الأشريشيا القولونية المعوية النزفية O157 في الجبن الطري المحلي

فادية عبد المحسن الخياط

فرع العلوم الطبية الأساسية – كلية طب الأسنان – جامعة بغداد– بغداد – العراق

الخلاصة

تعد جراثيم الأشريشيا القولونية ضمن النبت الطبيعية للقناة المعوية في الإنسان والحيوان، إلا أن بعض أنماطها المصلية تعتبر مرضية مثل الأشريشيا القولونية المعوية النزفية O157 والمسؤولة عن أحداث حالات مرضية تتراوح بين الإصابة المتوسطة إلى الإصابة المميتة وهي من الجراثيم التي تنتقل عن طريق الغذاء وتهدد الصحة العامة ولهذا فأن إجراء هذه الدراسة كان لمعرفة مدى أنتشار جراثيم الأشريشيا القولونية وخاصة النمط المصلي O157 في نماذج الجبن الطري المحلي حيث تم التحري والكشف عن تواجدها وحساب أعداد مستعمراتها / غم من الجبن باستخدام الأوساط الزرعية الخاصة للعزل الجرثومي (E.M.B. , CT-SMAC) واعتماد الاختبارات المصلية (Latex O157) الاختبارات الكيموحياتية التأكيدية.

تم جمع 50 نموذجاً من الجبن الطري المحلي من أسواق مدينة بغداد وللفترة من شهر نيسان ولغاية نهاية شهر آيار لعام 2007 وقد أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في نسبة العزل الجرثومي الكلية حيث تم عزل جراثيم الأشريشيا القولونية من 47 نموذج (94 %) بينما عزل النمط المصلي O157 من 40 نموذج (80 %) هذا كما أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في معدل العد الجرثومي للمستعمرات/ غم حيث سجلت أعداد المستعمرات لجراثيم الأشريشيا القولونية وجراثيم النمط المصلي O157 ($4.7x10^6$, $2.4x10^5$وحدات تكوين المستعمرات/غم) على التوالي وهذا يشير إلى الأهمية الصحية لمنتجات الألبان في أحداث الإصابة المرضية للإنسان.

Enterohaemorrhagic *E.coli* O157 in locally produced soft cheese

Fadia Abd AL-Muhsin Al-Khyat
Dept. of Basic Medical Sciences-Dentist College
University of Baghdad – Baghdad-Iraq

Summary

Escherichia coli is consedered to be one of the normal flora of the human and animal intestinal tract, but there are some serotypes which are diagnosed as a pathogenic such as Enteroheamorrhagic *E.coli* O157 that cause disease ranging in severity from mild to lethal and it's significant as a major food-borne pathogen and as a public health problem. The purpose of this study was to provide the prevalence of *E.coli* and *E.coli* O157 in locally produced soft cheeses, detection and enumeration were carried out using specific differential media (CT.SMAC,E.M.B.), serological test (Latex O157) and biochemical test.

A total of 50 samples of locally produced soft cheeses were collected from supermarket in Baghdad City during the period from April till the end of May 2007. The result revealed that there was a significant ($P<0.05$) difference in the isolation percentage, *E.coli* was isolated from 47 samples (94%) while *E.coli* O157 isolated from 40 samples (80%). The data also revealed that there was a significant ($P<0.05$) difference in the mean of microbial counts *E.coli* and *E.coli* O157 recorded ($4.7x10^6$, $2.4x10^5$ CFU/g) respectively. These result suggest that the serotype O157 is prevalent within dairy product and processing environment.

المقدمة

ظهرت مشكلة تهدد الصحة العامة في مختلف أنحاء العالم حول تواجد جراثيم تعرف بالأشريشيا القولونية المعوية النزفية O175 (EHEC*Enteroheamorrhagic E.coli*) في الأغذية كونها مسؤولة عن أحداث حالات التسمم الغذائي الجرثومي للإنسان (1) متمثلاً بمغص معوي شديد مع أسهال مائي يتطور إلى أسهال دموي مشكلاً حالة التهاب القولون النزفي

(Haemorrhagic colitis HC) إضافة للمضاعفات الخطيرة مثل متلازمة حال الدم اليوريمي (Heamolytic Uremic Syndrom) (2) خاصة في الأطفال دون سن الخامسة من العمر وكبار السن والأشخاص ذوي مستوى المناعة الضعيف (3)، ويمتاز هذا النمط المصلي عن بقية الأنماط المصلية بكونه ينتج ذيفانات قوية جدا متمثلة بذيفان الشيكا واحد (Shiga 1) أو الشيكا اثنان (Shiga 2) أو كليهما (4).

