میزان جداسازی باکتری های پاتوژن برخی از محصولات غذایی در تهران

دکترمحمدحسین سالاری [۱]، ربابه حافظی [۱]

واژه های کلیدی : *باکتری های پاتوژن، محصولات غذایی، تهران*

چکیده

باکتری های پاتوژن با رشد، تکثیر و تهاجم به دستگاه گوارش و یا تولید اگزوتوکسین در مواد غذایی باعث بیماری می شوند. در مورد گروه دوم می توان توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم بوتولینوم* و *کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ A* را نام برد.

دراین مطالعه باکتری های موجود در ۳۷۵ محصول غذایی به روش کشت مورد بررسی قرار داده، که نتایج بدست آمده بدین صورت است :

۱۲ مورد (۳/۴ درصد) باسیلوس سرئوس، ۲۵ مورد (۷/۱ درصد) استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت ۳۷ مورد (۱۰/۶ درصد) استافیلوکوکوس کوآگولازمنفی ، ۱۸ مورد (۵/۱درصد)، استرپتوکوکوس آلفاهمولیز ، ۳ مورد (۰/۸ درصد) انتروکک و ۵ مورد (۱/۴ درصد) کلبسیلا.

سرآغاز

آب و مواد غذایی درانتقال عوامل بیماریزا حائز اهمیت می باشد. از عواملی که باعث آلودگی مواد غذایی می شوند می توان به باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها، انگل ها و سموم اشاره داشت. لذا انواع بیماری هایی که از طریق مواد غذایی به انسان منتقل می شود بسیار گسترده اند. مسمومیت های غذایی با علایم کلینیکی مانند اسهال، استفراغ، تهوع، دل درد و... همراه بوده، اغلب بیمار پس از دوره ۴۸- ۲۴ ساعت، بدون درمان نیز بهبودی می یابد (باستثنای بوتولیسم). باکتری های مهم عامل مسمومیت غذایی عبارتند از : *باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ A ، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم بوتولینوم* و نیز *ویبریوپا را همولیتیکوس ، سالمونلا* و *شیگلا*.

به منظور جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و نیز مسمومیت ناشی از آن می بایست صنایع غذایی درطول فرآیند تولید، ذخیره، بسته بندی و نیز انتقال مواد غذایی، ضمن رعایت دقیق معیارهای بهداشتی بگونه ای عمل نمایند که احتمال آلودگی این مواد موجود نباشد (۱۱،۵).

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ ، تهران، ایران.

نمونه گیری و روش بررسی

دراین مطالعه جهت شناسایی عوامل باکتریال آلوده کننده نمونه هایی از مواد غذایی مانند کنسروهای لوبیا، بادمجان، نخود فرهنگی، قرمه سبزی، ماهی، رب گوجه فرنگی، کمپوت های گیلاس و سیب و نیز سس مایونز، کشک ، شیربتی خامه ای ، شیر، بستنی ، سوسیس و کالباس از سطح تهران گردآوری شد. باکتری های موجود در مواد غذایی با روش های متداول باکتریولوژی و استفاده از محیط های کشت بلاداگار، اندوگار، EYA ، BHI [1] و تست های بیوشیمیایی مانند ژلاتین، TSI [2] ، SIM [3] ، اوره، اندول، اسکولین، کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز و نیز روش های رنگ آمیزی گرم و اسپور مورد شناسایی قرار گرفتند.

ابتدا قوطی های کنسرو را تمیز و ضدعفونی کرده، پس از بازنمودن آنها مقدار یک گرم از محتویات کنسرو را در ۱۰ سی سی محیط مایع [4] ریخته شد. برای انجام آزمایش شمارش کلنی رقت های ۰/۱ ، ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ از آنها تهیه شد. سپس با آنس استاندارد به اندازه یک لوپ از مایع (۰/۰۱ سی سی) بر روی محیط بلاداگار و اندوآگار کشت داده، آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. یک لوپ از مایع را نیز روی محیط اختصاصی [5] کشت نموده، به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی (بااستفاده از گاز پک و جار بی هوازی) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ضمن مطالعه کلنی های ایجاد شده و شمارش آنها تعداد هریک از باکتری های موجود در هر گرم مواد غذایی را محاسبه نموده و با استفاده از تست های اختصاصی باکتری نیز مورد شناسایی قرار می گرفت. لازم به ذکراست که نمونه برداری و مطالعه دیگر مواد غذایی نیز به روش فوق انجام گرفت.

