بررسی مقایسه‌ای روش‌های امپدانس و مرجع در شناسایی آلودگی به انتروکوک‌ها در مواد غذایی

مهین فلاح[1*]، مسعود حق خواه[2]، علی فضل آرا[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد باکتری شناسی،گروه پاتوبیولوژی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۲- دانشیار، دکترای تخصصی میکروبیولوژی،گروه پاتوبیولوژی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۳- استاد، دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۸/۰۹)

چکیده

با توجه به مقاوم بودن بعضی از *انتروکوک‌ها* به شرایط محیطی و تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها درمواد غذایی که بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی مراکز تهیه و توزیع مواد غذایی است، از روش مرجع و بررسی میزان تطابق آن با روش امپدانس به منظور دست‌یابی به روش دقیق‌تر و سریع‌تر که بتواند در مدت زمان کوتاه‌تر ارزیابی نمونه‌های مورد آزمایش را انجام دهد، استفاده گردید. در این مطالعه برای جداسازی *انتروکوک‌ها* از سه گروه مواد غذایی شامل شیرخام، سبزیجات خشک و عرقیات گیاهی استفاده شد و در مجموع ۷۷ نمونه جمع‌آوری گردید و نمونه‌ها به دو روش مرجع و امپدانس کشت داده شدند. روش مرجع براساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۹۸ با عنوان "جستجو، شناسایی و شمارش انتروکوک‌های روده‌ای در موادغذایی" انجام گرفت. تکنیک امپدانس نیز براساس ثبت نتایج هر ده دقیقه یکبار حاصل از اندازه‌گیری تغییرات مقاومت الکتریکی محیط کشت مایع (M-Value) مورد مصرف، در این روش صورت پذیرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS، میزان انطباق دو روش با هم مقایسه شد. نتایج حاصله نشان داد که حساسیت و ویژگی روش امپدانس در تشخیص *انتروکوک* در مجموع هرسه نوع ماده غذایی به ترتیب ۸۱٫۲٪ و ۷۵٫۹٪ بوده و توافق مشاهده شده بین روش امپدانس با مرجع برابر با ۷۹٫۲٪ می‌باشد. در مورد نمونه‌های سبزیجات خشک و عرقیات گیاهی، بین روش‌های امپدانس و مرجع اختلاف معناداری وجود داشت و در مورد نمونه شیرخام که از ماتریکس نسبتا ثابت و یکنواختی برخوردار است، روش امپدانس به‌لحاظ انطباق بالا ۸۳٫۳٪ با روش مرجع در شناسایی آلودگی به *انتروکوک‌ها*، به‌عنوان روش جایگزین می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: مواد غذایی، *انتروکوک* ، امپدانس، مرجع

*مسئول مکاتبات: m.falah8194@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

۱- مقدمه

برای سال‌های زیادی اعتقاد بر این بود که گونه‌های *انتروکوکوس* برای انسان بی‌ضرر هستند و از نظر پزشکی مهم نیستند. از آنجا که *انتروکوک‌ها* تولید باکتریوسین می‌کنند، گونه‌های *انتروکوکوس* به‌طور گسترده‌ای در دهه گذشته، در صنایع غذایی به عنوان پروبیوتیک یا استارتر استفاده شده‌اند [۱]. اخیرا، *انتروکوک‌ها* به یکی از رایج‌ترین عوامل بیماری‌زای بیمارستانی با نرخ مرگ و میر بالای ٦١ ٪ تبدیل شده‌اند[۲].

انتروکوک‌ها به شرایط نامساعد مقاومند. مقاومت گرمایی و مقاومت در برابر انجماد از جمله ویژگی‌های این گروه می‌باشد. از بین سویه‌های فراوان تنها سویه‌های خاصی پاتوژن هستند که علایم مسمومیت را، با بلع مقادیر زیاد از این میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند[۳]. حضور زیاد *انتروکوک‌ها* در مواد غذایی، می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد. طی مطالعات انجام شده، *انتروکوک‌ها* و *کلیفرم‌ها* به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی در کشورهای توسعه یافته مطرح هستند. *انتروکوک‌ها* نسبت به *کلیفرم‌ها* شاخص بهتری در مورد غذاهای یخ زده و منجمد می‌باشند. تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است.

امروزه ابداع روش‌های سریع، حساس و دارای ویژگی(اختصاصیت) زیاد برای شناسایی باکتری‌های بیماری زای مواد غذایی در صدر تحقیقات کنترل کیفیت و سلامتی مواد غذایی است و در تحقیقاتی که در زمینه تعیین و تشخیص سریع گونه‌های سالمونلا در گوشت خوک پروسس شده، انجام شد به استفاده از روش‌های سریع و نوین از جمله امپدانس اشاره دارد [٤]. همچنین تعیین غلظت باکتری‌ها که در شیر با یک حسگر interdigitated microelectrode انجام شد براساس اندازه‌گیری دقیق تغییر امپدانس الکتریکی الکترود با توجه به متابولیسم باکتریایی در شیر بود [٥].

