

بررسی گونه های مختلف انتروباکتریاسه در مواد غذایی آلوده ارسالی به آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر نورامیر مظفری^{*}، هما فروهش تهرانی^{**} دکتر علیرضا سالک مقدم^{***} دکتر حسن انصاری^{****}
علی مجتهدی^{*****}

خلاصه:

از ۲۰۰۰ مورد مواد غذایی ارسالی به آزمایشگاه میکروبی شناسی در مدت یک سال از خرداد ۱۳۷۷ لغایت خرداد ۱۳۷۸، ۵۲۱ مورد باکتریهای متعلق به خانواده انتروباکتریاسه جدا گردیدند که برای تعیین گونه باکتریهای جدا شده علاوه بر روشهای متداول از آزمایشات تشخیصی تکمیلی شامل دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه و تخمیر قندها استفاده گردید. در میان انتروباکتریاسه های جدا شده اشریشیاکلی به تنهایی ۳۰۰ مورد را به خود اختصاص می داد و از ۲۲۱ مورد باکتریهای باقیمانده ۱۱۰ مورد مربوط به جنس انتروباکتر یعنی گونه انتروباکترکلوآکه ۴۰ مورد، انتروباکتر تایلوره ۳۰ مورد، انتروباکتر آنروجنز ۲۱ مورد و انتروباکتر ساکازاکی ۱۹ مورد می باشد. از جنس کلبسیلا ۴۴ مورد جدا گردید که ۲۴ مورد آن کلبسیلاکسی توکا، ۱۵ مورد کلبسیلا پنومونیه و ۵ مورد نیز کلبسیلاتری جنا (terrigena) بود. از ۴۱ مورد سراتیا، ۳۲ مورد سراتیامارسنس و ۹ مورد سراتیا فونتی کولا جدا گردید. همچنین ۱۱ مورد جنس بوتیوکسلا، ۶ مورد جنس پانتوآ و ۳ مورد نیز سیتروباکترفروندی از مواد غذایی جدا گردید. بیشترین مواد غذایی که با انتروباکتریاسه ها آلوده بودند به ترتیب فرآورده های لبنی، شیرینی جات و بستنی را شامل گردید. با توجه به اینکه این گونه مواد غذایی آماده به مصرف می باشند و همچنین به غیر از اشریشیاکلی، در انتروباکتر، کلبسیلا و اخیراً هافنیا نیز انترونوکسین و سیتونوکسین شناسایی گردیده است، جداسازی و تشخیص این باکتری ها در مواد غذایی حائز اهمیت می باشد.

واژه های کلیدی: گونه های مختلف انتروباکتریاسه، مواد غذایی آلوده

مقدمه:

و به دلیل جایگاه طبیعی آنها در انسان تحت عنوان باسیلهای روده ای نامیده می شوند. در این خانواده بعضی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های روده ای از قبیل تب تیفوئیدی و دیسانتری باسیلی نیز قرار دارند (۱). گروهی از انتروباکتریاسه ها که تحت

باکتری های خانواده انتروباکتریاسه شامل تعداد زیادی جنس و گونه می باشند که از نظر خصوصیات بیوشیمیایی بسیار به یکدیگر شباهت دارند. این باکتریها در خاک، آب، مواد تجزیه شده و روده بزرگ انسان، حیوانات و حشرات وجود دارند

* مدیر گروه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

** عضو هیئت علمی گروه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** استاد و مدیر گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

**** معاونت درمان و دارو دانشگاه علوم پزشکی ایران

***** کارشناس ارشد میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

مواد و روشها:

