مطالعه میزان شیوع و ژن‌های حدت *E.coli O157: H7* در پنیرهای سنتی و شیرهای خام عرضه شده در شهرستان مرند

عسگر نقی‌زاده[1]، حمید میرزائی[2*]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذائی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

***نویسنده مسؤل**: *hmirzaei@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۵

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع *اشریشیاکلی* O157:H7 و شناسائی ژن‌های بیماری‌زای *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hly* آنها در نمونه‌های پنیر سنتی و شیر خام عرضه شده در شهر مرند بود. برای این منظور ۱۰۰ نمونه پنیر و ۵۰ نمونه شیر خام گاو از سطح عرضه و مراکز جمع آوری شیر خام و به صورت تصادفی جمع آوری شد. نمونه‌ها در ECB حاوی مکمل نوبیوسین به عنوان محیط غنی کننده و سپس محیط مک کانکی آگار سوربیتول حاوی مکمل سفکسیم و تلئوریت پتاسیم به عنوان محیط انتخابی کشت داده شد. از محیط‌های VRBA، تریپتون و کروموژن آگار جهت ارزیابی تخمیر لاکتوز، تولید اندول و فعالیت بتاگلوکورونیدازی جدایه‌ها و از آنتی سرم اختصاصی جهت تائید *اشریشیاکلی* سروتیپ O157:H7 و از Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های حدت استفاده شد. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، تعداد ۹ جدایه (۹٪) مربوط به پنیر و ۵ جدایه (۱۰٪) مربوط به شیر خام به عنوان *اشریشیاکلی* سوربیتول منفی شناخته شدند و در نهایت بر اساس تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی از بین جدایه‌های مربوط به شیر خام یک مورد (۲٪) به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 مورد تایید قرار گرفت. تنها جدایه تائید شده به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 دارای ژن‌های حدت *eaeA* و *stx1* بود. در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان گفت که پنیرهای سنتی و شیرهای خام عرضه شده در شهرستان مرند می‌توانند به عنوان منبع انتقال این باکتری بیماری‌زا به انسان عمل نمایند.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی* O157:H7، پنیر سنتی، شیر خام، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

اشریشیا کلی سروتیپ O157:H7 یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده مسمومیت غذائی و بیماری‌هائی مانند اسهال خفیف، کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic colitis)، ترومبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورا (Thrombotic thrombocytopenic purpura)، سندرم اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome) و مرگ در انسان است (کارگر و همکاران، ۱۳۸۵).

گاوسانان به ویژه گوساله یکی از مخازن اصلی این باکتری است. همچنین حیواناتی مانند گوسفند، بز، آهو، خوک، گربه، سگ، جوجه و غاز به عنوان مخزن شناخته شده‌اند. تا کنون هیچ‌گونه بیماری‌زائی ناشی از این باکتری در حیوانات یاد شده گزارش نشده است. اما امکان انتقال باکتری از

حیوانات به انسان، از راه مستقیم، تماس با آب، خاک، فضولات نشخوارکنندگان و مصرف موادغذائی مانند شیرخام، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت خردشده، ساندویچ‌های گوشتی، سبزیجات و آب میوه‌ها (به‌ویژه آب سیب) وجود دارد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰).

عوامل مختلف از جمله ترشح سموم شبه شیگا (Stx1 و Stx2) یا وروتوکسن‌های (VT1 و VT2)، تولید پروتئینی به نام اینتیمین (Intimin) و نیز تولید آنتروهمولیزین به عنوان عوامل حدت در بیماری‌زائی شدید *اشریشیاکلی* سروتیپ O157:H7 در انسان مطرح می‌باشند (O'Brien and Holmes, 1987; Schmidt et al., 1994; Louie et al., 1993). آنتروهمولین توسط ژن hly A (Schmidt et al., 1994) و اینتمین توسط ژن eae A (Louie et al., 1993) کد می‌گردد. اینتیمین یک پروتئین با وزن مولکولی ۹۷ کیلودالتونی بوده و مسئول اتصال باکتری به سلول‌های اپی تلیال روده و ایجاد آسیب‌های خاص به نام اتصال و محو شدن (attachment-and-effacement) می‌باشد (Leotta et al., 2008). بطور کلی فرایند، فرایند بیماری‌زائی شامل مراحل استقرار باکتری در روده، ایجاد اسهال و آسیب‌های روده ای، جذب شیگاتوکسین، واکنش توکسین با بافت‌های میزبان و ایجاد پاسخ‌های التهابی است (Paton and Paton, 1998).

