

ارزیابی روش های مختلف غنی سازی ، میزان شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی O157:H7 در شیر خام گاوهای شهرستان جهرم

محمد کارگر*^۱ ، سوسن حیدری^۲ ، فیروز عباسیان^۳ ، شهرام شکر فروش^۴

۱. PhD میکروبیولوژی ، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

۲. MSc میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

۳. PhD میکروبیولوژی ، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

۴. PhD کنترل کیفی مواد غذایی، رئیس دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

mkaragarmicro418@yahoo.com

* نشانی برای مکاتبه: جهرم ، دانشگاه آزاد اسلامی گروه میکرب شناسی ، تلفاکس : ۰۷۱۱-۶۲۶۲۱۰۲

دریافت مقاله: اسفند هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: تیر هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیا کلی O157:H7 یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده بیماری های منتقل شونده به وسیله مواد غذایی در انسان است . منابع حیوانی به ویژه شیر گاو یکی از کانون های اصلی انتقال عفونت به انسان محسوب می گردد . هدف از این پژوهش ، ارزیابی شیوع و مقایسه روش های مختلف غنی سازی و بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده این باکتری از شیر خام در گاوهای شهرستان جهرم است .

روش کار: در این پژوهش ۵۰۰ نمونه شیر گاو از سه منطقه شهرستان جهرم در سال ۱۳۸۴ جمع آوری و پس از غنی سازی در سه محیط کشت ECB ، BHI و TSB واحد نوویوسین در سه دمای : ۲۲ و ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت . سپس از محیط ECC ، VRBA و CT-SMAC به منظور بررسی تخمیر سوربیتول و لاکتوز و از محیط کروموژن اختصاصی MST برای بررسی فعالیت بتا گلوکورونیداز باکتری های جدا شده استفاده گردید . در نهایت با استفاده از آنتی سرم اختصاصی جداسازی باکتری E.coli o157:H7 تایید و توسط روش های استاندارد حساسیت نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک مختلف بررسی شد ،

یافته ها: استفاده از محیط TSB در دمای ۲۲ °C (با فراوانی ۵۳/۶۰٪) مناسب ترین روش غنی سازی تشخیص داده شد . از مجموع نمونه های مورد بررسی ، ۴۵ نمونه (۹٪) اشریشیا کلی سوربیتول منفی جداسازی گردید ، همچنین میزان شناسایی اشریشیا کلی MUG⁻ ۳/۶۰٪ و اشریشیا کلی O157:H7 پس از انجام تست های تاییدی ۳/۴۰٪ تشخیص داده شد که تمامی آنها نسبت به پنی سیلین ، آمپی سیلین و نوویوسین مقاومت داشتند .

نتیجه گیری: به دلیل شدت بیماری زایی و دوز عفونی اندک باکتری E.coli O157H7 (۱۰۰ تا ۲۰۰ ارگانیسم) انجام مطالعات گسترده تر بر روی سایر مواد لبنی در سطح کشور پیشنهاد می گردد .

واژگان کلیدی: شیر گاو ، اشریشیا کلی O157:H7 ، روش های غنی سازی ، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

