

بررسی مقایسه‌ای آلودگی به کلی‌فرم و اشرشیاکلی در مواد غذایی با استفاده از محیط‌های کروموژن مختلف و ارزیابی آن‌ها با روش مرجع

لیلا سهرابی¹، علی فضل آرا^{2*}، مهدی پورمهدی بروجنی³

- 1- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
2- استاد، دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
3- دانشیار، دکترای تخصصی اپیدمیولوژی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: 98/02/27 تاریخ پذیرش: 98/11/27)

چکیده

روش‌های مختلفی برای شناسایی وجود آلودگی به کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی در مواد غذایی مختلف ابداع شده‌اند که هرکدام دارای مزیت‌ها و معایبی نسبت به یکدیگر می‌باشند. در این میان روش پورپلیت با استفاده از محیط VRBA به عنوان روش مرجع در ایران مورد تایید می‌باشد که از بزرگ‌ترین معایب آن نیاز به وقت زیاد، حجم عملیات بالای آزمایشگاهی، مراحل متعدد و طولانی بودن زمان حصول نتایج است. امروزه به دلیل تولید انبوه مواد غذایی گوناگون، نیاز به روش‌های سریع‌تر با حساسیت بالا برای کنترل کیفیت مواد غذایی از احتیاجات ضروری مراکز نظارتی مسئول می‌باشد، استفاده از محیط‌های کروموژن نیز یکی از روش‌های مناسب تشخیص سریع است. لذا با توجه به این موضوع، ارزیابی مقایسه‌ای نتایج حاصل از به کارگیری سه محیط کروموژنیک و مرجع در کنترل کیفیت مواد غذایی مد نظر قرار گرفت. طی تحقیق حاضر بر روی 100 نمونه ماده غذایی ارزیابی آلودگی به کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی به روش مرجع و سه محیط کروموژن صورت گرفت. براساس نتایج حاصله به ترتیب 86، 79، 85 و 80 نمونه با استفاده از روش‌های مرجع، ChromAgar ECC، Coliform Agar ES و Rapid E.coli 2/ Agar آلوده به کلی‌فرم تشخیص داده شدند. همچنین با استفاده از چهار روش مذکور، آلودگی به اشرشیاکلی به ترتیب 66، 80، 84 و 80 گزارش شد. آزمون کوکران نشان داد که تفاوتی بین چهار روش در تشخیص کلی‌فرم وجود ندارد ($p>0/05$). اما چهار روش مذکور در تشخیص اشرشیاکلی عملکرد یکسانی نداشته، به طوری که روش‌های کروموژنیک با روش مرجع اختلاف معناداری دارند ($p<0/001$)، ولی هیچ اختلافی بین روش‌های کروموژنیک در تشخیص اشرشیاکلی وجود ندارد ($p>0/05$). با توجه به آنالیز آماری مطالعه صورت گرفته می‌توان از سه روش کروموژنیک مورد اشاره به جای روش مرجع برای شناسایی کلی‌فرم استفاده نمود اما استفاده از محیط‌های مذکور برای شناسایی اشرشیاکلی توصیه نمی‌گردد.

کلید واژگان: کلی‌فرم‌ها، اشرشیاکلی، کروموژنیک، روش مرجع

*مسئول مکاتبات: a.fazlara@scu.ac.ir

1- مقدمه

اشرشیاکلی به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، از گروه باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی اختیاری می‌باشند، این باکتری از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه به شمار می‌رود [1]. اشرشیاکلی به عنوان ارگانسیم کنترلی جهت انجام آزمایش‌های کنترلی مؤثر بودن عوامل ضد میکروبی و مواد ضد عفونی کننده استفاده می‌شود و به عنوان ارگانسیم اندیکاتور جهت تعیین آلودگی مدفوعی مواد غذایی، آب و محیط مطرح می‌باشد و نقش مهمی را به عنوان فلور میکروبی روده ی انسان و حیوانات خونگرم تشکیل می‌دهد [2].

برای شناسایی کلی‌فرم‌ها تولید اسید و گاز از لاکتوز اساس بسیاری از روش‌ها از جمله روش‌های مرجع استاندارد را تشکیل می‌دهد، اما گاهی بعضی از کلی‌فرم‌های مدفوعی به ویژه اشرشیاکلی به دلیل از دست دادن آنزیم فرمنت‌هیدروژناز آگاز تولید نمی‌کنند و همین امر موجب تعاریف آنزیمی جدیدی گردید که از آن جمله می‌توان به وجود آنزیم‌های بتا-دی گالاکتوزیداز در کلی‌فرم‌ها و بتا-دی گلوکوزونیداز در 94-96 درصد از سویه‌های اشرشیاکلی اشاره نمود [3]. تشخیص فعالیت بتاگلوکوزونیداز برای تشخیص و شمارش اشرشیاکلی به خوبی شناخته شده است. از این ویژگی در محیط‌های کشت انتخابی این ارگانسیم‌ها و همچنین در تهیه محیط‌های کروموزینیک جدید استفاده می‌شود. محیط‌های کروموزینیکی از روش‌های تشخیص نسبتاً سریع میکروارگانسیم‌های بیماریزا در آب و مواد غذایی هستند که مورد استفاده قرار گرفته‌اند [4]. مادهٔ زمینه‌ای بکار رفته در محیط‌های کروموژن برای آنزیم‌های اختصاصی میکروارگانسیم‌ها در نظر گرفته شده و بر مبنای رنگ تولید شده به راحتی می‌توان نوع میکروارگانسیم را شناسایی نمود [5]. 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 شناسایی استفاده می‌شود. سوبستراهای مورد استفاده برای محیط‌های کروموژن یک عمده‌تاً از مشتقات فنل و ایندولو بسیاری از سوبستراهای محیط‌های فلورسنت از مشتقات

کومارین هستند [6].

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم‌ها از مواد کروموژن استفاده گردیده است. برای مثال با استفاده از ماده کروموژن 5-برومو 4-کلرو 3-ایندول بتادی گلوکوزونید می‌توان فعالیت آنزیم بتا-دی گلوکوزونیداز را در سویه‌های مختلف اشرشیاکلی اندازه گرفت. همچنین ماده کروموژن 5-برومو 6-کلرو 3-ایندول بتا-دی گالاکتوپیرانوزید برای تعیین وجود آنزیم بتا-دی گالاکتوزیداز مورد استفاده قرار گرفته است. براساس این تعاریف جدید محیط‌های کشت تجارتي گوناگون برای جستجو و شناسایی کلی‌فرم‌ها به ویژه اشرشیاکلی با استفاده از مواد زمینه‌ای کروموژن ابداع گردیده است که امکان کشف همزمان میکروارگانسیم‌ها را در آب و مواد غذایی فراهم می‌نماید [7 و 8]. در روش‌های سنتی تشخیص کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی که شاخص آلودگی مدفوعی آب و مواد غذایی هستند، زمان زیادی صرف می‌شود. استفاده از محیط‌های کروموژن نیز یکی از روش‌های مناسب تشخیص سریع است که در سالیان اخیر در کشورهای پیشرفته جهان به جای روش‌های سنتی جایگزین گردیده است. لذا با توجه به این موضوع ارزیابی مقایسه‌ای نتایج حاصل از به کارگیری محیط‌های مختلف کروموزینیک (3 محیط کروموژن) از نظر وجود آلودگی به کلی‌فرم و اشرشیاکلی و میزان تطابق نتایج حاصله از آنها با روش مرجع در کنترل کیفیت مواد غذایی مدنظر قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد 100 نمونه غذایی ریسک بالا از نظر آلودگی به کلی‌فرم و اشرشیاکلی مانند گوشت چرخ کرده، برگر دست ساز، شیرخام، شیربرنج، سرشیر، بستنی سنتی، فالوده، فلافل و سمبوسه از مناطق مختلف عرضه این مواد در شمال، جنوب، شرق غرب و مرکز شهر اهواز جمع آوری شدند. نمونه‌های شیرخام علاوه بر شهر اهواز از شهرهای دیگر استان خوزستان نیز تهیه شدند. نمونه‌ها در شرایط استریل و سرما به آزمایشگاه گروه بهداشت مواد غذایی منتقل گردیدند و مراحل رقت‌سازی با وسایل استریل و در کنار شعله انجام گرفت.

2-1- کشت به روش مرجع

در این روش بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره

1. Forment hydrogenase

9263 در ابتدا از نمونه‌های غذایی بر روی محیط VRBA (Merck- آلمان) به روش پورپلیت دولایه کشت و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و سپس از کلونی‌های رشد کرده مشکوک به کلی‌فرم (کلی‌فرم فرضی یا احتمالی) به رنگ ارغوانی با قطر 0/5 تا 2 میلی‌متر که در مواردی دارای هاله املاح صفراوی هستند، به‌منظور تأیید کلی‌فرم، به محیط کشت آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان (Merck - آلمان) حاوی لوله دورهام تلقیح نموده به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری می‌گردد. در مرحله بعد از لوله‌های گاز مثبت سبز درخشان که بیانگر تأیید وجود کلی‌فرم می‌باشد مجدداً به محیط کشت آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان حاوی لوله دورهام و نیز محیط آب پیتونه (Merck - آلمان) تلقیح و به ترتیب در دماهای 44 و 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت قرار داده می‌شود. چنانچه پس از پایان این مرحله لوله‌های حاوی محیط کشت آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان، کدر شده، در لوله دورهام گاز جمع گردد، کلی‌فرم مدفوعی تأیید گشته و چنانچه با افزودن معرف کواکس به محیط آب پیتونه، حلقه قرمز رنگ ایجاد شود دلیل بر احتمال قریب به یقین اشرشیاکلی می‌باشد [9].

در ادامه با استفاده از آزمون IMViC نسبت به شناسایی دقیق‌تر موارد اشرشیاکلی اقدام گردید. آزمایش IMViC جهت تفریق اشرشیاکلی از انتروباکتر به کاررفته و در صورتی که باکتری مورد بررسی از نظر اندول و متیل‌رد مثبت بوده و از نظر وگس‌پروسکوئر و سیترات منفی باشد، وجود اشرشیاکلی نوع یک¹ محرز می‌گشت، همچنین در صورتی که واکنش متیل‌رد مثبت، ولی اندول و وگس‌پروسکوئر و سیترات هر سه منفی باشند، دلیل بر وجود نوعی اشرشیاکلی غیرتیبیک (سویه‌های نوع دو² اشرشیاکلی) است که 15 درصد اشرشیاکلی‌ها از نوع اندول منفی هستند [10].

2-2- کشت در محیط‌های کروموژنیک

محیط‌های کشت استفاده شده در این مطالعه شامل محیط Chromocult Coliform Agar ES (Merck- آلمان)، محیط ChromAgarECC (Chromagar-فرانسه) و محیط

کوتاه، جهت جلوگیری از کف کردن انجام می‌شد. نحوه کار بدین‌صورت بود که 1 میلی‌لیتر از رقت تهیه شده نمونه غذایی را در پلیت ریخته و با استفاده از حدود 10 الی 15 میلی‌لیتر از محیط‌های کشت کروموژنیک با دمای 45 درجه سانتی‌گراد نسبت به انجام کشت پورپلیت دولایه با استفاده از دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت اقدام می‌گردید. پس از سپری شدن زمان مذکور پرگنه‌هایی رنگی در پلیت‌ها مشاهده می‌شد. در دو محیط Chromocult Coliform Agar ES و ChromAgarECC نتایج مشابهی با مقدار بسیار کمی تفاوت در رنگ ظاهر شده در نمونه‌های حاوی کلی‌فرم، پرگنه‌های قرمز و در نمونه‌های حاوی اشرشیاکلی پرگنه‌های آبی و در نمونه‌های حاوی هر دو پرگنه‌های قرمز و آبی دیده می‌شدند ولی در محیط کشت Rapid E.coli 2/Agar نمونه‌های حاوی کلی‌فرم، پرگنه‌های سبز مایل به آبی و در نمونه‌های حاوی اشرشیاکلی پرگنه‌های قرمز ارغوانی و در نمونه‌های حاوی هر دو، پرگنه‌های ارغوانی و سبز آبی مشهود بودند.

2-3- تجزیه تحلیل آماری

نتایج حاصل از روش مرجع و نیز محیط‌های کروموژن به منظور ارزیابی مقایسه ای بعدی به تفکیک برای هر نمونه قرائت و ثبت می‌گردید. سپس داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS نسخه 19 به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. تحلیل داده‌ها با آزمون کوکران، آزمون مک‌نمارو محاسبه آماره کاپا انجام گرفت.

3- نتایج و بحث

در طی این تحقیق، 100 نمونه غذایی جمع‌آوری شد و بررسی از نظر آلودگی به کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی به روش مرجع و با استفاده از سه محیط کروموژنیک مختلف انجام شد. طبق جداول

1. Type I
2. Type II

1 و 2 تعداد 86 نمونه از مجموع 100 نمونه بر اساس روش مرجع، دارای آلودگی کلی فرمی (86 درصد) و تعداد 66 نمونه آلوده به اشرشیاکلی (66 درصد) بودند. حال آن که بر اساس سه محیط کروموزنیک Chromocult Coliform Agar ES،

86 نمونه از مجموع 100 نمونه بر اساس روش مرجع، دارای آلودگی کلی فرمی (86 درصد) و تعداد 66 نمونه آلوده به اشرشیاکلی (66 درصد) بودند. حال آن که بر اساس سه محیط کروموزنیک Chromocult Coliform Agar ES،

Table 1 Results (percent) of samples contaminated to Coliforms

Rapid E.coli 2/Agar	ChromAgar ECC	Chromocult Coliform Agar ES	Reference	Method Microorganism
80	85	79	86	Coliform

Table 2 Results (percent) of samples contaminated to *E.coli*

Rapid E.coli 2/Agar	ChromAgar ECC	Chromocult Coliform Agar ES	Reference	Method Microorganism
80	84	80	66	<i>Escherichiacoli</i>

مرجع، در تشخیص کلی فرم‌ها به ترتیب 73، 77 و 72 درصد بود (جدول 1، 2، 3 و 4) که در این بررسی بیشترین میزان توافق محیط کروموزن با روش مرجع مربوط به محیط ChromAgar ECC با 77 درصد بود. حساسیت و ویژگی محیط‌های کروموزن ChromAgar ECC، Chromocult Coliform Agar ES و Rapid E.coli 2/Agar به ترتیب (80/23) و (28/57)، (86/05 و 21/43) و (21/43) درصد به دست آمد. همچنین مقادیر محاسبه شده آماره کاپا برای محیط‌های کروموزن فوق الذکر به ترتیب 0/07، 0/07 و 0/014 بود.

بررسی آماری نشان داد که بین سه محیط کروموزنیک با روش مرجع، اختلاف معنا داری در تشخیص کلی فرم وجود ندارد ($P>0/05$). اما بین سه محیط کروموزنیک و روش مرجع اختلاف معنی داری در تشخیص اشرشیاکلی وجود دارد ($P<0/001$). به عبارت دیگر این سه محیط کروموزن در تشخیص کلی فرم‌ها عملکرد یکسانی با روش مرجع داشتند ولی در تشخیص اشرشیاکلی عملکرد یکسانی با روش مرجع نداشتند. به طوری که میزان توافق بین هر کدام از محیط‌های کروموزن Chromocult Coliform Agar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar با روش

Table 3 Comparison of Chromocult Coliform Agar ES with reference method in detection of Coliforms

Total	Negative	Positive	Reference Chromocult ColiformAgar ES
79	10	69	Positive
21	4	17	Negative
100	14	86	Total

Table 4 Comparison of ChromAgar ECC with reference method in detection of Coliforms

Total	Negative	positive	Reference ChromAgarECC
85	11	74	Positive
15	3	12	Negative
100	14	86	Total

Table 5 Comparison of Rapid E.coli 2/Agar with reference method in detection of Coliforms

Total	Negative	Positive	Reference Rapid E.coli2/ Agar
80	11	69	Positive
20	3	17	Negative
100	14	86	Total

همچنین میزان توافق بین روش مرجع با سه محیط کروموزنیک Chromocult Coliform Agar ES و Rapid E.coli 2/Agar به ترتیب (86/36 و 32/35)، (90/91 و 29/41) و (87/88 و 35/29) درصد به دست آمد. همچنین مقادیر محاسبه شده آماره کاپا برای محیط‌های کروموزن فوق الذکر به ترتیب 0/21، 0/23 و 0/26 بود و بطور کلی آزمون کوکران نشان داد روش مرجع با سه محیط کروموزنیک در تشخیص اشرشیاکلی اختلاف آماری معنی‌داری ندارند ($P < 0/001$).

همچنین میزان توافق بین روش مرجع با سه محیط کروموزنیک Chromocult Coliform Agar ES و Rapid E.coli 2/Agar در تشخیص اشرشیاکلی به ترتیب 68، 70 و 70 درصد می‌باشد (طبق جداول 6، 7 و 8) که در این بررسی بیشترین میزان توافق محیط کروموزن با روش مرجع مربوط به دو محیط ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar با 70 درصد بود. حساسیت و ویژگی محیط‌های کروموزن Chromocult Coliform Agar ES

Table 6 Comparison of Chromocult Coliform Agar ES with reference method in detection of *E.coli*

Total	Negative	Positive	Reference
			Chromocult Coliform Agar ES
80	23	57	Positive
20	11	9	Negative
100	34	66	Total

Table 7 Comparison of ChromAgar ECC with reference method in detection of *E.coli*

Total	Negative	Positive	Reference
			ChromAgar ECC
84	24	60	Positive
16	10	6	Negative
100	34	66	Total

Table 8 Comparison of Rapid E.coli 2/Agar with reference method in detection of *E.coli*

Total	Negative	Positive	Reference
			RapidE.coli2/Agar
80	22	58	Positive
20	12	8	Negative
100	34	66	Total

تحقیقات مشابهی از نظر مقایسه روش کروموزن با روش مرجع در جستجوی میکروب‌ها در مواد غذایی توسط محققین انجام شده است. تعداد بسیاری از این تحقیقات حاکی از انطباق خوب روش‌های کروموزن با یکدیگر و همچنین باروش‌های مرجع در شناسایی عوامل پاتوژن و البته برخی نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین نتایج محیط‌های کروموزن با روش مرجع و در مواردی با یکدیگر می‌باشد که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌ای از Gonzalez و همکاران (2003) در آرژانتین برای شناسایی آلودگی غذاهای آماده مصرف¹ از محیط‌های کروموزن اختصاصی اشاره کرد. در این تحقیق محیط

Chromocult Coliform Agar با روش استاندارد و مرجع و محیط VRBA به منظور شمارش کلی فرم‌ها در غذاهای مختلف آماده به مصرف مقایسه شد، همچنین ویژگی محیط Chromocult Coliform Agar برای شناسایی باکتری اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع 94 نمونه مواد غذایی آماده مصرف از رستوران‌های شهر کوردوبا جمع‌آوری شد، این مواد غذایی شامل انواع سبزی‌های پخته، گوشت قرمز، گوشت سفید، سالاد و ساندویچ بود. ضریب همبستگی شمارش کلی فرمی میان دو محیط Chromocult Coliform Agar و VRBA نسبتاً خوب و معادل 0/72 ($P = 0/00001$) بود [11] که از این نظر مشابه نتایج مطالعه حاضر در خصوص کلی فرم‌ها

1. Ready to eat

همکاران (2005) بر روی 1246 نمونه آلوده به سویه‌های مختلف اشرشیاکلی انجام دادند، 1240 سویه (99 درصد) با استفاده از محیط‌های کروموژن شناسایی شدند و فقط تعداد اندکی از باکتری‌های غیر کلی فرمی مانند سویه‌هایی از سراتیا، هافنیا، ویبریوا آنروموناتس واکنش مثبت کاذب داشتند. وی معتقد است استفاده از این محیط‌ها در مقایسه با روش‌های استاندارد، در طی 24 ساعت کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی را شناسایی می‌کند [7]. به همین ترتیب Pitkanen و همکاران (2007) نیز با استفاده از محیط‌های کروموژن در شناسایی کلی فرم‌ها در 110 نمونه آب آلوده به اشرشیاکلی، توانایی شناسایی وجود باکتری را با این روش تأیید کردند. در این مطالعه روش‌های جایگزین برای شناسایی و شمارش کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی با روش مرجع بررسی شد، محیط‌های جایگزین شامل Chromcult Coliform و Colilert¹، LESEndo Agar، Agar بود، نتایج این مطالعه نشان داد که محیط‌های Chromcult Coliform Agar و Colilert می‌تواند جایگزین بالقوه‌ای برای شناسایی کلی فرم و اشرشیاکلی باشد [14]. همچنین Bonadonna و همکاران در سال 2004 طی مطالعه خود نشان دادند که این محیط‌ها نسبت به سایر روش‌ها و آزمون‌ها تأییدی از حساسیت بیشتری در تشخیص در نمونه‌های اشرشیاکلی برخوردار است [15]. نتایج این محققین بر خلاف نتایج حاصله از مطالعه حاضر در خصوص اشرشیاکلی می‌باشد. در مطالعه ای دیگر Tavakoli و Riazipour در سال 2008 تعداد 72 نمونه از 4 نوع غذای مصرفی در 6 مرکز درمانی و آموزشی را از نظر آلودگی باکتریایی با استفاده از محیط‌های کروموژن مورد بررسی قرار دادند و میانگین تعداد کلی باکتری‌ها، کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی در هر گرم از نمونه‌ها را تعیین کردند [16].

در مطالعه ای که توسط Finneya و همکاران در سال 2003 برای تشخیص و شمارش انتروباکتریاسه از نمونه‌های مدفوع افراد سالم انجام گرفت، از محیط کروموژنیک Chromocult Coliform Agar (CCA) استفاده شد و از مقایسه آن با محیط MacConkey Agar در این مطالعه به این

می‌باشد. در مطالعه دیگری که Ferris و همکاران در سال 2017 انجام دادند؛ جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های پاتوژن/اشرشیاکلی، سودوموناس آنروجنوزا، کلبسیلا پنومونیا و استرپتوکوکوس اکویی از محیط‌های کروموژنیک حاوی آگار استفاده گردید و با سه روش دیگر غیر کروموژنیک مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج مطالعه این محققین نشان داد که به طور کلی بین این چهار روش، همچون مطالعه حاضر در خصوص اشرشیاکلی تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و ضمناً توسط محیط آگار کروموژن به کار گرفته شده (کروموژنیک آگار) در این مطالعه به طور میانگین 96 درصد موارد بیمار جداسازی گردید که در مقایسه با دیگر روش‌ها، از توانایی بالاتری برخوردار بود [12].

Geissler و همکاران (2000) تعیین کمی کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی نمونه‌های آب دریا با روش کروم کالت و فلوروژن را مورد تحقیق قرار دادند، در این تحقیق عملکرد محیط Chromocult Coliform Agar (CCA) و فلوروژن LMX broth با روش استاندارد چند لوله‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. اطلاعات به دست آمده از آزمایش‌های متعدد نشان‌دهنده تفاوت عمده در محیط‌های فلوروژن (LMX) و کروموژن (CCA) در شمارش کلی فرم‌ها بود ($P < 0/05$). همچنین در این تحقیق بیان شد روش استاندارد چند لوله‌ای در شمارش اشرشیاکلی از حساسیت پایینی برخوردار است، اگرچه اختلاف آماری معنی‌داری میان این سه روش در شمارش اشرشیاکلی مشاهده نشد [8] که از این نظر مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. در تحقیقی مشابه در سال 2002، Beloti و همکارانش در برزیل از محیط Readycult-LMX برای تشخیص سریع کلی فرم و اشرشیاکلی استفاده کردند و بدین منظور، 125 نمونه شیر پاستوریزه و خام تهیه و با استفاده از محیط Readycult-LMX و نیز روش تکنیک مرجع چند لوله‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل حاکی از انطباق خوب دو روش با یکدیگر به ترتیب معادل ($r = 0/8224$) و ($r = 0/8603$) برای تشخیص کلی فرم و اشرشیاکلی بود. این محققین عنوان نمودند که محیط Readycult-LMX از سهولت بیشتری برای استفاده برخوردار است و مضاف بر آن که در مدت زمان کمتر و حداکثر 24 ساعت نتایج را مشخص می‌سازد [13]. در بررسی که Manafi و

مختلف به کار رفته در کشت، زمان انکوباسیون، درجه حرارت به کار رفته در انکوباسیون، استفاده از روش های غنی سازی اولیه قبل از انجام کشت و ... باشد در همین راستا در مطالعه Rattanabumrung و همکاران در سال 2012، باکتری *Chromocult Coliform* اشرشیاکلی در محیط کروموژنیک *Agar* تحت شرایط مختلف دمای انکوباسیون، اثر تنش حرارتی بر رشد کلنی و بروز رنگ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور باکتری مذکور بر روی محیط *Chromocult Coliform* *Agar* کشت داده شدند. نتایج حاکی از آن بود که در محدوده دمایی 30 تا 45 درجه سانتیگراد پس از 16 ساعت انکوباسیون، رنگ کلنی اشباع شد در حالی که افزایش حجم کلنی به مدت 48 ساعت ادامه داشت و در دمای بالای 45 درجه سانتیگراد رشد اشرشیاکلی متوقف شد [21]. در مطالعه Kalchayanand و همکاران (2013) سروتپ های مختلف اشرشیاکلی (O121, O145, O26, O45, O103O111) از *Chromogenic Agar Medium* استفاده شده است و بیان شد که توانایی این محیط کروموژنیک برای انتخاب و تشخیص این پاتوژن ها براساس ترکیبی از مصرف کربوهیدرات ها، فعالیت بتا-گالاکتوزیداز و مقاومت در برابر عوامل انتخابی است. محیط آگار در ترکیب با روش جدید جداسازی بر پایه ایمونومغناطیسی برای تشخیص و جداسازی این شش سروگروپ اشرشیاکلی از گوشت گاو تازه که بطور تجربی آلوده شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. این محققین اعلام داشتند که این جداسازی با موفقیت انجام پذیرفت [22]. به همین ترتیب در مطالعه Fazlara و همکاران در سال 2012 بستنی های پاستوریزه از نظر آلودگی به اشرشیاکلی با استفاده از روش امیدانس که بر پایه هدایت الکتریکی می باشد و محیط کروموژنیک *Rapid E.coli 2/ Agar* مورد بررسی قرار گرفتند که نظر آماری این دو روش در تشخیص اشرشیاکلی اختلاف معنی داری نداشتند ($p > 0/05$) [23].

4- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر درصد انطباق نمونه های آلوده به کلی فرم ها بین سه محیط کروموژن *Coliform Agar ES*

نتیجه رسیدند که از نظر آماری این دو روش اختلاف معنی داری در شناسایی کلی فرم ها و اشرشیاکلی ندارند ($p > 05/0$) و با همبستگی ($r = 0/86$) بین این دو محیط، محیط *CCA* یک جایگزین مناسب برای *MacConkey Agar* محیط می باشد [17]. در همین راستا Maheux و همکاران در سال 2008 از محیط های کروموژنیک *MI ReadyCult Coliforms 100 (ReadyCult)*، *Colilert Chromocult Coliform Agar (MI)* و همچنین *ES* استفاده شد و عملکرد این محیط ها براساس توانایی تشخیص تولید آنزیم β -glucuronidase و β -galactosidase در کلی فرم ها و اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه محیط *Colilert* و محیط *MI* به ترتیب ضعیف ترین در تشخیص آنزیم β -glucuronidase و آنزیم β -galactosidase در بین چهار محیط مورد بررسی بودند و هر چهار روش به دلیل سطح بالای نتایج منفی کاذب در تشخیص اشرشیاکلی مناسب تشخیص داده نشدند [18] که از این نظر منطبق با نتایج تحقیق حاضر در مورد اشرشیاکلی می باشد. البته Maheux و همکاران (2014) با توجه به نتایج مطالعه فوق در مطالعه دیگر برای ارزیابی کیفیت میکروبیولوژیکی آب از نظر آلودگی به کلی فرم ها و اشرشیاکلی در روش فیلتراسیون غشایی از محیط کروموژنیک *Chromocult Coliform Agar ES* که بهترین نتایج را در سال 2008 نشان داده بود استفاده نمودند [19] که بر همین قیاس در مطالعه حاضر از محیط مذکور در مقابل 2 محیط کروموژن دیگر و نیز روش مرجع استفاده گردید اما بر اساس نتایج حاصل، بیشترین میزان توافق محیط کروموژن با روش مرجع در مورد شناسایی اشرشیاکلی مربوط به دو محیط *Chrom Agar ECC* و *Rapid E.coli 2/ Agar* و نه *Chromocult Coliform Agar ES* بود. این در حالی است که در مطالعه Charimba و همکاران (2012) که بر روی 100 نمونه گوشت گاو و بوقلمون در آفریقای جنوبی و پروتپ های مختلف اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت، از محیط کروموژنیک *Chromocult Coliform agar* در کنار روش های دیگر استفاده شده است [20]. علت مشاهده و گزارش نتایج متناقض در خصوص یک محیط کشت توسط محققین مختلف می تواند به دلایل متفاوت از جمله روش های تکنیکی

- Microbiology. 4th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp: 335-350.
- [3] Beauchamp, C.J., Simao-Beauvoir, A.M., Beaulieu, C. and Chalifour, F.P. (2006). Confirmation of *E.coli* among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips screening rejects and paper sludges. *Water Research*, 40(12): 2452-2462.
- [4] Tavakoli, A. (1995). *Medical Microbiology and Immunology*. Compiled by Levinson, Warren Ay and Jawetz, Ernest. Publishing Vice-Chancellor for Research of Isfahan University of Medical Sciences. pp: 157-145.
- [5] Bayat, M., and Manafi, M. (2005). Chromogenic and fluorigenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 45-48.
- [6] Manafi, M., (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3): 205-218.
- [7] Manafi, M., Romans, H. and Geissler, K.M. (2005). Quantitative determination of total Coliforms and *E. coli* in marine waters with chromogenic and fluorigenic media. *Journal of Applied Bacteriology*, 98: 280-285.
- [8] Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I. and Alonso, J. L. (2000). Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorigenic media. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 280-285.
- [9] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms colony count technique*, National Standard Reference No. 9263.
- [10] Jay, James. M. (2000). *Modern Food Microbiology*. Vol. 1., 4th edition. Champan and Hall, New York, pp:81-82, 227, 355.
- [11] González, R. D., Tamagnini, L. M., Olmos, P. D. and De Sousa, G.B. (2003). Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichiacoli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 20(5): 601-604.
- [12] Ferris, R.A., Palmer, B.A., Borlee, B.R., and McCue, P.M. (2017). Ability of chromogenic agar, MALDI-TOF, API 20E and

ChromAgarECC و Rapid E.coli 2/Agar و مرجع به ترتیب 73، 77 و 72 درصد بود که اختلاف معنی داری با روش مرجع نداشتند. همچنین درصد انطباق نمونه‌های آلوده به اثرشیاکلی بین سه محیط کروموژن Coliform Agar و RapidE.coli 2/ Agar و ChromAgar ECC.ES با روش مرجع به ترتیب 68، 70 و 70 درصد مشاهده شد که بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد. همچنین در سه محیط کروموژن Rapid Coliform Agar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar نتایج مربوط به کلی فرم به ترتیب 71/43، 78/57 و 78/57 درصد مثبت کاذب و 19/77، 13/95 و 19/77 درصد منفی کاذب نسبت به نتایج روش مرجع وجود داشت و نیز در سه محیط کروموژن Coliform Agar ES، Rapid E.coli 2/Agar و ChromAgar ECC به اثرشیاکلی به ترتیب 67/65، 70/59 و 64/71 درصد مثبت کاذب و 13/64، 9/09 و 12/12 درصد منفی کاذب محاسبه شد. بر اساس نتایج آزمون مک‌نمار که حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین این سه محیط کروموژن با روش مرجع در تشخیص کلی فرم‌ها بود، می‌توان از روش‌های مذکور به عنوان جایگزینی برای روش مرجع در تشخیص کلی فرم‌ها استفاده نمود ($p > 0/05$) ولی با وجود اختلاف معنی دار ملاحظه شده بین این سه محیط کروموژن با روش مرجع در تشخیص اثرشیاکلی، محیط‌های کروموژن مورد مطالعه جایگزین مناسبی در تشخیص اثرشیاکلی برای روش مرجع نمی‌باشند ($p < 0/001$).

5- سپاسگزاری

هزینه‌های انجام مطالعه حاضر از طریق پژوهانه سال 1397 دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است که بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌نماید.

6- منابع

- [1] Jain, S., and Khety, Z., (2012). Changing antimicrobial resistance pattern of isolates from an ICU over a 2 year period. *Journal of Association Physicians India*, 60:8-28.
- [2] Mahon, C.R., Lehman, D.C., and Manuselis J.G., (2010). *Textbook of Diagnostic*

- Picard, F. J., Bissonnette, L., Bernier, J. L. T., and Bergeron, M. G. (2008). Analytical limits of four β -glucuronidase and β -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichiacoli* and total coliforms. *Journal of Microbiological Methods*, 75(3): 506-514.
- [19] Maheux, A. F., Dion-Dupont, V., Bisson, M. A., Bouchard, S., and Rodriguez, M. J. (2014). Detection of *Escherichiacoli* colonies on confluent plates of chromogenic media used in membrane filtration. *Journal of Microbiological Methods*, 97: 51-55.
- [20] Charimba, G., Hugo, C., and Hugo, A. (2012). The incidence of diarrhoeagenic *Escherichiacoli* in minced beef and boerewors. *Food Research International*, 47(2): 353-358.
- [21] Rattanabumrung, O., Sangadkit, V., Supanivatin, P., and Thipayarat, A. (2012). Kinetics of *E. coli* colony area expansion and color development in Chromocult coliform Agar (CCA) under different incubation conditions. *Procedia Engineering*, 32: 134-140
- [22] Kalchayanand, N., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Wells, J. E., and Wheeler, T. L. (2013). Chromogenic agar medium for detection and isolation of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from fresh beef and cattle feces. *Journal of Food Protection*, 76(2): 192-199.
- [23] Fazlara, A., Izadi, B., and Abbasnia, M. (2012). Investigation of pasteurized Ice-creams for *E.coli* contamination using impedance and culture in a chromogenic media. *Veterinary Laboratory Research*, 4 (1): 228-229.
- 20 Strep strips, and BBL crystal enteric and gram-positive identification kits to precisely identify common equine uterine pathogens. *Journal of Equine Veterinary Science*, 57: 35-40.
- [13] Beloti, V., Arros, M. D. A. F., Nunes, M. P., Santana, E. H. W. D., Nero, L. A., and Souza, J. A. D., (2002). Use of Readyult LMX for enumeration of total coliforms and *Escherichiacoli* in milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(1): 49-52.
- [14] Pitkänen, T., Paakkari, P., Miettinen, I. T., Heinonen-Tanski, H., Paulin, L. and Hänninen, M. L. (2007). Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichiacoli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3): 522-529.
- [15] Bonadonna, L., Cataldo, C., Chiaretti, G., Coccia, A., and Semproni, M. (2005). A new method for the detection of coliforms and *Escherichiacoli* in water intended for human consumption. *Igiene e Sanita Pubblica*, 61(6): 569-584.
- [16] Tavakoli, H. R. and Riazipour, M. (2008). Microbial quality of cooked meat foods in Tehran University's Restaurants. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 24(4): 595-599.
- [17] Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S., and Storey, D. M. (2003). Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods*, 54(3): 353-358.
- [18] Maheux, A. F., Huppé, V., Boissinot, M.,

Comparative Evaluation of Contamination to Coliforms and *E.coli* in Foods by Using Different Chromogenic Medias and Their Correlation with Reference Method

Sohrabi, L.¹, Fazlara, A.^{2*}, Pourmahdi Brujeni, M.²

1. Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

(Received: 2019/05/17 Accepted: 2020/02/16)

Various methods have been developed to detect the presence of contamination with Coliforms and *E. coli* in foods. The pour plate technique using VRBA medium is confirmed as a standard method in Iran. The biggest disadvantage of this method is the need to spend a lot of time, high volume of laboratory operations, multiple stages and ultimately long time to achieve the results. Today, due to the mass production of various foodstuffs, the need for faster methods with high sensitivity to control the quality of food is necessary for the responsible oversight centers. The use of chromogenic medias is also one of the fastest diagnostic methods that have been developed. According to this matter, a comparative study was considered from the results of application of three chromogenic media and reference method in food quality control. Totally 100 samples of foodstuffs were evaluated for contamination to Coliform and *E.coli* using standard method and three chromogenic medias. Based on the obtained results, 86, 79, 85 and 80 samples were contaminated to Coliform using the standard method, Coliform Agar ES, ChromAgar ECC and Rapid *E.coli* 2/Agar respectively. Also, using four mentioned methods, contamination to *E.coli* was reported at 66, 80, 84 and 80, respectively. Cochran test showed that there was no significant difference between the four methods in Coliform diagnosis ($p>0.05$). However, four methods did not have the same function in the detection of *E. coli* so that the chromogenic methods showed significant difference with the standard method ($p<0/001$). But there was no significant difference between these chromogenic methods in detecting *E.coli* ($p>0.05$). According to the statistical analysis of present study, three chromogenic medias can be used instead of the standard method for the detection of Coliform, but the use of these chromogenic medias is not recommended for the identification of *E.coli*.

Keywords: Coliforms, *E. coli*, Chromogenic, Reference Method

* Corresponding Authors Email Address: a.fazlara@scu.ac.ir