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 آهنگرزاده‌رضایی[٤]، تقی زهرایی‌صالحی[٥]

چکیده

سویه‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک معمولاً در کشورهای درحال‌توسعه شایع می‌باشند و علت اصلی اسهال در افرادی هستند که به کشورهای درحال‌توسعه مسافرت می‌کنند. تیپ‌های بیماریزای انتروپاتوژنیک (EPEC) به‌عنوان سویه‌هایی تعریف شده‌اند که دارای ژن eae هستند ولی ژن‌های stx ۱ و stx ۲ را ندارند و می‌توانند علت اسهال در انسان و حیوانات باشند. هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی میزان اشریشیا کلی جدا شده از نمونه شیر و فراورده های شیری خام با روش دوپلکس PCR بود. تعداد ۱۰۲ نمونه شیر و فرآورده‌های شیری خام عرضه شده در بازار از بخش های مختلف استان آذربایجان شرقی انتخاب شدند. جدایه های اشریشیاکلی بعد از کشت و انجام تست‌های تاییدی شناسایی شدند. برای تشخیص سویه‌های اشریشیا-کلی انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک از دوپلکس PCR استفاده شد. به‌منظور شناسایی سویه‌های بیماریزای ETEC از پرایمرهای مربوط به ژن‌های st , lt و برای شناسایی تیپ‌های بیماریزایEPEC از پرایمرهای مربوط به ژن‌های eae و bfp استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده، ٤٥٪ نمونه‌ها آلوده به اشریشیاکلی بودند. در بین اشریشیاکلی‌های جدا شده هیچ مورد ETEC شناسایی نشد و فقط دو مورد (٤/٣٤٪) EPEC جداسازی شد که یک مورد (٢/١٧٪) آن EPEC تیپیک و یک مورد (٢/١٧٪) هم EPEC غیرتیپیک بود. باتوجه به مطالعات گذشته و مطالعه حاضر در ایران که نشان دهنده میزان بالای E. coli و حضور سویهEPEC 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 روش های 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 است و مسئول بسیاری از مرگ و میرها در کودکان بخصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد(۲۱و ۱۸، ۱٦, 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 ٦ پاتوتیپ اصلی تقسیم کرده‌اند: انتروتوکسیژنیک‌اشریشیاکلی (ETEC)، انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی (EPEC)، انتروهموراژیک اشریشیاکلی (EHEC)، انترو اینویزیو اشریشیاکلی (EIEC)، انترو اگریگیتیو 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 مخصوصا توله خوک‌ها، گوساله‌ها و بره ها باشد. تیپ‌های بیماریزای اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک به عنوان سویه‌هایی تعریف شده‌اند که دارای ژن eae هستند ولی ژن‌های stx ۱ و stx ۲ 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 می گیرند و معمولا بوسیله غذای آلوده منتقل می‌شود (۲۲ و ۱۳، ۷، ٦، 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

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.

٤- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، تبریز، ایران.

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

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 سنتی در مناطق مختلفی از جهان مصرف می‌شوند که به خاطر وجود محیط مغذی بالا، باکتری‌های بیماریزا و مولد فساد زیادی می توانند رشد و تکثیر یابند. عموما 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 (۱۲و ٤). بنابراین به منظور اطمینان از سلامت عمومی و آگاهی از تهدیدهای بیولوژیک استفاده از روش های مولکولی سریع، حساس و اختصاصی برای شناسایی تیپ‌های بیماریزای اشریشیاکلی مهم می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی اشرشیاکلی‌های 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 تایید آزمایشات، از سویه‌های استاندارد اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (H۱۰٤۰۷)، اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (۲۳٤۸/٦۹) 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 سی‌سی محیط کشت لوریل سولفات تریپتوز براث (مایع غنی کننده انتخابی) تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا مدت زمان ۲٤ 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 ۲٤ ساعت و در دمای ٤٤ 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 (ووژس پروسکوئر و سیترات) اشریشیاکلی تایید شد (٤).

ذخیره نمونه‌ها

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

در شرایط استریل، ٦۰۰ میکرولیتر از این محیط، در داخل میکروتیوب‌های ۲۰۰۰ میکرولیتری، ریخته شد. بعد از کشت کلنی های مورد تایید میکروتیوب‌ها به مدت یک شبانه روز در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس، ٦۰۰ 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.