اشریشیا کلی سروتیپ O157:H7 یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده مسمومیت غذایی و بیماری هایی مانند: اسهال خفیف ، کولیت خونریزی دهنده (HC) ، ترومبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورا (TTP)، سندرم اورمی همولیتیک (HUS) و مرگ در انسان است (۱-۷). بیماری های یاد شده می تواند با بروز ناگهانی ، تمامی گروه های سنی را درگیر سازد . این باکتری برای اولین بار توسط Riley و همکاران در سال ۱۹۸۲ در آمریکا به دنبال شیوع اسهال خونی در ایالت های آرگان و میشیگان به دلیل استفاده از گوشت های آلوده در رستوران های زنجیره ای شناسایی گردید (۸). سپس مواردی از شیوع سندرم اورمی همولیتیک ناشی از آن در آمریکا ، انگلیس و کانادا گزارش شد (۸ ، ۹). بزرگ ترین شیوع این باکتری در کشور ژاپن توسط Armstrong و همکارانش در سال ۱۹۹۶ به دنبال مصرف تریچه گزارش شده است که باعث بروز بیش از ۹۰۰۰ مورد بیماری و ۷ مورد مرگ گردید (۳). گاوسازان (Bovine animal) به ویژه گوساله یکی از مخازن اصلی این باکتری است (۲ ، ۴). همچنین حیواناتی مانند : گوسفند ، بز ، آهو ، خوک ، گربه ، سگ ، جوجه و غاز به عنوان مخزن شناخته شده اند (۴). تا کنون هیچ گونه بیماری زایی ناشی از این باکتری در حیوانات یاد شده گزارش نشده است . اما امکان انتقال باکتری از حیوانات به انسان ، از راه مستقیم ، تماس با آب ، خاک و فضولات نشخوار کنندگان و مصرف مواد غذایی مانند : شیر خام و پاستوریزه آلوده ، ماست ، پنیر ، همبرگر، سوسیس ، گوشت خرد شده ، ساندویچ های گوشتی ، سبزیجات ، آب میوه ها (به ویژه آب سیب) وجود دارد (۴). این باکتری به دلیل تحمل شرایط اسیدی در دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد چند ساعت و در حرارت ۴ درجه سانتی گراد ، ۱ تا ۸ روز در سس مایونز و ماست و ۶۰ روز در پنیر زنده می ماند . هم چنین میزان بقای این ارگانیسم در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد در همبرگر ۹ ماه گزارش شده است (۱۰ ، ۱۱). مکانیسم چگونگی آلودگی شیر با این باکتری هنوز کاملاً شناسایی نشده است (۱)، اما انتقال عفونت به انسان از راه های ، آلودگی پستانی ، تجهیزات شیر دوشی و آلودگی مدفوعی شیر، به وسیله عواملی مانند : مدفوع ، محتویات شکمبه ، بزاق ، محیط مزرعه ، مگس و پرستل انسانی گزارش شده است (۱ ، ۲). چگونگی فرآوری محصولات مختلف لبنی از نظر پتانسیل آلودگی با این باکتری اهمیت دارد (۱۳). به دلیل دوز بسیار اندک عفونی این باکتری (کمتر از ۱۰۰ ارگانیسم) در مقایسه با سایر پاتوژن های مواد غذایی به ویژه سالمونلا و شیگلا ، ضرورت شناسایی منابع عفونی و چگونگی انتقال آن به انسان وجود دارد (۱ ، ۱۳). هدف از این پژوهش ارزیابی شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری در شیر خام گاوهای شهرستان جهرم است . همچنین به دلیل تعداد اندک این باکتری در شیر سه روش مختلف غنی سازی برای تکثیر باکتری های آسیب دیده مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

نمونه گیری: ۵۰۰ نمونه شیر ، از اردیبهشت تا شهریور ماه ۱۳۸۴ ، با روش خوشه ای از گاوهای سنتی ، نیمه صنعتی و صنعتی ، سه ناحیه اصلی : مرکزی ، خفر و سیمکان شهرستان جهرم تهیه گردید . نمونه ها به صورت مستقیم از پستان گاو در ظروف استریل جمع آوری و با رعایت

زنجیره سرد به آزمایشگاه میکرب شناسی شبکه دامپزشکی شهرستان جهرم منتقل گردید . در مورد تمامی نمونه ها اطلاعاتی مانند : سن ، نژاد ، نوع تغذیه ، منبع آب آشامیدنی ، محل و ماه های نمونه گیری در پرسش نامه تنظیمی ثبت گردید .

غنی سازی: مقدار ۴۰ میلی لیتر از هر نمونه شیر در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس رسوب حاصل از آن در سه محیط (Difco) TSB ، (Oxoid) E.coli broth و (Oxoid) BHI واجد ۲۰ میلی گرم در لیتر نوویوسین (Sigma, Germany) به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب: با سه دمای ۲۲ ، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد غنی سازی گردید (۱۲) .

