میزان فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در فرایند تولید فراورده گوشتی همبرگر

زهرا اسفندیاری[۱]، محمد جلالی[۲]، حمید عزت پناه[۳]، اسکات ویز[۴]، محمد چمنی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: *کلستریدیوم دیفیسیل* به عنوان عامل اسهال ناشی از مصرف آنتی بیوتیک وکولیت با غشای کاذب است. محصولات گوشتی به عنوان یکی از منابع احتمالی انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان محسوب می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در فرایند تولید همبرگر با استفاده از روش کشت و آزمون بیوشیمیایی انجام گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، ۲۱۱ نمونه شامل مواد اولیه متشکله و محصول نهایی همبرگر سه کارخانه فراورده گوشتی دارای گواهینامه HACPP و چهار کارخانه فاقد آن در استان اصفهان در فاصله زمانی تیر تا دی ماه۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در محیط مایع کلستریدیوم دیفیسیل موکسالاکتام نوروفلوکسازین "CDMN" غنی‌سازی و سپس در محیط CDMN آگار به صورت بی‌هوازی کشت داده شدند. پرگنه‌های مشکوک کلستریدیوم دیفیسیل در محیط بلاد آگار درشرایط بی‌هوازی دوباره کشت داده شد و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید. نتایج حاصل با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری χ^2 مورد آنالیز و $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در کارخانجات دارای گواهینامه HACCP، ۵/۵٪ و در کارخانجات فاقد گواهینامه،۱۴٪ بود. بر پایه نتایج، اختلاف معنی‌داری در شیوع باکتری طی فصول مختلف (P= ۰/۳۴) مشاهده نشد ولی شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در کارخانجات دارای گواهینامه HACCP در مقایسه با کارخانجات فاقد گواهینامه اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P = ۰/۰۳).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالا" مصرف همبرگر در انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان نقش دارد و اجرای اصول HACCP در کارخانجات تولیدکننده فراورده گوشتی همبرگر می‌تواند در کاهش شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، فراورده گوشتی همبرگر، آزمون بیوشیمیایی

ارجاع: اسفندیاری زهرا، جلالی محمد، عزت پناه حمید، ویز اسکات، چمنی محمد. **میزان فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در فرایند تولید فراورده گوشتی همبرگر.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۲؛ ویژه نامه تغذیه: ۱۴۶۰-۱۴۶۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۲ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۲**

۱. دانشجوی دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، گروه تخصصی علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات امنیت غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳. دانشیار، گروه تخصصی علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران(نویسنده مسؤول)
Email: Hamidezzatpanah@srbiau.ac.ir

۴. استاد، دانشکده پاتوبیولوژی، دانشگاه Guel ph، اونتاریو، کانادا

۵. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد میلیون‌ها بیماری عفونی منجر به مرگ در جهان شناخته شده است (۱). نقش بیماری‌زایی *کلستریدیوم دیفیسیل* برای اولین بار در دهه هفتاد میلادی به عنوان عامل کولیت با غشای کاذب مشخص گردید (۲). *کلستریدیوم دیفیسیل* اگزوتوکسین‌های کشنده ایجاد کننده کولیت و اسهال ناشی از مصرف آنتی بیوتیک به دلیل تغییر در تعادل فلور طبیعی روده را در افراد بستری در بیمارستان تولید می‌کند. در ابتدا بیمارستان به عنوان مهمترین محل انتقال باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان مطرح گردید که به آن بیماری بیمارستانی ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* (Nosocomial *Clostridium difficile Associated* Disease: *CDAD*) گویند (۳). با افزایش شیوع CDAD در بیمارستان، تعداد بیمارانی که در بیمارستان بستری نشده و همچنین آنتی بیوتیک مصرف نکردند در جامعه افزایش یافت که عفونت ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در جامعه (Community-Associated *Clostridium difficile infection:CACDI*)نام گرفت (۴).