تعداد ۲۰۰۰ نمونه مواد غذایی در مدت ۱۲ ماه از اول خرداد سال ۱۳۷۷ لغایت خرداد سال ۱۳۷۸ به طور مستمر از نظر آلودگی به باکتریهای گروه انتروباکتریاسه مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها از طرف اداره نظارت بر مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ایران از مناطق تحت پوشش شامل غرب تهران، کرج، ساوجبلاغ، شهریار و رباط کریم با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد و در آزمایشگاه میکروبی شناسی مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی نمونه‌ها در دفاتر مخصوص ثبت گردیده و از نظر آلودگی به باکتری‌های مزوفیل، کلی فرم و اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های ارسالی پس از توزین به میزان ۱۰ گرم در شیشه‌های استریل و رعایت شرایط استریل با ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر مخلوط گردیده و پس از ۱۰ دقیقه جهت شمارش باکتری‌های کلی فرم و مزوفیل ها روش pour plate با استفاده از محیط‌های نوترینت آگار و مک کانکی آگار انجام گردید. با قرار دادن پلیت ها در انکوباتور ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت جهت کلی فرم‌ها و ۴۸ ساعت جهت مزوفیل ها، شمارش انجام گردید. سپس کشت‌های مثبت جهت تعیین نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفته و پس از انجام آزمایش‌های افتراقی تشخیصی انتروباکتریاسه ها جهت شناسائی جنس و گونه باکتریهای جدا شده، تمامی آنها از نظر دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه لیزین و اورنیتین با استفاده از محیط پایه مولر دکربوکسیلاز و تخمیر قندهای لاکتوز، سوکروز، سوربیتول و آرابینوز در محیط پایه فنل رد و همچنین استفاده از مالونات و آزمایش DNase در ۲۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص جنس و گونه‌های انتروباکتر از اسیدهای آمینه لیزین و

عنوان باسیلهای کلی فرم (coliform) نامیده می‌شوند، به عنوان اندیکاتور در تعیین آلودگی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲). هر چند که این طبقه بندی صحیح نمی‌باشد ولی نشان دهنده گروهی از انتروباکتریاسه‌ها است که قادر به رشد در تحت شرایط خاصی می‌باشند. روشهای شمارش کلی فرمها علاوه بر شمارش اشریشیاکلی به عنوان اندیکاتور آلودگی مواد غذایی روشی قابل قبول بوده و کاربرد زیادی در تعیین آلودگی مواد غذایی دارد (۳). خصوصیتی که باعث می‌شود باکتریهای گروه کلی فرم در فساد مواد غذایی اهمیت داشته باشند در ارتباط با توانایی آنها در استفاده از انواع متفاوتی از مواد غذایی به عنوان منبع انرژی، ساخت ویتامینهای مورد لزوم، رشد در طیف وسیعی از درجه حرارت (پائین تر از ۱۰ درجه سانتی گراد تا بالاتر از ۴۶ درجه سانتی گراد)، تولید میزان زیادی گاز از کربوهیدراتها و ایجاد بوی بد در مواد غذایی می‌باشد (۴). از آنجا که در آزمایشات رایج میکروبی شناسی مواد غذایی جداسازی کلی فرمها از مواد غذایی به عنوان شاخص آلودگی محسوب می‌گردد و از طرفی با افزایش تعداد باکتریهای متعلق به خانواده انتروباکتریاسه به ۳۱ جنس و ۱۳۹ گونه و پراکندگی وسیع آنها در طبیعت و تشخیص فاکتورهای بیماریزائی مانند انتروتوکسین در کلبسیلا و سیتوتوکسین مشابه شیگلاشیگا (shiga like toxin) در انتروباکتر، و هافینا در این گونه از باکتری‌ها که فلور نرمال روده محسوب می‌گردند، این پژوهش در این راستا انجام گرفته است تا این گروه از باکتریها به تفکیک، شناسائی شده و تعلق آنها به جنس و گونه خاصی مشخص گشته و شیوع آنها در مواد غذایی مورد مصرف در کشورمان، تعیین گردد.

