مقاله پژوهشی

بررسی سبزیجات مناطق مختلف شیراز و آب استفاده‌شده برای آبیاری آن‌ها ازنظر آلودگی به باکتری‌های مولد بیماری‌های منتقله از آب و غذا در تابستان ۹۵

مانلی امین شهیدی، فرشته فانی*، نسرین فیروزیان، نورالدین رفعت پور

مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: ازآنجایی‌که بخشی از سبزیجات به‌صورت خام وارد برنامه غذایی ما می‌شوند لذا کیفیت میکروبی آن‌ها ازنظر باکتری‌های شاخص در ایجاد بیماری‌های گوارشی از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف ما از این مطالعه بررسی آلودگی سبزیجات مناطق مختلف شهر شیراز و همچنین آب‌های به‌کاررفته جهت آبیاری همان مناطق ازلحاظ کلی فرم‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از سه نوع سبزی خوراکی ریحان، تره و خرفه از نه منطقه مختلف همراه با منابع آبی آبیاری آن‌ها در شهر شیراز به عمل آمد. برای شناسایی کلی فرم‌ها و عوامل بیماری‌زای گوارشی از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. تشخیص انواع پاتوتیپ‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی با استفاده از تست‌های مولکولی انجام شد. روش دیسک دیفیوژن برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده گردید.

نتایج: به ترتیب ۴۰، ۶۰، ۳۳/۵، ۳۳/۵، ۲۸/۵، ۵۰، ۵۰، ۶۰ و نهایتا ۱۶/۵درصد همپوشانی بین جنس‌های جداشده از نمونه آب چاه برای هر یک از ۹ منطقه کشت با جنس‌های جداشده از سبزیجات همان مناطق به دست آمد. باکتری‌های بیماری‌زای جداشده شامل انتروهموراژیک اشریشیاکلی از دو نمونه خرفه و آئروموناس هیدروفیلیا از آب چاه بود. هر سه جدایه به بتالاکتامازهای وسیع الطیف حساس بودند.

نتیجه‌گیری: کیفیت آلودگی میکروبی آب‌های بکار رفته جهت آبیاری سبزیجات خام بر بهداشت آن‌ها به‌عنوان انتقال‌دهنده‌های بیماری‌های عفونی گوارشی اثر گذاشته که گویای نقش ارزشمند کنترل کیفی این منابع در جلوگیری از رخداد طغیان‌های عفونی و سلامت جامعه است.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، کلی فرم، آب، سبزیجات، آلودگی باکتریایی

مقدمه

نقش سبزیجات خام در تغذیه و سلامت به‌عنوان منابع تأمین‌کننده املاح و ویتامین‌های ضروری و همچنین منابعی سرشار از فیبر مهم شناخته شده است. گواه این موضوع را می‌توان در توصیه سازمان‌های بهداشت جهانی(WHO) و غذا و دارو (FDA) به مصرف روزانه ۵ الی ۹ واحد میوه و سبزیجات در رژیم غذایی روزانه مشاهده کرد (۱). ازآنجایی‌که سبزیجات عمدتاً به‌صورت مستقیم و خام وارد برنامه غذایی ما می‌شوند لذا کیفیت میکروبی آن‌ها پیش و یا پس از برداشت محصول و یا به عبارتی حضور یا عدم حضور باکتری‌های شاخص در ایجاد بیماری‌های گوارشی از اهمیت خاصی برخوردار است (۲).

این گروه از باکتری‌ها با داشتن منشأهای متفاوت انسانی یا دامی می‌توانند از راه‌های مختلف همچون از راه خاک و کودهای به‌کاررفته در زمین کشت، آب مورداستفاده جهت آبیاری و یا در حین برداشت از طریق عوامل مداخله‌گر در برداشت به سبزیجات انتقال یابند (۳). بنابراین کیفیت آب مورداستفاده جهت آبیاری می‌تواند به‌شدت بر محتوای میکروبی میوه و سبزیجات تازه آماده مصرف اثرگذار باشد (۴، ۵). در این میان شاخص آلودگی آب‌ها با فضولات انسانی و دامی بر پایه محتوای میکروبی آن‌ها ازنظر

*نویسنده مسئول: **فرشته فانی**، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
Email: fe_fani@sums.ac.ir

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

کمیت و کیفیت کلی فرم‌های احتمالی موجود سنجیده می‌شوند (۳).

وجود گزارش‌های متعدد از رخداد بیماری‌های التهابی و عفونی گوارشی به‌واسطه مصرف سبزیجات آلوده آماده مصرف در نواحی مختلف جهان مؤکد نقش پررنگ کنترل و نظارت بر کیفیت آب‌های مورداستفاده جهت آبیاری است (۴). از عمده گزارش‌های طغیان‌های عفونی _گوارشی مرتبط با مصرف سبزیجات خام می‌توان به چندین طغیان درنتیجه مصرف کاهو، اسفناج، جوانه آلفا آلفا و.... در نقاط مختلف جهان اشاره کرد (۶). به‌عنوان‌مثال گزارش‌هایی از بروز یک طغیان اسهال درنتیجه ابتلا به اشریشیاکلی O157:H7 در میشیگان و کلرادو آمریکا در سال ۱۹۹۷ و دیگری در ایالت مینه سوتا کلرادو آمریکا در سال ۲۰۰۳ منتشر شده است که در هر دو همه‌گیری علت ابتلا مصرف جوانه‌های سبز آلفا آلفا به‌کاررفته در تهیه سالاد بود (۷، ۸). همه‌گیری وسیع دیگری در ایالت متحده آمریکا با اشریشیاکلی O157:H7 در سال ۲۰۰۶ درنتیجه مصرف برگ اسفناج آلوده گزارش گردیده که منجر به عفونت ادراری خونریزی دهنده و نهایتاً مرگ‌ومیر در کودکان آلوده گردید (۹). جدایه‌ای از اشریشیاکلی مولد وروتوتکسین VTEC(Vero toxigenic *E.coli*) دارای ژن *stx2* در سال ۲۰۰۵ در کشور سوئد باعث بروز همه‌گیری اسهال شد که علت آن مصرف کاهوهای محلی آلوده تشخیص داده شد (۱۰). همچنین در سال ۲۰۱۱ در آمریکا همه‌گیری اسهال وسیع دیگری ناشی از اشریشیاکلی O157:H7 به وقوع پیوست که علت آن مصرف کاهوهای رومی آلوده به شیگا توکسین گزارش گردید (۱۱).

