



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

Ehsan Yousefi¹, Bahareh Ghouchannezhad Nournia¹, Afsaneh Yousefi², 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



شناسایی *اشریشیا کلی* O157:H7 در گوشت گاوهای کشتار شده شهر مشهد با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

احسان یوسفی^۱، بهاره قوچان‌نژاد نورنیا^۱، افسانه یوسفی^۲، فائزه فکور^{۱*}

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

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

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری‌های منتقل شونده به وسیله 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 روش کار:** 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* به خوبی 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

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

موضوع:

میکروبی‌شناسی پزشکی

IJMM1398;13(2): 137-141

نویسنده مسئول:

فائزه فکور

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

پست الکترونیک:

faezefakour@gmail.com

مقدمه

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 ۱۲ ژنی قرار دارد. از مجموع این ۱۲ ژن، یک گروه ۶ ژنی 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

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 به وسیله 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

صورت هموزن شده به ۲۲۵ میلی لیتر محیط کشت تربیتون سوی برات (TSB) (Merck, Germany) غنی شده با نوویوسین (۲۰ میلی گرم در لیتر) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. برای جداسازی/شریشیا کلی، پس از گرماگذاری، یک لوپ از نمونه غنی شده، به روش کشت خطی روی پلیت حاوی محیط کشت آئوزین 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 تربیل شوگر آبرون 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، و گس پروسکوئر منفی و سیترا تاژ منفی بودند، به عنوان *شریشیا کلی* محسوب شدند. برای جداسازی *شریشیا 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 (۵/۰ میلی گرم در لیتر) و تلوریت پتاسیم (۵/۲ میلی گرم در لیتر) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. کلنی‌های سوربیتول منفی به عنوان *شریشیا کلی* سویه *O157:H7* در نظر گرفته شدند (۱۲).

شناسایی مولکولی *شریشیا کلی* سویه *O157:H7*

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

باکتری *شریشیا 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 *شریشیا 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 *شریشیا 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 *شریشیا کلی* سویه *O157:H7* با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (*rdyabi* ژن *rfbE*) بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی *شریشیا کلی* و *شریشیا 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 $10 \times 10 \times 0.3$ 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 *شریشیا کلی* و *شریشیا کلی* سویه *O157:H7*، حداکثر تا ۱۰ ساعت پس از نمونه‌گیری انجام شد. به منظور جدا کردن *شریشیا کلی* و *شریشیا کلی* سویه *O157:H7*، ۲۵ گرم از هر نمونه به

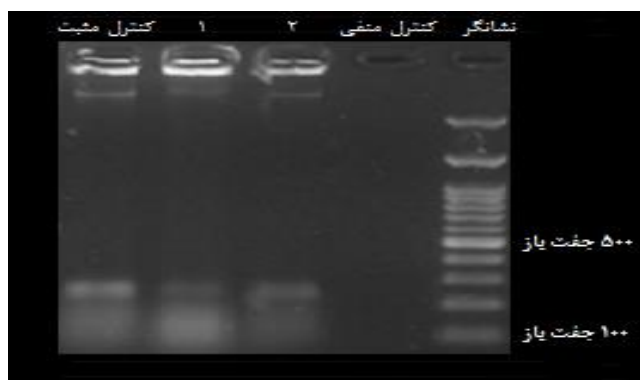
جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن *rfbE* در ایزوله‌های *شریشیا کلی* سویه *O157:H7* گوشت گاو کشتار شده

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

مخلوط واکنش کلنی PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ کلنی *شریشیا 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 پلیمرز (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، و اسرشت 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

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* جدایه‌های 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 می‌تواند 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* به خوبی 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.

نهایت از باندها با استفاده از دستگاه ژل داگ (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 روش‌های 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*، 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*

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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01465.x)] [[PMID](#)]