نتایج:

در این پژوهش از ۲۰۰۰ نمونه مواد غذایی مورد مطالعه تعداد ۱۲۰۰ مورد از خط تولید کارخانه و ۸۰۰ مورد نیز از مغازه‌ها جمع‌آوری گردید. از ۲۰۰۰ ماده غذایی مورد آزمایش ۵۲۱ نمونه (۲۶٪) آلودگی با باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه داشت. باکتری‌های جدا شده متعلق به جنس‌های اشریشیاکلی (۵/۵٪)، انتروباکتر (۲۱٪)، کلبسیلا (۹٪)، سرایتیا (۸٪)، بوتیوکسلا (۲٪)، پانتوآ (۱٪)، سیتروباکتر (۵/۵٪) بودند. از نظر شیوع فصلی بیشترین موارد آلودگی با باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به ترتیب مربوط به فصل تابستان ۲۱۳ مورد (۴۱ درصد)، بهار ۱۹۰ مورد (۳۶/۵ درصد)، پائیز ۶۵ مورد (۱۲/۵ درصد) و زمستان ۵۳ مورد (۱۰ درصد) بوده است. تمامی باکتری‌هایی که جهت تشخیص نهائی با آزمایشات تکمیلی تعلق آنها به جنس و گونه‌های مختلف موجود در خانواده انتروباکتریاسه مشخص گردید، در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توزیع فراوانی گونه‌های انتروباکتریاسه

جدا شده از مواد غذایی

درصد	فراوانی	گونه‌های باکتریایی
۵۷/۵٪	۳۰۰	اشریشیاکلی
۷/۷٪	۴۰	انتروباکتر کلواکه
۵/۸٪	۳۰	انتروباکتر تایلوره
۴٪	۲۱	انتروباکتر آنروجنز
۳/۴۵٪	۱۸	انتروباکتر ساکازاکی
۰/۲٪	۱	انتروباکتر آمی جنوس
۴/۶۱٪	۲۴	کلبسیلا اکسی توکا
۲/۹٪	۱۵	کلبسیلا پنومونیه
۰/۹۵٪	۵	کلبسیلا تری جتا
۶/۱٪	۳۲	سراتیامارسنس
۱/۷٪	۹	سراتیافونتی کولا
۲/۱۱٪	۱۱	بوتیوکسلا
۱/۱۵٪	۶	هافنیا آلوه ای
۱/۱۵٪	۶	پانتوآ
۰/۵۸٪	۳	سیتروباکتر فروندی
	۵۲۱	جمع

اورنیتین در محیط پایه مولر دکربوکسیلاز با اضافه نمودن یک درصد از اسید آمینه‌های فوق الذکر استفاده گردید. از آنجا که انتروباکتر ساکازاکی تولید پیگمان زرد می‌نماید این گونه از سایر گونه‌های انتروباکتر افتراق داده شد. انتروباکتر آنروجنزو انتروباکتر کلواکه قادر به تخمیر سوریتول می‌باشند که از سایر گونه‌های جنس انتروباکتر تشخیص داده می‌شوند. برای انجام این تست از قند سوریتول در محیط پایه فنل رد استفاده گردید. عدم دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لیزین باعث افتراق انتروباکتر کلواکه از انتروباکتر آنروجنز می‌گردد. انتروباکتر تایلوره که اکنون تحت عنوان E.cancerogenes نامیده می‌شود، لیزین دکربوکسیلاز منفی بوده و با عدم تخمیر قندهای لاکتوز و سوکروز و سوریتول از سایر گونه‌ها افتراق داده می‌شود. انتروباکتر آمی جنوس با عدم دکربوکسیلاسیون لیزین ولی با تخمیر لاکتوز و سوکروز تشخیص داده می‌شود. کلبسیلا اکسی توکا، یک گونه اندول مثبت در جنس کلبسیلا است که از کلبسیلا پنومونیه اندول منفی مشخص می‌گردد. کلبسیلاتری جتا با تست اوره آز منفی، متیل رد و VP مثبت و عدم رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد از سایر گونه‌ها افتراق داده شد. سرایتیا فونتی کولا ابتدا با دکربوکسیلاسیون لیزین و اورنیتین در جنس سرایتیا قرار گرفت و از سایر گونه‌های این جنس با تست DNase و ژلاتیناز منفی تشخیص داده شد. جنس بوتیوکسلا با فرمول (+ - - +) Imvic و (- - +) LAO و عدم تخمیر سوکروز مشخص گردید. جنس هافنیا مانند بعضی از گونه‌های انتروباکتر لیزین و اورنیتین مثبت می‌باشد ولی قادر به تخمیر لاکتوز و سوکروز نمی‌باشد. جنس پانتوآ نیز با عدم دکربوکسیلاسیون لیزین و اورنیتین و آرژنین از سایر اعضای تیره کلبسیله مشخص گردید.

