

بررسی منشاء ژنتیک شیگاتوکسین در اشریشیا کلی انتروهموراژیک

دکتر سعید سپهری سرشت^۱، دکتر تقی زهرایی صالحی^۲، دکتر مرتضی ستاری^۳، دکتر حسن تاجبخش^۴، دکتر محمد مهدی اصلانی^۵

۱- دکترای بیوتکنولوژی، گروه میکروبیشناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۲- استاد گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۵۶۳ sattarim@modares.ac.ir

۴- استاد گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۵- دانشیار گروه باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

زمینه و هدف: انتروهموراژیک اشریشیا کلی (EHEC) یکی از مهمترین عوامل بیماریزای خطرناک و حتی با مرگ و میر بالا هنگام اپیدمی‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده معرفی شده است. تولید سیتوتوکسین‌هایی موسوم به سموم شیگا (Shiga toxin) از ویژگیهای بارز این گروه از باکتریهاست. بررسی منشاء ژنتیک در کنترل انتشار تولید توکسین در بین سویه‌های مختلف اشریشیا کلی اهمیت دارد. همچنین برای تولید مقادیر زیاد توکسین جهت اثرات ضد سرطانی آن ناگزیر از شناسایی منشاء ژنتیک توکسین هستیم.

روش بررسی: تعداد ۴۰۰ نمونه مدفوع از گاوها و گوساله‌های سه گاوداری در استان تهران درون لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی استریل گرفته شد. استخراج Total DNA ایزوله‌های اشریشیا کلی انجام گرفت و بر روی آن PCR جهت جداسازی اولیه ایزوله‌های شیگاتوکسیژن انجام شد. جهت استخراج فازهای لیزوژن از سلول باکتری القاء فاز با استفاده از سیروفلوکساسین انجام گرفت و سپس با روش فیلتراسیون و هضم آنزیمی، فاز تخلیص شد. روی فاز تخلیص شده مجدداً PCR انجام شد تا وجود ژن شیگاتوکسین روی ژنوم فاز اثبات شود.

یافته‌ها: مشخص شد که از ۳۴ ایزوله شیگاتوکسیژنیک، ۲۴ ایزوله (۷۰/۵٪) شیگاتوکسین ۱، ۸ ایزوله (۲۳/۵٪) شیگاتوکسین ۲ و ۲ ایزوله (۶٪) هر دو نوع شیگاتوکسین را تولید می‌کردند. همچنین فراوانی حضور ژن رمزکننده شیگا توکسین روی ژنوم فاز بررسی و مشخص شد که از ۳۴ ایزوله دامی مورد مطالعه، ۲۶ ایزوله (۷۶/۵٪) واجد فاز لیزوژن رمزکننده شیگا توکسین هستند.

نتیجه‌گیری: ثابت شده که شیگاتوکسین می‌تواند توسط فاز، کروموزوم یا پلاسمید کد شود. در صورتی که فاز در سطح باکتری دارای گیرنده باشد، می‌تواند وارد پیکر باکتری شود. بنابراین در صورتی که ژن رمزکننده شیگا توکسین بر روی فاز قرار گرفته باشد، ممکن است در بین سویه‌های مختلف یک باکتری یا در بین باکتریهای مختلف پخش شود. بنابراین بررسی منشاء ژنتیک در کنترل انتشار تولید توکسین در بین سویه‌های مختلف اشریشیا کلی اهمیت دارد. از سوی دیگر شیگاتوکسین دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشد. بنابراین اگر هدف، استفاده شیگاتوکسین به عنوان یک داروی ضد سرطان باشد، مطلوب آن است که بتوان این توکسین را به مقدار زیاد تولید نمود و ناگزیر از شناسایی منشاء ژنتیک آن هستیم.

کلیدواژه‌ها: اشریشیا کلی، PCR، شیگاتوکسین، فاز

وصول مقاله: ۸۷/۴/۱۲ اصلاح نهایی: ۸۷/۵/۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۱۴

ایزوله‌های اشریشیاکلی مورد تایید قرار گرفت (۱۴) و (۱۳).

