تعیین فراوانی باکتری های وروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* در مدفوع گاو در شهر کرمان

خلیلی، م.*[۱و۲]، منصوری، ش.[۲] ، افضلی، م.[۳] ، محمدآبادی، م.[۱].

دریافت: ۱۳۸۹/۲/۲۵ پذیرش: ۱۳۸۹/۸/۸

خلاصه

اشریشیاکلی تولیدکنندهٔ توکسین مشابه شیگا (STEC) (وروتوکسیژنیک) در سال های اخیر به عنوان مهمترین گروه از پاتوژن های مواد غذایی مطرح شده است. اصلی ترین جایگاه این باکتری ها در طبیعت، رودهٔ گاو است که از این طریق سبب آلوده شدن مواد غذایی با منشاء گاو می شود. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و تشخیص فراوانی سویه های STEC با روش کشت اختصاصی و multiplex PCR در مدفوع گاوهای شهر کرمان بود.

در این مطالعه تعداد ۱۴۲ نمونه مدفوع گاو از کشتارگاه کرمان جمع آوری شد و پس از غنی سازی در محیط mTSB (modified Tripticase Soy Broth) جدایه های *اشریشیاکلی* از نظر ژن های بیماریزایی stx1,2 با روش M –PCR ارزیابی شدند.

با انجام آزمایش های فوق یک جدایه (۰/۷٪) STEC O_{157} حامل ژن stx2 و یک جدایه (۰/۷٪) *E. coli* O_{157} غیر توکسیژنیک از نمونه های مدفوع گاو جدا شد؛ همچنین با انجام روش M –PCR d بر روی تمامی مدفوع غنی شده در محیط m-TSB، ۵ نمونه (۳/۵٪) STEC non – O_{157} تشخیص داده شد.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در ناحیهٔ جغرافیایی مورد بررسی، سروتیپ های غیر O_{157} وروتوکسیژنیک نسبت به سروتیپ O_{157} وروتوکسیژنیک غالب تر است. بنابراین جهت شناسایی سویه های وروتوکسیژنیک در این منطقه، روش های باکتریولوژیک که تنها اساس آنها تکیه بر خصوصیات بیوشیمیایی سروتیپ O_{157} است، برای تشخیص سروتیپ O_{157} کافی نبوده و برای شناسایی سویه های وروتوکسیژنیک به روش های مولکولی مانند M–PCR نیاز است.

واژه های کلیدی: *اشریشیا کولی*، M-PCR، مدفوع گاو، STEC، کرمان.

۱.هستهٔ تحقیقاتی ژنتیک حیوانی و حیوانات ترانسژنیک دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۳ . دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

*نویسنده مسؤول: : mdkhalily@mail.uk.ac.ir

مقدمه

سویه های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک شایعترین سویه های عامل بیماری در کشورهای توسعه یافته هستند. تخمین زده می شود که این باکتری ها عامل بیش از صدهزار عفونت و تقریباً ۱۰۰ مورد مرگ ومیر در ایالات متحده هستند. شدت بیماری های ایجاد شده توسط EHEC از فرم ملایم (اسهال ساده) تا کولیت هموراژیک به همراه درد شکمی شدید، اسهال خونی و تب پایین و یا بدون تب متغیر است، و علت بیشتر موارد بیماری در انسان در ایالات متحده سروتیپ $O_{157}:H_7$ است (Murray و همکاران، ۱۹۹۸). این سروتیپ از سال ۱۹۸۲ به عنوان عضو جدید گروه *اشریشیاکلی* های مولد اسهال خونی اضافه گردید (حقیقی، ۱۳۸۳). *اشرشیاکولی* های وروتوکسیژنیک دو نوع وروتوکسین *stx1&2* تولید می کنند که باعث توقف سنتز پروتئین در سلول میزبان می شوند. وژن های مربوط به این وروتوکسین ها توسط باکتریوفاژهای لامبدا کد می شوند (Murray و همکاران، ۱۹۹۸).