برای تشخیص انتروتوکسین *باسیلوس سرئوس* باکتری جدا شده روی محیط BHI کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. با استفاده از فسفات بافر(ph = ۷/۰۲) محلولی با رقت ۰/۱ از محیط مذکور تهیه و با دور ۲۵۰۰ RPM سانتریفوژ و سپس قسمت فوقانی آن با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون پالایش شد. محیط اختصاصی کشت [6] سلول همراه با سلول های هیلا[7] فراهم نموده، به هر حفره میکروتایترلیپ ۰/۲ سی سی از محلول فوق که دارای ۱۰ ۲/۵ عدد باکتری می باشد افزوده شد. مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول سانتریفوژ و فیلترشده فوق الذکر را نیز با رقت ۱/۴۰ افزوده و درشرایط اتمسفر و ۵ درصد گاز کربنیک به مدت ۴۸ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرارداده شد.درصورت گردشدن (مردن)

1- Egg Yolk Agar
2- Triple Suger Iron agar
3- SH2-Indol Motility
4- BHI Broth
5- BHI agar
6- Minimum essential medium (MEM)
7- Hela

حداقل ۵۰ درصد سلول ها، نتیجه آزمایش مثبت ودرغیراینصورت منفی قلمداد می گردد. جهت کنترل آزمایش به یک ردیف از حفره های میکروتایترپلیپ، توکسین اضافه ننموده که دراین صورت سلول ها بحالت عادی رشد می کنند (۱۸،۸،۴).

یافته ها

دراین مطالعه جمعاً ۳۵۰ محصول غذایی ظاهراً سالم از نظر باکتری های هوازی، بی هوازی اختیاری و بی هوازی مورد بررسی قرار گرفته است که عبارتند از : کنسرولوبیا (۲۵ مورد)، نخودفرنگی (۱۰ مورد)، بادمجان (۱۰ مورد)، گوجه فرنگی (۱۵ مورد)، قیمه (۵ مورد)، قرمه سبزی (۵ مورد)، تن ماهی (۵ مورد)، کمپوت سیب (۵ مورد)، کمپوت گیلاس (۱۰ مورد)، سس مایونز (۵ مورد)، کشک (۵ مورد)، شیرپاستوریزه (۲۰ مورد)، سوسیس و کالباس (۵۰ مورد)، شیرخام (۳۰ مورد)، پنیر (۲۰ مورد)، بستنی (۳۰ مورد) و شیرینی خامه ای (۱۰۰ مورد).

نتایج بدست آمده از آن است که بالاترین درصد آلودگی مواد غذایی مورد مطالعه بترتیب عبارتند از : بستنی (۶۰ درصد)، کشک (۴۰ درصد)، کمپوت سیب (۴۰ درصد)، سوسیس و کالباس (۳۸ درصد) (شترنگ ۱ و ۲).

دراین مطالعه با استفاده از کشت سلول توانایی توکسین زایی باسیلوس های سرئوس جدا شده از محصولات غذایی مورد بررسی قرار گرفته است (شترنگ ۳). لازم به توضیح است که نسبت فراوانی نسبی محاسبه شده در جداول درستون اول نسبت به کل نمونه های کار شده و موارد دیگر نسبت به تعداد هر نمونه محاسبه گردیده است.

گفتگو و بهره گیری پایانی

باتوجه به اینکه دراین مطالعه دو باکتری مهم عامل مسمومیت غذایی یعنی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (کوآگولاز مثبت) جدا گردیده است، در مورد این دو باکتری مطالبی ارائه می گردد.

باسیلوس سرئوس معمولاً بصورت اسپور و یا باکتری فعال در خاک و محیط زندگی موجود بوده ، دارای سرولیزین (همولیزین) و لسیتیناز می باشد. عوامل اصلی مسمومیت غذایی انتروتوکسین های حساس و مقاوم به حرارت باکتری است. مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری را به دو گروه زیر تقسیم می نمایند.

