



ارزیابی شیوع ژن های بیماری زای سویه های اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین در فروشگاه های عرضه کننده آب میوه و سبزیجات در شهرستان شیراز

مرجان شاه ایلی^۱، دکتر محمد کارگر^{۲*}، عباسعلی رضاییان^۳، مریم همایون^۴، مهدی کارگر^۵، صادق قربانی دالینی^۶

^۱مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، گروه میکروبیولوژی، ^۲دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، ^۳مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، ^۴کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، باشگاه پژوهشگران جوان، ^۵کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، ^۶کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

زمینه و هدف: سویه های اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین می توانند انسان ها را از طریق مصرف غذاهای حیوانی و گیاهی آلوده نمایند و عامل ایجاد مسمومیت های غذایی همراه با اسهال، کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیت و حتی مرگ باشند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی ژن های بیماری زای سویه های اشریشیا کلی O157:H7 از نمونه های آب میوه و سبزیجات شهرستان شیراز بود. مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۸۹ نمونه آب میوه و سبزیجات جمع آوری شده از چهار منطقه شیراز انجام شد. نمونه ها پس از غنی سازی در محیط ECB واجد نوویوسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از محیط CT-SMAC و VRBA به منظور بررسی تخمیر سوربیتول و لاکتوز و از محیط کرومواگار برای بررسی فعالیت بتاگلوکورونیداز جدایه های باکتریایی استفاده شد. با استفاده از آنتی سرم اختصاصی باکتری اشریشیا کلی O157 تایید گردید. در نهایت وجود ژن های بیماری زای *stx1*، *stx2*، *eae* و *hly* با استفاده از Multiplex PCR و ژن های *rfb* O157 و *fliC* H7 با روش single PCR بررسی شد.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی ۶۹ باکتری سوربیتول منفی (۷۷/۵۳٪) جداسازی گردید که پس از بررسی های سرولوژیکی ۲۱ باکتری (۲۳/۶۰٪) به عنوان اشریشیا کلی O157 شناسایی شدند. از باکتری های یاد شده ۱۷ باکتری (۸۰/۹۵٪) ژن *rfb* O157 و ۹ باکتری (۴۲/۸۴٪) ژن *fliC* H7 را داشتند. با ارزیابی مارکرهای بیماری زایی، در ۳ نمونه ژن *stx1* و در یک نمونه ژن های *stx1* و *eae* شناسایی شد. نتیجه گیری: مطالعات گسترده تر بر روی منابع، میزان شیوع، سرنوشت و انتقال اشریشیا کلی O157:H7 در نزدیکی محیط های تامین سبزیجات به منظور تعیین مکانیسم های آلودگی قبل از برداشت محصول و توانایی انتقال آلودگی و بیماری زایی برای انسان ضروری است.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی O157:H7، PCR، عوامل بیماری زایی

پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

دریافت مقاله: آذر ۸۸

* آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

تلفن ۰۹۱۷۳۴۹۲۰۳، نمابر: ۰۷۱۱-۶۲۷۱۵۴۷

پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

مقدمه

اپی تلیال روده ای هستند که در ایجاد اسهال خونی نقش دارد. از دیگر عوامل بیماری زای سویه های STEC، پروتئینی به نام اینتیمین (intimin) است که مسئول اتصال باکتری به روده و ایجاد آسیب های خاصی به نام اتصال و محو شدن (attaching/effacing) و ساختارهای فنجانکی شکل (cup like) در سلول های اپی تلیال روده می باشد. پروتئین اینتیمین یک پروتئین ۹۴kDa غشای خارجی است. به ژن کد کننده این پروتئین *eaeA* (*E. coli* attaching and effacing) می گویند. وجود ژن *eae* در سویه های STEC به وضوح با خطر افزایش اسهال خونی در انسان همراه می باشد. (۱ و ۸). دوز عفونی پایین باکتری، ضرورت توسعه تکنیک های تشخیصی حساس را نشان می دهد تا بتواند ایمنی و سلامت غذا را تامین کند (۹). با وجود این که ژن های کد کننده شیگا توکسین ها (*stx1* و *stx2*) و ژن های *eaeA* و *hly* مهم ترین ژن های بیماری زایی شناخته شده سویه های STEC هستند، اما ارزیابی ژن های *O157* *rfb* و *H7* *fliC* در سویه های تأیید شده با آنتی سرم، می تواند به تشخیص دقیق تر باکتری کمک نماید. هدف از این پژوهش، پایش سویه های اشریشیا کلی *O157:H7* در نمونه های سبزیجات و آب میوه های سنتی شیراز و مقایسه روش های سرولوژی و مولکولی به منظور شناسایی سروتیپ *O157:H7* در باکتری های جداسازی شده می باشد.