۲- استخراج Total DNA ایزوله‌های اشریشیاکلی: برای انجام PCR و اثبات وجود ژنهای تولیدکننده شیگاتوکسین که ممکن است روی فاژ، کروموزوم یا پلاسمید قرار گرفته باشند، باید Total DNA ایزوله‌های اشریشیاکلی استخراج شود. در این مطالعه از روش جوشاندن بدین منظور استفاده شد. ابتدا یک کلنی از کشت ۲۴ ساعته ایزوله‌های اشریشیاکلی بر روی محیط BHI agar به درون ۲ میلی لیتر محیط LB broth برده شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، محیط LB broth به مدت ۳ دقیقه در دور 5000RPM سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری جوش قرار گرفت. بدین ترتیب سلولهای باکتری لیز شده و Total DNA آنها آزاد شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور 5000RPM سانتریفیوژ و مایع رویی به درون لوله جدیدی منتقل گردید.

۳- انجام PCR روی Total DNA ایزوله‌های اشریشیاکلی: جهت PCR از دو جفت پرایمر اختصاصی ژنهای کدکننده شیگاتوکسینهای ۱ و ۲ (Stx1, Stx2) استفاده شد که توسط Blanco و همکاران (۱۵) معرفی شده بودند (جدول ۱). PCR به صورت مالتیپلکس و مخلوط واکنش در هر لوله شامل موارد ذیل بود: 2.5µl از بافر PCR (10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, and 0.1% Triton X-100), 0.2mM از هر یک از dNTPs, 1µM از هر پرایمر و 1.25U از آنزیم Taq polymerase. حجم نهایی واکنش 25µl بود. مرحله اول PCR واسرشت شدن اولیه DNA الگو در دمای 94°C به مدت ۴ دقیقه بود.

شود. فاژ نیز در صورتی که در سطح باکتری دارای گیرنده باشد، می‌تواند وارد پیکر باکتری شود. بنابراین در صورتی که ژن رمزکننده شیگا توکسین بر روی فاژ یا پلاسمید قرار گرفته باشد، ممکن است در بین سویه‌های مختلف یک باکتری یا در بین باکتریهای مختلف پخش شود (۱۱).

از سوی دیگر چندین سال پس از کشف سویه‌های VTEC ثابت شد که توکسین نیمه خالص سویه اشریشیاکلی HSC10 اثر آنتی نوپلاستیک دارد (۱۲). بنابر این اگر هدف استفاده از VT به عنوان یک داروی ضد سرطان باشد، مطلوب آن است که بتوان این توکسین را به مقدار زیاد تولید نمود و بدین منظور ناگزیر از شناسایی کامل ژنهای احتمالی کدکننده آن و تفاوت این ژنها در میزان بیان توکسین هستیم. در نتیجه شناسایی ژنهای تولیدکننده توکسین مزبور بر روی پلاسمید یا فاژ و مقایسه تفاوت‌های آنها با ژنهای مستقر بر روی کروموزوم از نظر بیان و توالی می‌تواند واجد اهمیت زیادی باشد. در تحقیق حاضر، فراوانی ژن رمزکننده شیگا توکسین بر روی فاژی که به صورت لیزوژن با سویه‌های تولیدکننده سم در آمده بود مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

۱- جداسازی ایزوله‌های اشریشیاکلی از مدفوع گاوها و گوساله‌ها: تعداد ۴۰۰ نمونه مدفوع از گاوها و گوساله‌های سه گاوداری در استان تهران درون لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی استریل گرفته شد. پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه مدفوع روی محیط کشت EMB agar برده شد. کلنی‌های تشکیل شده بر روی این محیط توسط تستهای بیوشیمیایی بررسی و

رشته‌های ناقص به کار گرفته شد. به عنوان کنترل منفی از لوله‌ای استفاده شد که حاوی تمام اجزاء ضروری PCR بجز DNA الگو بود. به عنوان کنترل مثبت از سه سویه E.coli استفاده شد که سویه شماره ۱ فقط Stx1، سویه شماره ۲ فقط Stx2 و سویه شماره ۳ هر دو توکسین را تولید می‌کرد (۱۵).

