

بررسی فراوانی اشریشیاکلی‌های انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در شیر

و فرآورده‌های شیری خام به روش دوپلکس PCR

رامین ابری^۱، ودود رضویلر^{۲*}، افشین جوادی^۳، محمد آهنگرزاده رضایی^۴، تقی زهرایی صالحی^۵

چکیده

است و مسئول بسیاری از مرگ و میرها در کودکان بخصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲۱، ۱۸، ۱۶، ۱۵). اشریشیاکلی ساکن طبیعی مجاری روده‌ای انسان و حیوانات بوده و در صورت فراهم شدن شرایط بیماری ایجاد می‌کند. اشریشیاکلی‌های پاتوژن روده‌ای را براساس عوامل حدت آنها به ۶ پاتوتیپ اصلی تقسیم کرده‌اند: انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی (EPEC)، انتروهمورازیک اشریشیاکلی (EHEC)، انترو اینویزیو اشریشیاکلی (EIEC)، انترو اگریگیتو اشریشیاکلی (EAEC) و چسبنده منتشر (DAEC). اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک عامل اصلی اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و در بزرگسالان و افرادی که از کشورهای صنعتی به این نواحی مسافرت می‌کنند باعث ایجاد اسهال مسافرتی می‌شود. همچنین می‌تواند عامل اسهال در حیوانات تازه متولد شده مخصوصاً توله خوک‌ها، گوساله‌ها و بره‌ها باشد. تیپ‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک به عنوان سویه‌هایی تعریف شده‌اند که دارای ژن eae هستند ولی ژن‌های ۱ stx و ۲ stx را ندارند. انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی یکی دیگر از عوامل اسهال در کشورهای جهان سوم می‌باشد که بیشتر کودکان زیر ۲ سال توسط این پاتوژن تحت تاثیر قرار می‌گیرند و معمولاً بوسیله غذای آلوده منتقل می‌شود (۲۲ و ۱۳، ۷، ۶، ۲).

در سال ۱۹۸۲، شاردینگر پیشنهاد نمود که به جهت آسان بودن جداسازی اشریشیاکلی نسبت به سایر پاتوژن‌های روده‌ای، به عنوان یک باکتری اندیکاتور برای تعیین آلودگی مدفوعی مواد

سویه‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک معمولاً در کشورهای در حال توسعه شایع می‌باشند و علت اصلی اسهال در افرادی هستند که به کشورهای در حال توسعه مسافرت می‌کنند. تیپ‌های بیماری‌زای انتروپاتوژنیک (EPEC) به‌عنوان سویه‌هایی تعریف شده‌اند که دارای ژن eae هستند ولی ژن‌های ۱ stx و ۲ stx را ندارند و می‌توانند علت اسهال در انسان و حیوانات باشند. هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی میزان اشریشیاکلی جدا شده از نمونه شیر و فرآورده‌های شیری خام به روش دوپلکس PCR بود. تعداد ۱۰۲ نمونه شیر و فرآورده‌های شیری خام عرضه شده در بازار از بخش‌های مختلف استان آذربایجان شرقی انتخاب شدند. جدایه‌های اشریشیاکلی بعد از کشت و انجام تست‌های تاییدی شناسایی شدند. برای تشخیص سویه‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک از دوپلکس PCR استفاده شد. به‌منظور شناسایی سویه‌های بیماری‌زای ETEC از پرایمرهای مربوط به ژن‌های It, st و برای شناسایی تیپ‌های بیماری‌زای EPEC از پرایمرهای مربوط به ژن‌های eae و bfp استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده، ۴۵٪ نمونه‌ها آلوده به اشریشیاکلی بودند. در بین اشریشیاکلی‌های جدا شده هیچ مورد ETEC شناسایی نشد و فقط دو مورد EPEC (۴/۳۴٪) جداسازی شد که یک مورد (۲/۱۷٪) آن EPEC تیبیک و یک مورد (۲/۱۷٪) هم EPEC غیرتیبیک بود. با توجه به مطالعات گذشته و مطالعه حاضر در ایران که نشان دهنده میزان بالای E. coli و حضور سویه EPEC در فرآورده‌های شیری خام است، می‌توان گفت که علت اصلی آن عدم رعایت شرایط صحیح بهداشتی، استفاده از شیر غیر پاستوریزه و انجام تمام مراحل تولید با دست و روش‌های سنتی می‌باشد.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، انتروتوکسیژنیک، انتروپاتوژنیک، فرآورده‌های شیری، دوپلکس PCR

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۸

مقدمه

بیماری‌های اسهالی یکی از مشکلات بهداشتی در سرتاسر جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند (۹). یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال، اشریشیاکلی

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران-ایران.

