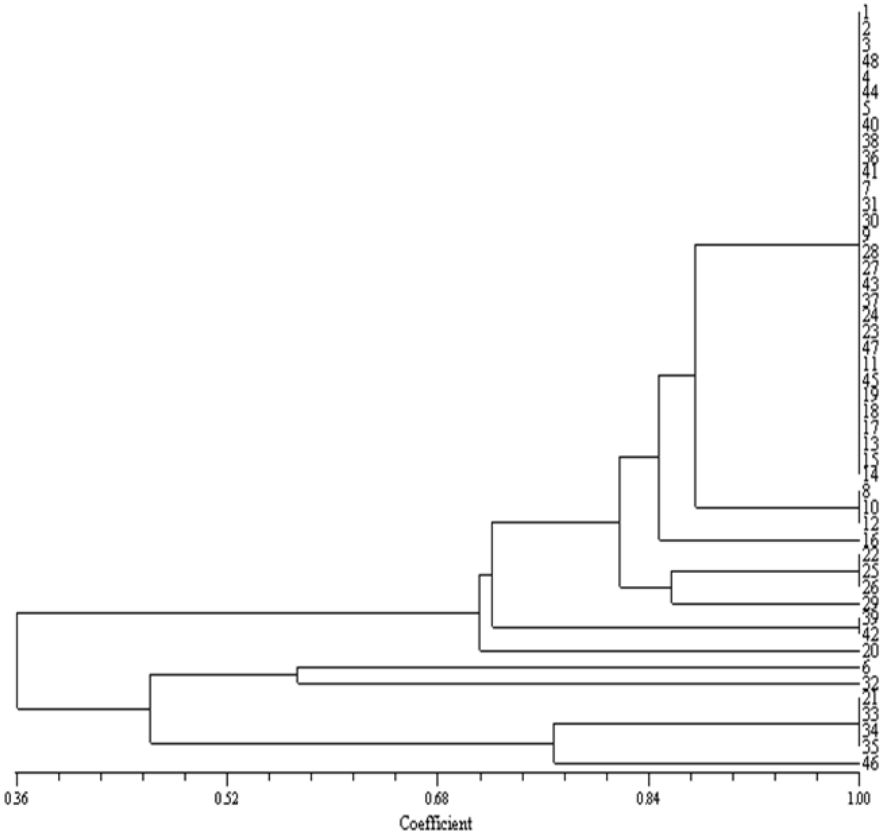
در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad C1000, Life Science Group)، با شرایط واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و طویل شدن نهایی دردمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول این فرآیند بر روی ژل آگاروز ۲ درصد به مدت ۳۵ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و سپس مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور توالی یابی، ابتدا محصول PCR با استفاده از کیت QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی گردید. سپس محصول یاد شده، مطابق با روش سانگر توسط شرکت-ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شد (۲۲).

در این مطالعه از DNA *اشریشیا کلی* تهیه شده از روش استاندارد به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

یافته ها

الف) ویژگی های بیوشیمیایی کلی فرم های جدا شده: از نمونه های مختلف بستنی جمع آوری شده از قسمت های مختلف شهر اصفهان باکتری های گرم منفی، میله ای شکل با طول ۲ تا ٦ میکرون و عرض ۱ تا ۱/۵ میکرون، متحرک، واجد تاژک



شکل ۱: گروه بندی و مقایسه جدایه ها بر اساس آزمون بیوشیمیایی. گروه اول (۱ تا ١٦)، گروه دوم (۲۲ تا ۲۹)، گروه سوم (۳۹ تا ٤۲)، گروه چهارم (شماره ۲)، گروه پنجم (٦)، گروه ششم (۳۲)، گروه هفتم (۲۱ تا ۳۵) و گروه هشتم (٤٦).

