شیوع ژن tir در سویه E. coli جدا شده از مواد غذایی سرد

سحر محمودی[۱]*، جمیله نوروزی[۲]، محدثه لاری پور[۳]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران– شمال، تهران، ایران.
۲- استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران – شمال، تهران، ایران.
۳- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران – شمال، تهران، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** : تهران، شهر قدس، خیابان ۴۵ متری انقلاب اسلامی، کوچه اندیشه، پلاک ۱۵، همراه: ۰۹۱۲۸۶۰۲۱۷۰، Sahar87665000@gmail.com

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و هفت پذیرش برای چاپ: تیر نود و هفت

چکیده

مقدمه: *E. coli، ساکن طبیعی مجرای روده انسان و حیوانات خون گرم است. این باکتری از طریق انتقال مدفوعی- دهانی ممکن است به غذاهای سرد مانند: سالاد، ساندویچ های سرد که حرارت داده نمی شوند منتقل شود و دیگران را آلوده کند به همین علت، یافتن راهی سریع برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی سرد مانند: سالاد، ساندویچ های سرد که حرارت داده نمی شوند ضروری است.*

روش کار: *در این پژوهش با استفاده از محیط های کشت غنی کننده و افتراقی (مانند محیط نوترینت براث و محیط مک کانکی آگار و EMB آگار) و انجام آزمایشات بیوشیمیایی (تست تخمیر قندها، حرکت، اندول و...) و همچنین با استفاده از روش مولکولی PCR مشخص شد که از بین ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد (از جمله: کاهو، کالباس، کلم و گوجه) جمع آوری شده فقط ۲۵ نمونه (۲۵٪) دارای باکتری E. coli و وجود ژن tir در این باکتری بودند که این امر نشان دهنده وجود باکتری E. coli بیماریزا در ۲۵٪ می باشد.*

یافته ها *از بین ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد (۲۵=کاهو، ۲۵=کالباس، ۲۵=گوجه، ۲۵=کلم) جمع آوری شده، پس از کشت نمونه ها در محیط های افتراقی و انجام آزمایش PCR و همچنین آزمایش PCR مستقیم مشخص شد که فقط باکتری های E. coli جدا شده از ۲۵ نمونه (۲۵٪) کالباس ها دارای ژن tir هستند. در واقع نتایج حاصل از کشت و بدون کشت (بطور مستقیم) در PCR مشابه بوده است و در PCR از نمونه های حاصل از کشت و بدون کشت، ۲۵٪ ژن tir مشاهده شده است.*

نتیجه گیری: *این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش PCR مستقیم می توان ژن tir را در مواد غذایی سرد مانند: سالادها و ساندویچ های سرد در مدت زمان کمتری (۲۴ ساعت) نسبت به کشت نمونه ها شناسایی کرد. وجود ژن tir، در نمونه های جمع آوری شده، نشان دهنده بیماریزا بودن باکتری اشریشیا کلی است. بنابراین، شناسایی سریع این ژن از طریق روش مولکولی PCR مستقیم می تواند باکتری اشریشیا کلی بیماریزا را متمایز کند.*

واژگان کلیدی: ***E. coli، روش مولکولی PCR، ژن tir ، مواد غذایی سرد***

مقدمه

E. coli، باسیل گرم منفی، بی هوازی اختیاری، متحرک، جزو خانواده انتروباکتریاسه بوده، تخمیر کننده و اکسیداز منفی است. *E. coli*، ساکن طبیعی مجرای روده انسان و حیوانات خون گرم است(۱). این باکتری از طریق انتقال مدفوعی- دهانی ممکن است به غذاهای سرد مانند: سالاد، ساندویچ های سرد که حرارت داده نمی شوند منتقل شود و دیگران را آلوده کند. طبق گزارشات مرکز کنترل و پیشگیری از بیماریها (CDC)، متداول ترین باکتری های آلوده کننده مواد غذایی سرد، Salmonella، Campylobacter، *E. coli* O157:H7، *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Clostridium perfringens* هستند(۲). اگرچه معمولا سویه های مختلف *E. coli* غیر بیماری زا هستند اما آنها با بدست آوردن ژنهای بیماری زا موجب بیماری در انسان و حیوانات می شوند. این پاتوژنها مسئول ۳ تیپ اصلی عفونتهای کلینیکی بیماریهای روده ای و اسهال، عفونتهای دستگاه ادراری، و سپسیس و مننژیت هستند. در اصل، سویه های بیماریزای *E. coli* با ویژگی های متفاوت بیماری زایی و علائم کلینیکی در میزبان از گروه های دیگر متمایز می شوند. سویه های مختلف *E. coli* عامل اسهال عبارتند از: ۱) سویه های *E. coli*

