مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی شیوع آلودگی *اشریشیا کلی* O157:H7 در بستنی‌های سنتی و دست‌ساز در واحدهای صنفی عرضه‌کننده بستنی شهر بندرعباس و ارزیابی محیط کروموژنیک در مقایسه با محیط استاندارد برای تشخیص آن

مریم اقبالی[۱]، درنوش جعفرپور[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۰

کلمات کلیدی:

اشریشیا کلی O157:H7،

بستنی سنتی،

محیط کشت کروموژن،

روش استاندارد.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.07

* مسئول مکاتبات:

d.jafarpour84@yahoo.com

چکیده

کلی‌فرم‌ها، به ویژه *اشریشیا کلی* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده گاستروانتریت و شاخص میکروبی آلودگی آب و مواد غذایی محسوب می‌گردند. سویه‌های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک به دلیل ایجاد اسهال خونی و سندرم همولیتیک اورمیا از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای محسوب می‌گردند، که *اشریشیا کلی* O157:H7 مهم‌ترین و شایع‌ترین این گونه است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی شیوع آلودگی *اشریشیا کلی* O157:H7 در بستنی‌های سنتی و دست‌ساز و مقایسه کارآمدی محیط کروموژن با محیط استاندارد جهت تشخیص آن بود. در این مطالعه، تعداد ۹۰ نمونه بستنی سنتی از مراکز تولید و توزیع این فرآورده از سه منطقه شهری شهر بندرعباس، در دو فصل گرم و سرد جمع‌آوری و به منظور شمارش کلی‌فرم‌ها، جستجوی *اشریشیا کلی* و جستجوی *اشریشیا کلی* O157:H7 از دو روش استاندارد و کروموژن استفاده شد. نتایج نشان دادند که تعدادکلی‌فرم در ۸۱/۱ ٪ از نمونه‌ها بیش از حد مجاز استاندارد بود، و ۲۸/۹ ٪ از نمونه‌ها آلوده به *اشریشیاکلی* بودند. *اشریشیاکلی* O157:H7، ۲/۲ ٪ به روش استاندارد و ٤/٤ ٪ به روش استفاده از محیط کشت‌های کروموژن از نمونه‌ها جداسازی گردید. تحلیل‌های انجام شده نشان داد که با استفاده از محیط‌های حاوی مواد کروموژن، می‌توان با حداقل خطای احتمالی، *اشریشیا کلی* O157:H7 را تشخیص داد. طی این تحقیق مشخص شد که روش کروموژن برای شناسایی *اشریشیا کلی* O157:H7 بهتر از روش استاندارد می‌باشد. هم‌چنین نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که می‌باید نظارت دقیق‌تری بر کیفیت و وضعیت بهداشتی بستنی‌های سنتی و دست‌ساز صورت گیرد.

۱- مقدمه

اشریشیا کلی[1] زیر گروه خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد و به صورت فلور طبیعی در روده بزرگ حیوانات خونگرم همزیستی می‌کند [۱]. این باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی، گاهی دارای کپسول و فاقد اسپور است و نیز بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. از میان گونه‌های بیماری‌زای این باکتری گونه *انتروهموراژیک*[2] *اشریشیاکلی*، به دلیل ایجاد اسهال خونی و سندرم همولیتیک اورمیا (HUS[3]) اهمیت ویژه‌ای دارد. سندرم HUS در موارد شدید ممکن است باعث مرگ و یا از کار افتادن کلیه شود [۲]. *اشریشیا کلی* O157:H7 مهم‌ترین و شایع‌ترین این گونه است [۳]. این باکتری مهم‌ترین پاتوژنی است که از طریق غذا منتقل می‌شود. منبع اصلی این سویه گاوها هستند [٤]. گونه *E. coli* O157:H7 اولین بار در سال ۱۹۸۲ در شیوع اسهال خونی در آمریکا تحت عنوان عامل پاتوژن انسانی شناسایی شد [۵]. دوز عفونی *اشریشیا کلی* O157:H7 همانند شیگلا، بسیار کم است به طوری که ورود کمتر از ۱۰۰ سلول و گاهی اوقات ۱۰ سلول به بدن برای ایجاد بیماری کافی است. مصرف مواد غذایی غیر پاستوریزه، مواد غذایی نیم‌پز و تماس مستقیم با مدفوع حیوان از جمله عوامل مهم در انتقال این باکتری به انسان گزارش شده است. علاوه بر این، انتقال بیماری از طریق دست آلوده نیز امکان پذیر است و بیماران بدون علامت می‌توانند به راحتی باعث انتقال عفونت از فردی به فرد دیگر شوند [٦].

روش‌های معمول کشت *اشریشیاکلی* در آزمایشگاه بیش از ۷۲ ساعت به‌طول می‌انجامد و در بیشتر مواقع نیازمند آزمایشات افتراقی و تکمیلی جهت اثبات حضور باکتری در غذا است. اخیراً استفاده از روش‌های تشخیص سریع، این مشکلات را تا حد زیادی مرتفع نموده، و با داشتن سرعت و دقت بسیار بالا، شناسایی میکروارگانیسم‌ها سریع‌تر شده است [۷]. یکی از روش‌های جدید که در دهه‌ی اخیر برای تشخیص نسبتاً سریع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در آب و مواد غذایی مطرح گردیده محیط‌های رنگ آفرین[4] هستند، که استفاده از آن‌ها می‌تواند نیاز به کشت فرعی و آزمون‌های بیوشیمیایی اضافی را برای تعیین هویت باکتری‌های مورد نظر از میان بردارد. اساس این روش ایجاد ماده‌ی زمینه‌ای برای آنزیم‌های اختصاصی میکروارگانیسم‌ها بوده و بر مبنای نوع رنگ تولید شده به راحتی می‌توان نوع میکروارگانیسم را تشخیص داد [۸]. روش تشخیص باکتری‌ها در محیط‌های کشت کروموژنیک به دلیل عدم نیاز به استفاده از انواع مختلف محیط‌های کشت و از طرفی امکان انجام غنی‌سازی و جداسازی به‌صورت همزمان بسیار مقرون به صرفه بوده و جواب‌دهی سریع در صنایع از ضرر و زیان‌های احتمالی در خط تولید جلوگیری می‌کند. در برخی از مطالعات از محیط‌های کشت کروموژن در تشخیص برخی از باکتری‌ها از جمله *اشریشیاکلی* استفاده شده است اما در مورد کاربرد آن‌ها درشناسایی این باکتری بیماری‌زا در مواد غذایی لبنی مطالعه چندانی صورت نگرفته است. Karpísková و همکاران (۲۰۰۰)، طی تحقیقی برای تشخیص *لیستریامونوسایتوژنز* در مواد غذایی، از سه روش PCR، محیط کروموژنیک و روش استاندارد استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که نتایج روش کروموژنیک و PCR مشابه بوده و این دو روش جایگزین مناسب روش استاندارد برای تأیید سریع *لیستریامونوسایتوژنز* در مواد غذایی می‌باشد [۹]. Fricker و همکاران (۲۰۰۸)، در مطالعه‌ای روش استاندارد را با محیط‌های رنگی کروموژنیک برای جداسازی و شناسایی *باسیلوس‌سرئوس* بر روی ۱۰۰ نمونه آلوده مقایسه کردند و گزارش کردند که محیط کشت‌های کروموژنیک جایگزین مناسب برای دو محیط کشت برای جداسازی و شناسایی *باسیلوس‌سرئوس* در مواد غذایی است [۱۰]. محیط‌های کشت استاندارد حتی توسط کارکنان بسیار آموزش‌دیده در شناسایی *باسیلوس‌سرئوس* می‌توانند گاهی منجر به شناسایی نادرست و نادیده گرفتن بیماری ناشی از *باسیلوس‌سرئوس* باشد.

