تعیین هویت مولکولی پاتوتیپ‌های *EAEC* و *EPEC* باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان با روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و روش E.test

ناهید سلیمانی‌فرد[۱]، کیومرث امینی[*۲]

چکیده

E.coli گیای نرمال مجاری گوارشی بیشتر جانوران و نیز انسان است. اغلب سویه‌های *E.coli* بیماری‌زا نیستند، اما برخی سویه‌های پاتوژنیک *E.coli* می‌توانند باعث بروز انواعی از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شوند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان فراوانی ژن‌های پاتوتیپ‌های *EAEC*، *EPEC* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های دامی می‌باشد. پس از جمع‌آوری ۵۰ نمونه، آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی انجام و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI وE-test با آنتی بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید. جهت شناسایی پاتوتیپ‌ها از آزمون Multiplex PCR استفاده شد. اکثر *E.coli* جدا شده نسبت به اریترومایسین (۱۰۰٪) و آمپی سیلین (۹۳٪) مقاوم و نسبت به آمیکاسین (۱۰۰٪) و نیتروفورانتوئین (۹۶٪) حساس بودند، همچنین بسیاری از سویه‌ها به چند دارو مقاومت داشتند. نتایج Multiplex PCR بر روی ۵۰ نمونه شیر دام، ٤ نمونه (۸٪) دارای ژن *bfPA* (پاتوتیپ *EPEC*) بودند. علت اختلاف نتایج بدست آمده از روش M-PCR در این مطالعه با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا ممکن است به علت منبع نمونه باشد، در این مطالعه سویه‌های جدا شده از نمونه‌های شیر ورم-پستان مورد بررسی قرار گرفته است، در حالیکه در مطالعات سایر محققین بیشتر موارد بر روی نمونه‌های مبتلا به اسهال خونی بررسی انجام شده است. البته تفاوت در نمونه‌های جداشده از شیر می‌تواند به علت تفاوت در مناطق جغرافیایی باشد.

واژگان کلیدی *: اشریشیاکلی، آنتی‌بیوگرام، E-test، EPEC، Multiplex PCR*

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۱۸

مقدمه

ورم پستان بیماری است که توسط عوامل مختلف بیماری‌زا ایجاد می‌گردد. اگرچه عوامل بیماری‌زا موجود در شیر با پاستوریزاسیون از بین می‌روند، اما برخی عوامل با تولید توکسین در شیر خطر بالقوه برای سلامتی جامعه می‌باشند. ورم پستان از نظر اقتصادی بزرگترین مشکل در صنعت دامپروری به جهت ایجاد خسارت‌های مادی از قبیل، کاهش تولید، تلفات دام، عدم مصرف شیر به علت مصرف مداوم آنتی بیوتیک و هزینه‌های درمان برآورد شده است(۱۹ و ٦). جنس اشریشیا شامل هفت گونه است، مهمترین گونه آن *اشریشیاکلی* می‌باشد. این گونه دارای فاکتورهای حدت مهمی است که توسط ژن‌های مختلفی رمزدهی می‌شوند، از جمله آدزین‌های فیمبریه‌ای، انتروتوکسین‌ها، سایتوتوکسین‌ها، کپسول و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد(۱۵). از عوامل مهم ایجاد ورم پستان در دام، باکتری *E.coli* بوده و تحت عنوان ورم پستان‌های محیطی شناخته می‌شود(۷). از خصوصیات اعضاء پاتوتیپ *EPEC* باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد ضایعات آسیب‌شناسی در اپی تلیوم روده می‌باشد که به یاخته‌های روده کوچک میزبان متصل شده و قادر به تولید سموم شیگا نمی‌باشند. از خصوصیات پاتوتیپ *EAEC* می‌توان به عدم توانایی آنها در تولید و ترشح سموم *LT* و *ST* و همچنین اتصال آنها به سلول‌های هلا بصورت تهاجمی اشاره نمود. مکانیسم ایجاد اسهال در پاتوتیپ *EAEC* خیلی پیچیده می‌باشد به این ترتیب که ترکیبات مؤثر سیستم ترشحی نوع III در محو ریزپرزها و برهم زدن تنظیم تبادلات یونی که باعث کاهش جذب آب می‌باشد دخالت دارند(۱۷). یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت باکتری‌های بیماریزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

۱ـ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه میکروبیولوژی، ساوه، ایران.

