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

لیلا سهرابی[1]، علی فضل‌آرا [2*]، مهدی پورمهدی بروجنی[3]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران 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 آننیاز 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 محیط های 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 غذاییارزیابی آلودگی به کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* به روش مرجع و سه محیط کروموژن صورت گرفت. براساس نتایج حاصله به ترتیب86، 79، 85 و80نمونه با استفاده از روش‌های مرجع، Coliform Agar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/ Agar آلوده به کلی‌فرم تشخیص داده شدند. همچنین با استفاده از چهار روش مذکور، آلودگی به *اشرشیا کلی* به ترتیب 66، 80، 84 و 80 گزارش شد.آزمون کوکران نشان داد که تفاوتی بین چهار روش درتشخیص کلی‌فرم وجود ندارد($p>0/05$). اما چهار روش‌مذکور 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 محیط های 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 بی هوازی اختیاری می‌باشند، این باکتری از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه به شمار می‌رود[1]. *اشرشیاکلی* به عنوان ارگانیسم کنترلی جهت انجام آزمایش‌های کنترلی مؤثر بودن عوامل ضدمیکروبی و مواد ضدعفونی کننده استفاده می‌شود و به عنوان ارگانیسم 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* به‌دلیل از دست دادن آنزیم فرمنت‌هیدروژناز[1]گاز تولید نمی‌کنند و همین امر موجب تعاریف آنزیمی جدیدی گردید که از آن جمله می‌توان به‌وجود آنزیم‌های بتا-دی گالاکتوزیداز در کلی‌فرم‌ها وبتا-دی گلوکورونید از در 96-94 درصد از سویه‌های *اشرشیاکلی* اشاره نمود [3]. تشخیص فعالیت بتاگلوکورونیداز برای تشخیص و شمارش *اشرشیاکلی* به خوبی شناخته شده است. از این ویژگی در محیط‌های کشت انتخابی این ارگانیسم‌ها و همچنین در تهیه محیط‌های کروموژنیک جدید استفاده می‌شود. محیطهای کروموژنیکی از روش‌های تشخیص نسبتا سریع میکروارگانیسمهای بیماریزا در آب و مواد غذایی هستند که مورد استفاده قرار گرفته‌اند[4]. مادهٔ زمینهای بکار رفته در محیط‌های کروموژن برای آنزیم‌های اختصاصی میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شده و بر مبنای رنگ تولید شده به راحتی میتوان نوع میکروارگانیسم را شناسایی نمود[5]. در واقع بسیاری از مواد پس از واکنش با آنزیم های میکروبی یا دیگر اجزاء آنها محصولات رنگی یا فلورسنت تولیدمی‌کنند و از این خاصیت برای شناسایی استفاده می‌شود. سوبستراهای مورد استفاده برای محیط های کروموژن یک عمدتاً از مشتقات فنل و ایندولو بسیاری از سوبستراهای محیط های 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-برومو4-کلرو3-ایندول‌بتادی‌گلوکورونید می‌توان فعالیت آنزیم بتا-دی‌گلوکورونیداز را در سویه‌های مختلف *اشرشیاکلی* اندازه گرفت. همچنین ماده کروموژن 5-بروموو6-کلرو3-ایندول‌بتا-دی‌گالاکتوپیرانوزید برای تعیین وجود آنزیم بتا-دی‌گالاکتوزیداز مورد استفاده قرارگرفته است. براساس این تعاریف جدید محیط‌های کشت تجارتی گوناگون برای جستجو و شناسایی کلی‌فرم‌ها به *ویژه اشرشیاکلی* با استفاده از مواد زمینه‌ای کروموژن ابداع گردیده است که امکان کشف همزمان میکروارگانیسم‌ها را در آب و موادغذایی 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 محیط های 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 کروموژنیک (3 محیط کروموژن) از نظر وجود آلودگی به کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* و میزان تطابق نتایج حاصله از آن‌ها با روش مرجع در کنترل کیفیت موادغذایی 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، شرقف غرب و مرکز شهر اهواز جمع آوری شدند. نمونه های 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 تائید 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 گرمخانه گذاری می‌گردد. در مرحله بعد از لوله‌های گاز مثبت سبز درخشان که بیانگر تائید وجود کلی‌فرم می‌باشد مجدداً به محیط کشت آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان حاوی لوله دورهام و نیز محیط آب پپتونه (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 تائید گشته و چنانچه با افزودن معرف کواکس به محیط آب پپتونه، حلقه قرمزرنگ ایجاد شود دلیل بر احتمال قریب‌به‌یقین *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 صورتی‌که باکتری مورد بررسی ازنظر اندول و متیل‌رد مثبت بوده و ازنظر وگس‌پروسکوئر و سیترات منفی باشد، وجود *اشرشیاکلی*نوع یک[1]محرز می‌گشت، همچنین درصورتی‌که واکنش متیل‌رد مثبت، ولی اندول و وگس‌پروسکوئر و سیترات هر سه منفی باشند، دلیل بر وجود نوعی *اشرشیاکلی* غیرتیپیک (سویه‌های نوع دو[2]*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 Rapid E.coli 2/Agar (Bio-Rad-فرانسه) بودند که در تهیه این محیط‌ها طبق دستور شرکت‌های سازنده به جز محیطRapid E.coli 2/Agar که استریل کردن آن اختیاری ذکرشده بود، نیازی به اتوکلاو کردن نداشتند. در تهیه دو محیط Chromocult Coliform Agar ES و ChromAgarECC حرارت دادن در فواصل زمانی بسیار 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 دمای37 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/Agarنمونه‌های 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 19به طور 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، 100نمونه 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 کلی‌فرمی (86 درصد) و تعداد 66 نمونه آلوده به *اشرشیاکلی* (66 درصد) بودند. حال آن که بر اساس سه محیط کروموژنیک ChromocultColiform Agar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar به ترتیب تعداد 79 و 85 و 80 نمونه از مجموع نمونه‌ها آلودگی به کلی‌فرم و به ترتیب تعداد 80 و 84 و 80 نمونه آلودگی به *اشرشیاکلی* را نشان دادند.