مفهوم اندازه گیری امپدانس الکتریکی رشد میکروبی توسط جی. ان. استوارت درسال ۱۸۹۹ شناخته شده است اما تا سال ۱۹۷۰ از این تئوری برای این هدف استفاده نشده است. دراین روش جداسازی سریع میکروب‌ها ازطریق نمایش فعالیت های متابولیک به وسیله ایجاد مقاومت الکتریکی امکان پذیرمی باشد و از آنجا که روش امپدانس، در مدت زمان بسیار کمتر و سریع‌تر میکروارگانیسم‌ها را شناسایی می‌نماید و همچنین علاوه بر صرفه جویی در مواد مصرفی و کاهش زمان مورد نیاز شناسایی میکروارگانیسم، می‌تواند تعداد نمونه‌های بیشتری را آزمایش کند، لذا بهره‌گیری از این فن در کنترل کیفیت مواد غذایی مد نظر قرار گرفته است.

میکروب شناسی امپدانس تشخیص و اندازه گیری رشد باکتریایی است که با اندازه‌گیری تغییرات امپدانس الکتریکی در طی متابولیسم میکروبی به شناسایی سلول های زنده و غیر زنده کمک می‌کند. این روش از تکنیک های مختلفی برای بهبود حساسیت و تشخیص انتخابی باکتری استفاده می‌کند که شامل آنالیز مدار معادل، میکروالکترودهای آرایه‌ای ، میکروچیپ‌ها، بیوسنسورها و نانومواد برای تشخیص باکتریایی است. مزیت امپدانس میکروبیولوژی این است که داده ها را می توان در یک زمان کوتاه با حساسیت و انتخابی خوب، با استفاده از یک نمونه کوچک بدست آورد و از معایب آن می‌توان به موضوع آلودگی، نیاز به محیط‌های کشت انتخابی خاص و تداخل ماتریس‌های مواد غذایی اشاره کرد. اساس سیستم‌های مختلف آزمایش سریع میکروبیولوژی امپدانس همچنان به عنوان ابزار مدیریت ایمنی و کیفیت مواد غذایی مورد بررسی قرار می‌گیرد [٦].

در این روش برخلاف روش مرجع، خطاهای فنی در انجام کشت وجود ندارد و نیازی به مواد و آماده سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع از جمله تهیه سریال رقت از نمونه‌های غذایی نمی‌باشد و این امر در سرعت عمل انجام آزمایش‌های مربوطه بر روی تعداد زیادی از نمونه‌ها نیز موثر واقع می‌گردد. در واقع تلفیق اندازه‌گیری امپدانس یا مقاومت ظاهری با عوامل بیولوژی در جهت شناسایی باکتری‌های مختلف، زمینه گسترده تحقیقاتی را در چند ساله اخیر مطرح نموده است.

هر چند که تاکنون استانداردی در زمینه کاربرد این تکنیک در شناسایی *انتروکوک‌ها* در مواد غذایی تدوین نشده است. لذا بررسی کارایی این تکنیک در ارزیابی آلودگی به *انتروکوک ها* در مواد غذایی و مقایسه آن با روش مرجع یا سایر روش‌ها مثل بهره‌گیری از روش کروموژنیک می تواند رهیافتی برای تدوین استانداردهای ملی باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

با توجه به خطاهای روش دستی و جهت دست‌یابی به روشی دقیق‌تر و سریع‌تر، در تحقیق حاضر تکنیک امپدانس در شناسایی *انتروکوک*ها درمواد غذایی مانند سبزیجات خشک، عرقیات گیاهی و شیر خام که احتمال وجود *انتروکوک‌ها* در آن‌ها بیشتر است، مورد استفاده قرارگرفت و مقایسه‌ای بین دو روش مرجع و امپدانس در شناسایی *انتروکوک*ها درمواد غذایی انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق ۷۷ نمونه شامل: ۳٦ نمونه شیرخام، ۲۱ نمونه عرق گیاهی و۲۰ نمونه سبزی خشک جمع آوری گردید که به دو روش مرجع و امپدانس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-۱- کشت به روش مرجع

ابتدا نمونه ها به منظور غنی سازی در محیط کشت مایع انتخابی بروموکروزول پرپل آزید براث قرار داده شد و لوله‌ها درگرمخانه ۳۷- ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸-۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و هر ۲٤ ساعت لوله‌ها از نظر تغییر رنگ از بنفش به زرد مورد بررسی قرار گرفت. سپس در مرحله بعد در صورت تغییر رنگ محیط کشت، از لوله‌های تغییر رنگ داده شده روی محیط کشت KF استرپتوکوکوس آگار به صورت خطی کشت داده شد و پلیت‌ها به صورت معکوس در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸-۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و هر ۲٤ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله آخر آزمون‌های تائیدی جهت اطمینان از وجود یا عدم وجود *انتروکوکوس* در نمونه‌ها انجام شد که شامل هیدرولیزآسکولین روی کلنی‌های برجسته صورتی، قرمز، ارغوانی و شاه بلوطی بود. از کلنی‌های مشکوک به *انتروکوکوس*، به لوله‌های حاوی محیط کشت صفرا- آسکولین آزاید آگار، بصورت سطحی و عمقی با آنس سوزنی کشت داده شد و لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸-۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شده، هر ۲٤ ساعت از نظر تغییر رنگ محیط به رنگ سیاه تا خرمایی رنگ مورد بررسی قرار داده شد.