تعد النواقل الغذائية وخاصة ذات المنشأ البقري (اللحم ، الحليب) الوسيلة الرئيسية في احداث الإصابة المرضية للإنسان لأن الأبقار تعتبر المستودع الأساس لهذه الجراثيم, (5) وأشارت البحوث العلمية إلى أن الجرعة اللازمة لإحداث الإصابة تقدر بـ (10-100وحدات تكوين المستعمرات)(6) وأوضحت الدراسات الميدانية أن استهلاك الحليب الخام ومنتجاته المصنعة منه مباشرة (الجبن الطري ، الزبد ، القشطة) لها دور في أحداث حالات إصابة فردية وثورات مرضية في عدد من دول العالم (7).

ومن أجل تسليط الضوء على دور تلوث منتجات الألبان وخاصة الجبن الطري المحلي بجراثيم الـ*E.coli* O157 وعلاقتها بصحة المستهلك ولعدم وجود دراسات في قطرنا تناولت هذا الموضوع، تقرر إجراء هذه الدراسة باستخدام التقنيات الحديثة والمتبعة عالمياً في عزل وتشخيص هذه الجراثيم من الأجبان الطرية المصنعة محلياً والمعروضة في أسواق مدينة بغداد.

المواد وطرائق العمل

تم جمع 50 نموذجا من الجبن الطري المحلي من الأسواق المحلية لمدينة بغداد خلال الفترة من شهر نيسان ولغاية نهاية شهر آيار لعام 2007 وبواقع 250 غم لكل نموذج ووضعت في أكياس من البولي أثلين المعقمة وحفظت في حاويات مبردة لحين نقلها إلى المختبر.

وزّن (10) غم من كل نموذج ووضع في كيس معقم ثم أضيف إليه 90 مل من محلول سترات الصوديوم بتركيز 2 % (2% Sodium citrate) لتحويل نموذج الجبن إلى مستحلب وتمت مجانسته باستخدام جهاز الهاضم (Stomacher) ولمدة 5 دقائق (8).

العزل الجرثومي

تم التحري عن وجود جراثيم الأشريشيا القولونية وجراثيم النمط المصلي O157 *E.coli* في النماذج بسحب 1 مل من محلول سترات الصوديوم والمتضمنة نموذج الجبن باعتباره التخفيف العشري الأول (1 : 10) بواسطة محقنة (Syringe) معقمة وأضيف إلى 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم (Saline) (8) للحصول على التخفيف العشري الثاني (1 :100) وباستخدام المايكروبايبيت حضرت خمسة تخافيف عشرية أخرى، ثم تم نشر (0.1) مل من كل تخفيف باستخدام الناشر الزجاجي (Spreader) على وسط *Eosine Methylen Blue agar (E.M.B.)* و 0.1 مل أيضا على وسطMacConkey agar المحضران حسب تعليمات الشركة المنتجة (HIMEDIA) وحضنت الأطباق بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 37م^{o} لمدة 24 ساعة، إذ تظهر مستعمرات جراثيم الآشريشيا القولونية أن وجدت بشكل مستعمرات صغيرة (1−2) ملم، جافة، دائرية، ملساء وذات لون أخضر فسفوري على الوسط الأول ولون وردي على الوسط الثاني حيث أجريت على هذه المستعمرات الاختبارات الكيموحياتية التفريقية (IMVIC) واختبار الحركة (Motality test) (9)

كما تم نشر 0.1 مل من كل التخافيف المحضرة على الوسط الزرعي الخاص بعزل جراثيم الاشريشيا القولونية O157

(CT-SMAC Cefixim Tellurite – Sorbitol MacConkey Agar) والمحضر حسب تعليمات الشركة المنتجة (OXOID) وحضنت الأطباق بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 37م^{o} لمدة 24 ساعة،(10) حيث يتم التحري عن نمو الجراثيم غير المخمرة لسكر السوربيتول وبضمنها النمط المصلي O157 أن وجدت بشكل مستعمرات ملساء عديمة اللون إلى شبه رمادية مع مركز ضبابي(Neutral gray with smokycenter) وبقطر (1−2) ملم ويتم إجراء الاختبارات المصلية والكيموحياتية التأكيدية لتشخيص هذه الجراثيم.