انتروتوکسیژنیک (ETEC) که با اسهال مسافران و اسهال گاو و خوک مرتبط هستند. ۲) سویه های *E. coli* انتروپاتوژنیک (EPEC) که عامل اسهال در کودکان و حیوانات هستند. ۳) سویه های *E. coli* انتروهموراژیک (EHEC) که با کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک در انسان مرتبط هستند. سویه های *E. coli* انترواگریگیتیو (EAEC)، عامل اسهال پایدار در انسان می باشند. سویه های *E. coli* انترواینویسیو (EIEC) که در عفونتهای تهاجمی روده ای، اسهال آبکی و اسهال خونی در انسانها و حیوانات دخیل هستند(۳).

پروتئین باکتریایی Tir (EspE) می تواند به عنوان گیرنده اینتیمین، EHEC/EPEC عمل کند (۴). دومین عملکرد Tir برای actin-Nuclate و دیگر اجزای اسکلت سلولی بعد از اتصال اینتیمین است. سومین عملکرد Tir، همزمان با واکنش intimin -Tir است که سیگنال های اضافی را به سلول میزبان انتقال می دهد(۵). وجود Tir در باکتری های EPEC و EHEC، عامل اصلی اتصال این باکتری ها به سلول های اپیتلیال روده میزبان است. وجود اینتیمین و Tir در سویه های *E. coli* بیماریزا، اصلی ترین عامل بیماریزایی در اتصال به سلول میزبان و استقرار این باکتریها است (۶).

از آنجاییکه باکتری *E. coli* در روده بوده و از مدفوع دفع می شود، لذا افرادی که در تهیه غذا دخالت می کنند، می توانند غذا را آلوده کنند. به همین علت، یافتن راهی سریع برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی سرد مانند سالاد، ساندویچ های سرد که حرارت داده نمی شوند ضروری است. یکی از راه های شناسایی این باکتری، یافتن ژن *tir* در مواد غذایی است. وجود ژن *tir*، نشان دهنده بیماری زا بودن باکتری *اشریشیا کلی* است زیرا باعث اتصال باکتری به سلول های بدن می شود. Tir، عامل مهمی برای اتصال و تشکیل پایه و ایجاد ضایعه A/E توسط باکتری *اشریشیا کلی* بیماری زا است، شناسایی سریع این ژن از طریق روش مولکولی PCR می تواند باکتری *اشریشیا کلی* بیماری زا را از غیر بیماری زا متمایز کند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی سریع *اشریشیا کلی* بیماری زا از مواد غذایی سرد با استفاده از ژن *tir* بوده است که در صنایع غذایی و مرکز بهداشت و درمان نیز کاربرد دارد.

روش کار

در کل، ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد از جمله (۲۵=کاهو، ۲۵=کالباس، ۲۵=گوجه، ۲۵=کلم) از مغازه های فست فود موجود در شهرقدس جمع آوری شد. نمونه ها پس از جمع آوری در داخل لوله های فالکون حاوی محیط کشت نوترینت براث استریل ریخته شد. لوله های فالکون حاوی نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۵°C نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، تست های تشخیصی برای شناسایی باکتری *E. coli* انجام شد.

برای تایید و تشخیص باکتری *E. coli* از تست های اندول، متیل رد، رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی و کاتالاز و اکسیداز استفاده شد. باکتری های *E. coli* روی محیط های مختلف نظیر مک کانکی آگار، EMB آگار، سیمون سیترات آگار، TSI، SIM کشت داده شدند و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور ۳۵°C قرار داده شدند. باکتری های *E. coli* در محیط MRVP brothنیز کشت داده شدند و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۵°C قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، لوله های حاوی محیط کشت MRVP broth از انکوباتور خارج کرده و به دو قسمت مساوی تقسیم شد .

