مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۳، ۲۲۸ - ۲۲۳

مطالعه ژن‌های حدت سویه‌های وروتوکسین زای باکتری اشریشیاکلی جدا شده از شیرهای خام و پنیرهای غیر پاستوریزه

مجتبی بنیادیان[1*] تقی زهرایی صالحی[2] محمد رضا محزونیه[3] فروغ اخوان طاهری[4]

۱) گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده بیماری های مشترک، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۳) گروه پاتوبیولوژی، پژوهشکده بیماری های مشترک، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

(دریافت مقاله: ۷ شهریور ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۱۲ اسفند ماه ۱۳۸۹)

چکیده

اشریشیاکلی وروتوکسیژن شامل سویه‌هایی است که دارای ژن‌های stx_1 و stx_2 می‌باشند که هرکدام نقشی در بیماریزایی باکتری *E. coli* دارند. این سویه‌ها باعث بروز اسهال خونی، سندرم همولیتیک اورمیک و ترومبوسایتوپنی پورپورا می‌شود. ازآنجایی که احتمال وجود باکتری *E. coli* و سویه‌های وروتوکسین زا در مواد غذایی گوناگون از جمله شیر و پنیر زیاد است و به لحاظ اهمیت زیاد این سویه‌ها در بهداشت انسان، در همین راستا این مطالعه جهت بررسی فراوانی سویه‌های وروتوکسین زای اشریشیاکلی در شیر و پنیرهای غیر پاستوریزه، با روش PCR طراحی و به اجرا درآمد. در این بررسی ۲۰۰ نمونه شیر غیر پاستوریزه و ۸۰ نمونه پنیر غیر پاستوریزه مورد آزمون قرار گرفت که ۳۸ جدایه باکتری اشریشیاکلی از نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه و ۱۴ جدایه باکتری اشریشیاکلی از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه جداگردید. جدایه‌های *E. coli* جداشده از نظر وجود سروتیپ O157:H7 و ژن‌های stx_1، stx_2، *eaeA* و *hlyA* توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از بین ۳۸ جدایه باکتری *E. coli* جداشده از نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه، ۲ سروتیپ O157:H7 جداگردید که هردو واجد ژن‌های stx_2، *eaeA* و *hlyA* بودند. همچنین یک جدایه غیر O157 نیز واجد ژن stx_2 شناسایی گردید. هیچ یک از جدایه‌ها واجد ژن stx_1 نبودند. از بین ۱۴ جدایه باکتری *E. coli* جداشده از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه، هیچ کدام واجد ژن‌های مذکور نبودند و سروتیپ O157:H7 نیز جدا نگردید.

واژه‌های کلیدی: شیر، پنیر، اشریشیاکلی، وروتوکسین.

مقدمه

باکتری اشریشیاکلی باکتری میله‌ای گرم منفی است که به عنوان شاخصی برای تعیین آلودگی مدفوعی آب و مواد غذایی و حضور پاتوژن‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای سویه‌های مختلفی است که، انواع پاتوژن آن در ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوان دخیل بوده و نقش مهمی در بهداشت عمومی ایفا می‌کنند. اشریشیاکلی‌های تولید کننده شیگا توکسین (STEC) به عنوان پاتوژن غذایی مهم مطرح می‌باشند و موجب بیماری‌هایی از قبیل اسهال خونی، کولیت هموراژیک، سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) و ترومبوسایتوپنی پورپورا (TTP) می‌شوند (۱۱،۱۸). STEC دارای توکسین‌ها و عوامل بیماریزای مختلفی بوده که ساخت هر کدام از آنها توسط ژن‌های خاصی کنترل می‌شود. یکی از انواع اشریشیاکلی‌های پاتوژن سویه‌های خونریزی دهنده روده‌ای (EHEC۵) می‌باشد. EHEC که گاهی به نام اشریشیاکلی‌های مولد وروتوکسین یا VTEC[6] نیز شناخته می‌شوند، توانایی تولید فاکتورهای چسبندگی و شیگا توکسین را دارند، که توسط ژن‌های *eaeA*، *hlyA*، stx_1 و stx_2 کد می‌شوند (۱۵). سروتیپ O157:H7 که در گروه EHEC قرار دارد، دارای اهمیت ویژه‌ای است که علتش توانایی برای فرار از شرایط اسیدی است که برای *E. coli* کشنده می‌باشد. چندین ساختار و فرآورده تولیدی اشریشیاکلی، با نقش قطعی یا بالقوه، در بیماریزایی باکتری در روده و دیگر بافت‌ها وجود دارد. ساختارها را، تاژک، کپسول، دیواره سلولی و پیلی و فرآورده‌ها را، کولیسین‌ها، انتروتوکسین‌ها، سیتوتوکسین‌ها، همولیزین و آئروباکتین شامل می‌گردند (۲۱).

