مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال۶ شماره ۸، بهار و تابستان ۱۳۹۱، صفحات۷۶ – ۶۸

بررسی توانایی محیط کروموژن در تشخیص E.coli O157H7 در آب و مواد غذایی ومقایسه آن با روش کشت استاندارد

دکتر حمیدرضا توکلی[۱] ، محمدتقی صدر ممتاز [۱]، ترانه پیمانه عابدی محتسب [۲]، دکتر حسن رفعتی [۱]

۱.دانشگاه بقیه اله
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت
نویسنده مسئول : محمد تقی صدر ممتاز mt_sadr@yaoo.com ،۰۹۱۱۱۱۵۷۷۶۴

چکیده :

مقدمه: اشرشیاکلی یکی از مهمترین عوامل مسمومیت های غذایی است و برخی از سویه های آن مانند E.coli O157H7 عوارض خطرناکی مانند سندرم اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک ایجاد می کنند. محیط های کروموژن یکی از روشهای تشخیص نسبتاً سریع میکروارگانیسم‌های بیماریزا در آب و مواد غذایی هستند که در دهه اخیر مورد استفاده قرار گرفته اند . هدف از انجام این مطالعه بررسی توانایی محیط کروموژن در تشخیص E.coli O157H7 در آب و مواد غذایی ومقایسه آن با روش کشت استاندارد می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی در مرحله اول ۲۵ نمونه آب و چهار نوع ماده غذایی (۵ نمونه از هرکدام) بطور عمدی با سوش استاندارد *E.coliO157H7* آلوده و سپس با دو روش کروموژن وکشت استاندارد شناسایی گردید و سرعت و حسا سیت دو روش در شناسایی این باکتری بررسی و مقایسه گردید. سپس نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و فرمول آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت .

نتایج:سرعت تشخیص باکتری با استفاده از محیط کروموژن (۱۸ ساعت و ۲۰ دقیقه) ، بیشتر از روش استاندارد(۷۲ساعت) بوده ولی حساسیت این روش(۹۹/۶۱٪) کمتر از روش استاندارد(۱۰۰٪) تعیین گردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مشابه نشان می دهد محیط های کروموژن دارای سرعت وحساسیت بالایی در تشخیص E.coliO157H7 در نمونه های آب و موادغذایی بوده و می تواند به عنوان یک روش جایگزین در تشخیص باکتریهای بیماری زا در آزمایشگاه های مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد .

واژه های کلیدی : محیط های کروموژن ، E.coli O157 H7، آب و مواد غذایی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

کلی فرمها و بویژه *E.coli* شاخص میکروبی آلودگی آب و مواد غذایی محسوب می‌گردند و وجود آن‌ها در آب آشامیدنی و مواد غذایی نشانگر آلودگی این مواد به سایر پاتوژنهای روده‌ای است ، بنابراین جداسازی این باکتری در تعیین سطح بهداشت آب و مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است. (۱و۲)

این باکتری که دارای دوز عفونی کم است یکی از مهمترین عوامل مسمومیت های غذایی بوده و سویه های تیپ اشرشیاکلی انتروهموراژیک(EHEC) مانند *E.coli O157:H7* ازمهمترین پاتوژنهای روده‌ای محسوب می گردند و عوارضی مانندکولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک و بویژه نارسایی‌حادکلیوی را ایجاد می کنند (۳).

این سویه می تواند ازطریق مصرف آب ومواد غذایی آلوده، و از فردی به فرد دیگر(مدفوعی – دهانی) منتقل شود . اگرچه گاو به عنوان مخزن اصلی این باکتری شناخته شده اما حیواناتی مانندگوسفند، گوزن، بز، آهو، خوک، گربه، سگ، جوجه وغاز نیز به عنوان مخزن محسوب می گردند . تاکنون هیچگونه بیماریزایی ناشی ازاین باکتری درحیوانات یادشده، گزارش نشده است اما امکان انتقال باکتری ازحیوان به انسان ازراه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوارکنندگان و همچنین مصرف موادغذایی آلوده مانند شیر، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت چرخ شده، ساندویچ های گوشتی، سبزیجات و آبمیوه ها وجود دارد (۴و۵).