عمده عوامل باکتریایی گزارش‌شده در رخدادهای عفونت‌های گوارشی به‌واسطه گونه‌های سالمونلا، شیگلا و تیپ‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی ایجادکننده اسهال، کمپیلوباکتر، لیستریا مونوسایتوژنز و یرسینیا انترو کولیتیکا می‌باشند (۵). در این گزارش‌ها علت آلودگی، مصرف سبزیجات خام و سالادها و یا مصرف غذاهایی است که حداقل فرایند پخت بر آن‌ها اعمال‌شده است (۱۲). البته در کنار این علت، عللی همچون تغییرات فلور طبیعی روده‌ای در افراد تازه‌وارد و غیربومی به مناطق جدید ذکرشده است که غالباً به‌عنوان اسهال مسافرتی از آن نام‌برده می‌شود (۶).

هدف از این بررسی ارائه گزارشی از تنوع کلی فرم‌ها و احتمال حضور عوامل باکتریایی بیماری‌زا گوارشی در سبزیجات کشت داده‌شده در مناطق مختلف شهر شیراز است و به‌موازات آن وجود کلی فرم‌ها در آب‌های به‌کاررفته جهت آبیاری همان مناطق ازلحاظ وجود و تشخیص نوع کلی فرم بررسی گردیده است.

مواد و روش ها

۱- نمونه‌گیری

از سه نوع سبزی‌خوردن شامل ریحان، تره و خرفه از نه منطقه اصلی سبزی‌کاری در شهر شیراز نمونه‌گیری به عمل آمد. به میزان یک کیلوگرم از هر نمونه برداشت گردید. پس از جدا کردن خاک و بخش‌های اضافی، نمونه‌ها به کیسه‌های زیپ‌دار استریل منتقل گردیدند. جهت انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه از کیسه‌های یخ به‌منظور حفظ دما، در دمای حدود یخچال استفاده شد. زمان، مکان نمونه‌گیری به همراه مختصات جغرافیایی آن و نوع نمونه بر روی هر یک از نمونه‌ها درج گردید. همچنین از آب چاه‌های مورداستفاده جهت آبیاری زمین‌های زیر کشت نمونه‌گیری به عمل آمد. حجم یک لیتر از هر نمونه آب چاه در فلاکس‌های استریل جمع‌آوری و پس از برچسب‌گذاری در دمای یخچال به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-کشت و تشخیص به کمک تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی

از هر نمونه سبزی به‌صورت جداگانه ۱۰۰ گرم به‌صورت چهار نمونه ۲۵ گرمی با استفاده از تخته و چاقو استریل جدا گردید. نمونه‌ها به داخل کیسه‌های دیالیز استریل منتقل شدند. هر نمونه به نسبت ۱ به ۱۰ با فسفات بافر سرم ۱x مخلوط گردیده و با دستگاه (Stomacher 400 Seward limited, UK) به مدت ۲ دقیقه خرد و مخلوط شدند.

محتوای درون کیسه‌ها به لوله‌های فالکون استریل منتقل شدند سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۴۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مجموع رسوب‌های به دست آمده در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته حل و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها بر روی محیط‌های کشت هکتون انتریک آگار به‌منظور جداسازی گونه‌های شیگلا و مک کانکی آگار جهت جداسازی کلنی‌های رشد یافته کلی فرم‌ها و زایلوز لایزین داکسی کولات جهت جداسازی کلنی گونه‌های سالمونلا کشت داده شدند. همان میزان از نمونه نیز به لوله‌های حاوی جی- ان برات و پریستون برات منتقل گردیدند. به‌استثنای پریستون برات که در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در شرایط

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده‌شده جهت تشخیص تیپ‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی

پاتوتیپ های اشریشیا کولی	*نام منطقه ژنی*	توالی	اندازه(جفت باز) (مقاله مرجع)	دمای Annealing
ETEC	*lt*	F:GGCGACAGATTATACCGTGC R:CGGTCTCTATATTCCCTGTT	۴۵۰ (۱۵)	۵۰
	st	F:ATTTTTCTTTCTGTATTGTCTT R:CCGGTACAAGCAGGATTACA	۱۹۰ (۱۵)	۵۰
EPEC	*eae*A	F:GACCCGGCACAAGCATAAGC R:CCACCTGCAGCAACAAGAGG	۳۸۴ (۱۵)	۵۵
	bfp	F:AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC R:GCCGCTTTATCCAACCTGGTAAG	۳۲۶ (۱۵)	۵۵
EHEC	*stx1*	F:TTCAGCAAGTGCGCTGGCGA R:CGCTGAATCCCCCTCCATTA	۲۱۲ (۱۵)	۵۰
	stx2	F:GGCGCGTTTTGACCATCTTCG R:GATGATGGCAATTCAGTATAACG	۵۱۸ (۱۵)	۵۰
EIEC	*vir*F	F:AGCTCAGGCAATGAAACTTTGAC R:TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	۶۱۸ (۱۵)	۵۵
	*ipa*H	F:ATGCGAGAAATTAATATGCTCAG R:GAATAGCAGAGTTTGATCTGATAAG	۷۸۶ (۱۵)	۵۵
EAEC	*agg*	F:GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	۲۵۴ (۱۵)	۵۰
	aap	F:GGCATCTTGGGTATCAGCCTG R:CCCATTCGGTTAGAGCACTATATT	۳۱۳ (۱۵)	۵۵

تیپ‌های مختلف اشریشیاکلی بیماری‌زا شامل انترو توکسیژنیک (ETEC) و انتروپاتوژنیک (EPEC) و انتروهموراژیک (EHEC) و انترواینویزیو (EIEC) و انترو اگریگیتیو (EAEC) است و پرایمرهای بکار رفته جهت تشخیص مناطق ژنی مرتبط با بیماری‌زایی آن‌ها برحسب توالی و اندازه قطعه رونویسی شده برحسب تعداد جفت باز و دمای Annealing برحسب سانتی‌گراد نمایش داده شده است.

میکرو آئروفیل به مدت ۲۴ ساعت جهت جداسازی کمپیلوباکترهای احتمالی گرما گذاری گردیدند، بقیه محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از زمان یادشده مجدداً از محیط جی- ان برات بر روی محیط‌های هکتون انتریک آگار و زایلوز لایزین داکسی کولات آگار کشت داده شد و مانند مرحله قبل گرما گذاری انجام شد. کلیه کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط‌های کشت جامد ازنظر سالمونلا و شیگلا و سایر کلی فرم‌های مولد اسهال موردبررسی واقع شدند.

به‌موازات مراحل ذکرشده، پس از گرما گذاری اولیه پریستون برات، کشت مجدد جهت جداسازی کمپیلو باکتر بر روی اسکیرو آگار به عمل آمد. این پلیت‌ها نیز مانند مرحله قبل در شرایط میکروآئروفیل و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند.

از تمامی کلنی‌های رشد یافته رنگ‌آمیزی گرم به‌عمل‌آمده و تشخیص اولیه با کمک تست‌های تشخیصی کاتالاز و اکسیداز و ایم ویک (IMViC) انجام‌شده و تشخیص نهایی گونه متعاقباً توسط کیت‌های تشخیصی 20 E api biomeriux(France) تائید گردید. جهت تشخیص کمپیلوباکتر، از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت اسکیرو آگار تست‌های کاتالاز و اکسیداز و رنگ‌آمیزی به روش گرم تغییریافته به عمل آمد، بدین ترتیب که به‌جای سافرانین از کربول فوشین رقیق‌شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد (۱۳).

جهت کشت نمونه آب‌های جمع‌آوری‌شده از روش فیلتراسیون استفاده گردید. بدین منظور که از قیف خلا سه‌شاخه (Sartorius, Germany) و با کمک فیلترهای میلی پور از جنس استات سلولز استریل باضخامت منفذ ۴۵ صدم میکرومتر با اندازه

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

قطر متناسب با هولدر دستگاه جهت فیلتراسیون هر نمونه آب استفاده شد. لازم به ذکر است که در فاصله هر نمونه به نمونه بعدی جهت ممانعت از هرگونه رخداد آلودگی متقاطع سطح داخلی محفظه‌ها در فور و دردمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت استریل شده و خروجی دستگاه نیز به کمک مواد ضدعفونی‌کننده قوی سترون گردیدند. پس از فیلتراسیون، به کمک پنس استریل فیلتر را برداشته و رسوب جمع‌آوری‌شده بر سطح فیلتر را کاملاً با فسفات بافر سرم ۱X در شرایط کاملاً استریل شستشو داده شد. محلول به‌دست‌آمده در لوله فالکون استریل جمع‌آوری و کدگذاری گردید. از این مرحله به بعد مشابه پروتکل نمونه‌های سبزی، مراحل کشت و تشخیص انجام گرفت (۱۴).

۳-روش مولکولی

جدایه‌های اشریشیاکلی جهت تشخیص تیپ‌های بیماری‌زا ایجادکننده اسهال که شامل:

