اشریشیا کلی های تولید کننده شیگا توکسین در پنیرهای گوسفندی

فرهاد صفرپور دهکردی[۱]، ابراهیم رحیمی[۲*]، ، محمد قبادی[۳]، عماد یاحقی[۴]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد

۲-گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد

۳-دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد

۴-دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ، تهران

*نشانی برای مکاتبه: شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه بهداشت مواد غذایی، تلفن: ۰۹۱۳۳۲۷۸۳۷۷، ebrahimrahimi55@yahoo.com

دریافت مقاله: اسفند نود و دو پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *ارتباط بین حضور اشریشیا کلی در مواد غذایی و بروز عفونت و مسمومیت های غذایی در مطالعات فراوانی به اثبات رسیده است. در این بین شیر و محصولات لبنی جایگاه ویژه ای دارند. مطالعه حاضر با هدف تعیین حضور اشریشیا کلی، اشریشا کلی O157: H7 و اشریشیا کلی‌های مولد شیگاتوکسین‌ها در نمونه‌های پنیر محلی انجام پذیرفته است.*

روش کار: *در مجموع ۱۱۰ نمونه پنیر محلی از خرده فروشی های استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های پنیر از شیر خام گوسفند تهیه شده بودند. تمام نمونه ها به آزمایشگاه انتقال داده شدندو با استفاده از روش های کشت میکروبی و واکنش زنجیره ای پلیمراز برروررسی شدند.*

یافته ها: *از کل ۱۱۰ نمونه پنیر، ۲۳ نمونه از نظر حضور اشرشیا کلی مثبت بودند در حالی هیچ کدام از آن ها اشرشیا کلی O157: H7 نبودند. از این ۲۳ نمونه مثبت، ۲ نمونه ژن stx1 (۸,۶۹٪)، ۱ نمونه ژن stx2 (۴,۳۴٪)، ۳ نمونه ژن eaeA (۱۳,۰۴٪) و در نهایت ۱ نمونه ژن ehxA (۴,۳۴٪) را داشتند.*

نتیجه گیری: *استفاده از پنیر های محلی و غیر پاستوریزه می تواند برای سلامت انسان خطرناک باشد. ما روش PCR را به عنوان یک تست دقیق، ایمن و سریع به منظور کنترل کیفیت میکروبی فراورده های خام لبنی پیشنهاد می کنیم.*

واژگان کلیدی: ***اشرشیا کلی، سروتیپ O157: H7، ژن های حدت، پنیر محلی، PCR، اصفهان***

مقدمه

باکتری اشرشیا کلی جز فلور طبیعی روده تمام حیوانات خون گرم می-باشد. تعداد این باکتری در روده گوشت خواران و انسان بیش از روده علف خواران است. به عنوان مسمومیت غذایی انواع غذاها از جمله شیر و فرآورده‌های آن مطرح می‌باشد. حضور این باکتری در آب و غذا به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی پاتوژن‌های غالب پذیرفته شده است(۱).

چندین سویه از باکتری اشرشیا کلی به عنوان پاتوژن‌های بالقوه در غذا معرفی شده‌اند. یکی از سویه‌های مهم آن، سویه اشرشیا کلی O157:H7 است که به عنوان یکی از عمده‌ترین سویه‌های بیماری زای انسان معرفی شده است. سویه اشرشیا کلی O157:H7 سالانه باعث بروز چندین مورد مرگ شده و از طریق مواد غذایی مختلف خصوصاً مواد غذایی با منشاء دامی به انسان منتقل می‌شود. این باکتری توانایی تولید سمی شبیه به سم باکتری شیگلا را دارد. اشرشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین در گروه باکتری های مولد کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتک قرار می-گیرد(۱و۲). برخی مطالعات نشان می‌دهد گوسفند و بز منابع مهم اشرشیاکلی تولید کننده شیگا توکسین هستند(۳و۴). آلودگی شیر به مدفوع این حیوانات و استفاده از این منابع در تهیه فرآورده‌های لبنی می-تواند منبع بالقوه باکتری برای انسان باشد(۵و۶). مطالعات نشان می دهند که در اکثر موارد، بیماری زایی باکتری اشرشیا کلی با حضور ژن های حدت این باکتری همراه می باشد. از مهم ترین ژن های حدت باکتری اشرشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین می توان به شیگا توکسین ۱ (stx1)، شیگا توکسین ۲ (stx2)، پروتیین اینتیمین (eae) و پلاسمید کد کننده انتروهمولیزین (ehly) اشاره نمود(۷و۸).

مطالعه حاضر با هدف تعیین حضور باکتری اشرشیا کلی O157: H7 و اشرشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین در پنیرهای تولید با منشاء شیر گوسفند انجام شد.

روش کار

تعداد ۱۱۰ نمونه پنیر محلی تولید شده از شیر خام گوسفندی از خرده فروشی های استان اصفهان خریداری شد. نمونه ها با رعایت شرایط بهداشتی کامل و بلافاصله ۶ ساعت پس از نمونه گیری در کلمن های حاوی یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. ۵۰ گرم از هر نمونه را با آب مقطر استریل مخلوط کرده و عصاره‌های حاصله را با محیط VRBA در کنار شعله به روش پورپلیت کشت دادیم. پس از مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد پرگنه‌های مشکوک در محیط BGBLB حاوی لوله‌ی در هام کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۴/۵ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. نمونه‌هایی که گاز تولید کرده بودند را بر روی محیط EMB توسط آنس حلقوی کشت دادیم و به مدت ۲۴ ساعت در 37^{c} گرم‌خانه‌گذاری کردیم. نمونه‌هایی که در محیط EMB پرگنه-های با تلألو سبز درخشان تولید نموده بودند را در BHI کشت داده و تا زمان انجام آزمایش PCR در یخچال $4^{\circ c}$ نگهداری گردید.

برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده کردیم. از کشت یک شبه باکتری که در محیط BHI بود ۲۵ میکرولیتر در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه جوشانده و به عنوان منبع DNA استفاده شد.

واکنش PCR به منظور ردیابی باکتری اشرشیا کلی O157: H7 با استفاده از روش پیشین که توسط Fracnk و همکاران (۱۹۹۸) (۷) ابداع گردید، صورت پذیرفت. برای انجام کلیه واکنش های PCR از دستگاه Master cycler gradiant (Eppendorf) در قالب یک برنامه Multiplex PCR استفاده شد. لیست پرایمر های مورد استفاده در واکنش های PCR برای تشخیص ژن های حدت باکتری در جدول ۱ آمده اند. واکنش PCR برای تشخیص ژن های حدت stx1, stx2, eaeA و sta در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرول وتر × ۱۰ PCR buffer، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرو مول دیوکسی نوکلیوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و 1.25 واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام پذیرفت. برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۲۵ چرخه دمایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سپس ۵۰ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد۹۰ ثانیه و ۳ ثانیه در هر چرخه به همراه یک مرحله نهایی ۷۰ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه تنظیم گردید.

جدول ۱. لیست پرایمر های مورد استفاده جهت تشخیص ژن های حدت باکتری اشرشیا کلی در نمونه های پنیر محلی.

ژن حدت	توالی پرایمر ('5-'3)	اندازه محصول (bp)	منابع
Stx1 (F) Stx1 (R)	TTC GCT CTG CAA TAG GTA TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	555	)۱۶(
Stx2 (F) Stx2 (R)	GTG CCT GTT ACT GGG TTT TTC TTC AGG GGT CGA TAT CTC TGT CC	118	)۱۶(
Intimin (F) Intimin (R)	ATA TCC GTT TTA ATG GCT ATC T AAT CTT CTG CGT ACT GTG TTC A	425	)۱۶(
Sta (F) Sta (R)	GCT AAT GTT GGC AAT TTT TAT TTC TGT A AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A	190	)۱۶(
EhxA (F) EhxA (R)	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA	1551	(۱۷)

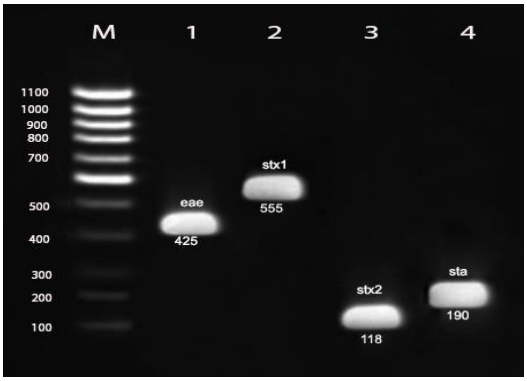
حجم کلی PCR یرای تشخیص ژن حدت ehxA ۳۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ۹۰ نانوگرم پرایمر، ۰،۲ میلی مول dNTP، ۱۰ میلی مول تریس HCl، ۱،۵ میلی مول MgCl2، ۵۰ میلی مول KCl و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بوده است. برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۳۵ چرخه دمایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس ۶۰ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد۱ دقیقه تنظیم گردید.

در آزمون PCR از ژل آگارز یک درصد استفاده گردید برای این منظور یک گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر با فرم ۱× TBE ذوب و پس از رسیدن درجه حرارت محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۵ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید به آن اضافه گردید و در سینی مخصوص الکتروفورز (Cast) قرار داده شد.

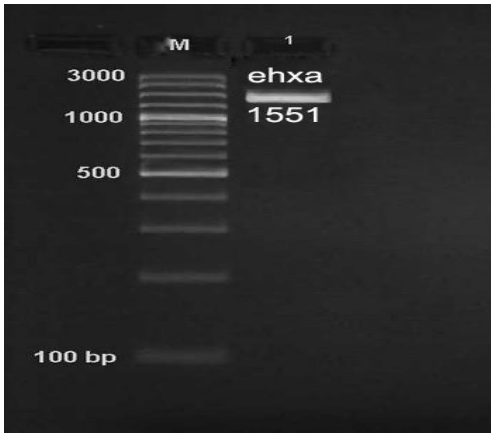
برای الکتروفورز محصولات PCR سینی حاوی ژل در تانک الکتروفورز قرار گرفت و مقداری بافر ۱ × TBE در تانک اضافه شد تا کاملا سطح ژل را فرا گیرد. سپس ۱۵ میکرولیتر محصول PCR با ۲۰ میکرولیتر محصول رنگ نشانگر (loading) مخلوط و در چاهک ژل منتقل گردید. نشان گر DNA (مارکر) هم به میزان $3\mu l$ به منظور تعیین وزن باندهای بدست آمده در چاهک مجاور استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام گرفت.

یافته ها

از مجموع۱۱۰ نمونه آزمایش شده، ۲۳ نمونه آلوده به اشریشیا کلی بوده است و به دنبال آن بر اساس آزمون PCR هیچ یک از ۲۳ نمونه اشریشیا کلی جدا شده O157 نبوده است. ۲۳ سوش اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه با روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن‌های حدت vt_2, vt_1, hly, eaeA, stx_2,stx_1 بررسی شدند. الکتروفورز محصولات PCR در اشکال ۱ و ۲ آمده است. از مجموع ۲۳ اشریشیا کلی بررسی شده، ۲ سوش حامل ژن stx_1، ۱ سوش حامل ژن stx_2 ، ۳ سوش حامل ژن eaeA، ۱ سوش حامل ژن ehxA بوده است. بنابراین فراوانی ژن های حدت eaeA, stx2, stx1 و ehxA به ترتیب ۸،۶۹٪، ۴،۳۴٪، ۱۳،۰۴٪ و ۴،۳۴٪، بود.



شکل ۱. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت ردیابی ژن های حدت باکتری اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۴-۱: نمونه های مثبت.



شکل ۲. واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت ردیابی ژن حدت ehxa باکتری اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه مثبت.

بحث

اشریشیا کلی جزء مهم ترین باکتری ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخور است. علاوه بر آن اشریشیا کلی با داشتن ژن‌های حدت نقش مهمی را در ایجاد بیماری در انسان و حیوان بازی می‌کند. این پاتوژن‌ها به طور کلی مسئول سه نوع عفونت بالینی در انسان، اسهال و بیماری‌های روده‌ای، عفونت‌های مجاری ادراری و سپتی سمی و منژیت، محسوب می‌شوند. بر پایه علائم بالینی و خصوصیات حدت‌شان به چندین گروه از جمله اشریشیا کلی بیماری‌زای روده‌ای، اشریشیا کلی مهاجم روده‌ای، اشریشیا کلی توکسین‌زایی روده‌ای، اشریشیا کلی متصل روده‌ای و اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین یا شیگاتوکسین تقسیم‌بندی می‌شوند و دراین بین گروه اشریشیا کلی تولید کننده شیگاتوکسین سروتیپهایی چون O_{157} ,O_{26} ,O_{111} وجود دارد که تحت عنوان اشریشیاکلی‌های خونریزی دهنده در بروز کولیت خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولیتیک نقش ویژه‌ای بازی می کنند. این پاتوژن‌ها عمدتاً از مواد غذایی مانند گوشت فرآورده‌های گوشتی نپخته و شیر و فرآورده‌های غیر پاستوریزه آن منتقل می‌شوند(۹ و ۱۰).

با توجه به اهمیت این گروه از پاتوژن‌ها، مطالعات فراوانی در خصوص ردیابی آنها در مواد غذایی و بررسی خصوصیات حدت آنها انجام شده است. مطالعه حاضر نیز در راستای همین اهداف طراحی و انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد ۲۳ نمونه از مجموع ۱۱۰ نمونه پنیر محلی جمع‌آوری شده از مراکز فروش اصفهان آلوده به اشریشیا کلی بوده است. بر اساس استاندارد ایران در هر گرم از مواد غذایی تا ۱۰ کلی‌فرم قابل قبول است مشروط به اینکه هیچ یک از آنها اشریشیا کلی نباشد لذا نتایج این مطالعه نشان می‌دهد تقریباً یک سوم از غذاها غیر قابل مصرف می‌باشد.

در ادامه این مطالعه اشریشیا کلی‌های جدا شده از نمونه به منظور تشخیص و تأثیر سروتیپ O157:H7 به کمک دو پرایمر جهت اختصاص به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج این بخش از مطالعه حاکی از آن بود که هیچ کدام از ۲۳ جدایه بررسی شده O157 نبوده است. این بخش از مطالعه با مطالعات Holko و هم کاران (۲۰۰۶) از اسلواکی (۱۱)، و Caro و هم کاران (۲۰۰۷) از اسپانیا (۱۲) مشابه است. مطالعه Holko و هم کاران نشان می‌دهد از ۹۵ اشریشیا کلی جدا شده از پنیرهای محلی تهیه شده از شیر غیر پاستوریزه گوسفند هیچ کدام اشریشیا کلی O157:H7 نبوده است(۱۱). هر چند مطالعه‌ای توسط Honish و هم کاران (۲۰۰۵) نشان می‌دهد اشریشیا کلی O157:H7 از نوعی پنیر تهیه شده از شیر گوسفند جدا شده است(۱۳). Oksuz و هم کاران (۲۰۰۴) از ترکیه طی مطالعه در خصوص بررسی حضور اشریشیا کلی O157 در شیر خام و پنیر، میزان وقوع این پاتوژن را به ترتیب ۱ درصد (۱ نمونه از ۱۰۰ نمونه شیر و ۴ درصد (۲ درصد از ۵۰ نمونه پـنیر) در شیـر خام و پنـیر گزارش نموده‌اند(۱۴).

اکثر گزارشات موجود در خصوص ردیابی اشریشیا کلی O157:H7 نشان می‌دهد گوشت گاو به عنوان مهم ترین فرآیند دامی در انتقال این پاتوژن به انسان نقش بازی می‌کند. این مطالعات نشان می‌دهد میزان آلودگی گوشت گاو به اشریشیا کلی O157:H7 در کشورهای مختلف بسیار متفاوت و از صفر تا ۴۲ درصد نمونه‌ها متغییر بوده است .آلودگی سایر مواد غذایی به این پاتوژن بسیار پایین‌تر گزارش شده است.

در بخش دیگری از مطالعه اشریشیا کلی‌های جدا شده از نمونه‌ها به منظور بررسی خصوصیات حدت با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاص ژن‌های حدت بررسی شدند. نتایج این بخش از مطالعه نشان داده از ۲۳ جدایه بررسی شده از ۲۳ نمونه پنیر آلوده به اشریشیا کلی ۳ و ۲ جدایه به ترتیب حامل ژن stx_2, stx_1 بوده‌اند که در ۲ جدایه هر دو ژن حدت sxt_2, stx_1 و در مابقی ژنها حامل یکی از ژن‌های فوق‌الذکر بوده‌اند. این عوامل حدت توسط سویه‌های اشریشیا توکسین‌زای روده‌ای حمل شوند لذا می‌توان گفت ۸ مورد از اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه از نوع سروتیپ اشریشیا توکسین‌زای روده‌ای بوده‌اند. این بخش از مطالعه با نتایج مطالعه Holko و هم کاران (۲۰۰۶) (۱۱) هم خوانی دارد. در این مطالعه از ۹ سویه حدت‌دار اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های پنیر تهیه شده از شیر گوسفند ۱ سویه حامل سه ژن sxt_1, stx_2 و lt_1 وجود دارد و ۱ سویه تنها حامل ژن حدت sxt_1 گزارش شده است. مطالعه‌ای از Caro و هم کاران (۲۰۰۷) نشان می‌دهد از ۸۳ مورد اشریشیا کلی بررسی شده ۳ سویه حامل ژن‌های حدت stx_1 بوده‌اند در حالی که هیچ یک از آنها ژن-های stx_2 را حمل نمی‌کرده‌اند(۱۲).