مواد غذایی که جنس انتروباکتر از آن جدا شده است شامل لبنیات (۰/۲۰/۱)، انواع شیرینی (۰/۱۱/۲)، بستنی (۰/۴/۲)، محصولات گوشتی (۰/۴/۲)، سبزیجات (۰/۱)، آب میوه و ادویه (۰/۰/۲) می باشد. در مورد کلیسیلا فرآورده های لبنی (۰/۰/۳)، انواع شیرینی (۰/۱/۴)، بستنی (۰/۰/۷)، سبزیجات تازه (۰/۰/۲) را شامل می گردد. سرایتا در مواد غذایی به ترتیب (۰/۱/۱) در انواع شیرینی، (۰/۱/۷) در بستنی، و (۰/۰/۲) در محصولات گوشتی وجود داشت. بوتیوکسلا در شیرینی جات، محصولات گوشتی و آب میوه (۰/۰/۰۲) و در بستنی (۰/۰/۱) و در سبزیجات تازه به میزان (۰/۰/۶) یافت می شود. هافیا و پلانتوا هر کدام ۶ مورد (۰/۱/۵) از انتروباکتریاسه های آلوده کننده مواد غذایی را تشکیل می دهند که در جدول ۴ بیان شده است.

جدول ۴: توزیع فراوانی انتروباکتریاسه های آلوده

کننده مواد غذایی

انتروباکتریاسه	بوتیوکسلا	هافیا	پلانتوا	کلیسیلا	سبزیجات	شیرینی	لبنیات	گوشتی	آب میوه	ادویه	جمع
فراورده های لبنی	۱۰	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰
انواع شیرینی	۵۳	۲۰	۱۵	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۷۵
بستنی	۲۰	۱۵	۲۲	۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۶۳
محصولات گوشتی	۲۰	۰	۰	۳	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۲۴
سبزیجات تازه	۵	۴	۱	۳	۳	۳	۰	۰	۰	۰	۱۹
آب میوه	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
آب	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ادویه	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
جمع	۱۱۰	۴۴	۴۱	۱۱	۶	۶	۰	۰	۰	۰	۲۰۸

بحث :

یکی از مهمترین مسائل بهداشتی کشورها در حال توسعه، آلودگی مواد غذایی می باشد که منجر به بیماری های عفونی منتقله از غذا می گردد. کنترل این

نمونه های مواد غذایی که باکتری های خسانواده انتروباکتریاسه از آنها جدا گردید عبارت بودند از انواع شیرینی (۰/۳۳)، بستنی (۰/۲۰/۵)، لبنیات (۰/۲۰)، فرآورده های پروتئینی (۰/۱۳)، سبزیجات (۰/۱۰/۵)، آب میوه (۰/۱/۵)، ادویه (۰/۱)، آب (۰/۰/۵) که در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول ۲: توزیع فراوانی انواع نمونه های مواد

غذایی

نمونه های مواد غذایی	فراوانی	درصد
انواع شیرینی	۱۷۱	۳۳
بستنی	۱۰۸	۲۰/۵
لبنیات	۱۰۳	۲۰
فراورده های پروتئینی	۶۸	۱۳
سبزیجات	۵۵	۱۰/۵
آب میوه	۸	۱/۵
ادویه	۵	۱
آب	۳	۰/۵
جمع	۵۲۱	

مواد غذایی که اثرشیاکلی از آنها جدا گردیده است شامل لبنیات (۰/۲۹/۵)، شیرینی جات (۰/۲۶)، بستنی (۰/۱۶/۵)، فرآورده های پروتئینی (۰/۱۳)، سبزیجات (۰/۱۲)، آب میوه (۰/۱/۵)، آب (۰/۱) و ادویه (۰/۰/۵) می باشد که در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: توزیع فراوانی انواع نمونه های مواد

