ارزیابی همبستگی بین حضور ژن های تولید کننده شیگا توکسین (stx1 و stx2) در *اشرشیا کلی O157 H7* با پارامترهای میکروبی و شیمیایی در شیر خام

سیما انصاری[1]، مسعود یاورمنش[2*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۱)

چکیده

باکتری *اشرشیاکلی* تولید کننده شیگا توکسین یکی از مهمترین عوامل بیماری زا در صنعت فرآورده های لبنی محسوب می‌شود. پاستورزاسیون شیر به منظور جلوگیری از رشد میکروبی تاثیری بر سمیت توکسین های تولید شده ندارد. لذا شناسایی دقیق و سریع عامل تولید کننده، می تواند از مسمومیت های غذایی جلوگیری کند. هدف از این تحقیق ارزیابی همبستگی بین حضور ژن های تولیدکننده شیگاتوکسین (stx1 و stx2) در *اشرشیاکلی O157: H7* باپارامترهای میکروبی وشیمیایی درشیرخام بود. از اینرو،۳۰ نمونه شیر خام از مراکز توزیع مواد لبنی و گاوداری های سطح شهرستان مشهد به شکل تصادفی جمع آوری و به منظور غربالگری و جداسازی باکتری *اشرشیاکلی O157: H7* کشت اختصاصی داده شد. پس از استخراج DNA از سویه های جدا شده، واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت شناسایی ژن های 16srRNA، stx1 و stx2 انجام شد. نتایج کشت میکروبی و واکنش زنجیره ای پلی مراز به ترتیب نشان داد که ٦۲ و ۸۹ درصد از نمونه های شیرخام حاوی *اشرشیاکلی O157: H7*بودند. همچنین ۸۸ درصد *اشرشیاکلی* های توکسین زای شناسایی شده حاوی ژنstx1 بودند در حالیکه ژنstx2 در هیچ باکتری مورد مشاهده نشد. ضریب همبستگی بین حضور ژن تولیدکننده شیگاتوکسین (stx1) دراشرشیاکلی *O157: H7* با دامنه شمارش باکتری های مزوفیل، دامنه شمارش اشرشیاکلی، دامنه اسیدیته، دامنه pH، دامنه ماده خشک بدون چربی، دامنه چربی و دامنه ضریب هدایت الکتریکی به ترتیب ۰/۱۷٤، ۰/٤۷٤، ۰/۹۹۲، ۰/۱۷۷، ۰/۷۲٤، ۰/٦۲۲ و ۰/۸۹۷ برآورد شد. نتیجه این تحقیق نشان داد که پارامترهای شیمیایی شیر خام از همبستگی بالایی با حضور ژن شیگاتوکسین (stx1)در *اشرشیاکلی O157: H7* برخوردارند.

کلید واژگان: شیر خام، اشرشیاکلی O157: H7 ، شیگا توکسین، پارامترهای میکروبی، پارامترهای شیمیایی