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	*Escherichiacoli*

بررسی آماری نشان داد که بین سه محیط کروموژنیک با روش مرجع، اختلاف معنا داری در تشخیص کلی‌فرم وجود ندارد (P>0/05). اما بین سه محیط کروموژنیک و روش مرجع اختلاف معنی‌داری در تشخیص *اشرشیاکلی* وجود دارد (P<0/001). به عبارت دیگر این سه محیط کروموژن در تشخیص کلی‌فرم‌ها 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 کروموژن Chromocult ColiformAgar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar با روش مرجع، در تشخیص کلی‌فرم‌ها به ترتیب 73، 77 و 72 درصد بود (جداول۳،٤ و5) که در این بررسی بیشترین میزان توافق محیط کروموژن با روش مرجع مربوط به محیط ChromAgar ECC با 77 درصد بود. حساسیت و ویژگی محیط‌های کروموژن Chromocult ColiformAgar ES ، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar به ترتیب (80/23 و 28/57)، (86/05 و 21/43) و (80/23 و 21/43) درصد به دست آمد. همچنین مقادیر محاسبه شده آماره کاپا برای محیط‌های کروموژن فوق الذکر به ترتیب 0/07،۰/0 و 0/014 بود.

Table 3 Comparison of Chromocult Coliform Agar ESwith 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 کروموژنیک Chromocult Coliform Agar ES، ChromAgarECC و RapidE.coli 2/Agarدر تشخیص *اشرشیاکلی* به ترتیب 68، 70 و 70 درصد می‌باشد (طبق جداول 6، 7 و8) که در این بررسی بیشترین میزان توافق محیط کروموژن با روش مرجع مربوط به دو محیط ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar با 70 درصد بود. حساسیت و ویژگی محیط‌های کروموژن Chromocult ColiformAgar ES، ChromAgar ECC 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 کروموژن فوق الذکر به ترتیب 0/21، 0/23 و 0/26 بود و بطور کلی آزمون کوکران نشان داد روش مرجع با سه محیط کروموژنیک در تشخیص *اشرشیاکلی* اختلاف آماری معنی‌داری دارند(P<0/001).