مراحل بعدی PCR در ۳۰ سیکل و به ترتیب زیر انجام گرفت: دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت شدن رشته‌های DNA الگو، دمای 55°C به مدت یک دقیقه جهت اتصال پرایمرها به رشته‌های الگو، دمای 72°C به مدت یک دقیقه جهت پلی‌مریزاسیون رشته جدید از روی رشته الگو. در سیکل نهایی نیز دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه جهت تکمیل پلی‌مریزاسیون

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شونده

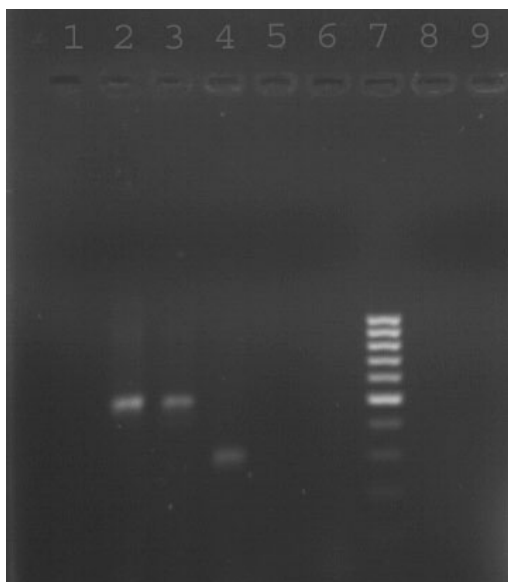
Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Fragment size (pb)	Annealing temperature	Reference
stx1	VT1-F	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	302	55	Blanco et al. (2003)
	VT1-R	CGTGGTATAGCTACTGTCACC			
stx2	VT2-F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	516	55	Blanco et al. (2003)
	VT2-R	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC			

خارج شود، باید القاء فاز (Phage induction) انجام گیرد. بدین منظور یک کلنی خالص از باکتری شیگاتوکسیژن به ۵ میلی‌لیتر محیط LB broth افزوده شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. به محیط مزبور، سیروفلوکساسین به میزان 0.15µg/ml افزوده شد و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. سپس سانتریفیوژ با دور 5000RPM به مدت ۵ دقیقه و فیلتراسیون مایع رویی با فیلتر 0.45µm انجام گرفت. از باکتری E.coli DH5α به عنوان باکتری روشنگر جهت تشکیل پلاک فاژی استفاده شد. بدین صورت که باکتری مزبور به صورت یکنواخت روی محیط LB agar کشت داده شد. ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل از مرحله قبل به ۴ میلی‌لیتر آگار مایع 0.7% با دمای حدود ۵۰-۴۵ درجه سانتیگراد اضافه و

۴- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز: برای این کار از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد در بافر TAE استفاده شد. ولتاژ مورد نیاز نیز به میزان ۵ ولت به ازاء هر سانتیمتر فاصله بین دو الکترود تانک الکتروفورز در نظر گرفته شد. جهت تعیین وزن مولکولی باندهای احتمالی، از 100-1000bp ladder (سیناژن- ایران) استفاده گردید. پس از الکتروفورز رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید 0.5µg/ml به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. برای مشاهده باندها و عکسبرداری از ژل از دستگاه ژل داک (Biometra, Germany) و امواج UV با طول موج 254nm استفاده شد.

۵- القاء فاز جهت استخراج فازهای لیزوژن از سلول باکتری: هنگامی که فاز به صورت لیزوژن در می‌آید، ژنوم آن درون ژنوم باکتری میزبان ادغام می‌شود. برای اینکه ژنوم فاز مجدداً از ژنوم باکتری

از ژن stx1 را که حاوی ۳۰۲ جفت باز است شناسایی می‌کند، اما پرایمر stx2 قطعه‌ای از ژن stx2 را که حاوی ۵۱۶ جفت باز است شناسایی می‌کند. پس از PCR نمونه‌های حاصل از تمامی ۴۰۰ ایزوله، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۰/۸٪ الکتروفورز گردید (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز. ردیف شماره ۱ کنترل منفی را نشان می‌دهد که در آن هیچگونه باندهایی تشکیل نشده است. ردیف‌های ۵، ۶، ۸ و ۹ نشان‌دهنده ایزوله‌هایی هستند که هیچکدام از انواع stx را حمل نمی‌کنند. ردیف‌های ۲ و ۳ ایزوله‌هایی را نشان می‌دهند که ژن stx2 را حمل می‌کنند. ردیف ۴ ایزوله‌ای را نشان می‌دهد که ژن stx1 را حمل می‌کند. مارکر مورد استفاده از نوع 100-1000bp (سیناژن - ایران) می‌باشد.

