پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هفدهم، شماره ۴، پی در پی ۸۸، صفحات ۲۱۰ تا ۲۱۴
مهر و آبان ۱۳۹۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۶/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۳۰

# تشخیص و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* O157 جدا شده از گوشت قرقاول، کبک، اردک و غاز

*سمیرا عباسی*[۱*]، دکتر حسن ممتاز[۲]، دکتر ابراهیم رحیمی[۳]، منوچهر مؤمنی[۴]، مجید ریاحی[۴]

۱. عضو انجمن علمی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
۲. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
۳. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
۴. کارشناس مرکز بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

## چکیده

**سابقه و هدف:** با وجود ارزش بالای گوشت طیور، کنترل و بازرسی دقیقی بر روی لاشه‌های ذبح شده طیور در کشتارگاهها صورت نمی‌گیرد. در نتیجه امکان انتقال برخی از باکتری‌ها مانند *اشریشیاکلی* که یکی از عمده‌ترین باکتری‌های ایجاد کننده فساد غذایی است، به انسان وجود دارد. این بررسی به منظور تشخیص و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* O157 جدا شده از گوشت قرقاول، کبک، اردک و غاز در استانهای گیلان، مازندران، اصفهان و فارس انجام شد.

**مواد و روشها:** برای انجام این بررسی به ترتیب تعداد ۲۵، ۱۷، ۲۲ و ۳۶ نمونه گوشت عضله سینه قرقاول، کبک، اردک و غاز از استانهای ذکر شده جمع‌آوری شد و در یخچال حاوی یخ سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها ابتدا کشت داده شدند و سپس از کلنی‌های تیپیک که نشانگر *اشریشیاکلی* بودند، DNA استخراج گردید و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تأیید تشخیص و شناسایی گروه سرمی O157 استفاده شد. در پایان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک گذاری ساده مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که ۲۷٪ نمونه‌ها از نظر وجود *اشریشیاکلی* مثبت بودند که ۶ نمونه آن دارای گروه سرمی O157 بودند. بررسیها نشان داد که بیشترین و کمترین فراوانی باکتری و گروه سرمی O157 به ترتیب متعلق به گوشت غاز و گوشت کبک بوده است. باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از گوشت طیور، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به سولفامتوکسازول و ونکومایسین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین داشته است. اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین میزان شیوع باکتری و گروه سرمی O157 بین گوشت غاز و کبک و همچنین بین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دیده شد.

**نتیجه‌گیری**: پیشنهاد می‌شود که از روش دقیق، سریع و بی‌خطر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور کنترل بهداشت گوشت طیور از نظر وجود پاتوژن‌هایی مثل *اشریشیاکلی* بهره‌گیری شود. این بررسی نشان می‌دهد که استفاده از روش دیسک گذاری ساده قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک بسیار ضروری است.

**واژگان کلیدی:** *اشریشیاکلی* O157، مقاومت دارویی میکروبیال، گوشت طیور، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Abbasi S, Momtaz H, Rahimi E, Momeni M, Riahi M. Detection and assessment of antimicrobial resistance properties in Escherichia coli O157 isolated from pheasant, partridge, duck and goose meat. Pejouhandeh 2012;17(4):210-14.

## مقدمه

گوشت طیور یکی از اصلی‌ترین غذاهای مردم ایران به شمار می‌رود. گوشت طیور از نظر تغذیه انسانی منبع مناسب و خوبی از لحاظ آهن، فسفر، پروتئین و ویتامین D محسوب می‌شود. این گوشت از نظر پروتئین و اسیدهای آمینه ضروری نسبت به گوشتهای دیگر کمبودی ندارد. متأسفانه با وجود کلیه ویژگیهای مطلوبی که این گوشت را برجسته می‌سازد، کنترل و بازرسی لازم در کشتارگاههای طیور انجام نمی‌شود. در نتیجه گوشت طیور می‌تواند منبع مناسبی برای تکثیر و رشد باکتری‌های متفاوت باشد. مطالعات نشان داده است باکتری *اشریشیاکلی* به راحتی می‌تواند موجب فساد گوشت طیور شود (۱ و ۲).