پنیر سفید سنتی عرضه شده در بازار مرند یک نوع پنیر رسیده نگهداری شده درآب نمک می‌باشد که بطور سنتی و معمولاً از شیر گوسفند و گاهی از شیر بز، شیر گاو و یا ترکیبی از آنها تهیه می‌شود. این پنیر دارای طعم نمکی یا شور، کمی اسیدی و دارای خصوصیات مطبوع ارگانولپتیکی بوده و از نظر خواص حسی بسیار شبیه به پنیر سنتی لیقوان، پنیر سفید ترکیه (Beyaz penir) و پنیر فتا (Feta) است (Mirzaei, 2011). در تولید سنتی این پنیر شیر خام با استفاده از رنت منعقد و لخته حاصله پس از آبگیری با استفاده از تجهیزات سنتی قطعه بندی شده و بعد از نمک پاشی دستی برروی میز در داخل حلب‌ها چیده شده و برروی آن آب نمک اضافه می‌گردد و پنیرهای تولید شده در داخل حلب‌ها دوره رسیدن را در طول ۶ الی ۸ ماه طی می‌کنند (Mirzaei, 2011).

در تولید سنتی این پنیر از شیر خام استفاده می‌شود و این امر در مواقعی که کیفیت بهداشتی شیر مناسب نباشد موجب وجود سوراخ‌ها و حفره‌های ناهمگن در پنیر می‌گردد که ظاهر آن را نا مرغوب ساخته و از طرف دیگر خطر انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را در بردارد و ضمنا بسیاری از مراحل تولید این پنیر بصورت دستی و با استفاده از تجهیزات سنتی اولیه انجام می‌پذیرد و تمام این موارد خطر بروز آلودگی این محصول با میکروب‌های مولد فساد، و بیماریزا از قبیل *بروسلا*، *سالمونلا*، *اشریشیا کولای*، استافیلوکوکوس آرئوس کوآگولاز مثبت و یا کپک‌ها و مخمرها را از طریق حیوان، محیط و بخصوص کارگران ناقل افزایش می‌دهند (Cetinkaya and Soyutemiz, 2006; Tamagnini et al., 2006; Mirzaei, 2011). لذا ارزیابی شاخص‌های میکروبی پنیرهای سنتی از نظر بهداشت، سلامت و قابلیت نگهداری ضروری به نظر می‌رسد (Meng et al., 2007).

هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع *اشریشیاکلی* سروتیپ O157:H7 و شناسائی ژن‌های بیماری‌زای *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hly* آنها در نمونه‌های پنیر سنتی و شیر خام عرضه شده در شهر مرند بوده است.

مواد و روش کار

نمونه برداری

در طول فصل بهار و تابستان سال ۱۳۹۲، تعداد ۱۰۰نمونه پنیر سنتی نگهداری داری شده در آب نمک از سطح بازار

شهر مرند و از هر کدام به مقدار۲۰۰ گرم و ۵۰ نمونه شیر خام از ۵ مرکز جمع آوری شیر و از هرکدام ۲۵۰ میلی لیتر خریداری و در ظروف شیشه‌ای سترون و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.