۲* - گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران-ایران. vrazavi@ut.ac.ir

۳- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۴- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، تبریز، ایران.

۵- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران-ایران.

(۲۳۴۸/۶۹) و سویه استاندارد (۹۳۳J) که از دانشگاه شیلی تهیه شده بودند، استفاده گردید.

جداسازی و تأیید بیوشیمیایی اشریشیاکلی

مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۲۵ سی سی محیط کشت لوریل سولفات تریپتوز برات (مایع غنی کننده انتخابی) تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شده و از نظر تولید گاز یا کدورت بررسی گردید. در صورت مشاهده کدورت یا گاز در لوله، از آن به لوله محیط کشت مایع EC تلقیح و تا ۲۴ ساعت و در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. سپس از نظر تولید گاز و کدورت بررسی شد. در ادامه در صورت مشاهده گاز یا کدورت در لوله EC broth، بر روی محیط کشت مک کانکی، کشت خطی داده شد. سپس کلنی‌های قرمز ارغوانی انتخاب و با تست‌های بیوشیمیایی (IMViC) از نظر اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مثبت شدن تست ایندول، متیل رد و منفی بودن دو تست دوم (وورس پروسکوئر و سترات) اشریشیاکلی تأیید شد (۴).

ذخیره نمونه‌ها

جهت ذخیره نمونه‌ها از محیط تریپتیکس سوی برات به همراه گلیسرول ۲۰ درصد استفاده شد. برای ذخیره‌سازی به طریق زیر عمل گردید:

در شرایط استریل، ۶۰۰ میکرولیتر از این محیط، در داخل میکروتیوب‌های ۲۰۰۰ میکرولیتری، ریخته شد. بعد از کشت کلنی‌های مورد تأیید میکروتیوب‌ها به مدت یک شبانه روز در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس، ۶۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۲۰ درصد استریل به آن‌ها افزوده شد و پس از ورتکس شدن، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

استخراج DNA از باکتری‌ها

استخراج DNA با استفاده از کیت پرومگا A11125 ساخت کشور آمریکا انجام شد.

غذایی به کار گرفته شود. وجود اشریشیاکلی در غذا می‌تواند بیانگر احتمال وجود سایر میکروارگانیسم‌های با منشاء مدفوعی در غذا باشد که بسیاری از آنها بیماری‌زا هستند، در نتیجه در آزمایش نمونه‌های مواد غذایی، جداسازی و تعیین تعداد آنها نیز مورد توجه قرار گرفت (۱).

شیر خام و فرآورده‌های شیری خام مانند پنیر های سستی در مناطق مختلفی از جهان مصرف می‌شوند که به خاطر وجود محیط مغذی بالا، باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد زیادی می‌توانند رشد و تکثیر یابند. عموماً باکتری‌ها در شیر از طریق کلونیزاسیون در کانال پستانی و یا از طریق پستان آلوده در حین شیر دوشی وارد شیر می‌شوند. لذا کیفیت و امنیت فرآورده‌های لبنی خام تا حد زیادی به عفونت پستانی مرتبط هستند. در مجموع حضور پاتوژن‌های با منشا غذایی در فرآورده‌های شیری خام بطور مستقیم و غیر مستقیم خطر انتقال این پاتوژن‌ها و توکسین‌های مضر را بالا می‌برد (۱۲ و ۴). بنابراین به منظور اطمینان از سلامت عمومی و آگاهی از تهدیدهای بیولوژیک استفاده از روش‌های مولکولی سریع، حساس و اختصاصی برای شناسایی تیپ‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی مهم می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی اشریشیاکلی‌های انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در شیر و فرآورده‌های شیری خام به روش دوپلکس PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری

تعداد ۱۰۲ نمونه شیر و فرآورده‌های شیری خام عرضه شده در بازار که از بخش‌های مختلف استان آذربایجان شرقی به آزمایشگاه میکروب شناسی اداره نظارت بر مواد غذایی ارجاع شده بودند، انتخاب گردید.