بستنی به دلیل مواد غذایی فراوان، pH نزدیک به خنثی و نگهداری طولانی مدت آن، محیط مناسبی برای رشد میکروب‌ها به‌ویژه در فصل تابستان است. در تولید سنتی به دلیل استفاده از شیرهای غیرپاستوریزه و عدم توجه به روند اعمال حرارت کافی بر روی مخلوط اولیه، آلودگی ظروف تهیه، نحوه توزیع و نگهداری، ظروف بسته‌بندی و بطورکلی عدم رعایت موازین بهداشت فردی وبهداشت محیطی در طول روند تولید، زمینه بروز آلودگی‌های میکروبی مختلف در این فرآورده را فراهم می‌آورد [۱۱]. از آنجا که بستنی به عنوان یک

1. *Escherichia coli*
2. *Enterohemorrahgic Escherichia coli (EHEC)*
3. Hemolytic Uremic Syndrome
4. Chromogenic Medium

ماده غذایی توسط سنین مختلف استفاده می‌شود و از نظر منبع تهیه و شرایط بافری و دمایی بسیار مستعد برای آلودگی با باکتری‌هاست، لذا بررسی شیوع آلودگی *اشریشیاکلی* O157:H7 در بستنی‌های سنتی و دست‌ساز اهمیت ویژه‌ای دارد. هم‌چنین محیط کشت کروموژنیک می‌تواند، جایگزین محیط‌های کشت استاندارد به‌عنوان یک آزمون سریع [1]جهت تشخیص *اشریشیاکلی* O157:H7 باشد. لذا در این پژوهش قصد بر این است که بررسی شیوع آلودگی *اشریشیاکلی* O157:H7 در بستنی‌های سنتی و دست‌ساز در واحدهای صنفی عرضه‌کننده بستنی شهر بندرعباس انجام گیرد و هم‌چنین ارزیابی کارایی محیط کروموژنیک به عنوان یک روش سریع، جهت جایگزین محیط‌های کشت استاندارد برای تشخیص آن صورت گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری از بستنی‌های سنتی

برای آزمون بر روی بستنی‌های سنتی به شکل تصادفی از سه منطقه شهری شهر بندرعباس نمونه‌برداری شد. شهر بندر عباس از سه منطقه شهری تشکیل شده است: منطقه یک (منطقه شرقی)، منطقه دو (منطقه مرکزی) و منطقه سه (منطقه غربی). منطقه یک نسبت به منطقه دو و منطقه دو نسبت به منطقه سه، از نظر شاخص درآمد، تحصیلات و فرهنگ، در سطح مطلوب‌تری قرار دارند. هم‌چنین مراکز خرید، بازارها، در منطقه دو و در منطقه سه اسکله و بازار قرار دارد. از هر منطقه شهری، ۱۵نمونه در فصل سرد و ۱۵ نمونه در فصل گرم، از همان مرکز فروش و فقط از یک نوع بستنی که بستنی وانیلی بود نمونه‌برداری انجام شد. تا تمام نمونه‌ها دارای شانس و شرایط مساوی باشند. لوازم نمونه‌برداری و ظروف نمونه سترون شده بودند و با استفاده از یک قاشق یا کاردک سترون حداقل ۱۰۰ گرم نمونه برای آزمون‌های میکروبیولوژی با استفاده از روش‌های آسپتیک برداشته شد. به دلیل اینکه شرایط میکروبیولوژی بستنی به صورتی که به دست مصرف‌کننده می‌رسد باید آزمایش می‌گردید، به همان گونه که در مراکز عرضه توزیع می‌گردید، نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها را سریعاً به ظرف سترون انتقال و درب آن‌ها فوراً بسته و بلافاصله در ظروف عایق مناسب حمل نمونه که از قبل سرد شده[2] بودند، قرار داده شد [۱۲] و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمون در انجماد کامل (دمای ۱۸- درجه سلسیوس) نگهداری شدند [۱۳].

۲-۲- آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه بستنی

جهت آماده‌سازی سوسپانسیون نمونه بستنی می‌بایست بستنی به پایداری حرارتی مناسبی رسانده می‌شد تا قابلیت نمونه‌برداری داشته باشد. از این رو، بستنی در دمای (۱۸-۲۷) درجه سلسیوس (دمای آزمایشگاه) به مدت یک ساعت نگهداری شد. پس از پایان زمان فوق نمونه‌ها بلافاصله آزمون شدند. جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه‌ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده‌سازی و دست‌کاری نمونه با رعایت شرایط اسپتیک[3] و تجهیزات سترون انجام شد. سپس در اتاق کشت زیر هود لامینار، ۲۵ گرم از آزمایه در یک شیشه مخصوص رقت‌گیری سترون توسط ترازو (AND، مدل HL-I، ژاپن) با حساسیت ۰/۰۱ توزین شد. ۲۲۵ میلی‌لیتر از رقیق‌کننده استریل (پپتون واتر [4]بافری) در دمای اتاق اضافه و مخلوط شد. بدین صورت سوسپانسون اولیه آماده‌سازی و روی شیکر[5] گذاشته شد. قابل ذکر است که بستنی در طول مخلوط کردن ذوب شد [۱۴ و ۱۵].

۲-۳- شمارش کلی‌فرم‌ها

جهت شمارش از روش پورپلیت دو لایه استفاده شد. بدین منظور، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه بستنی در مرکز پلیت خالی استریل ریخته و سپس حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت جامد مک کانکی آگار[6] با دمای حدود ۴۴تا ۴۷ درجهٔ سلسیوس در پلیت مذکور ریخته شد. پس از مخلوط کردن کامل محیط کشت با سوسپانسیون، پلیت‌ها روی سطح افقی و خنک قرار گرفت، برای کنترل سترونی محیط کشت، یک پلیت شاهد را که فقط حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت بود، تهیه گردید. پس از بسته شدن کامل محیط کشت مجدداً حدود ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار با دمای حدود ۴۴ تا ۴۷ درجهٔ سلسیوس روی آن اضافه شد. بعد از خنک

1. Rapid test

2. Cool box
3. Aseptic
4. Peptone Water
5. Shaker
6. MacConkey agar

شدن پلیت‌ها، به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. از همان سوسپانسیون اولیه به میزان ۱ میلی‌لیتر به لوله حاوی محیط کشت برلیانت گرین بایل براث [1]اضافه گردید و به عنوان آزمون تاییدی به همراه پلیت‌های مک کانکی گرمخانه‌گذاری شد [۱۴]. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، کلونی‌های قرمز ارغوانی با قطر حداقل ۰/۵ میلی‌متر گاهی با هالهٔ مایل به قرمز ناشی از رسوب صفرا، کلونی‌های شاخص کلی‌فرم هستند. حد مجاز کلی‌فرم cfu/gr ۱۰۰در نظر گرفته شد [۱۳].