* مسئول مکاتبات: yavarmanesh@um.ac.ir

۱- مقدمه

اشرشیاکلی یکی از گونه‌های غالب در دستگاه گوارش انسان می باشد. اشکال بیماری زای *اشرشیاکلی* می توانند شکل های مختلفی از بیماری اسهال را ایجاد کند. این تنوع به فاکتورهای خاص مهاجرت، فاکتورهای بیماریزایی و ژن های بیماریزایی که در دیگر *اشرشیاکلی* ها موجود نمی باشد، بستگی دارد [۱]. در حال حاضر، شش *اشرشیاکلی* بیماری زا، وروسایتوتوکسژنیک *اشرشیاکلی*[1] (VTEC)، انتروتوکسژنیک *اشرشیاکلی*[2] (ETEC)، انتروایوسیو *اشرشیاکلی*[3] (EIEC)، انتروپاتوژنیک *اشرشیاکلی*[4] (EPEC)، انترواگروگرتیو *اشرشیاکلی*[5] (EAggEC) و دیفیوزلی ادهرنت *اشرشیاکلی*[6] (DAEC) شناخته شده اند [۲]. در این میان، باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 یکی از باکتری های بیماری زا انسانی است که سبب کولیت های هموزژیک[7]، سندرم کم خونی همولتیک[8] و لخته شدن خون در رگ های بدن[9] می شود [۳و ٤]. این باکتری در سال ۱۹۸۲ توسط مرکز کنترل بیماری ها آمریکا (CDC) به جهت شیوع اسهال خونی شدید در بین مصرف کنندگان غذا در دو فست فود شناخته شد. پس از این مشاهده، گزارشات زیادی از سراسر جهان برای این بیماری ارسال شد [۵]. از آنجا که شدت این بیماری بسیار بالا و دوز عفونی آن بسیار کم (کمتر از ۱۰ سلول) است [٦]. *اشرشیاکلی* O157 H7 یکی از مهمترین عوامل بیماری زا محسوب می شود [۷]. این باکتری قادر است تا دو توکسین (stx1) و (stx2) که در دسته ویروتوکسین ها قراردارند، تولید کند. این سویه ژن های stx را به همراه ژن های انتروهمولایزین (hly) و انتیمین (eae) در خود جای داده است که بسیار برای سلامت انسان خطرناک است [۸]. گاوها بزرگترین مخزن باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 محسوب می‌شوند و گوشت و شیر آن ها منبع مناسبی جهت آلودسازی انسان می باشند [۹]. پژوهشگران در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که ۵۲ درصد از شیوع *اشرشیاکلی* O157: H7 مربوط به محصولات گاو می باشد [۱۰]. اگرچه پاستوریزه کردن شیر سبب از بین رفتن این باکتری می گردد اما استفاده از شیر غیرپاستوریزه توسط بعضی از مشتریان سبب بیماری آنها می گردد. هرچند که زمان ماندگاری شیر بسیار کوتاه است اما طول دوره شیر دهی برای یک گاو ۳۰۵ روز می باشد، در نتیجه یک گاو به عنوان مخزن می‌تواند ۳۰۵ روز شیر آلوده تولید کند [۱۱]. در بررسی شیر خام در کرمانشاه گزارش کردند که ۸/۲۵ درصد از نمونه های *اشرشیاکلی* جداسازی شده، eaeA مثبت و stx منفی بودند. تا به امروز روش های مختلفی از قبیل آزمایش های ایمنی (الایزا)، کشت سلولی و واکنش زنجیره ای پلمراز جهت شناسایی این باکتری پیشنهاد شده است [۱۲]. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری *اشرشیاکلی* بیماریزای O157: H7 در نمونه های شیر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و همچنین ارزیابی حضور دو ژن stx1 و stx2به عنوان توکسین های اصلی بود. همچنین همبستگی احتمالی بین حضور این ژن ها و پارامترهای میکروبی و شیمیایی در شیر خام مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

جمع آوری و آماده سازی نمونه

تعداد ۳۰ نمونه شیرخام از گاوداری های سطح شهرستان مشهد به شکل تصادفی جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل گردید و به سرعت جهت شمارش میکروبی و شناسایی اشرشیاکلی و آزمون های مولکولی استفاده شد.

1. Verocytotoxigenic*E. coli*
2. Enterotoxigenic*E. coli*
3. Enteroinvasive*E. coli*
4. Enteroinvasive*E. coli*
5. Enteroaggregative*E. coli*
6. Diffusely adherent *E. coli*
7. Haemmorhagic Colitis
8. HaemolyticUraemic Syndrome
9. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

کشت میکروبی

دمای نمونه های شیر به دمای محیط رسانده شدو به خوبی مخلوط شدند. ۲۵ میلی لیتر از هر نمونه به ۲۲۵ میلی لیتر TSB[10] (مرک، آلمان)حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر نووبیوسین[11] منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس نمونه ها به محیط کشت جامد مک کانکی[12]حاوی سفکسیم (۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر) و تلوریت پتاسیم (۲/۵ میلی گرم بر لیتر) انتقال و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. پنج کلونی با رنگ سبز جلا دار از هر پلیت برداشته شده و به محیط کشت EMB[13] منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. از باکتری های رشد کرده بر روی این محیط جهت شمارش میکروبی و آزمون های ملکولی استفاده شد [۱۱].