محیطی، فاقد اسپور، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی، قادر به احیای نیترات و تخمیری، از نظر کپسول بعضی کلنی های موکوئیدی واجد کپسول ولی اکثراً فاقد کپسول و قادر به تولید اندول بودند. این ویژگی ها به طور قابل توجهی به *اشریشیا کلی* شباهت دارند. پس از خالص سازی جدایه ها به منظور تشخیص قطعی تر و مقایسه روش مرسوم و روش پیشنهادی از سایر آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد.

به دلیل وجود تنوع بیوشیمیایی میان جدایه ها و عدم تشخیص قطعی از دسته بندی جدایه ها استفاده گردید. خوشه ها بر اساس متغیرهای مهم دسته بندی شدند. آنالیز عددی (برنامه *NTYSYSPC VER 2.02e*) بیان گر قرار گرفتن جدایه ها در ۸ گروه بر اساس اختلاف در آزمون های بیوشیمیایی بودند (شکل ۱). در این آزمون جدایه های کاملاً یکسان، نزدیک به هم و در مواردی متمایز گروه بندی گردید (جدول ۱) .

ب) مقایسه روش استاندارد و روش پیشنهادی با آزمون های تکمیلی و با یکدیگر: بر اساس روش ارائه شده در استاندارد شماره ۲۹٤٦ تعداد ۱۰ نمونه دارای عدم انطباق با نتایج تکمیلی حاصل از آزمون های بیوشیمیایی بودند و ۷۲ نمونه با آزمون های بیوشیمیایی منطبق بودند. نتایج با استفاده از آزمون مکنمار (MCNemar) بررسی شدند. یافته های به دست آمده حاکی از هم خوانی نتایج نهایی با استاندارد ۲۹٤٦ بوده (P<۰/۰۰۱) و اندازه تطابق ۰/۷٦ می باشد. مطابق با جدول ۲ یک نمونه بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۹٤٦ در مقایسه با آزمون های تکمیلی سالم تشخیص داده شد. به بیان دیگر با توجه به حساسیت روش استاندارد، نتیجه منفی کاذب داشت. اما روش پیشنهادی بر مبنی حساسیت بیشتر در مقایسه آزمون های تکمیلی، به منظور تایید فرضیه آلوده بودن نمونه به *اشریشیا کلی* توانست آن را تشخیص و آلوده بودن آن را به

جدول ۱: مشخصات گروه های انتروباکتریاسه جداشده از بستنی.

آزمون \ شماره گروه	درصد سویه های مثبت هر گروه								*E.coli* ATCC1399
	۱ (۳۴)	۲ (۴)	۳ (۲)	۴ (۱)	۵ (۱)	۶ (۱)	۷ (۴)	۸ (۱)	
گرم	–	–	–	–	–	–	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
احیاء نیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+
متابولیسم تخمیری	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد رنگ فلورسانت روی LMX	–	–	–	–	–	–	–	–	+
ایجاد رنگ سبز متالیک روی EMB	+	–	–	–	–	–	–	–	+
ایجاد رنگ سبز آبی روی LMX	+	+	+	+	–	–	–	–	+
ایجاد کلنی قرمز روی مک کانکی آگار	+	+	+	–	–	+	–	–	+
ایجاد کلنی بنفش روی کروموکالت آگار	+	+	۵۰	+	–	–	–	–	+
تولید پیگمان	–	–	+	–	–	–	–	–	–
هیدرولیز اوره	–	–	–	–	+	+	+	–	–
مصرف سیترات	–	–	–	–	+	+	–	–	–
متیل رد (MR)	+	(+)	+	–	+	–	+	+	+
تولید استوئین (VP)	–	–	–	–	–	+	–	–	–
هیدرولیز ژلاتین	۹	۱۱	–	–	–	–	۲۵	–	–
هیدرولیز لیزین	٦۰	۵۰	–	+	–	+	۵۰	–	+
تولید اندول	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+
حرکت	+	+	+	–	+	–	–	+	+
تولید گاز از گلوکز	+	+	+	–	–	±	–	–	±
تولید H2S از سیستئن	–	–	–	–	–	–	–	–	–
واکنش اسیدی (ACID /acid +G)	+	+	+	–	–	+	–	–	+
تولید قلیا (ALK/acid)	–	–	–	+	+	–	–	+	–
سیترات	–	–	–	–	+	+	–	–	–
سوکروز	(+)	(+)	ND	–	–	±	–	ND	+
مالتوز	(+)	(+)	ND	(+)	=	+	–	ND	(+)
ملیبیوز	(+)	(+)	ND	(+)	–	+	–	ND	(+)
سلوبیوز	–	–	ND	–	–	+	–	ND	–
ترهالوز	(+)	(+)	ND	+	–	+	–	ND	+
سوربیتول	(+)	(+)	ND	(+)	–	+	–	ND	(+)
ملونات	–	–	ND	–	–	+	–	ND	–