جداسازی E.coli O157:H7: کشت های غنی شده در مرحله قبل به صورت جداگانه بر روی محیط سوربیتول مک کانکی (CT-SMAC) واجد ۰/۵ میلی گرم در لیتر سفیکسیم (Dynal) و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تاسیم تلوریت (Dynal) کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در حرارت ۳۷ درجه ، کلنی های سوربیتول منفی خالص سازی و سپس به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز ، کلنی های یاد شده بر روی محیط VRBA (Merk) کشت داده شد (۱ ، ۱۴). در مرحله بعد مجدداً تخمیر سوربیتول در محیط تک قندی بررسی و به منظور تایید نهایی جداسازی اشریشیا کلی، در محیط (Oxoid) EMB Agar و (Rambach) (Merk) ECC کشت داده شد (۱ ، ۱۴ ، ۱۵). هم چنین به منظور تایید جداسازی سروتیپ E.coli O157:H7 فعالیت بتاگلوکوزونیدازی باکتری ها در محیط کروموژن Chrom Agar E.coli O157:H7 ارزیابی گردید (۱) .

تعیین سروتیپ: به منظور تایید نهایی کلنی های MUG^{-} خالص شده در مرحله قبل، از تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی E.coli O157:H7 (Difco, USA) استفاده گردید (۲) . **تست حساسیت آنتی بیوتیکی:** با استفاده از روش استاندارد Disk Diffusion بر روی محیط کشت مولر هینتون (Merk) با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک شامل نوویوسین ۵ ، آمپی سیلین ۱۰ ، پنی سیلین ۱۰ ، کانامایسین ۳۰ ، کاربنی سیلین ۱۰۰ ، جنتامایسین ۱۰ ، توبرامایسین ۱۰ ، اریترومایسین ۱۵ ، دوکسی سایکلین ۳۰ ، نیتروفورانتسولین ۳۰۰ ، اتروفلوکساسین ۵ ، فورازولیدون ۱۰۰ ، تتراسایکلین ۱۵ ، سفنکسیم ۳۰ ، نالیدیکسیک اسید ۳۰ ، کلرامفنیکل ۳۰ ، سولفامتوکسازول / تری متوپریم ۲۵ (Oxoid) انجام شد (۲) .

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 12 و آزمون های مربع کای و ANOVA و دقیق فیشر انجام شد . مرز معنی داری روی $p < 0/05$ قرار داده شد .

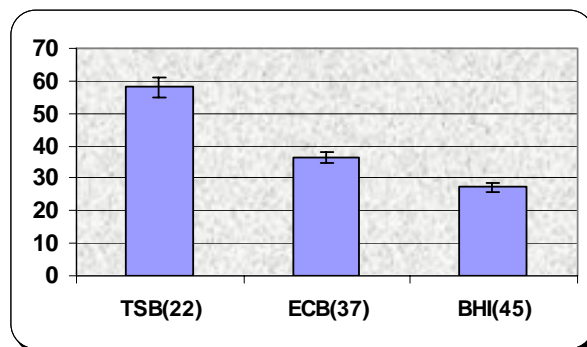
یافته ها

در این پژوهش مناسب ترین روش غنی سازی محیط TSB با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد تشخیص داده شد. نتایج پژوهش نشان داد که با افزایش دما میزان جداسازی نمونه های سوربیتول منفی کاهش می یابد (نمودار ۱).