سویه استاندارد

به منظور تأیید آزمایشات، از سویه‌های استاندارد اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (H1۰۴۰۷)، اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک

بررسی فراوانی اشریشیاکلی های انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در شیر و فرآورده های شیری خام به روش دوپلکس PCR

EPEC استفاده شد. در این بررسی برای تایید قطعی EPEC غیرتیبیک از پرایمرهای 1 stx و 2 stx نیز استفاده شد (۲۰). نوع ژن و نیز توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

تست PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: PCR 2X Master Mix (۱۲/۵)، ۲ پیکومول از هر پرایمر و یک میکروگرم از هر نمونه DNA اضافه شد.

شناسایی پاتوتایپ های اشریشیاکلی با استفاده از دوپلکس PCR

پرایمرهای اختصاصی و شرایط مناسب دوپلکس PCR جهت شناسایی پاتوتایپ ها، طبق روش های ارائه شده در مقالات انجام گرفت (۲۲ و ۲۱، ۲۰). برای این منظور دو بار دوپلکس PCR استفاده شد. در دوپلکس PCR اول، پرایمرهای مربوط به ژن های It و st برای شناسایی سویه های بیماریزای ETEC مورد استفاده قرار گرفت. در دوپلکس PCR دوم، از پرایمرهای مربوط به ژن های eae و bfp برای شناسایی تیپ های بیماریزای

جدول ۱- نوع ژن و نیز توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای آنها

منابع	اندازه bp	توالی پرایمر	جایگاه ژن	ژن هدف	ارگانیزم هدف
(۲۲)	۱۹۰	ATT TTT ATT TCT GTA TTA T CAC CCG GTA CAT GCA GGA TT	پلاسمید	It	
(۲۲)	۴۵۰	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CGG TCTCTA TAT TCC CTG TT	پلاسمید	st	ETEC
(۲۱)	۵۷۰	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	کروموزوم	eae	
(۲۱)	۳۲۶	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	کروموزوم	bfp	tEPEC ^a
(۲۱)	۵۷۰	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	کروموزوم	eae	
(۲۰)	۳۸۸	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G AGA GCG ATG TTA CGG TTT G	فاژ	stx ₁	aEPEC ^b
(۲۰)	۸۰۷	TGG GTT TTT CTT CGG TAT AC ATT CTG GTT GAC TCT CTT	فاژ	stx ₂	

a: اشریشیاکلی پاتوژنیک تیبیک

b: اشریشیاکلی پاتوژنیک غیرتیبیک

گرفت (نگاره ۱).

۲) دوپلکس PCR دوم: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۸ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت (نگاره ۲).

تکثیر ژن هدف در ترموسایکلر با برنامه سیکل های حرارتی شامل:

۱) دوپلکس PCR اول: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت

سبز فلزی نشان دادند. نتایج آزمایش‌های اندول، متیل رد مثبت و آزمایشات VP و سیترات منفی بود. در محیط TSI پاسخ اسید - اسید همراه با تولید گاز مشاهده شد. هیچ سویه‌ای H₂S تولید نکرد.

نتایج آزمایشات دوپلکس PCR برای شناسایی اشریشیا-

کلی انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک

در بررسی با دوپلکس PCR، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که ژن‌های *st*، *lt* و *eae* مورد هدف قرار می‌دادند، از مجموع نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده هیچ مورد ETEC شناسایی نشد و فقط دو مورد (۴/۳۴٪) EPEC جداسازی شد که یک مورد (۲/۱۷٪) آن به عنوان EPEC تیپیک و یک مورد (۲/۱۷٪) هم به عنوان EPEC غیر تیپیک شناسایی شدند.

محصول نهائی در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با safe dye با استفاده از ژل داگ که با اشعه UV کار می‌کند مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است در این بررسی از نشانگر ۱۰۰bp جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید (۲۰).