۲-۲-کشت به روش امپدانس

همزمان با انجام روش مرجع، برای نمونه‌های شیرخام و عرقیات گیاهی یک میلی لیتر از نمونه مستقیما به لوله‌های الکترودار استریل مخصوص روش امپدانس که حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت براث اختصاصی ویژه روش امپدانس به نام کانامایسین آسکولین آزید Bimedia 330 A بود، منتقل شد و در مورد نمونه‌های سبزیجات خشک، ۰/۱ میلی لیتر از کشت ۲٤ ساعته بروموکروزول پرپل آزید براث که در روش مرجع بدست آمده بود، به لوله‌های الکترودار استریل مخصوص روش امپدانس که حاوی ۹/۹ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی کانامایسین آسکولین آزید بود، منتقل شد. سپس لوله‌ها در دستگاه قرارداده شدند و تنظیمات دستگاه بر روی نرم افزار، شامل: دما (۳۷ درجه سلسیوس)، مدت زمان اندازه‌گیری (۲٤ ساعت)، فاصله زمانی بین دو اندازه‌گیری (۱۰ دقیقه)، زمان تاخیر(یک ساعت) و حد آستانه[1](M-value) صورت گرفت تا نتایج به تفکیک ثبت شدند. سپس دستگاه با فواصل زمانی ده دقیقه از طریق اندازه-گیری میزان امپدانس درهر لوله آزمایش، نتایج مربوطه را ثبت - نمود. نتایج حاصله از این روش براساس ثبت نتایج انـدازه-گیـــــری میـزان امپدانس محیط کشـت (M-VALUE) در داخل لوله‌های آزمایش مخصوص روش امپدانس صورت گرفت. به این صورت که چنانچه نمونه مورد آزمایش حاوی مقادیر زیادی از انتروکوک‌ها بود، به لحاظ مصرف سریع‌تر ماکروکولکول‌های موجود در محیط کشت که واجد امپدانس ثابت و مشخصی هستند و تبدیل کردن آن‌ها به میکروملکول، سبب کاهش میزان امپدانس و برعکس آن افزایش میزان هدایت الکتریکی درمحیط کشت شد که این نوسانات و تغییرات امپدانس به صورت یک منحنی ثبت شدند. بنابراین با توجه به نکات فوق هرچه میزان آلودگی بیشتر بود، وقوع تغییر یا نوسان درمیزان امپدانس و متعاقب آن هدایت الکتریکی درمحیط کشت سریع‌تر یا زودتر صورت گرفت و برعکس هرچه میزان آلودگی کمتر بود، این نوسان در امپدانس و نهایتا هدایت الکتریکی با تأخیر انجام شد، بنابراین دستگاه با مونیتورکردن لوله‌های آزمایش حاوی الکترود درطی مدت حداکثر ۲٤ ساعت با توجه به تراکم آلودگی نسبت به اعلام نتیجه مثبت و نهایتا منفی در پایان ۲٤ ساعت اقدام کرد. به این نحو که هرچه نمونه آلوده‌تر بود در مدت

1.Threshold

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

زمان کمتر مشخص شده و ثبت می‌شد و هر چه آلودگی کمتر بود، نتیجه دیرتر حاصل می‌آمد. موارد منفی با صرف حداکثر زمان که ۲٤ ساعت بود، ثبت شدند. براین اساس و نظر به آنکه دستگاه هر ده دقیقه یک بار نسبت به اندازه‌گیری امپدانس درمحیط کشت داخل لوله‌های آزمایش ویژه امپدانس اقدام کرد، منحنی رشد و رفتار باکتری در محیط کشت نیز از طریق نرم افزار دستگاه درخصوص تک تک نمونه‌ها رسم گشته، ثبت شدند.

درصد آلودگی نمونه‌ها به تفکیک نوع نمونه محاسبه شد. نتایج حاصله از دو روش با استفاده از آنالیز آماری SPSS مورد مقایسه قرارگرفت و حساسیت و ویژگی روش‌ها و آماره کاپا محاسبه گردید. همچنین میزان توافق این دو روش، از طریق crosstab مورد بررسی و تجزیه وتحلیل آماری قرارگرفت.

۳- نتایج و بحث

تحقیقات مشابهی ازنظر مقایسه روش امپدانس با روش مرجع در جستجوی میکروب‌ها در مواد غذایی مختلف توسط محققین انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه روش استاندارد مرجع و تکنیک امپدانس در شناسایی و تشخیص *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* در ۹۰ نمونه کره پاستوریزه اشاره کرد که براساس نتایج حاصله هیچ‌گونه آلودگی به کلی‌فرم و *اشرشیا کلی* در کره‌ها در هر دو روش مرجع و امپدانس ملاحظه نگردید و نتایج حاصله ۱۰۰ درصد با یکدیگر تطابق داشتند [۷].