مواد و روش ها

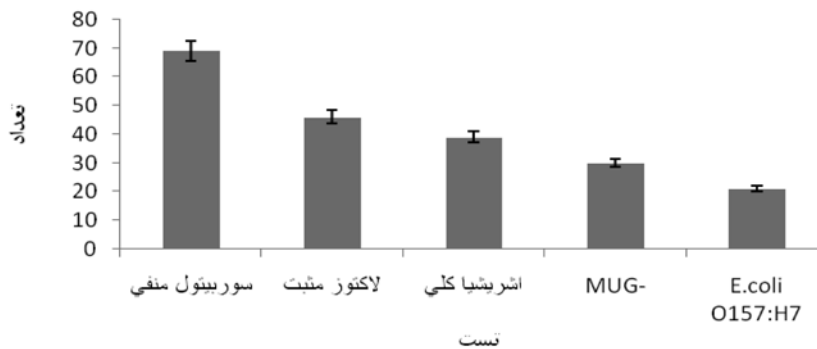
الف) نمونه گیری: این پژوهش به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۸۹ نمونه (آب هویج، تربچه، کاهو و سبزیجات دیگر) تهیه شده از فروشگاه های عرضه کننده این محصولات در ۴ منطقه جغرافیایی غرب، شرق، شمال و جنوب شیراز در سال ۱۳۸۹ انجام شد. اطلاعات مربوط به محل جغرافیایی، زمان نمونه گیری و دمای نگهداری در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروبی شناسی منتقل شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به سرعت مورد آزمایش قرار گرفتند.

ب) غنی سازی: به منظور غنی سازی، ۲۵ گرم از نمونه های کاهو و سبزیجات و ۲۵ میلی لیتر از نمونه های آب میوه جداسازی و پس از کشت در ۲۲۵ میلی لیتر محیط اشریشیا کلی برات

اشریشیاکلی تولید کننده شیگا توکسین (Shiga Toxigenic *Escherichia coli*=STEC) اولین بار در سال ۱۹۸۲ به عنوان یک پاتوژن انسانی شناسایی شد. از آن زمان به بعد، بیش از ۲۰۰ سروتیپ STEC از مواد غذایی، نمونه های حیوانی و منابع دیگر جداسازی شده است (۱). اشریشیا کلی *O157:H7* مهم ترین سروتیپ سویه های تولید کننده شیگا توکسین اشریشیا کلی می باشد که در ایجاد بیماری های منتقل شونده به وسیله مواد غذایی نقش دارد (۲). این سروتیپ عامل اصلی در ایجاد موارد تک گیر و همه گیری های کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک است. عفونت های انسانی ناشی از این باکتری در اثر مصرف آب و غذای آلوده ایجاد می شوند (۳ و ۴). محصولات غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه نشده، پنیر، سس مایونز، میوه جات، سبزیجات، کاهو، سالاد، اسفناج، جوانه ترب، آب میوه، سوسیس و کالباس، همبرگر و گوشت چرخ کرده به عنوان منابع آلودگی اشریشیاکلی *O157:H7* گزارش شده است (۲ و ۴). هر میکروارگانیسمی برای رشد به یک محدوده pH خاص احتیاج دارد. از آن جا که میکروارگانیسیم ها برای تنظیم pH داخلی خود ساختار خاصی ندارند، به شدت تحت تاثیر pH ماده غذایی قرار می گیرند. معمولاً غذاهایی با pH پایین به راحتی توسط باکتری ها فاسد نمی شوند. اشریشیا کلی *O157:H7* به خاطر توانایی زنده ماندن در pH پایین به خوبی شناخته شده است. اشریشیا کلی *O157:H7* توانایی زنده ماندن در غذاهایی با pH پایین به ویژه آب میوه، سوسیس و کالباس تخمیری را دارد (۵).