نتایج

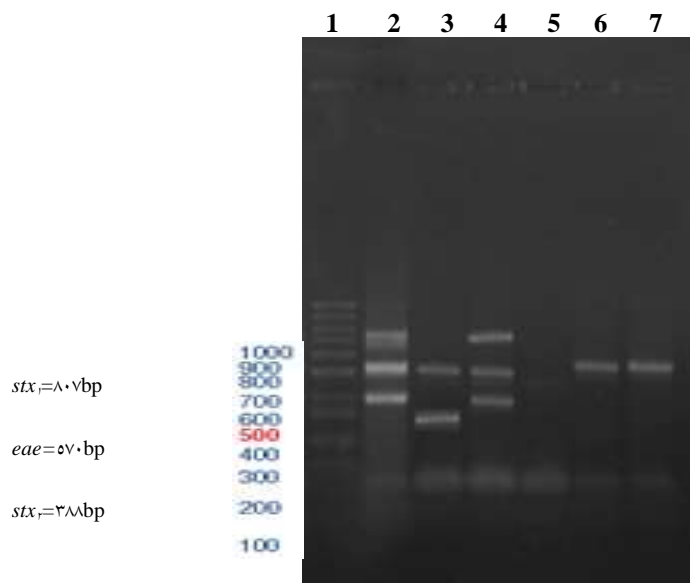
نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جهت جداسازی و تشخیص

اشریشیاکلی

در این مطالعه از بین ۱۰۲ نمونه فرآورده‌های لبنی، ۴۶ مورد (۴۵٪) اشریشیاکلی جداسازی شدند. همه باکتری‌های جدا شده در محیط مکانکی آگار کلنی‌های لاکتوز مثبت صورتی رنگ و در محیط آگار ائوزین متیلن بلو کلنی‌های با جلای

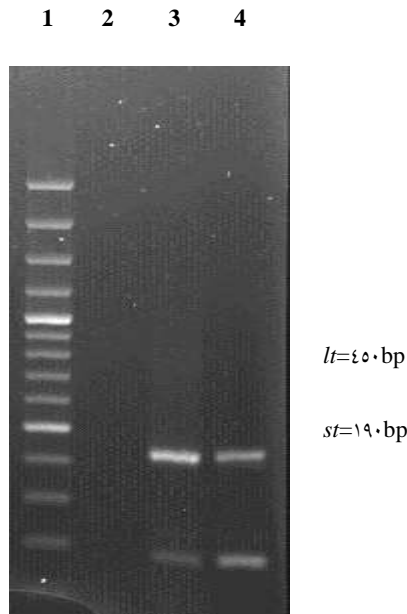
جدول ۲- فراوانی پاتوتایپ‌های شناسایی شده با دوپلکس PCR

تعداد شناسایی شده در دوپلکس PCR	ژن‌های بررسی شده	پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی
۰	<i>lt, st</i>	ETEC
۱ (۲/۱۷٪)	<i>eae, bfp</i>	Typical-EPEC
۱ (۲/۱۷٪)	<i>eae</i>	Atypical-EPEC



نگاره ۱- نتیجه آزمایش دوپلکس PCR برای شناسایی سویه‌های اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک

چاهک ۱: مارکر ۱۰۰، bp چاهک ۲: سویه کنترل EHEC (1 *stx*، ۲ *stx* و *eae*) چاهک ۳: سویه کنترل EPEC (*bfp*، *eae*) چاهک ۴: سویه کنترل منفی، چاهک ۵ و ۶: سویه کنترل EPEC (*eae*) چاهک ۷: سویه کنترل EPEC (*bfp*)



نگاره ۲ - نتیجه آزمایش دوپلکس PCR برای سویه کنترل اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک. چاهک ۱- مارکر ۱۰۰ bp، چاهک ۲- کنترل منفی، چاهک ۳ و ۴- سویه کنترل ETEC (It, st).

بحث

روی سویه های اشریشیاکلی اسهالزا انجام گیرد، در حالیکه مراکز بهداشتی - درمانی و کنترل بیماری های عفونی دامی بیشتر بررسی های خود را بر روی سالمونلا و شیگلا متمرکز می کنند.

