جداسازی و شناسایی *اشریشیا کولای*سروتیپ O157:H7 تولید کننده‌ی سم شیگا از گربه‌های سالم

شیما شاکری‌خمسه[۱]، فرنوش ارفعی[۱*]، کیومرث امینی[۲]

چکیده

باکتری *اشریشیا کولای* فلور طبیعی روده‌ی حیوانات خونگرم می‌باشد. این باکتری‌های بی‌خطر می‌توانند با دریافت ژن‌های حدت از طریق پلاسمید، فاژیاترانسپوزون به سویه‌های پاتوژن تبدیل شوند. باکتری پاتوژن *اشریشیا کولای* می‌توانند از حیوانات ناقل بدون علامت به حیوانات دیگر و به انسان منتقل می‌شود. *اشریشیا کولای*O157:H7 به عنوان مهمترین عامل ایجاد سندرم همولیتیک اورمیا شناسایی شده است. با توجه به ارتباط تنگاتنگ انسان و گربه، این تحقیق به منظور بررسی وجود آلودگی *باشریشیا کولای* O157:H7 در گربه‌های خانگی غیر اسهالی انجام شد.

تعداد ۱۰۱ باکتری *اشریشیا کولای* از مدفوع گربه‌های سالم ارجاعی به کلینیک‌های دامپزشکی تهران جدا سازی شد. جدایه‌های *اشریشیا کولای* با آزمایشات کشت و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. به منظور بررسی وجود سویه‌ی O157:H7 از محیط اختصاصی کروم آگار استفاده شد و ژن‌های توکسین زای سم شیگا نوع یک و دو با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات به‌دست آمده از آزمایشات همراه با اطلاعات پرسشنامه‌ها مورد تحلیل آماری قرار گرفتند.

تعداد ۳ نمونه *اشریشیا کولای* O157:H7 که حامل ژن نوع دوم سم شیگا بودند شناسایی شد. براساس آنالیز آماری در مربع کای و آزمون کراسکال والیس رابطه‌ی معناداری بین وجود سویه‌ی O157:H7 با متغییرهای جنس، نژاد، تغذیه، تماس با سایر گربه‌ها، تردد در خارج از منزل و سن در سطح معناداری $p<۰/۰۵$ وجود نداشت. این نتایج نشان دهنده‌ی نقش گربه در انتشار و انتقال باکتری *اشریشیا کولای* O157:H7 به حیوانات دیگر و انسان است. بنابراین گربه می‌تواند مخزن این باکتری پاتوژن خطرناک باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کولای، گربه، سم شیگا*

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۷

مقدمه

باکتری اشریشیاکولای از خانواده‌ی انتروباکتریاسه، به عنوان فلور میکروبی طبیعی و به صورت هم‌زیست در روده‌ی حیوانات خونگرم وجود دارد(۵). این باکتری اولین بار توسط باکتری‌شناس آلمانی تئودوراشریش (Theodore Escherich) زمانی که برروی فلور مدفوع نوزادان مطالعه می‌کرد، تشخیص داده شد(۸). سویه‌های غیر پاتوژن این باکتری می‌توانند با دریافت ژن‌های حدت از طریق پلاسمید، فاژیا ترانسپوزون به سویه‌های پاتوژن تبدیل شوند. در بین سویه‌های پاتوژن این باکتری سویه انتروهموراژیک اشریشیا کولای (*Enterohaemorrhagic Escherichia coli*) به دلیل ایجاد اسهال خونی و سندرم همولیتیک اورمیا (Hemolytic Uremic Syndrome) HUS حائز اهمیت است. سندروم HUS در موارد شدید ممکن است منجر به از دست دادن کلیه یا مرگ بیمار شود(۱). چند سویه‌ی سرمی این باکتری که از بیماران دارای سندروم HUS جدا شده‌اند شامل O91:H21،O26:H11 ،O111:H8 ،O157:NM و O157:H7 می‌باشد. *Escherichiacoli* O157:H7 از مهم‌ترین و شایع‌ترین این سویه‌ها است(۱۸).