+: بیش از ۸۰ درصد جدایه ها در مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت مثبت بودند.

–: بیش از ۸۰ درصد جدایه ها در مدت ۵ روز منفی بودند.

(+): بیش از ۸۰ درصد جدایه ها بعد از ۷۲ ساعت مثبت تاخیری بودند.

ND: not determine

اثبات برساند. همچنین تعداد ۹ نمونه آلوده یا به عبارتی مثبت کاذب بودند که در مقایسه با آزمون های تکمیلی مشخص گردید که سایر جدایه های اندول مثبت غیر از *اشریشیا کلی* می باشند. در این مطالعه جدایه های اندول مثبت مانند *اشریشیا هرمانی*، *پروویدنشیا رتگری*، *کلبسیلا اکسی توکا* و *مورگانلا مورگانی* توانستند در نتیجه نهایی ارائه شده در استاندارد ملی ایران خطا ایجاد نمایند. بر اساس نتایج حاصل روش استاندارد دارای ۸۸ درصد صحت می باشد (از ۸۲ نمونه ۷۲ نمونه صحیح شناسایی گردید) و ۱۲ درصد خطا (از ۸۲ نمونه ۱۰ نمونه اشتباه شناسایی گردید) می باشد (جدول۲) (*p-value* <۰/۰۰۱ و *kappa value*: ۰/۷٦).

بر اساس روش پیشنهادی و مقایسه با نتایج تکمیلی حاصل از آزمون های بیوشیمیایی هیچگونه عدم انطباقی مشاهده نشد و تمام جدایه ها با نتایج تکمیلی سایر آزمون های بیوشیمیایی مطابقت داشتند. با استفاده از آزمون مکنمار مشخص گردید که نتایج نهایی با روش پیشنهادی انطباق دارند (جدول ۳) (*p-value* <۰/۰۰۱ و *kappa value*: ۱).

در نهایت از مجموع ۸۲ نمونه حاصل، ٤٥ درصد نمونه ها آلوده و ٥٥ درصد نمونه ها سالم ارزیابی گردید. از این میزان ۲۰ درصد نمونه های صنعتی و ۷۱ درصد نمونه های سنتی آلوده بودند.

ج) تعیین موقعیت آمینو لیپیدها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک : در این بررسی تعداد ۱۰ جدایه حاصل از بستنی و سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC1399 استفاده گردید. بر اساس روش یاد شده آمینولیپیدها پس از جداسازی با معرف نین هیدرین ۲ درصد مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس لکه ها بر روی کاغذ کالک منتقل گردید. نتایج بر اساس R_F به دست آمده با سویه استاندارد مقایسه شد. جدایه ها از نظر الگوی آمینولیپیدی بسیار مشابه سویه استاندارد بودند و به طور کلی قادر به ایجاد یک لکه روی کاغذ سیلیکاژل در R_F= ۰/۷٦ شدند (با حرف X روی شکل نشان داده شده است). این آزمون توانایی ایجاد افتراق بین جدایه های مختلف *اشریشیا کلی* را نداشت (شکل ۲) .