در مطالعه‌ای دیگر، که شمارش کلی میکروبی بر روی ۸۵ نمونه شیر پاستوریزه با دو روش امپدانس و مرجع (پورپلیت) مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت و میزان تطابق روش امپدانس با روش مرجع بر اساس منحنی رگرسیون حاصله ۹۵٫۰٦ درصد به‌دست آمد که براساس نتایج مربوطه، تکنیک امپدانس به‌عنوان روشی جایگزین روش مرجع در ارزیابی بار میکروبی در شیر پاستوریزه پیشنهاد گردید[۸]. همچنین در بررسی روش اندازه‌گیری بار میکروبی شیر خام و پاستوریزه با استفاده از امپدانس و تطابق آن با اسیدیته قابل تیتر شیر، میزان تطابق روش امپدانس با روش مرجع پورپلیت در شیرهای پاستوریزه و خام را به ترتیب ۹۵٫۰۱ و ۹۵٫۲۹ درصد اعلام شد[۹].

در مطالعه دیگر روش استاندارد مرجع و تکنیک امپدانس در شناسایی و تشخیص لیستریا در شیر و محصولات لبنی مورد بررسی قرار گرفت و درمجموع ۲۵۰ نمونه مورد بررسی، اعم از شیرهای خام و موارد شاهد مثبت و منفی، صرفا ٤ مورد اختلاف در نتایج دو روش ملاحظه شد که بر اساس آزمون آماری اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود نداشت[۱۰].

در مطالعه دیگری که توسط فلیس و همکاران در آرژانتین انجام شد، با استفاده از روش امپدانس نسبت به‌رسم منحنی هدایت الکتریکی و نهایتاً تعیین میزان بار باکتریایی در شیر پرداختند. آنان تغییرات هدایت الکتریکی در محیط کشت در طول رشد باکتری را برای تخمین کمی و کیفی از رشد میکروبی به کاربردند. این محققین روش امپدانس را به‌عنوان یک روش کارآمد و سریع برای ارزیابی و تعیین سریع میکروارگانیسم‌های شیر خام گاو و سایر فراورده‌های لبنی تأیید کردند و بیان داشتند که هر چه تعداد و رشد باکتری‌ها سریع‌تر باشد زمان شناسایی باکتری‌ها کمتر خواهد بود و ضریب همبستگی خوبی با روش مرجع ($r >$ ۰/۷۸) گزارش نمودند[۱۱].

Fontana و همکاران در ایتالیا، نتایج حاصل از شمارش اسپورهای کلستریدیایی را در ۱۲۵ نمونه شیرخام که خامه آن‌ها گرفته‌شده بود، با دو روش مرجع و امپدانس با هم مقایسه‌کردند که نتایج حاصل از این دو روش تطابق ۹۷٪ را نشان داد[۱۲].

Walker و همکاران ، با استفاده از تکنیک امپدانس شمارش سریع بیفیدو*باکتریوم لاکتیس*(پروبیوتیک) افزوده‌شده به شیر را بررسی کردند و تغییرات امپدانس محیط کشت یا M-Value در ٤۰ درجه سلسیوس را توسط دستگاه آنالیزر رشد میکروبی باک تراک ٤۱۰۰ ثبت نمودند، در این مطالعه نمونه‌های $۱۰^{٦}$ باکتری در گرم، در روش امپدانس به مدت ۱۵ ساعت و همین نمونه‌ها درروش پلیت کانت به مدت ۳ روز شناسایی شدند. در این بررسی میزان انطباق دو روش ۹۸/۷٤ درصد گزارش‌شده است و نتایج حاصل از دو روش مرجع و امپدانس ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد[۱۳].

تحقیقاتی توسط Yang و همکاران در شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* صورت گرفت و میکروالکترودهای اینتردیجیتال

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

(IMEs)[2] به‌عنوان سنسورهای امپدانس برای تشخیص سریع *سالمونلا تیفی موریوم* در یک محیط کشت انتخابی و نمونه‌های شیر به کار گرفته شدند. منحنی امپدانس ارتباط خطی بین لگاریتم اولیه سلول‌های *سالمونلا تیفی موریم* در محیط کشت و نمونه‌های شیر و زمان تعیین امپدانس نشان داد. مقادیر ضریب تعیین به ترتیب در محیط کشت و نمونه‌های شیر معادل ۰/۹۹و ۰/۹۸ به دست آمد و زمان لازم برای تشخیص ($5/4\times10^{5}$CFU/ml تا ٤/۸)، معادل ۹/۳-۲/۲ ساعت گزارش گردید [١٤].

در تحقیقی که توسط لک انجام شد، شمارش کلی میکروبی در ۱۵۰ نمونه بستنی سنتی را با دو روش استاندارد پورپلیت و امپدانس مورد بررسی قرارداد و بر اساس نتایج حاصل، تطابق این دو روش را ۸۰ درصد گزارش نمود [۱۵].