سویه‌ی *E. coli*O157:H7 اولین بار در سال ۱۹۸۲ در شیوع اسهال خونی در آمریکا به عنوان عامل بیماری‌زای انسانی شناسایی شد. پس از آن در سال ۱۹۸۳ به عنوان عامل ایجاد سندرم HUS شناسایی شد(۲۲). هر ساله موارد متعددی از همه‌گیری با این باکتری گزارش می شود(۱۹). این باکتری از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای منتقل شونده با غذا است. گاوها اصلی‌ترین مخزن این سویه هستند. حیوانات دیگر مانند گوسفند، بز، خوک و بوقلمون هم به عنوان مخزن این باکتری مطرح هستند(۲). انتقال از طریق هوا نیز در محل‌هایی که حیوانات آلوده وجود دارند به اثبات رسیده است(۲۶). این باکتـری توانایی زیادی در زنده ماندن در خاک، آب و غذا دارد.

* ۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
farfaee@ yahoo.com
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تحقیقات نشان داده که اشریشیا تا ۲۱ ماه در مدفوع زنده می‌ماند(۱۵).

اشریشیا کولای‌های پاتوژن جدا شده از انسان و حیوانات دارای منشاء ژنتیکی مشترکی هستند(٦). با توجه به بروز همه‌گیری‌های متعدد عفونت با سروتیپ O157:H7، اشریشیا کولای تهدید کننده‌ی سلامت عمومی جامعه است. به دلیل عواقب وخیم عفونت با این باکتری مانند بستری شدن و حتی مرگ بیمار، وقوع این بیماری بسیار حائز اهمیت است.

مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی این باکتری تولید سم شیگا (Shiga toxin (STX است. این سم توسط باکتری‌های شیگلادیس آنتری و برخی از سویه‌های اشریشیا کولای تولید می‌شود(٤) و با تاثیر بر روی ریبوزومیوکاریوتی مانع از سنتز پروتئین سلولی می‌شود(۲۵ و۲٤). این سم از گروه‌های مختلف گوساله‌ها نیز جداسازی شده است(١٤ و ١٣).

خانواده‌ی شیگا توکسین یا وروتوکسین‌ها، محصولاتی هستند که با بیماری‌زایی در روده‌ها ارتباط دارند. وروتوکسین‌ها برای اولین بار در عصاره سلول‌هایی که دارای فعالیت کشنده‌ی سلولی بر روی سلول‌های ورو (سلول‌های کلیه‌ی میمون سبز افریقایی) بودند کشف و به نام وروتوکسین شناخته شد (۵). وروتوکسین از بسیاری جهات، مشابه توکسین تولید شده توسط باکتری شیگلا دیسانتری است، اما از نظر آنتی‌ژنی و ژنتیکی این دو توکسین متفاوت هستند. این سم از کمپلکس چند ساب یونیتی AB_5 تشکیل شده است. هر پنج بخش دارای یک بخش کوچک است و باعث مهار سنتز پروتئین می‌شود(۲۰).

سم شیگا در سویه‌های *اشریشیا کولای* O157:H7به دو شکل نوع یک (STX_1) و نوع دو(STX_2) وجود دارد. این سویه‌هامی‌توانند هر دو سم و یا فقط یکی از آنها را تولید کنند. شدت بیماریزایی سویه‌های تولیدکننده‌ی سم STX_2 بیشتر است. احتمال بروز سندروم HUS در افراد درگیر با سویه‌هایی که فقط سم STX_2 را تولید می‌کنند؛ بیشتر است (۱۰و۷).

