

## بررسی فراوانی سروتیپ‌های *اشریشیا کولای* در پنیرهای محلی تولیدی در روستاهای شهرستان مراغه

سامان مهدوی

استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: s.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۳/۱/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۲/۱۷)

### چکیده

کلی فرم‌ها و *اشریشیا کولای* شاخص‌های مهم میکروبی در برآورد کیفیت مواد غذایی هستند. حضور آن‌ها در مواد غذایی به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی در نظر گرفته می‌شود. *ای کولای* جزو مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای انسان معرفی شده است که از طریق مواد غذایی با منشاء دامی به انسان منتقل می‌شود. این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه پنیر محلی تولیدی در روستاهای شهرستان مراغه به منظور مطالعه فراوانی گروه‌های سرمی *ای کولای* صورت گرفت. نمونه‌ها با روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی آنالیز گردید و سپس آزمایشات بیوشیمیایی تأییدی بر روی آن‌ها انجام گرفت. در نهایت از روش آگلوتیناسیون مستقیم جهت تشخیص سروتیپ O جدایه‌ها استفاده شد. از ۱۰۰ نمونه پنیر هیچ موردی از *ای کولای* O<sub>157</sub> مشاهده نشد، اما سایر سروتیپ‌های *ای کولای* شامل ۳۲ سروتیپ non-O<sub>157</sub> جداسازی شد. در بین سروتیپ‌های جدا شده انواع بیماری‌زای روده‌ای، توکسین‌زای روده‌ای و خونریزی‌دهنده روده‌ای مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کولای*، پنیر محلی، مراغه

### مقدمه

بودن طعم و قوام بهتر نسبت به انواع پاستوریزه و صنعتی، طرفداران زیادی دارد و آمار مصرف آن در روستاها و شهرستان مراغه بالاست. *اشریشیا کولای* به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب و در مواد غذایی به‌عنوان یک میکرووب شاخص بهداشتی حائز

تولید پنیر محلی در روستاهای شهرستان مراغه از دیر باز مرسوم بوده و همانند سایر مناطق کشور از شیر غیرپاستوریزه تهیه می‌شود. این نوع پنیر به‌دلیل دارا

آب شهری و آب استخر زنده می‌ماند (Oksuz *et al.*, 2004). تحقیقات نشان می‌دهد ۲۰ تا ۵۰ درصد عفونت‌های ناشی از *EHEC* (EHEC) توسط سروتیپ non-O<sub>157</sub> ایجاد می‌شود که حدت کمتری نسبت به سروتیپ O<sub>157</sub> دارند. شایع‌ترین سروتیپ‌های *EHEC* non-O<sub>157</sub> که با بیماری انسان مرتبط هستند شامل سروتیپ‌های O<sub>26</sub>، O<sub>103</sub>، O<sub>111</sub> و O<sub>113</sub> می‌باشد (Nataro and Kaper, 1998). در آلمان، افزایش سروتیپ‌های *EHEC* non-O<sub>157</sub> مرتبط با بیماری انسان شامل سروتیپ‌های O<sub>26</sub>، O<sub>103</sub>، O<sub>111</sub> و O<sub>145</sub> می‌باشد (McClure, 2000). در ایتالیا، موارد سندرم HUS (Hemolytic Uremic Syndrome) ناشی از سروتیپ O<sub>26</sub> بیشتر از موارد ناشی از سروتیپ O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> می‌باشد (McClure, 2000). با توجه به عدم وجود اطلاعات دقیق در خصوص میزان آلودگی و تنوع سروتیپ‌های *EHEC* در پنیرهای سنتی منطقه مراغه، لذا این تحقیق، با هدف مطالعه فراوانی گروه‌های سرمی *EHEC* بر اساس آنتی ژن O در پنیرهای محلی تولید شده در مناطق روستایی شهرستان مراغه انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق از اسفند ماه سال ۹۱ تا مهر ماه سال ۹۲ بر روی ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی اخذ شده از ۲۵ روستای مختلف شهرستان مراغه انجام شد. مقدار ۱۰۰ گرم نمونه پنیر سنتی از هر خانوار روستایی در ظروف استریل جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها پس از همگن شدن، به میزان ۱۰ گرم در ۹۰ میلی‌لیتر محیط (Merck, Germany) Tryptic Soy Broth به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر

اهمیت است. در سال‌های اخیر این میکروب به‌عنوان عامل اختصاصی بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شناسایی شده است. عدم ردیابی *EHEC* به روش سنتی در مواد غذایی به‌طور قاطع نمی‌تواند دلیل بر عدم آلودگی *EHEC* بیماری‌زا باشد. مدفوع و آب‌های تصفیه نشده بیشترین منابع آلودگی مواد غذایی به این میکروب هستند (رضوی‌لر، ۱۳۸۲). تحقیقات مختلف نشان داده است ۱ تا ۵ درصد عفونت‌های ناشی از مواد غذایی با مصرف شیر و محصولات لبنی مرتبط است که ۵۳ درصد موارد عفونت‌های ناشی از مواد غذایی به‌علت پنیرهای آلوده می‌باشد (Mansuri Najand and Ghanbarpour, 2006). *EHEC* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> مهم‌ترین سویه‌های بیماری‌زای انسان معرفی شده است و سالانه باعث بروز چندین مورد مرگ و میر می‌شود. راه انتقال این سویه از طریق مواد غذایی به‌خصوص مواد غذایی با منشأ دامی از جمله شیر و فرآورده‌های آن، گوشت چرخ‌شده و همبرگر می‌باشد (بنیادیان و همکاران، ۱۳۸۶). غیر از گاو، مهم‌ترین مخازن طبیعی *EHEC* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> گوسفند، بز، خوک و شاید طیور هستند؛ لذا ممکن است مواد غذایی با منشأ دامی در حین کشتار و یا بعد از عمل‌آوری مجدداً آلوده شوند (Oksuz *et al.*, 2004). این باکتری از مدفوع گاوهای سالم نیز جداسازی شده است. بنابراین شیر و فرآورده‌های لبنی تولید شده از شیر دام‌های آلوده در صورت عدم پاستوریزاسیون می‌تواند باعث عفونت گردد (Oksuz *et al.*, 2004). اگرچه این باکتری در اثر حرارت پاستوریزاسیون نابود می‌شود، اما میزان پایداری آن در سایر فرآورده‌ها بالاست. برای مثال این باکتری تا ۸/۵ درصد نمک را تحمل نموده و بیش از ۵۰ روز در منبع

سرمی از آنتی‌سرم اختصاصی O (شرکت بهار افشان، ایران) استفاده گردید.

### یافته‌ها

بر اساس نتایج، از ۱۰۰ نمونه پنیر محلی مورد آزمایش، هیچ مورد مثبتی از *ای‌کولای* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> دیده نشد. اما سایر سروتیپ‌های *ای‌کولای* جداسازی شدند که شامل ۳۲ مورد سروتیپ‌های Non O<sub>157</sub> بود. در میان این سروتیپ‌ها دو مورد مربوط به سروتیپ‌های گروه ۱ (O<sub>26</sub>, O<sub>55</sub> و O<sub>111</sub>)، ۵ مورد مربوط به سروتیپ‌های گروه ۲ (O<sub>86</sub> و O<sub>127</sub>)، ۴ مورد مربوط به سروتیپ‌های گروه ۳ (O<sub>44</sub>, O<sub>125</sub>, O<sub>126</sub> و O<sub>128</sub>) و یک مورد مربوط به سروتیپ‌های گروه ۴ (O<sub>20</sub> و O<sub>114</sub>) بودند. تعداد ۲۰ سویه جدا شده نیز در هیچ یک از گروه‌های سرمی فوق نبودند. در جدول (۱) میزان آلودگی پنیرهای محلی مناطق مختلف روستاهای شهرستان مراغه نشان داده شده است.

آنتی‌بیوتیک سفکسیم کشت و در دمای ۳۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس یک لوپ از آن به محیط سوریتول مکانکی آگار (Merck, Germany) به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفکسیم و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر تلوریت پتاسیم منتقل شده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. برای جداسازی باکتری *ای‌کولای* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> کلنی‌های بی‌رنگ و برای جداسازی سایر گروه‌های سرمی *ای‌کولای*، کلنی‌های قرمز رنگ جداسازی شدند که پس از رنگ‌آمیزی گرم، تک کلنی‌ها به محیط نوترینت آگار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس آزمون IMViC و کشت در محیط‌های Eosin agar (Merck, Germany) و Triple Sugar Iron agar بر روی Methylene Blue نمونه‌ها انجام شد (Hitchins *et al.*, 1998) و در صورت تایید باکتری *ای‌کولای*، برای تعیین گروه‌های

جدول ۱- میزان (درصد) فراوانی گروه‌های مختلف *ای‌کولای* در پنیرهای محلی روستاهای شهرستان مراغه

منطقه	تعداد نمونه	درصد آلودگی	گروه‌های <i>ای‌کولای</i>	
			Non O <sub>157</sub>	O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub>
شمال	۵۴	٪۳۷/۰۳	۲۰	۰
جنوب	۱۰	٪۳۰	۳	۰
شرق	۳۵	٪۲۵/۷۱	۹	۰
غرب	۱	۰	۰	۰