آزمون های شیمیایی

به منظور برآورد پارامترهای pH و اسیدیته، درصد چربی و درصد ماده خشک به ترتیب از استانداردهای ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، ۳٦٦ و ٦۳۷ استفاده شد همچنین ضریب رسانایی با استفاده از دستگاه pH متر (Metrom) براساس واحد میکروزیمنس اندازه گیری شد. این آزمون ها با سه تکرار برای هر نمونه انجام شد.

استخراج DNA

کلنی باکتری های مشکوک در ۱۰۰ ماکرولیتر آب استریل حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانیده گردید.سپس این محلول به مدت ۵ دقیقه در ٦۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. ۲ میکرولیتر از محلول رویی برای استفاده در واکنش PCR استفاده شد [۱۲]. غلظت محصول استخراج DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND2000-Thermo, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش زنجیره ای پلی مراز

به منظور شناسایی مولکولی گونه *اشرشیاکلی* از آغازگرهای اختصاصی(شرکت ماکروژن کره جنوبی) گزارش شده [13]برای ژن 16srRNA استفاده شد. همچنین به منظور شناسایی ژن های تولید کننده توکسین (stx1,stx2) در باکتری *اشرشیاکلی* دو جفت پرایمر انتخاب شد. جدول ۱ ویژگی های توالی نوکلوتیدی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق را نشان می دهد.بررسی همولوژی و نحوه اتصال پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer Primer 5 و همچنین بانک جهانی ژن (NCBI) انجام شد. هر واکنش PCRاز ترکیب ۱ میکرولیتراز DNA مجهول، به همراه ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به همراه ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط کیت PCR (آمپلیکون، دانمارک) انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر قطعات هدف در دستگاه ترموسایکر (T-Personal، آلمان) برای ژن stx1و stx2با روش Touch downبه شکل زیر بود: واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹۵C°، اتصال ٤۰ ثانیه در ۵۳C° و بسط ۱ دقیقه در ۷۲C° ، در هر سه سیکل یک درجه کاهش در دمای اتصال تا دمای ٤۳ C° انجام و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲C° قرار داده شد. به منظور تکثیر ژن 16srRNA از برنامه دمایی واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹۵C°، اتصال ٤۰ ثانیه در ۵٤C° و بسط نهایی ۵دقیقه در ۷۲C°در تعداد ۳۰ سیکل استفاده شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد برده شد و رنگ آمیزی آن با استفاده از سایبرگرین صورت گرفت. مارکر مورد استفاده در الکتروفورز مارکر M100(+) (ترمو، آمریکا) بود. محصولات PCR به منظور خوانش یک طرفه یا دو طرفه و تایید نهایی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردید.

10. Tryticase soy broth
11. Novobiocin
12. MacConkey
13. Eosinmethylen blue agar

Table 1 Characterization of primers sequence

source	primer sequence of nucleotides	target fragment length (bp)	the name of the target	gene primer
[13]	CTGGAAGAGGCTAGCCTGGACGAG AAAATCGGCACCGGTGGAGCGATC	366	16srRNA-F 16srRNA-R	16srRNA
[14]	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG CTGTCACAGTAACAAACCGT	516	stx1F stx1R	stx1
[14]	TTCTTCGGTATCCTATTCCC ATGCATCTCTGGTCATTGTA	482	stx2F stx2R	stx2

ارزیابی همبستگی

به منظور برآوردضریب رگرسیون بین حضور ژن های مولد شیگاتوکسین با پارامترهای میکروبی و شیمیایی از نرم افزار MiniTab نسخه ١٤ استفاده شد. هدف از بررسی همبستگی مطالعه رابطه بین متغیرهای مستقل X و وابسته Yاست. که در این مطالعه X (دامنه شمارش باکتری های مزوفیل، دامنه شمارش *اشرشیاکلی*، دامنه اسیدیته، دامنه pH، دامنه ماده خشک بدون چربی، دامنه چربی و دامنه ضریب هدایت الکتریکی) و Y (توکسین های STX1 و STX2) بودند.