مکانیسم بیماری‌زایی توسط مهار پروتئین‌سازی با فعالیت اختصاصی بر روی زیر واحد ٦۰S ریبوزوم پستانداران صورت می‌گیرد. STX فعالیت آنزیمی و پروتئولیزی دارد؛ سبب غیر فعال شدن زیر واحد ٦۰S ریبوزومی شده و فرآیند طویل‌سازی با فاکتور طویل‌سازی EF (Elongation factor) ریبوزوم‌ها را مسدود می‌کند(۲۷ و۲۵).

با توجه به اهمیت باکتری*E. coli* O157:H7 در ایجاد بیماری و شیوع مسمومیت‌های ناشی از آن از یک سو و ضرورت شناسایی مخازن این باکتری جهت اقدامات بهداشتی و پیشگیرانه از سوی دیگر، و از طرفی ارتباط نزدیک انسان با گربه‌های خانگی و احتمال انتقال باکتری بین این دو، ضرورت دارد که وضعیت وجود پاتوتیپ‌های تولید کننده‌ی توکسین *E. coli* O157:H7 در این حیوان مورد بررسی قرار گیرد تا از اطلاعات به‌دست آمده جهت پیشگیری، درمان و همچنین جلوگیری از شیوع عفونت استفاده شود (۱۷ و۱۳، ۱۱).

در این مطالعه، به سبب اهمیت وجود باکتری *اشریشیای کولای E. coli O157:H7* در حیوانات به ظاهر سالم و نظر به این که تاکنون تحقیقی در این زمینه روی گربه‌های خانگی در ایران صورت نگرفته است، نقش گربه‌ها را به عنوان مخزن این پاتوتیپ توکسین‌زای مهم *اشریشیا کولای* بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۱۰ نمونه مدفوع توسط سواپ استریل از گربه‌های غیر اسهالی ارجاعی به کلینیک‌های دامپزشکی شهر تهران اخذ و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند(جدول ۱ و ۲)

.

جدول ۱ـ مشخصات جمعیت آماری نمونه‌گیری شده

تماس با سایر گربه‌ها		نژاد		جنس		غذا		تردد در خارج از خانه	
بله	خیر	DSH	پرشین	سایر	نر	ماده	تجاری	خانگی	هردو	بله	خیر
۱۹/۸	۸۰/۲	۳٦/٦	٦۲/٤	۱	۵۳/۵	٤٦/۵	۵۲/۵	۲۲/۸	۲٤/۸	۲۲/۸	۷۷/۲

جدول ۲: فراوانی سن گربه‌های نمونه‌گیری شده

سن بر حسب ماه		
۱ الی ۵ ماه	٦الی ۱۲ ماه	۱۳ ماه وبیشتر
٪۳٦/٦	٪۲۰/۸	٪٤۲/٦

نمونه‌ها در محیط مک‌کانکی آگار تلقیح شدند(۵) و در دمای ۳۷ درجه‌ی‌سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. یک کلنی دارای مشخصه‌ی اشریشیا کولای (کلنی صورتی رنگ) به صورت تصادفی از هر پلیت انتخاب و در محیط Eosin-methylene blue (EMB) agar کشت داده شد. در صورتی که کلنی‌ها به خوبی ایزوله نبودند یک ساب کالچر تهیه شد تا از برداشت یک کلنی اطمینان حاصل شود. پس از ۲٤ ساعت محیط از نظر رشد و ایجاد جلای فلزی بررسی شد. بررسی میکروسکوپی باکتری‌ها توسط روش رنگ‌آمیزی گرم با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی شرکت فن‌آوری روز آزمون انجام شد.

آزمایش‌های تاییدی

جهت تایید باکتری جداشده از روش کشت در محیط Triple Sugar Iron Agar (TSI) و آزمایش Indole, Methyl red and Voges–Proskauer(IMViC) استفاده شد. آزمایش IMViC به وسیله‌ی کشت در محیط‌های سیمون سیترات، Sulfide indole motility (SIM) و متیل رد (MR) و Voges–Proskauer (VP) برند مرک انجام شد.