مشخص شد که از ۳۴ ایزوله شیگاتوکسیژنیک، ۲۴ ایزوله (۷۰/۵٪) شیگاتوکسین ۱، ۸ ایزوله (۲۳/۵٪) شیگاتوکسین ۲ و ۲ ایزوله (۶٪) هر دو نوع شیگاتوکسین را تولید می‌کردند. تمامی ایزوله‌های شیگاتوکسیژن از نظر وجود فاژ لیزوژن مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که در تمامی ایزوله‌های مزبور، فاژ لیزوژن وجود دارد و پس از القاء فاژ، روی پلید پلاکهای فاژی قابل رویت بودند (شکل ۲).

پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر 100mM CaCl₂، به صورت یکنواخت روی پلید حاوی E.coli DH5α پخش گردید. پس از بستن آگار رویی، پلیدها به مدت ۶-۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت تشکیل پلاک در روی پلید بررسی شد.

۶- تخلیص فاژ: با استفاده از اسکالپل استریل پلاکهای فاژی از روی پلید حاوی پلاکها بریده شدند و در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفته به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت زیاد ورتکس شدند تا فاژها از درون آگار به درون سرم فیزیولوژی منتقل شوند. جهت تخلیص فاژ و حذف باکتریهای احتمالی، سرم فیزیولوژی حاوی فاژ ابتدا با سرعت 5000RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس با استفاده از فیلتر 0.45μم فیلتر گردید. جهت حذف ژنوم احتمالی باکتری در سرم فیزیولوژی، مقدار 2U/ml به آن DNase اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. جهت حذف نهایی DNase و پوشش فاژ، محلول فوق به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

۷- انجام PCR روی ژنوم تخلیص شده فاژ: جهت بررسی وجود ژنهای شیگاتوکسین روی ژنوم فاژها، PCR با استفاده از همان پرایمرهای قبلی انجام گرفت و سپس محصول PCR الکتروفورز گردید.

یافته‌ها

از ۴۰۰ راس گاو و گوساله که مدفوع آنها مورد بررسی قرار گرفت تعداد ۵۰ راس آنها گاو (۱۲/۵٪) و ۳۵۰ راس گوساله (۸۷/۵٪) بودند. جهت PCR از دو پرایمر stx1 و stx2 استفاده گردید. پرایمر stx1 قطعه‌ای

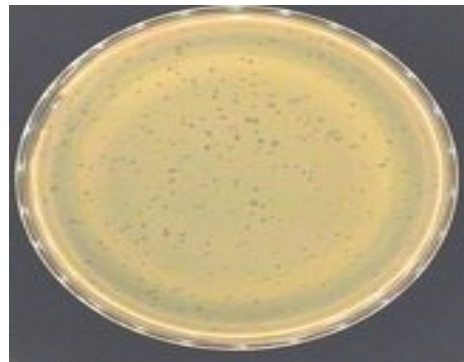
بحث

در ایران همانند بسیاری از کشورهای دیگر سویه‌های شیگاتوکسیژنیک از گاو، گوسفند (۱۷) و مواد غذایی (۱۸) جدا شده‌اند. STEC به عنوان باکتری‌هایی معرفی شده‌اند که می‌توانند در گوساله‌ها اسهال خونی ایجاد کنند. اما در گوساله‌هایی که مبتلا به اسهال نبوده‌اند نیز STEC جدا شده است (۱۹). این اطلاعات نشان می‌دهد که دامها می‌توانند به عنوان مخزنی برای این پاتوژن عمل کنند.

در این مطالعه در بین ۴۰۰ نمونه مدفوع، ۳۴ ایزوله (۸/۵٪) شیگاتوکسیژنیک جدا شد. وایلر و همکاران پس از غربالگری ۱۲۲۴ سواب رکتومی از ۲۲۱ گوساله ۱ تا ۱۲ هفته‌ای در آلمان نشان دادند که ۴/۵٪ از موارد stx مثبت بودند (۲۰). علم و زورک ۸۹۱ نمونه مدفوع از گوساله‌ها را در کانزاس بررسی کردند و نشان دادند که ۹/۲٪ از آنها واجد ایزوله‌های E.coli O157:H7 بودند که همه آنها stx2 مثبت و ۱۴ ایزوله از ۸۲ ایزوله stx1 مثبت بودند (۲۱).