*نویسنده مسؤول مکاتبات: **سمیرا عباسی**؛ شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی دانشکده کشاورزی، صندوق پستی ۱۶۶؛ **پست الکترونیک:** samira5632@yahoo.com

*اشریشیاکلی* یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری است که جزو باکتری‌های روده‌ای بوده و موجب مسمومیت غذایی مهلک در انسان می‌گردد. این باکتری به چندین تیپ متفاوت تقسیم می‌شود که عبارتند از: *اشریشیاکلی* توکسین‌زای روده‌ای (ETEC)، *اشریشیاکلی* خونریزی‌دهنده روده‌ای (EHEC)، *اشریشیاکلی* پاتوژنی روده‌ای (EPEC)، *اشریشیاکلی* متهاجم روده‌ای (EIEC) و در نهایت *اشریشیاکلی* چسبنده روده‌ای (EAEC) (۳). تیپ EHEC شامل یک تحت تیپ مهم به نام *اشریشیاکلی* تولیدگر شیگاتوکسین (STEC) می‌شود که تحقیقات نشان داده است این تیپ عامل ایجاد دو بیماری مهم و خطرناک کولیت خونریزی دهنده و سندرم همولیتیک اورمیک است (۴ و ۵). در مطالعات بسیاری نیز، گروه سرمی O157 از گوشت مرغ جداسازی شده است (۱ و ۲). در تمام موارد بیماریهایی که در اثر این باکتری ایجاد می‌شوند، درمان آنتی‌بیوتیکی بهترین اقدام جهت بهبودی و کنترل بیماری است، اما متأسفانه امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار شدیدی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد شده است (۶). تحقیقات نشان می‌دهد که در برخی کشورها مصرف سالیانه آنتی‌بیوتیک در مزارع پرورش طیور به ۳۰۰۰۰۰ کیلوگرم نیز می‌رسد (۷). در نتیجه مصرف زیاد و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک، سبب بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی شدیدی در اکثر باکتری‌ها شده است.

متأسفانه علیرغم اهمیت بالای طیور در کشور ایران، تا کنون هیچ مطالعه‌ای در مورد میزان شیوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* انجام نگرفته است. در نتیجه این مطالعه به منظور بررسی میزان شیوع باکتری اشرشیاکلی، گروه سرمی O157 و همچنین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این گروه سرمی جدا شده از نمونه‌های گوشت قرقاول، کبک، اردک و غاز، از اردیبهشت تا مرداد ماه ۱۳۹۱ انجام گرفته است.

## مواد و روشها

تحقیق حاضر به روش توصیفی انجام گرفت. برای این منظور ۲۵ نمونه گوشت قرقاول، ۱۷ نمونه گوشت کبک، ۲۲ نمونه گوشت اردک و ۳۶ نمونه گوشت غاز از مراکز فروش گوشت و مواد پروتئینی استانهای گیلان، مازندران، اصفهان و فارس به طور تصادفی انتخاب گردید. قبل از نمونه‌گیری به منظور از بین بردن آلودگی سطحی، سطح گوشت با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شد. کلیه نمونه‌ها از گوشت عضله سینه طیور گرفته شد و در یخچال حاوی یخ سریعاً به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد.

در ابتدا سطح عضله سینه با آنس داغ و استریل ضد عفونی شد و از عمق عضله برای کشت در محیط MacConkey agar (Merck, Germany) استفاده شد. محیطها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های تیپیک رشد کرده که دارای خصوصیات ظاهری *اشریشیاکلی* بودند، با آنس استریل برداشته شده و دوباره در محیط آگار خوندار کشت و گرمخانه گذاری شدند و در نهایت به محیط EMB agar (Merck, Germany) انتقال یافتند. کلنی‌های سبز متالیک رشد کرده در محیط EMB agar به عنوان باکتری *اشریشیاکلی* تیپیک مورد پذیرش قرار گرفتند. کلیه *اشریشیاکلی*های جدا شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد در گلیسرول نگهداری شدند (۸). به منظور تأیید تشخیص از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید. بدین منظور از روش Sabat و همکاران (۹) استفاده شد.