پس از گذشت ۲٤ ساعت از کشت نمونه‌ها در محیط‌های کشت، عدم رشد در محیط سیمون سیترات، ایجاد رنگ قرمز در سطح لوله SIM پس از افزودن معرف کواکس و مثبت بودن واکنش MR و منفی بودن واکنش VP تایید کننده باکتری اشریشیا کولای بود.از تعداد ۱۱۰ سواپ مدفوعی اخذ شده در نهایت ۱۰۱ نمونه اشریشیاکولای از مدفوع ۱۰۱ گربه جهت انجام مراحل بعدی تحقیق به‌دست آمد.

محیط کشت رنگ‌آفرین (Chromogenic culture media)، طبق دستور العمل کارخانه (Chromeagar) بدون انجام اتوکلاو تهیه و در پلیت‌های استریل تقسیم شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت از کشت باکتری ایجاد کلنی‌های قرمز رنگ نشان دهنده‌ی باکتری *اشریشیاکولای* O157:H7 است. در این محیط کشت، کلنی سایر سویه‌های *اشریشیا کولای* آبی است (نگاره ۱).

نگاره۱: کشت ۲٤ ساعته‌ی باکتریاشریشیا کولای در محیط کروم آگارسمت راست اشریشیاکولایO157:H7، سمت چپ غیر O157:H7

آزمایش واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR)

ایزوله‌های تایید شده در محیط Luria Bertani Agarکشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری،DNA باکتری‌ها توسط کیت استخراج شرکت Gene Transfer Pioneers طبقه دستورالعمل کارخانه استخراج شد. تمام سویه‌های جداشده همراه با کنترل مثبت و منفی مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Change Reaction) PCR قرار گرفتند. توالی پرایمرها در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. برنامه‌ی PCR شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ٤۵ ثانیه، ٥٤ درجه ٦۰ ثانیه، ۷۲ درجه ٦۰ ثانیه بود. مرحله‌ی طویل سازی نهایی یک سیکل ۷۲ درجه سانتیگرادی برای ۵ دقیقه تعیین گردید(جدول ٤).

جدول ۳ـ توالی پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی ژن STX_1 و STX_2(۱۶)

ژن هدف	توالی پرایمر	اندازه توالی
STX_1	F: AAATCGCCATTCGTTGACTACTTCT R: CAGTCGTCACTCACTGGTTTCATCA	۳۷۰
STX_2	F: TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA R: GGATCTTCTCCCCACTCTGACACC	۲۸۳

جدول٤ـ محتویات تیوب واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

محلول	حجم	محلول	حجم
Taq buffer 10×	۲µl	Each primer	۱µl
MgCl225mM	۱µl	DNA template	۵µl
dNTPs (each 2.5 mM)	۱µl	Taq DNA polymerase	۰/۳µl

تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲، آزمون‌های آماری مربع کای و کراسکالوالیس در سطح معناداری$p<$۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

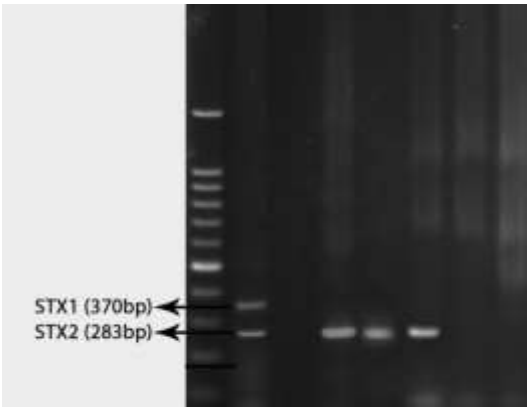
نتایج مثبت کشت در محیط کروم آگار اشریشیا کولای O157:H7 شامل سه مورد بود که نزدیک ۳٪ مجموع نمونه‌ها را شامل می‌شد. نتایج PCR نشان داد که هر سه نمونه دارای ژن توکسین زائی سم شیگا نوع دوم هستند اما ژن سم شیگا نوع اول در هیچکدام از جدایه ها وجود نداشت (نگاره۲). تحلیل آماری نشان داد که ارتباط معناداری بین وجود سروتیپO157:H7 و متغییرهای جنس، نژاد، تردد، تغذیه و تماس با سایر گربه‌ها در سطح معناداری $p<$۰/۰۵ وجود نداشت(جدول ۵ و ٦).