نوع اول : مسمومیت غذایی توام با استفراغ : عامل این نوع مسمومیت غذایی انتروتوکسین مقاوم به حرارت است که باکتری تولید می نماید. بطور متوسط دوره کمون این نوع مسمومیت غذایی ۲ ساعت و دوره بیماری ۹ ساعت می باشد. علایم کلینیکی بیماری عبارتند از : استفراغ، تهوع، درد شکم.

نوع دوم : مسمومیت غذایی همراه با اسهال : مکانیسم عمل انتروتوکسین شبیه انتروتوکسین های *اشرشیاکلی* و *ویبریوکلرا* است. عامل این نوع مسمومیت غذایی انتروتوکسین حساس به حرارت است که باکتری تولید می نماید. بطور متوسط دوره کمون بیماری ۹ ساعت و دوره بیماری ۲۴

ساعت می باشد. علایم کلینیکی بیماری عبارتند از : اسهال، تهوع، درد شکم (۱۷،۱۰،۷).

دراین مطالعه جمعاً ۱۲ مورد از کل محصولات غذایی مورد مطالعه یعنی ۱ مورد (۶/۷ درصد) رب گوجه فرنگی، ۱ مورد (۲۰ درصد) کشک، ۳ مورد (۳ درصد) شیرینی خامه ای ، ۱ مورد (۳/۳ درصد) بستنی ، ۱ مورد (۳/۳ درصد) شیرخام، ۲ مورد (۱۰ درصد) پنیر، ۱ مورد (۵ درصد) شیرپاستوریزه ، ۲ مورد (۴ درصد) سوسیس و کالباس دارای باسیلوس سرئوس بود.

درسال ۱۹۸۸ و ۱۹۹۵ آلودگی مواد غذایی به باسیلوس سرئوس بدین صورت گزارش شد : شیرخام ۹ درصد، پنیر ۱۴ درصد، بستنی ۵۲ - ۴۸ درصد، شیر تخمیرشده ۱۷ درصد و شیر پاستوریزه ۳/۵ - ۲ درصد (۱۷،۱).

براساس تحقیقی که در سال ۱۹۷۷ درهلند صورت گرفت ۷۰ درصد *باسیلوس سرئوس های* جدا شده از شیرقادرند انتروتوکسین تولید نماید. درحالی که در نروژ این پدیده در سال ۱۹۳۳ ، ۵۹ درصد گزارش شد. براساس نتایج این مطالعه ۵ مورد (۴۱/۷ درصد) *باسیلوس های سرئوس* جدا شده توان توکسین زایی بسیار کم، ۲ مورد (۱۶/۷ درصد) کم، ۴ مورد (۳۳/۳ درصد) متوسط و ۱ مورد (۸/۳ درصد) قدرت توکسین زایی بسیار بالایی داشتند (۱۵، ۱۶).

مسمومیت غذایی ناشی از *باسیلوس سرئوس* در انگلستان و آمریکا حدود یک درصد، هلند ۱۱ درصد، کانادا ۲ درصد (سال های ۸۰ - ۱۹۷۰) و در تایوان ۱۸ درصد (سال های ۸۶-۱۹۷۵) گزارش د. در مجارستان از این باکتری بعنوان سومین عامل مسمومیت غذایی در سال های ۶۸- ۱۹۶۰ نام برده شده است.

باسیلوس سرئوس بدلیل تولید اسپور در حرارت های پاستوریزاسیون از بین نمی رود. ضمناً گزارش می شود بعضی از نژادهای این باکتری قادرند در دمای ۶- ۴ درجه سانتی گراد نیز بخوبی رشد و تکثیر نمایند. لذا به لحاظ خصوصیات اسپورزایی، تحمل نژادی از این باکتری در دمای یخچال و نیز انتروتوکسین های آن می توان آن را بعنوان یکی از عوامل مهم مسمومیت غذایی نام برد (۱۴ ،۹،۶،۲،۱).

مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به انتروتوکسین مقاوم به حرارت باکتری است. این نوع مسمومیت غذایی گاهی بشکل اپیدمی های کوچک مشاهده می گردد. علایم بیماری عبارتند از : تهوع، استفراغ ، دردهای شدید شکم، اسهال و...