برای استخراج DNA از محیط کشت نوترینت براث که باکتری به مدت یک شب رشد کرده بود، توسط سمپلر ۱۰۰۰-۱۰۰ به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشت کرده و درون میکروتیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری ریخته، سپس میکروتیوب ها به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۹۰۰۰ سانتریفوژ شدند. از محیط کشت EMB نیز توسط یک لوپ استریل از کلنی های با جلای سبز فلزی نمونه برداری کرده سپس لوپ را وارد میکروتیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری استریل حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر کرده، سپس میکروتیوب ها به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۹۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی میکروتیوب را خالی کرده و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر NLB به آن اضافه کرده و پیپتاژ شدند. میکروتیوب ها درون رک مخصوص آنها قرار داده شده و به مدت ۱۵ دقیقه درون فریزر نگهداری شدند. سپس میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. مجدد میکروتیوب ها را در فریزر قرار داده تا منجمد شوند. میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر بافر NaCl به میکروتیوب ها اضافه کرده و ورتکس شدند. مجدد میکروتیوب ها را در فریزر قرار داده تا منجمد شود. میکروتیوب ها را به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و سپس ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب ها اضافه کرده و ورتکس شدند. میکروتیوب ها به مدت ۲ دقیقه با دور ۷۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و سپس مایع رویی را برداشته و درون میکروتیوب جدید ریخته شدند. ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶% به میکروتیوب ها اضافه کرده و ورتکس شدند. میکروتیوب ها را به مدت ۱۵ دقیقه در فریزر قرار داده و سپس میکروتیوب ها را به مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ کرده و سپس مایع رویی را خالی و کمی صبر کرده تا کاملا خشک شود. سپس میکروتیوب ها ۳ دقیقه در دمای ۵۰ درجه قرار داده شدند. در پایان ۵۰ میکرولیتر آب به میکروتیوب ها اضافه شد.

برای آزمایش PCR حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. به طوری که ابتدا ۷ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری اضافه

بعد از اضافه کردن ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده، Primer نیز به میزان ۱ میکرولیتر به دیواره اضافه شد. قبل از اضافه کردن Master Mix، یخ را آماده کرده و دستگاه روشن شد. سپس Master Mix را اضافه کرده و میکروتیوب داخل دستگاه قرار داده شد.زمان بندی هر یک از قسمتها انجام شد. قسمت اول (واسرشت اولیه) ۹۵ درجه ۳ دقیقه، قسمت دوم (واسرشت ثانویه) ۹۵ درجه ۳۰ ثانیه، قسمت ب- دمای Anneling با توجه به TM Primer تنظیم شد(جدول ۱)، قسمت ج- دمای همانند سازی ۷۲ درجه ۱ دقیقه، قسمت سوم ۷۲ درجه پایانی ۵ دقیقه. پس از اتمام کار دستگاه دما به ۴ درجه رسید و نمونه برای خارج کردن آماده بود.

جدول ۱ . لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

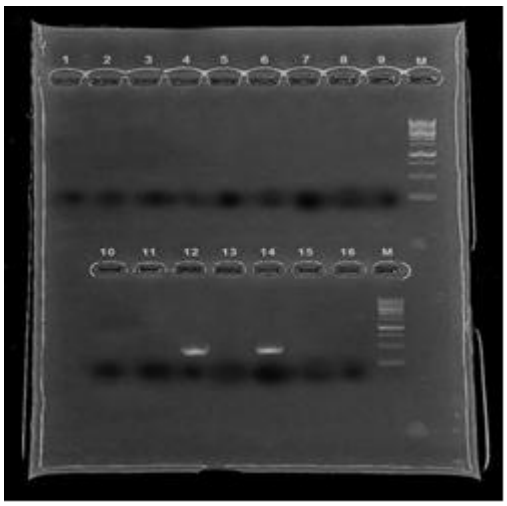
نام پرایمر	توالی (′۳→′۵)	اندازه محصول
tir F *E. coli*	′۵-ATTGGTGCCGGTGTTACTGCTG-3′	**۴۴۲bp**
tir R *E. coli*	′۵-CTCCCATACCTAAACGCAATTC-3′	