۲-۴- جستجو و شناسایی *اشریشیا کلی* به روش استاندارد

۲-۴-۱- تلقیح وگرمخانه‌گذاری محیط کشت انتخابی (آبگوشت لوریل سولفات [2])

۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه به دو لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر لوریل سولفات با غلظت مضاعف اضافه کرده و لوله‌های تلقیح شده به همراه یک لوله حاوی محیط کشت به عنوان شاهد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت۲۴ساعت قرار داده شد. اگر در این مرحله گاز و یا کدورت مشاهده نشد، گرمخانه‌گذاری تا ۴۸ ساعت ادامه داده و پس از گرمخانه‌گذاری چنانچه هرگونه کدورت یا گاز مشاهده شد از این لوله به لوله حاوی محیط کشت مایع EC [3] تلقیح گردید [۱۴ و ۱۵].

۲-۴-۲- تلقیح و گرمخانه‌گذاری محیط انتخابی EC براث

پس از گرمخانه‌گذاری لوله‌های کشت، چنانچه هرگونه کدورت یا گاز در لوله مشاهده شد، بوسیله حلقه کشت [4]، از آن برداشت گردید و به محیط کشت EC تلقیح شد و در حمام آب گرم (Germany, Memmert) ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. چنانچه در این مرحله هیچ گازی در لوله EC مشاهده نشد، مدت زمان گرمخانه‌گذاری تا ۴۸ ساعت ادامه داده شد.

1. Brilliant green bile broth
2. Lauryl Sulfate Broth
3. *Escherichia coli* broth
4. Loop

۲-۴-۳- تلقیح و گرمخانه‌گذاری آب پپتونه

پس از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها چنانچه در آن‌ها گاز مشاهده شد، بوسیله حلقه کشت، از آن به محیط آب پپتونه که دمای آن به ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است، تلقیح شد و در دمای ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید.

۲-۴-۴- بررسی تولید اندول

۰/۵ میلی‌لیتر از معرف اندول به لوله‌های آب پپتونه که گرمخانه‌گذاری شده بود اضافه گردید و پس از یک دقیقه بررسی شد. ایجاد رنگ قرمز در فاز الکلی وجود اندول را مشخص نمود [۱۵].

۲-۴-۵- جستجو و شناسایی *اشریشیا کلی* O157:H7

جستجو و شناسایی *اشریشیا کلی* O157:H7 به دو روش استاندارد و با استفاده از محیط کروموژنیک آگار صورت گرفت.

۲-۴-۶- شناسایی *اشریشیا کلی* O157:H7 با استفاده از روش استاندارد

۲-۴-۶-۱- کشت بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار [5]

حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت استریل ذوب شده سوربیتول مک کانکی آگارکه به دمای حدود ۴۴ تا ۴۷ درجهٔ سلسیوس رسیده را در پلیت‌های استریل یکبار مصرف ریخته شد. سپس پلیت‌ها روی سطح افقی و خنک قرار داده شد تا ببندند. از لوله‌های EC براث بستنی‌هایی که اشریشیا *کلی* مثبت شدند به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر با لوپ بر روی پلیت حاوی محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار کشت خطی داده شد، پلیت‌های کشت داده شده به همراه یک پلیت شاهد حاوی محیط کشت را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها بررسی شدند [۶].

۲-۴-۶-۲- کشت بر روی محیط نوترینت آگار [6]

کلونی‌های بی‌رنگ به علت تخمیر نشدن سوربیتول که بر روی محیط SMAC رشد نموده بودند، بر روی محیط کشت نوترینت آگار جهت بدست آوردن کشت خالص به‌صورت

5. Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)
6. Nutrient Agar

کشت سطحی کشت داده و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند.

۲-٤-۷- آزمایش آگلوتیناسیون[1]

در گوشه‌ای از لام شیشه‌ای تمیز یک قطره آنتی سرم O157:H7 (شرکت بهار افشان، ایران) و در گوشه دیگر آن یک قطره نرمال سالین[2] قرار داده شد. از کلونی ۲٤ ساعته کشت داده شده بر روی نوترینت آگار در هر دو قطره مخلوط گردید تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید. لام را به مدت ٦۰ ثانیه به آرامی به عقب و جلو چرخانده و ایجاد آگلوتیناسیون بررسی شد (دستورالعمل شرکت کروم آگار) [۱٦].

۲-٤-۸- شناسایی *اشریشیاکلی* O157:H7 با استفاده از محیط کشت کروموژن

زیر هود لامینار و در شرایط استریل ۰/۱ میلی¬لیتر از لوله آبگوشت لوریل سولفات کشت داده شده که به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شده با یک پیپت استریل برداشته و بر روی پلیت حاوی محیط کروموژنیک O157:H7 (CHROMagarTM 0157) هر کدام ۰/۱ میلی¬لیتر به صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون کلونی‌های رشد کرده مورد بررسی قرار داده شد (دستورالعمل شرکت کروم آگار) [۱٦]. رشد کلونی‌های ارغوانی روشن روی محیط کشت کروموژنیک آگار، آلودگی به *اشریشیا کلی* O157:H7 را تایید می‌کند (جدول ۱). رشد کلونی‌های آبی متالیک روی این محیط مشخصه گونه‌های دیگر کلی فرم می‌باشد و کلونی‌های خاکستری یا بی‌رنگ نشان‌دهنده وجود پروتئوس در نمونه مورد آزمون است (جدول ۱).

Table 1 Color changes of colonies on CHROMagarTM 0157 media

Colony color	Microorganism
Bright purple	*E. coli* O157:H7
Metallic blue	Coliforms
Gray or colorless	*Proteus*

۲-٤-۹- آنالیز آماری

در این مطالعه، جامعه مورد مطالعه نمونه‌های بستنی سنتی برداشت شده از بستنی فروشی‌های سه منطقه شهرداری شهر بندرعباس به صورت کاملا تصادفی بود و آزمون ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت پذیرفت. منحنی‌های مربوطه در محیط EXCEL توسط نرم افزار OFFICE 2016 رسم شدند. نتایج ابتدا در معرض تجزیه واریانس یکطرفه قرار گرفته و سپس برای مقایسه میانگین‌ها و بررسی اختلاف معنی-داری بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی-داری ۹۵٪ استفاده گردید. هم‌چنین جهت مقایسه فصول سرد و گرم از آزمون Independent-Samples T-Test استفاده شد. مرز معنی‌دار بودن P-value< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شمارش کلی‌فرم در بستنی