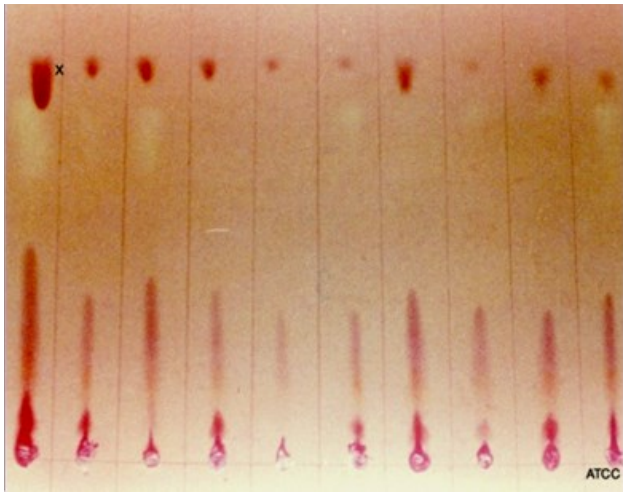
د) روش PCR : به منظور تشخیص و بررسی محصولات PCR

جدول ۲: مقایسه نتایج نهایی با استاندارد شماره ۲۹٤٦.

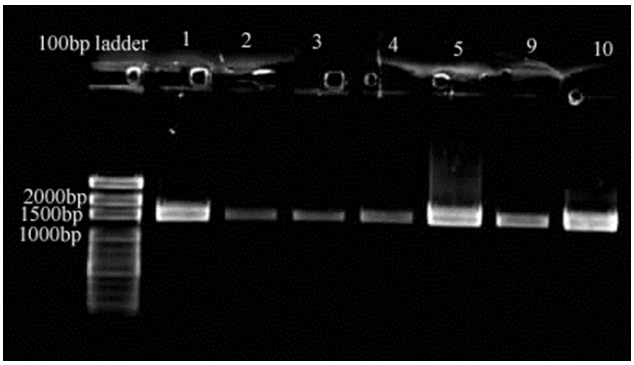
استاندارد ۲۹۴۶		نتایج حاصل از آزمون تکمیلی بیوشیمیایی		تعداد و درصد کل
		غیر آلوده به *اشرشیا کلی*	آلوده به *اشرشیا کلی*	
سالم	تعداد	۱	۳٦	۳۷
	در صد	۱/۲	٤۳/۹	٤٥/۱
آلوده	تعداد	۳٦	۹	٤٥
	در صد	٤۳/۹	۱۱	٥٤/۹
تعداد کل		۳۷	٤٥	۸۲
در صد		٤٥/۱	٥٤/۹	۱۰۰

جدول ۳: مقایسه نتایج نهایی به دست آمده از روش پیشنهادی.

نتایج نهایی		نتایج حاصل از آزمون تکمیلی بیوشیمیایی		تعداد و درصد کل
		غیر آلوده به *اشریشیا کلی*	آلوده به *اشریشیا کلی*	
سالم	تعداد	۰	٤٥	۳۷
	در صد	–	۹/٥٤	۹/٥٤
آلوده	تعداد	۳۷	۰	٤٥
	در صد	۱/٤٥	–	۱/٤٥
تعداد کل		۳۷	٤٥	۸۲
در صد		۱/٤٥	۹/٥٤	۱۰۰



شکل ۲: نقوش آمینولیپیدی جدایه های حاصل در مقایسه با جدایه استاندارد. ستون اول از سمت راست) سویه استاندارد ATCC ، بقیه ستون ها) جدایه های مورد بررسی.



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR جدایه های *اشریشیا کلی* پس از خالص سازی با استفاده از جفت پرایمرهای 16S 27f و 16S 1492R (ستون های ۱ تا ۱۰). Ladder = مارکر ۱۰۰ جفت بازی،

عمل الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام و پس از رنگ آمیزی با اتیدبوم بروماید با دستگاه آشکار ساز UV Tech (Cambridge, United Kingdom) مشاهده گردید (شکل۳).