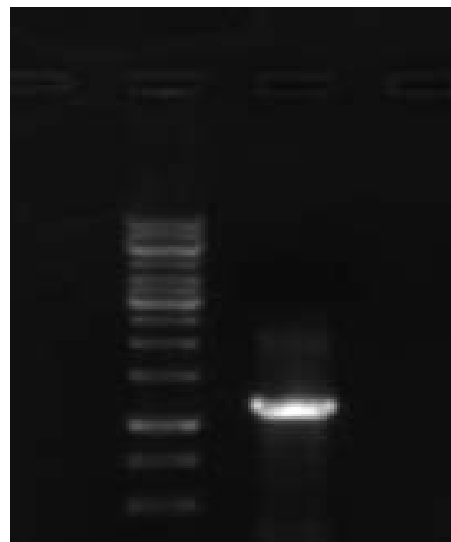
در مطالعه حاضر، شیگاتوکسین ۱ در مقایسه با شیگاتوکسین ۲ توکسین غالب بود و اکثر ایزوله‌ها Stx1 تولید می‌کردند (۲۴ ایزوله)، در حالی که ۸ ایزوله Stx2 و ۲ ایزوله هر دو نوع توکسین را تولید می‌کردند. این نتایج مشابه نتایج مطالعات دیگر است که بیان کرده‌اند که Stx1 در نمونه‌های جدا شده از گوساله‌ها توکسین غالب بوده است (۲۲).

ثابت شده که شیگاتوکسین دارای اثرات آپوپتوز بر روی برخی سلولهای سرطانی است و در مورد برخی سرطانها، استفاده بالینی از این توکسین در مرحله آزمایش است (۲۳، ۲۴). اگر هدف به کار بردن شیگاتوکسین جهت استفاده‌های درمانی آن باشد،



شکل ۲: پلاکهای فاژی تشکیل شده روی باکتری E.coli DH5a ناشی از الفاء فاژ در ایزوله اشریشیا کلی شیگاتوکسیژن. در محل تکثیر فاژ به دلیل لیز باکتری E.coli DH5a هاله روشن دیده می‌شود.

پس از تشکیل پلاکهای فاژی، باکتریوفاژهای تشکیل شده در محل پلاک استخراج و تخلیص شدند و پس از تخلیص، روی ژنوم آنها PCR با همان پرایمرهای قبلی انجام گرفت و محصول PCR روی ژل آگاروز ۰/۸٪ الکتروفورز گردید. مشخص شد که از ۳۴ ایزوله شیگاتوکسیژن، در ۲۶ ایزوله (۷۶/۵٪) ژن رمزکننده شیگاتوکسین بر روی ژنوم فاژ لیزوژن قرار گرفته است (شکل ۳).



شکل ۳: محصول PCR بر روی ژنوم تخلیص شده یک فاژ لیزوژن. با توجه به وزن مولکولی، ژن stx1 روی ژنوم این فاژ قرار گرفته است. مارکر مورد استفاده از نوع 100-1000bp ladder (سیناژن، ایران) می‌باشد.

مطلوب است سویه‌ای انتخاب شود که بیشترین میزان تولید را داشته باشد و از آنجا که ممکن است بین میزان بیان ژنهای فاژی، کروموزومی یا پلاسمیدی تفاوت وجود داشته باشد، لازم به نظر می‌رسد که منشاء ژنتیک شیگاتوکسین در انواع ایزوله‌های بالینی نیز تعیین گردد. از سوی دیگر، در صورتی که ژن رمزکننده شیگاتوکسین روی فاژ یا پلاسمید قرار گرفته باشد، امکان انتقال آن بین سویه‌ها بیشتر است. لذا اطلاع از منشاء ژنتیک ایزوله‌های بالینی ضروری است تا اطلاعات پایه‌ای جهت مقابله با انتشار تولید توکسین در بین سویه‌ها فراهم شود.

شیگاتوکسین ممکن است منشاء ژنتیک گوناگونی داشته باشد و ژن رمزکننده آن روی کروموزوم، پلاسمید یا فاژ قرار گرفته باشد. در سال ۱۹۸۹ اوبراین و همکاران نشان دادند که شیگاتوکسین در گونه E.coli 933 توسط فاژ تولید می‌شود (۲۵). در سال ۱۹۹۲ پاتون و همکاران ثابت کردند که ژن تولید شیگاتوکسین در اشریشیاکلی

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه گروه‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و باکتری شناسی دانشکده علوم پایه پزشکی تربیت مدرس در انجام این تحقیق تشکر میشود.