با افزایش CACDI، مطالعات مربوط به شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در محیط خارج از بیمارستان آغاز گردید. بر اساس تحقیقات انجام گرفته؛ غذا به عنوان یکی از منابع احتمالی بالقوه انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان مطرح شد (۵). اکثر پژوهش‌های انجام گرفته در ارتباط با غذا، به گوشت و فراورده‌های گوشتی اختصاص دارد. اولین تحقیقات مرتبط با شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در این گروه از محصولات در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ از کشورهای کانادا و آمریکا گزارش شده است (۷، ۶).

همبرگر فراورده گوشتی است که بدلیل فرایند تولید و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویژه محصول در معرض خطرات میکروبی گوناگونی است (۸). همبرگر بر اساس استاندارد ملی ایران؛ از گوشت چرخ کرده حیوانات حلال گوشت نظیر گاو، گوساله و گوسفند همراه یا بدون افزودن چربی، ادویه و سایر افزودنی‌های مجاز تشکیل شده است که به اشکال مختلف تهیه و در بین کاغذهای مومی مجاز به صورت منجمد عرضه می‌گردد (۹). مطالعاتی در زمینه شیوع پاتوژن‌های بیماری‌زای غذازاد در همبرگر در مراحل فراوری محصول و سطح عرضه انجام گرفته است (۸ ، ۱۲- ۱۰).

بر اساس مطالعات انجام گرفته اجرای سیستم ایمنی مواد غذایی مانند اصول تجزیه و تحلیل خطرات و نقاط کنترل بحرانی (Hazard Analytical Critical Control Point: HACCP) می‌تواند در کنترل و کاهش آلودگی *کلستریدیوم دیفیسیل* در محصولات غذایی موثر باشد (۱۵- ۱۳).

روش کشت از روش‌های متداول تشخیص پرگنه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* است (۱۶). رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و دارا بودن فعالیت آنزیمی ال- پرولین آمینوپپتیداز جهت تایید پرگنه مشکوک *کلستریدیوم دیفیسیل* به کار می‌روند (۱۸، ۱۷). با توجه به اهمیت *کلستریدیوم دیفیسیل* در محصولات غذایی کشورهای پیشرفته دنیا، مطالعه‌ای در زمینه شیوع این باکتری در فراورده گوشتی همبرگر در کشورمان انجام نگرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه توصیفی تحلیلی، بررسی میزان فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در مسیر فراوری، ترکیبات اولیه تشکیل‌دهنده همبرگر و محصول نهایی نمونه‌برداری شده در دو گروه از کارخانجات تولیدکننده فراورده گوشتی همبرگر دارای گواهینامه HACCP و فاقد گواهینامه در استان اصفهان بود.

روش‌ها

نمونه‌برداری به روش سرشماری با تعداد کلی ۲۱۱ نمونه از مواد اولیه متشکله همبرگر شامل گوشت گاو، پروتئین سویا، ادویه (ترکیبی از پودر دارچین، فلفل سیاه و سماق)، پیاز، محصول نیمه فرایند شده پس از مرحله فرمینگ در دمای محیط و درنهایت همبرگر بسته‌بندی شده در دمای انجماد ۱۸- درجه سیلسیوس پس از مدت زمان ۴۸ ساعت از کلیه کارخانجات فعال تولیدکننده فراورده گوشتی همبرگر در استان اصفهان در شرایط واقعی تولید در تابستان و پاییز سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. در این مطالعه، ۳ کارخانه تولیدکننده دارای

گواهینامه(Hazard Analytical Critical Control Point:HACCP) از شرکت‌های معتبر صادرکننده گواهینامه کنترل کیفیت و ۴ کارخانه فاقد گواهینامه بودند. نمونه‌برداری با سواب از سطوح ماشین آلات تولیدی مانند چرخ گوشت نیز انجام گرفت. نمونه برداری با سواب از سطوح ماشین آلات تولیدی مانند چرخ گوشت و دیوارهای اتاق انجماد نیز انجام گرفت.