الاختبارات التشخيصية

1. الصفات المظهرية: شخصت بصورة مبدئية المستعمرات الجرثومية المعزولة على الأوساط الزرعية اعتمادا على صفاتها المظهرية والتي تضمنت حجم المستعمرة ولونها وشكلها وحافاتها.(11)
2. الاختبارات الكيموحياتية (Biochemical test): تم إجراء الاختبارات الكيموحياتية التأكيدية للعزلات الجرثومية والتي ضمت اختبارات الـ IMVIC واختبار الحركة واختبار سيانيد البوتاسيوم (KCN test) الخاص بجراثيم *E.coli* O157 وبحسب الطرائق الموضوعة من قبل الباحث (12).
3. الاختبارات المصلية (Serological test): أجري الفحص المصلي للعزلات قيد الدراسة بطريقة التلازن على الشريحة الزجاجية (Slid agglutination test) باستعمال المصول النوعية للمستضد الجسمي O157 وبحسب تعليمات الشركة المنتجة(Oxoid) والمتضمنة أربع كواشف

(Control positive , Control negative, O157 control latex, O157 test latex)

حيث يتم أخراج عدة الفحص (Kit) خارج الثلاجة كي تصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة الغرفة قبل إجراء الاختبار وبعد أن يتم تحضير عالق بكتيري بنقل مستعمرة مفردة من وسط CT-SMAC إلى شريحة زجاجية موضوع عليها بضع قطرات من المحلول الملحي الفسلجي ومزجها جيدا، تضاف قطرة واحدة من كاشف O157 test latex وتمزج جيدا وتعاد نفس الخطوات على شريحة زجاجية أخرى ولكن بإضافة قطرة من كاشف O157 control latex ، تحرك الشريحتان حركة دائرية وبهدوء وبكلا الاتجاهين مع ملاحظة حدوث التلازن في أقل من دقيقة في الشريحة الأولى وتشير النتيجة الموجبة إلى أمتلاك العزلة الجرثومية للمستضد الجسمي O157 بشرط عدم ظهورالتلازن مع كاشف السيطرة O157 control latex.

النتائج

1. عزل جراثيم الاشريشيا القولونية والاشريشيا القولونية المعوية النزفية O157

شملت الدراسة التحري عن تواجد جراثيم الاشريشيا القولونية و الاشريشيا القولونية المعوية النزفيةO157 في نماذج للجبن الطري المحلي حيث تم جمع 50 نموذجا من الاسواق المحلية لمدينة بغداد خلال الفتره من شهر نيسان ولغاية نهاية شهر آيار لعام 2007

يبين جدول (جدول 1) عدد النماذج التي تم عزل جراثيم الاشريشيا القولونيه منها من مجموع النماذج الكلي حيث تم فحص(50) نموذج اظهر 47 منها نتيجه موجبه وبنسبة عزل بلغت 94% بينما اظهرت النتائج انخفاضا في نسبة عزل جراثيم الاشريشيا القولونية المعوية النزفية O157حيث سجل 40 نموذج نتيجة موجبة ومن مجموع50 نموذج وبنسبة عزل بلغت80% .