جدول ۲- توزیع فراوانی ویژگی های نمونه های مورد بررسی بر اساس میزان جداسازی باکتری E.coli O157:H7 در نواحی مورد پژوهش

ویژگی	ویژگی	نمونه مورد بررسی	باکتری جدا شده
		(تعداد (%))	(تعداد (%))
نژاد	اصلی	۳۵۳ (۷۰/۶۰)	۳ (۱۷/۶۵)
	بومی	۱۴۷ (۲۹/۴۰)	۱۴ (۸۲/۳۵)
محل	مرکزی	۳۱۰ (۶۲)	۳ (۱۷/۶۵)
	سیمکان	۶۸ (۱۲/۶۰)	۱۳ (۷۶/۴۷)
	خفر	۱۲۲ (۲۴/۴۰)	۱ (۵/۸۸)
گروه های سنی	۳-۵	۲۹۰ (۵۸)	۱ (۵/۸۸)
	۵-۷	۲۹۱ (۵۸/۲۰)	۳ (۱۷/۶۵)
	۷-۹	۲۶۶ (۵۳/۲۰)	۶ (۴۱/۱۸)
نحوه تغذیه	دستی	۲۹۰ (۵۸)	۴ (۲۳/۵۳)
	چرا	۲۱۰ (۴۲)	۱۳ (۷۶/۴۷)
منبع آب	آب شهر	۱۰۶ (۲۱/۲۰)	۱ (۵/۸۸)
	آب چاه	۳۱۴ (۶۲/۸۰)	۳ (۱۷/۶۵)
	رودخانه	۸۰ (۱۶)	۱۳ (۷۶/۴۷)
تعداد گاو در هر جایگاه	کمتر از ۵۰	۴۳۵ (۸۷)	۱۷ (۱۰۰)
	۵۰-۱۰۰	۲۴ (۴/۸۰)	۰ (۰)
	۱۰۰-۱۵۰	۱۰ (۲)	۰ (۰)
	۱۵۰-۲۰۰	۰ (۰)	۰ (۰)
ماه نمونه گیری	بیشتر از ۲۰۰	۳۱ (۶/۲)	۰ (۰)
	اردیبهشت	۵۰ (۱۰)	۱ (۵/۸۸)
	خرداد	۸۴ (۱۶/۸۰)	۴ (۲۳/۵۳)
	تیر	۱۱۴ (۲۲/۸۰)	۵ (۲۹/۴۱)
	مرداد	۲۴ (۴/۸۰)	۳ (۱۷/۶۵)
مهر	شهریور	۸۴ (۱۶/۸۰)	۴ (۲۳/۵۳)
	مهر	۴۴ (۸/۸۰)	۰ (۰)

نمودار ۱: توزیع فراوانی نمونه های سوربیتول منفی غنی شده با استفاده از سه روش و دمای مختلف



از نظر جمعیت دامی شهرستان جهرم به سه منطقه اصلی: مرکزی (با فراوانی ۳۰٪)، سیمکان و خفر (هر کدام با فراوانی ۳۵٪) تقسیم بندی می گردد. با وجود فراوانی بیشتر جمعیت گاوی منطقه سیمکان و خفر نسبت به منطقه مرکزی به دلیل تولیدشیر بیشتر در منطقه مرکزی بیشتر نمونه ها از این ناحیه تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی جمعیت، میزان شیرتولیدی و تعداد آزمایش های گاوهای مورد مطالعه در شهرستان جهرم

محل	جمعیت دام	میزان شیرتولیدی(تن)	تعداد آزمایش
	(تعداد (%))	(تعداد (%))	(تعداد (%))
مرکزی	۶۰۰۰ (۳۰)	۳۱ (۸۰/۵۱)	۳۱۰ (۶۲)
سیمکان	۷۰۰۰ (۳۵)	۳۵ (۹/۰۹)	۶۸ (۱۳/۶۰)
خفر	۷۰۰۰ (۳۵)	۴ (۱۰/۳۸)	۱۲۲ (۲۴/۴۰)
جمع کل	۲۰۰۰۰ (۱۰۰)	۵۰ (۳۸/۵۰)	۵۰۰ (۱۰۰)

(اعداد داخل پرانتز به درصد است.)

بحث

نتایج اغلب پژوهش های انجام شده نشان می دهد که O157:H7 E.coli شیوع گسترده ای را در اغلب نقاط دنیا به ویژه در مواد غذایی لبنی دارد (Rauf, ۱۲). همکاران در سال ۱۹۹۶ در مصر، Alleberger و همکاران در سال ۱۹۹۷ در استرالیا، Klie و همکاران در سال ۱۹۹۷ در آلمان، میزان شیوع این باکتری را در شیر خام گاو به ترتیب: ۳٪، ۶٪ و ۳۰٪ گزارش کردند (۱۲).