در مطالعه ما از بین ۲۳ اشریشیا کلی بررسی شده ۳ سویه حامل ژن eaeA بوده است که جزء ژن‌های است که توسط سویه‌های اشریشا کلی بیماری‌زای روده‌ای حمل می‌شوند(۱۵). لذا این نتیجه نشان می‌دهد که سویه‌های اشریشیا کلی بیماری‌زای روده‌ای بیش ترین فراوانی را نسبت به سایر سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های مطالعه حاضر داشته‌اند. در مطالعه Holko و هم کاران (۲۰۰۶) نیز مشاهده می‌شود که این ژن غالب‌ترین ژن ردیابی شده از اشریشیا کلی‌های جدا شده از نمونه‌های پنیربوده است(۱۱).

گزارشات ثبت شده از مطالعه Caro و هم کاران (۲۰۰۷) حاکی از آن است که از ۱۸۳ سویه اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های پنیر هیچ کدام حامل ژن eaeA نبوده است(۱۲).

در مطالعه ما تنها ۱ سوش از ۲۳ اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های پنیر حامل ژن hly بوده است. مطالعه‌ای از Gonzalez و هم کاران (۲۰۰۰) در برزیل، نتایج بررسی خصوصیات حدت ۳۸۵ سوش اشریشیا کلی جدا شده از ۴۴ نمونه پنیر نشان دهنده آن است که ۲۸۴ (۷۳/۶ درصد) سوش قدرت همولیز و ۱۰۱ سوش فاقد قدرت همولیز بوده است. از تعداد ۳۸۵ سوش بررسی شد هیچ کدام حامل ژن‌های حدت stx_1, stx_2, ehly نبوده‌اند(۱۶).

نتیجه گیری

این بررسی نشان داد که استفاده از پنیر های محلی و غیر پاستوریزه می تواند برای سلامت انسان خطرناک باشد. ما روش PCR را به عنوان یک تست دقیق، ایمن و سریع به منظور کنترل کیفیت میکروبی فراورده های خام لبنی پیشنهاد می کنیم.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از الطاف بی کران آقایان دکتر حسن ممتاز، دکتر امیر شاکریان و دکتر فرهاد صفرپور دهکردی که ما در جمع آوری و انجام این بررسی یاری رساندند، تشکر می کنند.

REFERENCES

1. Beutin L, Geier D, Steinruch H, Zimmermann S, Acheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like- toxin)- producing Escherichia coli in seven different species of healthy dometsic animals. J Clin Microbiol.1993; 31(9):2483- 2488.

2. Caro I, García-Armesto MR. Occurrence of shiga toxin-producing Escherichia coli in a Spanish raw ewe's milk cheese. Int J Food Microbiol.2007; 116(3):410-413.

3. Belongia EA, MacDonald KL, Parham GL, White KE, Korlath JA, Lobato MN, Strand SM, Casale KA, Osterholm MT. An Outbreak of Escherichia coli O157: H7 Colitis Associated with Consumption of Precooked Meat Patties. J Infect Dis.1991; 164(2):338-43.

4. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enter hemorrhagic Escherichia coli, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev.1991; 13(3):60-98.

5. Henning DR. Survival of Escherichia coli in cheddar and colby cheese. J Dairy Sci.2004; 87(4):122.

6. Honish L, Predy G, Hislop N, Chui L, Kowalewska-Grochowska K, Trottier L, Kreplin C, Zazulak I. An outbreak of E. coli O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. Can J Public Health.2005; 96(3):182-184.

7. Joklik WK. Zinsser Microbiology. 29th ed.Appleton and Lance Company; 1992.

8. Lahti E, Eklund M, Ruutu P, Siitonen A, Rantala L, Nuorti P, Honkanen-Buzalski T. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of Escherichia coli O157: H7 from dairy farms. Europoean Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.2002; 21(3):189-195.

9. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev.1998; 11(1):142-201.

10. Parry SM, Palmer SR. The public health significance of VTEC O157. J Appl Microbiol.2000; 88(29):1S-9S.

11. Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of shiga toxigenic Escherichia coli by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA and saa. J Clin Microbiol.2002; 40(1):598-602.

12. Restm C, Henning DR. Survival of enterohemorrhagic Echerichia coli O157: H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. J Food Protect.1996; 59(5):460-464.

13. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid- encodedhemolysin of Echerichia coli O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun.1995; 63(3):1055-1061.

14. Vernozy-Rozand C, Montet MP, Berardin M, Bavai C, Beutin L. Isolation and characterization of shiga toxin- producing Escherichia coli strains from raw milk cheeses in France. Lett Appl Microbiol.2005; 41(3):235-241.

15. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. I Int J Food Microbiol.2008; 124(3):217-223.

16. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxinproducing Escherichia coli strains from calves. J Clin Microbiol.1998; 36(6):1795-1797.

17. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun.1995; 66(3):1055–1061.