در کشورهای توسعه یافته توجه بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتاً واضحی از شیوع آن وجود دارد. میزان موارد تائید شده آلودگی به EcoliO157H7 در سال ۲۰۰۷ در اسکاتلند ۹ مورد و در سال ۲۰۰۸ در ویرجینیای آمریکا ۲۵ مورد بوده است. همچنین در سال ۲۰۰۸ در ۴۰ همه گیری (۲۱ مورد در میشیگان و ۱۹ مورد در اوهایو) آلودگی موادغذایی به باکتری EcoliO157H7 تائید شده است (۶ و۷) .

گزارشات زیادی از وقوع عفونت ها و مسمومیت های غذایی در اثر آلودگی به این باکتری در نقاط مختلف جهان وجود دارد که از آن جمله می توان به مطالعات Brashearو Galyean در آمریکا(۱۹۹۵)، Khan و همکاران در هندوستان (۲۰۰۳) Murphy و همکاران در ایرلند(۲۰۰۵) ، Meldrum در انگلستان(۲۰۰۶)، Froder در برزیل (۲۰۰۷)، Bahk در کره جنوبی (۲۰۰۷) Abadiasدر کره(۲۰۰۸)، Abougrain در لیبی(۲۰۱۰)، Ponniah در مالزی(۲۰۱۰) و Gormley در انگلستان(۲۰۱۰) اشاره نمود (۱۵– ۸) .

در کشور ما پژوهش های انجام شده در مورد این باکتری بیشتر محدود به نمونه های کلینیکی بوده است . اصلانی و همکاران در سال ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳ با بررسی ۲۰۰۸ نمونه مدفوع انسان در غرب(ایلام) و شمال ایران (مازندران و گلستان) میزان شیوع اشرشیاکلی تولید کننده وروتوکسین را به ترتیب ۴/۹۰ ٪ و ۰/۷ ٪ گزارش کردند ، اما هیچکدام از نمونه ها سروتیپ EcoliO157H7 نبوده اند(۱۲). سالک مقدم و همکاران برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در ایران با بررسی ۲۰۰۰ نمونه ماده غذایی مختلف ، فقط از یک نمونه سبزی موفق به جدا سازی EcoliO157H7 گردیدند(۱۶).

روش های معمول کشت E.coli در آزمایشگاه بیش از 72 ساعت بطول می انجامد و در بیشتر مواقع نیازمند آزمایشات افتراقی و تکمیلی جهت اثبات حضور باکتری در غذا هستیم .

خوشبختانه با کشف روش های تشخیص سریع، این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است، زیرا این روش ها دارای سرعت و دقت بسیار بالا بوده و با کمک آنها در زمان بسیار کمتری میکروارگانیسم مورد نظر شناسایی می گردد (۱۷– ۲۱).

یکی از روشهای جدید که در دهۀ اخیر برای تشخیص نسبتا"سریع میکروارگانیسم‌های بیماریزا در آب و مواد غذایی مطرح گردیده است محیطهای رنگ آفرین (Chromogenic Media) هستند که استفاده از آنها می تواند نیاز به کشت فرعی و آزمونهای بیوشیمیایی اضافی را برای تعیین هویت باکتریهای مورد نظر از میان بردارد. اساس این روش ایجاد مادۀ زمینه‌ای برای آنزیم‌های

Archive of SID

www.SID.ir

اختصاصی میکروارگانیسم‌ها بوده و بر مبنای نوع رنگ تولید شده براحتی می‌توان نوع میکروارگانیسم را تشخیص داد (۲۲-۲۳).

در واقع بسیاری از مواد پس از واکنش با آنزیم‌های میکروبی یا دیگر اجزاء آنها محصولات رنگی یا فلورسنت تولید می‌کنند و از این خاصیت برای تشخیص باکتری استفاده می‌شود. سوبستراهای مورد استفاده برای محیط های کروموژن عمدتاً از مشتقات فنل و ایندول هستند. این مشتقات مانند (بتا دی گلوکورونید یا بتا دی گالاکتورونید) استفادهٔ گسترده‌ای در این محیط ها جهت تشخیص سریع پاتوژن های غذایی دارند. این ترکیبات توسط آنزیم‌های میکروبی تجزیه کننده آنها متابولیزه شده و از متابولیسم آنها محصولات رنگی و یا محصولات فلورسنت تولید می گردد(۲۴).