غذایی که اثرشیاکلی از آنها جدا گردید

نمونه های مواد غذایی	فراوانی	درصد
لبنیات	۸۸	۲۹/۵
انواع شیرینی	۷۸	۲۶
بستنی	۴۹	۱۶/۵
فراورده های پروتئینی	۳۹	۱۳
سبزیجات	۳۶	۱۲
آب میوه	۵	۱/۵
آب	۳	۱
ادویه	۲	۰/۵
جمع	۳۰۰	

در بیمارستان‌ها توزیع می‌گردد می‌تواند منبعی برای این گونه عفونت‌ها محسوب گردد. در این بررسی سراتیامارسنس بیشترین گونه جدا شده در جنس سرایتا بود که با موارد جداسازی آن از نمونه‌های کلینیکی مشابه می‌باشد. کلبسیلا نیز علاوه بر فلور نرمال روده انسان و حیوانات در طبیعت نیز گستردگی وسیعی دارد. در این بررسی کلبسیلاکسی توکا به مراتب بیشتر از کلبسیلاپنومونیه که عامل اکثر گستردگی عفونت‌های ناشی از کلبسیلا است جدا گردید. در بین سایر انتروباکتریاسه‌ها، بوتوکسلا اکثراً از آب جدا می‌شود (۱۰) و مواد غذایی که با این باکتری و سه باکتری باقیمانده یعنی هافنیا، پانتوآ و سیتروباکتر فروندی آلوده شده اند نیز آلودگی‌های ثانویه را خاطر نشان می‌سازند. نکته ای که در این بررسی حائز اهمیت است حضور انتروباکتریاسه‌های آلوده کننده در مواد غذایی آماده به مصرف مانند فرآورده‌های لبنی، انواع شیرینی، بستنی و غیره می‌باشد. هر چند که این باکتریها اکثراً به عنوان فلورنرمال روده شناخته شده‌اند ولی وجود انتروتوکسین مقاوم و حساس به حرارت در کلبسیلا پنومونیه می‌تواند این باکتری را یکی از عوامل ایجاد کننده اسهال معرفی نماید (۱۱). اخیراً توکسین مشابه شیگلاشیگا (shiga-like toxin) در انتروباکتر کلوآکه که عامل کولیت هموراژیک می‌باشد و می‌تواند منجر به سندروم اورمی همولیتیک به خصوص در کودکان و افراد مسن گردد، نیز شناسائی گردیده است (۱۲) همچنین با معرفی ژن eaeA در هافنیا (۱۳) همانند اشریشیاکلی انتروپاتوژن و انتروهموراژیک که سبب چسبیدن باکتری به روده کوچک گشته و سپس با ایجاد تغییرات سطحی در روده سبب اسهال می‌گردد، لزوم اهمیت در جداسازی این باکتریها و نظارت هر چه بیشتر در امر تهیه، تولید، توزیع و نگهداری مواد غذایی را خاطر نشان می‌سازد.