کشت نمونه‌ها

هر کدام از نمونه‌ها همگن سازی شده و ۱۰ گرم از نمونه‌های پنیر و ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های شیر به ۹۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت *اشریشیا* (E.coli broth= ECB) شرکت Oxoid حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نووبیوسین (Sigma) تلیقح گردید و مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده (کارگر و همکاران، ۱۳۸۹) و سپس به ازای هر ارلن ۲ پلیت حاوی محیط سوربیتول مکانگی آگار (Sorbitol- Agar=SMCA MacConkey) شرکت Lab.M حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفیکسیم و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تلوریت پتاسیم در نظر گرفته شد و با آنس استریل یک حلقه از محتویات ارلن روی پلیت به صورت خطی کشت و پلیت‌های حاصله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها از نظر وجود پرگنه‌های بیرنگ و پایه رنگ محیط (سوربیتول منفی) مورد ارزیابی قرار گرفت (بنیادیان، ۱۳۸۶ و کارگر و همکاران، ۱۳۸۹). سپس در هر پلیت تا ۵ عدد از پرگنه‌های سوربیتول منفی انتخاب و هر کدام بصورت جداگانه در محیط نوترینت آگار بصورت خطی کشت و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد تا پرگنه‌های مجزا حاصل گردد. در ادامه به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تولید اندول پرگنه‌های حاصله به ترتیب بر روی محیط VRBA (Merk) و در محیط تریپتون/ تریپتوفان کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (کارگر و همکاران، ۱۳۸۹). هم چنین به منظور تائید جداسازی سروتیپ *E. coli* O157:H7 فعالیت بتاگلوکورونیدازی باکتری‌ها در محیط کروموژن Chrom Agar *E. coli* O157:H7 ارزیابی گردید. و در نهایت به منظور تایید نهائی، جدایه‌های MUG منفی خالص شده در مرحله قبل، از تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی *E. coli* O157:H7 (Difco USA) استفاده گردید (کارگر و همکاران، ۱۳۸۵).

استخراج DNA با استفاده از کیت DNA^{TM} (شرکت سیناژن) انجام گردید. برای ردیابی همزمان ژن‌های حدت *stx1* و *stx2* (مربوط به تولید شیگاتوکسین)، ژن *eaeA* (مربوط به قدرت اتصال باکتری به جدار سلول‌های اپیتلیال روده) و ژن *hlyA* EHEC (مربوط به تولید آنتی ژن فلاژلی H7) ازروش و پرایمرهای مورد استفاده فاقان و همکاران طبق جدول یک و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چند تائی (Multiplex PCR) استفاده گردید (Fagan et al., 1999).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های حدت *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA* EHEC

پرایمر	توالی اولیگونوکلئوتیدها(5'-3')	اندازه باند مورد انتظار
stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614 bp
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG	
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	
eaeA-F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	890
eaeA-R	CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	
hlyA-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	165
hlyA-R	CTTCACGTGACCATACATAT	

در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۳ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر یک شامل۲۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (مرحله ذوب)، ۴۰ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد (محله چسبیدن پرایمر) و ۹۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (مرحله ساخته شدن رشته مکمل DNA الگو) می‌باشد، اعمال گردید. در پایان سیکل‌ها نیز به مدت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال و پس از رسیدن دمای محتویات میکروتیوب‌ها به ۵ درجه سانتی‌گراد، محصولات PCR از دستگاه ترموسایکلر خارج گردیدند(Fagan et al., 1999).

۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۲ درصد بارگذاری و پس از انجام الکتروفورز به مدت حدود یک و نیم ساعت با ولتاژ حدود ۸۵ mV، از باندهای حاصله زیر اشعه UV عکس برداری شد. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از نشانگر با اندازه kbp ۱ تولیدی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی و ۵۰ نمونه شیرخام آزمایش شده، از ۸۰ نمونه در محیط CT-SMAC، پرگنه‌های سوربیتول منفی جداسازی شد و بر اساس ارزیابی تخمیر لاکتوز و تولید اندول توسط جدایه‌ها در محیط‌های VRBA و تریپتون تعداد ۹ جدایه (۹٪) مربوط به پنیر و ۵ جدایه (۱۰٪) مربوط به شیر خام به عنوان اشریشیاکلی سوربیتول منفی شناخته شدند و در نهایت بر اساس تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی از بین جدایه‌های مربوط به شیر خام یک مورد (۲٪) به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 مورد تایید قرار گرفت و از بین جدایه‌های مربوط به پنیر هیچ کدام به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 مورد تائید قرار نگرفتند. تنها جدایه تائید شده به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 دارای ژن‌های حدت *eaeA* و *stx1* بود

بحث

براساس نتایج این تحقیق از مجموع نمونه‌های پنیرهای سنتی و شیرهای خام، فقط یک مورد (۲٪) از شیرهای خام، آلوده به *اشریشیاکلی* O157:H7 تشخیص داده شد.

تحقیقات صورت گرفته درخصوص میزان شیوع *اشریشیاکلی* O157:H7 در شیر و فرآورده‌های شیری در کشورهای مختلف جهان، شهرهای مختلف کشورها و نیز در مناطق مختلف جغرافیائی ایران نتایج متفاوتی را نشان داده‌اند.