در برخی از مطالعات از محیط های کروموژن در تشخیص برخی از باکتریها از جمله ***E.coli*** و **S.aureus** و **V.chlora** و برخی از کپک ها در آب استفاده شده است اما در مورد کاربرد آنها درشناسایی این باکتری بیماریزا در مواد غذایی گوشتی و لبنی مطالعه چندانی صورت نگرفته است (۲۲ و ۲۴). در داخل کشور تنها یک مطالعه در مورد استفاده از محیط های کروموژن در تشخیص استافیلوکوکوس آرئوس توسط دکتر رهبر انجام گرفته (۲۵) اما در سطح کشور بویژه در سطح نیروهای مسلح برای تشخیص ***E.coli O157 H7***در آب و مواد غذایی با استفاده از محیط های کروموژن مطالعه ای صورت نپذیرفته و این مطالعه اولین مطالعه محسوب می گردد.تشخیص سریعتر باکتریهای بیماریزا در آب و مواد غذایی همواره یکی از مهمترین اولویت های مراکز مختلف بهداشتی بوده و این مشکل مرتفع می گردد . به نظر میرسد مقایسه این قبیل روشهای جدید با روش کشت باکتریایی متداول در تشخیص ***E.coli*** در آب و مواد غذایی بتواند یکی از مشکلات جدی در حوزه بهداشت و میکروبیولوژی مواد غذایی (تشخیص سریعتر عوامل بیماریزا در آب و مواد غذایی) بویژه در شرایط بحران را مرتفع نماید .از سوی دیگر اطمینان از سلامت آب و مواد غذایی مصرفی در شرایط عادی و بحران یکی از مهمترین وظایف مسئولین بهداشتی سازمان های ذیربط در مدت زمان کم و با حساسیت بالا است و نظر به اینکه شناسایی و تشخیص سریع این عامل بیماریزای روده ای در آب و مواد غذایی مصرفی مردم موجب پیشگیری از بروز بیماری و اپیدمی می گردد ،

این تحقیق که در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰ بر روی استفاده از محیط های کشت کروموژن در شناسایی سریع میکروارگانیسم ها بیماریزا در آب و موادغذایی در نقاط مختلف جهان و اخیراً در ایران مورد بررسی قرار گرفته است. لذا مبنی انتخاب مطالعه توانمندی محیط های کرموژن در شناسایی میکروارگانیسم ها و نقاط ضعف و قوت این روش و همچنین سرعت و حساسیت آن در مقایسه با روشها متداول بوده است .

روش کار:

۲۵ نمونه آب و چهارنوع ماده غذایی (۵ نمونه از هرکدام) بطور عمدی با سوش استاندارد ***E.coli O157 H7*** آلوده و سپس با دو روش کروموژن و کشت استاندارد سرعت و حساسیت دو روش در شناسایی باکتری به ترتیب زیر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت .

۱- **تهیه سوش استاندارد:**برای انجام این مطالعه ابتدا سوش استاندارد E.coli O157:H7 از بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید .

۲- **نمونه برداری** : برای نمونه برداری از موادغذایی جامد مانند پنیر , گوشت قرمز و گوشت مرغ طبق استاندارد ملی ایران شماره های ۸۹۲۳ ، ۶۸۰۶ و ۱۸۱۰ عمل شد بدین صورت که در مورد پنیر نمونه های نیم کیلو گرمی پاستوریزه انتخاب و به آزمایشگاه منتقل گردید و درمورد نمونه های گوشت قرمز و گوشت مرغ از لوله مخصوص نمونه گیری استفاده گردید بدین صورت که ابتدا این لوله را سترون نموده شده و ازسطح و عمق مرغ و گوشت نمونه برداشته شد و نمونه ها در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل گردید.در مورد مواد غذایی مایع مانند شیر پاستوریزه و آب شهری نیز طبق استاندارد نمونه برداری انجام پذیرفت و سپس نمونه ها به آزمایشگاه ارسال شد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای شناسایی باکتری در محیط کروموژن : پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه به روش زیر عمل شد.

۱- ابتدا به منظور رشد باکتری *E.coli O157H7* آن را در محیط مولر هینتون آگار کشت داده و به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری نمودیم.

۲ –بعد از رشد باکتری از آن سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه کردیم (هدف از این کار داشتن سوسپانسیونی با بار میکروبی 10^8 باکتری در هر میلی لیتر می باشد) .