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 ازنظر مقایسه روش کروموژن با روش مرجع در جستجوی میکروب‌ها در مواد غذایی توسط محققین انجام‌شده است. تعداد بسیاری از این تحقیقات حاکی از انطباق خوب روش‌های کروموژن با یکدیگر و همچنین باروش‌های مرجع در شناسایی عوامل پاتوژن و البته برخی نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین نتایج محیط‌های کروموژن با روش مرجع و در مواردی با یکدیگر می باشد که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌ای از Gonzalezو همکاران (2003) در آرژانتین برای شناسایی آلودگی غذاهای آماده مصرف[1] از محیط‌های کروموژن اختصاصی اشاره کرد. در این تحقیق محیط ChromcultColiformAgar با روش استاندارد و مرجع و محیط VRBA به منظور شمارش کلی‌فرم‌ها در غذاهای مختلف آماده به مصرف مقایسه شد، همچنین ویژگی محیط Chromcult 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 کلی‌فرمی میان دو محیط AgarColiformChromcultو VRBAنسبتا 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

می باشد. در مطالعه دیگری که Ferris و همکاران در سال 2017 انجام دادند؛ جهت جداسازی و شناسایی باکتری های پاتوژن*اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروجینوزا*، *کلبسیلا پنومونیا* و *استرپتوکوکوس اکویی* از محیط های 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 روش ها، از توانایی بالاتری برخوردار بود[12].

Geissler و همکاران(2000) تعیین کمی کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* نمونه‌های آب دریا با روش کروم‌کالت و فلوروژن را مورد تحقیق قراردادند، در این تحقیق عملکرد محیط Chromocult Coliform Agar (CCA) و فلوروژن LMX broth با روش استاندارد چند لوله‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. اطلاعات به‌دست‌آمده از آزمایش‌های متعدد نشان‌دهنده تفاوت عمده در محیط‌های فلوروژن (LMX) و کروموژن (CCA) در شمارش کلی‌فرم‌ها 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 می باشد. در تحقیقی مشابه در سال 2002، Beloti و همکارانش در برزیل از محیط Readycult-LMXبرای تشخیص سریع کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* استفاده کردند و بدین منظور، 125 نمونه شیر پاستوریزه و خام تهیه و با استفاده از محیط Readycult-LMXو 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 کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* بود. این محققین عنوان نمودند که محیط Readycult-LMX از سهولت بیشتری برای استفاده برخوردار است و مضاف بر آنکه در مدت زمان کمتر و حداکثر 24 ساعت نتایج را مشخص می‌سازد[13]. در بررسی که Manafi و همکاران (2005) بر روی 1246نمونه آلوده به سویه‌های مختلف *اشرشیاکلی* انجام دادند،1240سویه (99 درصد) با استفاده از محیط‌های کروموژن شناسایی شدند و فقط تعداد اندکی از باکتری‌های غیر کلی‌فرمی مانند سویه‌هایی از *سراتیا*، *هافنیا*، *ویبریووا آئروموناس* واکنش مثبت کاذب داشتند. وی معتقد است استفاده از این محیط‌ها در مقایسه با روش‌های استاندارد، در طی24 ساعت کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* را شناسایی می‌کند[7]. به همین ترتیب Pitkanen و همکاران(2007) نیز با استفاده از محیط‌های کروموژن در شناسایی کلی‌فرم‌ها در110 نمونه آب آلوده به *اشرشیاکلی*، توانایی شناسایی وجود باکتری را با این روش تأیید کردند. در این مطالعه روش‌های جایگزین برای شناسایی و شمارش کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* با روش مرجع بررسی شد، محیط‌های جایگزین شامل LESEndoAgar[1]، Colilertو ChromcultColiform Agar بود، نتایج این مطالعه نشان داد که محیط‌های Chromcult Coliform Agar و Colilert می‌تواند جایگزین بالقوه‌ای برای شناسایی کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* باشد [14]. همچنین Bonadonnaو 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 می باشد.*

در مطالعه ای دیگر Tavakoli و Riazipourدر سال 2008 تعداد 72 نمونه از 4 نوع غذای مصرفی در6 مرکز درمانی و آموزشی را از نظر آلودگی باکتریایی با استفاده از محیط‌های کرموژن مورد بررسی قرار دادند و میانگین تعداد کلی باکتری‌ها، کلی‌فرم‌ها 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 MacConkeyAgar در این مطالعه به این