در ایران نیز مواردی از وجود اشریشیاکلی وروتوکسیژن در انسان به ثبت رسیده است، به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در تهران در سال ۲۰۰۵ انجام شد، ۱۵ درصد از موارد وقوع اسهال کودکان از نظر وجود اشریشیاکلی وروتوکسیژن مثبت بودند (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۳ مشخص گردید که در شمال ایران ۰/۷ درصد از جمعیت با اشریشیاکلی وروتوکسیژن آلوده هستند (۴). در سال ۱۹۹۸ طی مطالعه‌ای در غرب ایران ۴/۹ درصد از نمونه‌های مدفوعی از نظر اشریشیاکلی وروتوکسیژن مثبت بودند (۵)

با توجه به گزارشات موجود از آنجایی که احتمال وجود باکتری اشریشیاکلی و سویه‌های وروتوکسین زا در مواد غذایی بخصوص شیر و فراورده‌های آن زیاد است و فرآورده‌های خام از قبیل گوشت، شیر و پنیر غیر پاستوریزه از مخازن معمول این پاتوژن می‌باشند و به لحاظ اهمیت زیاد

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۰۱، نمابر: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۷ Email: boniadian@vet.sku.ac.ir

این سویه‌ها در بهداشت انسان، مطالعه حاضر طراحی تا فراوانی سویه‌های وروتوکسین زای باکتری اشریشیاکلی را در شیر و پنیر غیر پاستوریزه توسط روش PCR مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

جداسازی اشریشیاکلی از نمونه‌های شیر خام و پنیر غیر پاستوریزه: در طی بهار و تابستان سال ۱۳۸۶-۸۰ نمونه (۲۰۰ نمونه شیر خام به حجم ۲۰۰ میلی لیتر و ۸۰ نمونه پنیر غیر پاستوریزه به وزن ۲۰۰ گرم) از مناطق مختلف استان چهار محال و بختیاری بطور تصادفی از مراکز جمع آوری شیر، کارخانجات شیر پاستوریزه و فروشگاهها اخذ گردید. بر روی نمونه‌ها با استفاده از محیط‌های کشت آبگوشت اشریشیا، مک کانکی آگار، سوربیتول مک کانکی آگار، SIM و TSB، آزمون‌های میکروبی برای جدا سازی باکتری اشریشیاکلی صورت گرفت (۱۳). جدایه‌ها برای انجام آزمون PCR در محیط TSB نگهداری شدند.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB گرمخانه گذاری گردیدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل با ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB حاوی باکتری، به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس جهت استحصال DNA، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند (۱۴). در هر مورد از ژن‌های مورد بررسی از اشریشیا کلی که از نظر آن ژن مثبت بود استفاده گردید.

آماده کردن مخلوط PCR: جهت یکنواخت کردن شرایط در آزمایش و برای کاهش دفعات استفاده از سمپلر و باز و بسته کردن درب تیوب‌ها و انتقال آلودگی در نمونه‌های مورد آزمایش، مخلوط اصلی (Mixture PCR) تهیه گردید. بدین ترتیب که تعداد نمونه‌ها همراه با کنترل منفی (آب مقطر استریل) و کنترل مثبت (باکتری اشریشیا کلی)، با احتساب یک نمونه بیشتر محاسبه شد. پس از محاسبه مواد لازم Buffer10X (PCR)، dNTPMix، MgCl2، Taq Polymerase و پرایمر ها (رابه ترتیب در داخل تیوب ۱/۵ میلی لیتر (به جز DNA الگو) ریخته و مخلوط را به مدت چند ثانیه در دور پائین سانتریفوژ نموده تا مواد به خوبی با هم مخلوط گردند. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ و غلظت مواد موجود در واکنش در جدول ۲ آورده شده است. سپس از تیوب حاوی مخلوط PCR به میزان ۲۳ میکرولیتر در تیوب‌های ۰/۲ سی سی که قبلا شمارهٔ نمونه‌ها روی آنها نوشته شده ریخته و در نهایت ۲ میکرولیتر DNA استخراجی به آنها اضافه کرده (جدول ۲) و مجددا به مدت چند ثانیه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ می‌گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل در کنار یخ انجام می‌گیرد. سپس نمونه‌ها را به دستگاه ترمال سایکلر شرکت Techne منتقل گردید.

آزمایش PCR: آزمون PCR نمونه‌ها به ترتیب ذیل انجام شد. دو دقیقه در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت اولیه، ۶۰ ثانیه در دمای ۹۰ درجه، ۶۰ ثانیه در دمای اتصال، ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه. سیکل‌ها در ۳۵ نوبت تکرار گردید (۱۴). پس از اتمام سیکل‌ها بر روی نمونه‌ها الکتروفورز انجام شد.

الکتروفورز محصول PCR: پس از تهیه ژل آگارز ۱ درصد و ریختن آن به درون کاست‌های مخصوص الکتروفورز و اضافه کردن مخلوط محصول PCR و Loading dye به گوده‌ها، کاست در داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت. پس از انجام الکتروفورز، ژل به دستگاه ترانسلومیناتور منتقل شد و عکس برداری صورت گرفت و وزن مولکولی باندهای DNA روی ژل با توجه به نشانگر وزن مولکولی، تعیین گردید (۹).

نتایج

در این مطالعه تعداد ۲۸۰ نمونه شامل، ۲۰۰ نمونه شیر خام از گاوداری‌ها و ۸۰ نمونه پنیر غیر پاستوریزه از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری اخذ گردید. از بین این تعداد، ۳۸ جدایه اشریشیاکلی از نمونه‌های شیرخام و ۱۴ جدایه اشریشیاکلی از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه (۵۲ جدایه باکتری اشریشیاکلی) جدا شد و ژن‌های حدت آنها توسط آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفت.

از بین ۳۸ باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های شیر خام، تعداد ۲ جدایه (۱ درصد) اشرشیاکلی O157:H7 تشخیص داده شدند، اما هیچ کدام از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه به باکتری اشریشیا کلی O157:H7 آلوده نبودند (جدول ۳).

از بین ۳۸ باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های شیر خام، هیچ کدام واجد ژن stx_1 نبودند، ۳ جدایه (۷/۸۹ درصد) واجد ژن stx_2 و ۲ جدایه (۵/۲۶ درصد) واجد ژن *eaeA* و ۲ جدایه واجد ژن *hlyA* بودند. هیچ یک از باکتری‌های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه واجد ژن‌های stx_1، stx_2، *eaeA* و *hlyA* نبودند (جدول ۴). همچنین مشخص گردید که هر دو جدایه O157:H7 واجد ژن‌های stx_2، rfb، *eaeA* و *hlyA* می‌باشند (تصویر ۱،۲،۳،۴).

بحث

سویه‌های وروتوکسین زای باکتری اشریشیاکلی بخصوص سروتیپ O157:H7 از جمله باکتری هایی می باشند که در سال های اخیر باعث بروز همه‌گیری‌هایی در برخی از نقاط جهان شده است و به این دلیل توجه محققان و دست اندرکاران امور بهداشتی را به خود جلب نموده اند.

در سال ۱۹۹۷ سروتیپ O157:H7 از ۸/۲-۰/۹ درصد از دام‌های سالم جداسازی گردید و به همین دلیل دام‌ها می توانند منبع مهمی جهت این عفونت باشند (۶). در مطالعه‌ای در پنسیلوانیا ۲۴۸ نمونه شیر از نظر وجود پاتوژن‌های غذایی مورد آزمایش قرار گرفتند و نشان داده شد که ۲/۴ درصد از نمونه‌ها واجد STEC هستند (۸). در تحقیقی ۴ مورد سندرم

جدول ۱- طول و توالی پرایمرهای به‌کار رفته در این مطالعه، اندازه قطعات مورد انتظار و دماهای اتصال مربوط به هر ژن.

ژن هدف	پرایمر	اولیگونکلئوتید('3-'5)	وزن (bp)	دمای اتصال	رفرانس
STx_1	VT1-F	5'-CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC-3'	302	64	Ray(2002)
	VT1-R	5'-CGTGGTATAGCTACTGTCACC-3'			
STx_2	VT2-F	5'-CTTCGGTATCCTATTCCCGG-3'	516	64	Ray(2002)
	VT2-R	5'-CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC-3'			
rfbE	O157-F	5'-CGGACATCCATGTGATATGG-3'	259	58	Ray(2002)
	O157-R	5'-TTGCCTATGTACAGCTAATCC-3'			
eaeA	*EAE*-F	5'-GAGAATGAAATAGAAGTCGT-3'	775	50	Ray(2002)
	EAE-R	5'-GCGGTATCTTTCGCGTAATCGCC-3'			
ehxA	*HLY* A-F	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3'	1551	61	Yamamoto(1995)
	HLY A-R	5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'			

جدول ۲- مقدار و غلظت مواد مورد نیاز برای انجام PCR برای یک نمونه در حجم ۲۴ میکرولیتری.(مقادیر فوق به منظور انجام PCR برای یک نمونه می‌باشد).

مواد	مقدار	غلظت نهایی
PCR Buffer10X	۲/۵µl	-
MgCl	۲۰/۷۵µl	۲/۵mmol
dNTP	۱µl	۱۰mmol
Reverse primer	۱/۵µl	۲۰pmol
Forward primer	۱/۵µl	۲۰pmol
Taq DNA polymerase	۰/۲۵µl	۰/۵u
DNA	۲µl	۱۰pg
Distilled water	۱۴/۵µl	-

جدول ۳- تعداد جدایه‌های اشریشیاکلی و تعداد سروتیپ O157:H7 جدا شده از نمونه‌های شیر خام و پنیر غیر پاستوریزه.

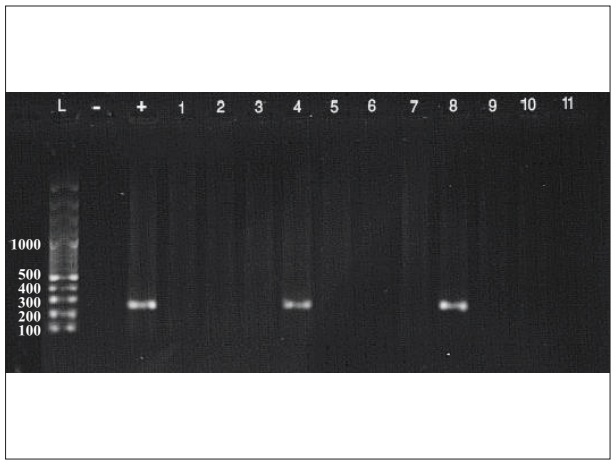
نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد جدایه‌های اشریشیاکلی	تعداد سروتیپ O157:H7 جداشده
شیر	۲۰۰	(٪۱۹)۳۸	(٪۱)۲
پنیر	۸۰	(٪۱۷/۵)۱۴	_
کل	۲۸۰	(٪۱۸/۵۷)۵۲	(٪۰/۷۱)۲

جدول ۴- جدایه‌های اشریشیاکلی واجد ژن‌های rfb، *stx*1، *stx*2، *eae*A و *hly*A از نمونه‌های شیر خام و پنیر غیر پاستوریزه.

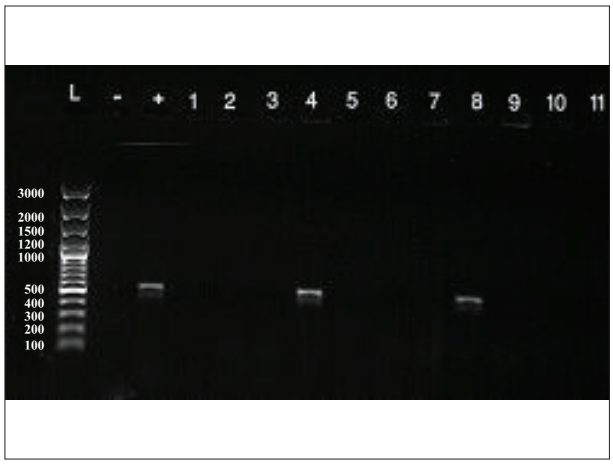
نوع نمونه	تعداد نمونه	جدایه‌های اشریشیاکلی	جدایه‌های واجد ژن 2 stx	جدایه‌های واجد ژن *eaeA*	جدایه‌های واجد ژن *hlyA*	جدایه‌های O157:H7 و جدژن‌های rfb stx_2، *eaeA* *hlyA*
شیر	۲۰۰	(٪۱۹)۳۸	(٪۷/۸۹)۳	(٪۵/۲۶)۲	(٪۵/۲۶)۲	(٪۵/۲۶)۲
پنیر	۸۰	(٪۱۷/۵)۱۴	-	-	-	-
کل	۲۸۰	(٪۱۸/۵۷)۵۲	(٪۵/۷۶)۳	(٪۳/۸۴)۲	(٪۳/۸۴)۲	(٪۳/۸۴)۲

HUS در بین بچه‌ها مشاهده شد که همگی آنها دارای تیتر بالایی از آنتی بادی علیه O157 بودند. همگی بچه‌ها چند روز قبل از بیماری از شیر غیر پاستوریزه بز یک مزرعه مصرف کرده بودند. در مطالعات بعدی مشخص شد که ۵ نفر (۳۳درصد) از ۱۵ نفری که از این شیرها استفاده کردند دچار بیماری شدند که وروتوکسین اشریشیاکلی و سروتیپ O157:H7 از این افراد جدا شد(۳).

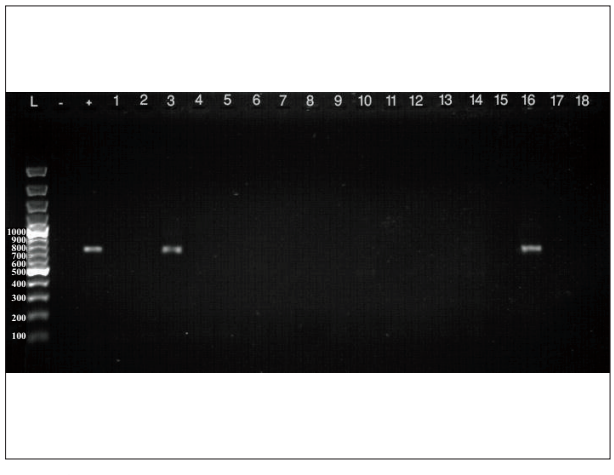
در تحقیق حاضر از ۳۸ جدایه باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های شیر خام، ۲ سویه O157:H7 جدا گردید که این دو سویه واجد ژن‌های stx_2، *eaeA* و *hlyA* بودند. همچنین یک جدایه که فقط واجد ژن stx_2 بود نیز جدا گردید(جدول ۳). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ در اسپانیا بر روی سویه‌های اشریشیاکلی تولید کننده شیگا توکسین جدا شده از تانک‌های شیر و پنیر تازه صورت گرفت مشخص شد که فقط سروتیپ O157:H7 واجد ژن *eaeA* است(۱۷). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Karns و همکارانش انجام شد، جدایه‌های اشریشیا کلی جدا شده از شیر از نظر وجود ژن‌های مختلف کد کننده فاکتورهای حدت مربوط به EHEC با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ۳۶ جدایه که واجد ژن *eaeA* بودند جهت تایید سویه O157:H7 مورد بررسی قرار گرفتند و نشان داده شد که از این تعداد ۵ جدایه O157:H7 هستند. همچنین یک جدایه O157:H7 که واجد ژن‌های stx_2، *eaeA* و *hlyA*



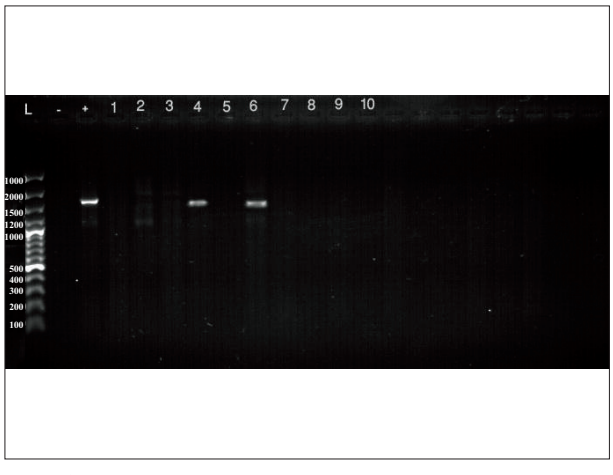
تصویر ۱- ژن rfbE باکتری O157:H7 جدا شده از شیر خام (باند مورد انتظار: ۲۵۹ جفت باز). L: DNA Ladder 100bp ـ شاهد منفی: آب مقطر استریل + شاهد مثبت: اشریشیا کلی O157:H7 چاهک‌های ۴ و ۸: نمونه‌های مثبت از نظر سروتیپ O157:H7.



تصویر ۲- ژن stx2 باکتری O157:H7 جدا شده از شیرخام (باند مورد انتظار: ۵۱۶ جفت باز). L: DNA Ladder 100bp ـ شاهد منفی: آب مقطر استریل. + شاهد مثبت: اشریشیاکلی دارای ژن stx2. نمونه‌های مثبت از نظر ژن stx2= چاهک‌های ۴ و ۸.



تصویر ۳- ژن *eaeA* باکتری O157:H7 جدا شده از شیر خام (باند مورد انتظار: ۷۷۵ جفت باز). L: DNA Ladder 100bp ـ شاهد منفی: اب مقطر استریل + شاهد مثبت: اشریشیاکلی دارای ژن *eaeA* نمونه‌های مثبت از نظر ژن *eaeA*: چاهک‌های ۳ و ۱۶.



تصویر ۴- ژن *hlyA* باکتری O157:H7 جدا شده از شیر خام (باند مورد انتظار: ۱۵۵۱ جفت باز). L: DNA Ladder 100bp ـ شاهد منفی: اب مقطر استریل + شاهد مثبت: اشریشیاکلی دارای ژن *hlyA* چاهک‌های ۴ و ۶: نمونه‌های مثبت از نظر ژن *hlyA*.

بود نیز جدا گردید(۱۰). در مطالعه‌ای که در ایرلند شمالی در سال ۲۰۰۳ انجام شد، ۴۲ نمونه شیر خام از نظر آلودگی به باکتری *E.coli* تولید کننده وروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های جدا شده در ۴ مورد واجد دو ژن stx_2 و *eaeA* بودند(۱۲). Fremaux و همکاران در سال ۲۰۰۶ در لیون فرانسه از ۹ درصد نمونه‌های شیر خام و پوست پستان گاوهای مورد مطالعه، سویه‌های وروتوکسیژن را جدا نمودند که ۴۶ درصد از این سویه‌ها حاوی ژن stx_1، ۸۶ درصد واجد ژن stx_2، ۲۹ درصد حاوی ژن *eae* و ۹۲ درصد واجد ژن *hly* بودند(۷).

علی رغم گزارشات متعدد در خصوص آلودگی پنیر به باکتری اشریشیاکلی O157:H7(۲)، در مطالعه حاضر از بین ۱۴ باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه هیچ کدام سویه O157:H7 نبودند و همچنین هیچ کدام واجد ژن‌های rfb، stx_1، stx_2، *eae* و *hly* نبودند. نتایج مطالعات سایر محققین نیز نشانگر این می باشد که میزان آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به سویه‌های وروتوکسیژن باکتری *E.coli* بسیار متفاوت است، با توجه به این‌که گاو یکی از مهمترین مخازن سویه O157:H7 باکتری اشریشیا کلی می باشد ولی مطالعات نشان داده است که این سروتیپ بطور مداوم از حیوانات آلوده دفع نمی شود (۱). از طرف دیگر تفاوت در شرایط اقلیمی و جغرافیایی و همچنین تنوع میزبان‌ها ممکن است در میزان آلودگی به سروتیپهای وروتوکسین زای باکتری اشریشیا کلی از جمله سروتیپ O157:H7 تأثیر گذار باشد (۷،۱۰،۱۲)، بنابراین آلودگی شیر این‌گونه حیوانات نیز به دنبال دفع تناوبی این سروتیپ صورت خواهد گرفت که این خود می تواند دلیلی برای پایین بودن میزان آلودگی شیر و پنیرهای مورد آزمون در این مطالعه باشد. لذا برای پی بردن به پراکندگی و شیوع واقعی این سروتیپ در بین گاوها و

همچنین شیر تولیدی، باید مطالعات طولی (Longitudinal) طراحی و به اجرا گذارده شود.

همچنین با توجه به اهمیت سروتیپهای وروتوکسین زای باکتری اشریشیا کلی و نتایج مطالعه حاضر و همچنین نتایج بدست آمده از سایر مطالعات پیشنهاد می‌گردد که بررسی‌های جامع تری بر روی سایر مواد غذایی و به ویژه سایر منابع حیوانی جهت دست یابی به میزان آلودگی و پراکندگی سویه‌های وروتوکسین زای باکتری اشریشیا کلی صورت پذیرد.

References

1. Aktan, K.A., Sprigings, K.A., Ragion, R.M. (2004). Charachterisation of attaching-effacing *E.coli* isolated from animals and slaughter in England and Wales. Vet. Microbiol. 102: 43-53.
2. Alves, D., Kamali, M. A. (1999). A 20-year population-based study of hemolytic syndrome: evidence for the importance of shiga-like toxin producing *E. coli*. Recent Advance in VTEC infractions. Infect. Immune. 65: 221-234.
3. Aslani MM, Badami N, Mahmoodi M, Bouzari S. (1998). Verotoxin-producing *E.coli* infection in randomly selected population of Ilam province (Iran). Scand. J. Infect. Dis. 30: 473-476.
4. Aslani, M.M., Bouzari, S. (2003). An epidemiological study on verotoxin- producing *E. coli* infection among population of northern region of Iran. Eur. J. Epidemiol. 18: 349-354.
5. Aslani, M.M., Badami, N., Mahmoodi, M., Bouzari, S. (1998). Verotoxin producing *E.coli* infection in randomly selected population of Ilam province (Iran). Scand. J. Infect. Dis. 30: 473-476.
6. Bielaszewska, M., Clarke, I., Kamaliu, M.A., Petric, M. (1997). Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-Like Toxins) 1 and 2 in rabbits immunized and toxin subunits. Infect. Immune. 65: 2509-2516.
7. Fremaux, B., Raynauld, S., Beutin, L. (2006). Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *E. coli* strains on French dairy farms. Vet. Microbiol. 117: 180-91.
8. Jayarao, B. M., Donaldson. S. C., Straley. B. A., Sawant. A.A., Hegde. N.V., Brown. J.L. (2006). A survey of foodborn pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. J. Dairy Sci. 89: 2451-2458.
9. Karimi, M. (2003). Priciple of PCR and Laboratory Applications. Andishe zohur press, Tehran, Iran.
10. Karns, J.S., Van Kessel, J.S., McClusky, B.J., Perdue, M.L. (2007). Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. J. Dairy Sci. 90: 3209-12.
11. Martin, M.L., Shipman, L.I., Wells, J.G. (1986). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two case of hemolytic uremic syndrome. Lancet. 2: 1043.
12. Mc Kee, R., Madden, R.H., Gil Mou, A. (2003). Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environment, J. Food Port. 66: 1576-80.
13. Mortazavi, A., Sadeghimahong, A. (2001). Modern Food Microbiology (Translated). Ferdowsi University Press, Mashhad, Iran.
14. Purnaghshband, Z. (2000). Principle of PCR Method. Sanam publication, Tehran, Iran.
15. Razavilar, V. (1998). Microbial Pathogens in Foods, Epidemiological aspects of Food Intoxications. Tehran University press. Tehran, Iran.
16. Rey, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Usera, M.A., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J. (2003). Serotypes, phage types and virulence,genes of shiga producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. Vet.Microbiol.94:47-56.
17. Rey, J., Sanchez, S., Blanco, J.E., Hermoso de Mendosa, J., Hermoso de Mendosa, M., Garsia, A., Gil,C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M. (2006). Prevalence , serotypes and virulence genes of shiga toxin-producing *E. coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int. J. Food Microbiol. 107: 207-12.