یافته ها

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده از مغازه های فست فود، فقط در ۲۵ نمونه (۲۵٪) از نمونه های کالباس، *E. coli* بیماری زا از طریق کشت نمونه ها و انجام آزمایش PCR و با استفاده از پرایمرهای ژن *tir* شناسایی شد. کشت ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد جمع آوری شده بر روی محیط کشت MacConkey agar نشان داد که پلیت هایی که کلنی های صورتی رنگ داشتند، دارای باکتری *E. coli* بودند. این پلیت ها برای مراحل بعدی کشت بر روی محیط کشت Simmon Citrate agar وEMB agar انتخاب شدند. در محیط کشت Simmon Citrate agar، پلیت هایی که سبز رنگ باقی مانده بود دارای باکتری *E. coli* بودند. در محیط کشت EMB agar، نیز پلیت هایی که دارای کلنی هایی با جلای سبز فلزی بودند دارای باکتری *E. coli* بودند و از روی این خاصیت به آسانی از کلنی های انتروباکتر و کلبسیلا متمایز و شناسایی شدند. در مراحل بعدی، کشت در محیط کشت TSI agar نشان داد که فقط نمونه هایی دارای باکتری *E. coli* بودند که بخش شیب دار و عمقی محیط TSI لوله های آنها زرد رنگ شده بود. از آنجاییکه باکتری *E. coli*، SH2 منفی بوده، در لوله های TSI agar رسوب سیاهرنگ تولید نشد. کشت نمونه های مواد غذایی سرد جمع آوری شده در محیط کشت MRVP Broth که به دو قسمت مساوی تقسیم شده بود نشان داد که فقط نمونه هایی دارای باکتری *E. coli* بودند که پس از افزودن دو قطره معرف متیل رد به لوله های MR رنگ قرمز تندی ظاهر شد و واکنش منفی با رنگ زرد مشخص شد. در لوله های VP فقط نمونه هایی دارای باکتری *E. coli* بودند که پس از افزودن یک قطره معرف آلفانفتول و یک قطره KOH حلقه بنفش رنگ در بالای لوله های VP ظاهر نشد که این امر نیز نشان دهنده منفی بودن آزمایشVP در مورد باکتری *E. coli* بود. در لوله های حاوی محیط کشت SIM، ۳ مورد بررسی شد:

کشت نمونه های مواد غذایی سرد جمع آوری شده در محیط کشت SIM نشان داد که فقط در لوله هایی که در کنار مسیر حرکت آنس در داخل لوله کدورت ایجاد شده بود نشان دهنده مثبت بودن حرکت و وجود باکتری *E. coli* بود. در لوله هایی که رسوب سیاه رنگ مشاهده نشد نشان دهنده منفی بودن SH2 و وجود باکتری *E. coli* بود.بعد از افزودن ۲ قطره معرف کواکس، حلقه قرمز رنگ ضعیفی در سطح بعضی از لوله های SIM مشاهده شد که نشان دهنده مثبت بودن اندول و وجود باکتری *E. coli* بود.

آزمایش PCR در این مطالعه نشان داد که از بین ۱۰۰ DNA ای که بطور مستقیم و همچنین بعد از کشت نمونه ها از ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد استخراج شده بود فقط در DNA استخراج شده از نمونه های کالباس ژن *tir* وجود داشت. همچنین در این مطالعه مشخص شد که از طریق آزمایش PCR مستقیم می توان باکتری *E. coli* را با سرعت و دقت بالا در مدت کمتر از ۲۴ ساعت تشخیص داد(شکل ۱) .



تصویر۱. نتایج حاصل از PCR و شناسایی ژن *tir* در DNA های استخراج شده
اندازه محصول bp ۴۵۰، چاهک M: مارکرDNA bp ۲۵۰۰، چاهک های ۱ تا ۱۶، DNA استخراج شده.