انترواگریگیتیو اشریشیاکلی (EAEC)، انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (EPEC)، انتروهموراژیک اشریشیاکلی (EHEC)، انترواینویزیو اشریشیاکلی (EIEC) و انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی (ETEC) می‌باشند موردبررسی مولکولی قرار گرفتند. توالی پرایمرهای به‌کاررفته در این تحقیق به شرح جدول ۱ است. بر روی هر یک از جدایه‌ها با کمک کیت استخراج Nucleospin Tissue (Germany, Macherey-Nagel) استخراج ژنوم صورت گرفت. پس از اطمینان از مناسب بودن کیفیت و غلظت دی ان آ به کمک دستگاه نانودراپ (Nano drop, nd1000, USA) هرکدام از ژنوم‌های استخراج‌شده با روش پی سی آر به ترتیب ازنظر ژن‌های زیر موردبررسی واقع شدند (۱۵). ژن‌های *agg, att, aap* برای تشخیص تیپ‌های انترو اگریگیتیو اشریشیاکلی (EAEC)، ژن‌های *stx1,stx2* جهت تشخیص تیپ‌های انترو هموراژیک اشریشیاکلی (EHEC) ژن‌های *ipa*H *vir* F، برای تشخیص تیپ‌های انترو اینویزیو اشریشیاکلی (EIEC)، ژن‌های *bfp* ،*eae*A برای تشخیص تیپ‌های انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (EPEC) و نهایتاً ژن‌های *elt, est* برای تشخیص تیپ‌های انترو توکسیژنیک (ETEC) (۱۶).

۴-تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیک

در صورت قرار گرفتن جدایه‌ها در هرکدام از گروه‌های پاتوتایپ اشریشیاکلی و یا در صورت بیماری‌زا بودن گونه کلی فرم جداشده، برای آنان تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از قرص‌های آنتی‌بیوتیک (Rosco, Denmark) به روش دیسک دیفیوژن برای هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰µ)، سفالوتین (۳۰µ)، سفازولین (۳۰µ)، داکسی سیلین (۳۰µ)، سفوتاکسیم (۳۰µ)، سفتازیدیم (۳۰µ)، سفتریاکسون (۳۰µ)، سفکسیم (۵µ)، سفوراکسیم (۳۰µ)، سفپیم (۳۰µ)، سیپروفلوکساسین (۵µ)، کو تریموکسازول (۲۵µ)، جنتامیسین (۱۰µ)، آمیکاسین (۳۰µ)، تازوسین (۱۱۰µ) و مروپنم (۱۰µ) روی محیط کشت مولر آگار (Merck, Germany) انجام شد (۱۷).

نتایج

تشخیص نهایی بر روی کلیه جدایه‌های باکتریایی از سه دسته سبزیجات خرفه، ریحان و تره در کنار تمامی جدایه‌های باکتریایی از نمونه‌های آب چاه که جهت آبیاری برای هر منطقه مورداستفاده واقع می‌شدند به تفکیک نه منطقه زیر کشت در شهر شیراز (این مناطق هیچ‌گونه ارتباطی با تقسیمات مناطق شهری نداشته و صرفاً جهت معرفی هستند) در جدول ۲ آورده شده است.

هرچند تشخیص نهایی به کمک کیت api 20 E که اختصاصاً برای انتروباکتریاسه‌ها طراحی‌شده است تا سطح گونه صورت گرفته، اما همچنان برای افتراق دقیق‌تر دو گونه گاهاً برای برخی از جنس‌ها خصوصاً جنس‌های باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده (non fermentative gram negative bacilli) نیاز به انجام تست‌های تشخیصی بیشتر است، لذا نهایتاً جهت همگن کردن نتایج جدایه‌ها برای جنس‌هایی که شامل گونه‌های متنوع تشخیص داده‌شده بودند نتیجه به‌صورت نام جنس باکتری و برای جدایه‌های خاص و کمتر شایع، تشخیص در حد گونه گزارش گردید.

نتایج ارائه‌شده در جدول دو به ترتیب ۴۰، ۶۰، ۳۳/۵، ۳۳/۵، ۲۸/۵، ۵۰، ۵۰، ۶۰ و نهایتا ۱۶/۵درصد احتمال همپوشانی بین جنس‌های جداشده از نمونه آب چاه برای هر یک از ۹ منطقه کشت سبزیجات با جنس‌های جداشده از سبزیجات همان مناطق است.

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌کنید از کلیه نمونه‌های سبزیجات بررسی‌شده مجموع ده جنس مختلف جدا گردید و درمجموع یازده جنس کلی فرم از کل نمونه‌های، آب چاه‌های بکار رفته جهت آبیاری زمین‌های سبزی‌کاری، جدا گردید که یکی از جدایه‌ها گونه آئروموناس هیدروفیلیا است این باکتری از

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

آب آبیاری در منطقه هفت جدا گردید و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیر را نمایش می‌داد.

جدایه آئروموموناس هیدروفیلیا نسبت به آمپی‌سیلین، سفالوتین، سفازولین، داکسی سیلین و تتراسیلین مقاوم و به سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفکسیم، سفوراکسیم، سفپیم، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، جنتامیسین، آمیکاسین، تازوسین و مروپنم حساس بودند.

گونه‌های میرابیلیس، ولگاریس و جنس سیتروباکتر دربرگیرنده گونه‌های فروندی، فارمری و یونگایی بودند. تمام جدایه‌های پانتوا از گونه ۴ پانتوا و تمام جدایه‌های پرووِیدنشیا از گونه رتجری شناسایی شدند.

هیچ‌گونه‌ای از جنس شیگلا و سالمونلا و در شرایط میکروائروفیل از جنس کمپیلوباکتر چه از سبزیجات و چه از آب‌ها جدا نگردید.