*۲ـ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

(dr_kumarss_amini@yahoo.com)

می‌باشد، که در آن چندین فاکتور از جمله نوع میکروارگانیسم عفونت‌زا، محل میکروب در داخل بدن، توزیع میکروارگانیسم در بدن، غلظت دارو در محل عفونت و وضعیت ایمنی بیمار دخالت داشته و بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند(۲۰ و ۱۰). مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی-بیوتیک‌ها بوده و منشاء کروموزومی دارد. در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت‌های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و تبدیل سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود (۳). این مطالعه با هدف تعیین سویه‌های مقاوم باکتری *E.coli* و شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت در بین نمونه‌های جداسازی شده از ورم پستان انجام گردید.

مواد وروش کار

تعداد ۵۰ نمونه از شیر دام‌های مبتلا به ورم پستان که عامل اصلی ایجاد کننده عفونت، باکتری *E.coli* بود جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. این نمونه‌ها را بر روی محیط‌های بلاد آگار، مک کانکی آگار، ائوزین متیلن بلوآگار و کروم آگار *E.coli* کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. بعد از شناسایی و تایید حضور باکتری *E.coli* آزمون‌های بیوشیمیایی (TSI ،IMViC) جهت تشخیص نهایی انجام شد. بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری *E.coli* با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر (Kirby-Bauer) و بر طبق دستورالعمل CLSI(Clinical and Laboratory Standards institute) استفاده گردید(۸). جهت انجام این مطالعه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سپفیم، نیتروفورانتوئین، سفتریاکسون، سفکسیم، نالیدکسیک اسید، اریترومایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین از شرکت (HIMEDIAHimedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* (ATCC ۲۵۹۲۲) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همچنین جهت انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC (Minimum inhibitory concentration) از روش E.test(Epsilometer test) استفاده گردید. این آزمایش با آنتی‌بیوتیکهای آمیکاسین، آمپی سیلین، اریترومایسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدکسیک اسید تهیه شده از شرکت (HIMEDIAPvt.Limited-INDIA Himedia Laboratories) انجام شد. در این مطالعه از نوارهای E.test با رقت‌های مختلف آماده تجاری بر حسب میکروگرم استفاده گردید. برای استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید. برنامه آزمون Multiplex-PCR، مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه‌سانتیگراد به مدت ٤۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه‌سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ٤۰ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بوده است. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده است (۵). مخلوطهای استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۱٦/۸ میکرولیتر،1X. PCR buffer به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، (dNTP mix 5Mm) به میزان ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هرکدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم *Taq* polymerase به میزان ۰/۱ میکرولیتر، نمونه DNA ۲/۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه(version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex-PCR (۵)

جدول پرایمرهای مورد استفاده			
نام پرایمر	توالی پرایمر(۳' to ۵')	ژن هدف	محصول PCR(bp)
eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	*eae*	۹۱۷
eae2	CCAGACGATACGATCCAG(12)	*eae*	۹۱۷
BFP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	*bfPA*	۳۲۶
BFP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA(5)	*bfPA*	۳۲۶
EAEC1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	*CVD432*	۶۳۰
EAEC2	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT(15)	*CVD432*	۶۳۰

نتایج

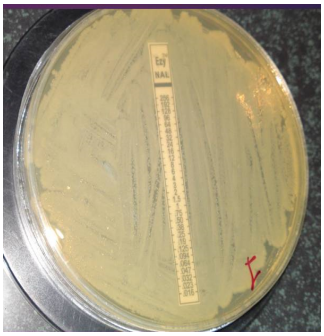
به منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، آنتی‌بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن انجام شد و میزان درصد حساسیت و مقاومت کلیه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر مشخص گردید. این تحقیق بر روی ۵۰ نمونه انجام گرفت. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده در جدول ۲ ذکر شده است. بیشترین مقاوت آنتی بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین به میزان ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها به آنتی بیوتیک آمیکاسین گزارش شد. نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش E-Test بر روی نمونه‌ها در جدول ۳ ذکر گردیده است. در این آزمون بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین مشاهده شد (نگاره۱). نتایج حاصل از شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های *EAEC* و *EPEC* با استفاده از روش Multiplex PCR در جدول ٤ عنوان شده است. ژن *CVD432* به وزن ۶۳۰ جفت باز مربوط به پاتوتیپ *EAEC* درنمونه‌های دامی شناسایی نگردید. نتیجه تأیید ژن *bFPA* با قطعه به وزن ۳۲۶ جفت باز مربوط به پاتوتیپ *EPEC* نمونه های دامی، در ٤ نمونه این ژن (*bFPA*) شناسایی گردید که ۸٪ کل جدایه‌ها را شامل می‌شود. همچنین ژن *eae* به وزن ۹۱۷ جفت باز در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید (نگاره۲).