۳- تهیه رقت از نمونه ها : برای این منظور ۲۵ گرم از نمونه را با ۲۲۰میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق مخلوط و از آن رقت 10^{-1}تهیه و سپس رقت های بعدی (تا رقت10^{-5}) تهیه شد.

۴- برای کشت در محیط کروموژن برای هر رقت یک پلیت حاوی محیط کشت کروموژن اختصاصی در نظر گرفته شد و از هر رقت ، ۱ میلی لیتربه داخل پلیت حاوی محیط کشت O157H7ریخته و کشت سطحی دادیم و سپس به صورت وارونه به مدت ۲۴-۱۸ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد.

۵- به منظور تعیین زمان رشد باکتری و تشخیص آن در محیط کروموژن با توجه به دستورالعمل کارخانه تهیه کننده محیط کشت(مرک آلمان) مبنی بر رشد باکتری طی ۲۴ ساعت از ساعت پانزدهم به بعد بطور منظم و با فواصل ۳۰ دقیق نمونه ها از نظر رشد باکتری کنترل گردید و اطلاعات مربوط به هر نمونه در جدول مربوطه ثبت گردید. همچنین برای تعیین حساسیت روش تعداد باکتری های رشد کرده در پلیت های مربوط به هر رقت شمارش و در جدول ثبت کردید.

شناسایی باکتری در محیط کشت استاندارد: برای این منظور مراحل مختلفی انجام گرفت که عبارتند از:

۱- شناسایی و تأیید کلی فرم: در آزمایشگاه موادغذایی برای شناسایی و تأئید کلی فرم از محیط کشت های مکانکی (MCA) و سبز درخشان (BGB) استفاده گردید . بدین صورت که از رقت های تهیه شده فوق در این دو محیط کشت داده شد. به ازای هر رقت یک محیط کشت MCA و یک محیط کشت BGB حاوی لوله دورهام انتخاب گردید و پس از کشت نمونه ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گرادگرمخانه گذاری شد.

در محیط MCA کلنی های به رنگ قرمز یا قرمز مایل به بنفش و در لوله های BGB حاوی لوله دورهام گاز تولید می شود که نشان دهنده وجود کلی فرم می باشد.

۲- شناسایی Ecoli : سپس به منظور شناسایی اشرشیا کلی ، هر نمونه مثبت کلی فرم را در ۲ لوله (یک لوله حاوی محیط کشت سبز درخشان و یک لوله حاوی آب پپتونه) کشت داده و در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کردیم. با توجه به تولید گاز در محیطBGB و همچنین تشکیل حلقه قرمز پس از ریختن چند قطره معرف کواکس در محیط PW ، وجود Ecoli تایید گردید .

۳- تأیید Ecoli : سپس برای تایید تشخیصEcoli در نمونه ها از محیط کشت IMVIC استفاده شد و از نمونه های مثبت دو محیط BGB و PW در این محیط کشت داده شد و در دمای۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کردیم. با توجه به رشد باکتری در این محیط وجود Ecoli در نمونه ها تایید شد .

۴- تأییدEcoliO157H7 : به منظور تأئید نهایی کلنی های سوربیتول منفی و بتاگلوکورونیداز منفی ، از تست آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصیO157H7 (بهار افشان) استفاده گردید

سپس اطلاعات مربوط به هر نمونه از نظر زمان رشد باکتری در هر مرحله در جدول مربوطه ثبت و سرعت تشخیص باکتری با روش کروموژن مقایسه گردید . برای تعیین حساسیت روش کروموژن تعداد نمونه ها در هر پلیت شمارش و درجدول مربوطه ثبت گردید و سپس با استفاده از فرمول مربوطه حساسیت روش تعیین و با حساسیت روش استاندارد مقایسه گردید .

www.SID.ir

نتایج:

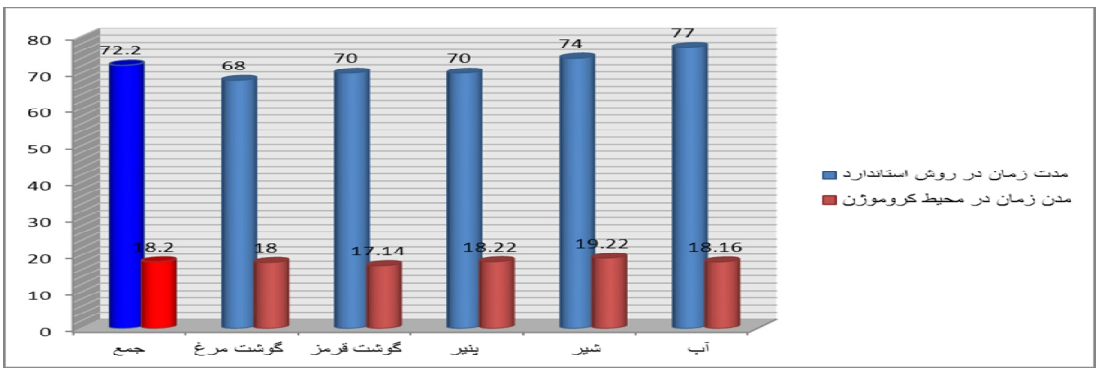
هدف از انجام این مطالعه تعیین توانایی محیط کروموژن در تشخیص باکتری E.coli O157H7 در آب و مواد غذایی بوده است که در جداول شماره ۳ و ۴ و نمودار شماره۱ نشان داده شده است . نتایج نشان داد محیط های کروموژن دارای توانایی تشخیص باکتری E.coli 157H7 در نمونه های آب و مواد غذایی گوشتی و لبنی می باشد بطوری که تمام نمونه هایی(۱۰۰ درصد) که به طور عمدی به این باکتری آلوده شده بودند با استفاده از این روش تشخیص داده شدند.

همانطور که درجدول شماره۱ مشاهده می گردد مدت زمان تشخیص و شناسایی E.coliO157H7 در محیط کروموژن بطور متوسط ۱۸ ساعت و ۲۰ دقیقه بوده درحالی که مدت زمان تشخیص این باکتری در محیط کشت استاندارد بطور متوسط ۷۲ ساعت و ۲۰ دقیقه تعیین گردید . بنابراین می توان ادعا نمود که سرعت تشخیص E.coli 157H7 در محیط کروموژن به مراتب بیش از محیط کشت استاندارد است.

جدول ۱- مقایسه سرعت تشخیص EcoliO157H7 در نمونه های آب و مواد غذایی در دو روش محیط کروموژن و محیط کشت استاندارد

ردیف	نوع نمونه	تعداد نمونه	میانگین مدت زمان لازم برای تشخیص با روش کشت کروموژن (ساعت)	میانگین مدت زمان لازم برای تشخیص با روش کشت استاندارد (ساعت)
۱	آب	۵	۱۸.۱۶	۷۷
۲	شیر	۵	۱۹.۲۲	۷۴
۳	پنیر	۵	۱۸.۲۲	۷۰
۴	گوشت قرمز خام	۵	۱۷.۱۴	۷۰
۵	گوشت مرغ خام	۵	۱۸	۶۸
	جمع(میانگین)	۲۵	۱۸.۲۰	۷۲.۲۰

نمودار ۱- مقایسه سرعت تشخیص E Coli 157 H7 در نمونه های آب و مواد غذایی تلقیح شده در دو روش محیط کروموژن و محیط کشت استاندارد (برحسب ساعت)



Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که درجدول شماره ۲ مشاهده می گردد میزان حساسیت روش کروموژن در تشخیص و شناسایی E.coli 157H7 بطور متوسط ۹۹/۶۱ درصد تعیین گردید که در مقایسه با حساسیت روش کشت استاندارد(۱۰۰درصد) کمتر می باشد با این وجود می توان ادعا نمود که حساسیت این روش بسیار بالا می باشد .

جدول ۲- حساسیت E Coli 157 H7 در نمونه های آب و مواد غذایی تلقیح شده در دو روش محیط کروموژن و محیط کشت استاندارد

ردیف	نوع نمونه	تعداد نمونه	حساسیت با روش کشت کروموژن (درصد)	حساسیت باروش کشت استاندارد (درصد)
۱	آب	۵	٪۹۹/۳۱	۱۰۰
۲	شیر	۵	٪۹۹/۴۴	۱۰۰
۳	پنیر	۵	٪۹۹/۷۴	۱۰۰
۴	گوشت قرمز خام	۵	٪۹۹/۴۵	۱۰۰
۵	گوشت مرغ خام	۵	٪۹۹/۵۰	۱۰۰
جمع(میانگین کل)		۲۵	٪۹۹/۶۱	۱۰۰

بحث:

دستیابی به روش های تشخیص سریع میکروارگانیسم های بیماریزا درمواد غذایی، یکی از الویت های مهم تحقیقاتی درحوزه بهداشت موادغذایی محسوب می گردد

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که محیط کروموژن دارای توانایی بالایی در تشخیص باکتری EcoliO157H7 در نمونه های آب و مواد غذایی می باشد، بطوری که تمام نمونه هایی(۱۰۰٪) که بصورت عمدی با این باکتری آلوده شده بودند را شناسایی نمود .