ابتدا حدود ۲۰ نوکلوئید از اول و آخر توالی ها به دلیل عدم کیفیت حذف گردید و توالی های هزار نوکلوئیدی اولیه نگهداشته شد. سپس تمام توالی های حاصل در NCBI بلاست گردیدند. نتایج نشان داد که تمامی جدایه ها با سویه *اشریشیا کلی* منطبق هستند. سپس تمامی توالی های به دست آمده به اضافه یک توالی مربوط به *16S rDNA اشریشیا کلی* که در NCBI ثبت شده بود به صورت ردیف سازی چندگانه (مالتیپل الاینمنت) با نرم افزار *Bioedit* مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی های مربوط به جدایه ها در سایت NCBI در بانک نوکلئوتید با شماره دستیابی بصورت ذیل ثبت گردیدند: KJ660333.1، KJ660334.1، KJ660335.1، KJ660336.1، KJ660337.1، KJ660338.1 و KJ660339.1. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=nedaeinia).

بحث

در نتایج ۳۱ آزمون فنوتیپی تنوع میان زیر گونه استاندارد و جدایه های به دست آمده مشاهده گردید. با استفاده از آنالیز عددی و ترسیم دندروگرام، جدایه ها در ۸ گروه قرار گرفتند. این گروه ها نتیجه تفاوت فنوتیپی بین سویه ها و اختلاف آنها در تولید اسید با استفاده از منابع کربنی مختلف بودند.

بر اساس بررسی های صورت گرفته با توجه به روش استاندارد ارائه شده در استاندارد شماره ۲۹٤٦ روش یاد شده دارای ۸۸ درصد صحت و ۱۲ درصد خطا بود. در این بررسی جدایه های اندول مثبت مانند *E. coli (inactive)*، *E. hermani*، *P. rettger*، *K. oxytoca* و *M. mogani* توانستند در نتیجه نهایی خطا ایجاد نمایند.

با این وجود آنالیز های انجام شده با استفاده از روش ارائه شده مانند استفاده از محیط های حاوی مواد کروموژنیک شامل LMX broth و کرموکالت آگار و ایجاد فلورسانت زیر نور فرابنفش با طول موج ۳٦٦ نانومتر نشان داد که بدون هیچگونه خطایی می توان *اشریشیا کلی* را شناسایی نمود.

در جدول ۲ از ۸۲ نمونه بررسی شده، ۱۰ نمونه (۱۲ درصد) با نتایج حاصل از آزمون های تکمیلی منطبق نبودند. اما ۷۲ نمونه (۸۸ درصد) کاملاً انطباق داشتند. در جدول ۳ که در آن روش پیشنهادی مورد بررسی قرار گرفت عدم انطباقی مشاهده نگردید.

البته باید به این نکته توجه نمود که در روش پیشنهادی بستنی های حاوی مواد رنگی به دلیل ایجاد تغییر رنگ محیط و اختلال در فلورسانت حاصل می توانند موجب ابهام در نتیجه

گردند. اما با انجام کشت بر روی محیط کروموکالت آگار و مشاهده پرگنه های آبی بنفش می توان این ابهام را بر طرف نمود. با استفاده از محیط LMX broth و بسته به میزان *اشریشیا کلی* در نمونه، به ۷ تا ٢٤ ساعت زمان برای جواب نیاز می باشد. که در مقایسه با روش استاندارد که ۷۲ ساعت زمان نیاز دارد از ارزش و دقت بالاتری برخوردار است.