جدول (1): النسبة المئوية لعزل جراثيم الأشريشيا القولونية *E.coli* والاشريشيا القولونية المعوية النزفية(*E.coli* O157) في نماذج الجبن الطري المحلي

الجراثيم المعزولة	عدد النماذج الموجبة/ الكلي	نسبة العزل الكلية %
أشريشيا القولون *E.coli*	50/47	94
اشريشيا القولون المعوية النزفية *E.coli* O157	50/40	80

العد الجرثومي لمستعمرات الاشريشيا القولونية والاشريشيا القولونية المعويةالنزفيةO157 :

يبين الجدول (جدول 2)ان اعداد المستعمرات الجرثومية للاشريشيا القولونية في النماذج المدروسة قد بلغ ($3x10^5$ وحدات تكوين المستعمرات/غم) كحد أدنى و($6.3x10^7$ وحدات تكوين المستعمرات/غم) كحد أعلى وبلغ المعدل الكلي الجرثومي للمستعمرات /غم ($4.7x10^6$ وحدات تكوين المستعمرات/غم) بينما نلاحظ انخفاضا في اعداد المستعمرات الجرثومية للاشريشيا القولونية المعوية النزفية O157حيث سجل الحد الادنى($1x10^5$وحدات تكوين المستعمرات/غم) و الحد الاعلى($2.2x10^7$وحدات تكوين المستعمرات/غم) وبمعدل كلي للمستعمرات الجرثومية ($2.4x10^5$وحدات تكوين المستعمرات/غم)

جدول (2): أعداد مستعمرات الأشريشيا القولونية *E.coli* والاشريشيا القولونية المعوية النزفية (*E.coli* O157) في نماذج الجبن الطري المحلي

نوع الجرثومة	عدد النماذج الموجبة / الكلي	وحدة تكوين المستعمرة / غم من الجبن CFU/g		
		الحد الأدنى	الحد الأعلى	المعدل
أشريشيا القولون *E.coli*	50/47	$3x10^5$	$6.3x10^7$	$4.7x10^6$
اشريشيا القولون المعوية النزفية *E.coli* O157	50/40	$1x10^5$	$2.2x10^7$	$2.4x10^5$

المناقشة

يعد الحليب ومنتجاته من المواد الغذائية الضرورية للإنسان لما يتمتع به من سهولة الهضم والقيمة الغذائية العالية متمثلة بأحتوائه على عناصر غذائية ضرورية للنمو والمحتوى العالي من الرطوبة والحموضة المتعادلة لذلك يعتبر وسطاً مثالياً لنمو العديد من الجراثيم بشكل عام وجراثيم الاشريشيا القولونية وخاصة النمط المصلي O157 بشكل خاص (14) إذ تعتبر الأبقار المستودع الرئيسي لهذه الجراثيم بحسب ما أشارت إليه الدراسات الميدانية [15].

أظهرت النتائج من خلال فحص 50نموذجا للجبن الطري المحلي وجود فرق معنوي في نسبة العزل الكلية للجراثيم ($P<0.05$) حيث تم عزل جراثيم الـ*E.coli* من 47نموذجا أي بنسبة عزل بلغت 94% (جدول 1) وبالمقارنة من نتائج الدراسات الأخرى التي أشارت أحداها إلى أن نسبة العزل الكلية للـ *E.coli* من مجموع 153نموذج جبن طري قد بلغت 23% (16) بينما أوضحت دراسة أخرى أجريت على (19) نموذجا للجبن الطري أنه تم عزل الجراثيم (*E.coli*) من (11) نموذج أي بنسبة 58% (17) كما أوضح (18)أن نسبة العزل قد سجلت 41 % من نماذج الأجبان المباعة في الأسواق ، ومن خلال نتائج هذه الدراسة نستنتج أن النماذج المدروسة والمتوفرة في أسواقنا المحلية خلال فترة البحث تعد ذات مستوى تلوث عالي بجراثيم الـ*E.coli* وبالتالي يمكن أن نستدل على مدى الخطورة المترتبة عن أستهلاك هذه الأجبان من قبل المواطن العراقي حيث أن الكشف عن تواجد هذه الجراثيم المعوية (Enteric) في الغذاء دليل على حصول تلوث بالفضلات وإمكانية تواجد جراثيم مرضية معوية مثل السالمونيلا والشيكلا.