همبرگر مورد بررسی در این مطالعه، ترکیبی از ۳۵٪ پروتئین سویا، ۳۰٪ گوشت گاو چرخ کرده، ۱۶٪ پیاز، ۹٪ روغن سرخ کردنی، ۸٪ آرد گندم، ۱/۷٪ نمک و ۰/۳٪ ادویه بود که در همزن مخلوط، قالب‌گیری و در بین کاغذهای مومی قرار داده شد. در این بررسی، این محصول به عنوان نمونه نیمه فرآیند شده پس از مرحله فرمینگ در نظر گرفته شد. محصول بسته‌بندی و در نهایت به مدت ۴۸ ساعت منجمد گردید.

حدود ۵۰ گرم از نمونه گوشت گاو، پروتئین سویا، ادویه، پیاز، محصول نیمه فرآوری شده پس از مرحله فرمینگ و همبرگر در ظروف استریل نمونه‌برداری منتقل گردید و جهت انجام آزمایشات، به آزمایشگاه مرکز تحقیقات امنیت غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال داده شد.

۵ گرم از هریک از نمونه‌ها به ۲۵ میلی لیتر محیط مایع انتخابی *کلستریدیوم دیفیسیل* موکسالاکتام نوروفلوکسازین (*Clostridium difficle* moxalactam norfloxacin: CDMN) که شامل ترکیبی از ۴۰ گرم برلیتر پروتئوز پپتون (فلوکا، آمریکا)، ۵ گرم بر لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات (مرک، آلمان)، ۱ گرم برلیتر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (مرک، آلمان)، ۰/۱ گرم بر لیتر سولفات منیزیم (مرک، آلمان)، ۲ گرم برلیتر کلریدسدیم (مرک، آلمان)، ۶ گرم برلیتر فروکتوز (مرک، آلمان) و یک گرم برلیتر اسید سدیم تورکولیک (زیگما آلدریچ، آمریکا) غنی شده با ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر سیستئین هیدروکلرید (زیگما آلدریچ، آمریکا)، ۱۲ میلی گرم بر لیتر نوروفلوکسازین (زیگما آلدریچ، آمریکا) و ۳۲ میلی گرم برلیتر موکسالاکتام (زیگما آلدریچ، آمریکا) است ریخته شد. از روغن معدنی پارافین مایع دارویی (شرکت داروسازی حنان، ایران) جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی برروی سطح محیط مایع CDMN استفاده گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۷ روز انکوبه گردید. ۲ میلی لیتر از مایع در ۲ میلی لیتر اتانول ۹۹٪ (مرک، آلمان) ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداری گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفوژ (g × ۱۰۰۰۰) قرار گرفتند. رسوب پلت متشکله در بخش پایینی لوله بر روی محیط کشت CDMN آگار حاوی ترکیبات ذکر شده در محیط مایع CDMN و ۱۳ گرم برلیتر ترکیب آگار– آگار (های مدیا، هندوستان) و ۷٪ خون گوسفند (مرکز تحقیقات و تولید مواد بیولوژیک، ایران)، کشت داده شد. بی‌هوازی شدن نمونه‌ها در جار و با دستگاه مارت به مدت ۱۰ دقیقه در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت. گاز تزریقی به جار شامل ۱۰٪ دی اکسیدکربن، ۱۰٪ گاز هیدروژن و ۸۰٪ گاز نیتروژن بود. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس انکوبه گردید. کلنی‌های بزرگ، مسطح و کنگره‌دار با بوی مشخص مدفوع اسب بر روی محیط بلاد آگار (مرک، آلمان) ساب کالچر داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه گردیدند. آزمون بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و دیسک پرولین (Hardy Diagnostics ، آمریکا) برروی پرگنه‌های مثبت انجام شد.