دراین مطالعه از محصولات غذایی مورد مطالعه ۲۵ مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* (کوآگولاز مثبت) جدا گردید. شاید بتوان این مواد غذایی را با توجه به حضور کافی باکتری در آنها به عنوان مواد غذایی آلوده ای نام برد که می توانند منجر به مسمومیت غذایی گردند. دراین رابطه پژوهشگران ۳۰ - ۱۶درصد مواد غذایی مورد مطالعه خود را آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نموده اند (۱۲،۱۱،۱۰،۷،۳).

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاران محترم بخش باکتریولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران مخصوصاً استاد محترم جناب آقای دکتر کیومرث قاضی سعیدی و خانم نسرین ایرانپرست و نیز از همکاران محترم مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی یزد وابسته به این دانشگاه بخصوص خانم ها سحرامیرمعافی و فاطمه فلاح صمیمانه تشکر می نماید.

شترنگ ۱- توزیع فراوانی مواد غذایی فرآیند شده مورد مطالعه برحسب جداسازی باکتری از آنها

نمونه	تعداد نمونه n* = ۱۰۰		باسیلوس سرئوس n = ۲		استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت n = ۲		استافیلوکوکوس کواگولاز منفی n = ۳		استرپتوکوکوس آلفاهمولیز n = ۵		کلبسیلا n = ۱		جمع n = ۱۲	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کنسرو نخودفرنگی	۱۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۳	۳۰
کنسرو لوبیا	۲۵	۲۵	۰	۰	۰	۰	۱	۴	۱	۴	۰	۰	۲	۸
کنسرو بادمجان	۱۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
رب گوجه فرنگی	۱۵	۱۵	۱	۶/۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۶/۷
کنسرو قیمه	۵	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کنسرو قرمه سبزی	۵	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سس مایونز	۵	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کشک	۵	۵	۱	۲۰	۰	۰	۱	۲۰	۰	۰	۰	۰	۲	۴۰
نان ماهی	۵	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کمپوت گیلاس	۱۰	۵	۰	۰	۱	۱۰	۰	۰	۲	۲۰	۰	۰	۳	۳۰
کمپوت سیب	۵	۵	۰	۰	۱	۲۰	۰	۰	۱	۲۰	۰	۰	۲	۴۰

* n : تعداد کل نمونه های کارشده

n : تعداد نمونه های دارای باکتری

شترنگ ۲- توزیع فراوانی مواد غذایی مورد مطالعه بر حسب جداسازی باکتری از آنها

نمونه	تعداد نمونه n = ۲۵۰		باسیلوس سرئوس n = ۱۰		استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت n = ۲۲		استافیلوکوکوس کواگولاز منفی n = ۲۴		استرپتوکوکوس آنفالیتیکوس n = ۱۳		اشرشیاکلی n = ۲		کلبسیلا n = ۲		جمع n = ۷۶	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
شیرپاستوریزه	۱۰۰	۴۰	۳	۳	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۸	۸	۱	۱	۲	۲	۳۳	۴۳
سوسیس و کالباس	۵۰	۲۰	۲	۴	۴	۸	۸	۸	۲	۴	۱	۱	۲	۴	۱۹	۲۸
پنیر سفید	۳۰	۱۲	۱	۳/۳	۴	۱۳/۳	۸	۳۶/۷	۲	۶/۷	-	-	-	-	۸	۶۰
پنیر سفید	۳۰	۱۲	۱	۳/۳	۳	۱۰	۳	۱۱	۱	۳/۳	-	-	-	-	۵	۱۶/۷
پنیر	۲۰	۸	۲	۱۰	۲	۱۰	۳	۱۵	۱	۳/۳	-	-	-	-	۷	۳۵
شیرپاستوریزه	۲۰	۸	۱	۵	-	-	۲	-	-	-	-	-	-	-	۳	۱۵

شترنگ ۳ - توزیع فراوانی مواد غذایی مورد مطالعه برحسب جداسازی *باسیلوس سرئوس* و توان توکسین زایی این باکتری