هیچ گونه طبیعت مورفولوژیک اختصاصی که *E. coli* $O_{157}:H_7$ یا دیگر سروتیپ های EHEC را از فلور نرمال روده ای کشت داده شده در محیط جامد متمایز کند، وجود ندارد، لیکن سروتیپ های *E. coli* $O_{157}:H_7$ تخمیر کنندهٔ سوربیتول و تولیدکنندهٔ بتا گلوکورونیداز نیز دیده شده است (Law، ۲۰۰۰). جداسازی و تشخیص VTEC O_{157} در آزمایشگاه براساس عدم توانایی باکتری در تخمیر سوربیتول، واکنش با آنتی‌سرم ویژه و اثبات یک یا هر دو ژن تولیدکنندهٔ توکسین stx امکان پذیر است، ولی در سروتیپ های تخمیرکنندهٔ سوربیتول، جداسازی و تشخیص مشکلتر است و با بررسی تولید توکسین یا تکثیر اسیدنوکلئیک برای فاکتورهای حدت صورت می گیرد (Lanser، ۲۰۰۴). به طور کلی تشخیص آزمایشگاهی عفونت های ناشی از VTEC با سه روش انجام می گیرد: ۱- کشت مدفوع. ۲- آزمایش نشان دادن وروتوکسین در صافی مدفوع. ۳- تعیین عیار آنتی بادی های خنثی کنندهٔ وروتوکسین (حقیقی، ۱۳۸۳).

منبع اصلی باکتری های STEC O_{157} و STEC non O_{157}، دستگاه گوارش گاوهای سالم و دیگر نشخوارکنندگان مثل گوسفند و بز است. حیواناتی مثل گوزن، اسب، خرگوش، پرنده، سگ و گربه نیز می توانند باعث انتقال این سروتیپ شوند. شیوع EHEC $O_{157}:H_7$ به مصرف محصولات غذایی پخته نشده و یا آلودهٔ تهیه شده از گاو بستگی دارد. منابع دیگر آلودگی شامل آب سیب پاستوریزه نشده و یا آلوده، آب آلوده (آب آشامیدنی و یا آب شنا)، سبزیجات، میوه ها، سس مایونز، ماست، شیر آلوده، گوشت گوزن، گوشت خوک، غذاهای اسیدی و حساس آلوده، کالباس و سوسیس است. علاوه بر این تماس شخص با حیوان و یا انسان نیز در این آلودگی بی تأثیر نمی باشد (Indira و همکاران، ۱۹۹۸).

با توجه به اهمیت *اشرشیاکلی* های وروتوکسینوژنیک و نظر به این که گاو مخزن اصلی باکتری است، در این مطالعه هدف ما تشخیص سویه های وروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* و شناسایی ژن های حدت اصلی در سویه های جداشده و شناسایی سروتیپ O_{157} در نمونه های مدفوعی گاو در شهر کرمان است که هم به روش کشت و هم به روش PCR صورت می گیرد.

روش کار:

جمعاً ۱۴۲ نمونه مدفوع گاو از کشتارگاه کرمان در اوائل زمستان و اواسط بهار۱۳۸۶-۱۳۸۵ جمع آوری شد.

جداسازی اشریشیا کلی O_{157} از مدفوع گاو: یک گرم از نمونه مدفوع قرار داده شده در دمای اتاق را وزن کرده، در cc9 محیط mTSB حاوی وانکومایسین و سفکسیم به مدت ۲۴ ساعت، در ۳۷ $^\circ C$ کشت دادیم. سپس این نمونه ها را از محیط mTSB برداشته، به صورت خطی در محیط کروم آگار O_{157} کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ $^\circ C$ گذاشتیم، تا بررسی ها و آزمایش های مورد نظر روی کلونی تک و خالص باکتری که صورتی تا ارغوانی رنگ و مشکوک به *اشرشیاکلی* سروتیپ O_{157} است، انجام شود. کلونی های صورتی رنگ برای بررسی توانایی تخمیر قند سوربیتول در محیط پایهٔ فنل رد آگار حاوی قند سوربیتول کشت داده شدند (Bettelheim ۱۹۹۸، Dodd، ۲۰۰۳). کلونی های بیرنگ، درشت و مضرّس که مشکوک به سروتیپ O_{157} بودند از نظر شناسایی اشریشیاکلی بررسی شدند. برای این منظور از محیط های سیمون سیترات، اوره براث، SIM، MR-VP، TSI و مک کانکی آگار استفاده