در منطقه یک، در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، ٦۳/۳ ٪ از نمونه‌ها تعداد کلی‌فرم بیش از حد مجاز داشتند، که از ۱۵ نمونه فصل سرد، ۹ (٦۰ ٪) نمونه و از ۱۵ نمونه فصل گرم، ۱۰ (٦٦/۷ ٪) نمونه، آلودگی به کلی‌فرم در آن‌ها بیش ازحد مجاز مشاهده گردید (جدول ۳). در تحلیلی که بین نمونه‌های دو فصل گرم و سرد انجام گرفت، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه یک از نظر آلودگی به کلی‌فرم وجود ندارد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۲). در منطقه دو، در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده، ۲٤ (۸۰ ٪) نمونه، شمارش کلی‌فرم بیش از حد مجاز داشتند، که از ۱۵ نمونه در فصل سرد ۱۱ (۷۳/۳ ٪) نمونه و از ۱۵ نمونه فصل گرم، ۱۳ (۸٦/۷ ٪) نمونه، آلودگی به کلی‌فرم در آن‌ها بیش ازحد مجاز مشاهده گردید (جدول ۳). در تحلیل آلودگی به کلی‌فرم بین نمونه‌های دو فصل گرم و سرد، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه دو وجود دارد ($P<۰/۰۵$). در منطقه سه، ۱۰۰٪ نمونه‌ها، شمارش کلی‌فرم بیش از حد مجاز داشتند. نمونه قابل قبولی در هیچ یک از فصول از نظر کلی‌فرم وجود نداشت (جدول ۳). در تحلیل آلودگی به کلی‌فرم بین دو فصل گرم و سرد، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه سه وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

در کل از ۹۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم (٤۵ نمونه) و فصل سرد (٤۵ نمونه)، ۷۳ (۸۱/۱ ٪) نمونه، آلوده به

1. Agglutination Test
2. Normal Saline

کلی‌فرم بودند، که از ٤٥ نمونه در فصل سرد، ٣٥ (٧٧/٨ ٪) نمونه و از ٤٥ نمونه فصل گرم، ٣٨ (٨٤/٤ ٪) نمونه، آلودگی به کلی‌فرم بیش از حد مجاز بود (جدول ٣). و در تحلیل میانگین تعداد کلی‌فرم در بستنی‌های دو فصل گرم و سرد، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل از نظر میانگین تعداد کلی‌فرم وجود داشت (P<٠/٠٥).

Table 2 Status of coliform contamination in traditional handmade ice creams (cfu/g) in Bandar Abbas according to region and season

Sample	Region 1		Region 2		Region 3	
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Cold season	1.3×10^{3aA}	1.6×10^{3}	5.1×10^{3abA}	4.8×10^{3}	7.4×10^{3bA}	6.3×10^{3}
Warm season	7.5×10^{2aA}	9.1×10^{2}	2.0×10^{3aB}	2.2×10^{3}	4.7×10^{3bA}	5.0×10^{3}
Total ice cream	1.0×10^{3a}	1.3×10^{2}	3.6×10^{3ab}	4.0×10^{3}	6.1×10^{3b}	8.8×10^{3}

The same lowercase letters are not significantly different between different regions at $P > 0.05$. The same uppercase letters are not significantly different between seasons at $P > 0.05$. Acceptable limit for coliforms is 100 cfu/g.

Table 3 Number of ice cream contaminated with coliform in Bandar Abbas by region and season

Region	Cold season			Warm season			Total warm and cold seasons		
	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)
Region1	15	9	60	15	10	66.7	30	19	63.3
Region2	15	11	73.3	15	13	86.7	30	24	80
Region3	15	15	100	15	15	100	30	30	100
Total	45	35	77.8	45	38	84.4	90	73	81.1

شیوع بالای کلی‌فرم‌ها در بستنی سنتی می‌تواند به دلیل آلودگی محیطی یا تولید غیربهداشتی بستنی و روش‌های ذخیره باشد. فاکتورهای دیگری مانند افزودنی‌ها ممکن است در آلودگی نقش داشته باشد. مواد اولیه بستنی شامل شیر، شکر، ثعلب، وانیل، دست کارگران، اسکوپ و ظروف نگهداری، منابع اصلی آلودگی بستنی‌های سنتی به شمار می‌آیند. عدم وجود سیستم صحیح دفع مدفوع و فاضلاب، عدم دسترسی به منابع سالم آب، عدم توجه به اعمال حرارت کافی به مخلوط اولیه بستنی، نقش بسزایی در افزایش بار میکروبی این فرآورده یا انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از طریق آن دارد. بهداشت شخصی ضعیف کارگران و کارکنان تهیه فرآورده و عدم شستشوی دست‌ها یا عدم استفاده از مواد پاک‌کننده در شستشوی آن‌ها و نیز تماس دست‌ها با دهان، بینی در حین تهیه فرآورده‌ها در انتقال عوامل باکتریایی مختلف از جمله *اشریشیا کلی* به فرآورده نقش بسزایی دارد. Joshi و همکاران (٢٠٠٤) در بررسی بر روی کیفیت میکروبی بستنی‌های شهر کاتماندو کشور نپال مشاهده کردند که ٦٨/١٪ از نمونه‌ها آلودگی کلی‌فرمی داشتند [١٧]. مطالعات در دنیزلی ترکیه توسط Yaman و همکاران (٢٠٠٦)، نیز نشان داد که حدود ٥٥ و ٦٦ درصد از نمونه‌های بستنی‌های عرضه شده در مراکز فروش، به ترتیب به میکروب‌های *کلی‌فرم* و *استافیلوکوکوس* آلوده بوده و شمارش کلی‌فرم در آنها ١٠×٢/٤ تا ^{٤}١٠×٥/٥ بود [١٨]. مطالعه Ekhtelat وهمکاران (٢٠١١) بر روی ١٢٠نمونه بستنی سنتی از مناطق مختلف اهواز نشان داد که از ١٢٠نمونه، به ترتیب ٩٤ (٧٨/٣٣ ٪) و ١٣نمونه (١٠/٨٣ ٪) آلوده به کلی‌فرم و *اشریشیا کلی* بودند [١٩]. در یک مطالعه توصیفی که بر روی ٨٠ نمونه بستنی سنتی از شهر کرمانشاه توسط Emami و همکاران (٢٠١٣) انجام گرفت، تعداد ٥٤ (٦٧/٥ ٪) نمونه شمارش کلی‌فرم بیش از حد مجاز بودند [٢٠]. مطالعات Shadan و همکاران (٢٠٠٣) نیز در زاهدان نشان داد درصد آلودگی بستنی به کلی‌فرم‌ها در فصل بهار ٧٢ درصد و در تابستان ٦٤ درصد بود. هم‌چنین میزان آلودگی به *اشریشیاکلی* در فصل بهار ٢ درصد و درفصل تابستان ٥/٣ درصد بود [٢١]. در این بررسی هم مشخص گردید که درصد بالایی از بستنی‌های سنتی توزیع شده از بابت کیفیت بهداشتی با استانداردهای موجود در جامعه منطبق نبوده‌اند. اغلب این

آلودگی‌ها ثانویه هستند و حتی با وجود سالم‌سازی مخلوط بستنی، نیز ایجاد می‌گردند.

۳-۲- شناسایی *اشریشیا کلی* در بستنی

پس از گرمخانه‌گذاری چنانچه در هریک از لوله‌های EC براث، گاز مشاهده شد و در لوله آب پپتونه اندول تولید شد از نظر وجود *اشریشیاکلی* در حجم و یا وزن مورد آزمون، مثبت و در غیر این صورت منفی در نظر گرفته شد. **در** منطقه یک، در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، تعداد ٦ نمونه (٪۲۰)، *اشریشیا* مثبت گزارش شد که از ۱۵ نمونه فصل سرد، ۲ نمونه (۱۳/۳ ٪) و از ۱۵ نمونه فصل گرم، ٤ نمونه (۲٦/۷ ٪) ، *اشریشیا* مثبت بودند (جدول ۵). در تحلیل آلودگی به *اشریشیاکلی* بین دو فصل گرم و سرد، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه یک وجود ندارد (P>۰/۰۵). در منطقه دو، در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، تعداد ۸ نمونه (۲٦/۷ ٪)، *اشریشیا* مثبت گزارش شد، که از ۱۵ نمونه فصل سرد ۲ نمونه (۱۳/۳ ٪) و از ۱۵ نمونه فصل گرم، ٦ نمونه (٤۰ ٪)، *اشریشیاکلی* مثبت بودند. در تحلیل آلودگی به *اشریشیاکلی* بین دو فصل گرم و سرد نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه دو وجود ندارد (P>۰/۰۵). در منطقه سه، در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، تعداد ۱۲نمونه (٤۰ ٪)، *اشریشیا* مثبت گزارش شد، که از ۱۵ نمونه فصل سرد ۲ نمونه (۱۳/۳ ٪) و از ۱۵ نمونه فصل گرم، ۱۰ نمونه (٦٦/۷ ٪)، *اشریشیاکلی* مثبت بودند. در تحلیل آلودگی به *اشریشیا کلی* بین دو فصل گرم و سرد نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل در منطقه سه وجود دارد (P<۰/۰۵). در کل از ۹۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و فصل سرد (هر کدام ٤۵ نمونه)، تعداد ۲٦ نمونه (۲۸/۹ ٪)، *اشریشیا* مثبت گزارش شد، که از ٤۵ نمونه در فصل سرد ٦ نمونه (۱۳/۳ ٪) و از ٤۵ نمونه فصل گرم، ۲۰ نمونه (٤٤/٤ ٪)، به *اشریشیاکلی* آلوده بودند (جدول ۵). در تحلیل آلودگی به *اشریشیاکلی* بین بستنی‌های دو فصل گرم و سرد، نشان داد که اختلاف معناداری بین دو فصل از نظر *اشریشیاکلی* وجود داشت (P<۰/۰۵). در آنالیز داده‌های بدست آمده از آزمون *اشریشیاکلی* بین نمونه‌های سه منطقه، در دو فصل گرم و سرد، مشخص شد که در فصل سرد در سه منطقه اختلاف معناداری بین نتایج مشاهده نشد. اما میانگین داده‌ها در فصل گرم، نشان داد که در مناطق یک و سه اختلاف معناداری از نظر آلودگی به *اشریشیاکلی* وجود دارد (P<۰/۰۵) (جدول٤).

Table 4 Contamination of traditional homemade ice cream with *Escherichia coli* (cfu/g) in Bandar Abbas according to region and season

Sample	Region 1	Region 2	Region 3
Cold season	1.13 ± 0.35^{aA}	1.13 ± 0.35^{aA}	1.13 ± 0.35^{aA}
Warm season	1.27 ± 0.45^{aA}	1.40 ± 0.50^{abA}	1.67 ± 0.48^{bB}
Total ice cream	1.20 ± 0.40^{a}	1.27 ± 0.45^{a}	1.40 ± 0.49^{a}

Results are shown as mean ± standard deviation. The same lowercase letters are not significantly different between different regions at $P > 0.05$. The same uppercase letters are not significantly different between seasons at $P > 0.05$.

Table 5 Number of *Escherichia coli* positive samples in both warm and cold seasons in three regions of Bandar Abbas

Region	Cold season			Warm season			Total warm and cold seasons		
	Samples (No.)	*E. coli* positive (No.)	*E. coli* positive (%)	Samples (No.)	*E. coli* positive (No.)	*E. coli* positive (%)	Samples (No.)	*E. coli* positive (No.)	*E. coli* positive (%)
Region1	15	9	60	15	10	66.7	30	19	63.3
Region2	15	11	73.3	15	13	86.7	30	24	80
Region3	15	15	100	15	15	100	30	30	100
Total	45	35	77.8	45	38	84.4	90	73	81.1

با توجه به اینکه *اشریشیا کلی* شاخص کنترل بهداشتی آب و مواد غذایی است و طبق استاندارد نباید بستنی به این باکتری آلوده باشد، آلودگی ۲۸/۹٪ از نمونه‌های بستنی مورد آزمایش به این باکتری برای مسئولین بهداشتی سازمان، هشداردهنده بوده و می‌تواند موجب بروز عفونت و مسمومیت غذایی در بین مصرف‌کنندگان گردد. گزارشات زیادی از آلودگی بستنی به باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه *اشریشیاکلی* وجود دارد که نتایج بدست‌آمده از مطالعه ما با نتایج سایر مطالعات انجام شده مطابقت دارد. این آلودگی می‌تواند، نتیجه عدم رعایت بهداشت فردی، استفاده از مواد اولیه آلوده و عدم پاستوریزه کردن شیر باشد. آب آلوده، مگس و سایر حشرات، ظروف کثیف محیط و دست‌های آلوده به نوعی موجب آلودگی بستنی می‌شوند و می‌توانند عوامل بیماری‌زایی چون *اشریشیاکلی*، را منتقل نمایند. به نظر می‌رسد سطح فرهنگ تولیدکنندگان و توزیع‌کنندگان این فرآورده در خصوص رعایت اصول و موازین بهداشتی باعث افزایش آلودگی‌های ثانویه می‌شود. سطح توقعات، در آمد، تحصیلات و فرهنگ مصرف‌کنندگان، می‌تواند هم‌چنین در این رابطه نقش ایفا کند. وجود مراکز خرید، بازارها، اسکله، در نتیجه ازدحام جمعیت در مناطق دو و مخصوصا منطقه سه عوامل مهمی در ایجاد آلودگی‌های ثانویه می‌باشد. با توجه به این که در فصل گرما تعداد مصرف‌کنندگان بستنی نسبت به فصل سرما بیشتر است و همچنین با توجه به گرمای هوا، بخصوص در شهر بندرعباس که شرایط رشد باکتری‌ها را بالاتر می‌برد، این افزایش در میزان آلودگی به *اشریشیاکلی* در فصل گرما را توجیه می‌کند. هم‌چنین در فصل گرما امکان دست‌کاری این فرآورده به علت مشتریان بیشتر، توسط کارکنان شاغل در مراکز توزیع بیشتر است و آلودگی وسایل و تجهیزات مورد استفاده برای عرضه بستنی به دلیل استفاده مکرر بیشتر می‌شود. هر فردی که به این مراکز به عنوان مشتری وارد می‌شود می‌تواند یک عامل آلوده‌کننده محیط باشد. Shahryari و همکارانش (۲۰۱۰)، طی تحقیقی که بر روی ۱۰۰ نمونه بستنی سنتی شهر گرگان انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که میزان آلودگی نمونه‌های بستنی به *اشریشیاکلی* و *انتروباکتریاسه* به ترتیب حدود ۳۶ و ۱۱درصد می‌باشد و در کل، حدود ٤٠ درصد نمونه‌ها، قابلیت مصرف نداشتند [۲۲]. در مطالعه‌ای که در واحدهای صنفی عرضه‌کننده بستنی سنتی شهر بیرجند توسط Abolhassannejad و همکاران (۲۰۱۷) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج مطالعه نشان داد که از تعداد ۹٦ نمونه بستنی سنّتی جمع‌آوری شده از سطح شهر، ۲۵ نمونه قابل قبول و ۷۱ نمونه غیرقابل مصرف بودند. بیشترین آلودگی مربوط به آلودگی به باکتری‌های *انتروباکتریاسه* با ۳۹نمونه (٤٠٪) ، کمترین میزان آلودگی نیز مربوط به *اشریشیاکلی* با ١٤ (١٥ ٪) نمونه گزارش گردید. ۳۹ آلودگی (٤٢/٤ ٪) مربوط به کلی‌فرم بود [۲۳]. در یک بررسی که توسط Shokrforosh & Jafarpour(۲۰۰٦) انجام گرفت، تعداد ۷۰ واحد تولید و عرضه بستنی سنتی در مناطق مختلف شهر شیراز بطور تصادفی انتخاب گردید. سپس از آن‌ها نمونه بستنی تهیه و بر اساس استاندارد ملی ایران مورد آزمایش‌های میکروبی قرار گرفت. از نظر تعداد *انتروباکتریاسه* ۹۲/٦ درصد نمونه‌ها و از نظرآلودگی به *اشرشیاکلی* ۲۰ درصد نمونه‌ها، آلودگی بالاتر از حد استاندارد ملی ایران داشتند [٢٤]. نتایج Karim و همکاران (۱۹۹٤) نیز نشان داد که در پنج منطقه تهران (شمال، شرق، غرب، جنوب و مرکز) ٦۳/٦۱ درصد در شمال، ۸۱/۰۸ درصد در جنوب، ۷۲/۹ درصد در شرق، ۸۵/۷ درصد در مرکز و۷۵/۸ درصد در غرب به *اشریشیاکلی* آلوده بودند [۲۵].

۳-۳- جستجوی *اشریشیاکلی* O157:H7 به روش استاندارد

رشد کلونی‌های بی‌رنگ بر روی محیط سوربیتول مک کانکی آگار و ایجاد آگلوتیناسیون واضح و مشخص در قطره آنتی‌سرم، بیانگر واکنش مثبت بود. طبق نتایج بدست آمده در منطقه یک، پس از جستجو بین ٦ نمونه آلوده به *اشریشیاکلی*، فقط ۱ نمونه در فصل سرد، *اشریشیاکلی* O157:H7 در آن تایید شد. در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، ۱ نمونه (۳/۳ ٪) *اشریشیاکلی* O157:H7 مثبت در منطقه یک گزارش شد (جدول٦). در منطقه دو، از ۳۰ نمونه بستنی، هیچ گونه مورد مثبت *اشریشیاکلی* O157:H7 تایید نشد و در منطقه سه، پس از جستجو بین ۱۲ نمونه *اشریشیاکلی* مثبت، ۱نمونه در فصل گرم *اشریشیاکلی* O157:H7، مثبت بود. در کل از ۹۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و فصل سرد (هر کدام ٤٥ نمونه)، ۲ نمونه (۲/۲ ٪) *اشریشیاکلی* O157:H7 به روش استاندارد، جداسازی گردید (جدول ٦). در مطالعه‌ای در اسپانیا توسط Caro و همکاران (۲۰۰٦)، به بررسی وجود

اشریشیاکلی O157:H7 در نمونه‌های شیر گوسفند جمع‌آوری شده از کارخانه‌های تولید پنیر پرداختند و مشاهده کردند که از تمام نمونه‌های شیر گوسفند بررسی شده، تنها ۳ مورد مثبت بود [۲۶]. در بررسی که توسط Rahimi و همکاران (۲۰۱۱) برای تعیین آلودگی به *اشریشیاکلی* O157 در بستنی‌های شهرهای اصفهان، چهار محال بختیاری و اهواز، به روش استاندارد صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که از مجموع ۱۲۰ نمونه بستنی، ٤ نمونه به *اشریشیاکلی* O157 آلوده بودند [۲۷].

۳-٤- جستجوی *اشریشیاکلی* O157:H7 به روش کروموژن

نتایج حاصل از روش کروموژن در جدول ٦ آورده شده است. در منطقه یک، پس از جستجو بین ٦ نمونه *اشریشیاکلی* مثبت، ۱ نمونه در فصل سرد، *اشریشیاکلی* O157:H7 مثبت بود. در کل از ۳۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و سرد (هر کدام ۱۵ نمونه)، ۱ نمونه (۳/۳ ٪) *اشریشیاکلی* O157:H7 مثبت، در منطقه یک تایید شد (جدول ٦). در منطقه دو، بین ۸ نمونه آلوده به *اشریشیاکلی*، فقط ۱ نمونه در فصل گرم، *اشریشیاکلی* O157:H7 مثبت بود. در منطقه سه، پس از جستجو بین ۱۲ نمونه *اشریشیاکلی* مثبت، ۲ نمونه در فصل گرم *اشریشیاکلی* O157:H7، مثبت بودند. در کل از ۹۰ نمونه بستنی جمع‌آوری شده در فصل گرم و فصل سرد (هر کدام ٤٥ نمونه)، ٤ نمونه (٤/٤ ٪) *اشریشیاکلی* O157:H7 به روش استفاده از محیط کشت کروموژن جداسازی گردید (جدول ٦).

