

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

مهین فلاح^{۱*}، مسعود حق خواه^۲، علی فضل آرا^۳

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: ۹۶/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۸/۰۹)

چکیده

با توجه به مقاوم بودن بعضی از انتروکوک‌ها به شرایط محیطی و تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی که بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی مراکز تهیه و توزیع مواد غذایی است، از روش مرجع و بررسی میزان تطابق آن با روش امیدانس 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 امیدانس کشت داده شدند. روش مرجع براساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۹۸ با عنوان "جستجو، شناسایی و شمارش انتروکوک‌های روده‌ای در مواد غذایی" انجام گرفت. تکنیک امیدانس 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 امیدانس در تشخیص انتروکوک در مجموع هر سه نوع ماده غذایی به ترتیب ۸۱/۲٪ و ۷۵/۹٪ بوده و توافق مشاهده شده بین روش امیدانس با مرجع برابر با ۷۹/۲٪ می‌باشد. در مورد نمونه‌های سبزیجات خشک و عرقیات گیاهی، بین روش‌های امیدانس و مرجع اختلاف معناداری وجود داشت و در مورد نمونه شیرخام که از ماتریکس نسبتاً ثابت و یکنواختی برخوردار است، روش امیدانس به لحاظ انطباق بالا ۸۳/۳٪ با روش مرجع در شناسایی آلودگی به انتروکوک‌ها، به عنوان روش جایگزین می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: مواد غذایی، انتروکوک، امیدانس، مرجع

* مسئول مکاتبات: m.falah8194@gmail.com

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 *انتروکوکوس* تولید باکتریوسین می‌کنند، گونه‌های *انتروکوکوس* به‌طور گسترده‌ای در دهه گذشته، در صنایع غذایی به عنوان پروبیوتیک یا استارتر استفاده شده‌اند [۱]. اخیراً، *انتروکوکوس* به یکی از رایج‌ترین عوامل بیماری‌زای بیمارستانی با نرخ مرگ و میر بالای ۶۱٪ تبدیل شده‌اند [۲].

*انتروکوکوس*ها به شرایط نامساعد مقاومت می‌کنند. مقاومت گرمایی و مقاومت در برابر انجماد از جمله ویژگی‌های این گروه می‌باشد. از بین سویه‌های فراوان تنها سویه‌های خاصی پاتوژن هستند که علائم مسمومیت را، با بلع مقادیر زیاد از این میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند [۳]. حضور زیاد *انتروکوکوس*ها در مواد غذایی، می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد. طی مطالعات انجام شده، *انتروکوکوس*ها و کلیفرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی در کشورهای توسعه یافته مطرح هستند. *انتروکوکوس*ها 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 بیماری‌زای 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 [۴]. همچنین تعیین غلظت باکتری‌ها که در شیر با یک حسگر *interdigitated microelectrode* انجام شد براساس اندازه‌گیری دقیق تغییر امپدانس الکتریکی الکتروود با توجه به متابولیسم باکتریایی در شیر بود [۵].

مفهوم اندازه‌گیری امپدانس الکتریکی رشد میکروبی توسط جی. ان. استوارت در سال ۱۸۹۹ شناخته شده است اما تا سال ۱۹۷۰ از این تئوری برای این هدف استفاده نشده است. در این روش جداسازی سریع میکروب‌ها از طریق نمایش فعالیت های متابولیک به وسیله ایجاد مقاومت الکتریکی امکان پذیر می 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 اندازه‌گیری 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 [۶].

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 سربال 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 استاندارد در زمینه کاربرد این تکنیک در شناسایی *انتروکوکوس*ها در مواد غذایی تدوین نشده است. لذا بررسی کارایی این تکنیک در ارزیابی آلودگی به *انتروکوکوس*ها در مواد غذایی و مقایسه آن با روش مرجع یا سایر روش‌ها مثل بهره‌گیری از روش کروموزنیک می‌تواند رهیافتی برای تدوین استانداردهای ملی باشد.