جدول۲- میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع آنتی بیوتیک	میزان حساسیت(٪)	میزان متوسط(٪)	میزان مقاومت(٪)
نیتروفورانتوئین	۹۶	–	٤
اریترومایسین	–	–	۱۰۰
آمیکاسین	۱۰۰	–	–
سفپیم	۲۳	۷	۷۰
نالیدکسیک اسید	۲۷	–	۷۳
آمپی سیلین	٤	۳	۹۳
سیپروفلوکساسین	۶۰	–	٤۰
سفتریاکسون	٤۳	–	۵۷
سفکسیم	٤٤	۳	۵۳
جنتامایسین	۶۷	۱۷	۱۶

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری اشریشیا کلی با روش E-Test بر حسب درصد

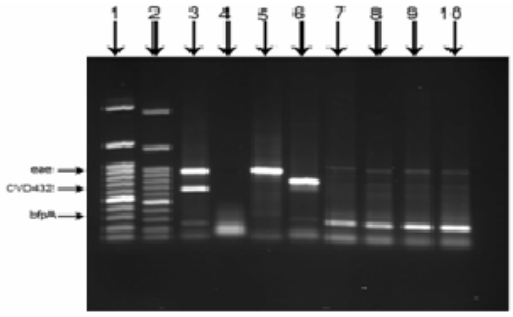
نوع آنتی بیوتیک	حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
سیپروفلوکساسین	۸۰	۲۰
نالیدکسیک اسید	–	۱۰۰
جنتامایسین	۱۰۰	–
آمیکاسین	۱۰۰	–
آمپی سیلین	–	۱۰۰
اریترومایسین	–	۱۰۰



نگاره ۱- نتیجه آزمون تعیین MIC به روش E-Test نواری با آنتی‌بیوتیک نالیدکسیک اسید

جدول ٤- تعداد نمونه‌های حاوی ژن‌های مورد نظر بر حسب درصد

ژن مورد نظر مجموع نمونه‌ها	*CVD432*	*eae* **پروتئین اینتیمین**	*bFPA*
٥٠ نمونه	-	-	٤



نگاره ۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز
نتایج Multiplex PCR: از سمت چپ ۱ و ۲ـ Ladder 100 bp ۳ـ کنترل مثبت ٤ـ کنترل منفی ٥ـ سویه استاندارد ٦ تا ۱۰ نمونه‌های مجهول
eae:917bp, vfpA:326bp, CVD432:630bp

بحث

در طول یکصد سال گذشته *E.coli* مورد مطالعه وسیعی قرار گرفته است بطوری که در حال حاضر مشخص شده است که این ارگانیسم بطور طبیعی بر روی زمین می‌باشد و حضور همیشگی در فلور طبیعی مدفوع باعث شده است که *E.coli* بعنوان یک بیماریزای فرصت‌طلب مطرح شود و توانایی ایجاد عفونت‌های خطرناکی را در صورت جایگزین شدن به‌غیر از محل طبیعی خود دارا می‌باشد(۱۲). تشخیص ژن‌های بیماری‌زا به طور اختصاصی با PCR غالباً مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این روش نتایج سریع و مطمئن با حساسیت بالا می‌دهد(۱۸). ورم پستان ناشی از *E.coli* ارتباط نزدیکی با وضعیت میزبان دارد که تحت تاثیر عملکرد دفاع سلولی توسط نوتروفیل‌ها می‌باشد(۷). واکسن موثر برای کنترل *E.coli* که نقش حفاظتی دارد *E.coli* J5 می‌باشد(۱۱). همت‌زاده و عقیلی در سال ۱۳۷۹ در بررسی بر روی باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان، عوامل ورم پستان محیطی را به ترتیب به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، انروفلوکساسین و جنتامایسین حساس گزارش نمودند (۲). در تحقیقات دانشور و همکاران در سال ۱۳۹۱ در دامداریهای اطراف شهرستان گرمسار، میزان حساسیت به جنتامایسن (۹۲/۵۹٪) و سفتریاکسون (۸۸/۸۸٪) اعلام گردید (۱). در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومایسین (۱۰۰٪) و آمپی سیلین (۹۳٪) و کمترین مقاومت مربوط به نیتروفورانتوئین (٤٪) و آمیکاسین بود. امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی رویه و روزافزون داروها بوده و متأسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. باکتری‌ها به راحتی می‌توانند ژن‌های مقاومتی که بر روی عناصر متحرک ژنتیکی (پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها) قرار دارد را از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال دهند(۱۰). از طرفی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه دام باعث شده که حتی باکتری‌هایی که در بدن بصورت فلور طبیعی حضور دارند نیز به داروها مقاوم شده و مخزنی برای انتشار سویه‌های مقاوم به دارو در جامعه باشند. جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید دو فاکتور عمده، یعنی استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت. اگرچه این مسئله سال‌های متمادی وجود دارد، اما هنوز این بحران جدی گرفته نشده و چگونگی انتشار این پدیده و تأثیر استفاده ناصحیح از داروها اطلاع‌رسانی دقیق انجام نمی‌شود. اثرات متقابل رشد سریع، تراکم بالای