Grossi و همکاران، در ایتالیا نیز تراکم کلی میکروبی در انواع بستنی‌های عرضه‌شده در شهر بلونا را با استفاده از روش استاندارد مرجع و نیز تکنیک امپدانس مورد ارزیابی قراردادند و میزان انطباق دو روش را خوب و معادل ۷۸٪ گزارش نمودند و اظهار داشتند که روش امپدانس به‌عنوان یک روش مطمئن، کاربردی، سریع و آسان در ارزیابی کیفیت بستنی‌های تولیدی کارخانه‌های مواد غذایی و نیز مراکز نظارتی و کنترلی قابل‌استفاده است[١٦].

در تحقیقی دیگر امپدانس به‌عنوان روشی در تعیین میزان *باسیلوس استئاروترموفیلوس* به‌کاررفته است. براساس نتایج حاصله از Flint و Brooks با استفاده از باک‌تراک ٤۰۰۰ ارتباط قابل قبولی بین تعداد باکتری مورد مطالعه و تغییرات امپدانس اندازه‌گیری شده به دست آمد[۱۷].

فضل آرا و همکاران، تراکم میکروبی براساس روش امپدانس در فیله گوشت ماکیان و بررسی تطابق آن با مقدار ازت فرار تام را مورد بررسی قراردادند. در این تحقیق تعداد ۸۰ نمونه فیله گوشت ماکیان تهیه شد و با استفاده از روش امپدانس و نیز روش مرجع پورپلیت مورد ارزیابی ازنظر شمارش کلی بار میکروبی قرار گرفتند. همچنین مقدار ازت فرار تام اندازه‌گیری شد. تحلیل همبستگی در مطالعه مذکور نشان داد که همبستگی بسیار قوی و معکوسی بین لگاریتم بار میکروبی (روش مرجع) میزان امپدانس وجود داشت (r=۰/۹۷٤). براساس نتایج حاصل از تحقیق آنان، به لحاظ اهمیت حصول هر چه سریع‌تر نتایج در آزمون‌های کنترل کیفیت غذایی، بهره‌گیری از تکنیک‌هایی همچون روش امپدانس در صنایع غذایی به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم قدیمی می‌تواند مورد تأکید واقع گردد [۱۸].

ازجمله دیگر تحقیقات در به‌کارگیری روش امپدانس در جستجوی استافیلوکوک‌ها می‌توان به تحقیقات Glassmoyer و Russell در آمریکا اشاره نمود که از یک محیط مایع یا آبگوشت انتخابی که همان نوترینت براث حاوی ۱۰ ppm نالیدیکسیک اسید و ۱۰ ppm اکریفلاوین بود برای ردیابی *استافیلوکوکوس آرئوس* با استفاده از روش امپدانس استفاده کردند که میانگین مدت زمان شناسایی *استافیلوکوکوس آرئوس* با روش امپدانس را ١٦/٤ ساعت گزارش نمودند و از این روش برای شناسایی *استافیلوکوکوس آرئوس* در لاشه‌های تازه طیور، مرغ پخته‌شده و نیز ۵ فرآورده مختلف فرآوری شده از گوشت مرغ بهره گرفتند و اعلام داشتند که روش امپدانس، مقادیر اندک آلودگی به *استافیلوکوکوس آرئوس* (به میزان ۱۰ cfu/gr) را در مدت‌زمان کمتر از ٢٤ ساعت گزارش خواهد نمود و این روش را روشی بسیار مناسب برای جستجو و شناسایی *استافیلوکوکوس آرئوس* در مواد غذایی اعلام داشتند[۱۹].

تحقیقات متعدد دیگری در زمینه استفاده از روش امپدانس در کنترل کیفی میکروبی مواد غذایی مختلف صورت گرفته است که از جمله Andrade و همکاران، روش امپدانس را در مقایسه با روش کشت مرجع در پلیت به‌منظور شناسایی انتروکوکوس‌های موجود در سطوح در تماس با مواد غذایی مورد استفاده قرار دادند. آنان اعلام داشتند با توجه به انطباق بالای روش مرجع با روش امپدانس (۹۲٪) روش امپدانس به‌عنوان روشی مناسب برای شناسایی انتروکوک توصیه می‌گردد [۲۰].

Garro و همکاران نیز کاربرد امپدانس را برای ارزیابی استارتر کالچر لبنی در شیر سویا بررسی کردند و ارتباط خطی بین شمارش باکتری‌های استارترکالچر و زمان تعیین امپدانس با ضریب همبستگی بالا (r = ۰/۹۵) به دست آمد [۲۱].

جانسون و همکاران روش امپدانس غیر مستقیم را برای ارزیابی رشد میکروبی در ماتریکس‌های غذایی کمپلکس بررسی کردند و

1. Interdigitated microsensor electrode arrays

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

ارتباط خطی خوبی بین سطوح تلقیح و زمان اندازه‌گیری با ضریب همبستگی بالا ($r^2 \geq$۰/۸٤) به دست آوردند [۲۲].