اساس آزمون دیسک پرولین، وجود ترکیب ال پرولین بتانفتیل آمید (L-prolin B naphthylamide) در دیسک است که در حضور معرف PEP، ترکیب بتانفتیل آمین (B naphthylamine) آزاد می‌شود. معرف PEP حاوی ترکیب پارا دی متیل آمینوسینامالدهیل (para-dimethyl amino-cinnamaldehyl) ۰با اسید هیدروکلریدریک ضعیف است. در این آزمون ابتدا دیسک مرطوب شده با آب مقطر استریل برروی لام قرار داده شد. پرگنه‌های مشکوک با لوپ از محیطCDMN آگار بر روی دیسک منتقل شدند. ایجاد رنگ صورتی تیره تا قرمز پس از زمان دو دقیقه

نشان‌دهنده مثبت بودن پرگنه‌های *کلستریدیوم دیفیسیل* از نظر دارا بودن آنزیم ال- پرولین امینوپپتیداز است (۶ و ۱۸-۱۷). نتایج حاصل از جداسازی *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو سطح آمار توصیفی شامل فراوانی و آمار تحلیلی شامل آزمون مربع کای χ^2 با سطح معنی داری $P < ۰/۰۵$ در نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۹۰ نمونه مورد آزمایش در کارخانجات دارای گواهینامه HACCP، تعداد (فراوانی) نمونه های گوشت گاو، پروتئین سویا، ادویه، پیاز، سواب، محصول نیمه فرآیند شده پس از مرحله فرمینگ و همبرگر پس از مرحله انجماد به ترتیب، ۲۲(۲۴/۴٪) ،۶ (۶/۶٪)، ۸ (۸/۸٪)، ۶ (۶/۶٪)،۲۴ (۲۶/۶٪)، ۱۲ (۱۳/۵٪) و ۱۲ (۱۳/۵٪) بود. کلیه نمونه‌های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* در این گروه در روزهای واحد در فصل تابستان جداسازی گردید. در جدول ۱ توزیع فراوانی و درصد نمونه‌های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* در این گروه از کارخانجات نشان داده شده است.

از ۱۲۱ نمونه مورد آزمون در کارخانجات بدون گواهینامه HACCP، به ترتیب ۳۲ (۲۶/۴٪)، ۸ (۶/۶٪)، ۹ (۷/۴٪)، ۸ (۶/۶٪)، ۳۲ (۲۶/۴٪)، ۱۶ (۱۳/۲٪)، ۱۶ (۱۳/۲٪) را از نظر تعداد (فراوانی) به محصولات گوشت گاو، پروتئین سویا، ادویه، پیاز، سواب، محصول نیمه فرآیند شده پس از فرمینگ و همبرگر پس از مرحله انجماد اختصاص داشت. یک و دو نمونه مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* از هر یک از نمونه‌های گوشت خام، پیاز و سواب به ترتیب در دو فصل تابستان و پاییز شناسایی گردید. به همین ترتیب *کلستریدیوم دیفیسیل* در محصول نیمه فرآیند شده پس از مرحله فرمینگ و همبرگر پس از مرحله انجماد با تعداد یک و سه نمونه در فصل تابستان و پاییز، در روزهای واحد جداسازی گردید (جدول ۲). بر اساس نتایج، شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در دو فصل تابستان و پاییز (P= ۰/۳۴) اختلاف معنی‌داری نداشت. ولی فراوانی این میکروارگانیسم، بر اساس دارا بودن کارخانه از نظر گواهینامه HACCP اختلاف معنی‌داری (P = ۰/۰۳)را نشان داد.