بیماری‌ها تنها در پی شناخت و جداسازی عوامل آلوده کننده و روشهایی که از طریق آن مواد غذایی آلوده می‌گردند میسر می‌باشد. در این بررسی تعداد ۲۰۰۰ ماده غذایی از نظر وجود باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مورد بررسی قرار گرفتند که از ۵۲۱ مورد انتروباکتریاسه جدا شده ۳۰۰ مورد (۵۷/۵٪) به اشریشیاکلی اختصاص دارد. از آنجا که اشریشیاکلی فلورنرمال روده انسان و حیوان می‌باشد و مدت زمان کوتاهی می‌تواند در خارج از روده باقی بماند، جداسازی آن از مواد غذایی آلودگی جدید با مواد دفعی را نشان می‌دهد (۵). سایر انتروباکتریاسه‌ها در زمان طولانی تری در مواد غذایی باقی مانده و حضور آنها، هم نشانه آلودگی مدفوعی و هم آلودگی محیطی می‌باشد. در این بررسی نشان داده شد که فرآورده‌های لبنی دارای بیشترین آلودگی با اشریشیاکلی می‌باشند که به دلیل مصرف شیر غیر پاستوریزه در تهیه محصول است. انتروباکتر بیشترین فراوانی را در انواع شیرینی دارد این امر به دلیل آلودگی ثانویه از طریق نحوه نگهداری و توزیع آن می‌باشد. در بین گونه‌های انتروباکتر که در این بررسی تعیین گردیدند انتروباکتر کلوآکه بالاترین میزان جداسازی را دارد و این گونه در نمونه‌های کلینیکی نیز عامل اکثر عفونت‌های ایجاد شده توسط جنس انتروباکتر می‌باشد. سایر گونه‌های انتروباکتر (به غیر از انتروباکتر ساکازاکی و انتروباکتر آتروجنز که در عفونت‌های انسانی نقش دارند) در خاک و آب وجود دارند و حضور آنها در مواد غذایی نشانگر آلودگی محیطی می‌باشد (۶). جنس سرایتا نیز پراکندگی وسیعی در طبیعت شامل خاک، آب، گیاهان و حشرات دارد (۷) و موارد جداسازی آن در شیرینی‌جات و بستنی بیشتر نمایانگر نقص در سیستم نگهداری و توزیع مواد غذایی می‌باشد. از آنجا که این باکتری یکی از علل شایع عفونت‌های بیمارستانی است (۹ و ۸) حضور آن در مواد غذایی

- 6- Forbes BA, Sahm F BA, & Scott S. Diagnostic Microbiology tenth ed. USA. Mosby. 1998. 380 – 397.
- 7- Gill VJ, Farmer JJ. *Serratia ficaria* isolated from a human clinical specimen. J. Clin Microbiol, 1981. P 14: 234 – 236.
- 8- Mermel LA, Spiegel CA: Nosocomial sepsis due to *serratia odorifera* biovar 1. Clin Infect Dis 1992 14: 208 – 210.
- 9- Ursua PR, Unzaga. MJ, Melero P. *Serratia rubidaea* as an invasive pathogen. J Clin Microbiol. 1996. 34: 216 – 217.
- 10- Muller HE, Bernner, DJ Fanning GR, Grimont PAD, Kampf P. *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella*. Int J Syst Bacteriol, 1996. 46; 50 – 63.
- 11- Koneman EW, Allen D. Color atlas and text book of Diagnostic Microbiology. 5th ed Philadelphia. Lipincot Company. 1997. 172 – 230.
- 12- Paton AWP. *Enterobacter cloacae* producing a shiga – Like toxin II related cytotoxin associated with a case of hemolytic – uremic syndrome. J. Clin Microbiol. 1996. 34: 465.
- 13- Ridelly S A, Paulin L, Hafnia Alvei. In stool specimens from patients with diarrhea and healthy controls J. Clin Microbiol, 1994. 32: 2335 - 2337.

تشکر و قدردانی:

در این بررسی از همکاری و مساعدت همکاران آزمایشگاه میکروبی شناسی مواد غذایی خانم اعظم نورانی وطنی، خانم منیژه قاسمی و آقای دکتر بهرام روادگر برخوردار بودیم که بدینوسیله از آنان تشکر می‌گردد.

References :

- 1- Jok Lik, Willett, Amons and Wilfert: Zinsser Microbiology 20th ed. Appleton & Lange. Norwalk, California 1993. 538 – 563.
- 2- Frazier W,C. Westhoff D C Food Microbiology. fourth ed. Newyork. M cGraw – Hill. 1988. 59 – 68.
- 3- Vanderzant CSD. Compendium of methods for the Microbiologic examination of foods. Third ed. American Public Health Association 1992. Pp 325 – 367.
- 4- Potter ME Tauxe RV. Epidemiology of food borne diseases: Tools and applications. World – Health Stat. Q. 1997 50(1-2): 24 – 9.
- 5- Collee JG, Duguid JP Fraser AG, Mackie & Mc Cartney. Practical Medical Microbiology thirteenth ed. U.K. Churchill Livingstone. 1990. 204 – 238.