جدول ۲- آلودگی باکتریایی نمونه‌های سبزیجات و آب چاه استفاده‌شده برای آبیاری سبزیجات از ۹ منطقه مختلف شهر شیراز همراه با مختصات جغرافیایی هر منطقه

منطقه مختصات جغرافیائی	منبع نمونه‌گیری	
	آب چاه	سبزیجات (خرفه- ریحان- تره)
یک ۲۹,۶۰۰۷۶۱،۵۲,۵۶۶۶۷۲	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس انتروباکتر، جنس سیتروباکتر
دو ۲۹,۵۵۴۳۹۷،۵۲,۶۰۹۶۱۸	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس سیتروباکتر وجنس کلبسیلا	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس پانتوآ
سه ۲۹,۵۶۸۰۶۸،۵۲,۵۷۸۱۲۹	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس سیتروباکتر و گونه اشریشیا هرمانی	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس اسینتوباکتر، جنس انتروباکتر، جنس پرووِیدنشیا، اشریشیا کولی تولید کننده شیگا توکسین
چهار ۲۹,۵۷۱۲۸۹،۵۲۵۰۳۹۷۱	جنس پروتئوس، جنس کلبسیلا، جنس انتروباکتر، گونه مورگانلا مورگانی	جنس پروتئوس، جنس کلبسیلا، جنس انتروباکتر، جنس سودوموناس، جنس سیتروباکتر، جنس اسینتو باکتر، جنس پانتوآ، جنس پرووِیدنشیا
پنج ۲۹,۶۰۷۳۳۲،۵۲,۴۵۵۰۹۸	جنس سودوموناس، جنس پانتوآ، جنس پروتئوس، جنس اسینتو باکتر، گونه مورگانلا مورگانی	جنس سودوموناس، جنس پانتوآ، جنس سیترو باکتر، جنس کلبسیلا،
شش ۲۹,۵۸۲۱۳۷،۵۲,۶۳۸۱۷۶	جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس پانتوآ	جنس سودوموناس، جنس کلبسیلا، جنس سیترو باکتر، جنس انترو باکتر، جنس اسینتو باکترو جنس پانتوا
هفت ۲۹,۵۸۳۲۳۶،۵۲,۶۵۰۵۰۷	جنس سودوموناس، جنس اسینتوباکتر، جنس گونه لکلرسیا ادکربوکسیلات، گونه آئروموناس هیدروفیلا	جنس سودوموناس، جنس اسینتوباکتر، گونه لکلرسیا ادکربوکسیلات، جنس کلبسیلا، جنس پانتوآ
هشت ۲۹,۵۷۱۳۴۵،۵۲,۶۱۵۹۲۰	جنس پروتئوس، جنس کلبسیلا، جنس سیتروباکتر، جنس پانتوآ	جنس پروتئوس، جنس کلبسیلا، جنس سیتروباکتر، جنس سودوموناس
نه ۲۹,۵۹۲۷۷۷،۵۲,۶۰۷۷۹۱	جنس پروتئوس	جنس پروتئوس، جنس سودوموناس، جنس سیتروباکتر، جنس کلبسیلا، جنس پانتوآ، اشریشیا کولی تولید کننده شیگا توکسین

شناسایی باکتری‌ها در حد جنس انجام شده است. نام باکتری‌هایی که به‌صورت پررنگ آورده شده است در نمونه‌های سبزیجات و آب چاه آن منطقه مشترک هستند. از سبزیجات منطقه ۳ و ۹ باکتری اشریشیاکلی جدا شده است که جزو گروه پاتوژن اشریشیاکلی در گروه تولیدکننده شیگا توکسین (انترو هموراژیک) قرار گرفته‌اند و از آب چاه منطقه هفت، باکتری آئروموناس هیدروفیلیا شناسایی گردیده که زیر آن‌ها خط کشیده شده است).

در میان جدایه‌های آب و سبزیجات، گونه‌های جنس انتروباکتر عمدتاً شامل گونه ساکازاکی و کلواکه؛ گونه‌های کلبسیلا شامل اکسی توکا و پنومونیه و جنس پروتئوس شامل هر دو مورد اشریشیاکلی جداشده، از سبزیجات منطقه ۳ و ۹ و از سبزی خرفه جداشده بودند و ازلحاظ کلیه ژن‌های بیماری‌زا دخیل در ایجاد گاستروانتریت به‌غیراز *stx2* مابقی منفی بودند.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

شکل ۱ نشان‌دهنده جداسازی و شناسایی ژن *stx2* به طول ۵۱۸ جفت باز از جدایه‌های اشریشیاکلی از دو نمونه سبزی خرفه مربوط به مناطق ۳ و ۹ است. تشخیص ژن *stx2* در دو جدایه اشریشیا منجر به قرار دادن آن‌ها در گروه انترو توکسیژنیک‌ها می‌گردد.



شکل ۱- نتیجه مثبت تست پی سی آر برای شناسایی قطعه ژن *stx2* ستون یک ladder 100bp و ستون دو و سه نمایش قطعه ۵۱۸ جفت بازی ژن *stx2*از جدایه‌های اشریشیا کلی جداشده از نمونه‌های خرفه از مناطق نمونه گیری به ترتیب ۳ و ۲.

