Archive of SID

Short Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Identification of *Escherichia coli O157: H7* from Slaughtered Beef in Mashhad Using Biochemical and Molecular Methods

Ehsan Yousefi[1], Bahareh Ghouchannezhad Nournia[1], Afsaneh Yousefi[2], Faeze Fakour[1*]

1- *Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*
2- *Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran*

Article Information

Article Subject:
Medical Microbiology

DOI:

Corresponding author:

Faeze Fakour,
Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Email:
faezefakour@gmail.com.

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Escherichia coli O157:H7* is one of the main causes of transmitted diseases by food, including meat and meat products. The purpose of this study was to investigate the prevalence of *E. coli O157:H7* contamination in Mashhad with the detection of *rfbE* gene.

Materials and Methods: For this study, 148 slaughtered beef samples from Mashhad (spring to winter, 2018) were randomly collected and transferred to the laboratory. The identification of *E. coli O157:H7* was performed by biochemical methods and *rfbE* gene was detected by PCR colony method.

Results & Discussion: Based on biochemical tests, *E. coli O157:H7* was isolated in 7 (4.73%) samples of slaughtered beef and after PCR colony; only 2 (1.35%) of these 7 samples were approved.

According to the results of this study, it can be concluded that beef can be considered as a major reservoir for *E. coli O157:H7* and there is a potential for transmission of this pathogen to humans through the consumption of beef and its products. Also, the specific primers of *rfbE* gene were able to differentiate the *E. coli O157:H7* colonies from other cultured colonies on the culture medium during the PCR process. The present research was performed for the first time in the city of Mashhad.

Keywords: *Escherichia coli O157:H7*, *rfbE* gene, PCR colony, Beef

Received: 2019/05/09 Accepted: 2019/08/05 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Yousefi E, Ghouchannezhad Nournia B, Yousefi A, Fakour F. Identification of Escherichia coli O157: H7 from Slaughtered Beef in Mashhad Using Biochemical and Molecular Methods. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :137-141

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۲ ـ خرداد و تیر ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی *اشریشیاکلی* O157:H7 درگوشت گاوهای کشتار شدهٔ شهر مشهد با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

احسان یوسفی[۱]، بهاره قوچان‌نژاد نورنیا[۱]، افسانه یوسفی[۲]، فائزه فکور[۱*]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲. گروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

موضوع:

میکروب‌شناسی پزشکی

IJMM1398;13(2): 137-141

نویسندهٔ مسئول:

فائزه فکور

گروه زیست¬شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

پست الکترونیک:

faezefakour@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیا کلی سویه* O157:H7 به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری‌های منتقل شونده به‌وسیلهٔ مواد غذایی از جمله گوشت و فرآورده‌های گوشتی است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی شیوع آلودگی گوشت گاو کشتار شده در مشهد به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* با ردیابی ژن *rfbE* بود.

مواد و روش‌کار: تعداد ۱۴۸ نمونه گوشت گاو کشتار شده در مشهد (بهار تا زمستان ۱۳۹۷) به طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. شناسایی *اشریشیا کلی سویه O157:H7* با روش‌های بیوشیمیایی و ردیابی ژن *rfbE* به روش کلنی PCR صورت پذیرفت.

یافته‌ها و بحث: بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، *اشریشیا کلی سویه O157:H7* در تعداد ۷ (۴/۷۳ درصد) نمونه از گوشت گاوهای کشتار شده جداسازی و پس از انجام کلنی PCR، در ۲ (۱/۳۵ درصد) عدد از این ۷ نمونه تأیید شد. با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان استنباط کرد گوشت گاو می‌تواند به عنوان یک مخزن اصلی و مهم برای *اشریشیا کلی سویه O157:H7* باشد و احتمال انتقال این پاتوژن به انسان با مصرف گوشت گاو و فرآورده‌های آن وجود دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پرایمرهای اختصاصی ژن *rfbE* به‌خوبی قادر به افتراق کلنی‌های *اشریشیا کلی سویه O157:H7* از سایر کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت، طی فرآیند PCR هستند. تحقیق حاضر برای اولین بار است که در شهرستان مشهد انجام می‌شود.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی سویه* O157:H7، ژن *rfbE*، کلنی PCR، گوشت گاو

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

اشریشیا کلی تولیدکننده وروتوکسین از مهم‌ترین باکتری‌های پاتوژن انسانی است. *اشریشیا کلی سویه O157:H7* مهم‌ترین سروتیپ پاتوژن این پاتوتیپ در انسان است و یکی از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری‌های منتقل‌شونده به‌وسیله مواد غذایی از جمله گوشت و فرآورده‌های گوشتی است (۱،۲) که در ایجاد بیماری‌هایی همچون کولیت خونریزی دهنده، پورپورا ترومبوسیتوپنی ایدیوپاتیک و سندروم اورمی همولیتیک مؤثر است (۳). *اشریشیا کلی سویه O157:H7*، کودکان و سالمندان را بیشتر درگیر می‌کند و بیماری‌های ناشی از آن از کشورهای زیادی از جمله آمریکا، انگلستان و دیگر کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه (۴، ۵) و همچنین عفونت ادراری ناشی از این پاتوژن در ایران (شهرستان الشتر) گزارش شده است (۶). اولویت تحقیقاتی پیشنهاد شده از طرف سازمان جهانی بهداشت به تمامی کشورهای جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه، پایش باکتری *اشریشیا کلی سویه O157:H7* است. در این سویه از *اشریشیا کلی*، ژن رمزدهی‌کننده آنتی‌ژن *O157* در کلاستر ۱۲ژنی قرار دارد. از مجموع این ۱۲ ژن، یک گروه ۶ژنی مسئول بیوسنتز قند-باز است و پروتئین رمزدهی شده توسط ژن *rfbE* نیز در همین گروه قرار دارد (۷). *rfbE* یک ژن اختصاصی است که منحصراً در ژنوم سروتیپ *O157:H7* وجود دارد و آنتی‌ژن سطحی O را رمزدهی می‌کند که به فرآیند شناسایی صحیح پاتوژن مذکور از طریق تکنیک PCR کمک می‌کند (۸). با توجه به دوز عفونی بسیار پایین

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری *اشریشیا کلی سویه O157:H7* (۹)، شناسایی منابع عفونی و پایش مستمر مواد غذایی به ویژه گوشت و فرآورده‌های گوشتی در کشور حائز اهمیت است. از آنجا که در بین حیوانات، گاو به عنوان مهم‌ترین مخزن این سویه از *اشریشیا کلی* است (۱۰)، بر آن شدیم تا پژوهشی در جهت پیشبرد اهداف سازمان جهانی بهداشت انجام دهیم. مطالعه حاضر اولین گزارش از وضعیت آلودگی گوشت گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شهرستان مشهد به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* است که خود می‌تواند به عنوان نوآوری این پژوهش باشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی شیوع آلودگی گوشت گاو کشتار شده در مشهد به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (ردیابی ژن *rfbE*) بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی *اشریشیا کلی* و *اشریشیا کلی سویه O157:H7* از گوشت گاو کشتار شده

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، از ناحیه عضلات سطحی گردن لاشه گاو کشتار شده در مشهد و بر اساس مطالعات مشابه (۱۱،۱۲)، ۳۰، ۴۵، ۴۲ و ۳۱ نمونه (با اندازه برش‌های ۱۰ × ۱۰ × ۰/۳ سانتی‌متر) به ترتیب در فصول بهار، تابستان، پاییز و زمستان سال ۱۳۹۷ به طور تصادفی جمع‌آوری (در مجموع ۱۴۸ نمونه) و در شرایط استریل و در کنار کیسه یخ به آزمایشگاه منتقل شد. آزمایش‌های مربوط به جداسازی و شناسایی *اشریشیا کلی* و *اشریشیا کلی سویه O157:H7*، حداکثر تا ۱۰ ساعت پس از نمونه‌گیری انجام شد. به منظور جدا کردن *اشریشیا کلی* و *اشریشیا کلی سویه* O157:H7، ۲۵ گرم از هر نمونه به صورت هموژن شده به ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتون سوی براث (TSB) (Merck, Germany) غنی شده با نوبیوسین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. برای جداسازی *اشریشیا کلی*، پس از گرماگذاری، یک لوپ از نمونه غنی شده، به روش کشت خطی روی پلیت حاوی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) کشت شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس، از کشت روی محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI) (Merck, Germany) و آزمون IMViC استفاده شد. کلنی‌هایی که در محیط TSI از نظر تخمیر قندها به صورت اسید/اسید، H_2S (تولید سولفید هیدروژن) منفی و توانایی تولید گاز را داشتند و همچنین از نظر آزمون IMViC به صورت اندول مثبت، متیل-رد مثبت، وگس پروسکوئر منفی و سیتراتاز منفی بودند، به عنوان *اشریشیا کلی* محسوب شدند. برای جداسازی *اشریشیا کلی سویه O157:H7*، یک لوپ از نمونه غنی شده، به روش کشت خطی روی پلیت حاوی محیط کشت سوربیتول مک کانگی آگار (SMA) (Merck, Germany) حاوی سفیکسیم (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و تلوریت پتاسیم (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. کلنی‌های سوربیتول منفی به عنوان *اشریشیا کلی سویه O157:H7* در نظر گرفته شدند (۱۲).

شناسایی مولکولی *اشریشیا کلی سویه O157:H7*

برای تأیید این سویه از باکتری *اشریشیا کلی* از روش کلنی PCR (Polymerase Chain Reaction) و آغازگرهای ژن *rfbE* (Sinaclone, Iran) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن *rfbE* در ایزوله‌های *اشریشیا کلی سویه O157:H7* گوشت گاو کشتار شده

توالی آغازگر پیشرو ('۳→'۵)	توالی آغازگر پیرو ('۳→'۵)	طول محصول PCR (جفت باز)
GTGCTTTTGATATTTTTCCGAGTAC	*TTTATATCACGAAAACGTGAAATTG*	۲۳۹

مخلوط واکنش کلنی PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ کلنی *اشریشیا کلی سویه O157:H7*، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پیرو (۵ Pmol/µL)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۱ میکرولیتر dNTP (۰/۲ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۰/۸ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر Taq DNA پلیمراز (۱ unit/µL) و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر آماده شد. کلنی PCR با استفاده از ترموسایکلر (Kyratec, Korea) و مطابق با چرخه‌های دمایی زیر، در ۳۰ سیکل انجام شد.

واسرشتی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۰/۷۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۰/۷۵ دقیقه، بسپارش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۰/۷۵ دقیقه و بسپارش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات واکنش کلنی PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (CinnaGen, Iran) به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت الکتروفورز (Interlab, Italy) شدند. سپس نمونه‌های رانده شده در ژل با استفاده از دستگاه فرابنفش لامیناتور مشاهده شدند. در

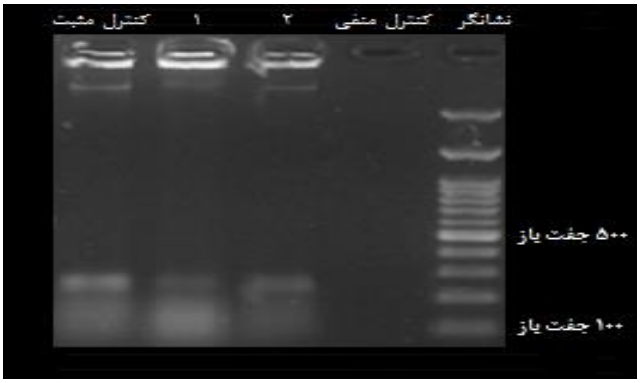
www.SID.ir

Archive of SID

نهایت از باندها با استفاده از دستگاه ژل داک (Kimiagene, Iran) عکس گرفته شد (۱۳). از *اشریشیا کلی سویه O157:H7* با شماره استاندارد 933J و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

جداسازی و شناسایی صحیح، نقش مهمی در درمان آسیب‌های ناشی از پاتوژن‌ها دارد. روش‌های بیوشیمیایی می‌توانند ما را در دستیابی به این مهم یاری کنند؛ اما این روش‌ها زمانبر هستند و وجود خطا در کشت‌های افتراقی غیر قابل انکار است. امروزه با پیشرفت روش-های مولکولی همچون PCR، قابلیت شناسایی یک پاتوژن در سطح سویه و سروتیپ و همچنین در دزهای بسیار پایین فراهم شده که این پدیده در زمینه بهبود کیفیت بهداشت عمومی بسیار امیدوارکننده است. با توجه به جایگاه ویژه‌ای که پاتوژن *اشریشیا کلی سویه O157:H7* در ایجاد عفونت‌ها دارد، ما را بر آن داشت تا در این پژوهش، به ارائه راهکاری سریع و منطقی در شناسایی این پاتوژن بپردازیم؛ دلیل انتخاب و ردیابی ژن *rfbE* اختصاصی بودن آن برای *اشریشیا کلی سویه O157:H7* بود. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی ۴۶ نمونه (۳۱/۰۸ درصد) از مجموع نمونه‌های مورد مطالعه آلوده به *اشریشیا کلی* و از این تعداد ۷ نمونه (۴/۷۳ درصد) بر اساس ویژگی عدم تخمیر سوربیتول به عنوان سروتیپ مشکوک به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* بودند. نتایج کلنی PCR ژن *rfbE* مربوط به ۷ جدایه مشکوک به *اشریشیا کلی O157:H7*، ۲ جدایه را به عنوان *اشریشیا کلی سویه O157:H7* تأیید کرد که حاکی از آلودگی ۱/۳۵ درصد گوشت گاوهای کشتار شده در مشهد به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* بود. این مقدار، از آلودگی گوشت گاوهای کشتار شده در اصفهان به این باکتری با ۶/۴ درصد، گزارش شده توسط Rahimi و همکاران در سال ۲۰۰۸ کمتر بود (۱۲). در تحقیقات جداگانه، میزان آلودگی گوشت گاوهای کشتار شده به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* در کشورهای انگلیس (سال ۲۰۰۰) و آمریکا (سال ۲۰۰۱) به ترتیب ۱۳/۴ و ۱۸ درصد بود که از میزان اندازه‌گیری شده در تحقیق حاضر بسیار بیشتر است (۴، ۵). تفاوت در میزان شیوع گوشت گاوهای کشتار شده به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* در این تحقیق با سایر تحقیقات، می‌تواند به دلیل تفاوت در روش نمونه‌برداری، اندازه قطعات و تعداد نمونه‌ها باشد. در پژوهشی که Fode-Vaughan و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۱۴) و Campbell و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۱۵) برای شناسایی مولکولی *اشریشیا کلی سویه O157:H7* انجام دادند، همانند مطالعه حاضر از ردیابی ژن *rfbE* استفاده کردند. در مطالعه حاضر، ۷ نمونه (۴/۷۳ درصد) بر اساس ویژگی عدم تخمیر سوربیتول به عنوان سروتیپ مشکوک *اشریشیا کلی سویه O157:H7* جداسازی شدند؛ این در حالی است که از این ۷ نمونه (۴/۷۳)، تنها ۲ نمونه (۱/۳۵ درصد) با روش کلنی PCR تأیید شدند. این امر نشان‌دهنده اهمیت روش‌های مولکولی در تشخیص صحیح این پاتوژن است. در شکل ۱، جدایه‌های تأیید شده در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت بازی نشان داده شده است.



شکل ۱. ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR بعد از تکثیر ژن *rfbE* جدایه-های *اشریشیا کلی سویه O157:H7* (۱ و ۲: جدایه‌ها)

در این تحقیق ارجحیت روش مولکولی به بیوشیمیایی در تشخیص *اشریشیا کلی سویه O157:H7* ثابت شد. با توجه به اینکه ۱/۳۵ درصد گوشت گاوهای کشتار شده در مشهد آلوده به *اشریشیا کلی سویه O157:H7* بود، می‌توان استنباط کرد که گوشت گاو می-تواند به عنوان یک مخزن اصلی و مهم برای *اشریشیا کلی سویه O157:H7* مطرح باشد و احتمال انتقال این پاتوژن به انسان با مصرف گوشت گاو و فرآورده‌های آن وجود دارد. بر همین اساس و به دلیل اهمیت موضوع، ضروری است که مطالعات در زمینه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، راه‌های انتقال این پاتوژن به انسان و کنترل شیوع آن در شهرستان مشهد افزایش یابد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد پرایمرهای اختصاصی ژن *rfbE* به‌خوبی قادر به افتراق کلنی‌های *اشریشیا کلی سویه O157:H7* از سایر کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت طی فرآیند PCR هستند.

سپاسگزاری

از تمامی افراد و ارگان‌هایی که در انجام این تحقیق به ما یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Hiko A, Asrat D, Zewde G. Occurrence of Escherichia coli O157:H7 in retail raw meat products in Ethiopia. J Infect Dev Countries. 2008; 2(5):389-93. [DOI:10.3855/jidc.203]
2. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour, MandSherman P M. Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun. 2008; 76(4):1340-48. [DOI:10.1128/IAI.00778-07] [PMID] [PMCID]
3. Vimont A, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Lazizzera C, Bavai C, Delignette-Muller ML. Modeling and predicting the simultaneous growth of Escherichia coli O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(1):261-8. [DOI:10.1128/AEM.72.1.261-268.2006] [PMID] [PMCID]
4. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in faeces, hides and carcasses of beef cattle during processing. PNAS. 2000; 97:2999-3003. [DOI:10.1073/pnas.97.7.2999] [PMID]
5. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JTM, Beumer RR, De Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. J Food Prot. 1999; 62(10):1115-22. [DOI:10.4315/0362-028X-62.10.1115] [PMID]
6. Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, Shakib P. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from urine samples in Lorestan, Iran. Feyz. 2013; 17(2):188-94.
7. Tarr PI, Schoening LM, Yea YL, Ward TR, Jelacic S, Whittam TS. Acquisition of the rfb-gnd Cluster in Evolution of Escherichia coli O55 and O157. J Bacteriol. 2000; 182(21):6183-91. [DOI:10.1128/JB.182.21.6183-6191.2000] [PMID] [PMCID]
8. Tarr PI, Schoening LM, Yea YL, Ward TR, Jelacic S, Whittam TS. Acquisition of the rfb-gnd cluster in evolution of Escherichia coli O55 and O157. J Bacteriol. 2000; 182(21):6183-91. [DOI:10.1128/JB.182.21.6183-6191.2000] [PMID] [PMCID]
9. Byrne CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ, et al. Characterization of Escherichia coli O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(8):4683-8. [DOI:10.1128/AEM.69.8.4683-4688.2003] [PMID] [PMCID]
10. Murphy BP, McCabe E, Murphy M, Buckley JF, Crowley D, Fanning S, et al. Longitudinal Study of Two Irish Dairy Herds: Low Numbers of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157 and O26 Super-Shedders Identified. Front Microbiol. 2016; 7:1850. [DOI:10.3389/fmicb.2016.01850] [PMID] [PMCID]
11. Shekarfroush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. Detection and frequency of Stx2 gene in Escherichia coli O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. Pak J Biol Sci. 2008; 11(8):1085-92. [DOI:10.3923/pjbs.2008.1085.1092] [PMID]
12. Rahimi E, Momtaz H, Hemmatzadeh F. The prevalence of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Campylobacter spp. on bovine carcasses in Isfahan, Iran. IJVR. 2008; 9(4):365-70.
13. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. IJCID. 2009; 4(2):97-103.
14. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of Escherichia coli O157: H7. Lett Appl Microbiol. 2003; 37(3):239-43. [DOI:10.1046/j.1472-765X.2003.01386.x] [PMID]
15. Campbell GR, Prosser J, Glover A, Killham K. Detection of Escherichia coli O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. J Appl Microbiol. 2001; 91(6):1004-10. [DOI:10.1046/j.1365-2672.2001.01465.x] [PMID]

www.SID.ir