منابع آلودگی میوه و سبزیجات شامل آب آلوده و کودهای حیوانی مورد استفاده در زمین های کشاورزی است. زمانی که امکان ورود گاو و نشخوارکنندگان دیگری مثل گوزن به زمین های کشاورزی و مزارع سبزی وجود داشته باشد، شانس آلوده شدن میوه و سبزی های خام با باکتری اشریشیا کلی *O157:H7* افزایش می یابد (۶ و ۷).

سویه های STEC دو سیتوتوکسین قوی به نام شیگا توکسین های ۱ و ۲ (*Stx1* و *Stx2*) را تولید می کنند که ژن های آن توسط فاز کد می شود. این توکسین ها دارای اثر سیتوپاتیک بر روی سلول های



نمودار ۱: توزیع فراوانی و نسبت باکتری های مشکوک به اشریشیاکلی O157:H7 بر اساس تست های بیوشیمیایی.

KCl (۱۰mM)، ۱ واحد آنزیم DNA پلی مزاز Taq، ۲۰pM از هر یک از پرایمرها و ۴μl DNA انجام شد. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne, UK) با شرایط حرارت: ۹۵ درجه سانتی گراد ۳ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۸ درجه سانتی گراد ۴۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سانتی گراد ۹۰ ثانیه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را بر روی ژل آگاروز ۱٪/۱۵ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز توسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل مثبت از سویه 933J اشریشیا کلی O157:H7 و به عنوان کنترل منفی از سویه اشریشیا K12 استفاده شد (۱۲). هم چنین به منظور تعیین هویت دقیق ویروتیپ O157:H7 از پرایمرهای اختصاصی ژن های *fliC H7* و *rfb O157* استفاده شد (۱).

یافته ها

از نمونه های جمع آوری شده، ۱۹ نمونه (۲۱/۳۵٪) مربوط به سبزی، ۲۴ نمونه (۲۶/۹۷٪) تریچه، ۴ نمونه (۴/۴۹٪) اسفناج، ۷ نمونه (۷/۸۶٪) کاهو و ۳۵ نمونه (۳۹/۳۳٪) مربوط به آب هویج بود. از مجموع نمونه های مورد بررسی در محیط CT-SMAC، ۶۹ مورد (۷۷/۵۳٪)، کلنی های سوربیتول منفی و ۴۶ مورد (۵۱/۶۹٪) کلنی های لاکتوز مثبت در محیط VRBA جداسازی گردید. پس از کشت بر روی محیط های اختصاصی، ۳۹ نمونه (۴۳/۸۲٪) به عنوان اشریشیا کلی تعیین هویت شدند. پس از بررسی فعالیت بتاگلوکورونیداز بر روی محیط

(ECB) تهیه شده از شرکت دیفکو (آمریکا) حاوی ۲۰ نوویوسین تهیه شده از شرکت سیگما (آمریکا) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرم خانه گذاری گردید (۱۰).
ج) جداسازی باکتری: تمام نمونه های غنی شده بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC) تهیه شده از شرکت مرک (آلمان) حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفیکسیم (Oxoid, UK) و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تلوریت پتاسیم (Oxoid) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷°C، کلنی های سوربیتول منفی خالص سازی گردید. به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت باکتری های جداسازی شده محیط های ویولت رد بایل آگار (VRBA) و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) هر دو تهیه شده از شرکت مرک مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین به منظور بررسی فعالیت بتاگلوکورونیداز، باکتری های تایید شده به عنوان اشریشیا کلی بر روی محیط کرومو آگار اختصاصی O157 تهیه شده از شرکت هایمدیا (هند) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم خانه گذاری گردید (۱۰ و ۱۱).