با توجه به خطاهای روش دستی و جهت دستیابی به روشی دقیق‌تر و سریع‌تر، در تحقیق حاضر تکنیک امپدانس در شناسایی /نتروکوک‌ها در مواد غذایی مانند سبزیجات خشک، عرقیات گیاهی و شیر خام که احتمال وجود /نتروکوک‌ها در آنها بیشتر است، مورد استفاده قرار گرفت و مقایسه‌ای بین دو روش مرجع و امپدانس در شناسایی /نتروکوک‌ها در مواد غذایی انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق ۷۷ نمونه شامل: ۳۶ نمونه شیرخام، ۲۱ نمونه عرق گیاهی و ۲۰ نمونه سبزی خشک جمع‌آوری گردید که به دو روش مرجع و امپدانس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۱-۲- کشت به روش مرجع

ابتدا نمونه‌ها به منظور غنی‌سازی در محیط کشت مایع انتخابی بروموکروزول پریل آزید براث قرار داده شد و لوله‌ها در گرمخانه ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و هر ۲۴ 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 ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و هر ۲۴ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله آخر آزمون‌های تأییدی جهت اطمینان از وجود یا عدم وجود /نتروکوکوس در نمونه‌ها انجام شد که شامل هیدرولیز آسکولین روی کلنی‌های برجسته صورتی، قرمز، ارغوانی و شاه بلوطی بود. از کلنی‌های مشکوک به /نتروکوکوس، 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 ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده، هر ۲۴ 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 مستقیماً 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 ۲۴ ساعته بروموکروزول پریل آزید براث که در روش مرجع بدست آمده بود، به لوله‌های الکترودار استریل مخصوص روش امپدانس که حاوی ۹/۹ میلی لیتر محیط کشت اختصاصی کانامایسین آسکولین آزید بود، منتقل شد. سپس لوله‌ها در دستگاه قراردادده شدند و تنظیمات دستگاه بر روی نرم افزار، شامل: دما (۳۷ درجه سلسیوس)، مدت زمان اندازه‌گیری (۲۴ ساعت)، فاصله زمانی بین دو اندازه‌گیری (۱۰ دقیقه)، زمان تاخیر (یک ساعت) و حد آستانه (M-value) صورت گرفت تا نتایج به تفکیک ثبت شدند. سپس دستگاه با فواصل زمانی ده دقیقه از طریق اندازه‌گیری میزان امپدانس در هر لوله آزمایش، نتایج مربوطه را ثبت نمود. نتایج حاصله از این روش براساس ثبت نتایج اندازه‌گیری میزان امپدانس محیط کشت (M-VALUE) در داخل لوله‌های آزمایش مخصوص روش امپدانس صورت گرفت. به این صورت که چنانچه نمونه مورد آزمایش حاوی مقادیر زیادی از /نتروکوک‌ها بود، به لحاظ مصرف سریع‌تر ماکروکول‌های 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 در محیط 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 در میزان امپدانس و متعاقب آن هدایت الکتریکی در محیط کشت سریع‌تر یا زودتر صورت گرفت و برعکس هرچه میزان آلودگی کمتر بود، این نوسان در امپدانس و نهایتاً هدایت الکتریکی با تأخیر انجام شد، بنابراین دستگاه با مونیتور کردن لوله‌های آزمایش حاوی الکتروود در طی مدت حداکثر ۲۴ ساعت با توجه به تراکم آلودگی نسبت به اعلام نتیجه مثبت و نهایتاً منفی در پایان ۲۴ ساعت اقدام کرد. به این نحو که هرچه نمونه آلوده‌تر بود در مدت