در مطالعه حاضر اشریشیاکلی های انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در شیر و فرآورده های شیری خام مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج بدست آمده، از بین ۱۰۲ نمونه ۴۶ مورد (۴۵٪) اشریشیا کلی جداسازی شد. مطالعات مشابه مختلفی بر روی مواد شیری خام در مناطق مختلف جهان و ایران صورت گرفته است. در یک بررسی در سال ۱۳۸۹ در غرب تهران توسط فرامرزی و همکاران مشاهده گردید که ۵۰٪ نمونه های بستنی سنتی آلوده به اشریشیا کلی می باشند (۱۱). در مطالعه دیگری در سال ۱۳۸۸ در مراغه توسط وزیری و همکاران از مجموعه ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی، ۹۸٪ نمونه ها به کلی فرم و ۵۰٪ موارد آلوده به اشریشیا کلی تشخیص داده شدند (۲). نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر تا حد زیادی همخوانی دارند که نشان دهنده فراوانی بالای اشریشیا کلی در فرآورده های شیری خام می باشد. در

بیماری های اسهالی که توسط پاتوژن های روده ای مختلف ایجاد می شوند، از موارد اصلی مشکل ساز برای بهداشت عمومی می باشند و سالانه موارد زیادی از بیماری ها را در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران ایجاد می کنند. این عفونت ها به ویژه باعث مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال و افراد مسن می شوند (۸ و ۹). در سال های اخیر توانایی شناسایی و تعیین هویت اشریشیاکلی های پاتوژن، با به کارگیری روش های مولکولی پیشرفته افزایش یافته است. در کشورهای در حال توسعه به دلیل پرزحمت و گران قیمت بودن این روش ها، اطلاعات زیادی در مورد میزان شیوع پاتوتایپ های اشریشیاکلی در نمونه های غذایی از جمله فرآورده های شیری خام وجود ندارد. با توجه به مطالب فوق روشن است که استفاده از تکنیک های سریع شناسایی، از ابزارهای مهم برای کم کردن میزان ابتلا و کاهش بار مالی بیماری بر بهداشت و سلامت جامعه است. جهت ارتقای بهداشت لازم است تا مطالعات اپیدمیولوژیکی بیشتری بر

نقاط مختلف ایران و دنیا میزان شیوع ETEC در فرآورده‌های شیری خام پایین می‌باشد که با نتایج بررسی ما همخوانی دارند. همچنین در این بررسی‌ها میزان شیوع EPEC اندکی بالاتر از مطالعه حاضر می‌باشد و در بیشتر این تحقیقات سویه‌های EPEC به عنوان یکی از دو پاتوتیپ غالب گزارش شده است. برای مثال، در تحقیقی در کرمان توسط نژند و قنبرپور در سال ۲۰۰۶ بر روی پنیر نرم، ۷۶ مورد (۹۸/۷٪) اشریشیا کلی جداسازی شد که ۱۵ مورد (۱۹/۴۸٪) مربوط EPEC بود (۱۶). در مطالعه دیگری در کشور عراق از ۴۰۰ نمونه فرآورده‌های شیری خام، ۴۰/۵٪ آلوده به EPEC بودند (۳). در بررسی دیگری در برزیل در سال ۲۰۰۲ از مجموع ۴۵ نمونه پنیر نرم ۲۱/۱٪ نمونه‌ها آلوده به EPEC گزارش شدند (۵). با اینحال به نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی پایین بودن میزان فراوانی این پاتوتیپ‌ها در پژوهش حاضر نسبت به مطالعات قبلی، شناسایی تک ژنی ایزوله‌های مذکور در مطالعات گذشته باشد (استفاده از یک ژن برای تشخیص باکتری). چراکه بدلیل وجود ژن‌های مشترک بین پاتوتیپ‌های EPEC و EHEC احتمال تشخیص نادرست پاتوتیپ‌های EHEC بعنوان EPEC وجود دارد.

باتوجه به مطالعات گذشته و مطالعه حاضر در ایران که نشان دهنده میزان بالای E. coli و حضور سویه EPEC در فرآورده‌های شیری خام است، می‌توان گفت که علت اصلی آن عدم رعایت شرایط صحیح بهداشتی، استفاده از شیر غیر پاستوریزه و انجام تمام مراحل تولید با دست و روش‌های سنتی می‌باشد. شایان ذکر است که این فرآورده‌ها نه تنها عاملی برای انتقال اشریشیا کلی می‌باشند بلکه می‌توانند سایر پاتوژن‌های مهم از جمله عامل بیماری تب مالت را نیز منتقل کنند. لذا می‌توان گفت افزایش ابتلا به بیماری‌های عفونی در سال‌های گذشته ناشی از افت و خیز اقدامات نظارتی، ناکافی بودن امکانات و ناتوانی در کنترل بیماری‌های دام، گسترش استفاده و عرضه فرآورده‌های دامی غیر پاستوریزه و ناآگاهی گروه‌های در