است و در صورت مهیا شدن شرایط، تکثیر خواهد یافت (بنیادیان و همکاران، ۱۳۸۶). اصلانی و بوذری گزارش کردند که *ای‌کولای* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> در اکثر عفونت‌های غذایی و فرآورده‌های گاوی استان‌های مازندران و گلستان دخیل بوده است (Aslani and

### بحث و نتیجه‌گیری

حضور باکتری *ای‌کولای* در آب و غذا به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی پاتوژن‌های روده‌ای دیگر پذیرفته شده است. *ای‌کولای* حتی اگر به تعداد کم در غذا موجود باشد دارای توانایی بیماری‌زایی

2004). مطالعات سایر محققین در نقاط دیگر نیز نشانگر این می‌باشد که میزان فراوانی سروتیپ O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> در مواد غذایی و فرآورده‌های لبنی در حد بالایی نمی‌باشد (Gillespie and O'Brien, 2005). محمدی ثانی (۱۳۸۸) آلودگی پنیرهای موجود در سطح توزیع شهرستان مشهد و قوچان به باکتری ای‌کولای را ۷/۹ درصد گزارش کرد. در تحقیقی که توسط شیدفر و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت ۵۱ درصد آلودگی با باکتری ای‌کولای در پنیرهای محلی ایرانی مشاهده شد (Shidfar et al., 2004). منصورى نژند و قنبرپور (۲۰۰۶) گزارش کردند که ۹۸/۷ درصد از پنیرهای محلی به باکتری ای‌کولای آلوده بوده که در این میان ۱۹/۴۸ درصد از سویه‌های جدا شده انتروپاتوژن بودند (Mansuri Najand and Ghanbarpour, 2006).

در مطالعه اخیر ۳۲ سویه باکتری ای‌کولای (۳۲٪) از نمونه‌های پنیر محلی شناسایی شد. در بین سروتیپ‌های جدا شده در هر گروه، برخی انتروپاتوژن O<sub>126</sub>، O<sub>125</sub>، O<sub>128</sub>، O<sub>44</sub>، O<sub>114</sub>، O<sub>86</sub>، O<sub>127</sub> و O<sub>55</sub> و برخی انتروتوکسیژن (O<sub>20</sub>) و سویه‌هایی انتروهموراژیک (O<sub>26</sub> و O<sub>111</sub>) بودند. تعداد ۲۰ سویه جدا شده نیز در هیچکدام از گروه‌های سرمی فوق جای نداشتند. با توجه به این که در مطالعه حاضر سویه‌های دیگری به جز O<sub>157</sub> از پنیرهای محلی جدا شده است به‌درستی نمی‌توان در خصوص بیماری‌زا بودن این سویه‌ها اظهار نظر کرد.

با توجه به عدم جداسازی ای‌کولای O<sub>157</sub> پنیرهای محلی تولید شده در روستاهای شهرستان مراغه، پیشنهاد می‌گردد در مطالعه‌ای میزان آلودگی شیر و مدفوع نشخوارکنندگان این منطقه با ای‌کولای O<sub>157</sub> مورد

(Bouzari, 2003). بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، میزان آلودگی پنیرهای محلی تولید شده در روستاهای شهرستان مراغه به باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub> صفر برآورد گردید که این گزارش با نتایج بسیاری از محققین که شیوع این نوع آلودگی را محدود گزارش نموده‌اند، مطابقت دارد. بنیادیان و همکاران (۱۳۸۶) میزان آلودگی شیرهای خام استان چهارمحال و بختیاری به باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> را ۴/۵ درصد گزارش کردند که از جدایه‌های مزبور سروتیپ O<sub>157</sub> جدا شد. اما هیچکدام از سروتیپ‌های جدا شده دارای آنتی ژن H<sub>7</sub> نبودند. در مطالعه‌ای در کشور اسپانیا که در مورد وقوع ای‌کولای تولید کننده شیگاتوکسین در پنیرهای گوسفندی انجام شد، باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> از نمونه‌های پنیر جداسازی نشد (Caro and Garcia, 2007). در مطالعه‌ای در کشور آمریکا که برای تعیین میزان شیوع پاتوژن‌های شیر در ۱۳۱ گله گاو شیری مورد بررسی قرار گرفت، باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> از نمونه‌های شیر تانک‌ها جدا نشد (Jayavao and Henning, 2001). در تحقیقی در کشور ترکیه که بر روی شیوع پاتوژن‌های با منشأ مواد غذایی بر روی پنیر Van Otlu صورت گرفت، شیوع صفر درصد باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> از نمونه‌های پنیر گزارش شد (Tekinsen and Ozdemir, 2005). Coia کویا و همکاران در تحقیقی در کشور اسکاتلند میزان آلودگی شیر خام گاو و پنیرهای حاصله از شیر خام به باکتری ای‌کولای O<sub>157</sub> را صفر درصد گزارش کردند (Coia et al., 2001). در تحقیقی که توسط اوکسوز و همکاران در کشور ترکیه صورت گرفت ای‌کولای O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> در ۴ درصد از پنیرهای سفید گزارش شد (Oksuz et al.,