جدول ۵ـ تحلیل آماری رابطه شیوع باکتری اشریشیا کولایO157:H7 با متغییرهای ثبت شده در پرسشنامه(Chi-Square Tests)

متغیر	وجود پاتوژن	ارزشK2	df(درجه آزادی)	ارزشp
جنس	*E.coli O157:H7*	۱/۰۷۰	۲	۰/۵۸٦
نژاد	*E.coli O157:H7*	۱/۹۳٦	٤	۰/۷٤۸
تردد در خارج از منزل	*E.coli O157:H7*	۰/۷۹۱	۲	۰/٤٦۹
تغذیه	*E.coli O157:H7*	۱/۸٤٦	٤	۰/۷٦٤
تماس با سایر گربه‌ها	*E.coli O157:H7*	۱/۰٦۹	۲	۰/۵۸٦

جدول ٦ـ تحلیل آماری رابطه سن با شیوع باکتری اشریشیا کولایO157:H7 (Kruskal-Wallis Test)

متغیر	وجود پاتوژن	ارزشK2	df(درجه آزادی)	ارزشp
سن	*E.coli* O157:H7	۷/۳۷	۲۲	۰/۹۹۸



نگاره ۲ـ آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ردیف اول ladder DNA (شاخص وزن ملکولی)، ردیف دوم کنترل مثبت ژن‌های سم شیگا نوع اول(STX_1) و سم شیگا نوع دوم(STX_2)، ردیف سوم کنترل منفی، ردیف ٦-٤ نمونه‌های مورد آزمایش که ژن سم شیگا نوع دوم در آنها آشکار شده است.

بحث

سویه‌های پاتوژن اشریشیا کولای سبب بروز بیماری‌های مهمی در انسان و برخی از حیوانات می‌شوند. باکتری روده‌ای اشریشیا کولای باسیل گرم منفی از خانواده‌ی انتروباکتریاسه، گرم منفی، کروی شکل، معمولاً متحرک، فاقد اسپور، بی‌هوازی اختیاری و تولیدکننده گاز در اثر کربوکسیلاسیون هستند(۱۲). این باکتری به صورت طبیعی به عنوان فلور میکروبی طبیعی به صورت هم‌زیست در روده‌ی حیوانات خونگرم وجود دارد. انتقال این باکتری به سادگی از طریق آب یا غذای آلوده رخ می‌دهد. سروتیپO157:H7 از مهمترین سروتیپ‌های این گونه است.وجود سروتیپ خطرناک O157:H7 که در بسیاری از همه‌گیری‌ها جدا سازی شده است، قابل توجه است. جدایه‌یO157:H7 مهم‌ترین علت اسهال در افرادی است که از طریق آب وغذا دچار بیماری شده‌اند؛ بیماری همراه با کولیت خونریزی دهنده وسندرم اورمی همولیتیک است. این سویه برخلاف سایر سویه‌های اشریشیا کولای قادر به استفاده از سوربیتول نیست(١٦). سویه‌های O157:H7 با دوز عفونی بسیار کم۱۰۰-۱۰ میکروارگانیسم؛ می‌توانند بیماری ایجاد کنند. همه‌گیری‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم معمولاً با مصرف آب و غذای آلوده با مدفوع گاو و هم‌چنین شیر غیر پاستوریزه، آبمیوه و سبزیجات تازه شیوع پیدا می‌کند. انتقال از فرد به فرد نیز در مشاهده شده است(۹ و۲). تظاهرات بالینی آلودگی با باکتری اشریشیاکولای پاتوژن روده‌ای در گربه‌ها و بسیاری از حیوانات دیگر می‌تواند از یک بیماری فاقد علائم بالینی تا بروز اسهال خونی شدید کشنده را شامل شود(۲۳ و ۳).