Brashear و Galyean در سال ۱۹۹۵، در آمریکا نشان دادند که در صورت تهیه نمونه به میزان کافی تقریباً تمامی جایگاه های جمع آوری شیر مورد بررسی با باکتری E.coli O157:H7 آلودگی دارند (۱۶). Murphy و همکاران در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ با بررسی ۵۳۶ فیلتر شیر در ۹۷ گاوداری میزان آلودگی آنها را ۱۲٪ گزارش نمودند (۸). Brashears و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آمریکا نشان دادند که از میان ۹۱ مرکز نگهداری گاوهای شیری ۲۴/۲۰٪ و از ۹۷ محل فرآوری محصولات لبنی در ۱۹ ایالت مختلف، میزان آلودگی با باکتری E.coli O157:H7، ۳۰/۹۰٪ می باشد. محققین یاد شده، نشان دادند که با وجود دفع مقادیر کم باکتری از گاوهای شیری، میزان شیوع در اغلب مناطق مورد بررسی، به ویژه در فصول گرم تر و گاوهای جوان تازه از شیر گرفته شده قابل توجه است (۱۶).

از مجموع ۵۰۰ نمونه مورد بررسی، از ۲۶۸ نمونه (فراوانی ۵۳/۶۰٪)، کلنی های سوربیتول منفی در محیط CT-SMAC جداسازی گردید که پس از کشت بر روی محیط های اختصاصی EMB، VRBA و ECC از ۴۵ نمونه (فراوانی ۹٪) آن اشریشیا کلی جداسازی شد. در مرحله بعد با استفاده از محیط کشت اختصاصی O157:H7 و سپس با استفاده از آنتی سرم اختصاصی، جداسازی ۱۷ نمونه O157:H7 E.coli (فراوانی ۳/۴۰٪) تایید گردید (جدول ۲). با استفاده از آزمون های مربع کای و دقیق فیشر نشان داده شد که در سطح $p < 0.05$ بین متغیرهای: محل، نژاد، نوع تغذیه، منبع آب آشامیدنی و وجود باکتری E.coli O157:H7 ارتباط معنی داری مشاهده شد (در تمام موارد $P < 0.002$). همچنین با استفاده از آزمون ANOVA مشخص شد که بین تعداد کل گاوهای موجود در جایگاه و سن دام با باکتری های جدا شده E.coli O157:H7 ارتباط معنی داری وجود دارد (به ترتیب $P < 0.016$ و $P < 0.001$).

از بین ۱۷ آنتی بیوتیک مورد بررسی، ۱۰٪ باکتری های جدا شده E.coli O157:H7 نسبت به سه آنتی بیوتیک، پنی سیلین، آمپی سیلین و نوویوسین مقاوم ۷۲/۲٪ حداقل نسبت به یک تا دو آنتی بیوتیک نیمه مقاوم بودند.

باکتری در طول تخمیر لاکتیک و بقای آن در نوشیدنی های حاوی شیر برای بیش از ۱۰ روز در یخچال وجود دارد (۱۳).

به دلیل تهیه پنیر از شیر غیر پاستوریزه و همچنین به دلیل طی نشدن مدت لازم قبل از عرضه ، امکان شیوع این باکتری از راه مصرف آن نیز وجود دارد.

Meng و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که از میان ۱۲۵ باکتری E.coli O157:H7 جدا شده از حیوانات ، غذا و انسان ، حداقل ۲۴٪ از آنها نسبت به یک آنتی بیوتیک مقاوم هستند. همچنین سایر محققین ، بیشترین فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی را در مورد استرپتومایسین ، سولفامتوکسازول و تتراسایکلین گزارش نمودند (۱۲). Murphy و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ایرلند مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۶ باکتری E.coli O157:H7 جدا شده از ۹۷ فیلتر شیر خام نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که تمامی باکتری ها نسبت به استرپتومایسین مقاومت دارند (۸).