جدول ۱: توزیع فراوانی و درصد نمونه های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* مورد مطالعه در کارخانجات دارای گواهینامه HACCP

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت (درصد)
گوشت خام	۲۲	۱ (۴/۵)
پروتئین سویا	۶	منفی
ادویه	۸	منفی
پیاز	۶	منفی
سواب	۲۴	۲ (۸/۳)
محصول نیمه فرایند شده پس ازفرمینگ	۱۲	۱ (۸/۳)
محصول همبرگر پس از انجماد	۱۲	۱ (۸/۳)
مجموع	۹۰	۵ (۵/۵)

جدول ۲: توزیع فراوانی و درصد نمونه های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* مورد مطالعه در کارخانجات فاقد گواهینامه HACCP

نوع نمونه	تعداد نمونه	فراوانی (درصد)
گوشت خام	۳۲	۳ (۹/۳)
پروتئین سویا	۸	منفی
ادویه	۹	منفی
پیاز	۸	۳ (۳۷/۵)
سواب	۳۲	۳ (۹/۳)
محصول نیمه فرایند شده پس ازفرمینگ	۱۶	۴ (۲۵/۰)
محصول همبرگر پس از انجماد	۱۶	۴ (۲۵/۰)
مجموع	۱۲۱	۱۷ (۱۴/۰)

بحث

کلستریدیوم دیفیسیل عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شایع است. فراوانی نسبی *کلستریدیوم دیفیسیل* در مدفوع بیماران بستری در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان، ۲۲/۲٪ گزارش گردید (۱۹). در مطالعه دیگر ریبوتایپ‌های گوناگونی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه‌های مدفوع بیماران بستری در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان مشاهده شد. در این بررسی، احتمال وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* در مواد غذایی مطرح گردید (۲۰).

عدم وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* در مطالعات انجام گرفته در کشورهای اتریش و هلند، در ۲۶ و ۱۴۵ نمونه گوشت گاو تکه‌ای اعلام شد (۲۲، ۲۱). Indra و همکاران، عدم وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* را در ۲۵ نمونه گوشت گاو چرخ کرده، ۲۷ نمونه گوشت خوک و ۶ نمونه گوشت جوجه نیز گزارش نمودند (۲۱). De Boer و همکاران تنها در یک نمونه از ۱۶ نمونه گوشت بره و ۷ نمونه از ۲۵۷ نمونه گوشت جوجه *کلستریدیوم دیفیسیل* را شناسایی نمودند. در این بررسی، عدم وجود *کلستریدیوم دیفیسیل* در ۶۴ نمونه گوشت خوک و ۱۹ نمونه گوشت گوساله نیز گزارش گردید (۲۲). نتایج مطالعه ما تا حدود زیادی با مطالعات موجود مطابقت دارد در حالی که میزان شیوع آلودگی به *کلستریدیوم دیفیسیل* در گوشت خام گاوی در این بررسی، ۱/۸٪ است.

کلستریدیوم دیفیسیل در پروتئین سویا که برای اولین بار در ایران مورد آزمایش قرار گرفت جداسازی نشد. با توجه به پراکندگی اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در محیط می‌توان گفت که عدم وجود این باکتری مربوط به شرایط فرآوری و تولید پروتئین سویا است. پروتئین سویا تحت فرایندی با عنوان "پخت اکستروژن" تولید می‌شود که ممکن است منجر به نابودی اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در دمای مرطوب بالای ۸۵ درجه سیلسیوس گردد که در یافته‌های مطالعه Rodriguez-Palacios و همکاران به آن اشاره شده است (۲۳).

در مطالعه حاضر، *کلستریدیوم دیفیسیل* در ادویه نیز مشابه پروتئین سویا یافت نگردید. ادویه محصولی است که آلودگی به اسپور جنس کلستریدیوم در آن مطرح است (۲۵، ۲۴). عدم وجود اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در این مطالعه نیز ممکن است به دلیل فرایند استریل ادویه با اشعه در مقدار ۲ کیلوگری (KG) باشد که می‌تواند منجر به نابودی اسپور گردد (۲۶).