در مطالعه ای که توسط فرناندز و همکاران در سال ۲۰۱۷ در اسپانیا انجام شد از روش امپدانس الکتریکی مستقیم و غیر مستقیم در نمونه‌های آب سیب تغلیظ شده برای تشخیص *Alicyclobacillus acidoterrestris* استفاده کردند. آنان تغییرات امپدانس را از طریق تولید CO2 اندازه گیری کردند و علاوه بر این، همبستگی خوبی ($R^2 = 0.97$ ، $r = 0.98$) بین میکروبیولوژی کلاسیک و روش امپدانس غیر مستقیم به دست آوردند [۲۳].

درطی بررسی انجام شده در این پژوهش، از مجموع ۷۷ نمونه جمع آوری شده شیرخام، عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک، ٤۸ نمونه (٦۲٫۳۳ درصد نمونه‌ها) به روش مرجع آلوده به *انتروکوک*ها بودند که از این تعداد ۲۸ نمونه شیرخام (۷۷٫۷۷درصد)، ١٤ نمونه سبزی خشک(۷۰درصد) و ٦ نمونه عرق گیاهی(۲۸٫۵۷ درصد)، آلوده به *انتروکوک* بودند که نتایج آن در جدول ۱ گزارش شده است.

در روش امپدانس که نتایج آن در جدول ۱ گزارش شده است، از مجموع ۷۷ نمونه جمع آوری شده، ٤٦ نمونه (۵۹٫۷٤ درصد نمونه‌ها) آلوده به *انتروکوک*ها بودند که ازاین تعداد ۳٤ نمونه شیرخام (۹٤٫٤ درصد) و ۱۲ نمونه سبزی خشک (٦۰ درصد)، دارای آلودگی به *انتروکوک* بودند و در مورد عرق گیاهی نمونه آلوده به *انتروکوک* در این روش وجود نداشت.

Table 1 results of samples contamination to enterococci in food

sample	reference		impedance		Total	P-value*
	positive	Percent%	positive	Percent%		
dry vegetable	14	70	12	60	20	0.018
Herbal extract	6	28.57	0	0	21	0.000
raw milk	28	77.77	34	94.4	36	0.04
Total	48	62.33	46	59.74	77	0.000

*The amount of P_Values less than 0.05 are statistically significant.

بر اساس روش امپدانس، حداکثر زمان صرف شده جهت دریافت نتایج مربوط به نمونه های غذایی مایع که بطور مستقیم و بدون غنی سازی اولیه در روش شامل مراحل مختلف آزمایش تا تائید نهایی که ۵ شبانه روز (۱۲۰ساعت) است ازسرعت چشمگیری برخوردار است. البته لازم به ذکر است که در مورد نمونه های جامد همچون نمونه‌های سبزیجات خشک که غنی‌سازی اولیه ۲٤ ساعته در روش امپدانس نیز همچون روش مرجع ضرورت می یابد، باز هم در مقایسه با روش مرجع، حصول نتایج بسیار سریع تر است.

حساسیت و ویژگی روش امپدانس در تشخیص *انتروکوک* به ترتیب ۸۱٫۲٪ و ۷۵٫۹٪ بدست آمد که نتایج آن در جدول ۲ به تفکیک نوع نمونه‌ها و به‌صورت کلی گزارش شده است. امپدانس مورد ارزیابی قرار گرفت، ۲۳٫۰۹ و حداقل زمان صرف شده ٦٫۳۹ ساعت بود که درمقایسه با حداقل زمان لازم برای روش مرجع که برای نمونه‌های سبزی خشک توافق مشاهده شده، بین دو روش امپدانس و مرجع ۸۰٪، توافق مورد انتظار ٥٤٪ و آماره کاپا برابر با ۰٫٥٦٥(p<۰/۰۰۱) بدست آمد.

Table 2 Agreement between reference and impedance methods

sample	Specificity%	Sensitivity%	Agreement%	P-value*
dry vegetable	83.3	78.6	56.5	0.018
herbal extract	100	–	–	–
raw milk	25	100	34.1	0.04
Total	75.9	81.2	56.3	0.000

*The amount of P_Values less than 0.05 are statistically significant.

برای نمونه‌های عرق گیاهی توافق مشاهده شده ۷۱٪، توافق مورد انتظار ۷۱٪ است و در مورد نمونه‌های شیرخام توافق مشاهده شده بین دو روش امپدانس و مرجع ۸۳٪، توافق مورد انتظار ۷٤٪ و آماره کاپا برابر با ۰٫۳٤(p<۰/۰۰۱) بدست آمد. توافق کلی،

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

مشاهده شده بین دو روش۷۹٫۲٪، توافق مورد انتظار ۵۲٫٤ ٪و آماره کاپا بین روش امپدانس و مرجع برابر با ۰٫۵٦(p<۰/۰۰۱) بود که نتایج آن در جدول ۳ گزارش شده است.

Table 3 Agreement of methods in dry vegetable, herbal extract and raw milk

sample	Expected overall agreement	observed overall agreement	Measure of Agreement Kappa	P-value*
dry vegetable	54٪	80٪	0.565	0.018
herbal extract	71٪	71٪	-	-
raw milk	74٪	83.3٪	0.34	0.04
Total	52.4٪	79.2٪	0.56	0.000

*The amount of P_Values less than 0.05 are statistically significant.