مطالعات زیادی در کشورهای مختلف جهان بر روی شناسایی این باکتری در نمونه های آب و موادغذایی با روش فوق انجام شده است که نتایج آنها مطالعه ما را تأیید می نماید.

مطالعات Afnorو همکاران (۲۰۰۴)، Pitkanen و همکاران(۲۰۰۷)، Ten و همکاران(۲۰۰۴)، Keener وهمکاران (۲۰۰۱)، Wutor وهمکاران (۲۰۰۷)، Beauchamp وهمکاران (۲۰۰۶) اشاره نمود(۴و۳۱و۳۴و۳۵و۳۶و۳۷).

که نتایج آنها همچون مطالعه ما نشان دهنده توانایی و کارآیی این روش در شناسایی این باکتری می باشد.

نتایج حاصل از مطالعات ما در خصوص سرعت تشخیص این باکتری با روش کروموژن نشان داد که مدت زمان لازم برای تشخیص و شناسایی E.coli 157H7 در محیط کروموژن بطور متوسط ۱۸ ساعت و ۲۰ دقیقه می باشد، درحالی که مدت زمان تشخیص این باکتری در محیط کشت استاندارد بطور متوسط ۷۲ ساعت و ۲۰ دقیقه تعیین گردید(جدول و نمودر شماره۱). بنابراین می توان ادعا نمودکه سرعت تشخیص E.coli 157H7 در محیط کروموژن به مراتب بیش از محیط کشت استاندارد است.

همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر در خصوص تعیین حساسیت این روش در تشخیص باکتری نشان داد که میزان حساسیت روش کروموژن در تشخیص و شناسایی E.coli 157H7 بطور متوسط۹۹/۶۱ درصد می باشد (جدول شماره ۲) که در مقایسه با حساسیت روش کشت استاندارد(۱۰۰درصد) کمتر است ، با این وجود می توان ادعا نمود که حساسیت روش کروموژن بسیار بالا است و اگرچه میزان حساسیت این روش کمی پایین تر از روش