بحث

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی سریع *E. coli* بیماریزا از *E. coli* غیر بیماریزا با استفاده از ژن *tir* بود زیرا این ژن در اتصال باکتری *E. coli* به سلول های اپیتلیال روده میزبان و بیماریزایی باکتری دخیل است و در صورت عدم اتصال باکتری به این سلول ها، باکتری قدرت بیماریزایی خود را از دست می دهد، لذا شناسایی سریع این ژن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. در این مطالعه مشخص شد که بهترین روش برای شناسایی سریع ژن *tir* در سویه های *E. coli* جدا شده از مواد غذایی سرد، روش مولکولی PCR مستقیم است. با روش مولکولی PCR مستقیم می توان بعد از گذشت ۲۴ ساعت از نگهداری نمونه ها در دمای ۳۵°C، ژن *tir* را در نمونه های مورد نظر شناسایی کرد و *E. coli* بیماریزا را تفکیک نمود. روش مولکولی PCR، ابزاری سریع و آسان برای جدا کردن باکتری های *E. coli* از گروه های سرولوژیکی یکسان نیز می باشد (۳). از بین ۱۰۰ نمونه مواد غذایی سرد جمع آوری شده از فست فود ها فقط ۲۵ سویه (۲۵٪) *E. coli* جدا شده از کالباس دارای ژن *tir* بودند که نشان دهنده شیوع ژن *tir* در فرآورده های گوشتی حاصل از گوشت خوک بود.

پروتئین باکتریایی Tir (EspE) می تواند بعنوان گیرنده intimin، EPEC و EHEC عمل کند. Tir، همزمان با واکنش Tir – intimin سیگنال های اضافی را به سلول میزبان انتقال داده و وجود Tir در باکتری های EPEC و EHEC عامل اصلی اتصال این باکتری ها به سلول های اپیتلیال روده میزبان است (۴). در بررسی صورت گرفته توسط Gomes و همکاران بر روی ۱۲۰ ماده غذایی (شیر خام و پاستوریزه، فرآورده های گوشتی، پنیر و سبزیجات) گزارش گردید که گوشت و فرآورده های گوشتی، بیشترین آلودگی به *اشریشیا کلی* (از ۵۲/۵٪ آلودگی مشاهده شده در فرآورده های غذایی) را دارا بودند (۷). در پژوهش حاضر نیز فرآورده های گوشتی مانند کالباس های مورد استفاده در سالاد ها و ساندویچ های سرد، بیشترین آلودگی به *اشریشیا کلی* (۲۵٪) را دارا بودند.

در سال ۲۰۰۹ نیز توسط Meldrum و همکاران در انگلستان مطالعاتی بر روی ۱۲۱۳ نمونه سالاد سبزیجات انجام گرفت که در ۴٪/۷ از نمونه ها وجود *اشریشیا کلی* تایید شد و یک نمونه به سالمونلا آلوده بود (۸). در حالیکه در مطالعه حاضر در ۱۰ نمونه (۱۳٪/۸) نمونه های سالاد آلودگی به *اشریشیا کلی* تایید شد که در مقایسه با مطالعه فوق میزان آلودگی بیشتر بوده است. در مطالعه ساگو و همکاران نیز در ۳٪ نمونه های سالاد، آلودگی به *اشریشیا کلی* مشخص شد (۹) که کمتر از آلودگی مشاهده شده در مطالعه حاضر بود. کنترل بهداشتی مواد غذایی در رستوران ها و مراکز عرضه غذا بطور دوره ای برای اطمینان از سلامت غذا های مصرفی لازم و ضروری است و این موضوع در تمامی کشورها انجام می پذیرد. با توجه به اینکه غذاهای تهیه شده از گوشت چرخ کرده مانند کباب کوبیده و سالاد ها از غذاهای پر خطر محسوب می گردد، گزارشات زیادی از آلودگی این مواد غذایی به باکتریهای بیماریزا به ویژه *اشریشیا کلی* وجود دارد. توکلی و همکاران در سال ۱۳۹۲ طی مطالعه ای که بر روی مواد غذایی منتخب در برخی از رستوران های شهر تهران انجام دادند از مجموع ۹۶ نمونه گرفته شده، شامل ۴۸ نمونه کباب کوبیده و ۴۸ نمونه سالاد، ۱۰ نمونه