انتقال سویه‌های پاتوژن از انسان به حیوان و برعکس آن به اثبات رسیده است(۳). با توجه به تحقیق حاضر نزدیک به ۳ درصد گربه‌ها حامل باکتری *اشریشیا کولای*O157:H7 هستند. در این تحقیق که در گربه‌های به ظاهر سالم غیر اسهالی صورت گرفته است اشریشیا کولای پاتوژنO157:H7 دارای ژن STX_2 بودند.

در بررسی Bentancor میزان شیوع سویه O157:H7در سگ ها را حدود ۳/٦ درصد اعلام شد(۳).

در بررسی حاضر تمام سویه های O157:H7 جداشده از گربه‌ها دارای ژن تولید سم STX_2 بود، اما در تحقیق کوچک زاده و همکاران سویه‌های جدا شده تولید کننده سم شیگا از حیوانات وحشی (سگ سانان و اسب سانان) دارای ژن سم STX_1 بودند(۱۷). که این نتایج با نتایج تحقیق ما و سایرین تفاوت داشت که به عقیده آنها این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت جغرافیایی منطقه‌ی مورد تحقیق و گونه‌ی حیوانی است.

Paton و همکاران‌نشان دادند باکترهای *اشریشیا کولای* O157:H7 که فقط ژن STX_2 را دارند توانایی ایجاد بیماری HUS را دارند(۱۲). در تحقیق ما سویه‌های اشریشیا کولای O157:H7 نیز فقط سم STX_2 تولید می‌کردند. Rumi و همکاران در برزیل پس از یک همه‌گیری پاتوتیپ تولید کننده سم شیگا را از گربه‌ها جدا کردند. این جدایه‌ها دارای ژن STX_2 بود(۲۳). در تحقیق ما نیز سویه‌های جدا شده فقط دارای ژنSTX_2 بودند.

با استناد به نتایج بدست آمده از این تحقق، گربه‌ها مخزن مهمی از باکتری‌های پاتوژن اشریشیا کولایO157:H7 هستند. با توجه به نزدیکی و مجاورت گربه‌ها و انسان، این جانوران می‌توانند بهداشت عمومی را به خطر بیاندازند. بنابراین باید اقدامات لازم جهت درمان این گونه حیوانات صورت پذیرد.