بررسی قرار گیرد. همچنین با توجه به اینکه سوبه‌های دیگری از ای‌کولای از نمونه‌های پنیر محلی جدا شده است، لذا بررسی بیماری‌زایی این سوبه‌ها با مطالعه ژن‌های حدت آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

## منابع

- بنیادیان، مجتبی؛ مشتاقی، حمدالله؛ شمس اسفندآبادی، ناصر؛ زهرایی صالحی، تقی و فردیپور، آزاده (۱۳۸۶). مطالعه میزان آلودگی شیرهای خام استان چهارمحال و بختیاری به باکتری *اشریشیا کلی* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>. مجله دامپزشکی ایران، سال سوم، شماره ۲، صفحات: ۱۱-۵.
- رضویلر، ودود (۱۳۸۲). میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۹۰-۸۴.
- محمدی ثانی، علی (۱۳۸۸). بررسی آلودگی‌های پنیرهای موجود در سطح توزیع شهرستان مشهد و قوچان به پاتوژن‌های لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی. علوم غذایی و تغذیه. سال ششم، شماره ۴، صفحات: ۵۹-۵۳.
- Aslani, M. and Bouzari, S. (2003). An epidemiological study on verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan Provinces). *European Journal of Epidemiology*, 18:345- 349.
- Hitchins, A.D., Feng, P., Watkins, W.D., Rippey, S.R. and Chandler, L.A. (1998). *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, In: Jackson, G.J., Merker, R.I., Bandler, R. (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. FDA publication, USA, pp. 68-104.
- Caro, I. and Garcia-Armesto, M.R. (2007). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 410-413.
- Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J. and Hanson, M.F. (2001). A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O<sub>157</sub> in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology*, 66: 63-69.
- Gillespie, I.A. and O'Brien, S.J. (2005). Food borne general outbreaks of shigatoxin-producing *E.coli* O<sub>157</sub> in England and Wales. *Epidemiology Infection*, 133(5): 803-808.
- Jayavao, B.M. and Henning, D.R. (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 84 (10): 2157-62.
- Mansuri Najand, L. and Ghanbarpour, R. (2006). A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. *Veterinarski Arhiv*, 76 (6): 531-536.
- McClure, P. (2000). The impact of *E. coli* O<sub>157</sub> on the food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 749-755.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.
- Oksuz, O., Arici, M., Kurultay, S. and Gumus, T. (2004). Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, 15: 453-456.
- Shidfar, R. F., Amery, A., Sadeghifar, A. and Jalilian, N. (2004). A survey on aflatoxin M<sub>1</sub> and bacterial contamination on domestic Iranian cheese in Ilam from 2002 to 2004. *National Congress on Food Hygiene and Safety*. 21-23 Dec, Yazd, Iran.

- 
- Tekinsen, K. and Ozdemir, Z. (2005). Prevalence of food borne pathogens in Turkish Van Otlu (Herb) cheese. *Food Control*, 17: 707–711.

## Seroprevalence of *Escherichia coli* in traditional cheeses manufactured in Maragheh rural

Mahdavi, S.

Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

\*Corresponding author email: s.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

(Received: 2014/4/17 Accepted: 2015/3/8)

### Abstract

Coliforms and *Escherichia coli* are major microbial indicators in the accessing the quality of foodstuffs. The presence of these bacteria in foods is considered as an indication of fecal contamination. *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> is the most pathogenic strain that is transmitted to human through animal-foods. This study was performed on 100 traditional cheese samples manufactured in Maragheh rural to determine the seroprevalence of *E. coli*. The samples were analyzed with standard microbiological methods followed by biochemical confirmatory tests. Afterwards, the isolates were assayed for the detection of O-serotypes using direct agglutination method. Among the 100 cheese samples, *E. coli* O<sub>157</sub> serotype was not detected in any sample. However, other *E. coli* serotypes including 32 isolates of non-O<sub>157</sub> serotypes were detected. Among the isolates, enteropathogenic, enterotoxigenic and enterohaemorrhagic serogroups was also detected.

**Key words:** *Escherichia coli*, Farmhouse cheese, Maragheh