سالاد (۱۰/۴٪ موارد) به *اشریشیا کلی* آلوده بودند که با نتایج بدست آمده در این مطالعه اختلاف کمتری داشت. با توجه به اینکه *اشریشیا کلی* شاخص کنترل بهداشتی آب و مواد غذایی است و طبق استاندارد نباید مواد غذایی به این باکتری آلوده باشند، آلودگی (۱۳٪/۸) از نمونه های غذایی مورد آزمایش به این باکتری برای مسئولین بهداشتی سازمان هشدار دهنده است و می تواند موجب بروز عفونت و مسمومیت غذایی در بین مصرف کنندگان گردد (۱۰). در مطالعه حاضر مشخص شد که شیوع ژن *tir* در فرآورده های گوشتی حاصل از گوشت گاو و خوک از جمله کالباس ها بیشتر از نمونه های کاهو و گوجه و کلم است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گاوها و خوک ها و فرآورده های گوشتی حاصل آنها منابع اصلی و بالقوه بیماریزایی از سویه های *E. coli* برای انسان هستند. Lambertiniو همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که، شیوع گسترده *E. coli* بیماریزا، بیشتر در کارخانه های لبنیات سازی و گاو داری ها رخ می دهد و آلل γ عامل بیماریزای *tir* با *E. coli* O157: H7 مرتبط بوده که بطور متداول در گاوداری ها و فرآورده های لبنی آنها شناسایی شد (۱۱). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۲ توسط Galline و همکارانش با استفاده از روش مولکولی PCR انجام شد نیز مشخص گردید که سویه های جدا شده از نمونه های گوشت گاوها و خوکها دارای ژنهای مارکر بیماریزایی *ebly, tir, eaeA* بودند. این ژنهای مارکر بیماریزایی در بیماری ایجاد شده توسط STEC برای انسان بسیار مهم اند و به همین دلیل است که سویه های STEC متعلق به گروه سرولوژیکیO157 خطری بالقوه برای سلامتی انسان می باشند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که گاوها و خوکها ممکن است منابع بالقوه بیماریزایی از سویه های *E. coli* O157 برای انسان باشند. نتایج حاصل از مطالعه آنها نشان داد که در بین سالاد ها و ساندویچ های سرد آماده مصرف مورد آزمایش، نمونه های سالاد بیشترین آلودگی باکتریایی را داشتند. بیشترین آلودگی در سالاد های فست فود هایی مشاهده شد که به علت داشتن مشتری زیاد، مواد اولیه مورد نیاز برای تهیه انواع سالاد ها را از ساعت ها پیش تهیه می کردند که احتمال آلودگی آنها را افزایش می داد (۱۲). طبق نظر متخصصان بهداشت مواد غذایی، چنانچه فاصله بین تهیه و مصرف غذا و سالاد بیش از ۲ ساعت به طول بیانجامد، خطر آلودگی آن افزایش می یابد. آلودگی بالای نمونه های سالاد به باکتری *اشریشیا کلی*، زنگ خطر جدی برای مسئولان بهداشتی محسوب می شود. یکی از مهمترین مسائل کنترل آلودگی میکروبی در مواد غذایی، اجرای سیستم HACCP (تجزیه وتحلیل خطر و کنترل نقاط بحران) در ارتقا وضعیت بهداشتی رستوران ها و فست فود ها می باشد، به طوری که در بسیاری از مطالعات صورت گرفته، کنترل و نظارت منظم و اجرای این سیستم در آموزش کارکنان شاغل در رستوران ها و فست فود ها به ویژه رستوران ها و سرویس های غذایی مراکز زندگی گروهی مانند مدارس و دانشگاه ها تاکید نموده اند (۱۳). لذا بدون تردید یکی از مهمترین راه کارها برای بهبود کیفیت بهداشتی به ویژه در رستوران ها و فست فودهایی که مشتریان زیادی دارند، اجرای سیستم HACCP می باشد که با بهره گیری از نظرات متخصصین صنایع غذایی، کنترل کیفیت و بهداشت مواد غذایی قابل انجام است. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر، تنها ساندویچ های سرد و سالادهای آماده مصرف مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند و نظر به اینکه آلودگی مواد غذایی مصرفی با آلودگی کارکنان شاغل، محیط فست فود ها، ظروف مورد استفاده و برخی موارد دیگر ارتباط مستقیم دارد، لذا انجام مطالعات بیشتر و تعیین وضعیت بهداشتی آنها در فست فود های مورد بررسی به منظور تعیین منشا آلودگی و کنترل آنها کاملا لازم و ضروری است. در مجموع، مطالعات انجام شده در کشور نشان می دهد کیفیت باکتریولوژیکی سالاد های آماده مصرف در فست فود ها و رستوران ها مطلوب نیست و موازین بهداشتی به ویژه بهداشت فردی و محیط در آشپزخانه ها و کارکنان فست فود ها و رستوران ها چندان رعایت نمی گردد. با توجه به نتایج بدست آمده، برای جلوگیری از آلودگی میکروبی مواد غذایی و سالاد ها، آموزش افراد، رعایت اصول بهداشتی و نظارت در آماده سازی، نگهداری، حمل و نقل و عرضه مواد غذایی ضروری می باشد (۱۰).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که با استفاده از روش PCR مستقیم می توان ژن *tir* را در مواد غذایی سرد که در سالادها و ساندویچ های سرد به کار می روند در مدت زمان کمتری ۲۴ ساعت نسبت به کشت نمونه ها در محیط های افتراقی و انجام آزمایشات بیوشیمیایی شناسایی کرد. وجود ژن *tir*، در نمونه جمع آوری شده، نشان دهنده بیماریزا بودن باکتری *اشریشیا کلی* است. بنابراین، شناسایی سریع این ژن از طریق روش مولکولی PCR مستقیم می تواند باکتری *اشریشیا کلی* بیماریزا را متمایز کند.