زمان کمتر مشخص شده و ثبت می‌شد و هر چه آلودگی کمتر بود، نتیجه دیرتر حاصل می‌آمد. موارد منفی با صرف حداکثر زمان که ۲۴ ساعت بود، ثبت شدند. براین اساس و نظر به آنکه دستگاه هر ده دقیقه یک بار نسبت به اندازه‌گیری امپدانس در محیط 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 قرار گرفت و حساسیت و ویژگی روش‌ها و آماره کاپا محاسبه گردید. همچنین میزان توافق این دو روش، از طریق crosstab مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

تحقیقات مشابهی از نظر 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 /شرشیاکلی و /استافیلوکوکوس /ورئوس در ۹۰ نمونه کره پاستوریزه اشاره کرد که براساس نتایج حاصله هیچ‌گونه آلودگی به کلی‌فرم و /شرشیا 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 ۹۵/۰۶ درصد به- دست 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 اندازه-گیری بار میکروبی شیر خام و پاستوریزه با استفاده از امپدانس و تطابق آن با اسیدیته قابل تیتیر 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 در مجموع ۲۵۰ نمونه مورد بررسی، اعم از شیرهای خام و موارد شاهد مثبت و منفی، صرفاً ۴ 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 به رسم 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 ($r > 0.78$) گزارش نمودند [۱۱].

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

Walker و همکاران، با استفاده از تکنیک امپدانس شمارش سریع بیفیدوباکتریوم لاکتیس (پروبیوتیک) افزوده شده به شیر را بررسی کردند و تغییرات امپدانس محیط کشت یا M-Value در ۴۰ درجه سلسیوس را توسط دستگاه آنالیزر رشد میکروبی باک تراک ۴۱۰۰ ثبت نمودند، در این مطالعه نمونه‌های ۱۰^۶ باکتری در گرم، در روش امپدانس به مدت ۱۵ ساعت و همین نمونه‌ها در روش پلیت کانت به مدت ۳ روز شناسایی شدند. در این بررسی میزان انطباق دو روش ۹۸/۷۴ درصد گزارش شده است و نتایج حاصل از دو روش مرجع و امپدانس از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد [۱۳].

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

معکوسی بین لگاریتم بار میکروبی (روش مرجع) میزان امیدانس وجود داشت ($r=0.974$). براساس نتایج حاصل از تحقیق آنان، به لحاظ اهمیت حصول هر چه سریع‌تر نتایج در آزمون‌های کنترل کیفیت غذایی، بهره‌گیری از تکنیک‌هایی همچون روش امیدانس در صنایع غذایی به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم قدیمی می‌تواند مورد تأکید واقع گردد [۱۸].

ازجمله دیگر تحقیقات در به‌کارگیری روش امیدانس 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 آرتوس با استفاده از روش امیدانس استفاده کردند که میانگین مدت زمان شناسایی استافیلوکوکوس آرتوس با روش امیدانس را ۱۶/۴ ساعت گزارش نمودند و از این روش برای شناسایی استافیلوکوکوس آرتوس در لاشه‌های تازه طیور، مرغ پخته‌شده و نیز ۵ فرآورده مختلف فرآوری شده از گوشت مرغ بهره گرفتند و اعلام داشتند که روش امیدانس، مقادیر اندک آلودگی به استافیلوکوکوس آرتوس (به میزان ۱۰ cfu/gr) را در مدت‌زمان کمتر از ۲۴ ساعت گزارش خواهد نمود و این روش را روشی بسیار مناسب برای جستجو و شناسایی استافیلوکوکوس آرتوس در مواد غذایی اعلام داشتند [۱۹].

تحقیقات متعدد دیگری در زمینه استفاده از روش امیدانس در کنترل کیفی میکروبی مواد غذایی مختلف صورت گرفته است که از جمله Andrade و همکاران، روش امیدانس 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 امیدانس (۹۲٪) روش امیدانس به‌عنوان روشی مناسب برای شناسایی انتروکوک توصیه می‌گردد [۲۰].

Garro و همکاران نیز کاربرد امیدانس را برای ارزیابی استارتر کالچر لبنی در شیر سویا بررسی کردند و ارتباط خطی بین شمارش باکتری‌های استارترکالچر و زمان تعیین امیدانس با ضریب همبستگی بالا ($r=0.95$) به دست آمد [۲۱].