با توجه به وجود اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در محیط و خاک، جداسازی این باکتری در نمونه‌های پیاز در مطالعه حاضر، غیر منتظره نیست (۲۸، ۲۷). به طوری که در مطالعه Al Saif و Brazier *کلستریدیوم دیفیسیل* در ۲/۴٪ از نمونه‌های سبزی خام که پیاز نیز در این بررسی مورد آزمایش قرار گرفت جداسازی گردید (۲۷). در بررسی Simango به میزان آلودگی خاک جامعه شهری زیمبابوه به *کلستریدیوم دیفیسیل* تا۳۷٪ اشاره شده است (۲۸).

میزان فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در محصول نیمه فرآیند شده پس از مرحله فرمینگ نسبت به ماده اولیه در کارخانجات بدون گواهینامه HACCP متفاوت بود که می‌تواند حاکی از انتقال آلودگی اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* از دستگاه‌های مسیر فرآوری مانند چرخ گوشت به محصول باشد. اثبات این فرضیه نیاز به آزمایشات ملکولی برروی پرگنه های مثبت در این بررسی دارد.

شناسایی *کلستریدیوم دیفیسیل* در فرآورده همبرگر منجمد پس از ۴۸ ساعت همراه با محصول نیمه فرآیند شده پس از مرحله فرمینگ می‌تواند مربوط به مقاومت اسپور *کلستریدیوم دیفیسیل* در شرایط انجماد باشد. در حالی که در مطالعه Freeman و Wilcox به مقاومت اسپور کلستریدیوم دیفیسل در دمای یخچالی (۴ درجه سیلسیوس) و انجماد (۲۰- درجه سیلسیوس) اشاره شد (۲۹).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، میزان شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در کارخانجات دارای گواهینامه HACCP در مقایسه با کارخانجات فاقد گواهینامه متفاوت بود. این نتیجه با نتایج مطالعات Houser و همکاران در کشور آمریکا و

Bouttier و همکاران در کشور فرانسه مطابقت دارد که به اجرای سیستم HACCP در راستای کاهش شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* اشاره نمودند (۱۵، ۱۴).

نتایج این بررسی به دلیل عدم وجود گزارش مشخص از تشخیص فنوتیپی *کلستریدیوم دیفیسیل* با آزمون دیسک پرولین، با مطالعات انجام گرفته با روش ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مقایسه گردید. در مطالعه Fedorko و Williams تطابق تشخیص *کلستریدیوم دیفیسیل* با آزمون بیو شیمیایی دیسک پرولین تایید گردید. در بررسی ذکر شده، روش تشخیص با دیسک پرولین جهت شناسایی سریع باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* معرفی گردید (۱۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به عدم وجود مطالعات مشابه در خصوص شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در مسیر فرآوری و تولید همبرگر، مطالعه حاضر اولین گزارش از میزان فراوانی *کلستریدیوم دیفیسیل* در شرایط واقعی تولید فرآورده گوشتی همبرگر در اصفهان می‌باشد که نشان‌دهنده احتمال انتقال *کلستریدیوم دیفیسیل* به انسان با مصرف همبرگر است. با توجه به اینکه روش‌های متداول پخت تاثیری بر نابودی اسپور باکتری *کلستریدیوم دیفیسیل* ندارد کنترل دمای پخت به صورت مناسب جهت آماده‌سازی همبرگر اهمیت دارد. البته نظارت دقیق و رعایت اصول بهداشتی در طول فرآیند تولید در کاهش آلودگی موثر است. همچنین با توجه به احتمال مخاطرات ناشی از *کلستریدیوم دیفیسیل* در مواد غذایی ضروری است بررسی‌های جامع در سایر مناطق کشور انجام گیرد تا بتوان آمار مشخصی از وضعیت شیوع *کلستریدیوم دیفیسیل* در کشور به دست آورد. این مطالعه با تشخیص پرگنه‌های مثبت *کلستریدیوم دیفیسیل* تولید کننده زهرابه در حال انجام و پی‌گیری است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل از بخشی از نتایج پایان نامه دکترای تخصصی مصوب در دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است. کلیه نویسندگان این مقاله، مراتب سپاس خود را آقای دکتر اکبر انصاریان، کارشناس مواد خوراکی معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بویژه سرکار خانم پریسا شعاعی که ما را در اجرای مطالعه یاری کردند اعلام می‌دارند.