Heuvelink و همکاران (۱۹۹۸) و Coia و همکاران (۲۰۰۱) طی مطالعات جداگانه بر روی نمونه‌های شیر خام

در هلند و اسکاتلند گزارش کردند که در هیچکدام از نمونه‌ها *اشریشیاکلی* O157:H7 جدا نشد. همچنین نتایج مشابه در مطالعات صورت گرفته توسط Ansay و Kaspar (۱۹۹۷) روی ۴۲ نمونه شیر گاو در امریکا و توسط Hancock و همکاران (۱۹۹۴) روی ۶۰۳ نمونه شیرخام در واشنگتن گزارش شده است.

Alleberger و همکاران در سال ۱۹۹۷ در استرلیا، Klie و همکاران در سال ۱۹۹۷ در آلمان، میزان شیوع این باکتری را در شیرخام گاو به ترتیب ۳٪ ، و۰/۳٪ گزارش کردند (Alleberger et al., 1997., Klie et al., 1997). Rey و همکاران (2006) ضمن مطالعه ۵۰۲ نمونه از شیرهای گوسفند، بز و سایر فراورده‌های شیری در اسپانیا۰/۳٪ از نمونه‌ها را آلوده به *اشریشیاکلی* O157:H7 گزارش کردند. Dontorou و همکاران (2003) شیوع *Escherichia coli* O157:H7 در نمونه‌های شیر خام گوسفندی عرضه شده در کشور یونان را ۱٪ گزارش کردند (Dontorou et al., 2003).

Oksuz و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه، ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۵۰ نمونه پنیر سفید حاصله از شیر خام را مورد مطالعه قرار داده و گزارش کردند که به ترتیب ۱ و ۴٪ از آنها به *E. coli* O_{157} آلوده بودند. براساس تحقیق صورت گرفته توسط Cagri-Mehmtoglu و همکاران (۲۰۱۱) روی ۲۶۴ نمونه از شیرهای خام و پنیرهای عرضه شده در ترکیه، فقط یک نمونه از شیرهای خام آلوده به *E. coli* O157:H7 گزارش شده است (Cagri- Mehmetoglu et al., 2011). این مطالعه با تحقیق ما که *اشریشیاکلی* .:O157 در ۲٪ از شیرهای خام و در هیچکدام از نمونه‌های پنیر مشاهده نگردید همخوانی دارد Allerberger . و Dierch (۱۹۹۷) ۳٪ از نمونه‌های شیر آزمایش شده در استرلیا، Klie و همکاران (۱۹۹۷) *۳٪ از* نمونه‌های شیر انالیز شده *در آلمان و در مطالعه دیگر* Padhye و Doyle (۱۹۹۱) ۱۰٪ از نمونه‌های مورد آزمایش در آلمان *را آلوده به E.coliO157 گزارش کرده‌اند.* Cagri-Mehmtoglu و همکاران (۲۰۱۱) در شهر Sakarya ترکیه ۲۶۴ نمونه از شیرهای خام و پنیر تولیدی دو کار خانه را از نظر وجود باکتری *E. coli O157* مورد آزمایش قرار داده و گزارش کردند که فقط یک نمونه شیر خام و ۵ نمونه از پنیرهای تولید شده از شیرخام از نظر *E. coli O157:H7 مثبت بود.*

Salek-Moghaddam و همکاران درسال ۱۹۹۹در ایران با بررسی ۲۰۰۰ نمونه ماده غذایی مختلف تنها از یک نمونه سبزی موفق به جداسازی *E .coli O157:H7* شدند (Salek-Moghaddam et al., 2003). براساس تحقیق کارگر و همکاران (۱۳۸۴) روی ۵۰۰ نمونه، میزان آلودگی شیرخام گاوهای شهرستان جهرم به این باکتری، ۳/۴۰٪ گزارش شده است. بنیادیان و همکاران (۱۳۸۴)، ۲۰۰ نمونه از پنیرهای سنتی عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری را مورد مطالعه قرار داده و ۴ نمونه (۲٪) از آنها را آلوده به سروتیپ *E.coli O157* گزارش کردند. طبق این گزارش آلودگی پنیرهای گاوی به این سویه ۱/۷٪ و پنیرهای گوسفند ۳/۸۴٪ بوده و از پنیرهای سنتی حاصله از شیر بز آلودگی گزارش نشده و در هیچکدام از جدایه‌ها پادگن H7 مجود نبود. شریعتی فر و همکاران (۱۳۸۸) ضمن آزمایش ۵۰۰ نمونه از شیرهای خام و پنیرهای مشهد و حومه، ۱۵/۲٪ از آنها را به *اشریشیاکلی O157:H7* آلوده گزارش کردند. در تحقیق حاضر هیچ کدام از پنیرهای سنتی تهیه شده از سطح بازار مرند از نظر *E. coli O157:H7* مثبت نبودند.

در پژوهش‌های مختلف از منابع و عوامل متفاوت موثر در شیوع این باکتری در مواد غذائی نامبرده شده است. Brashears و همکاران در سال ۲۰۰۳، در امریکا نشان

دادند تقریباً تمامی جایگاه‌های جمع‌آوری شیر به باکتری *E .coli O157:H7* آلوده است. Murphy و همکاران در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ با بررسی ۵۳۶ فیلتر شیر در ۹۷ گاوداری، میزان آلودگی آنها را ۱۲٪ گزارش نمودند (Murphy., et al 2005). براساس تحقیق کارگر و همکاران (۱۳۸۵) استفاده از آب رودخانه به عنوان منبع آب آشامیدنی به عنوان عامل آلودگی به *اشریشیاکلی* O157:H7 تشخیص داده شده است. طبق نتایج این تحقیق با توجه به بقای بیش از ۵۰ روز این باکتری در مخازن آب شهری، رودخانه و نیز در بدن ناقلین بدون علامت (گوساله) خطر انتقال این باکتری ازگوساله‌های ناقل به حیوانات سالم، از گوساله به شیر و سایر مواد لبنی و غذایی وجود دارد (کارگر و همکاران، ۱۳۸۴). Brashear و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آمریکا نشان دادند که از میان ۹۱ مرکز نگهداری گاوهای شیری ۲۴/۲۰٪ و از ۹۷ محل فرآوری محصولات لبنی در ۱۹ ایالت مختلف، میزان آلودگی با باکتری *E .coliO157:H7*، ۳۰/۹۰٪ می‌باشد. محققین یاد شده، نشان دادند که با وجود دفع مقادیر کم باکتری از گاوهای شیری، میزان شیوع در اغلب مناطق مورد بررسی، به ویژه در فصول گرم‌تر و گاوهای جوان تازه از شیرگرفته شده قابل توجه است (Brashear, et al., 2003). در یونان آلودگی میکروبی پنیرها توسط Kousta و همکاران در سال ۲۰۰۹ مورد بررسی قرارگرفت، و نتایج نشان داد که آلودگی پنیرها مربوط به پاتوژن‌های شیرخام می‌باشد که از طریق محیط مزرعه، دفع مدفوع مستقیم از حیوانات و غدده آلوده، به شیر منتقل شده‌اند و منبع مهم آلودگی در طی فرایند دست زدن کارگران است (Kousta et al., 2009). براساس تحقیق Oksuz و همکاران ۸۰٪ از پنیرهای آلوده به *E .coliO157:H7*، pH بالای ۴/۵ داشته و دلیل اصلی رشد باکتری در نمونه‌های پنیر اسیدیته پایین بوده است (Oksuz et al., 2004). و طبق نتایج تحقیقات دیگر انواع *E .coliO157:H7* قابلیت زنده ماندن در پنیرهای سخت به مدت ۱۵۰ روز در طی دوره رسیدن را دارند. (Reitsma and Henning, 1996; Heening, 2004). نتایج تعداد زیادی از پژوهش‌ها نشان داده که مجموعاً میزان بقا، *اشریشیاکلی‌های* تولید کننده سم شیگا (STEC) در پنیر به عواملی همچون تعداد باکتری زنده، طول دوره رسیدن و pH و a_w پنیر دارد.

براساس نتایج تحقیق حاضر تنها جدایه تائید شده به عنوان *اشریشیاکلی* O157:H7 دارای ژن‌های حدت *eaeA* و *stx1* بود. از ۲۲ سویه STEC جداسازی شده در مکزیک توسط Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۵، اکثر سویه‌ها یا ژن stx2 یا ترکیبی از ژن *stx1* و *eaeA* را داشتند، به طوری که ۹ سویه ژن *stx2*، ۹ سویه ژن *stx1* و *eaeA*، ۳ سویه ژن *stx1* و۱ سویه ژن *stx1*، *eaeA* و *hlyA* را نشان دادند (Garcia et al., 2005). در بررسی Byrne و همکاران در سال ۲۰۰۳ در امریکا، از ۵۷ سویه *E .coliO157:H7* جداسازی شده، ۳۸ سویه ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eaeA* و *hlyA*، ۱۱ سویه ژن‌های *stx1*، *eaeA* و *hlyA* و ۳ سویه هم ژن‌های *stx1*، *stx2* و *eaeA* داشتند (Byrne et al., 2003).

براساس یافته‌های این تحقیق در مجموع می‌توان گفت که هر چند میزان شیوع *E .coliO157:H7* در شیر و فرآورده‌های شیر حاصله از شیر خام پائین است ولی هنوز این فرآورده‌ها می‌توانند به عنوان عامل خطر برای انتقال این باکتری بیماری‌زا به انسان باشند.

منابع

۱. بنیادیان، مجتبی.، زهرایی صالحی، تقی.، مشتاقی، حمدالله و زایرزاده، احسان. (۱۳۹۴). ارزیابی وضعیت آلودگی پنیرهای سنتی به سروتیپ‌های *اشریشیاکلی* در استان چهارمحال و بختیاری. مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۵، صفحه ۳۰۴-۳۰۱.

۲. کارگر، محمد.، حیدری، سوسن.، عباسیان، فیروز و شکرفروش، شهرام. (۱۳۸۵). ارزیابی روش‌های مختلف غنی سازی، میزان شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی *اشریشیا کلی* در شیر خام گاوهای شرستان جهرم. فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری‌های عفونی و گرمسیری، شماره ۳۴، صفحه ۱۱-۷.

۳. کارگر. محمد.، دانشور، موسی و همایون، مریم. (۱۳۸۹). شیوع ژن‌های *شیگاتوکسین*، *ایتیمین* و *همولیزین* در سویه‌های *اشریشیا کلی* O157:H 7 از نمونه‌های گوشت چرخ کرده کارخانجات صنعتی شهرستان شیراز. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، شماره ۶، صفحه ۵۲۰-۵۱۲.

۴. کارگر. محمد.، دانشور، موسی و همایون، مریم. (۱۳۹۰). پایش مارکرهای بیماری‌زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی *اشریشیاکلی* O157:H7 تولید کننده *شیگاتوکسین* در فروشگاه‌های عرضه کننده گوشت شهرستان شیراز. فصلنامه طب جنوب پژوهشکده زیست – پزشکی خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، شماره ۲، صفحه ۸۳-۷۶.

5. Allerberger, F., and Dierich, M.P. 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Austria. VTEC'97, abstract V37/I. The Third International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections. Baltimore, MD, USA. Lois Joy Galler Foundation for HUS, Melville, NY, USA.
6. Ansay, S.E., and Kaspar, C.W. 1997. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol. 25: 131–134.
7. Brashears, M.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Mann, J.E., and Killinger-Mann, K., 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given Lactobacillus direct-fed microbials. J Food Prot. 66:748–754.
8. Byrne, C.M., Erol, I., Call, J.A., Kaspar, C.W., Buege, D.R., Hiemke, C.J., et al. 2003. Characterization of Escherichia coli O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper midwest region of the united states. Appl Environ Microbiol. 69: 4683-4688.
9. Cagri-Mehmetoglu, A., Yaldirak, G., Bodur, T., Simsek, M., Bozkir, H., and Eren, N.M. 2011. Incidence of Listeria monocytogenes and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. Food Control. 22: 762-766.
10. Cetinkaya, F., and Soyutemiz, G.E. 2006. Microbiological and Chemical changes throughout the manufacture and ripening of Kashar: a traditioral Turkis cheese. Turk J Vet Anim Sci. 30: 397 – 404.
11. Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J., and Hanson, M.F. 2001. A survey of the

12. prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. Int J Food Microbiol. 66: 63-69.
13. Dontorou, C., Papado, P., and Filioussis, G. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. Int J Food Microbiol. 82: 273-279.
14. Fagan, P.K., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., and Djordjevic, S.P. 1999. Detection of Shigalike toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 65: 868-872.
15. Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H., and Paros, M.G. 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. Epidemiol Infect. 113: 199-207.
16. Heuvelink, A.E., Bleumink, B., van den Biggelaar, F.L., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., and de Boer, E. 1998. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. J Food Prot. 61: 1597-1601.
17. Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.W., Steinruck, H., 1997. Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Eschericia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 110: 337–341.
18. Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., and Drosinos, E.H.2009. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control. 21: 805–815.
19. Louie, M., de Azavedo, J.C.S., Handelsman, M.Y.C., Clark, C.G., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P., Brunton, J. 1993. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. Infect Immun. 61:4085–4092.
20. Meng, J., Doyle, M.P., Zhao, T., and Zhao, S. 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle M.P. and Beuchat L.R, Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3rd Ed. ASM press, Washington D.C., pp: 249-268.
21. Mirzaei, H. 2011. Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. Afr J Microbiol Res. 5: 1609-1614.
22. Murphy, B.P., Murphy, M., Buckley, J.F. 2005. In –Line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157:H7 surveillance of milk production holding. Int J Hyg Environ Health. 208: 407-413.
23. O'Brien, A.D., Holmes, R.K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev. 51:206–220.
24. 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.

25. Padhye, N.V., and Doyle, M.P. 1991. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. Appl Environ Microbiol. 57: 2693-2698.
26. Paton, J.C., and Paton, A.W. 1998. Pathogenesis and Diagnosis of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* Infections. Clin Microbiol Rev. 11: 450-79.
27. Reitsma, C.J., and Henning, D.R. 1996. Survival of enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 during the manufacture and curing Cheddar cheese. J Food Prot. 59: 460–464.
28. Rey, J., Sa´nchez, S., Blanco, J.E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., Garcı, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., and Alonso, J.M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in SpainInt J Food Microbiol. 107: 212 – 217.
29. Salek-Moghaddam, A., Forouhesh Tehrani, M., and Davoodian, P. 2003. Survey of the bacterial contaminants of Iranian foods in searches of *E. coli* O157:H7 in medical laboratory sciences researches center. Iranian J Infect Dis Trop Med. 18: 5 – 8.
30. Schmidt, H., Plaschke, B., Franke, S., Russman, H., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Karch, H. 1994. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Med Microbiol Immunol.183: 23–31.
31. Tamagnini, L.M., Sousa, G.B., Gonzalez, R.D., and Bude C.E. 2006. Microbiological characteristics of Crottin goat cheese made in different seasons. Small Ruminant Res. 66: 175-180.

Prevalence rate and presence of virulence genes of *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk and traditional cheese at Marand retails

Nagezadeh A[1]. and Mirzaei H.[2*]

1. Graduated of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

***Corresponding author**: *hmirzaei@iaut.ac.ir*

Received: 27 August 2015 Accepted: 22 June 2015

Abstract

The aim of this study was to estimate the prevalence rate of *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk and traditional cheese at Marand retails. Moreover, the isolates were assessed for the presence of virulence gene of *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hly*. For this reason, 100 traditional cheese and 50 raw milk samples were collected randomly. The samples were enriched in EC broth containing novobiocin and were isolated on sorbitol MacConkey agar with cefixime and tellurite. The isolates were further assayed by VRBA, tryptone broth and *Escherichia coli* Chromogenic agar for the lactose fermentation, indole production and beta-glucuronidase activity, respectively. The selected colonies were confirmed by *E. coli* O157: H7 antiserum and finally the isolates were analyzed for the presence of virulence genes. According to the results, 9% (9/100) of cheese and 10% (5/50) of raw milk samples were found contaminated with sorbitol-negative *E. coli*. Using the anti-*E. coli* antiserum, 1 isolate (2%) among the milk samples was confirmed and the presence of virulence genes of *eaeA* and *stx1* were determined by multiplex PCR. With respect to the occurrence of *E. coli* O157: H7 in raw milk and its high persistence to acidic environment, it was concluded that raw milks and traditional cheeses marketed at Marand could be considered as the potential source of infection to humans.

Key words: *Escherichia coli* O157: H7, traditional cheese, raw milk, virulence genes