٣- نتایج و بحث

بررسی نتایج میکروبی نشان داد که تمامی نمونه های شیرخام١٠٠٪ به باکتری *اشرشیاکلی*O157 H7 آلوده بودند. نتایج محصول PCR برای ژن 16srRNA نشان داد که ٢٥ نمونه یا ٨٣/٣ درصد از شیرهای خام حاوی *اشرشیاکلی* بوده است (شکل ١). حضور قطعه ٣٦٦ جفت بازی بر روی ژل آگارز ٢ درصد و همچنین بررسی نتیجه توالی یابی برای قطعه 16srRNA، تکثیر قطعه هدف را تایید نمود.در بخشی عظیمی از پژوهش های انجام شده، به منظور شناسایی *اشرشیاکلی* *O157 H:7*مولد اسهال و استفراغ،از ژن 16srRNA استفاده شده است [١٦].

شناسایی ژن های شیگاتوکسین

بررسی محصولات PCR برای ژن stx1 حضور باند ٥١٦ جفت بازی را بر روی ژل آگارز ٢ درصد نشان داد (شکل٢). ٨٠ درصد (٢٤ نمونه) نمونه های شیرخام به شیگاتوکسین stx1 آلوده بودند. نتایج توالی یابی ژن هدف تکثیر اختصاصی قطعه هدف را تایید نمود. بررسی محصولات PCR به منظور تکثیرژنstx2، هیچ باند اختصاصی را بر روی ژل نشان نداد. محققان با استفاده از پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه توانسته بودند ژن stx2 را که اصلی ترین عامل توکسین زایی در اشرشیاکلی O157 H:7 شناخته می شود، تکثیر کنند [١٤]. Stx2 توکسین چند متغییره محسوب می شود (Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e و Stx2f). انواع Stx2 دارای توالی نوکلوتیدی بسیار مشابه و نزدیکی است اما دارای ویژگی های آنتی ژنی و بیولوژی متفاوتی هستند [١٧]. در میان Stx2 های مختلف، Stx2 و Stx2c دارای فراوانی بیشتری در سویه های استفراغ زا هستند. سویه های تولید کننده Stx2d از بیمارانی که معمولا اسهال جزیی دارند جدا شده است [١٨]. Stx2e و Stx2f معمولا توسط سویه های آلوده کننده‌ی حیوانات تولید شده و در انسان بسیار کمیاب هستند. Stx2e در STEC (اسهال خونی) مشاهده شده و هامل بیماری اودما در خوک می باشد و Stx2f با بیماری STEC پرندگان مرتبط دانسته شده است [١٥]. لذا به نظر می رسد سویه های *اشرشیاکلی*O157: H7 جدا شده در این مطالعه از گونه استفراغ زا (stx2) نبوده است و به منظور شناخت بهتر این جدایه ها، می توان با طراحی آغازگرهای اختصاصی برای دیگر متغییرهای stx2 به شناسایی آنها پرداخت.

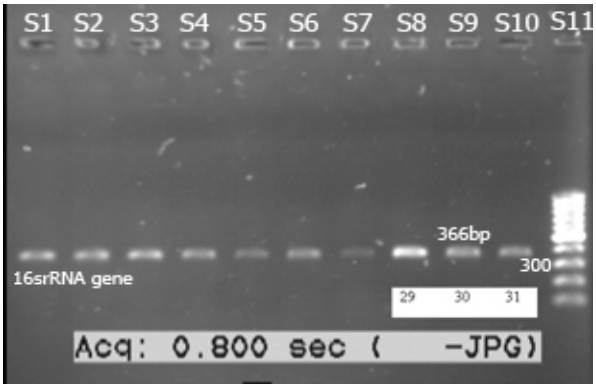

Fig 1 PCR products electrophoresis of 16srRNA on agarose gel (2%). S1-S10 unknown samples, S11 DNA marker +100

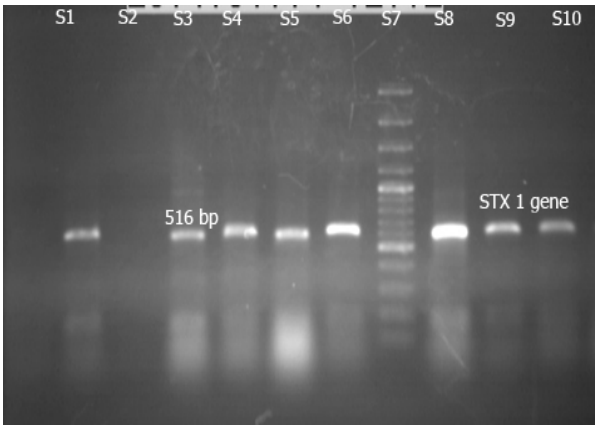

Fig 2 PCR products electrophoresis of stx1 gen on agarose gel (2%). S1-S6 & S8-S10 PCR product for stx1 gen, S7 DNA marker +100

همبستگی پارامترهای میکروبی و شیمیایی با ژن های عامل تولید شیگا توکسین ها

ضریب همبستگی بین باکتری های مزوفیل و حضور اشرشیاکلی O157: H7 و تولید شیگاتوکسین stx1، ۰/۱۷٤ برآورد شد که نشان دهنده اثر همبستگی مثبت حضور باکتری های مزوفیل با آلودگی شیر می باشد. هرچند که در غلظت های بالای باکتری های مزوفیل (۷/۵- ۸log Cfu/ml) *اشرشیاکلی* O157: H7 در حداقل مقدار خود (۰/۰۳log Cfu/ml) بود (جدول ۲). به نظر می‌رسد با افزایش جمعیت باکتری های مزوفیل، باکتری *اشرشیاکلی* O157 H7 توان رقابت خود را برای حضور در شیر از دست می دهد. در بررسی نتایج همبستگی پارامترهای شیمیایی، ضریب همبستگی حضور ژن stx1 با دامنه اسیدیته، دامنه pH، دامنه ماده خشک بدون چربی، دامنه چربی و دامنه ضریب هدایت الکتریکی یا قابلیت رسانایی به ترتیب ۰/۹۹۲، ۰/۱۷۷، ۰/۷۲٤، ۰/٦۲۲ و ۰/۸۹۷ برآورد شد. دامنه ۱٤/۵-۱٤ و ۱٦-۱۵/۵ بهترین دامنه اسیدی به منظوررشد *اشرشیاکلی* O157: H7 و تولید شیگا توکسین ها بود (جدول ۳). ضریب همبستگی بالای بین حضور ژن stx1 و دامنه اسیدی نشان دهنده حساسیت بالای باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 به رشد در محیط اسیدی است (جدول ۳). هرچند که گزارش ها نشان می دهد که این باکتری قادر است در pH اسیدی برای چندین هفته زنده باقی بماند [۱۹]. گزارشات نشان دادند اثر تنش اسیدی سبب افزایش حساسیت تحمل اشرشیاکلی O157: H7 نسبت به اسیدهای چرب می شود [20]. نتایج بدست آمده از برآورد ضریب همبستگی pH با تولید شیگا توکسین stx1 نیز نشان داد که باکتری *اشرشیاکلی* O157 H7 قادر به رشد در محیط اسیدی نبوده و بهترین pH جهت رشد باکتری *اشرشیاکلی* O157 H7 و تولید شیگاتوکسین stx1، ٦/۷۵-٦/۷ و ٦/۸-٦/۷۵ بود (جدول ٤) (ضریب همبستگی ۰/۱۷۷) . بطوریکه سایر تحقیقات مبنی بر اثر اسیدهای چرب و pH بر روی رشد باکتری نشان داده است که هیچ یک از اسیدهای چرب (کاپریک، لوریک، پالماتیک،اولئیک، لینولئیک و لینولینک) در pH=7 اثر ممانعت کنندگی رشد بر روی باکتری نداشته اند [۲۰]. ضریب همبستگی ۰/۷۲٤، ماده خشک با تولید شیگا توکسین stx1 نشان داد که افزایش ماده خشک سبب رشد بهتر *اشرشیاکلی* O157: H7 و تولید بیشتر شیگاتوکسین می شود (جدول ۵). بهترین دامنه چربی جهت رشد باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 و تولید شیگا توکسین stx1، ۳/٤-۳/۲ و ۳/٦-۳/٤ برآورد شد (جدول ٦) (ضریب همبستگی ۰/٦۲۲). ضریب همبستگی دامنه قابلیت رسانایی[14] با رشد *اشرشیاکلی* O157: H7 و تولید شیگا توکسین stx1، ۰/۸۹۷ برآورد شد و بهترین دامنه جهت رشد باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 و تولید شیگا توکسین stx1، ٤/۲-٤ و ٤/۸-۵ بود (جدول ۷). لذا همبستگی بالا بین حضور اسیدهای چرب با رشد باکتری و تولید شیگاتوکسین را قابل توجیه می باشد.

14. conductivity

Table 2 Correlation among mesophilic bacteria counts with E.coli and shiga toxin presence

STX2 Gene	STX1 Gene	*E. coli*	range of mesophilic bacteria counts log(cfu/ml)
۰	0.03	0.03	4-4.5
۰	0.06	0.06	4.5-5
۰	0.03	0.06	5-5.5
0	0.13	0.13	5.5-6
۰	0.16	0.23	6-6.5
۰	0.1	0.2	6.5-7
۰	0.23	0.23	7-7.5
۰	0.03	0.03	7.5-8
Correlation coefficient			0.174
Covariance			0.00299857

Table 3 Correlation among Acidity range with E. coli and shiga toxin presence

STX2 Gene	STX1 Gene	*E. coli*	acidity range
۰	۰	0.03	13.5-14
۰	0.26	0.3	14-14.5
۰	0.13	0.16	14.5-15
۰	0.1	0.13	15-15.5
۰	0.2	0.26	15.5-16
۰	0.03	0.03	16-16.5
۰	0.03	0.03	16.5-17
۰	۰	۰	17-17.5
۰	0.03	0.03	17.5-18
Correlation coefficient			0.922
Covariance			0.01030417

Table 4 Correlation among pH range with E.coli and shiga toxin presence

STX2Gene	STX1 Gene	*E.coli*	pH range
۰	0.03	0.03	6.4-6.45
۰	۰	۰	6.45-6.5
۰	۰	۰	6.5-6.55
۰	۰	۰	6.55-6.6
۰	0.03	0.06	6.6-6.65
۰	0.13	0.16	6.65-6.7
۰	0.33	0.2	6.7-6.75
۰	0.23	0.5	6.75-6.8
۰	0.03	0.03	6.8-6.85
Correlation coefficient			0.177
Covariance			0.0150583

Table 5 Correlation among solid–not-fat range with E.coli and shiga toxin presence

STX2 Gene	STX1 Gene	*E. coli*	range of solid-not-fat
۰	0.03	0.03	8-8.1
۰	0.03	0.06	8.1-8.2
۰	0.13	0.1	8.2-8.3
۰	0.2	0.2	8.3-8.4
۰	0.06	0.1	8.4-8.5
۰	۰	0.13	8.5-8.6
۰	0.1	0.1	8.6-8.7
۰	0.06	0.1	8.7-8.8
۰	0.16	0.16	8.8-8.9
Correlation coefficient			0.724
Covariance			0.00243194

Table 6 Correlation among fat range with E.coli and shiga toxin presence

STX2 Gene	STX1 Gene	*E. coli*	fat range
۰	0.16	0.13	3-3.2
۰	0.16	0.26	3.2-3.4
۰	0.2	0.2	3.4-3.6
۰	0.03	0.13	3.6-3.8
۰	0.16	0.16	3.8-4
۰	0.06	0.1	4-4.2
Correlation coefficient			0.622
Covariance			0.02467

٤- نتیجه گیری

بررسی ها نشان داده است که هر نمونه شیر با توجه به ترکیبات موجود، می تواند شرایط مختلفی را برای رشد *اشرشیاکلی* O157: H7 فراهم کند [۲۱]. از اینرو، با بررسی پارامترهای فیزیکوشیمیایی نمونه ها می توان تا حدی به یک تخمین مناسب برای رشد و تولید توکسین ها توسط باکتری *اشرشیاکلی* O157 H:7 دست یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که بعضی از پارامترهای فیزیکو شیمیایی مورد آزمون، از همبستگی بالایی با تولید شیگاتوکسین stx1 برخوردار می باشند.

٥- منابع

[1] Mohammadi P, and Abiri R. (2012). Isolation of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) from Raw Milk in Kermanshah by Polymerase Chain Reaction (PCR), Jundishapur Journal Microbiology. 6: 39-54.

[2] Donnenberg MS. (2002). Introduction Pp. I InDonnenberg, M.S. (Ed.) Escherichia Coli: Virulence Mechanisms Of A Versatile pathogen. Elsevier Ltd, UK. ISBN 0122207513.

[3] Nataro JP and Kaper B. (1998). Diarrheagenic Escherichia Coli., Clin. Microbiol. Rev., 11: 142-201.

[4] Zhao T. (1998). Reduction of Carriage OfEnterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 In Cattle By Inoculation With Probiotic Bacteria. J. Clin. Microbiol.,36: 641-647.

[5] Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, Yoon DY, Chae JS, Eo SK and Lee JH. (2004). Prevalence and Characteristics Of Escherichia Coli O157 From Major Food Animals In Korea. Int. J. Food Microbiol., 95: 41-49.

[6] Bach SJ, McAllister TA, Veira DM, Gannon VPJ and Holley RA. (2002). Transmission Control of Escherichia Coli O157:H7: A Review. Can. J. Anim. Sci., 2: 475-490.

[7] Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso MJ, Dahbi MP, Alonso G, Gonza´lez EA, Berna´rdez MI and Blanco J. (2003). Serotypes, Virulence Genes and Intiman Types Of Shiga Toxin Verotoxin-Producing Escherichia Coli Isolates From Healthy Sheep In Spain. J. Clin. Microbiol., 41: 1351-1356.

[8] Manna SK. (2006). Detection of Escherichia Coli O157 In Foods Of Animal Origin By Culture And Multiplex Polymerase Chain Reaction. J.Food Sci. Technol.,43: 77-79.

[9] Armstrong GL. (1996). Emerging Foodborne Pathogens: E. Coli O157:H7 As A Model Of Entry Of A New Pathogen Into The Food Supply Of The Developed World. Epidemiol. Rev., 18: 29-51.

[10] Who K. (1997). Prevention and Control of Enterohaemorrhagic Escherichia Coli Ehec Infections. Report of A Who Consultaties in Ground Beef. Applied and Environmental Microbiology, 1347–1353.

[11] Kannan P, Yong HY, Reiman L, Cleaver C, Patel P and Bhagwat AA. (2010). Bacteriophage-Based Rapid and Sensitive Detection of Escherichia Coli O157:H7 Isolates From Ground Beef. Foodborne Pathog Dis 7:1551–1558.