### استخراج DNA

باکتری‌های رشد کرده در طول یک شب در محیط Luria-Bertani broth (Merck, Germany) گرمخانه گذاری شدند و DNA ژنومی به وسیله کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (Purification DNP$^{TM}$ KIT DNA) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

### تشخیص گروه سرمی O157

به منظور تشخیص ژن *wzx* گروه سرمی O157، توالی پرایمرهای استفاده شده (۱۰)، به صورت زیر بود:

WZX-F: 5'- CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG-3'
WZX-R: 5'- TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC-3'

برای انجام واکنش PCR، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود که شامل: ۲۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و ۲۰۰ میکرو مولار dNTP Mix بود. برای انجام واکنش PCR از دستگاه مسترسایکلرگرادینت شرکت Eppendorf استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۸ دقیقه تنظیم گردید. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند، سپس ژل‌ها توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و نوارهای DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی گردیدند.

### بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به منظور بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* O157 جدا شده از گوشت طیور مختلف، از روش دیسک گذاری در محیط مولر هینتون آگار (HiMedia Laboratories, Mumbai, India, MV1084) و با توجه به پروتکل آزمایشگاهی و بالینی، استفاده شد. پس از گرمخانه گذاری هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در محیط آزمایشگاه، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به وسیله روش طراحی شده توسط انستیتو آزمایشگاهی و بالینی استاندارد، مورد بررسی قرار گرفت (۱۱). از باکتری *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به منظور کنترل در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد.

### بررسی آماری

به منظور انجام بررسی آماری از نرم‌افزار آماری SPSS شماره ۱۶ و تست کای دو استفاده گردید. در این بررسی $P <$ ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری معرفی شد.

## یافته‌ها

در این بررسی از تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت طیور مختلف، ۲۷ نمونه (۲۷٪) از نظر وجود *اشریشیاکلی*، مثبت بودند. پس از استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت تشخیص گروه سرمی O157 در گوشت طیور، مشخص شد که از ۲۷ نمونه مثبت، ۶ نمونه (۲۲/۲٪)، آلوده به گروه سرمی O157 بوده‌اند. در این میان، میزان شیوع باکتری *اشریشیاکلی* و گروه سرمی O157 در گوشت غاز بیشترین فراوانی و در گوشت کبک کمترین فراوانی را داشت. بررسیهای آماری نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان شیوع باکتری در غاز و کبک بوده است. همچنین میزان حضور گروه سرمی O157 در کبک و غاز دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود. توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب موارد مثبت *اشریشیاکلی* و موارد مثبت گروه سرمی O157 در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

**جدول ۱- فراوانی آلودگی به *اشریشیاکلی* و گروه سرمی O157 در گوشت پرندگان مورد مطالعه**

| نمونه | تعداد | تعداد مثبت *اشریشیاکلی* | تعداد مثبت گروه سرمی O157 |
|---|---|---|---|
| قرقاول | ۲۵ | ۸ | ۲ |
| کبک | ۱۷ | ۳ | ۰ |
| اردک | ۲۲ | ۷ | ۱ |
| غاز | ۳۶ | ۹ | ۳ |
| کل | ۱۰۰ | ۲۷ | ۶ |

نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدول شماره ۲ ارائه گردیده و نشان می‌دهد که باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از گوشت طیور بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به ونکومایسین و سولفامتوکسازول داشته است و هیچگونه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر جنتامایسین و سیپروفلوکساسین مشاهده نشد. از طرفی بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را باکتری‌های جدا شده از گوشت غاز و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را باکتری‌های جدا شده از کبک داشتند. گوشت غاز نه تنها بیشتر توسط باکتری *اشریشیاکلی* آلوده بود، بلکه میزان حضور گروه سرمی O157 در آن هم بیشتر بود؛ همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از آن نیز بیشتر بود. این بررسی نشان داد که باکتری *اشریشیاکلی* O157 دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول است. در این بررسی، اختلاف آماری آشکاری بین میزان مقاومت به سولفامتوکسازول با جنتامایسین و سیپروفلوکساسین (P< ۰/۰۵) دیده شد.

**جدول ۲- الگوی مقاومت ضد میکروبی در باکتری *اشریشیاکلی*** جدا شده از گوشت پرندگان

| تعداد مثبت *اشریشیاکلی* در هر گونه | میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | سیپروفلوکساسین | سفازولین | اریترومایسین | ونکومایسین | سولفامتوکسازول | تتراسیکلین | سفالکسین | فلومکوئین | جنتامایسین |
| قرقاول (۸) | - | ۲ | ۶ | ۸ | ۷ | ۸ | - | ۳ | - |
| کبک (۳) | - | ۲ | ۱ | ۲ | ۳ | ۲ | - | ۳ | - |
| اردک (۷) | - | ۰ | ۳ | ۷ | ۷ | ۷ | - | ۰ | - |
| غاز (۹) | - | ۳ | ۵ | ۸ | ۷ | ۶ | - | ۵ | - |
| کل (۲۷) | - | ۷ | ۱۵ | ۲۵ | ۲۴ | ۲۳ | - | ۱۱ | - |

## بحث

متأسفانه بررسی ما نشان می‌دهد که در وضعیت کنونی در ایران، درمان موارد ابتلا به *اشریشیاکلی*، بوسیله آنتی‌بیوتیک‌های رایجی مانند تتراسیکلین، ونکومایسین و سولفامتوکسازول، کارآمد نیست. به عبارت دیگر به دلیل

مقاومت آنتی‌بیوتیکی کم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفازولین، سیپروفلوکساسین و سفازولین، تجویز آنها می‌تواند به مراتب موثرتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. تاکنون اهمیت *اشریشیاکلی* به عنوان باکتری فاسد کننده در گوشت طیور (۱۲)، شیر (۱۳)، محصولات گوشتی (۱۴)، گوشت گوساله (۶)، گوشت ماهی (۱۵) و تخم‌مرغ (۱۵)، گزارش شده است. مطالعه اخیر در کشور کره (۲) نشان داد که از بین تمام گروههای سرمی باکتری *اشریشیا کلی* جداسازی شده از گوشت طیور، گروه سرمی O157، بیشترین فراوانی را داشته است. در مطالعه‌ای دیگر در جمهوری چک (۱۶)، ۲/۲٪ *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از طیور، O157 بوده‌اند که از نتایج بررسی ما کمتر بوده است.

مطالعه‌ای در تایلند (۸) نشان داد که کلیه *اشریشیاکلی*‌های جداسازی شده از گوشت طیور دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حد ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۷۳/۳٪ و ۲۶/۷٪ به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین، سفالوتین و سولفونامید+تری‌متوپریم، بوده‌اند. مطالعه‌ای دیگر نشان داد که ۸۲/۴٪ از *اشریشیاکلی*‌های جدا سازی شده از گوشت طیور دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین بوده‌اند (۱۷). مطالعه‌ای دیگر نشان می‌دهد *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از گوشت طیور دارای ۸۲٪ مقاومت به سیپروفلوکساسین بوده‌اند (۱۸).

این بررسی و مطالعات پیشین نشان می‌دهند که امروزه تجویز تتراسایکلین در مزارع پرورش طیور نه تنها کارآمد نیست بلکه سبب بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری در باکتری *اشریشیاکلی* می‌شود.