سلول ها، روند ژنتیکی موتاسیون، انتخاب طبیعی و نیز توان بالای باکتری‌ها در تبادل ژنتیکی سبب سازش و تنوع در حدی غیر معمول می‌شود، به همین جهت سازش باکتری‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک، در ایجاد مقاومت بسیار سریع اتفاق می‌افتد(۹). در مطالعه Lira و همکاران بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های stx_2 بوده نه stx_1 ، همچنین در این مطالعه به میزان ۷۲/۷ ٪ از نمونه‌ها با *CVD419* مثبت گزارش گردید(۱۳). ولی Sandhu و همکاران بر این امر تکیه دارد که میزان جداسازی ژن stx_1 از سویه‌های *STEC* بیشتر است(۱۸). Osek در سال ۲۰۰۲ گزارش نمود که در نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده در لهستان بیشترین فراوانی به میزان ۵۵/۸٪ مربوط به سویه‌های *STEC* با حضور ژن *eae* می‌باشد(۱٦). Willshaw به همراه همکاران در تحقیقات سال ۱۹۹۲ از بین ٤۸ نمونه دامی، در۲۹ نمونه دامی *STEC* غیر *O157*، پروب *CVD419* مثبت گزارش گردید(۲۰). Mohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۳، در کرمانشاه، از روش PCR برای شناسایی پاتوتیپ *EPEC* در شیر خام استفاده کردند. در این روش با مطالعه ژن های هدف *eaeA* و سپس Stx_1, Stx_2 برای شناسایی پاتوتیپ *EPEC* استفاده کردند. از مجموع ۲۰٦ نمونه، ۱۷ نمونه (۸/۲۵٪) دارای ژن‌های Stx_1 ,Stx_2 + *eaeA* (پاتوتیپ *EPEC*) بودند(۱٤). Alikhani و همکاران در سال ۲۰۰٦ در ایران، در طی مطالعه ای با استفاده از روش PCR به نتایج زیر دست یافتند: شایع‌ترین عامل جدا شده پاتوتیپ *EPEC* بود و سپس *E.coli* تولیدکننده شیگاتوکسین، شیگلا، سالمونلا و آئروموناس (٤). Andrade و همکاران در سال ۲۰۱۲ در برزیل به مطالعه بر روی ۱٥٦ نمونه دامی، با استفاده از روش Multiplex PCR پرداختند. در نتایج تحقیقات فراوانی ژن‌های بیماریزای شناسایی شده در نمونه های دامی مبتلا به اسهال خونی برابر با: (Stx_1 (۸۲/۸٪)، *eae* (۲٤/۳٪)، $F4_2$ (۱۱/٤٪)، F_5 (۱۰٪)، *Sta* (٤/۲۸٪)، Stx_2 (٤٪)، گزارش گردید(٥). در تحقیقات ما با استفاده از روش MultiPlex PCR جهت شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های *EAEC* و *EPEC* بر روی ٥۰ نمونه شیر، ٤ نمونه دارای ژن *bfPA* (پاتوتیپ *EPEC*) بودند. تفاوت نتایج بدست آمده از روش M-PCR در این مطالعه با مطالعات محققین دیگر در نقاط مختلف دنیا مربوط به شناسایی ژن‌های *CVD432* و *eae* می‌باشد که دلایلی برای این موضوع وجود دارد: یکی از این دلایل ممکن است به علت منبع نمونه و منطقه جغرافیایی باشد که در این مطالعه، نمونه‌های شیر گاو مورد بررسی قرار گرفته است.