٤- نتیجه‌گیری

درطی این تحقیق ، ۷۷ نمونه از شهرستان‌های اهواز و شیراز در سه گروه مختلف از مواد غذایی، شامل شیرخام، سبزیجات و عرقیات گیاهی جمع آوری شد و بررسی از نظر آلودگی به *انتروکوک‌ها* به دو روش مرجع و امپدانس و روی سه گروه ماده غذایی انجام گرفت.

در بررسی نمونه‌ها، از مجموع ۷۷ نمونه، ٤۸ نمونه براساس روش مرجع (٦۲٫۳۳ درصد)، ٤٦ نمونه (۵۹٫۷٤ درصد) براساس روش امپدانس ، آلوده به *انتروکوک* بودند.

درطی بررسی انجام شده از مجموع ۷۷ نمونه جمع آوری شده، ۷۷٫۷۷ درصد نمونه‌های شیرخام، ۷۰ درصد نمونه‌های سبزی خشک و ۲۸٫۵۷ درصد نمونه‌های عرق گیاهی، به روش مرجع آلوده به *انتروکوک‌ها* بودند.

همچنین، در روش امپدانس، ۹٤٫٤ درصد نمونه‌های شیرخام و ٦۰ درصد نمونه‌های سبزی خشک، آلوده به *انتروکوک‌ها* بودند و در مورد نمونه‌های عرق گیاهی، هیچگونه آلودگی به *انتروکوک‌ها* در روش امپدانس مشاهده نشد.

سپس بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت. آزمون crosstab نشان داد که دو روش مورد استفاده در تشخیص *انتروکوک* عملکرد یکسانی ندارند (p<۰/۰۰۱). به‌طوری‌که روش امپدانس با روش مرجع اختلاف معناداری دارد (p<۰/۰۰۱) .

نتایج حاصل از این تحقیق و نیز نتایج سایر محققین فوق‌الذکر نشان داده که تکنیک امپدانس درحصول نتایج آلودگی مواد غذایی به *انتروکوک* در عرق گیاهی و سبزیجات خشک‌شده و شیرخام به‌ترتیب دارای انطباق بالای ۷۱، ۸۰ و ۸۳ درصد، با روش مرجع بوده و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی با سرعت عمل بالاتر برای روش مرجع در شناسایی آلودگی *انتروکوکی* در مواد غذایی مطرح باشد.

در این زمینه نمونه‌های شیر از انطباق بالایی نسبت به سایر نمونه‌های عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک برخوردار بودند. علت این موضوع را شاید بتوان در ماتریکس یکنواخت و نسبتا ثابت شیر عنوان کرد که باعث حصول نتایج منطبق‌تر با روش مرجع شده است. در مقایسه، عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک از تنوع بیشتری برخوردارند و تنوع ترکیبی، میزان خلوص، تفاوت در خواص ضدمیکروبی، نوع فراوری آن‌ها (روش‌های سنتی و صنعتی) و فعالیت آبی آن‌ها از جمله مسائلی هستند که از انطباق دو روش کاسته است.

۵- منابع

[1] Foulquie´ Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*,No.106, pp.1-24.

[2] Lopes, D.F.S. Ribeiro, M. Abrantes, T. Figueiredo Marques, M.,J. J. Tenreiro, R. Crespo, M. T. B. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.103, No. 2, pp. 191-198.

[3] Jay, J.M. (1996). Modern Food Microbiology, 4th ed. Chapman and Hall. London. UK,pp.421-426.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

[4] Pablos, C. Marugán, M. Cristóbal,S. Grieken, R.(2017). Implications of Electrical Impedance-Based Microbiological Technology in Pork Meat Processing Industry for the Rapid Detection and Quantification of Salmonella Spp. Journal of Food Science and Engineering, No 7, pp. 1-16.

[5] Liu, J.-T. Settu, K. Tsai, J.-Z. Chen, C.-J.(2015). Impedance sensor for rapid enumeration of *E. coli* in milk samples. Electrochimica Acta. pp 89-95.

[6] Flint, S.H., Naila, A., Bashir, R.,(2015). Impedance microbiology and microbial screening strategy for detecting pathogens in food. High Throughput Screening for Food Safety Assessment, Pages 285-300.

[7] Fazlara, A., Rasekh, A., Khataminia, A., (2007). Comparative survey on hygienic quality (coli form, *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*) of lndustrial butters with using standard methods and impedance spilitting method, The first iranian congress of clinical microbiology Shiraz. Iran :42.

[8] Fazlara, A. (2004). Evaluation of total microbial count in pasteurized milks with using impedance-splitting method and it's comparing with the results of conventional standard pour plate technique. 7th Iranian Microbiology Congress, Semnan University of Medical Sciences. p:166.

[9] Fazlara, A., Zarei, M., Motaghiyan , N., (2013). Survey of predictive model for microbial load in raw and pasteurized milk with measuring electrical resistance (Impedance-Splitting Method) and it's correlation with milk titrable acidity, Scientific-Research Iranian Veterinary Journal, Vol.35, No 2, pp. 97-105.