Table 6 Number and percentage of ice creams contaminated with *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157: H7 by both standard and chromogenic methods

Region	*Escherichia coli*			*Escherichia coli* O157:H7 by Standard method			*Escherichia coli* O157:H7 by Chromogenic method		
	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)	Samples (No.)	Contaminated samples (No.)	Contaminated samples (%)
Region1	30	6	20	30	1	3.3	30	1	3.3
Region2	30	8	26.7	30	0	0	30	1	3.3
Region3	30	12	40	30	1	3.3	30	2	6.7
Total	90	26	28.9	90	2	2.2	90	4	4.4

وضعیت واقعی *اشریشیاکلی* O157:H7 در ایران ناشناخته است و اطلاعات کمی در مورد شیوع *اشریشیاکلی* O157:H7 در غذاهای مصرف شده در کشور موجود است. جدا شدن به میزان کم *اشریشیاکلی* O157:H7 از نمونه‌ها، دلیل بر عدم وجود آلودگی به این باکتری نمی‌باشد، زیرا شاید تراکم سایر انواع *اشریشیاکلی* و وجود باکتری‌های مختلف در بستنی و اثر نامطلوب و ممانعت‌کننده رشد آن‌ها بر روی باکتری باشد. مطالعه Tavakoli و همکاران (۲۰۱۳) که برای تعیین آلودگی به *اشریشیاکلی* O157:H7 در مواد غذایی منتخب در برخی از رستوران‌های شهر تهران با استفاده از محیط‌های کشت کروموژن صورت گرفت. از مجموع ۹٦ نمونه مورد آزمایش شامل ٤۸ نمونه کباب کوبیده و ٤۸ نمونه سالاد، ۱۰ نمونه (۱۰/٤ ٪) به *اشریشیاکلی* آلوده بودند که از این ۱۰ نمونه، ٦ مورد آن آلودگی به *اشریشیاکلی* سروتایپ O157 را نشان دادند [۱٦]. Fricker و همکاران (۲۰۰۸)، در مطالعه‌ای به ارزیابی روش استاندارد و استفاده از محیط‌های رنگی کروموژن برای جداسازی و شناسایی *باسیلوس‌سرئوس*، بر روی ۱۰۰ نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس* (۸۰ نمونه ماده غذایی و ۲۰ نمونه بالینی) پرداختند و به این نتیجه رسیدند که محیط کشت کروموژن یک جایگزین مناسب برای محیط کشت استاندارد جهت جداسازی و شناسایی *باسیلوس‌سرئوس* در مواد غذایی است. محیط‌های کشت استاندارد حتی توسط کارکنان بسیار آموزش دیده در شناسایی *باسیلوس‌سرئوس* می‌توانند گاهی منجر به شناسایی نادرست و نادیده گرفتن بیماری ناشی از *باسیلوس‌سرئوس*شود [۱۰].

نتایج بررسی‌ها نشان دادند که تعداد کلی‌فرم در ۷۳ (۸۱/۱ ٪) نمونه بیش از حد مجاز استاندارد بود. ۲٦ (۲۸/۹ ٪) نمونه آلوده به *اشریشیاکلی* بود که *اشریشیاکلی* O157:H7 از ۲ نمونه (۲/۲ ٪) و ٤ (٤/٤ ٪) نمونه بستنی، به ترتیب به روش استاندارد و کروموژن جداسازی گردید (شکل ۱). بستنی به

عنوان یک فرآورده لبنی مغذی، محیط مناسبی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های مختلف و انتقال عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت یا مسمومیت‌های غذایی به مصرف‌کنندگان است. یافته‌های حاصل از بررسی حاضر و تحقیقات مشابه در نقاط مختلف ایران و جهان، بر بالا بودن احتمال بروز آلودگی‌های میکروبی مختلف در بستنی و انتقال به مصرف‌کنندگان را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از این بررسی و نیز تحقیقات انجام شده بر روی این فرآورده و نقش آن در انتقال عوامل باکتریایی مختلف به مصرف‌کنندگان، تهدید سلامتی آن‌ها را بارزتر می‌نماید. لذا می‌بایست نظارت دقیق‌تری بر کیفیت و وضعیت بهداشتی بستنی‌های سنتی و دست‌ساز صورت گیرد. در این بررسی مشخص گردید که درصد بالایی از بستنی‌های سنتی توزیع‌شده از نظر کیفیت بهداشتی با استانداردهای موجود در جامعه منطبق نبوده‌اند. از این رو، باید جهت ارتقای سلامت جامعه در رساندن کیفیت بهداشتی آنها به سطح استاندارد تلاش نمود. به نظر می‌رسد پاستوریزاسیون مخلوط اولیه بستنی و یا اعمال حرارت کافی بر روی آن، به منظور کنترل آلودگی‌های اولیه و همچنین ارتقای سطح فرهنگ تولیدکنندگان و توزیع‌کنندگان این فرآورده در خصوص رعایت اصول و موازین بهداشتی به منظور کاهش بروز آلودگی‌های ثانویه، از راه‌های افزایش‌دهنده سطح کیفیت بهداشتی این فرآورده باشند.

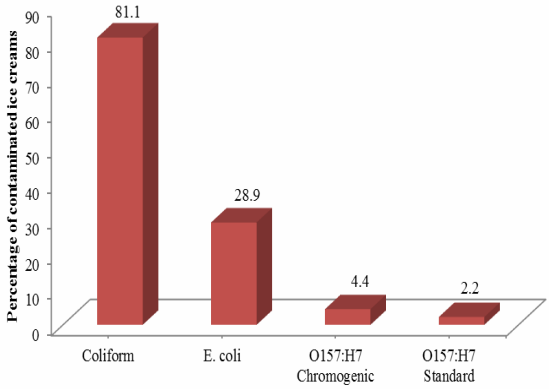

Fig 1 Percentage of contamination of traditional ice creams in Bandar Abbas

اگر چه بالا نبودن سطح بهداشتی در یک منطقه و انتقال میکروارگانیسم‌های مختلف از طریق مواد غذایی آلوده، میزان ایمنی اکتسابی افراد را در برابر بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌دهد، ولی کودکان، افراد مسن و افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و برخی دیگر از اقشار آسیب‌پذیر جامعه، همواره در برابر بیماری‌های ناشی از این میکروارگانیسم‌ها حساسیت بیشتری دارند.

٤- نتیجه‌گیری

اشریشیاکلی باکتری مقاومی است که می‌تواند هفته‌ها و ماه‌ها درآب و مواد غذایی به ویژه در دمای صفر درجه سلسیوس زنده بماند. ازآنجا که بستنی به عنوان یک ماده غذایی توسط سنین مختلف استفاده می‌شود، از نظر منبع تهیه، شرایط بافری و دمایی بسیار مستعد برای آلودگی با این باکتری است. در این پژوهش، وجود *اشریشیاکلی* O157:H7 با استفاده از روش کروموژن در ٤ نمونه (٤/٤ ٪) تایید شد، ولی به روش استاندارد فقط از ٢ نمونه، *اشریشیاکلی* O157:H7 جداسازی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و کم بودن نمونه‌های آلوده به این باکتری، هیچ گونه همبستگی و ارتباط معناداری بین این دو روش نمی‌توان لحاظ کرد. با توجه به میزان کم این گونه باکتری در بستنی، این تفاوت نتایج در دو روش می‌تواند به دلیل رنگی بودن محیط کروموژنیک آگار باشد که راحت‌تر می‌توان کلونی‌ها را تشخیص داد. قابل توجه است که محیط کشت کروم آگار، اختصاصی عمل می‌نماید و مشکلات محیط‌های کشت سوربیتول مک کانکی آگار را ندارد. تحلیل‌های انجام شده نشان داد که با استفاده از محیط‌های حاوی مواد کروموژنیک، می‌توان با حداقل خطای احتمالی *اشریشیاکلی* O157:H7 را تشخیص داد. بنابراین روش کروموژن یک روش دستی و آسان‌تر است و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است و می‌توان به عنوان یک روش جایگزین، بجای روش استاندارد استفاده کرد.