در این پژوهش ، تمامی باکتری های تایید شده اشریشیا کلی O157:H7 ، به سه آنتی بیوتیک آمپی سیلین ، نوو بیوسین و پنی سیلین مقاومت داشتند و همچنین ۷۲٪ از آنها نیز حداقل نسبت به یک یا دو آنتی بیوتیک نیمه مقاوم بودند . به طور کلی با توجه به مخاطرات ناشی از این باکتری به ویژه در صنایع لبنی ضرورت بررسی شیوع اتیولوژیکی این باکتری در مواد غذایی و راه های انتقال آن به انسان وجود دارد و بررسی های بیشتر در سایر مناطق کشور پیشنهاد می گردد.

نقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر تهمتن به دلیل مشاوره علمی و همچنین شبکه دامپزشکی شهرستان جهرم و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل حمایت های اجرایی صمیمانه سپاسگزاری می نمایند.

Khan و همکاران در سال ۲۰۰۲ در شهر کلکته در کشور هندوستان ، میزان شیوع این باکتری را در نمونه های مدفوع گاو ۱۸٪ و در گوشت خام کشتارگاه ها ۵۰٪ گزارش نمودند (۱۷). گزارش های متفاوتی در مورد میزان جداسازی باکتری یاد شده در کشورهای مختلف منتشر شده است. در بعضی از مناطق میزان شیوع آن مشابه با شیگلا و در برخی کمتر و یا بیشتر از آن نیز گزارش شده است (۱۸). در ایالت متحده تخمین زده می شود که سالانه ۷۳۰۰۰ مورد عفونت و ۶۱ مورد مرگ به علت عفونت با E.coli O157:H7 روی دهد (۱۹). همچنین بیماری اورمی همولیتیک (HUS) ناشی از این باکتری عامل بیشتر نارسایی های حاد کلیوی در کودکان این کشور می باشد (۳).

پژوهش های انجام شده در کشور ما در مورد این باکتری بیشتر محدود به نمونه های کلینیکی بوده است. اصلاهی و همکاران در سال ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳ با بررسی ۲۰۰۸ نمونه مدفوع انسان در غرب (ایلام) و شمال ایران (مازندران و گلستان) میزان شیوع اشریشیا کلی تولید کننده و روتوکسین را به ترتیب ۴/۹۰٪ و ۰/۷۰٪ گزارش کردند. اما هیچ کدام از نمونه ها سروتیپ O157:H7 نبودند (۲۰). برای اولین بار سالک مقدم و همکاران در سال ۱۹۹۹ در ایران با بررسی ۲۰۰۰ نمونه ماده غذایی مختلف تنها از یک نمونه سبزی موفق به جداسازی E.coli O157:H7 شدند (۱۸). همچنین بری و همکاران در سال ۱۳۷۹ با بررسی ۹۷ نمونه شیر خام گاو در استان مازندران تنها از ۳ نمونه (۳/۰۶٪) اشریشیا کلی O157:H7 تولید کننده و روتوکسین جداسازی نمودند (۲۱).

نتایج پژوهش ما نشان داد که میزان آلودگی شیر خام گاوهای شهرستان جهرم ، ۳/۴۰٪ می باشد. با آنالیز آماری ارتباط معنی داری در سطح $p < 0.05$ بین نمونه های مثبت و استفاده از آب رودخانه به عنوان منبع آب آشامیدنی تشخیص داده شد. با توجه به بقای بیش از ۵۰ روز این باکتری در مخازن آب شهری ، رودخانه و نیز در بدن ناقلین بدون علامت (گوساله) خطر انتقال این باکتری از گوساله های ناقل به حیوانات سالم ، از گوساله به شیر و سایر مواد لبنی و غذایی وجود دارد (۱۳). همچنین ضرورت کنترل و نظارت دقیق محصولات لبنی در هنگام تولید با توجه به توانایی رشد این