2. Lawrence Experimental Station Endo Agar

نتیجه رسیدند که از نظر آماری این دو روش اختلاف معنی‌داری در شناسایی کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* ندارند (p>05/0) و با همبستگی (r=0/86) بین این دو محیط، محیط CCA یک جایگزین مناسب برایMacConkey Agar محیط می‌باشد[17]. در همین راستا Maheux و همکاران در سال 2008 از محیط‌های کروموژنیک Colilert،ReadycultColiforms100(Readycult)، MI Agar (MI) و همچنین Chromocult Coliform Agar ES استفاده شد و عملکرد این محیط‌ها براساس توانایی تشخیص تولید آنزیمβ-glucuronidase و β-galactosidase در کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه محیط Colilert و محیطMI به ترتیب ضعیف‌ترین 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* می‌باشد. البتهMaheux و همکاران (2014) با توجه به نتایج مطالعه فوق در مطالعه دیگر برای ارزیابی کیفیت میکروبیولوژیکی آب از نظر آلودگی به کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* در روش فیلتراسیون غشایی از محیط کروموژنیک Chromocult Coliform AgarESکه 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 ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar و نه Chromocult Coliform AgarES بود. این درحالی است که در مطالعه Charimba و همکاران (2012) که بر روی 100 نمونه گوشت گاو و بوقلمون در آفریقای جنوبی ویروتیپ‌های مختلف *اشرشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت، از محیط کروموژنیک Chromocult Coliform agar در کنار روش‌های 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 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 مطالعهRattanabumrung و همکاران در سال 2012، باکتری *اشرشیاکلی* در محیط کروموژنیک Chromocult Coliform 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 درجه‌سانتیگراد 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 درجه‌سانتیگراد رشد *اشرشیاکلی* متوقف شد[21]. در مطالعه Kalchayanand و همکاران (2013) سروتیپ‌های 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 پاتوژن‌ها براساس ترکیبی از مصرف کربوهیدرات‌ها، 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 سرووگروپ *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 بستنی‌های پاستوریزه از نظر آلودگی به *اشرشیاکلی* با استفاده از روش امپدانس 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 معنی‌داری نداشتند (p>0/05) [23].

4- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر درصد انطباق نمونه‌های آلوده به کلی‌فرم‌ها بین سه محیط کروموژن Coliform Agar ES،

ChromAgarECC و Rapid E.coli 2/Agar و مرجع به ترتیب 73، 77 و 72 درصد بود که اختلاف معنی‌داری با روش مرجع نداشتند. همچنین درصد انطباق نمونه‌های آلوده به *اشرشیاکلی* بین سه محیط کروموژن Coliform Agar ES،ChromAgar ECCو RapidE.coli 2/ Agar با روش مرجع به ترتیب 68، 70 و 70 درصد مشاهده شد که بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد. همچنین در سه محیط کروموژن Coliform Agar ES، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agar نتایج مربوط به کلی‌فرم 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، ChromAgar ECC و Rapid E.coli 2/Agarنتایج مربوط به *اشرشیاکلی* 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 کلی‌فرم‌ها بود،می‌توان از روش‌های مذکور به عنوان جایگزینی برای روش مرجع در تشخیص کلی‌فرم‌هااستفاده نمود ($p>0/05$) ولی با وجود اختلاف معنی‌دار ملاحظه شده بین این سه محیط کروموژن با روش مرجع در تشخیص*اشرشیاکلی*، محیط‌های کروموژن مورد مطالعه جایگزین مناسبی در تشخیص *اشرشیاکلی* برای روش مرجع نمی‌باشند ($p<0/001$).

5- سپاسگزاری

هزینه‌های انجام مطالعه حاضر از طریق پژوهانه سال 1397 دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین‌شده است که بدین‌وسیله 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 a2 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 Microbiology. 4th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphila, USA, pp: 335-350.

[3] Beauchamp, C.J., Simao-Beaunoir, 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 flurogenic 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). Quantative determination of total Coliforms and *E. coli* in marine waters with chromogenic and flourogenic 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 fluorogenic 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, NewYork, 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

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 Readycult 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 thismethod 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 productionof 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. Cochrane 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