نتیجه آزمایش تعیین حساسیت در هر دو جدایه اشریشیاکلی حاکی از جداسازی دو سویه ESBLs منفی است که با تابلوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیر نمایش داده شده‌اند. جدایه اول نسبت به کلیه گروه‌های بتالاکتام چه پنیسیلین‌ها همچون آمپی‌سیلین و چه سفالوسپورین‌های نسل اول همچون سفالوتین، سفالکسین و سفازولین و نسل سوم مانند سفکسیم، سفوراکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون و سفالوسپورین نسل جدید مانند سفپیم و آمینو گلیکوزیدها مانند آمیکاسین و جنتامیسین و کوئینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین و ماکرولیدها همچون آزیترومایسین و نهایتاً پنم‌ها همچون ایمی پنم و مروپنم و تتراسیکلین‌هائی مانند داکسی سیلین و همچنین کو تری موکسازول حساس بود. در جدایه دوم اندکی اختلاف در مقاومت میکروبی مشاهده می‌گردید بدین شکل که نسبت به سفالوتین مقاوم و نسبت به آمپی‌سیلین و کواموکسی کلاو مقاومت حد واسط دیده می‌شد و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر که در بالا از آن‌ها نام‌برده شد حساس بودند.

بحث و نتیجه گیری

امروزه در کشورهای درحال‌توسعه عمده سیاست‌های بهداشتی و درمانی بر پایه و اساس اولویت‌گذاری برنامه‌های پیشگیرانه قبل از ارائه درمان است. این امر نه‌تنها در عرصه اقتصادی منجر به تحمیل هزینه‌های کمتری بر دولت می‌گردد بلکه می‌تواند در جلوگیری از بروز طغیان‌های عفونی احتمالی نقش داشته باشد و درنتیجه در هنگام مواجهه با چنین رخدادهایی سرعت و توان اقدامات درمانی و نهایتاً کیفیت درمان بهبود بخشیده خواهد شد. در ایالات‌متحده آمریکا خسارت اقتصادی ناشی از ابتلا به بیماری‌های عفونی منتقله از راه آب و غذا در مورد عفونت‌های غیر تیفوئیدال سالمونلا و اشریشیاکلی تیپ O157:H7 به ترتیب ۴/۴ میلیارد و ۶۰۷ میلیون دلار تخمین زده شده است (۱۸).

در مقوله طغیان‌های گوارشی که معمولاً با التهاب معده‌ای – روده‌ای همراه هستند با این دیدگاه که بیشترین راه انتقال عفونت‌های فوق از راه مدفوعی-دهانی هستند، اهمیت نظارت بر سلامت مواد غذایی خصوصاً آن‌هایی که کمتر دست‌کاری می‌شوند و یا کاملاً خام وارد برنامه غذایی ما می‌شوند چشمگیرتر خواهد بود. در این گروه عمدتاً سبزیجات و صیفی‌جات خوراکی و سالادها قرار می‌گیرند (۵).

با توجه به اهمیت و نقش کیفیت آب بکار رفته در آبیاری و خطر هرگونه آلودگی احتمالی به فاضلاب و یا فضولات دامی و انسانی به‌عنوان عوامل بالقوه در ایجاد طغیان‌های گاستروانتریت احتمالی (۶)، هدف ما از این بررسی تشخیص و بررسی باکتری‌های کلی فرم جداشده از سبزیجات به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی سبزیجات و آب‌های چاه مرتبط با آبیاری همان مناطق است.

بنا به تعریف کلی فرم‌ها گروهی از باسیل‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور هستند که در حضور دو درصد بایل رشد کرده و قادر به تخمیر قند لاکتوز و تولید گاز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۴۸ ساعت می‌باشند این دسته از باکتری‌ها از روده انسان و پستانداران جدا می‌گردند (۱۹). با توجه به نتایج و درصدهای بالای همپوشانی بین جنس‌های جداشده از آب چاه هر منطقه با جنس‌های شناسایی‌شده در سبزیجات هر منطقه می‌توان اهمیت و نقش اثرگذاری محتوای

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

میکروبی آب بر بار میکروبی سبزیجات زیر کشت با همان منابع آبی را متوجه شد هرچند که اثبات قطعی این مدعا تنها با تایپینگ جدایه‌ها مقدور است.

نکته دیگر این‌که تنها جداسازی کلی فرم، به معنای بیماری‌زا بودن آن جدایه تلقی نشده و دراین‌بین برخی از جدایه‌ها به‌عنوان عوامل اضطراری پرخطر از اهمیت بسیار زیادتری در گزارش دهی برخوردار هستند (۲۰).

نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق Falomir و همکاران بر روی سبزیجات تازه ازنظر تنوع انواع کلی فرم‌ها با تنوع نتایج ما نزدیک بود هرچند که آنان بیشترین جدایه‌ها را در جنس کلبسیلا و انتروباکتر داشتند و تنها چهار جدایه اشریشیاکلی از کاهو و گوجه‌فرنگی را گزارش کردند که هیچ‌یک از انواع پاتوتایپ مولد عفونت گوارشی نبودند. آنان همانند ما جدایه‌ای از جنس سالمونلا و شیگلا گزارش نکردند (۲۱). Soriano و همکاران (۲۰۰۰) و Weldezgina و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقات خود هیچ‌گونه گزارشی دال بر جداسازی شیگلا نداشتند (۲۲، ۲۳). درحالی‌که Guchi و همکاران (۲۰۱۰) گونه‌های شیگلا را از کاهو و فلفل سبز شناسایی کردند (۲۴).