٥- منابع

[1] Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T. & Karch, H. (2002). Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. Journal of Clinical Microbiology, 40(4), 1441–1446.

[2] Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H. & Wells, J. G. (2001). The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: Microbiologic, Serologic, Clinical, and Epidemiologic Findings. The

Kurdistan province and its relationship with personal hygiene and the environment. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 10, 53-60. [in persian]

[12] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products – Guidance on sampling. 2008, ISIRI No: 326. [in Persian]

[13] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of milk and milk products – Specifications and test methods. 2017, ISIRI No: 2406. [in Persian]

[14] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique. 2008, ISIRI No: 11166. (ICS: 07.100.30) [in Persian]

[15] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of food and animal feeding stuffs— Detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*— Most probable number technique. 2005, ISIRI No: 2946. [in Persian]

[16] Tavakoli, H., Sarshar, M., Ranjbar, R., Sadr Mumtaz, M. T. & Rafati, H. (2013). Infection with *Escherichia coli* O157: H7 in selected foods in some restaurants in Tehran using chromogen culture media. Journal of Infectiousand Tropical Diseases, 63, 61-67. [in Persian]

[17] Joshi, D. R., Shah, P. K., Manandhar, S., Sharma, S. & Banmali, P. (2004). Microbial quality of ice cream sold in Kathmandu. Journal of Nepal Health Reserch Council, 2(2), 37-40.

[18] Yaman, H., Elmali, M., Ulukanli, Z., Tuzcu, M. & Genctav, K. (2006). Microbial quality of ice cream sold openly by retail outlets in Turkey. Revue Med, 157(10), 457-462.

[19] Ekhtelat, M., Zaheripour, Z. & Shekar riz, B. (2011). The Survey on Contamination Value of *Staphylococcus aureus*, Coliform and *E.coli* in Traditional Ice Cream Offered in Ahvaz Market. Journal of Food Hygiene, 1(3 (3)), 15-23. [in persian]

[20] Emami, S., Akya, A., Hossain Zadeh, A. & Barkhordar, S. (2013). Bacterial contamination of traditional ice creams in Kermanshah in 2008. Iran J Med Microbiol, 7(2) :59-62. [in persian]

[21] Shadan, M., Khoushabi, F. & Safari, F. (2003). The evaluation of physicochemical

Journal of Infectious Diseases, 183(7), 1063–1070.

[3] Lim, J. Y., Yoon, J. & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(1), 5–14.

[4] Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 62(1), 1–10.

[5] Jonaidi Jafari, N., Ranjbar, R., Haghi-Ashtiani, M. T., Abedini, M. & Izadi, M. (2009). The study of prevalence and antimicrobial susceptibility of tracheal bacterial strains isolated from pediatric patients. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(5), 455–8.

[6] Lim, J. Y., Yoon, J. & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(1), 5–14.

[7] Voss, A. & Doebbeling, B. N. (1995). The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents, 5(2), 101–106.

[8] Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., & Berche, P. (2000). Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 38(4), 1587–1591.

[9] Karpísková, R., Pejchalová, M., Mokrosová, J., Vytrasová, J., Smuharová, P. & Ruprich, J. (2000). Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. Journal of Microbiological Methods, 41(3), 267–71.

[10] Fricker, M., Reissbrodt, R. & Ehling-Schulz, M. (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology, 121(1), 27–34.

[11] Hajir, M., Rashidi, K., Sanobartahai, S., Rashadmanesh, N. & Mofrah, N. (2005). Investigation of the type and extent of contamination of traditional ice cream in

and microbial status of traditional ice cream in Zahedan. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. (TABIB-E-SHARGH), 4(4), 215-221. [in persian]

[22] Shahryari, A., Tabarsaa, H., Ghasemi, S., Shahinei, A. & Ghodes Mofidi, E. (2010). Evaluation of traditional ice cream contamination to *Escherichia coli* and Enterobacteriacea in Gorgan ice cream enterprises in 2010. Journal of Health and Hygiene, 1(2 (2)), 7-14. [in persian]

[23] Abolhassannejad, M., Sharifzadeh, G., Naseri, K., Abedi, A., Yousefi, S. & Nakhaei, A. (2017). Short article: Prevalence of microbial contamination of traditional ice cream in ice cream suppliers Traditional of Birjand in 2015. Scientific Journal of Birjand University of Medical Sciences, 24 (1), 73-78.

[24] Shokrforosh, S. & Jafarpour, B. (2006). Comparison of the bacterial and chemical properties of traditional iranian ice cream produced in Shiraz with with Iran natinal standard. Iranian Journal of Food Science and Technology, 3(2), 11-17.

[25] Karim, G., Razavi, L. & Akhonzade, A. (1994). The survey on the bacterial contamination of traditional ice cream. Journal of Vaterinary Research, 50, 71-76.

[26] Caro, I., Fernández-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A. & García-Armesto, M. R. (2006). Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe's milk in Spain. Journal of Food Protection, 69(4), 920–4.

[27] Rahimi, E., Shekarchian Chaleshtori, S. & Parsaei, P. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran. African Journal of Microbiology, 5(22), 3706-3710.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Study the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 contamination in traditional and handmade ice-cream in ice-cream supplier trade units of Bandar Abbas and evaluating the efficiency of chromogenic media compared to the standard media for its detection

Eghbali, M.[1], Jafarpour, D.[2*]

1. M. Sc. Graduated of the Department of Food Science and Technology, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran.
2. Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 05/ 10
Accepted 2021/ 07/ 11

Keywords:

Escherichia coli O157: H7,
Traditional ice cream,
Chromogenic medium,
Standard method.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.07

*Corresponding Author E-Mail:
d.jafarpour84@yahoo.com

ABSTRACT

Coliforms, especially *Escherichia coli*, are one of the most important causes of gastroenteritis and microbial index of water and food contamination. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are considered to be the most important intestinal pathogens due to hemorrhagic diarrhea and hemolytic syndrome, of which *E. coli* O157: H7 is the most important and common. The purpose of this study was to investigate the prevalence of *E. coli* O157: H7 contamination in traditional and homemade ice creams and compare the efficiency of chromogenic media with standard media for its detection. In this study, 90 samples of traditional ice cream from the production and distribution centers of this product were collected from three urban regions of Bandar Abbas, in two warm and cold seasons and in order to count the coliforms and detect *E. coli* and *E. coli* O157: H7, two standard and chromogenic methods were used. The results indicated that 81.8% of samples had more than the standard number of coliforms, and 28.9% of the samples were contaminated with *E. coli*. *E. coli* O157: H7 contamination was detected 2.2% and 4.4% using standard and chromogenic methods, respectively. Analyzes showed that application of media containing chromogenic substances, *E. coli* O157: H7 could be detected with the least possible error. It was found that the use of chromogenic culture media to identify *E. coli* O157: H7 was better than the standard method. The results of the present study also indicate that the quality and health status of traditional and handmade ice creams should be more closely monitored.