[10] Fazlara, A., (2013). Evaluation of contamination Listeria monocytogenes in raw milks with using impedance-splitting method. The 2nd National Food Safety specialists Congress.

[11] Felice, C.J., Madrid, R.E., Olivera, J.M., Rotger, V.I., and Valentinuzzi M.E., (1999). Impedance microbiology quantification of bacterial in milk by means of capacitance growth curves. *Journal of Microbiological Methods*, Vol.35, No. 1, pp. 37-42.

[12] Fontana, M.A., Busiello, S.T., Biosotti, S.T., Dallorto, g.i., Unger, B.R., Masaniger, H.E., and Schinkinger, M.A. (2002). Rapid enumeration of clostridial spores in raw milk samples using an impedimetric method. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, No.10, pp.107-116.

[13] Walker, K. Ripandelli, N. Flint, S. (2005). Rapid enumeration of *Bifidobacterium Lactis* in milk Powders using impedance. *Internetional Dairy Journal*, Vol.15, No.2, pp.183-188.

[14] Yang, L. Yanbin, L. Griffie, C. Johnson, M.G. (2004). Interdigital micoelectrode (IME)impedance sensor for the detection of viable salmonella typhimurium. Biosensors and Bioelectronics, Vol.19, No.10, pp.1139 – 1147.

[15] Lak, A., (2005). Evaluation of total microbial count in traditional ice cream with using impedance-splitting method. 6th Congress of Veterinary Students of Iran, Ferdowsi University of Mashhad. pp. 269.

[16] Grossi, M. Lanzoni, M. Pompei, A. Lazzarini, R. Matteuzzi, D. Ricc B. (2008). Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 23, No. 11, pp. 1616 – 1623 .

[17] Flint, S.H., Brooks, J. D. (2001). Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 44, No.3, pp. 205-208.

[18] Fazlara, A., Pourmahdi Brojeni, M., Jaferi, F. (2013). Mathematical modeling of microbial load in poultry meat fillets according to Impedance-Splitting method and evaluation it's correlation with total volatile nitrogen (TVN), Food Science and Technology, Vol. 10, No.41, pp. 35-46.

[19] Glassmoyer, K.E., Russell, S.M., (2001). Evaluation of a selective broth for detection of *staphylococcus aureus* using impedance microbiology. *Journal of Food Protection*, No.64, pp. 44-50.

[20] Andrade, N.J., Bridgeman, T.A., and Zottola, E.A., (1998). Bactericidal activity of sanitizers against Entercocci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance method. *Journal of Food Protection*, Vol. 61. No. 7, pp. 833-838

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

[21] Garro, M.S., Devaldez, G.F., and Degiori G.S., (2001). Application of conductimetry for evaluation of lactic starter cultures in soymilk. *Journal of Food Science*, No.67, pp. 1175-1178.

[22] Johnson, N. Chang, Z. Bravo Almeida, C. Michel, M. Iversen, C. Callanan, M. (2014). Evaluation of indirect impedance for measuring microbial growth in complex food matrices. Food Microbiology, No 4, pp. 8-13.

[23] Fernández, P., Gabaldón, J.A., Periago, M.J., (2017). Detection and quantification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by electrical impedance in apple juice, Food Microbiology. Vol.68, pp. 34-40.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]

Comparative study of impedance and reference methods to detect contamination to enterococci in food

Falah, M. [1*], Haghkhah, M. [2], Fazlara, A. [3]

1, 2. Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Iran
3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

(Received: 2017/04/12 Accepted:2018/10/31)

Enterococci are important agents from the aspect of food safety. As some bacteria in this group are resistance to enviromental conditions, so presence of enterococci in excessive amount in foods, means undesirable sanitary situation during production and distribution of foods. Enterococci are known as indicator microorganism in many countries and excessive number of this group in foods means fecal contamination. So its detection in foods is a good guide for hygienic quality of food products. According to this matter, reference and impedance methods were used for the detection of enterococci and the results compared to obtain a rapid and sensitive method for evaluation of food samples. In present study, totally 77 samples include: 36 samples of raw milk, 21 samples herbal extract and 20 samples of dry vegetable were collected and tested for detection of enterococci with two above mentioned methods. The reference method was based on IRAN's national standard method No.2198. The impedance method was done by measuring the variation of electrical resistance of broth media (M-value) which used in this method. Then the results of two methods were compared and the overall agreement was determined with using SPSS software. The results showed that the sensitivity and specificity of the impedance method were 81.2 % and 75.9% respectively and the observed overall agreement was 79.2% with reference method. The Statistical analysis between two methods showed that there is a significant difference between two methods. In other meaning the studied methods have not shown the same performance. But in the other hand as a homogenous matrix of raw milks, the impedance method have 83.3% overall agreement with reference method. So this method could be used as alternative techniques instead of reference method for detecting enterococci in raw milk.

Keywords: Food, *Enterococcus*, Impedance, Reference

* Corresponding Author E-Mail Address: m.falah8194@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-13]