اولین گزارش جداسازی یرسینیا از سبزی های خام در ایران

دکترمحمدمهدی سلطان دلال [۱]، دکترابراهیم مصطفوی [۲]، فاطمه آقاسیدجوادی [۳]

واژه های کلیدی : *سبزی های خام، یرسینیا، ایران*

چکیده

یرسینیوز یک بیماری زئونوز است و عفونت با *یرسینیا انتروکولیتیکا* با طیف گسترده ای از نشانه های بالینی مختلف در جوانان و کودکان و بالغین همراه می باشد. این باکتری تاکنون از منابع گوناگونی مثل آب، گوشت ، شیر و ... جدا شده است و با توجه به مصرف روزافزون سبزی های خام در وعده های غذایی و شیوع عفونت حاصل از این باکتری، به جداسازی آن از سبزی ها اقدام نمودیم. مجموعاً ۹ نوع سبزی (کاهو، هویج، کرفس، جعفری ، گوجه فرنگی، کلم قرمز، ترب، قارچ و تره فرنگی) را مورد آزمایش قرار دادیم. روش های به کاررفته عبارتند از روش پیشنهادی ISO و روش تغییر یافته آن که همراه با غنی سازی در سرمای 4^0C به مدت ۱۴ روز از ۱۱۰ نمونه سبزی خام مورد آزمایش، با استفاده از روش ISO تغییر یافته ۲ سوش *یرسینیا* جدا شد. این دو سوش متعلق به گونه های *یرسینیاانتروکلی تیکا* و *یرسینیافردریکسنی* بوده که به ترتیب از کاهو و جعفری جدا شدند. با استفاده از تست های بیوشیمیایی و بیماری زایی محیطی و غیربیماری زا بودن این دو سوش مشخص شد.

سرآغاز

یرسینیا باکتری سرما دوستی از خانواده انتروباکتریاسه است که در محدوده حرارتی 4^0 - ۴ رشد می کند. رشد و تکثیر این خانواده در سرما و درجه حرارت یخچال بهتر از سایر باکتری ها است، به طوری که یکی از راه های بدست آوردن این باکتری استفاده از روش غنی سازی در سرما در زمان های طولانی می باشد. برهمین اساس حضور و بقاء این باکتری در فصول زمستان و پاییز در مواد غذایی در آب و در شیر به طور چشمگیری افزایش می یابد (۵).

جداسازی این باکتری از آب ، سبزی ها و سایر مواد غذایی ، مدفوع و محیط زیست در کشورهای مختلف از قبیل برزیل، فرانسه، آمریکا، دانمارک، بلژیک ، ژاپن و ایتالیا به طور گسترده ای انجام گرفته است (۹،۸،۷،۴،۳،۲).

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

۲- بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شمال تهران ، تهران، ایران.

باتوجه به شیوع فراوان و روزافزون پرسینیوز به دلیل تغییر رژیم ها و عادات غذایی و استفاده از سبزی های خام در کشورمان و به دلیل عدم اطلاع از میزان صحیح و درصد شیوع *پرسینیا* در سبزیجات خام مصرفی در ایران، اقدام به جداسازی این ارگانیسم از سبزی هایی نظیر کرفس، کاهو، جعفری، هویج، ترب، گوجه فرنگی، کلم قرمز، قارچ و تره فرنگی نمودیم.

نمونه گیری و روش بررسی

سبزی های مورد استفاده از میادین میوه تره بار و از برخی مزارع تهیه و جمع آوری شدند. در ابتدا سبزی های جمع آوری شده تمیز و سپس خرد شده و به محیط های غنی کننده تلقیح شدند. محیط های مورد استفاده دراین جداسازی عبارت بودند از :

۱- محیط های غنی کننده ای که در جداسازی *پرسینیاانتروکولیتیکا* به کار می روند (PSB[1] و ITC[2]).

۲- محیط های انتخابی جامد که شامل محیط های CIN آگار [3] و همچنین محیط SS آگار به اضافه نمک های صفراوی و کلراید کلسیم یا SSDC آگار [4] می باشد.

۳- انجام آزمایش های افتراقی و تاییدی واستفاده از تست اکسیداز، SIM ، KIA [5]، اوره و سالیسین و اسکولین و نهایتاً استفاده از کیت api 20E.

۴- جهت تعیین قدرت بیماری زایی *پرسینیا* نیز از تست های وابستگی به Ca و کریستال ویوله و RPMI-1640 استفاده شد (۱،۴).