REFERENCES

1-Kaper J.B., Nataro J.P., and Mobley H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2:123–140
2-Wolfram T, MS, RDN, LDN. 2017. Most common food borne pathogens. Eat right. Academy of nutrition and dietetics. http://www. eat right.org/ resource/home food safety.
3- Bekal S, Brousseau, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J and Harel J. 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. Journal of Clinical Microbiology, May, p. 2113–2125.
4-Kenny B. and Finlay B.B. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase c-gamma-1. Infect Immun 65: 2528- 2536
5-Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D.J., Frey E.A., and Finlay B.B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 91: 511-520
6- Zhang X.H, Qing Y, Ya-dong L, Bin L, Renata I and Kong-wang H. 2013. Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens. Journal of Medical
Microbiology, 62, 1665–1672.
7-Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of enterococcus spp. Isolated from brazilian foods. Food microbiology. 2008; 25(5): 668-675.
8-Meldrum RJ, Little CL, Sagoo S, Mithani V. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take- away restaurants in the united kingdom. Food Microbiol. 2009;26(6): 573-7.
9-Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. Microbiological quality of open ready- to- eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. J Food Prot. 2003; 66(9): 1581-6.
10- Tavakoli HR, Farhang K, Karimi Zarchi A, Heydari E. Bacteriological quality of ready to eat food in four military restaurants. Iranian Journal of Military Medicine. Vol. 13, No. 4, Winter 2012, Pages: 207-212.
11- Lambertini E, Karns J.S, Van Kessel J, Cao H, SchukkenY.H, Wolfgang D.R, Smith J.M, Pradhana A.K. July 2015. Dynamics of *Escherichia coli* virulence factors in dairy herds and farm environments in a longitudinal study in the united states. American society for microbiology. Applied and Environmental, Volume 81 Number 13
12- Gallien P., Osek J. 2002. Molecular analysis of *Escherichia coli* O157 strains isolated from cattle and pigs by the use of PCR and pulsed-field gel electrophoresis methods. Vet. Med. – Czech, 47, (6): 149–158.
13-Tavakoli HR, Riazipour M. Microbial quality of cooked meat foods in tehran university، s restaurants. Pak J Med Sci. 2008; 24(4): 595-9.