REFERENCES

1. Reinders R D, Barama A . Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation method for detection of shiga toxin – producing E.coli O157:H7 in milk . Journal of Applied Microbiology .2002 ; 92 : 1015-1020.
2. Kasrazadeh M, Genigeorgis C. Potential growth and control of Escherichia coli O157:H7 in soft Hispanic type cheese . International Journal of Food Microbiology. 1995 June; 25:289-300.
3. Widiasih D A , Ido N , Omoe K . Duration and magnitude of faecal shedding of shiga toxin – producing Escherichia coli from naturally infected Cattle . Epidemiol . Infect . 2003 ; 132 : 67-75.
4. Kenneth J, Ryan M D , Cray M D . Sherris Medical Microbiology. 4th ed . Mc Graw Hill; 2004:354-357.
5. Conedera G , Dalvit P, Martini M . Verocytotoxin – Producing Escherichia coli O157:H7 minced beef and dairy products in Italy . International Journal of Food Microbiology; 2004 March : 67-73.

6. Goodridge L , Chen J , Griffiths M . The use of a fluorescent bacteriophage assay for beef detection of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk . *International Journal of Food Microbiology*. 1999 ;47 : 43-50.
7. Seo K H , Brackett R E, FRANK J F . Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic flow cytometry in ground beef , apple juice , and milk . *International Journal of Food Microbiology* . 1998 August : 115-123.
8. Murphy B P , Murphy M , Buckley J F . In-Line milk filter analysis : *Escherichia coli* O157:H7 surveillance of milk production holding . *Int J Hyg Environ – Healthy* . 2005: 4521-4528.
9. Chang J H , Chou C. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink . *Food Microbiology* . 2000; 17: 579-587.
10. Cheng H Y , Cheng Chun C . Acid adaptation and in acidic fruit juice and lactic fermented milk product . *International Journal of Food Microbiology* . 2001 May; 70 :189-195.
11. Ogwaro BA,Gibson H .Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation, *International Journal of Food Microbiology* . 2002 April;79: 105-112.
12. Dontorou C , Papado P , Filioussis G, Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece . *International Journal of Food Microbiology* . 2003 June; 82 : 273-279.
13. Oksuz O , Arici M , Kurultay S, Gumus T . Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in turkey. *Food Control* . 2004 July ; 15: 453-456.
14. Alam M J , Zurek L . Association of *Escherichia coli* O157:H7 with house flies on a cattle farm . *Applied and Environmental Microbiology* . 2004 Dec: P : 7578 -7580.
15. Voitoux E , Lafarge V , Collette C , Lombard B. Applicability of the draft standard method for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy products . *International Journal of Food Microbiology* . 2002;77: 213-221.
16. Brashears M , Galyean M . *E.coli*O157:H7 in live cattle by 50 percent . 2002 April;24:3-6 .
17. Khan A, Yamasaki S . Prevalence and genetic profiling of virulence determinates of Non-O157 STEC isolate from cattle , beef and humans Calcutta India . *Emerg Inf Dis* .2002 Jan ; 8 (1): 54-62.
18. Salek Moghaddam A , Forouhesh Tehrani M , Davoodian P. Survey of the bacterial contaminants of Iranian foods in searches of *E.coli*O157:H7 in medical laboratory sciences researches center . *Iranian J of Inf Dis and Trop Medicine* . 2003 ; 18(21) : 5 – 8.
19. Baffone W,Ciaschini G,Pianetti A . Detection of *Escherichia coli* O157:H7and other intestinal pathogens in patients with diarrheal disease *Eur Epidemiol*. 2001;17:97-99.
20. Aslani M B, .Bourzari S . An epidemiological study on VTEC infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). *Eur J Epidemiol*.2003;18 : 345-349.

۲۱- بررسی شیوع اشریشیاکلی های تولید کننده وروتوکسین در شیر گاوهای استان مازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد ، قم : .بری حسین
 دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم ؛ ۱۳۷۹