در بررسی های انجام شده، نتایج حاصل از میزان آلودگی با نتایج به دست آمده توسط پور محمودی (Pourmahmoodi) و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطابقت داشت. اما از نظر نوع آلودگی به *اشرشیا کلی* با نتایج کریم (Karim) و همکاران در سال ۱۹۹۵ مطابقت داشت (۲ و ۷). برخی از سویه های تولید کننده توکسین مانند *اشریشیا کلی* O26 پس از *اشریشیا کلی* O157:H7 مسئول ایجاد اسهال و ادرار خونی در انسان هستند (۲۳).

گاو به عنوان یک مخزن مهم سویه O26 شناخته شده است. با توجه به بالا بودن *اشریشیا کلی* تیپیک نسبت به این سویه ها که به تعداد کم بیماری زا هستند و آزمون های مثبت کاذب کمتری نسبت به سویه های تولید کننده توکسین دارند، تشخیص زودهنگام آن مهم جلوه می کند.

بررسی های نورمن (Norman) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که سویه های به دست آمده از گاو و انسان از لحاظ الگوی پلی مورفیسم و ژن های بیماری زا یکسان هستند. بنابراین انتقال بین دو گونه ممکن است رخ دهد (۲۳). شیوع با جدایه های تولید کننده توکسین باوجود ارتقای سطح بهداشتی هنوز در تمامی کشورهای دنیا گزارش می گردد.

تاکنون درصد مختلفی از شیوع سویه های *انتروهموراژیک اشریشیا کلی* O157 (EHEC) و سویه های non-O157 گزارش شده است (٢٤). اهمیت موضوع در این موارد به قدری است که در موارد شیوع پایین بررسی های گسترده به منظور پی بردن به منشاء آلودگی صورت می گیرد و گاهی یک چالش بهداشتی محسوب شده تا آنجایی که در بسیاری از موارد، روش های تشخیصی جدیدتر جایگزین روش های قبلی می گردد.

سیستم سلامت محور تنها به درمان فرد بسنده نکرده بلکه ریشه کنی منشاء آلودگی را نیز در دستور کار قرار می دهد. به عنوان نمونه در سال ۲۰۰۷، شیوع *اشریشیا* O145 تولید کننده وروتوکسین و *اشریشیا کلی* O26 در میان مصرف کنندگان بستنی در یک مزرعه در استان آنتورپ (بلژیک) رخ داد. بستنی در دو جشن تولد در مزرعه مصرف گردید. پنج کودک، بین سنین ۲ و ۱۱ سال، دچار ادرار خونی Haemolytic uraemic syndrome (HUS)، هفت نفر دیگر نیز دچار اسهال شدید گردیدند. در سه نفر از پنج نفر مبتلا به HUS موارد عفونت O145 توسط آزمایشگاه تایید شد. یک نفر در ارتباط با O26 تشخیص داده شد.

اشریشیا کلی O145 و O26 با روش های PCR و PFGE در نمونه های مدفوع بیماران، در باقی مانده بستنی، نمونه های خاک مزرعه و در نمونه های مدفوع گرفته شده از گوساله به دست آمد. بررسی ها نشان داد که با وجود تولید بستنی از شیر پاستوریزه، اما باکتری به احتمال زیاد توسط یکی از عوامل تولید به صورت غیر مستقیم به ماده غذایی منتقل شده بود (۲۵).

در مطالعه حاضر تعیین موقعیت آمینو لیپیدها با استفاده از روش TLC نتوانست هیچ گونه تفکیک قابل ملاحظه ای را نشان دهد. بنابراین روش مناسبی محسوب نمی شود. با توجه به نتیجه برنامه (multiple alignment bioedit) و Blast برای طول هزار جفت باز اول قطعه 16s rDNA می توان اظهار داشت که با وجود تفاوت در آزمون های بیوشیمیایی، تمامی سویه ها مربوط به *اشریشیا کلی* بودند.