شناسایی پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی با استفاده از دوپلکس PCR

پرایمرهای اختصاصی و شرایط مناسب دوپلکس PCR جهت شناسایی پاتوتایپ‌ها, طبق روش‌های 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 ژن‌های lt و st برای شناسایی سویه‌های بیماریزای ETEC مورد استفاده قرار گرفت. در دوپلکس PCR دوم، از پرایمرهای مربوط به ژن‌های eae و bfp برای شناسایی تیپ‌های بیماریزای EPEC استفاده شد. در این بررسی برای تایید قطعی EPEC غیرتیپیک از پرایمرهای stx ۱ و stx ۲ 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□l)، ۲ پیکومول از هر پرایمر و یک میکروگرم از هر نمونه DNA اضافه شد.

جدول ۱- نوع ژن و نیز توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای آنها

ارگانیسم هدف	ژن هدف	جایگاه ژن	توالی پرایمر	اندازه bp	منابع
ETEC	*lt*	پلاسمید	ATT TTT ATT TCT GTA TTA T CAC CCG GTA CAT GCA GGA TT	۱۹۰	(۲۲)
	st	پلاسمید	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CGG TCTCTA TAT TCC CTG TT	٤٥٠	(۲۲)
tEPEC[a]	*eae*	کروموزوم	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	٥٧٠	(۲۱)
	bfp	کروموزوم	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	٣٢٦	(۲۱)
aEPEC[b]	*eae*	کروموزوم	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	٥٧٠	(۲۱)
	stx_1	فاژ	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G AGA GCG ATG TTA CGG TTT G	٣٨٨	(۲۰)
	stx_2	فاژ	TGG GTT TTT CTT CGG TAT AC ATT CTG GTT GAC TCT CTT	٨٠٧	(۲۰)

a:اشریشیاکلی پاتوژنیک تیپیک

b:اشریشیاکلی پاتوژنیک غیرتیپیک

تکثیر ژن هدف در ترموسایکلر با برنامه سیکل‌های حرارتی شامل:

۱) دوپلکس PCR اول: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٤٩ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه صورت گرفت (نگاره۱).

۲) دوپلکس PCR دوم: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۸ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه صورت گرفت (نگاره۲).

محصول نهائی در ژل اگاروز۱/۵٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با safe dye با استفاده از ژل داک 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

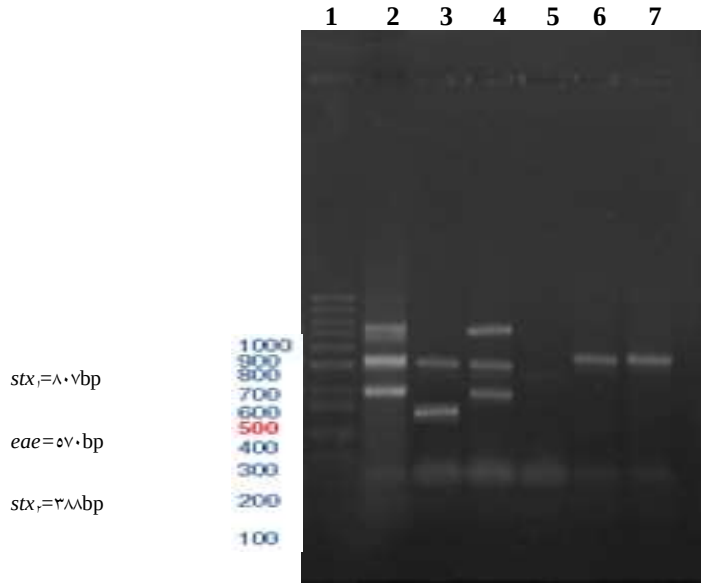
در این مطالعه از بین ۱۰۲ نمونه فرآورده‌های لبنی، ٤٦ مورد (٤٥٪) اشریشیاکلی جداسازی شدند. همه باکتری‌های جدا شده در محیط مکانکی آگار کلنی های لاکتوز مثبت صورتی رنگ و در محیط آگار ائوزین متیلن بلو کلنی‌های با جلای سبز فلزی نشان دادند. نتایج آزمایش‌های اندول، متیل رد مثبت و آزمایشات VP و سیترات منفی بود. در محیط TSI پاسخ اسید ـ اسید همراه با تولید گاز مشاهده شد. هیچ سویه‌ای H_2S 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 bfp، st ، lt و eae مورد هدف قرار می‌دادند، از مجموع نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده هیچ موردETEC شناسایی نشد و فقط دو مورد (٤/٣٤٪) EPEC جداسازی شد که یک مورد (۲/۱۷٪) آن به عنوان EPEC تیپیک و یک مورد (۲/۱۷٪) هم به عنوان EPEC غیرتیپیک شناسایی شدند.