Archive of SID

www.SID.ir

استاندارد است اما با توجه به سرعت بسیار بالاتر آن در تشخیص باکتری، می تواند به عنوان یک روش نسبتاً سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه های موادغذایی مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعاتی که در سایر کشورها نیز انجام شده نشان داده شده که این روش دارای سرعت و حساسیت بالایی در تشخیص باکتریهای مختلف از جمله Ecoli و بویژه E.coli 157H7 در آب و موادغذایی است. Banadonna و همکاران درمطالعه خود (۲۰۰۵) بر روی تشخیص E.coli در نمونه های آب قابل شرب نشان دادند که محیط کروموژن دارای سرعت تشخیص بیشتری نسبت به روش های متداول در آزمایشگاه و حساسیت بالایی می باشد(۳۰). درمطالعه ای که Manafi و همکاران (۲۰۰۴) بر روی ۱۲۴۶ نمونه آب آلوده به سویه های مختلف اشرشیاکلی انجام دادند، ۱۲۴۰ سویه (۹۹٪ موارد) بااستفاده از محیطهای کروموژن شناسایی شدند و فقط تعداد اندکی از باکتریهای غیرکلیفرمی مانند سویه هایی از سراتیا ، هافنیا، ویبریو و آئروموناس شناسایی نشدند. وی معتقد است استفاده ازاین محیط ها درمقایسه با روشهای استاندارد، درطی ۲۴ ساعت کلیفرم ها و اشرشیاکلی را شناسایی می کند (۳). همچنین نتایج به دست آمده ازمطالعه دیگر Manafi و همکاران(۲۰۰۵) بر روی ۱۰۴ نمونه آب آشامیدنی در اتریش نشان داد که ۹۷ ٪ از سویه های مثبت اشرشیا کلی در مدت ۲۴ ساعت با استفاده از محیط کروموژن شناسایی گردیدند(۳۹). اگرچه این افراد نیز از محیط کروموژن استفاده نموده اند اما مقایسه نتایج حاصل از مطالعه ما با مطالعه فوق نشان می دهد که سرعت (۱۸ ساعت و ۲۰ دقیقه)و حساسیت روش ما (۹۹/۶۱٪) بالاتر و بیشتر از روش مورد استفاده توسط این محققین می باشد. این امر نشان می دهد که محیط های کروموژن مختلف می توانند دارای سرعت تشخیص و حساسیت های مختلفی باشند. سایر محققین نیز در مطالعات خود نشان دادند که محیط های کروموژن دارای سرعت تشخیص و حساسیت بالایی در شناسایی باکتری های مختلف هستند، بطوری که حساسیت و قدرت افتراق این روش برای شناسایی باکتری های S.aureus ، L.monocytogenes ، V.cholerae،Salmonella و C.albicans را به ترتیب ۹۵/۵ ٪ ، ۱۰۰٪ ، ۹۹٪ ، ۱۰۰٪ و ۹۹٪ گزارش نموده اند(۴۰و ۴۱و ۴۲و ۴۳). به عنوان مثال Stoakes و همکاران(۲۰۰۶)در مطالعه خود برروی شناسایی باکتری استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین با روش کروموژن نشان دادند که این روش دارای حساسیت و سرعت بیشتری نسبت به روش های متداول می باشد (۴۴). درایران نیز Rahbar و همکاران(۲۰۰۸) برای تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین ازچهار روش مختلف از جمله محیط کروموژن استفاده نمودند که نتایج آن نشان داد محیط کروموژن مورد استفاده درمقایسه با سایر روش ها از سرعت بیشتر و حساسیت بالاتری برخوردار است ، بطوریکه حساسیت این روش به میزان ۱۰۰٪ تأئید گردید که از حساسیت به دست آمده در مطالعه ما بیشتر است(۲۷) . بنا به گزارش مرکز کنترل بیماری ها (CDC) یکی ازکاربردهای بسیار مفید این قبیل روش ها شناسایی سریع آلودگی آب می باشد و استفاده از این تکنیک در پیشگیری ازبیماریهای قابل انتقال ازطریق آب (Water – Borne Diseases) بسیارحائز اهمیت است (۹). تمامی مطالعات مورد اشاره نشان می دهند محیط های کروموژن دارای توانایی و حساسیت بالایی در شناسایی باکتری های بیماری زا در آب و موادغذایی هستند و نتایج آنها با نتایج حاصل از مطالعه ما همخوانی و مطابقت دارد.

پیشنهادات :

– با توجه به اینکه نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه نشان داده است که محیط کروموژن، روشی نسبتاً سریع ، دقیق و با حساسیت بالا برای شناسایی و تشخیص باکتری های بیماری زای قابل انتقال از طریق آب موادغذایی است، می تواندبه عنوان جایگزینی مناسب برای روشهای سنتی و متداول مورد استفاده قرار گیرد. زیرا استفاده از این روش نیاز به تهیه کشت های فرعی و آزمونهای بیوشیمیایی اضافی برای تشخیص عوامل بیماریزا از میان برود و در مدت زمان بسیارکمتری، عوامل بیماریزا تشخیص داده می شوند .این موضوع بویژه برای شرایط نظامی و بحرانها به منظور پیشگیری از بروز بیماریهای با منشاء آب و مواد غذایی از اهمیت بیشتری برخوردار است.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکرو قدردانی :

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاه کنترل کیفی موادغذایی دانشگاه تهران، دانشکده بهداشت و آزمایشگاه کنترل کیفی موادغذایی دانشگاه بقیهٔ الله(عج) ، دانشکده بهداشت به دلیل حمایت های اجرایی و همکاری در اجرای این پژوهش اعلام می دارند.

فهرست منابع :

1-Tavakoli HR , Bayat ,M.and Kosha M. Application of Chromogenic media for rapid detection water and food- borne pathogens , American-Eurasian Journal .(2008), 4(6):693 – 99.

2- Hill, W.E, (2004). The use of PCR technique for detection of Food-borne J. of Food Mic., 18:1191-99.

3-Manafi, M., Romans, H. , Geissler, K.M. (2004).Quantative *D*etermination of total Coliforms and E.coli in marine waters with chromogenic and flourogenic media. J. Appl. Bacteriol, 98: 280-285

4-Afnor,S. , Alonso, B.(2004). Detection of E.coli O157H7 in water samples by chromogenic media, J. Appl. and Environ. Mic., 69: 6103-6110.

5. Li F, Zhao C, Zhang W, Cui S, Meng J, Wu J, et al. Use of Ramification Amplification Assay for Detection of Escherichia coli O157:H7 and Other Escherichia coli Shiga Toxin- Producing Strains. J Clin Microbiol; 2005; 43; 6086 - 6090.

6- CDC. Multistate Outbraek of E. coli O157 Infection Michigan and Ohio. MMWR; 2008; Available from : http://www.cdc.gov/

7- Dontorou C , Papado P , Filioussis G, Isolation of Escherichia coli O157:H7 from foods in Greece . International Journal of Food Microbiology . 2008 June;82: 7578-7580

8. Brashears M , Galyean M . E.coliO157:H7 in live cattle by 50 percent . 2002 April;24:3-6

9- Meldrum RJ, Smith RM, Ellis P, Garside J, Microbiological quality of randomly selected ready-to-eat foods sampled between 2003 and 2005 in Wales, UK , International Journal of Food Microbiology , 2006 , 108, (3) : 397-400

10-Froder H , et al. Minimally processed vegetable salads: Microbial quality evaluation,J. of food protection ,2007, 70, (5) :1277-1280.

11-Bahk Gyung-Jin, Todd E, Chong-Hae H , Deog-Hwan O, and Sang-Do H, Exposure assessment for Bacillus cereus in ready-to-eat Kimbab selling at stores , Food Control , 2007, 18, (6): 682-688 .

12-Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Vi?as I, Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, 2008 ,123(1-2):121-29.

13-Abougrain AK, Nahaisi M, Nuri SM, Mohamed M , and Ghenghesh K , Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya , Food control ,2010(21) : 760-762.

14-Ponniah J, et al. Listeria monocytogenes in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia , Food Control , 2010 , 21, (5) :774-778 .

15- Gormley FJ , Little CL , Grant KA, Pinna E, McLauchlin B ,The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: A UK wide study with a focus on Salmonella and Listeria monocytogenes. Food Microbiology , 2010 ,27(4): 243-249.

16- Salek moghaddam A ,Forouhesh Tehrani M ,Davoodian P. Survey of the bacterial contaminants of Iranian foods in searches of E.coliO157:H7 in medical laboratory sciences researches center .Iranian J of Inf Dis and Trop Medicine . 2003 ; 18(21):5 – 8.

17- Vonderzant,C.,Splittstoesser, D.F, (2004). Compendium of methods for microbiological Examination of foods (APHA) 36: 605-609.

18-Archer G.L. *Staphylococcus aureus: A well-armedpathogen*. Clin. Infect.Dis.1998; 26: 1179-1181.

Archive of SID

www.SID.ir

19-Gaillot O, Kuhn H, Wonde B. *Evaluation of Rambach agar detection of Salmonella subspecies*. J. Appl. Environ.Microbiol. 2005;60: 749-751.

20-Gaillot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P.*Evaluationof CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenicmedium, for isolation and presumptive identification ofStaphylococcus aureus from human clinical specimens*. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1587-91.

21-Voss A. and Doebbelinf B.N. *The worldwide prevalenceof methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Int. J.Antimicrob. Agents. 1995; 5:101-106.

22-Rahbar M ,et al(2008).Evaluation of a new CHROMagar medium for detection of Methicillin –Resistant Staphylococcus aureus.Pakistan .J. of Biological Sciences 11(3):496-498.

23- Gaillot,O. et al, (2002).Value of examination of water for streptococci and staphylococcus aureus with a view to its recent contaminations, J. Clin. Microbiol, 38: 1587-91

۲۴- توکلی حمیدرضا ، میکروبیولوژی مواد غذایی و کنترل بهداشتی مراکز تهیه و توزیع غذا انتشارات مرز دانش ،۱۳۸۷.

25- Vanderzant C, and Splittstoesser DF , Compendium of methods for the microbiological examinat: ons of foods (APHA). U.S.A. 2005.

Archive of SID

www.SID.ir