د) تعیین سروتایپ: به منظور تایید نهایی کلنی های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی، از تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی O157 (بهار افشان، ایران) استفاده شد (۸).

ه) ارزیابی ژن های بیماری زای: استخراج DNA با استفاده از کیت DNP™ (سینازن، ایران) انجام گردید. برای ردیابی هم زمان ژن های بیماری زای *stx1*، *stx2* از روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط Santaniello در سال ۲۰۰۷ استفاده شد. حجم نهایی واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و حاوی Tris-HCL (۱۰mM)، MgCl₂ (۳mM)، dNTPs (۰/۲mM)،

بحث

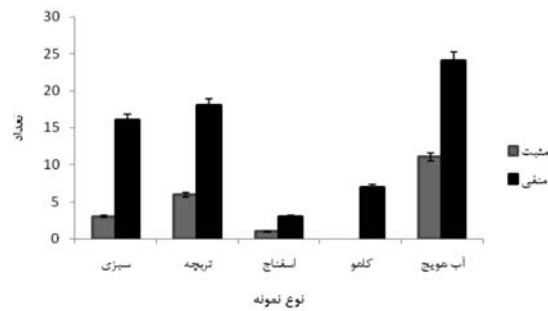
باکتری اشریشیاکلی O157:H7، چهارمین عامل بیماری های منتقل شونده از طریق مواد غذایی در آمریکا محسوب می شود. شمار موارد بیماری های مرتبط با مصرف انواع آب میوه و سبزیجات خام نیز طی سال های اخیر افزایش یافته است (۱۳).

با توجه به بقای طولانی مدت باکتری در محیط، امکان انتقال غیرمستقیم و جا به جایی باکتری از طریق حشرات وجود دارد. حشرات در نتیجه ارتباطی که با کود و مدفوع حیوانات دارند، موجب انتشار این باکتری در محیط می شوند. جانوران کندرو (مانند حلزون) از آفت های کشاورزی هستند که معمولا سبزیجات پر برگ را آلوده می کنند. این جانوران به طور مداوم باکتری های خاک و محیط خود را می بلعند. بنابراین پتانسیل آلودگی با سویه O157 را دارند. این بی مهرگان ممکن است در انتقال سویه O157 به میوه و سبزیجات از طریق تماس مستقیم آلودگی با مدفوع نقش داشته باشند. پژوهش های مختلف نشان داده که اشریشیاکلی بیشتر در کناره ها و شکاف های سبزیجات و میوه ها و یا در جایگاه های تغذیه ای جانوران کندرو مستقر می شوند. این نواحی نه تنها نقش محافظت باکتری را در برابر عواملی مانند شستشو و مواد پاک کننده دارد، بلکه مکان هایی برای انتقال هستند (۱۴).

در فاصله سال های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰، آب میوه (شامل شربت سیب و آب سیب) و محصولات میوه مانند جوانه های یونجه، کاهو و کلم همه گیری های گسترده ای را در مناطق مختلف جهان ایجاد نموده است که معروف ترین آن ها در سال ۱۹۹۶ در ژاپن به دنبال مصرف جوانه های تربچه روی داده است (۱۵).

در ایالات متحده افزایش مصرف میوه و سبزیجات خام با افزایش همه گیری های ایجاد شده توسط این باکتری در ارتباط بوده است. در سال ۲۰۰۵ یک همه گیری مربوط به مصرف محصولات بسته بندی شده از جمله کاهو و در سال ۲۰۰۶ یک همه گیری بزرگ تر نیز در ارتباط با مصرف اسفناج گزارش گردید. سویه های جدا شده در هر دو همه گیری یاد شده اشریشیاکلی O157:H7 بود (۱۶).