نمونه	تعداد نمونه n° =۳۵۰		دارای باسیلوس سرئوس n =۱۲		نتیجه کشت سلول			
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	+۱ n =۵	+۲ n =۲	+۳ n =۴	+۴ n =۱
کنسرو	۷۰	۲۰	-	-	-	-	-	-
کمپوت	۱۵	۴/۳	-	-	-	-	-	-
سس مایونز	۵	۱/۴	-	-	-	-	-	-
کشک	۵	۱/۴	۱	۲۰	۱	-	-	-
رب گوجه فرنگی	۵	۱/۴	۱	۲۰	۱	-	-	-
شیرینی خامه ای	۱۰۰	۲۸/۶	۳	۳	۱	-	۱	۱
بستنی	۳۰	۸/۶	۱	۳/۳	-	-	۱	-
شیرخام	۳۰	۸/۶	۱	۳/۳	-	-	۱	-
پنیر	۲۰	۵/۷	۲	۱۰	۱	-	۱	-
شیرپاستوریزه	۲۰	۵/۷	۱	۵	-	۱	-	-
سوسیس و کالباس	۵۰	۱۴/۳	۲	۴	۱	۱	-	-

n ° : تعداد کل نمونه ها

کتابنامه

1- Ahmed R, Sanker MP, Jacksom S, Ackermann HW and Kasatiya SS (1995): Bacillus cereus phage typing as an epidemiological tool in out breaks of food poisoning. *J Clin Microbiol*, **33**(3): 636-40.

2- Becker H, Schaller G, Von-wiese W and Terplan G (1994): Bacillus cereus in infant foods and dried milk proudcts. *Int J Food Microbiol*, **23**(1): 1-15.

3- De-Luca G, Zanetti F and Stampis (1997): *Staphylococcus aureus* in dairy products in Bologna area, *Int J Food Microbiol*, **35**(3): 267-7.

4- Drob niewski FA (1993) : Bacillus cereus and related species. Clin Microbiol Rev, **6**(4): 324-38.

5- Elizabeth AN (1990): *Microbiology and Infectious Disease*, 3rd edition.

Williams and Wilkins.
6- Ellen JD, Baron K and Sydney MF (1990): *Diagnostic Microbiology,* 8th edition, Mosbey company.
7- Elsenberg MS, Garrslev K, Brown W and et al (1975): Staphylococcal food poisoning aboard a commerical alrcraft, *Lancet*, **2**:595-9.
8- Mohon CR and Manaselis G (1995): *Texbook of Diagnostic Microbiology,* 1st edition. W.B. Saunders company.
9- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA and Rosenthal KS (1994): *Medical Microbiology,* 2nd edition, Mosbey-year book.
10- Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW and Homg CB (1997): Food-bom disease outbreaks due to bacteria in taiwan 1986 to 1995, *J Clin Microbiol,* **35**(5): 1260-2.
11- Pereira ML, Do - carmo LS, Dos - santos EJ and Bergdoll MS (1994): Staphylococcal food poisoning from cream-Filled cake in a metropolitan area of south-eastern Brazil. *Rev Saude Publica,* Dec, **28**(6): 406-9.
12- Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C and Richard N (1997): Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in france. *Int J Food Microbiol,* **35**(3), 213-21.
13- Shina GK (1990): Analytical methods for *B.Cereus* and other *Bacillus* species, *Int J Food Microbiol,* **10**:125-42.
14- Sutherland AD (1993): Toxin production by *bacillus cereus* in dairy products, *J Dairy,* **6**(56): 9-74.
15- Te - Giffel MC, Beumer RR, Granum PE and Rombouts FM (1997): Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in house hold refrigerators in the Netherlands. *In J Food Microbiol,* **34**(3): 307-18.
16- Turnbull PCB (1979): Properties and production characteristics of voming, diarrhea and necrotizing toxin of *B.Cereus, Am J Clin Nutrition,* **32**:219-28.
17- Wong HC (1988): Incidence and characterization of *B. cereus* isolates contamination dairy products. *Appl Envirom Microbiol,* **54**(3): 699-702.
18- Work TS and Burdon RH (1980): *Labaratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Cell Culture Media:* 84-97.