فهرست منابع

۱ـ دانشور، م.، محمدصادق، م.، عسکری، م.، گرجی‌دوز، م.، کوچک‌زاده، ع. (۱۳۹۱): تعیین میزان بروز انواع ورم پستان کلینیکی کلیفرمی در دامپروری‌های اطراف شهرستان گرمسار، مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، ٤ (۱): ۱٥۰-۱٤۱.

۲ـ همت‌زاده، ف.، عقیلی، س (۱۳۷۹): جداسازی و تعیین هویت عوامل باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک از اورام پستان گاو، مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی (دانشگاه شیراز)، ۱(۲): ۱۳۸-۱۳۳.

3- Aertsen, A., Vanoirbeek, K. (2004): Heat shock protein mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. J. Appl. Environ. Microbiol. 70(5): 2660-2666.

4- Alikhani, M.Y., Mirsalehian, A., Aslani, M.M. (2006): Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli (EPEC)* in iranian children with and without diarrhoea. J. Med. Microbiol. 55(9): 1159-1163.

5- Andrade, G.I.C., Fernanda, M.S., Ethiene, L.S.F., Marina, G.G., Grazielle, CF.F., Elias, J.de.C., Antonio, U.L., Andrey, P.H., Marcos, B. (2012): Identification of virulence factors by multiplex PCR in Escherichia coli isolated from calves in Minas Gerais Brazil. Trop.Anim. Health. Prod. 44(7): 1783-1790.

6- Burton,M.J., Williamson,N.B.,Brown,W.B.,-Baumann,L.B. (1988): Mastitis control measures used on some Minnesota dairy farms. Pre.Vet.Med. 5(3): 225-232.

7- Burvenich, C.Van.M., Valérie, M., DiezFraile, J., Duchateau, A.Lu. (2003): Severity of E.coli mastitis is mainly determined by cow factors. J. Vet.Res. 34(5): 521-564.
8- Cockerill, F.R., Clinical, L.S.Institute. (2012): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests Approved Standard Eleventh Edition. CLSI document. Pennsylvania. P: 9-12
9- Erb, A., Sturmer, T., Marre, R., Brenner, H. (2007) : Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* overview of geographical temporal and methodological variations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26(2): 83-90.
10- Fluit, A.C., Visser, M.R., Schmitz, F.J. (2001): Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 14(4): 836-871.
11- Gonzalez, R.N., Cullor, J.S.J., Donald, E.F., Thomas, B.B., Robert, B.O., Michael, N. (1989): Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. Can. J. Vet. Res. 53(3): 301-305.
12- Gyles, C.L. (1994): *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab International, Wallingford. P: 60-70.
13- Lira, W., Macedo, C., Marin, J. (2004): The incidence of Shiga toxin producing *Escherichia* coli in cattle with mastitis in Brazil. Appl. Environ . Microbiol. 97(4): 861-866.
14- Mohammadi, P., Abiri, R. (2013): Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli (EPEC)* from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). Jundishapur. J. Microbiol. 6(4): 5439-5443.
15- Nataro, J.P.B., Mary, M.K., James, B.B., Robert, E.B., Nora, L., Myron, M. (1985): Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J. Infect. Dis.1985. 152(3): 560-565.
16- Osek, J. (2002): Rapid and specific identification of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. Letters. Appl. Microbiol. 34(4): 304-310.
17- Pelczar, M., Chan, E., Krieg, N. (1998): Control of microorganism, Chemical agents microbiology Concepts and Applications. 2th edition. McGraw-Hill. London. P: 221-241.
18- Sandhu, K.S.C., McFadden, RC., Brouwer, K., Louie, A., Wilson, M., Lior, J., Gyles, H.CL. (1996): Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest ontario. Epidemiol. Infect. 116(01): 1-7.
19- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003): Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. J. Vet. Re. 34(5): 475-491.
20- Willshaw, G., Scotland, A., Smith, S.M., Rowe, H.R., Bernard. (1992): Properties of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* of human origin of o serogroups other than O157. J. Infect. Dis. 166(4): 797-802.