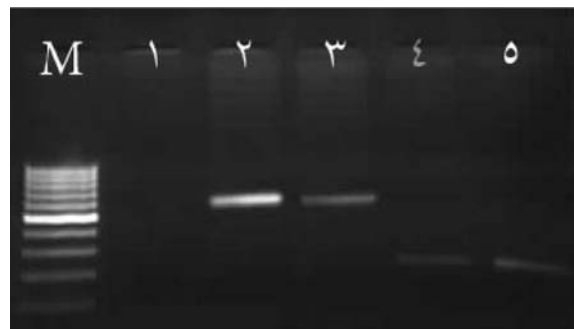
نتایج ما در این پژوهش نشان داد که از ۲۱ باکتری تأیید شده با آنتی سرم، ۴/۷۶٪ مربوط به اسفناج، ۱۴/۲۹٪ مربوط به سبزی،



نمودار ۲: فراوانی مطلق و نسبت باکتری های جدا شده با روش سرولوژیکی بر اساس نوع نمونه.

اختصاصی کرومواکار، ۳۰ باکتری اشریشیاکلی بتاگلوکورونیداز (MUG) منفی (۳۳/۷۱٪) و با استفاده از آنتی سرم اختصاصی، ۲۱ باکتری اشریشیاکلی O157:H7 (۲۳/۶۰٪) جداسازی شد (نمودار ۱).

بیشترین سروتیپ های شناسایی شده با روش سرولوژی مربوط به آب هویج و کم ترین آن ها مربوط به اسفناج به ترتیب با فراوانی ۵۲/۳۸٪ و ۴/۷۶٪ بود (نمودار ۲). پس از بررسی های مولکولی، از مجموع نمونه های تأیید شده با آنتی سرم ۱۷ نمونه (۸۰/۹۵٪) دارای ژن *rfb* O157 و ۹ نمونه (۴۲/۸۶٪) دارای ژن *fliC* H7 بودند (شکل ۱). هم چنین در ۳ نمونه (۳/۳۷٪) ژن *stx1* و در ۱ نمونه (۱/۱۲٪) ژن های *stx1* و *eae* مشاهده گردید که هر ۴ مورد مربوط به سویه هایی بود که با ژن های *rfb* O157 و *fliC* H7 نیز به عنوان اشریشیاکلی O157:H7 تأیید شده بودند (شکل ۲).



شکل ۱: نمایش ژن های اختصاصی سروتیپ در باکتری اشریشیاکلی O157:H7 بر روی ژل آگاروز. ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف های ۲ و ۳ نمونه های واجد ژن *fliC* H7 و ردیف های ۴ و ۵ نمونه های واجد ژن *rfb* O157.

با توجه به بقای طولانی مدت این ارگانیزم در خاک و در محیط‌های دارای pH پایین، خطر آلودگی مواد غذایی به ویژه در هنگام جدا شدن میوه از درخت و افتادن بر روی زمین بالا می‌رود. بنابراین ضرورت توجه و مراقبت بیشتر و پیشگیری در هنگام برداشت محصول وجود دارد. روش‌هایی که بر کاهش جمعیت باکتری اشریشیاکلی O157:H7 قبل از ورود به زنجیره غذایی انسان تاکید دارند می‌توانند نقش مهمی را در کاهش بیماری‌های انسانی ایفا کنند (۲۳).

نتیجه گیری

با توجه به دوز اندک عفونی و امکان آلودگی سبزیجات و میوه‌ها به باکتری O157:H7 ضرورت پایش مواد غذایی در مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت و عرضه آن به بازار وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان و جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۶ در شیراز از ۳ سویه تایید شده با آنتی‌سرم، در دو سویه ژن‌های بیماری‌زای *stx1* و *eaeA* را مشاهده نمودند (۲۱).