در سال ۲۰۰۱ Viswanathan و همکاران از نمونه‌های مختلف سبزیجات و سالادها و جوانه‌ها، انواع کلی فرم‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا را شناسایی و بر فراوانی آن‌ها بررسی جامعی انجام دادند آنان موفق به جداسازی کلی فرم‌ها و پاتوژن‌های بیشتر و متنوع‌تری نسبت به ما شدند که شامل بر انتروباکتر، کلبسیلا، اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی، سراشیا، سودوموناس، یرسینیا انتروکولیتیکا، لیستریا مونوسایتوژنز و آئروموناس هیدروفیلیا بودند (۲۵) . بررسی کوچک‌تری در سال ۲۰۱۵ توسط kumar kunda و Islam بر روی دو نمونه سالاد سبزیجات انجام شد و موفق به جداسازی اشریشیاکلی، شیگلا، کلبسیلا، انتروباکتر و سیتروباکتر گردیدند (۲۶). اما در بررسی ما از میان کلیه جدایه‌ها دو جدایه اشریشیاکلی از نمونه سبزی خرفه از دو منطقه مختلف شناسایی گردیدند که هر دو واجد ژن *stx2* بودند. لذا هر دو جدایه در گروه اشریشیاهای انتروهموراژیک قرارگرفته که از عوامل خطرساز شدید در بهداشت و سلامت مواد غذایی تلقی می‌شوند. این جدایه‌ها از عوامل شایع بروز همه‌گیری‌های گوارشی شناخته‌شده‌اند و در صورت آلودگی در کودکان احتمال ایجاد عفونت ادراری خونریزی دهنده وجود دارد و حتی در موارد عدم‌تشخیص و درمان خطر مرگ وجود خواهد داشت.

رخداد طغیان گاستروانتریت با سویه‌های شیگاتوکسیژنیک اشریشیاکلی در سال ۲۰۱۱ در آلمان منجر به جداسازی جدایه‌هایی با مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به بتالاکاماز های وسیع الطیف (ESBL مثبت) گردید (۲۷). اما نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر دو جدایه ما تا حدودی متفاوت و حاکی از جداسازی دو جدایه ESBLs منفی است. این امر که هیچ‌گونه ردی از این جدایه‌ها در نمونه آب چاه همان منطقه دیده نشد می‌تواند به دلایل مختلف همچون احتمال آلودگی سبزیجات از راه‌هایی به‌غیراز آب همچون از راه خاک و یا دام‌ها و طیور و یا آلودگی توسط کودهایی با منشأ حیوانی و یا سایر عوامل مداخله‌گر باشد.

امروزه بر طبق نظرِ Dascalov برخی از گونه‌های متحرک آئروموناس به‌عنوان عوامل بیماری‌زا بالقوه معرفی شده‌اند که در کودکان و بزرگ‌سالان می‌توانند ایجاد اسهال شدید در کوتاه‌مدت و یا ایجاد مدفوع شل و آبکی در درازمدت به‌صورت مزمن نمایند و از آنان به‌عنوان عوامل خطرساز و جدی در بروز طغیان‌های عفونی گوارشی مرتبط با مصرف مواد غذایی و یا آب آلوده در انسان و برخی از جانوران و آبزیان نام برده می‌شود (۲۸). همچنین این‌گونه به‌عنوان عامل دو درصد از اسهال‌های مسافرتی در مسافرین به کشورهای درحال‌توسعه، آفریقایی و یا آمریکای لاتین شناخته شده است (۲۹). جداسازی یک مورد آئروموناس هیدروفیلیا از نمونه آب چاه قطعاً خطرساز و قابل‌توجه است و با توجه به معرفی کمتر این‌گونه به‌عنوان عامل مولد اسهال و دخیل در بروز طغیان‌های گوارشی همراه با اسهال می‌بایست موردتوجه و دقت بیشتر واقع گردد. نتیجتاً اهمیت نقش آموزش مطابق با استانداردهای به‌روز جهانی جهت ارتقا توان علمی کارشناسان تشخیصی و آزمایشگاهی و درمانی پررنگ‌تر می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بودجه این طرح از محل طرح تصویب‌شده به شماره ۸-۹۴ از طرف مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تأمین‌شده است. از مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی که در انجام این طرح کمال همکاری را داشته‌اند، صمیمانه تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