دراین تحقیق برای جداسازی *پرسینیا* روش پیشنهادی ISO به کار گرفته شد. این روش خود به چهار نوع مختلف تقسیم می شود که عبارتند از :

۱- جمع آوری، تمیزکردن و سپس خردنمودن نمونه ها؛ ۲۵ تا ۳۰g از هر نمونه را در ۵۰ تا ۶۰cc محیط غنی کننده ITC تلقیح می کنیم و ارلن حاوی این مواد را به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۷۲° تا ۲۹° قرار می دهیم. سپس یک لوپ از این محیط را روی محیط SSDC آگار کشت داده و پلیت مذکور را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۷ °c قرار می دهیم. پس از پایان مدت انکوباسیون از کلنی های مشکوک به *پرسینیا* که در روی این محیط سفید رنگ و گرد کوچک و

1- Pepton sorbitol and bile salts Broth

2- Irgasan Ticarcillin and Potassium Chlorate Borth

3- Cefsulodin Irgasan Novobiocin

4- Salmonella Shigella Agar with Sodium desoxycholate and Calcium Chloride

5- Kligler Iron Agar

کدر می باشند، برداشت کرده و روی محیط نوترین آگار تخلیص، از آنها تست های بیوشیمیایی به عمل می آوریم.

۲- نمونه های جمع آوری شده را تمیز و خرد کرده و ۲۵ الی ۳۰ گرم از آن را در ارلن حاوی ۵۰ تا ۶۰ سی سی محیط PSB تلقیح کرده و ۴۸ ساعت انکوبه می نماییم. پس از اتمام انکوباسیون یک لوپ از آن را روی محیط CIN آگار کشت می دهیم. ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۷°C قرار داده و پس از اتمام این مدت از کلنی های مشکوک که بر روی این محیط شکل گرد با مرکز قرمز و هاله اطراف روشن (سفید) می باشند، برداشت و روی محیط نوترین آگار تخلیص نموده و سپس از آنها آزمایش های بیوشیمیایی به عمل می آوریم (۶،۳،۱).

۳- آزمایش انجام شده در مرحله ۲ را به همراه استفاده از KOH ۰/۲۵٪ تکرار می نماییم. دراین عمل از ارلن حاوی نمونه همراه با PSB ۰/۵ سی سی برداشت نموده و با ۴/۵ سی سی پتاس ۰/۲۵٪ به مدت ۲۰ ثانیه مجاور می کنیم، سپس یک لوپ از آن را روی محیط CIN آگار تلقیح می نماییم و پلیت مذکور را ۲۴ ساعت در انکوباتور۲۷°c قرار می دهیم. پس از اتمام انکوباسیون از کلنی های مشکوک آزمایش بیوشیمیایی به عمل می آوریم.

۴- این روش با تغییراتی در روش پیشنهادی ISO انجام شده و نمونه را با روش سرماگذاری ۱۴ روزه، در دمای یخچال سرکرده و با استفاده از KOH ۰/۲۵٪ و تلقیح یک لوپ از این نمونه روی محیط CIN آگار، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۷ درجه قرار دادیم. کلنی های مشکوک را جدا نموده و از آنها تست های بیوشیمیایی به عمل آوردیم.

یافته ها

با استفاده از روش چهارم موفق به جداسازی ۲ نمونه پرسینیا از ۱۱۰ نمونه مورد آزمایش شدیم ، یعنی حدود آلودگی سبزیجات خام با *پرسینیا* ۱/۸۱٪ می باشد (شترنگ ۱).

دو سوش پرسینیای جدا شده با توجه به آزمایش های بیوشیمیایی و استفاده از کیت api 20E، به ترتیب *پرسینیاانتروکولیتیکا* از کاهو و *پرسینیافردریکسنی* از جعفری بودند. سایر گونه های جدا شده از خانواده انتروباکتریاسه و شامل گونه های *انتروباکتر، سراشیا ، سیتروباکتر، کلبسیلا ، سودوموناس* و... بودند که در شترنگ ۲ تعداد و درصد آنها ذکر شده است (۱۱،۱۰). نتایج تست های بیماری زایی نشان دادند که سوش های جدا شده محیطی و غیرپاتوژن هستند.

گفتگو و بهره گیری پایانی

در کشورهای مختلف از جمله برزیل و فرانسه و ژاپن از چندین روش مختلف استفاده شده است و نتایج قابل قبولی بدست آمده است (۷.۴.۳). دراین بررسی باتوجه به روش هایی که به کار گرفته شد، برای جداسازی پرسینیا از مواد غذایی استفاده از روش سرماگذاری توام با KOH ۰/۲۵٪ توصیه می گردد. تحقیقات متعددی جهت بیماری زا بودن سوش های پرسینیا پیشنهاد شده است (۴) با استفاده از این روش ها نشان داده شد که هیچیک از دو سوش جدا شده بیماری زا نیستند. ولی به دلیل مصرف روزافزون سبزی های خام در رژیم غذایی که گاهی اوقات کامل شسته نشده یا تنها با شستشوی ساده استفاده می شود، وجود مقادیر زیاد سوش های غیر بیماری زای این باکتری در سبزی ها می تواند در کودکان، افراد مسن و یا افراد بیماری که از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی استفاده می نمـــایند، ایجاد بیماری کند. لذا اکیداً توصیه می گردد که سبزی ها(مخصوصاً سبزی های خام) را حتماً قبل از مصرف با مواد ضدعفونی کننده شستشو داده تا از پاکیزگی آنها اطمینان حاصل شود.