ما در این پژوهش، با استفاده از روش Multiplex PCR در نمونه‌های تایید شده با آنتی‌سرم اختصاصی، ژن‌های *eaeA* و *stx1* را در سویه‌های جدا شده تشخیص دادیم. از بین جدایه‌ها سه سویه دارای ژن *stx1* و یک سویه دارای ژن‌های *stx1* و *eaeA* بود که با نتایج پژوهش‌های قبلی ما مطابقت دارد. در پژوهش‌های قبلی ما بر روی نمونه‌های کلینیکی (۸) و نمونه‌های غذایی (۲۱ و ۲۲) در سطح استان فارس ژن *hly* مشاهده نشده بود و الگوی ژنتیکی غالب نشان دهنده وجود هم‌زمان ژن‌های *stx1* و *eaeA* در سویه‌های جداسازی شده بود.

خطرات ناشی از عفونت با اشریشیاکلی O157:H7 و تجربیات موارد آلودگی با این باکتری، اهمیت انجام آزمایش‌های دقیق برای شناسایی سروتیپ O157:H7 را نشان می‌دهد. در صورت شناسایی سریع این باکتری، منبع شیوع آن نیز زودتر شناسایی و درمان می‌گردد. بررسی‌های مولکولی هم‌زمان بر روی نمونه‌های محیطی (مانند آب و خاک) و سبزیجات، می‌تواند ارتباط ژنتیکی سویه‌ها و در نتیجه سبب شناسی عامل بیماری را بهتر نشان دهد (۱۶).

References

1. Badouei MA, Zahraei Salehi T, Rabbani Khorasgani M, Tadjbakhsh H, Nikbakht Brujeni G. Occurrence and characterisation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic calves. *Comp Clin Pathol*. 2010;19:295-300.
2. Kargar M, Homayoon M. Outbreaks of infection sources and antibiotic resistance in EHEC strains among children under 5 years old in Marvdasht. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University Tehran Medical Branch*. 2010;19:268-73 [In Persian].
3. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Lopez C, Justel P. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol*. 2007; 1(7):1-9.
4. Grant M, Hedberg C, Johnson R, Harris J, Logue C, Meng J, Sofos J, Dic kson J. The significance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Food Protection Trends*. 2011; 63:3-45.
5. Small DD. Evaluation of an amperometric biosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. Master's Thesis. The Department of Biological and Agricultural Engineering. Louisiana State University in Shreveport. Louisiana. USA. 2006. 1-93.
6. Turutoglu H, Ozturk D, GulerL, Pehlivanoglu F. Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. *Vet Med*. 2007; 52:301-7.
7. Wu G, Carter B, Mafura M, Liebana E, Woodward M, Anjum M. Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates and identification of genes linked to human infections. *Infection and Immunity*. 2008; 76(2):845-56.
8. Kargar M, Homayoon M, Yaghoobi R, Manookians A. Prevalence of virulence genes *stx1*, *stx2*, *hly* and *eaeA*

دنیای میکروبیوت ها، سال سوم، شماره اول، ۱۳۸۹، ارزیابی شیوع ژن های بیماری زای سویه های اشریشیاکلی تولید کننده شیگا توکسین در فروشگاه های عرضه کننده آب میوه و سبزیجات در شهرستان شیراز، مرجان شاهابلی و همکاران