## نتیجه‌گیری

بررسی ما نشان داد که روش PCR می‌تواند به عنوان یک روش دقیق، سریع و بی‌خطر برای تشخیص باکتری *اشریشیاکلی* O157 و همچنین کنترل نمونه‌های گوشت طیور از نظر وجود این باکتری مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بدلیل بروز بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول، دامپزشکان باید در تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها توجه و دقت بیشتری کرده و از تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک جداً خودداری کنند. رعایت اصول بهداشت خصوصاً در کشتارگاههای طیور، کنترل و بازرسی لاشه‌های طیور و حذف لاشه‌های تب‌دار و نامرغوب، کنترل و آزمایش مکرر کارکنان کشتارگاههای طیور از نظر وجود *اشریشیاکلی* O157 و نهایتاً رعایت اصول بهداشتی در فروشگاههای عرضه گوشت طیور می‌تواند به طور جدی بار آلودگی به این باکتری را کاهش دهند.

## تشکر و قدردانی

کلیه نویسندگان این مقاله از کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین جناب آقای دکتر فرهاد صفرپور دهکردی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## *REFERENCES*

1. Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Rhee MS. Prevalence and classification of pathogenic Escherichia coli isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. Int J Food Microbiol 2009;134(3):196-200.
2. Henry YM, Natrajan N, Lauer WF. Detex for detection of Escherichia coli O157 in raw ground beef and raw ground poultry. J AOAC Int 2001;84(3):752-60.
3. Holko I, Bisova T, Holkova Z, Kmet V. Virulence markers of Escherichia coli strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. Food Control 2006;17(5):393–6.
4. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC). Vet Microbiol 2010;140(3-4):360-70.
5. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic Escherichia coli in human medicine. Int J Med Microbiol 2005;295(6-7):405-18.
6. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of Escherichia coli O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. Appl Environ Microbiol 2001;67(4):1619-27.
7. van den Bogaard A. Veterinary use of antibiotics in the Netherlands. Facts and numbers. Tijdschr Diergeneeskd 2000;125(17):527-30. (full text in Dutch)
8. Mooljuntee S, Chansiripornchai P, Chansiripornchai N. Prevalence of the cellular and molecular antimicrobial resistance against E. coli isolated from Thai broilers. Thai J Vet Med 2010;40(3):311-5.
9. Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM. Selective and sensitive method for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA genes in soil. Appl Environ Microbiol 2000;66(2):844-9.

10. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing Escherichia coli. Res Microbiol 2007;158(7):591-9.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard-ninth Edition (M2-A9). Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

12. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry. Appl Environ Microbiol 1987;53(10):2394-6.

13. Bürk C, Braumiller IG, Becker H, Märtlbauer E. Nuclease fluorescence assay for the detection of verotoxin genes in raw milk. Lett Appl Microbiol 2002;35(2):153-6.

14. Chapman PA, Ellin M, Ashton R. A comparison of immunomagnetic separation and culture, Reveal and VIP for the detection of E. coli O157 in enrichment cultures of naturally-contaminated raw beef, lamb and mixed meat products. Lett Appl Microbiol 2001;32(3):171-5.

15. Chiueh LC, Shiang WH, Shih DYC. Characterization of Escherichia coli serotype O157 strains isolated in Taiwan by PCR and Multilocus enzyme analysis. J Food Drug Analysis 2001;9(1):12-9.

16. Lukásová J, Abraham B, Cupáková S. Occurrence of Escherichia coli O157 in raw material and food in Czech Republic. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2004;51(2):77-81.

17. Miles TD, McLaughlin W, Brown PD. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates from broiler chickens and humans. BMC Vet Res 2006;2:PMC1395310.

18- Akond MA, Alam S, Hassan SMR, Shirin M. Antibiotic Resistance of Escherichia Coli Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh. Am J Environ Sci 2009;5(1):47-52.