جدول۲- فراوانی پاتوتایپ‌های شناسایی شده با دوپلکس PCR

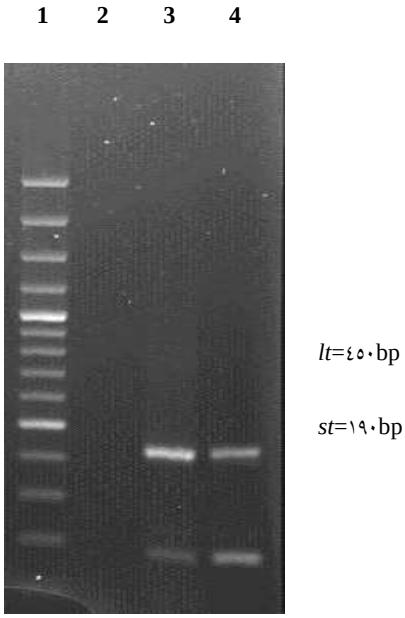
پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی	ژن‌های بررسی شده	تعداد شناسایی شده در دوپلکس PCR
ETEC	*lt,st*	۰
Typical-EPEC	*eae,bfp*	۱ (۲/۱۷٪)
Atypical-EPEC	*eae*	۱ (۲/۱۷٪)



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

چاهک ۱: مارکر۱۰۰، bp چاهک۲: سویه کنترل EHEC(۱ stx ۲, stx و eae) چاهک۳: سویه کنترل (bfp, eae)tEPEC

چاهک ۵ سویه کنترل منفی، چاهک ٦و۷: سویه کنترل (eae) aEPEC. bfp=326bp



نگاره ۲ – نتیجه آزمایش دوپلکس PCR برای سویه کنترل اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک.
چاهک ۱ـ مارکر bp ۱۰۰ چاهک ۲ـ کنترل منفی، چاهک٤و۳: سویه کنترل ETEC(lt, st).

بحث

بیماری‌های اسهالی که توسط پاتوژن‌های روده‌ای مختلف ایجاد می‌شوند، از موارد اصلی مشکل ساز برای بهداشت عمومی می‌باشند و سالانه موارد زیادی از بیماری‌ها را در کشورهای درحال‌توسعه از جمله ایران ایجاد می‌کنند. این عفونت‌ها به‌ویژه باعث مرگ‌ومیر در کودکان زیر ۵ سال و افراد مسن می‌شوند (۹و ۸). در سال‌های اخیر توانایی شناسایی و تعیین هویت اشریشیاکلی‌های پاتوژن، با به کارگیری روش‌های مولکولی پیشرفته افزایش یافته است. در کشورهای درحال‌توسعه به دلیل پرزحمت و گران قیمت بودن این روش‌ها، اطلاعات زیادی در مورد میزان شیوع پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های غذایی از جمله فرآورده‌های شیری خام وجود ندارد. با توجه به مطالب فوق روشن است که استفاده از تکنیک‌های 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 روی سویه‌های اشریشیاکلی اسهال‌زا انجام گیرد، در حالیکه مراکز بهداشتی ـ درمانی و کنترل بیماری‌های عفونی دامی بیشتر بررسی‌های خود را بر روی سالمونلا و شیگلا متمرکز می‌کنند.

در مطالعه حاضر اشریشیاکلی‌های انتروتوکسیژنیک و انتروپاتوژنیک در شیر و فرآورده‌های شیری خام مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج بدست آمده، از بین ۱۰۲ نمونه ٤٦ مورد (٤٥٪) 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٪ نمونه‌های بستنی سنتی آلوده به اشریشیا کلی می‌باشند (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 اشرشیا کلی تشخیص داده شدند (۲). نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر تا حد زیادی همخوانی دارند که نشان دهنده فراوانی بالای اشریشیا کلی در فراورده های شیری خام می‌باشد. در