- with multiplex PCR from *E. coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in Marvdasht. Iran J Infec dis and Trop Med. 2009; 44:7-12 [In Persian].
9. Fratamico PM, DebRoy C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food using Real-time multiplex PCR assays targeting the *stx1*, *stx2*, *wzy*O157, and the *fliCh7* or *eae* genes. Food Anal. Methods. 2010; 3(4):330-7.
 10. Kargar M, Heidary S, Abbasian F, Shekarforoosh S. Survey of prevalence and antibiotic susceptibility & verotoxin production of *E. coli* verotoxigenic (*E. coli* O157:H7) in row milk of Jahrom cows. Iran J Infec dis and Trop Med. 2006;34:7-11 [In Persian].
 11. Vimont A, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Lazizzera C, Bavai C, Delignete-muller ML. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. App Environ Microbiol. 2006; 72:261-8.
 12. Kim JY, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. J Vet Sci. 2005; 6:7-9.
 13. Namdar N, Tahamtan Y, Kargar M, Hoseini MH. Evaluation of antagonistic effect of probiotics *Bifidobacteria* spp. on *E. coli* O157:H7 *in vitro*. J Microb World. 2009; 2(3):161-168 [In Persian].
 14. Sproston EM, Ogden ID, Wilson MJ. Slugs: potential novel vectors of *Escherichia coli* O157. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(1):144-9.
 15. Kodaka H, Uesaka Y, Kashitani F, Nissui. Glucose fermentative gram-negative rod identification system EB-20 gives a unique profile for typical non-sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol. 2004; 42(1):354-8.
 16. Cooley M, Carychao D, Crawford-Miksza L, Jay MT, Myers C, Rose C, Keys C, Farrar J, Mandrell RE. Incidence and tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a major produce production region in California. PLoS ONE. 2007;2(11): e1159. doi: 10.1371/journal.pone.0001159.
 17. Alam MJ, Zurek L. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with houseflies on a cattle farm. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:7578-80.
 18. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, Gonzolez EA, Bernardez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (Verotoxin) - producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol. 2003; 41:1351-6.
 19. Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J App Microbiol. 2003; 95:1217-25.
 20. Uhlich, GA, Sinclair, JR, Warren, NG, Chmielecki, WA, Fratamico, PM. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with two multi-state foodborne outbreaks in 2006. Appl Environ Microbiol. 2008; 74:1268-72.
 21. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin producing *E. coli* O157:H7 strains from meats purchase in Shiraz. Iranian South Med J. 2011; 14(2):76-83 [In Persian].
 22. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins, intimin and hemolysin genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains from industrial ground meat in Shiraz. Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences. 2011; 18:512-20 [In Persian].
 23. Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC, Nisbet DJ. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a Review. J Dairy Sci. 2003; 86:852-60.



Evaluation of virulence genes of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from juice purchase and vegetables in Shiraz

Marjan Shah Illi¹, Mohammad Kargar², Abbas Ali Rezaeian³, Maryam Homayoon⁴,
Mehdi Kargar⁵, Sadegh Ghorbani-Dalini⁶

¹M.Sc. Department of Microbiology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

²Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

³Lecturer, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

⁴M.Sc. Department of Microbiology, Marvdasht Branch, Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

⁵B.Sc. Department of Microbiology, Science and Researches Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

⁶M.Sc. Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Introduction: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) strains can infect humans via vegetal and animal food consumption and cause food poisoning with diarrhoeas, hemorrhagic colitis, haemolytic uraemic syndrome that can lead to death. The purpose of this study is isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes from Juice Purchase and vegetables in Shiraz.

Material and Methods: This cross-sectional study was performed on 89 samples of Juice Purchase and vegetables collected from Shiraz. Isolates were enriched in ECB with novobiocin medium in temperature 37°C. After, in order to examine the fermentation of sorbitol and lactose the CT-SMAC and VRBA media and the activities of β -glucuronidase of separated bacteria were examined using the chromoagar medium. Then, the existence of *E.coli* O157:H7 was confirmed with the specific antiserum. Finally, virulence genes *stx1*, *stx2*, *eae* and *hly* were tested by multiplex PCR and *rfb* O157 and *fliC* H7 were tested by single PCR.

Results: Out of all examined samples 69 (77.53%) sorbitol negative bacteria were separated that after evaluation with specific antiserum 21 (23.60%) *E.coli* O157:H7 was detected. The molecular markers, *stx1* genes in 3 samples and *eae*, *stx1* in 1 sample were detected.

Conclusion: Intensive studies of the sources, incidence, fate and transport of *E.coli* O157 near produce production are required to determine the mechanisms of pre-harvest contamination and potential risks for human.

Keywords: *E.coli* O157:H7, Multiplex PCR, Virulence genes.