References

1. Nataro JP, Kaper JE. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11:142- 146.
2. Kong RYC, So CL, Law WF, A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*, Marine Pollution Bulletin 1999; 38: 1207-1215
3. Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin producing *E.coli*. J Appl Microbiol 2000; 88: 729-745
4. Konowalchuk J, Speirs JI, Starvic S, Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infection and Immunity 1977; 18: 775-779
5. O'Brien SJ, Murdoch PS, Riley AH, A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H- phage type 8 in hospital. Journal of Hospital Infection 2001; 49: 167-172.
6. C Corte's R, De la Fuente, J Blanco, M. Blanco, JE Blanco, G Dhabiand et al. Orden, serotypes, virulence genes and intimin types of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E coli* isolated from healthy dairy goats in Spain, Veterinary Microbiology 2005; 110: 67-76.
7. Buchanan RL, Doyle MP. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E coli*. Food Technol 1997; 51: 69-76.
8. Boyce TG, Pemberton AG, Wells JG, Griffin PM. Screening for *Escherichia coli* O157:H7- a nationwide survey of clinical laboratories. J Clin Microbiol 1995; 33: 3275-7.

9. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157, other enterohemorrhagic *E. coli*, associated with hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.
10. Bettelheim KA. Role of non-O157 VTEC. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 38-50
11. Leski TA, Gniadkowski M, Skoczynska A. Outbreak of mupirocin-resistant staphylococci in a hospital in Warsaw, Poland, due to plasmid transmission and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2781-2788
12. Bhattacharjee RN, Park KS, Uematsu S. *Escherichia coli* verotoxin 1 mediates apoptosis in human HCT116 colon cancer cells by inducing overexpression of the GADD family of genes and S phase arrest. *Fevs Letters* 2005; 579: 6604-6610.
13. Beutin L, Horbach I, Zimmermann S, Gleier K. Comparative evaluation of different diagnostic methods for the detection of verotoxin (Shiga-toxin) producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) in human clinical stool specimens. *J Lab Med* 21 1997; 21: 537-546.
14. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2751-2757.
15. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, and et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1351-1356.
16. Zahraei Salehi T, Safarchi A and Rabbani Khorasgani M. Identification of virulence genes in isolated *Escherichia coli* from diarrheic calves and lambs by multiplex polymerase chain reaction. *Pakistan J of Biological Sci* 2006; 9: 191-196.
17. Blanco J, González EA, Garcia S, Blanco M, Regueiro B, and Bernárdez I. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Vet Microbiol* 1988; 18: 297-311.
18. Blanco JE, Blanco M, Gutiérrez A, Prado C, Rio M, Fernández L, and et al. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef using immunomagnetic separation. *Microbiol* 1996; 12: 385-394.
19. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Mora A, Prado C, Alonso MP, and et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet Microbiol* 1997; 54: 309-319.
20. Wieler LH, Sobjinski G, Schlapp T, Failing K, Weiss R, Menge C, and et al. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 296-306.
21. Alam MJ, Zurek L. Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle Feces *J Food Prot* 2006; 69: 3018-20.
22. Staats JJ, Chengappa MM, DeBey MC, Fickbohm B, Oberst RD. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Veterinary Microbiology* 2003; 94: 303-312.
23. Bhattacharjee RN, Park KS, Uematsu S, Okada K, Hoshino K, Takeda K, and et al. *Escherichia coli* verotoxin 1 mediates apoptosis in human HCT116 colon cancer cells by inducing overexpression of the GADD family of genes and S phase arrest. *FEBS Letters* 2005; 579: 6604-6610.
24. Garipey J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2001; 39: 99-106
25. O'Brien AD, Marques LRM, Kerry CF, Newland JW and Holmes RK. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. *Microbial Pathogenesis*, 1989; 6: 381-390.
26. Paton AW, Paton JC, Heuzenroeder MW, Goldwater PN and Manning PA. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microbial Pathogenesis* 1992; 13: 225-236.
27. Paton AW, Paton JC, Heuzenroeder MW, Goldwater PN and Manning PA. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111:H. *Gene* 1993; 129: 87-92.