أن تلوث الحليب الخام المستخدم في تصنيع الجبن الطري وأرده أثناء عملية الحلب وجمع الحليب أو أثناء عمليات التصنيع والخزن والنقل غير المطابقة للشروط الصحية، كما يلعب الحلابون والعاملون على تربية الأبقار المنتجة للحليب سواء المصابين أو الحاملين لهذه الجراثيم دوراً مهما في تلوث الحليب أو الجبن المصنع منه (19)

ومن خلال نفس الجدول نلاحظ أنه تم تسجيل نتيجة موجبة بجراثيم *E.coli* O157 في 40 نموذجا للجبن الطري المحلي ومن أصل 50 نموذج أي بنسبة عزل كلية بلغت 80% وبحسب ما ورد في نتائج دراسات أخرى ضمت هذا الجانب البحثي نجد أن نسبة التلوث كانت عالية جدا حيث توصل الباحث (20) أنه ومن 153 نموذجا للجبن الطري المصنوع من الحليب الخام قد سجلت 5 نماذج فقط تواجد لـ *E.coli* O157 (3.3%) بينما أوضحت دراسة أخرى أجريت لفحص 26 نموذج من الجبن الطري أثر حدوث ثورة مرضية في مدينة Wisconsin الأمريكية أنه تم عزل جراثيم *E.coli* O157 من 9 نماذج (34.6%)(21) بينما أشار (17) أنه لم يتم عزل النمط المصلي *E.coli* O157 من مجموع 69 نموذجا أخضعت للفحص دون أن يوضحا أصل الحليب المستخدم في تصنيع نماذج الجبن المدروسة والذي قد يكون مصنوع من الحليب المبستر. وتفسير النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة سوء المستوى الصحي لإنتاج الحليب (عدم تطبيق الشروط الصحية لعملية الحلب مثل تنظيف وتطهير السطح الخارجي للضرع والحلمة والتأكد من نظافة أدوات وأواني جمع الحليب ونظافة أيدي الحلابين) المستعمل في تصنيع الجبن الطري حيث أكد كل من الباحث (22) و (23) في دراستين منفصلتين أن الطريقة الأساسية لتلوث الجبن الطري ناتجة عن تلوث الحليب الخام بفضلات الحيوانات المصابة أو السليمة مظهريا (الحاملة للجراثيم) أثناء كل من عملية الحلب وجمع الحليب أو خلال عمليات التصنيع وسوء ظروف خزن وعرض هذه الأجبان في أماكن البيع. وبالرجوع إلى نتائج الدراسات التي أجريت من قبل الـ (U.S Department of Agriculture USDA) على قطعان الأبقار المعدة لإنتاج الحليب والتي اشارت إلى تواجد جراثيم الـ *E.coli* O157 في 50% منها بينما أشارت دراسات أخرى أن 22 % – 50% من قطعان إنتاج الحليب مصابة بهذه الجراثيم (25). وأوضح الباحث Valcour وجماعته إلى أن تواجد هذه الجراثيم قد بلغ 38.5% (26).

أما في مجال احتساب أعداد المستعمرات الجرثومية /غم من الجبن كمؤشر معتمد في التقييم الصحي تم التوصل ومن خلال النتائج الموضحة في (جدول 2) إلى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في المعدلات الكلية العامة بين جراثيم الـ *E.coli* وجراثيم *E.coli* O157 حيث سجلت جراثيم الأشريشيا القولونية $3x10^5$ وحدات تكوين المستعمرات/غم كحد أدنى و $6.3x10^7$ وحدات تكوين المستعمرات/غم كحد أعلى بينما بلغ المعدل الكلي الجرثومي للمستعمرات /غم $4.7x10^6$ وحدات تكوين المستعمرات/غم وجاءت هذه النتيجة مقاربة لنتيجة دراسة أشارت إلى أن المعدل الكلي الجرثومي قد وصل إلى 10^5 (16) بينما أوضحت دراسة أخرى أن

منتجات الألبان يجب أن تتراوح أعداد مستعمرات جراثيم القولون (Coliform) فيها أقل من 50 مستعمرة / غم وبالنسبة لجراثيم *E.coli* يجب أن تكون صفر. (27)

وبالرجوع لنفس الجدول نلاحظ أن الحد الأدنى لأعداد مستعمرات الـ*E.coli* O157 في النماذج المدروسة قد سجل $1x10^5$وحدات تكوين المستعمرات/غم بينما بلغ الحد الأعلى $2.2x10^7$وحدات تكوين المستعمرات/غم وبمعدل كلي للمستعمرات الجرثومية $2.4x10^5$وحدات تكوين المستعمرات/غم وتعد هذه النتائج ذات أهمية صحية كبيرة عند مقارنتها مع نتائج دراسات أخرى والتي اشارت أحداها إلى أن معدل العد الجرثومي قد وصل إلى 10^2وحدات تكوين المستعمرات/غم (20) وفي دراسة أخرى أوضحت أن جبن الموزاريلا(Mozzarella) المصنع من الحليب غير المبستر قد تصل أعداد المستعمرات الجرثومية للـ*E.coli* O157 إلى 10^5 في حالة عدم تطبيق الشروط الأساسية أثناء عملية التصنيع مثل استخدام الحرارة العالية(28)

أن أرتفاع مستويات العد الجرثومي للمستعمرات /غم من الجبن في النماذج المدروسة يعزى إلى المصدر الأصلي لتلوث الحليب الخام بالإضافة إلى حصول زيادة في التلوث نتيجة لسوء الطرق المتبعة في أعداد الأجبان الطرية من جهة ومن جهة أخرى يعزى إلى أرتفاع درجة حرارة الجو خلال فترة البحث (شهر نيسان وآيار) حيث أكدت الدراسات الميدانية إلى أن أعداد الجراثيم في الأغذية تزداد في موسم الصيف بصورة عامة والنمط المصلي *E.coli* O157 بصورة خاصة لزيادة طرحه مع فضلات الأبقار وقدرته على التغلب على نمو الجراثيم الطبيعية المتواجدة في الأغذية وأخيرا السرعة في النمو والتكاثر. (29,30,31)

وعند إجراء مقارنة لنسبة العزل الجرثومي ومعدل أعداد المستعمرات الجرثومية /غم من الجبن بين جراثيم الأشريشيا القولونية وجراثيم النمط المصلي O157 في النماذج المدروسة أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود علاقة طردية r=0.43.

وبصورة عامة يمكن أن نستنتج من خلال نتائج هذه الدراسة خطورة منتجات الألبان وخاصة الجبن الطري المصنع من الحليب الخام على الصحة العامة لأنه يشكل مصدر رئيسي ومهم في إصابة الإنسان بجراثيم الأشريشيا القولونية المعوية النزفية O157 عند استهلاكه مباشرة ودون معاملة الحليب المصنع منه بالحرارة.

المصادر

1.FAD (Food and Drug Administration) (2002). *E.coli* O157:H7. Center for food safety and Applied nutrition food borne. Pathogenic microorganism and natural toxins handbook. Chap.15 p.36-43.

2.Mead, P.S. and Griffin, P.M. (1998). *E.coli* O157:H7. Lancet. 352:1207-1212.

3.FDA/CFSAN (Food and Drug Administration/ Center for food safety and Applied nutrition) (2005). Bad Bug Book, Food borne Pathogenic microorganisms and natural toxins. Handbook, *E.coli* O157:H7.

4.Feng, P. and Monday, S.R. (2000). Multiplex for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *E.coli* serotype. Mol. Probes. 14:333-337.

5.Widiasih, D.A.; Idon, R.; Omoe, K.and Shinagawa,K. (2004). Duration and magnitude of faecal shedding of shiga toxin –producing *E.coli* from naturally infected cattle. Epi. 123:67-75.

6.Griffin, P.M. (1995). *E.coli* O157:H7. and other enterohemorrhagic *E.coli*. In infections of the Gastrointestinal tract. P. 739-761.

7.Lahti, E.; Eklund, M.; Ruutu, P. and Hankanen, T. (2002). Use of phenotyping genotyping to verity transmission of *E.coli* O157:H7. from dairy farms. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis. 21: 189-195.

8.Marth, E.H. (1978). Standard methods for examination of dairy products. 14th edition, Am. Public health Association Washington, D.C.

9. Jawetz, E.; Melnick, J.L. and Adelbery, E.A. (2001). Medical microbiology 22nd Ed. Lang Medical books MacGraw-Hill medical Publishing division.

10.Noveir, M.R. and Halkman, A.K. (2000). A study on selective broths and a gars media for the isolation of *E.coli* O157:H7. serotype. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24: 459-464.

11.Scoters.S.; Aldridg, M. and Capps, K. (2000). Validation of a method for the detection of *E.coli* O157:H7. in foods. Food Control 11:85-95.

12.Collee, J. G. ; Fraser, A.G. ; Marimany, B.P. and simmons, A. (1996). Culture tests and media, In Mackie and McCartney practical medical microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone.

13.Crichton, P.B. (1996). Enterobacteriacea: *E.coli* O157:H7. In Mackie and McCartney practical medical microbiology. 14th ed. Pp. 361. USA.

14.Bonfoh, B.A.; Wasem, A.N.; Traore, A; Fane, H.; Spillmann, C.F. and Simbe, I.O. (2003). Microbiological quality of cows milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamko (Mali) food control, 14: 495-500.

15.Meyer-Broseta, S.; Bastion,S.N.;Arne, P.D. and Sana, M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *E.coli* serotype O157:H7. Int. J. Hyg. Environ. Health. 203:347-361.

16. Lee, J.H.; Lee, S.J.; Kalantari, A. and Park, Y.W. (2001). Comparism of microbial population of unfrozen and frozen control cheese with those 3 month frozen-stored ones. Fore valley state University. GA.
17. Ansay, S.E. and Kaspar, C.W. (1997). Survey of retial cheese, dairy processing environments and raw milk for *E.coli* and *E.coli* O157:H7. Food Research Institute, Department of microbiology and toxicology, Letters in Applied Microbiology. 23: 131-134.
18. Soomro, A.H.; Khasheli,M.; Arain, M.A. and Bhutto, B. (2003). Isolation of *E.coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market condition at tandojam pak. J. Nutr. 1: 151-152.
19. Chiueh, L.; Liu, F. and Shih, D.Y. (2002). Prevalence of shiga toxin – producing *E.coli* in food and raw milk of domestic cattle and sheep. J.Food. Drug Anal. 10: 39-46.
20. Jacques, V.;Mohamed,E.; Alexandre, L.; Bernard,L. and Jacques, D. (1999). Detection of shiga-like toxin producing *E.coli* from raw milk cheeses produced in wallonia. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 3(3): 159-164.
21. Center for disease and prevention (2000). Outbreak of *E.coli* O157:H7 associated with eating fresh cheese curds-wisconsin. Morbid. Mortal. Wkly Rep. 49: 911-913.
22. Tauxe, R.; Kruse, H.; Hedberg, C.; Potter, M. and Wachsmuth, K. (1997). Microbiological hazard and emerging issues associated with produce A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. J. Food Prot. 60: 1400-1408.
23. Harrigen, W. F. (1998). Laboratory Methods in food microbiology. Academic press, San Diego.
24. USDA-APHIS-VS. (1996). An updates *E.coli* O157:H7 in human and cattle USDA Animal and plant health inspection service. Vet. Epidemol and Animal health. Co.
25. Murinda, S.E.; Nguyen, L.Y.; Irey, S.J. and Oliver, S.P. (2002). Prevalence and molecular characterization of *E.coli* O157:H7 in Bulk tank milk and samples from cull cows: A 12 month survey of dairy farms in East Tennessee. J. Food Prot. 65: 752-759.
26. Valcour, J.E. *etal* (2002). Association between indicators of live stock farming intensity and incidence of human shiga-toxin-producing *E.coli* infection Emerg-Infect.Dis. 8: 252-257.
27. Department of Health Directorate: Food Control. (1997). Gudelines for Environmental health officers on the interpretaction of microbiological analysis data of food r. 1555 of 21 November.
28. Spano, G.; Goffredo, E.; Beneduce, D. and Massa, S. (2003). Fate of *E.coli* O157:H7 during the manifacture of Mozzarella cheese. Applied Microbiology. 36: 73-76.

29. Anon. (2001). Animal and environment: understanding the hazard in the task force on *E.coli* O157:H7 find report. Chapter 5: P. 50-56.
30. Blanco, J.; Blanco, M. and Blanco, J. E. (2001). Epidemiology of *E.coli* (VTEC) Ruminants. Food Science and Nutrition press, P. 120.
31. CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2005). Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public setting National Association of state, public health Vet. Inc. MMWR. 54.