References

1. Agudo, Antonio & Joint FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health (2004 : Kobe, Japan). (2005). Measuring intake of fruit and vegetables [electronic resource] / Antonio Agudo. Geneva : World Health Organization. http://www.who.int/iris/handle/10665/43144
2. Halablab M, Sheet I, Holail H. Microbiological quality of raw vegetables grown in Bekaa Valley, Lebanon. Am. J. Food Technol. 2011;6(2):129-39.
3. Okafo CN, Umoh VJ, Galadima M. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. Sci. Total Environ. 2003;311(1-3):49-56.
4. Castro-Rosas J, Cerna-Cortés JF, Méndez-Reyes E, Lopez-Hernandez D, Gómez-Aldapa CA, Estrada-Garcia T. 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. Int. J. Food Microbiol. 2012;156(2):176-80.
5. Denis N, Zhang H, Leroux A, Trudel R, Bietlot H. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. Food Control. 2016;67:225-34.
6. Decol LT, Casarin LS, Hessel CT, Batista ACF, Allende A, Tondo EC. Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. Food Microbiol. 2017;65:105-13.
7. Breuer T, Benkel DH, Shapiro RL, Hall WN, Winnett MM, Linn MJ, et al. A multistate outbreak of Escherichia coli O157: H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds .Emerg. Infect. Dis. 2001;7(6):977.
8. Ferguson D, Scheftel J, Cronquist A, Smith K, Woo-Ming A, Anderson E, et al. Temporally distinct Escherichia coli O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source–Colorado and Minnesota ,۲۰۰۳ .Epidemiol. Infect. 2005;133(3):439-47.
9. Arnade C, Calvin L, Kuchler F. Consumer Response to a Food Safety Shock: The 2006 Food-Borne Illness Outbreak of E. coli O157: H7 Linked to Spinach. Applied Economic Perspectives and Policy. 2009;31(4):734-5.٠
10. Söderström A, Österberg P, Lindqvist A, Jönsson B, Lindberg A, Blide Ulander S, et al. A large Escherichia coli O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. Foodborne Pathog. Dis. 2008;5(3):339-49.
11. Slayton RB, Turabelidze G ,Bennett SD, Schwensohn CA, Yaffee AQ, Khan F, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O157: H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011. PLoS One. 2013;8(2):e55300.
12. Beuchat LR, Ryu J-H. Produce handling and processing practices. Emerg. Infect. Dis. 1997;3(4):459.
13. Feroz F, Senjuti JD, Noor R. Determination of microbial growth and survival in salad vegetables through in vitro challenge test. International Journal of Nutrition and Food Sciences. 2013;2(6):312-9.
14. Oshiro R. Method 1604: Total Coliforms and Escherichia coli in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI Medium). [Washington, D.C.]: United States, Environmental Protection Agency, Office of Water 2002. p. 1-18.
15. Pouladfar G, Arasteh-Far A, Aminshahidi M, Firoozian N, Pourabbas B, Moghadami M, et al. Characterization of diarrheagenic E. coli causing a diarrheal outbreak in the south of Iran, Summer 2015. Asian Pac J Tropi Dis. 2017;7(8):491-5.
16. Aminshahidi M, Arastehfar A, Pouladfar G, Arman E, Fani F. Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella with High Rate of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production: Two Predominant Etiological Agents of Acute Diarrhea in Shiraz, Iran. Microb. Drug Resist. 2017;23(8):1037-4.٤
17. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100S.Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. p.1-256.
18. Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. J. Food Prot. 2012;75(1):123-31.
19. Aycicek H, Oguz U, Karci K. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2006;209(2):197-201.
20. Behravesh CB, Williams IT, Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens and problems: expanding prevention efforts before slaughter or harvest. Improving Food Safety Through a One Health Approach. Washington DC: National Academies Press (US); 2012. p. 307-31.
21. falomir MP, Gozalbo D, Rico H. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology.2010. p. 1175-81.
22. Soriano J, Rico H, Moltó J, Manes J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. Int. J. Food Microbiol. 2000;58(1):123-8.
23. Weldezgina D, Muleta D. Bacteriological contaminants of some fresh vegetables irrigated with Awetu River in Jimma Town, Southwestern Ethiopia. Advances in Biology. 2016:1-11.
24. Guchi B, Ashenafi M. Microbial load, prevalence and antibiograms of Salmonella and Shigella in lettuce and green peppers. Ethiopian journal of health sciences. 2010;20(1):41-8.
25. Viswanathan P, Kaur R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2001;203(3):205-13.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

26. Kundu SK, Islam MT. Prevalence of Pathogenic Bacteria Isolated from Two Selected Salad Vegetables and Antibiogram Profile of Klebsiella spp. The Agriculturists. 2016;13(1):9-17.
27. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, et al. German Outbreak of Escherichia coli O104: H4 Associated with Sprouts. N. Engl. J. Med. 2011;365(1763):70.
28. Daskalov H. The importance of Aeromonas hydrophila in food safety. Food Control. 2006;17(6):474-83.
29. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, et al. Aeromonas spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. Emerg. Infect. Dis. 2003;9(5):552.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

Original Article

An Investigation of the Contamination of Vegetables and the Irrigating Water with Bacteria Causing Food-borne and Water-borne Diseases in Different Areas of the City of Shiraz in the Summer 95

Aminshahidi M, Fani F*, Firoozian N, Rafaatpour N

Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 15 Oct 2017 Accepted: 12 Dec 2017

Abstract

Background & Objectives: since consumption of raw vegetables is part of our daily regimen, their microbial contamination is important for gastrointestinal diseases. The aim of this study is to evaluate not only the contamination of vegetables in different parts of Shiraz, but also the water used to irrigate those same regions in terms of enteropathogenic bacteria.

Materials & Methods: three types of raw vegetables – leeks, purslane, and basil – as well as water samples used for the irrigation of those vegetables were collected from the vegetable farms of nine different regions in Shiraz. Bacterial culture and biochemical tests were used for the identification of Coliforms and enteropathogens. The identification of different pathotypes of *Escherichia Coli* (*E. coli*) was done using molecular tests. Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion method.

Results: in these 9 sampling farms, 60, 50, 50, 28.5, 33.5, 33.5, 60, 40, and 16.5 per cent of isolated bacteria in genus level were similar between the vegetables from the 9 sampling farms, and the water samples of the same regions. We isolated two enter hemorrhagic *E. coli* from purslane and one *Aeromonas hydrophila* from the water sample. All three isolates were susceptible to broad spectrum beta-lactams.

Conclusions: The microbial contamination of the water used to irrigate the raw vegetables has affected their health and this could cause gastrointestinal diseases. This indicates that the quality control of these resources in terms of microbial contamination is valuable not only for maintaining public health, but also for preventing gastrointestinal outbreaks.

Keywords: Vegetables, *Escherichia Coli,* Water, Bacterial contamination

***Corresponding Author: : Fereshteh Fani,** Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: fe_fani@sums.ac.ir

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.1.15.1]

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 708-717