شترنگ ۱ - بررسی مقایسه ای ۴ روش به کار رفته جهت جداسازی پرسینیا از سبزیجات خام

روش های بکاررفته / نمونه های تست شده	استفاده از UTC و SSDC		استفاده از PSB و CIN		استفاده از PSB و CIN و KOH ۰/۲۵٪		استفاده از سرما به مدت ۱۲ روز PSB و KOH,CIN ۰/۲۵٪	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۱/۸۱٪

شترنگ ۲ - تعداد و درصد سایر باکتری های جدا شده از سبزیجات خام مورد آزمایش

سوء سبزیجات	تعداد هر نمونه	اشریشیاکلی		سیتروباکتر		کلبسیلا		پروتئوس		گلبرلا		سراتیا		سودوموناس		ساکارومیست	
		□	%	□	%	□	%	□	%	□	%	□	%	□	%	□	%
کاهو	۱۲	۴	۳۰/۷۶	۲	۱۵/۳۸	۲	۱۵/۳۸	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹	۲	۱۵/۳۸	۱	۷/۶۹	۲	۱۵/۳۸
گوجه فرنگی	۱۳	۴	۳۰/۷۶	۲	۱۵/۳۸	۲	۱۵/۳۸	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹	۲	۱۵/۳۸	۱	۷/۶۹	۲	۱۵/۳۸
خیار	۱۲	۴	۳۳/۳۳	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۲	۱۶/۶۶	۱	۸/۳۳	۲	۱۶/۶۶
جعفری	۱۰	۲	۲۰	۲	۲۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۲	۲۰	۱	۱۰	۱	۱۰
ترب	۱۰	۲	۲۰	۲	۲۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۱	۱۰	۲	۲۰	۱	۱۰	۱	۱۰
هویج	۱۸	۵	۲۷/۷۵	۲	۱۱/۱۱	۲	۱۱/۱۱	۲	۱۱/۱۱	۱	۵/۵۵	۳	۱۶/۶۶	۱	۵/۵۵	۲	۱۱/۱۱
گوجه فرنگی	۱۲	۴	۳۳/۳۳	۲	۱۶/۶۶	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۲	۱۶/۶۶	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳
کلم قرمز	۱۲	۳	۲۵	۲	۱۶/۶۶	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۱	۸/۳۳	۲	۱۶/۶۶	۱	۸/۳۳	۲	۱۶/۶۶
فلفل	۱۳	۶	۴۶/۱۵	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹	۲	۱۵/۳۸	۱	۷/۶۹	۱	۷/۶۹
نوار بهداشتی	۱۱	۴	۳۶/۳۶	۱	۹/۰۹	۱	۹/۰۹	۲	۱۸/۱۸	۱	۹/۰۹	۲	۱۸/۱۸	۱	۹/۰۹	۱	۹/۰۹

شترنگ ۳ - بررسی دوسویش پرسینیای جدا شده از نظر قدرت بیماری زائی

نمونه آزمایش شده	سویش جداشده	گریستال ویوله	سالیسین	اسکولین	ولبینگی به Ca	RPMI-1640
کاهو در سرما	پرسینیاالفروکولیتیکا	-	+	+	-	-
جعفری در سرما	پرسینیاالفروکولیتیکا	-	+	+	-	-

کتابنامه

1- International standard ISO 10273, 1994.

2- Christensen SG (1987) : The *Yersinia enterocolitica* situation in Dnemark. *Contr. Microbiol. Immunol.* **(a):** 93-7.

3- Delmas CL, Vidon DJM (1985): Isolation of Yersinia entercolitica and related species from foods in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **50:** 767-71.

4- Fukushima H (1987): New selective agar medium for isolation of virulent Yersinia enerocolitica. *J. Clin. Microbiol.* **25:** 1068-73.

5- Kapperud G (1991): *Yersinia enterocolitica* in food hygine. *Int. J. food Microbiol.* **12:** 53-66.

6- Petersen T (1985) : Keeping quality of cefsulodin irgasan novobiocin (CIN) medium for detection and enumaration of *Yersinia enterocolitica. Int. J. Food Microbiol.* **2:** 49-54.

7- Piasolitto AC, Falcao PP, Schimiau MT, Galvao SHM, Giraldini W (1979): The first isolation of human *Yersinia* in Braszil. *Contr. Microbiol. Immunol.* **51:** 169-73.

8- Vandepitite J, Wauters G (1979): Epidemiologyical clinical aspects of human *Yersinia entercolitica* infections in Belgium. *Conte. Microbiol. Immunol.* **5:** 150-9.

9- Velazquez L (1995): *Yersinia enterocolitica* and related species isolated in Sanluis, Arganitina (1989-1993), **13:** 59-61.

10- Wauters GM, Krembel CM (1985) : *Yersinia enterocoloitica* in raw vegetables. *J. Sci. Aliments.* **5**(Hors-serie TV): 103-6.

11- Wright C (1976) : Enterobacteriaccae and pseudomonas aeroginosa recoverd from begetable salad. *Appl. Environ. Microbiol.* PP: 453-4.