از آنجایی که *اشریشیا کلی* شاخص بهداشتی محسوب می گردد، بنابراین تشخیص آن در ماده غذایی همان قدر اهمیت دارد که تشخیص اشتباه آن و معدوم شدن مقادیر زیادی از مواد غذایی در صنعت. جدایه های باکتریایی که در مواد غذایی حضور دارند تحت تاثیر فرآیندهای مختلف دمایی مانند سرما و گرما قرار می گیرند. این موارد می تواند باعث ایجاد شوک در باکتری و در مواردی تغییراتی در تولید آنزیم ها و در نتیجه ایجاد ویژگی جدید در باکتری گردد.

بنابراین اطلاع از این ویژگی ها می تواند از اهمیت ویژه ای در تشخیص به موقع و دقیق تر برخوردار باشد.

به نظر می رسد جدایه های باکتریایی به دلیل قرار گرفتن در شرایط مختلف دمایی مانند پاستوریزاسیون و انجماد، دچار تغییراتی در ویژگی های آنزیمی و پروتئین های ساختمانی خود می گردند. بنابراین پیشنهاد می گردد که برای ارگانیسم های شاخص در مواد غذایی که تحت تاثیر فرایندهای مختلف حرارتی قرار می گیرند کلیدهای تشخیصی مشخصی تعریف گردد.

همچنین لازم است در مراحل تشخیص این جدایه ها این نکات مد نظر قرار گیرد. زیرا تغییر در شرایط رشد می تواند موجب تغییر در ویژگی های بیوشیمیایی و در نهایت ابهام در تشخیص شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بـه دسـت آمـده در ایـن مطالعـه و صـحت ۸۸ درصدی در تشخیص باکتری می توان نتیجه گرفـت کـه بـا استفاده از محیط های کشت حاوی مواد کروموژنیک می توان با صحت بالاتر، سرعت بیشتر و قیمـت ارزان تـر *اشریـشیا کلـی تیپیک* را شناسایی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، معاون غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان) گروه علوم و صنایع غذایی و تمامی افرادی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، کمال امتنان را دارند.

References

1. Motarjemi Y, Moy GG, Jooste PJ, Anelich LE. Milk and Dairy Products. In: Motarjemi Y, Lelieveld H, editors. Food Safety Management. San Diego: Academic Press; 2014. p: 83-117.
2. Pourmahmoodi A, Mohammadi J, Mirzai A, Momeni Negad M, Afshar R. Epidemiological study of traditional ice cream in YASUJ. Armaghan Danesh. 2002; 8(29): 59-65.
3. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol Rev. 2013; 37(5): 664-698.
4. Hearn P, Doherty T. Diarrhoea in travellers. Medicine. 2014; 42(2): 84-88.
5. Oomro AH, Arion MA, Khaskheli M, Bhutto B. Isolation of *Escherichia coli* from row milk productions in relation to public health sold under market conditions at tandojam. Pakistam J Nutrition. 2002; 1(3): 151-152.
6. Bagheri H, Ghaemi A, Aslani M, Mozafari N, Livani S, Dadgar T. The prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Gorgan. IRAN J Gorgan Univ Med Sci. 2008; 2: 8-12.
7. Karim G, Razavilar V, Akhondzadeh A. Survey on the contamination of Traditional Iranian ice cream with important bacteria associated with foodborn infection and intoxication. J Vet Res. 1995; 50: 1-2.
8. Meadr PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C. Food– related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5(5): 607-625.
9. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne pathogens and disease. 2005; 2 (2): 115-129.
10. Djazayery A, Sadeghipoor H, Effatpanah M, Mehrdad R, Nazarineia A, Mohseni M. Determination of microbial contamination in traditionally manufactured ice-creams and

handmade fruit juices (carrot juice and coconut milk) in Tehran. Pajuhesh Hakim. 2003; 6(2): 31-38.

11. Shekarforoush SS, Jafarpor B. Comparison of the bacterial and chemical properties of traditional Iranian ice cream produced in Shiraz with Iran National Standard. IJFST. 2006; 3(2): 11-17.