18. Robinson, R.K., Batt, Carl.A. (2000). Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego, Academic Press. San Digo, USA.
19. Salmanzade-Ahrabi, S., Habibi, E., Jaafari, F., Zali, M.R. (2005). Molecular epidemiology of *E. coli* diarrhea in children in Tehran. Ann. Trop. Paediatr. 25: 35-39.
20. Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex PCR. FEMS Immun. Med. Microbiol. 12: 85-90.
21. Zoughi, E., Hajikhani, R., Vandeyousofi, J. (2003). Pathogeneses of Bacterial Infections. Ghalamestan Honar Publication, Tehran, Iran.

J.Vet.Res. 66,3:223-228, 2011

VIRULENCE GENES OF VEROTOXIGENIC *E. COLI* ISOLATED FROM RAW MILK AND UNPASTURIZED CHEESE

Bonyadian, M.[1*], Zahraei Salehi, T.[2], Mahzounieh, M .R.[3], Akhavan Taheri. F.[4]

[1]*Department of Food Quality Control, Institute of Zoonoses Research, Faculty of VeterinaryMedicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Pathobiology, Institute of Zoonoses Research, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.*

[4]*DVM graduate, Facualty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.*

(Received 29 August 2010 , Accepted 3 March 2011)

Abstract:

Verotoxigenic strains of *E. coli* mostly contain one or both of stx_1 and stx_2 genes. Both of these genes play a role in pathogenicity of the bacteria. These strains cause bloody diarrhea, uremic haemolytic syndrome and purpura thrombocytopenia. Because of a high probability of the presence of verotoxigenic strains of *E. coli* in various foods, especially milk and cheese, and due to the importance of these strains to human health, we aimed to determine the presence of verotoxigenic strains of *E. coli* in unpasteurized milk and cheese by PCR. In this study, 200 samples of raw milk and 80 samples of unpasteurized cheese were collected, and verotoxigenic *E. coli* were isolated using selective media. PCR was used to determine some virulence genes including stx_1, stx_2, *eaeA* and *hlyA*. Thirty-eight and 14 *E. coli* samples were isolated from raw milk and unpasteurized cheese, respectively. The isolates were examined by PCR in order to find the O157:H7 specific DNA and stx_1, stx_2, eae and *hlyA* genes. Two out of 38 isolates originating from raw milk were typed as O157:H7, both of them containing stx_2, *eaeA* and *hlyA* genes. Another isolate, which was not O157:H7, also contained the stx_2 gene. No isolates possessed the stx_1 gene. None of the isolates originating from unpasteurized cheese samples contained any of the virulence genes.

Key words: milk, cheese, verotoxigenic *E. coli*.

***Corresponding author's email: boniadian@vet.sku.ac. ir, Tel: 0381-4424401, Fax: 0381-4424427**