تحقیق مشابه دیگری در سال ۱۳۸۵ توسط فدایی و همکاران در شهرکرد میزان اشرشیا کلی در شیر و فراورده های 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 ٦٦٪ و ۹٦٪ گزارش کردند (۱۰ و ٤). 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 (٤/۳٤٪) EPEC شناسایی گردید که یک مورد آن EPECتیپیک و یک مورد هم EPEC غیرتیپیک 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 (٤). در یک بررسی توسط Holko و همکاران در اسلواکی در سال ۲۰۰٦ میزان شیوع ETEC و EPEC به ترتیب ۲/۱٪ و ۳/۰۹٪ گزارش شد (١٤). در مکزیک در فاصله بین سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ میزان آلودگی مواد غذایی مختلف بررسی شدند که از ٦٦۹ نمونه فرآورده شیری خام، ۱٤۳ مورد (۲۱/۳٪) اشریشیاکلی جدا شد که فقط یک مورد آن (۰/٦۹٪) ETEC و ۱۳ مورد (۹/۱٪) EPEC بود (۸). در یک مطالعه مشابه هم در کرمانشاه که توسط محمدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، از ۲۰٦ نمونه شیر خام بررسی شده ۱۷ مورد (۸/۲۵٪) EPEC شناسایی شد (۱۷). بنابراین بطورکلی نتایج این مطالعات حاکی از آن است که در 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 ۲۰۰٦ بر روی پنیر نرم، ۷٦ مورد (۹۸/۷٪) اشریشیا کلی جداسازی شد که ۱۵ مورد (۱۹/٤۸٪) مربوط EPEC بود (١٦). در مطالعه دیگری در کشور عراق از ٤۰۰ نمونه فرآورده های شیری خام، ٤۰/۵٪ آلوده به EPEC بودند (۳). در بررسی دیگری در برزیل در سال ۲۰۰۲ از مجموع ٤۵ نمونه پنیر نرم ۲۱/۱٪ نمونه ها 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 سویهEPEC در فرآورده-های 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 فراورده‌ها نه تنها عاملی برای انتقال اشریشیا کلی می‌باشند بلکه می‌توانند سایر پاتوژن های مهم از جمله عامل بیماری تب مالت را نیز منتقل کنند. لذا می‌توان گفت افزایش ابتلا به بیماری‌های عفونی در سال های 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

معرض خطر، به ویژه روستاییان می‌باشد. به منظور جلوگیری از ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و عفونت‌ها در مصرف کنندگان ضروری است تا مراکز کنترل بهداشت مواد غذایی نظارت و بررسی‌های دقیق‌تری داشته باشند. همچنین با توجه به اینکه هنوز افراد زیادی مخصوصا در روستاها از شیر و فرآورده های شیری خام استفاده می‌کنند، بنابراین اهمیت آگاهی بخشیدن و اطلاع رسانی به مصرف کنندگان در مورد خطرات احتمالی مصرف فرآورده‌های شیری غیر پاستوریزه بر روی سلامتی افراد مهم به نظر می‌رسد.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد شیر و فرآورده‌های لبنی خام در سطح استان آذربایجان شرقی عاری از آلودگی با اشرشیاکلی نیست و بیش از پیش مستلزم رعایت اصول و موازین بهداشتی در مراحل تهیه، حمل و نقل، نگهداری و عرضه می‌باشد. باید توجه داشت که فراوانی و سایر ویژگی‌های اپیدمیولوژیکی پاتوتیپ‌ها می‌تواند در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت باشد. از طرفی ممکن است در شهرهای مختلف از یک منطقه جغرافیایی نیز این ویژگی‌ها متفاوت باشند. بطور کلی با توجه به مخاطرات ناشی از اشرشیاکلی‌های بیماریزا به ویژه در صنایع لبنی ضرورت بررسی شیوع اتیولوژیکی دیگر پاتوتایپ های اشرشیاکلی و همچنین بررسی‌های بیشتر در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد.

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 میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. بدینوسیله از همکاری‌های سرکار خانم فیروزه صفائیان کارشناس ارشد گروه میکروب‌شناسی قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

۱. پورعلی بهزاد، م.، میرزایی، ح.(۱۳۹۰): مطالعه میزان آلودگی پنیرهای سنتی عرضه شده در بازار تبریز به کلی فرم‌ها و اشریشیا کولای بیماریزا. مجله بهداشت مواد غذایی، ۳: ۸۰-۷۱.

۲. وزیری، س.، نوروزی، م.(۱۳۹۰): بررسی میزان آلودگی پنیرهای محلی لیقوان تبریز به کلیفرم‌ها و اشرشیا کلی در شهر مراغه. مجله میکروب 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-VillasenorI, 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

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., Scarllet, 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 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.

and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic E.