تحقیق مشابه دیگری در سال ۱۳۸۵ توسط فدایی و همکاران در شهرکرد میزان اشریشیا کلی در شیر و فرآورده‌های شیری خام ۷۰٪ گزارش شد (۹). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ در پاکستان بر روی شیر و فرآورده‌های شیری خام، از مکان‌های مختلفی نمونه‌برداری صورت گرفت و بطور میانگین ۵۵٪ نمونه‌ها آلوده به اشریشیاکلی گزارش شدند (۱۹). همچنین Altalhi و همکاران در سال ۲۰۰۹ در عربستان، Paneto و همکاران در سال ۲۰۰۷ در برزیل میزان شیوع اشریشیاکلی را در شیر و فرآورده‌های شیری خام به ترتیب ۶۶٪ و ۹۶٪ گزارش کردند (۱۰ و ۴). نتایج اغلب پژوهش‌های انجام شده در خاورمیانه و نقاط مختلف دنیا، شیوع گسترده اشریشیاکلی را در فرآورده‌های شیری خام و خطر انتقال این باکتری را از طریق مواد لبنی نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر در بررسی اشریشیاکلی‌های جداسازی شده با دوپلکس PCR هیچ مورد ETEC شناسایی نشد و فقط ۲ مورد (۴/۳۴٪) EPEC شناسایی گردید که یک مورد آن EPEC نیبیک و یک مورد هم EPEC غیرنیبیک بود. در یک مطالعه مشابه توسط Altalhi و همکاران در عربستان سعودی که شیر و فرآورده‌های شیری خام را مورد مطالعه قرار دادند، هیچ موردی از ETEC شناسایی نشد و فقط ۳ مورد (۹/۱٪) EPEC گزارش شد (۴). در یک بررسی توسط Holko و همکاران در اسلواکی در سال ۲۰۰۶ میزان شیوع ETEC و EPEC به ترتیب ۲/۱٪ و ۳/۰۹٪ گزارش شد (۱۴). در مکزیک در فاصله بین سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ میزان آلودگی مواد غذایی مختلف بررسی شدند که از ۶۶۹ نمونه فرآورده شیری خام، ۱۴۳ مورد (۲۱/۳٪) اشریشیاکلی جدا شد که فقط یک مورد آن ETEC (۰/۶۹٪) و ۱۳ مورد EPEC (۹/۱٪) بود (۸). در یک مطالعه مشابه هم در کرمانشاه که توسط محمدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، از ۲۰۶ نمونه شیر خام بررسی شده ۱۷ مورد (۸/۲۵٪) EPEC شناسایی شد (۱۷). بنابراین بطورکلی نتایج این مطالعات حاکی از آن است که در

فهرست منابع

۱. پورعلی بهزاد، م.، میرزایی، ح. (۱۳۹۰): مطالعه میزان آلودگی پنیهای سستی عرضه شده در بازار تبریز به کلی فرمها و اشریشیا کولای بیمارزا. مجله بهداشت مواد غذایی، ۳: ۷۱-۸۰.
۲. وزیر، س.، نوروزی، م. (۱۳۹۰): بررسی میزان آلودگی پنیهای محلی لبقان تبریز به کلیفرمها و اشریشیا کلی در شهر مراغه. مجله میکروپ شناسی پزشکی ایران، ۷: ۲۸-۲۳.
3. Abbar, F., Kaddar, H.K. (1991): Bacteriological studies on Iraqi milk products. *J. appl. bacteriol.* 71: 497-500.
4. Altalhi, A.D., Hassan, S.A. (2009): Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food control.* 20: 913-917.
5. Araujo, V., Pagliares, V., Queiroz, M., Freitas Almeida, A. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1172-1177
6. Aslani, M., Alikhani, M. (2009): Serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iranian J. Publ. Health.* 38: 70-77.
7. Bueris, V., Sicili, M. P., Taddei, C. R., Santos, M. F. D., Franzolin, M. R., Martinez, M. B., Ferrer, S. R., Barretto, M. L., Trabulsi, L. R. (2007): Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memó. I. Oswaldo Cruz.* 102: 839-844.
8. Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nunez, E., Vidal, J. E., Flores-Villasenor, H., LEÓN-Sicairos, N. (2013): Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 164: 36-45.
9. Estrada-Garcia, T., Lopez-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., Lopez-Hernandez, D., Santos, J. I., Rosado, J. L., Dupont, H. L., Long, K. Z. (2009): Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection

معرض خطر، به ویژه روستاییان می باشد. به منظور جلوگیری از ایجاد طیف گسترده ای از بیماری ها و عفونت ها در مصرف کنندگان ضروری است تا مراکز کنترل بهداشت مواد غذایی نظارت و بررسی های دقیق تری داشته باشند. همچنین با توجه به اینکه هنوز افراد زیادی مخصوصا در روستاها از شیر و فرآورده های شیری خام استفاده می کنند، بنابراین اهمیت آگاهی بخشیدن و اطلاع رسانی به مصرف کنندگان در مورد خطرات احتمالی مصرف فرآورده های شیری غیر پاستوریزه بر روی سلامتی افراد مهم به نظر می رسد.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد شیر و فرآورده های لبنی خام در سطح استان آذربایجان شرقی عاری از آلودگی با اشریشیاکلی نیست و بیش از پیش مستلزم رعایت اصول و موازین بهداشتی در مراحل تهیه، حمل و نقل، نگهداری و عرضه می باشد. باید توجه داشت که فراوانی و سایر ویژگی های اپیدمیولوژیکی پاتوتیپ ها می تواند در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت باشد. از طرفی ممکن است در شهرهای مختلف از یک منطقه جغرافیایی نیز این ویژگی ها متفاوت باشند. بطور کلی با توجه به مخاطرات ناشی از اشریشیاکلی های بیمارزا به ویژه در صنایع لبنی ضرورت بررسی شیوع اتیولوژیکی دیگر پاتوتیپ های اشریشیاکلی و همچنین بررسی های بیشتر در سایر مناطق کشور پیشنهاد می گردد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه دوره دکتری تخصصی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی استخراج شده است. کارهای عملی این پروژه در گروه میکروپ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. بدینوسیله از همکاری های سرکار خانم فیروزه صفائیان کارشناس ارشد گروه میکروپ شناسی قدردانی می گردد.

- coli with acute diarrhea. *J. clin. Microbiol.* 47: 93-98.
10. Fadaei, A., Jamshidi, E., Kheiri, S. (2008): Comparison of bacterial contamination of raw and pasteurized milk used in Shahrekord in 2006. *J. Shahrekord Univ. Med. Sci.* 10:37-44.
 11. Faramarzi, T., Jonidi Jafari, A., Dehghani, S., Mirzabeigi, M., Naseh, M., Rahbar Artesh, H. (2012): A survey on Bacterial Contamination of Food Supply in the West of Tehran. *J. Fasa Univ. Med. Sci.* 2: 11-18.
 12. Hayes, M., Ralyea, R., Murphy, S., Carey, N., Scarlett, J., Boor, K. (2001): Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *Journal of dairy science:* 84, 292-298.
 13. Hiett, K. L., Seal, B. S. (2009): Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Molecular Epidemiology of Microorganisms.* Springer.
 14. Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z., Kmet, V. (2006): Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control.* 17:393-396.
 15. Ishii, S., Meyer, K. P., Sadowsky, M. J. (2007): Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microb.* 73:5703-5710.
 16. Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J. (2000): Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 107-117.
 17. Mohammadi, P., Abiri, R. (2013): Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). *Jundishapur. J. Microb.* 6.
 18. Najand, L. M., Ghanbarpour, R. (2007): A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. *Vet. Arh.* 76:531.
 19. Soomro, A., Arain, M., Khaskheli, M., Bhutto, B. (2002): Isolation of *Escherichia coli* from and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam. *Pak. J. Nutr.* 1: 151-152.
 20. Tobias, J., Svennerholm, A.-M. (2012): Strategies to overexpress enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) colonization factors for the construction of oral whole-cell inactivated ETEC vaccine candidates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 2291-2300.
 21. Vidal, M., Kruger, E., Duran, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C. & Vidal, R. (2005): Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5362-5365.
 22. Vilchez, S., Reyes, D., Paniagua, M., Bucardo, F., Molby, R., Weintraub, A. (2009). Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *J. Med. Microbiol.* 58: 630-637.