شد ۱۹۹۸ ، (Indira). تمامی باکتری هایی که سوربیتول را تخمیر نکرده و به عنوان *اشریشیاکلی* شناخته شده بودند، جهت بررسی سروتیپ O_{157} با آنتی سرم ضد O_{157} مونوکلونال اختصاصی (آنتی بادی مونوکلونال مونو اسپسیفیک ضد O_{157}) (شرکت مست انگلیس) مخلوط شده، آگلوتیناسیون آنها را بررسی شد. برای این منظور از آنتی سرم O_{157} تهیه شده و آگلوتیناسیون با روش ذکر شده در بروشور مربوط انجام شد. در مراحل بعد روی تمامی نمونه های مدفوع کشت داده شده در محیط mTSB حاوی وانکومایسین و سفکسیم و همچنین کلونی های O_{157} شناسایی شده با آنتی سرم برای شناسایی ژنهای stx_1، stx_2، M-PCR انجام شد.

روش PCR:

استخراج اسید نوکلئیک: از روش جوشاندن برای استخراج اسید نوکلئیک استفاده شد. به مدت ۱۰ دقیقه سوسپانسیون باکتریایی در دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفت. سپس سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه انجام و از مایع رویی ۱۰ میکرولیتر به عنوان DNA templet به master mix افزوده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول زیر آمده است (Holland و همکاران، ۲۰۰۰).

Primer	Sequence (5′-3′)	Reference	Amplification product size (bp)
VT1F VT1R	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	Paton and Paton (1998) modified by Fitzmaurice J. (2003)	180
VT2F VT2R	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	Paton and Paton (1998) modified by Fitzmaurice J (2003)	255

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در مطالعه و اندازه محصول PCR

روش انجام PCR :

برای هر نمونه آنزیم Taqبه میزان ۲ واحد، dNTPS(۱۰میلی مولار) ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرها به میزان ۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار)، بافر X ۱۰ به میزان ۲/۵ میکرولیتر، کلراید منیزیوم (۵۰ میلی مولار) ۱/۵ میکرولیتر و سرانجام حجم نهایی با آب مقطر به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس۱۰ میکرولیتر DNA به Master Mix اضافه گردید. در نهایت نمونه های حاصل به داخل دستگاه MJ Thermal Cycler انتقال یافتند تا فرایندPCR انجام شود.

برنامه PCR شامل: پیش دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل، دناتوراسیون در ۹۴ درجه ۱ دقیقه، اتصال ۶۲ درجه ۱ دقیقه وگستردگی در۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه بود و سرانجام یک مرحله گستردگی نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در نهایت محصولات همراه با کنترل های مثبت (ATCC: ۴۳۸۹۵) و کنترل منفی (NTC) روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم برماید برده شدند.

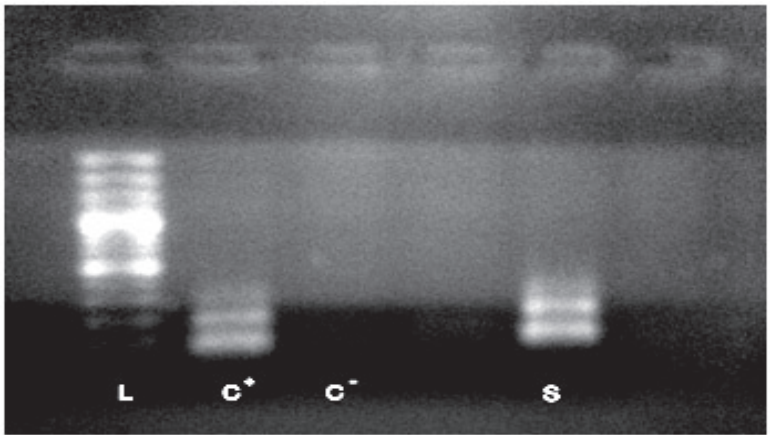
نتایج:

نتایج کشت و آگلوتیناسیون: از ۱۴۲ نمونه مدفوع گاو غنی شده در محیط mTSB، ۹۴ نمونه با کشت در محیط کروم آگار O_{157}، تشکیل کلونی صورتی تا ارغوانی دادند که احتمال وجود سروتیپ O_{157} در این موارد وجود داشت و از این۹۴ نمونه، ۸۰ نمونه با روش های باکتریولوژیک به عنوان *اشریشیاکلی* جدا گردید و از این ۸۰ نمونه ۱۱ نمونه با انجام تست های بیوشیمیایی به عنوان *E.coli* غیرتخمیرکننده سوربیتول شناخته شدند، که از این ۱۱ نمونه پس از انجام تست آگلوتیناسیون با استفاده از آنتی سرم O_{157}، ۲ مورد به عنوان *E.coli* O_{157} و ۹ مورد به عنوان *E.coli* non- O_{157} شناسایی شد.

نتایج انجامPCR:

با انجام آزمون Multiplex-PCR در روی دو نمونه *E. coli* O_{157} تأیید شده با روش آگلوتیناسیون یک مورد به عنوان O_{157} VTEC حامل ژن *stx2* یک مورد به عنوان*E.coli* O_{157}

غیر توکسینوژن شناخته شد. همچنین بر روی تمامی نمونه های مدفوع گاو(۱۴۲ نمونه) غنی شده در محیط mTSB روش Multiplex-PCR انجام شد که)از این تعداد ۵ نمونه (۳/۵٪) به عنوان VTEC non – O_{157} (دو نمونه حامل ژن های *stx1*,2 و سه نمونه حامل ژن های *stx1*) شناسایی شد(شکل ۱



شکل۱. الکتروفورز انجام شده بر روی محصولاتL. dM-PCR ; مارکر100 bp ،C^+ کنترل مثبت (ATCC:۴۳۸۹۵)
;کنترل منفی (NTC) ،S: نمونه مثبت مدفوع گاو با کد شماره ۶۰.

بحث:

روش های معمول برای تشخیص VTEC O_{157}:H_7 شامل رشد کلونی های فاقد قدرت تخمیر سوربیتول روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار و بررسی فعالیت گلوکورونیداز و آگلوتیناسیون با آنتی سرم های O_{157} و H_7 است. به هرحال سروتیپ های غیر O_{157} فاقد خصوصیات تخمیر سوربیتول و فعالیت گلوکورونیداز نیز هستند که مشکلاتی را در تشخیص ایجاد می کنند. یعنی کشت تنها می تواند تعداد کمی از سوش های وروتوکسیژنیک اشرشیاکلی را تشخیص دهد و قادر نیست سروتیپ های غیر O_{157} وروتوکسیژنیک را تشخیص دهد؛ بنابراین برای تشخیص سروتیپ های غیر O_{157} از تکنیک های دیگر مثل PCR و یا سیتوتوکسیسیتی استفاده می کنند (Murray و همکاران، ۱۹۹۸). روش PCR، روش سریع و قابل اطمینانی برای تشخیص بر پایه مولکولی طیفی از عوامل بیماریزاست. این روش در تشخیص میکروارگانیزم ها در کشت های میکروبی، بافتی و به طور مستقیم از نمونه های کلینیکی کاربرد دارد (Holland و همکاران، ۲۰۰۰). روش PCR را برای تکثیر ژن های *stx1* و *stx2* در کشت های مدفوع انسان شرح دادند نیز توانایی multiplex-PCR را برای تشخیص ژنهای *stx2*، *stx1*، *eae* و *hlyA* توضیح دادند. این روش به هرحال نتوانست با نمونه های مدفوع تست شود، چون پرایمرها برای هر سکانس ژن هدف، حساسیت های مختلفی را نشان داد و پرایمرهای ژن *stx* قادر نبود، *stx1* را از *stx2* به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز، تشخیص دهد (Fagon و همکاران، ۱۹۹۹).

تشخیص سریع عفونت های STEC برای جلوگیری از شیوع فراوان و کنترل بیماری مهم است؛ ولی در آزمایشگاه های تشخیص طبی روش های کشت به کار می رود. به طور کلی وسعت غربالگری برای STEC به تکنیک های جدیدی مخصوصاً برای تشخیص اپیدمیولوژی بهتر سروتیپ های O_{157} و non-O_{157} نیاز خواهد داشت (Cagneya و همکاران، ۲۰۰۴).

در این مطالعه از خصوصیت عدم تخمیر قند سوربیتول، تشکیل کلونی صورتی رنگ روی محیط کروم آگار – O_{157} و روش M-PCR برای جداسازی و ژنوتایپینگ باکتری-های اشرشیاکلی O_{157} و روتوکسیژنیک از مدفوع گاو در شهر کرمان

استفاده کردیم.

نمونه گیری از رکتوم گاو انجام شد. چون نمونه های رکتوم کمتر توسط باکتری های موجود در محیط آلوده می شوند براساس مطالعات انجام شده، محل استقرار STEC $O_{157}:H_7$ در گاو، دوراهی رکتوم، مجرای روده ای – مقعدی است (Rice و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین در این مطالعه برای بالا بردن موفقیت تشخیص و برداشتن مواد مهاری و غیرفعال کنندهٔ باکتری ها از یک فاز pre-enrichment، یعنی روش غنی سازی و از محیط m–TSB نیز برای این غنی سازی استفاده شد (Dodd و همکاران، ۲۰۰۳). در ادامه از محیط کروم آگار O_{157} برای تشخیص سریع و جداسازی EHEC بخصوص O_{157} با تشکیل کلونی های صورتی، استفاده شد. در روی این محیط سوش های EHEC سروتیپ O_{157} کلونی های صورتی تا ارغوانی تشکیل می دهند، در صورتی که *E. coli* های همسفره کلونی آبی یا بیرنگ تشکیل می دهند، این محیط به دلیل نداشتن موارد منفی کاذب از حساسیت بالایی در تشخیص سویه های O_{157} اشریشیاکلی برخوردار بود (Bettelheim ، ۱۹۹۸).

در این مطالعه که ۱۴۲ نمونه مدفوع گاو مورد بررسی قرار گرفت و نمونه گیری هم در اوایل زمستان ۸۵ و اواسط بهار ۸۶ یعنی در دو زمان انجام شد، یک مورد STEC O_{157} جدا شده و ۲ مورد STEC non-O_{157} در فصل زمستان و سه مورد STEC non-O_{157} در فصل بهار جداسازی شد. اگرچه تعداد نمونه های این مطالعه کم است، اما با توجه به نتایج به دست آمده و برخی مطالعات قبلی می توان گفت میزان جداسازی در دو زمان متفاوت یکی است (Dodd و همکاران، ۲۰۰۳). نائب آقایی و منصوری در یک تحقیق در سال ۷۸–۷۹ در شهر کرمان، گزارش کردند که در بین ۱۰۰ سویه جدا شده (مشکوک به VTEC) تنها سه مورد (۳٪) از نظر ژن *stx* با روش M-PCR مثبت بودند که هر سه مورد مربوط به سویه های *stx2*، دو مورد آن مربوط به نمونه مدفوع و یک مورد مربوط به نمونه ادرار بود (نائب آقایی و منصوری، ۱۳۸۵ ، Aslani و Bouzari، ۲۰۰۳) در یک مطالعه در ایران نشان دادند که همه STEC های جدا شده از کودکان غیر O_{157} بودند (Aslani و Bouzari، ۲۰۰۳). در کشورهای دیگر نیز شیوع این سروتیپ در گاو بررسی شده است. برای مثال در ژاپن در سال ۲۰۰۰ با روش کشت و PCR اثبات شد که ۵۰/۵۵٪ از نمونه های مدفوع گاو به STEC آلوده بودند که فقط یکی از آنها به سروتیپ O_{157} تعلق داشت و نیز ژن *eae* در 24% و ژن *hlyA* در 72% از نمونه ها تشخیص داده شد (Kobayashi و همکاران، ۲۰۰۱). قابل ذکر است که میزان ذخیره سازی این سروتیپ در گاوها تحت تأثیر تغذیه، سن، فصل و دیگر شرایط می باشد (Fagon و همکاران، ۱۹۹۹). بازیافت کم این سروتیپ و یا در بعضی موارد پیدا نشدن سروتیپ، شاید به دلیلِ شیوع کم و یا تعداد کم سروتیپ پخش نشدن همگن سروتیپ در نمونه مورد بررسی، برجسته بودن رشد فلور میکروبی زمینه ای نسبت به سروتیپ مورد نظر باشد و باید این موضوع را مدنظر قرار داد که گاوها همیشه دارای مقادیر متفاوتی از STEC هستند، ولی زمانی که مقدار STEC کم هست، STEC نمی تواند به وسیله stx-PCR تشخیص داده شوند (Kobayashi و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین نتایج این مطالعه نشان می دهد که در ناحیهٔ جغرافیایی مورد بررسی، میزان فراوانی انواع انتروهموراژیک *E. coli* در گاو ۴/۲٪ (۶ مورد از ۱۴۲ نمونه) است که ۳/۴٪ از آن مربوط به سروتیپ های non – O_{157} و ۰/۷٪ باقیمانده مربوط به سروتیپ O_{157} است. پس سروتیپ های غیر O_{157} وروتوکسیژنیک نسبت به سروتیپ O_{157} وروتوکسیژنیک غالبتر بوده است. بنابراین جهت شناسایی سویه های وروتوکسیژنیک در این منطقه روش های باکتریولوژیک که تنها اساس آن تکیه بر خصوصیات بیوشیمیایی سروتیپ O_{157} برای تشخیص سروتییپ O_{157} کافی نبوده و برای شناسایی سویه های وروتوکسیژنیک، به روش های مولکولی مانند M –PCR نیاز است (Holland و همکاران، ۲۰۰۰).

سپاسگزاری:

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی که انجام این مطالعه را در قالب طرح تحقیقاتی و تأمین هزینه میسر ساختند، سپاسگزاریم.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 3 (2011) 53-60

Determination of frequency of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from bovine feces in Kerman

Khalili, M.[1, 2], Mansouri, Sh.[2], Afzali, M.[3], Mohammad-Abadi, M.R.[1]

Received: 15.05.2010 Accepted: 30.10.2010

Abstract

Nowadays, Shiga- like toxin – producing *Escherichia coli* (STEC), verotoxin – producing *E. coli* (VTEC), are the most important emerged group of food borne pathogens. Cattle, especially young animals, have been implicated as a principal reservoir of STEC. Foods of bovine origin are the major of the infection. The aim of this study was to genotype the O_{157} VTEC from bovine feces in Kerman city.

A total of 142 cattle's fecal samples were collected from Kerman's abattoir. All samples were Grew in m TSB and were plated on chrom agar O_{157}, phenol red agar base with sorbitol, and cultured on differential medium for diagnostic of *E. coli*. The isolates suspicions to O_{157} were typed with monoclonal antibody again serotype O_{157}. These isolates and feces samples grown in m TSB, were also tested with M-PCR for detection of $stx_{1, 2}$ genes. One VTEC O_{157} (0.7%) carrying *stx*2 and one non- verotoxigenic *E. coli* O_{157} (0.7%) were isolated from feces, also five VTEC strains belong to serotypes other than O_{157} (3.5%) (two isolates carrying $stx_{1, 2}$ and three samples carrying *stx1*) were separated from feces which grown in m TSB using d M-PCR. The results of this study showed that the frequency of total of STEC is 3.5% and serotypes other than O_{157} have higher prevalence. Therefore for the identification of enterohemorrhagic serotypes, bacteriological tests are not satisfactory and molecular tests such as M-PCR are needed for the identification of all serotypes.

Key words: *E. coli*, M-PCR, Bovine feces, STEC, Kerman.

1.Research Center of Animal Genetic and Transgenic Animals, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2.Research Center of Tropical and Infectious Diseases of Kerman University Of Medical Sciences, Kerman, Iran

3.Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.

*Corresponding author: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

منابع

حقیقی ، ل.۱۳۸۳. باکتری های روده ای، چاپ اول، انتشارات شروع، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی، بوشهر. ۶۱- ۱۵۸.

نائب آقایی، م.؛ منصوری ، ش. ۱۳۸۵ . شناسایی سویه های O_{157}:H_7 مولد شیگاتوکسین اشرشیاکلی(STEC) جدا شده از نمونه های مدفوع، ادرار بیماران به روش multiplex-PCR ، مجله فصلنامه علمی- پژوهشی یافته، دانشگاه علوم پزشکی لرستان. **۸(۱)**، ۲۱- ۲۷.

Aslani, M., Bouzari, S. 2003. An epidemiological study on verotoxin-producing *Escherichia* coli: (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandran and Golestan provines). European Journal of Epidemiology **18**, 345-349.

Bettelheim, K.A. 1998. Reliability of chromagar O_{157} for the detection of EHEC O_{157} but not EHEC belonging to other serogroups. Applied Environmental Microbiolology **85**, 425-428.

Dodd, C.C., Sanderson, M.W., Sargeant, J.M., Nagaraja, T.G., Oberst, R.D., Smith, R.S., Griffin, D.D. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O_{157} in cattle feeds in Midwestern feedlots. Applied Environmental Microbiolology **69(9)**, 5243-5247.

Fagon, P., Hornitzky, M., Bettelheim, K., Djordjevic, S.P. 1999. Detection of shiga-like toxin, intimin and EHEC hly A genes in animal feces by multiplex PCR. Applied Environmental Microbiolology **65(2)**, 868-872.

Cagneya, C., Crowleya, H. G., Duffy, A., Sheridan, J., O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H. 2004. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. Food Microbiology **21**, 203–212

Fitzmaurice, J., 2003. Molecular diagnostic assay for *Escherichia coli* O_{157}:H_7. Ph.D. Thesis Department of Microbiology, National University of Ireland, University College Galway, Ireland.

Holland, J.L., Louie, L., Simor, A.E., Louie, M. 2000. PCR detection of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 directly from stools: evolution of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. Journal of Clinical Microbiology **38(11)**, 4108-4113.

Indira, T., Blanch, K., Hovde, C. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. Applied Environmental Microbiology **64(9)**, 3166 - 3174.

Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., Yamamoto, K. 2001.Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Applied Environmental Microbiology **67(1)**, 484-489.

Lanser, J. STECVTEC working party. Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Australian Government Report Oct 2004.

Law, D. 2000. Virulence factors of *E. coli* O_{157} and other shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology **88(5)**, 729-745.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. 1998. Medical Microbiology. 3rd. Boston, Mosby, 232-244.

Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaea, enterohaemorrhagic E. coli hlya, rfbO111, and rfbO157. Journal of Clinical Microbiology **36**, 598–602.

Rice, D., Haiqing, Q., Stacey, S., Wynia, A., Hovde, C. J. 2003. Rectal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O_{157}:H_7: colonized cattle and those transiently shedding the same organism. Journal of Clinical Microbiology, **41(11)**, 4924-4929.