12. Salehian M, Salehifar E, Esfahanizadeh M, Karimzadeh L, Rezaei R. Microbial contamination in traditional ice cream and effective factors. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23 (99): 18-33.

13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* -Most probable number technique. 2nd revision. 2005.

14. Nedaeinia R, Hejazi M, Javadi S, Feyzie M, Merasie MR. Statistical study of the rate of contamination of ice-cream made traditionally and industrially with *Escherichia coli* bacteria and optimizing methods of identifying *Escherichia coli* in Isfahan city in 2007: Isfahan Univ Med Sci. 2009.

15. Murray PR, Baron EJ. Manual of Clinical Microbiology: ASM Press; 2007.

16. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edition. Ed 2007.

17. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria: APS press Minessota; 2001.

18. Finegold SM, Martin WJ. Diagnostic Microbiology. 1982.

19. Cox FEG. Topley & Wilson's Microbiology and microbial Infections: Parasitology. Parasitology: E. Arnold; 1999.

20. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy: The Principles of Numerical Classification. San Francisco, CA, USA, Freeman. 1973.

21. Matsuyama N, Furya N. Application of the direct colony TLC for identification of phytopathogenic bacteria (II) chromatographic profile of *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. In: univ JfAK, editor. 1993.

22. Ko KS, Hong SK, Lee KH, Lee HK, Park MY, Miyamoto H. Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Microbiol Methods. 2003; 54(3): 325-337.

23. Norman KN, Clawson ML, Strockbine NA, Mandrell RE, Johnson R, Ziebell K. Comparison of whole genome sequences from human and non-human *Escherichia coli* O26 strains. Frontiers Cell Infect Microbiol. 2015; 1: 5.

24. Karch H, Leopold SR, Kossow A, Mellmann A, Köck R, Bauwens A. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC): Environmental-Vehicle-Human Interface. In: Sing A, editor. Zoonoses -Infections Affecting Humans and Animals: Springer Netherlands. 2015; p. 235-248.

25. De Schrijver K BG, Possé B, Van den Branden D, Oosterlynck O, De Zutter L, Eilers K, Piérard D, Dierick K, Van Damme-Lombaerts R, Lauwers C, Jacobs R. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. Euro Surveill. 2008; 13(7): 8041.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Optimizing methods of identifying *Escherichia coli* strains from ice cream on *16S rDNA*

Maryam Ranjbar[1], Mohammad Goli[2], Gholamreza Ghalamkari[3], Mostafa Manian[4], Mohammadreza Maracy[5], Reza Nedaeinia[6]

[1]M.Sc., Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. [4]M.Sc., Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [5]Associate Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [6]M.Sc., Department of Microbiology, Laboratory control, Deputy of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Milk and its products support the growth of infectious germs such as *Escherichia coli*, the most important agent of food contamination, in special conditions. This study was aimed to optimize the methods of identification of *E. coli* strains from ice cream based on *16S rDNA*.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 82 bacterial strain were isolated from 200 ice cream samples collected from different regions of Isfahan. Of these, 48 positive indole strains were isolated. The isolation was carried out based on Iran's national standards (No. 2946) and using chromogenic media on a comparative basis. After numerical analysis, the *16SrRNA* was amplified by PCR and the amplified genes were sequenced.

Results: We observed that the method used in the national standard is 88 % reliable with 12 % error. Moreover, the positive indole strain such as *Escherichia hermannii, Providencia rettgeri, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii* showed errors in the final result.

Conclusion: We demonstrated that culture media containing chromogenic materials could identify *Escherichia coli* with a more accurate, simple, quick and inexpensive procedure.

Keywords: Escherichia coli, Chromogenic substances, Ice cream, *16S rDNA*, Optimizing.

Correspondence to: Reza Nedaeinia

Tel: +9837922245

E-mail: Nedaeinr901@mums.ac.ir

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 209-220.