فهرست منابع

1. Banatvala, N., Griffin, P.M., Greene, K.D., Barrett, T.J., Bibb, W.F., Green, J.H., Wells, J.G. (2001): The united states national prospective hemolytic uremic syndrome study microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. J. Infect. Dis. 183(7):1063-1070
2. Belanger, L,.Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C. M. (2011): Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli. Fems. Immonul. Med. Mic. 62(1):1-10.
3. Bentancor, A., Rumi, M., Carbonari, C., Gerhardt, E., Larzabal, M.,Vilte, D., Pistone-Creydt, V., Chinen, I., Ibarra C, Cataldi A. (2012): Profile of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. Vet. Microbiol. 156(3):336-342.
4. Beutin, L. (2006): Emerging enterohaemorrhagic Escherichia coli, causes and effects of the rise of a human pathogen. J. Vet. Med. 53(7):299-305.
5. Brooks, G.F., Caren, C., Janet, S., Staphen, A., Timothi, A. (2008): Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology, 25-th edition. The McGraw-hill companies: United State; 414-435
6. Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur, E. (2011): Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic backgrounds. Infect. Genet. Evol. 11(3):654-662.
7. Dobrindt, U., Reidl, J. (2000): Pathogenicity islands and phage conversion: evolutionary aspects of bacterial pathogenesis. Int. J. Med. Microbiol. 290(6):519-527.
8. Escherich, T.(1886): Enterobacteria of infants and their relation to digestion physiology. J. Med. 3:515-520.
9. Franz, E., Klerks, M. M., De. Vos, O. J., Termorshuizen, A. J., Van Bruggen, A. H. (2007): Prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli stx1, stx2, eaeA, and rfbE genes and survival of E. coli O157: H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. Appl. Environ. Microbiol. 73(7):2180-90.
10. Friedman, D. I., Court, D. L. (2001): Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. Curr. Opin. Mic. 4(2):201-207.
11. Herrera-Luna, C., Klein, D., Lapan, G., Revilla-Fernandez, S., Haschek, B., Sommerfeld-Stur, I., Moestl, K., Baumgartner, W. (2009): Characterization of virulence factors in Escherichia coli isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. Vet. Med. 54:1-11.
12. Houser, B. A., Donaldson, S. C., Padte, R., Sawant, A. A., Deb. Roy, C., Jayarao, B. M. (2008):Assessment of phenotypic and genotypic diversity of Escherichia coli shed by healthy lactating dairy cattle. FoodbornePathog. Dis. 5(1):41-51.
13. Huasai, S., Chen, A., Wang, C. j., Li. Y., Tongrige, B. (2012): Occurrence and characteristics of virulence genes of Escherichia coli strains isolated from healthy dairy cows in Inner Mongolia, China. Braz. J. Microbiol. 43(2):528-34.
14. Hussein, H. (2007): Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing in beef cattle and their products. J. Anim. Sci. 85(13):63-72.
15. Jiang, X., Morgan, J., Doyle, MP. (2002): Fate of Escherichia coli O157:H7 in manure-amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 68(5):2605-9.

16. Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004): Pathogenic escherichia coli. Nat. Rev. Microbiol. 2(2):123-14017.
17. Koochakzadeh, A., Salehi, T., Fasaei, B., Badouei, M. (2014): Detection of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing and eae harboring Escherichia coli in some wild captive and domestic Equidae and Canidae. Arch. Razi Inst. 69(2):157-163.
18. Lim, J. Y., Yoon, J. W., Hovde, C. J. (2010): A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. J. Microb. Biot. 20(1):5-12.
19. Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H. (1999): Massive outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am. J. Epidemiol. 150(8):787-96.
20. Montenegro, M. A., Bülte, M., Trumpf, T., Aleksić, S., Reuter, G., Bulling, E., Helmuth, R. (1990): Detection and characterization of fecal verotoxin-producing Escherichia coli from healthy cattle. J. Clin. Microbiol. 28(6):1417-21.
21. Paton, A. W., Paton, J. C. (1998): Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157. J. Clin. Microbiol. 36(2):598-602.
22. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983): Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. The New N. Engl. J. Med. 308(12):681-685.
23. Rumi, M. V., Irino, K., Deza, N., Huguet, M. J., Bentancor, A. B. (2012): First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing Escherichia coli O145: N. M. from a domestic cat. J. Infect. Dev. Countr. 6(04):358-363.
24. Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A-B., Skotland, T., Torgersen, M. L. (2010): Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. Toxicon. 56(7):1181-1185.
25. Tesh, V., O'brien, A. (1991): The pathogenicmechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. Mol. Microbiol. 5(8):1817-22.
26. Varma, J. K., Greene, K. D., Reller, M. E., De. Long, S. M., Trottier, J., Nowicki, S. F., DiOrio, M., Koch, E. M., Bannerman, T. L., York, S. T., Lambert-Fair, M.A., Wells, J. G., Mead, P. S. (2003): An outbreak of Escherichia coli O157 infection following exposure to a contaminated building. Jama. 290(20):2709-2712.
27. Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., Karch, H. (2002): Identification, characterization, and distribution of a Shigatoxin 1 gene variant (stx1c) in Escherichia coli strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 40(4):1441-1446.