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

(IMEs)^۲ به‌عنوان سنسورهای امیدانس برای تشخیص سریع سالمونلا تیفی موریوم در یک محیط کشت انتخابی و نمونه‌های شیر به کار گرفته شدند. منحنی امیدانس ارتباط خطی بین لگاریتم اولیه سلول‌های سالمونلا تیفی موریوم در محیط کشت و نمونه‌های شیر و زمان تعیین امیدانس نشان داد. مقادیر ضریب تعیین به ترتیب در محیط کشت و نمونه‌های شیر معادل ۰/۹۹ و ۰/۹۸ به دست آمد و زمان لازم برای تشخیص (5.4×10^4 تا 4.8×10^4)، معادل ۲/۲-۹/۳ ساعت گزارش گردید [۱۴].

در تحقیقی که توسط لک انجام شد، شمارش کلی میکروبی در ۱۵۰ نمونه بستنی سنتی را با دو روش استاندارد پورپلیت و امیدانس 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 امیدانس مورد ارزیابی قراردادند و میزان انطباق دو روش را خوب و معادل ۷۸٪ گزارش نمودند و اظهار داشتند که روش امیدانس به‌عنوان یک روش مطمئن، کاربردی، سریع و آسان در ارزیابی کیفیت بستنی‌های تولیدی کارخانه‌های مواد غذایی و نیز مراکز نظارتی و کنترلی قابل‌استفاده است [۱۶].

در تحقیقی دیگر امیدانس به‌عنوان روشی در تعیین میزان باسیلوس استارتروترموفیلوس به‌کاررفته است. براساس نتایج حاصله از Flint و Brooks با استفاده از باک‌تراک ۴۰۰۰ ارتباط قابل قبولی بین تعداد باکتری مورد مطالعه و تغییرات امیدانس اندازه‌گیری شده به دست آمد [۱۷].

فضل آرا و همکاران، تراکم میکروبی براساس روش امیدانس 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 امیدانس و نیز روش مرجع پورپلیت مورد ارزیابی از نظر 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

۴۸ نمونه (۶۲/۳۳ درصد نمونه‌ها) به روش مرجع آلوده به *انتروکوک*‌ها بودند که از این تعداد ۲۸ نمونه شیرخام (۷۷/۷۷ درصد)، ۱۴ نمونه سبزی خشک (۷۰ درصد) و ۶ 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، ۴۶ نمونه (۵۹/۷۴ درصد نمونه‌ها) آلوده به *انتروکوک*‌ها بودند که از این تعداد ۳۴ نمونه شیرخام (۹۴/۴ درصد) و ۱۲ نمونه سبزی خشک (۶۰ درصد)، دارای آلودگی به *انتروکوک* بودند و در مورد عرق گیاهی نمونه آلوده به *انتروکوک* در این روش وجود نداشت.

ارتباط خطی خوبی بین سطوح تلقیح و زمان اندازه‌گیری با ضریب همبستگی بالا ($r^2 \geq 0.84$) 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 سبب تغلیظ شده برای تشخیص *Alicyclobacillus acidoterrestris* استفاده کردند. آنان تغییرات امپدانس را از طریق تولید CO_2 اندازه‌گیری 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].

در طی بررسی انجام شده در این پژوهش، از مجموع ۷۷ نمونه جمع آوری شده شیرخام، عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک،

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.

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 به صورت کلی گزارش شده است. امپدانس مورد ارزیابی قرار گرفت، ۲۳/۰۹ و حداقل زمان صرف شده ۶/۳۹ 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 ۵۴٪ و آماره کاپا برابر با ۰/۵۶۵ ($p < 0.001$) بدست آمد.

بر اساس روش امپدانس، حداکثر زمان صرف شده جهت دریافت نتایج مربوط به نمونه‌های غذایی مایع که بطور مستقیم و بدون غنی‌سازی اولیه در روش شامل مراحل مختلف آزمایش تا تأیید نهایی که ۵ شبانه روز (۱۲۰ ساعت) است از سرعت چشمگیری برخوردار است. البته لازم به ذکر است که در مورد نمونه‌های جامد همچون نمونه‌های سبزیجات خشک که غنی‌سازی اولیه ۲۴ ساعته در روش امپدانس نیز همچون روش مرجع ضرورت می‌یابد، باز هم در مقایسه با روش مرجع، حصول نتایج بسیار سریع تر است.

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.

شده بین دو روش امپدانس و مرجع ۸۳٪، توافق مورد انتظار ۷۴٪ و آماره کاپا برابر با ۰/۳۴ ($p < 0.001$) بدست آمد. توافق کلی،

برای نمونه‌های عرق گیاهی توافق مشاهده شده ۷۱٪، توافق مورد انتظار ۷۱٪ است و در مورد نمونه‌های شیرخام توافق مشاهده

مشاهده شده بین دو روش ۷۹/۲٪، توافق مورد انتظار ۵۲/۴٪. آماره کاپا بین روش امیدانس و مرجع برابر با ۰/۵۶ (۰/۰۰۱ < p)

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.

شیرخام به ترتیب دارای انطباق بالای ۷۱، ۸۰ و ۸۳ درصد، با روش مرجع بوده و می تواند به عنوان جایگزینی با سرعت عمل بالاتر برای روش مرجع در شناسایی آلودگی انتروکوک در مواد غذایی مطرح باشد.

در این زمینه نمونه های شیر از انطباق بالایی نسبت به سایر نمونه های عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک برخوردار بودند. علت این موضوع را شاید بتوان در ماتریکس یکنواخت و نسبتاً ثابت شیر عنوان کرد که باعث حصول نتایج منطبق تر با روش مرجع شده است. در مقایسه، عرقیات گیاهی و سبزیجات خشک از تنوع بیشتری برخوردارند و تنوع ترکیبی، میزان خلوص، تفاوت در خواص ضد میکروبی، نوع فراوری آن ها (روش های سنتی و صنعتی) و فعالیت آبی آن ها 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.

۴- نتیجه گیری

در طی این تحقیق، ۷۷ نمونه از شهرستان های 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 انتروکوک ها به دو روش مرجع و امیدانس و روی سه گروه ماده غذایی انجام گرفت.

در بررسی نمونه ها، از مجموع ۷۷ نمونه، ۴۸ نمونه براساس روش مرجع (۶۲/۳۳ درصد)، ۴۶ نمونه (۵۹/۷۴ درصد) براساس روش امیدانس، آلوده به انتروکوک بودند.

در طی بررسی انجام شده از مجموع ۷۷ نمونه جمع آوری شده، ۷۷/۷۷ درصد نمونه های شیرخام، ۷۰ درصد نمونه های سبزی خشک و ۲۸/۵۷ درصد نمونه های عرق گیاهی، به روش مرجع آلوده به انتروکوک ها بودند.

همچنین، در روش امیدانس، ۹۴/۴ درصد نمونه های شیرخام و ۶۰ درصد نمونه های سبزی خشک، آلوده به انتروکوک ها بودند و در مورد نمونه های عرق گیاهی، هیچگونه آلودگی به انتروکوک ها در روش امیدانس مشاهده نشد.

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

نتایج حاصل از این تحقیق و نیز نتایج سایر محققین فوق الذکر نشان داده که تکنیک امیدانس در حصول نتایج آلودگی مواد غذایی به انتروکوک در عرق گیاهی و سبزیجات خشک شده و

- 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. *Internetenal 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 Enterococci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance method. *Journal of Food Protection*, Vol. 61. No. 7, pp. 833-838
- [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 Industrial 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,

- 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.
- [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

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 environmental 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