[12] Carter, G.R., 1990. Isolation and identification of bacteria from clinical specimens. In: Carter GR, Cole JR. (Eds.) Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 5th edition, Academic Press Inc. San Diego, California,

[13]Yokoigawa K, Inoue K, Okubo Y *and* Kawai H. *(*1999*)* Primers for amplifying an alanine racemase gene fragment to detect *E. coli* strains in foods. Journal of Food Science.64*:* 571–575.

[14]Fode-Vaughan, KA, Maki JS, Benson JA and Collins MLP. (2003). Direct PCR detection of Escherichia coliO157:H7. Appl. Microbiol. 37: 239-243.

[15] Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ and Noller HF. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 75(10): 4801–4805.

[16] Wang G, Clark CG and Rodgers FG. (2002). Detection in Escherichia coli of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40(10), 3613–3619.

[17] Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Weiler LH and Karch H. (2000). A new Shiga toxin variant (Stx2f) from Escherichia coli isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol.66:1205-1208.

[18] Friedrich AW, Bielaszewska M, Wang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A and Karch H. (2002). Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185:74-84.

[19] Conner DE and Kotrola JS. (1995). Growth and survival of Escherichia coli O157:H7 under
acidic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61:382-385.

[20]YangJ, HouX, MirPSandMcAllisterTA. 2010. Anti-Escherichia coli O157:H7 activity of free fatty acids under varying pH. Canadian Journal of Microbiology. 56 (3): 263-267.

[21] Kornalijnslijper JE, van Werven T, Daemen AJ, van den Broek J, Niewold TA, Rutten VP andNoordhuizen-Stassen EN. (2003). In vitro growth of mastitis-inducing Escherichia coli in milk and milk fractions of dairy cows. Veterinary Microbialogy.2;91(2-3):125-34.

Evaluation of the correlation between the presence of Shiga toxin-producing gene (stx1 and stx2) in Escherichia Coli O157 H7 with biological and chemical parameters of raw milk

Ansari, S. [1], Yavarmanesh, M. [2*]

1. M.Sc. student, Department of food science and technology, Islamic Azad university, Quchan branch
2. Assistant professor, Department of food science and technology, Faculty of agriculture, Ferdowsi university of Mashhad

(Received: 2015/10/21 Accepted: 2017/03/01)

One of the most important Shiga toxin-producer in dairy product is *Escherichia coli O157*. Milk pasteurization has not any effect on toxicity of the shigatoxin; it's just preventing of microbial growth. Therefore, rapid and accurate detection of *E.coli O157* can help to prevent food poisoning. The aim of this study was to evaluate the correlation between the presence of Shiga toxin-producing genes (stx1 and stx2) with microbial and chemical parameters in raw milk. 30 samples of raw milk randomly were collected from dairy product distributors of Mashhad. Isolation of *E. coli O157 H7* was done by specific culture. After DNA extraction, of 16s rRNA, stx1 and stx2 gene was screened by Polymerase Chain Reaction (PCR). The specific culture and PCR results showed that 62% and 89% of samples were contaminated by *E. coli O157 H7*, respectively. Also, Stx1 gene was detected in 88% of shiga toxin E.coli and Stx2 gene was not present in any of the isolates tested in this study. The correlation between the presences of Shiga toxin-producing gene (Stx1) with mesophilic bacteria enumeration, enumeration of E. coli, acidity, pH, Non-fat dry matter, fat content and domain of electro condactivity was estimated 0/174, 0/474, 0/992, 0.177, 0/724, 0/622 and 0/897, respectively. Our findings indicated that there is high correlation between chemical parameters of raw milk with the presence of shigatoxin genes in *E. coli O157 H7*.

Keywords: Raw milk, E. coli O157 H7, Shiga toxin, Microbial Parameters, Chemical Parameters

* Corresponding Author E-Mail Address: yavarmanesh@um.ac.ir