References

1. D.Redelings M, Sorvillo F, Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. Emerging Infectious Diseases 2007; 13 (9): 1417 –19.
2. Rupnik M. J, Songer G. *Clostridium difficile*: It's Potential as a source of foodborn disease. Advances in Food and Nutrition Research 2010; 60: 53-66.
3. Weese J.S. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2010; 16 (1): 3-10.
4. Rupnik M, Wilcox M.H. Gerding D.N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 2009; 7(7): 526-36.
5. Gould L.H, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen? Clinical Infectious Diseases 2010; 51: 577-82.
6. Rodriguez-Palacios A, Staempfli H.R, Duffield T, Weese J. S. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerging Infectious Disease 2007; 13: 485-7.
7. Songer J. G, Trinh H. T, Killgore G. E, Thompson A. D, McDonald L. C, Limbago B. M. *Clostridium difficile* in Retail Meat Products, USA, 2007. Emerging Infectious Diseases 2009; 15: 819- 21.
8. Ranucci D, Miraglia D, Branciari R, D'Ovidio V, Severini M. Microbiological characteristics of hamburgers and raw pork sausages, and antibiotic-resistance of isolated bacteria. Veterinary Research Communications 2004; 28: 269-72.

9. Iran National Standard for row frozen hamburger- specifications. No. 2304. 2008; 3th Ed. Available from: http://www.isiri.org.
10. Shahraz F, Dadkhah H, Khaksar R, Mahmoudzadeh M, Hosseini H, Kamran M, Bourke P. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of mecA gene in Staphylococcus aureus isolated from packaged hamburger. Meat Science 2012; 90: 759-63.
11. Hosseini S.M, Ezzatpanah H, Aminlari M, Mazaheri Assadi M. Ataie D. Investigation the contamination of E.coli O157:H7 in processed meat products produced in two factories at Shiraz and Tehran. Food Technology & Nutrition 2011; 8(3): 37- 47. [In Persian]
12. Kargar M, Dianati P. Homayoon M. Evolution of Virulence genes and antibiotic resistance of enterhemorrhagic Escherichia coli isolated from hamburger by Multiplex PCR in Shiraz. Journal of Isfahan Medical School 2011; 29(148): 977- 87. [In Persian]
13. Iran National Standard as a Guidelines for the application of the hazard analysis critical control point (HACCP System). No. 4557. 1st Ed. Avaiable from: http://isiri.org
14. Bouttier S, Barc M. C. Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. *Clostridium difficile* in ground meat, France. Emerging Infectious Diseases 2010; 16: 733- 4.
15. Houser B. A, Soehnlen M. K, Wolfgang D. R, Lysczek H. R, Burns C. M. Jayarao B. M. Prevalence of *Clostridium difficile* toxing genes in the feces of veal calves and incidence of ground veal contamination. Foodborn Pathogens and Disease 2012; 9: 32-6.
16. Lyerly D.M, Krivan H.C, Wikins T.D. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clinical Microbiology Reviews 1988; 1: 1-18
17. Fedorko D.P, Williams E.C. Use of Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar and L-Proline-AMinopeptidase (PRO discs) in the rapid identification of Clostridium difficile. Journal of clinical microbiology 1997; 35(5): 1258-9.
18. Emadzade M.K. Akbarzadeh A. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 3th Ed. Thhran: Jahan e Adib Publication; 2010: 282-4. [In Persian]
19. Nasri M.R, Khorvash F, Zolfaghari M.R, Mobasherizadeh S. The relavtive frequency of *Clostridium difficile* in fecal samples of hospitalized patients with diarrhea by ELISA methos. Journal of Isfahan Medical School 2012; 29(167):1-7. [In Persian]
20. Jalali M, Khorvash F, Warriner K. Weese JS. *Clostridium difficile* infection in an Iranian hospital. BMC Research Notes 2012; 5: 1-5.
21. Indra A, Lassnig H, Baliko N, Much P, Fiedler A, Huhulescu S, Allerberger F. Clostridium difficile: a new zoonotic agent? Wiener KlinischeWochenschrift 2009; 121(3):91-5.
22. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, Harmanus C, Kuijper EJ. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands. International journal of food microbiology 2011;144(3):561-4.
23. Rodriguez-Palacios A, LeJeune J.T. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in Clostridium difficile. Applied and Environmental Microbiology 2011; 77: 3085-91.
24.Banerjee M, Sarkar P. K. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. Food Control 2004; 15: 491-6.
25. Aguilera M. O, Stagnitta P. V, Micalizzi B, Stefanini de Guzman A. M. Prevalence and characterization of Clostridium perfringens from spices in Argentina. Anaerobe 2005; 11: 324-7.
26. Farkas J, Mohacsi-Farkas C. History and future of food irradiation. Trends in Food Science and Technology 2011; 22: 121-6.
27. Al Saif N, Brazier J. S. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. Journal of Medical Microbiology1996; 45: 133-7.
28. Simango C. Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2006; 100: 1146-50.
29. Freeman J, Wilcox M. H. The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces. Journal of Clinical Pathology 2003; 56: 126-8.

The Frequency of *Clostridium difficile* in Processing steps of hamburger

Zahra Esfandiari[1], Mohammad Jalali[2], Hamid Ezzatpanah[3], Scott Weese[4], Mohammad Chamani[5]

Original Article

Abstract

Background: *Clostridium difficile* (*C. difficile*) is known as a cause of diarrhea through antibiotic usage and life threatening pseudo-membranous colitis. The meat products such as hamburger are one of possible sources for *C. difficile* transmission to human. The present study was conducted to examine the frequency of *C. difficile* in the processing steps of hamburger by culture method and biochemical test.

Methods: In this cross sectional study, 211 samples including raw material and final product of hamburger were collected from 3 and 4 hamburger manufacturing companies certified with and without HACCP, respectively during June 2012 to January 2013. The sampling by swab was done from production facilities. The samples were cultured in *Clostridium difficile* moxalactam norfloxacin (CDMN) broth. Afterwar it was streaked on the CDMN agar in anaerobic condition. The suspicious colonies were an aerobically sub cultured on the blood agar. Bacteriological examinations were performed by some biochemical tests. Collected data were analyzed using SPSS (version 16). Descriptive statistics and Chi-square tests were used with p-value ≤ 0.05.

Findings: The frequency of *C. difficile* was 5.5% and 14% in hamburger manufacturing companies certified with and without HACCP, respectively. There was no difference in *C.difficle* prevalence according to the season (p= 0.34). But the difference was observed in the results based on HACCP certification (p= 0.03).

Conclusion: These results indicate the hamburger may serve as a vehicle for *C. difficile* transmission to human. Furthermore, HACCP implementation can reduce the *C.difficle* prevalence.

Key words: *Clostridium difficile*, hamburger, biochemical test

Citation: Esfandiari Z, Jalali M, Ezzatpanah H, Weese Scott, Chamani M. **The Frequency of *Clostridium difficile* in Processing steps of hamburger**. J Health Syst Res 2013; Nutrition supplement: 1460-1468

Received date: 13/07/2013 **Accept date: 14/10/2013**

1. PhD Student, Department of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Food Security Research Center, Department of Food Technology, School of Nutrition and Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding author) Email: Hamidezzatpanah@srbiau.ac.ir
4. Professor, Department of Pathobiology, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada
5. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran