Archive of SID

پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
سال ۲۶، شماره۱، صفحات ۶۹- ۶۵(بهار ۱۳۸۱)

Original Article

شیوع انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده انتروتوکسین مقاوم به حرارت در مواد غذائی ارسالی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذائی مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی

دکتر نور امیر مظفری*، هما فروهش‌تهرانی*، دکتر علیرضا سالک‌مقدم**،
محمد روستائی***، دکتر بهرام روادگر***، منیژه قاسمی***

* گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

** گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** کارشناس آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذائی مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی

خلاصه

سابقه و هدف: *اسهال یکی از علل مهم مرگ و میر کودکان در کشورهای جهان سوم می‌باشد. طبق آمار منتشره از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه حدود ۱۲ میلیون کودک در سراسر جهان بر اثر ابتلاء به بیماریهای مختلف جان خود را از دست می‌دهند که سهم بیماری اسهال، ۵ میلیون نفر در سال می‌باشد. باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد اسهال نقش دارند. یکی از مهمترین مکانیسم‌ها تولید انتروتوکسین از جمله انتروتوکسین مقاوم به حرارت می‌باشد. روشهای ارزیابی انتروتوکسین مقاوم به حرارت شامل تکنیک‌های سریع ,ELISA Gene probe و روش بیولوژیک استفاده از نوزاد موش Suckling Mouse Assay (SMA) می‌باشد. با توجه به نقش مواد غذائی آلوده در ایجاد بیماری اسهال بررسی شیوع انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده انتروتوکسین مقاوم به حرارت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.*

مواد و روشها: *دراین مطالعه مقطعی، ۱۰۸۱ مورد مادهٔ غذائی از نظر وجود باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مورد آزمایش قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *از ۱۰۸۱ مورد ماده غذائی تحت آزمایش، ۲۶۵مورد(۲۴/۵٪) آلوده به میکروبهای خانواده انتروباکتریاسه بودند. ۲۰۳ مورد از انتروباکتریاسه‌هائی که قادر به تولید انتروتوکسین بودند (اشریشیاکلی ۱۰۲ مورد، انتروباکتر ۴۴ مورد، کلبسیلا ۳۰ مورد و سیتروباکترفروندی ۲۷ مورد) از نظر تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت با روش SMA مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه نشان داد که در ۷٪ از باکتری‌های ذکر شده، انتروتوکسین مقاوم به حرارت وجود داشت.*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: *با توجه به شیوع ۷٪ انتروتوکسینوژنهای باکتریهای روده‌ای، لزوم نظارت بهداشتی دقیق‌تر بر محصولات غذایی توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: *انتروباکتریاسه، مواد غذائی، انتروتوکسین مقاوم به حرارت، روش SMA*

مقدمه

بیماریهای منتقله از غذا بدنبال مصرف طیف وسیعی از مواد غذائی بوجود می‌آید که در آنها میکروارگانیسم‌های پاتوژن رشد یافته، یا حاوی توکسین‌های میکروبی و یا مواد شیمیائی می‌باشند. میزان واقعی بروز بیماریهای منتقله از غذا نامشخص است اما تخمین زده می‌شود که ۸۱-۶میلیون مورد بیماری در سال باشد (۹).

انواع زیادی از میکروارگانیسم‌ها یا توکسین‌های آنان، با مکانیسم‌های مختلف در ایجاد بیماریهای منتقله از غذا نقش دارند. خانوادهٔ انتروباکتریاسه شامل تعداد زیادی از گونه‌های بهم وابسته است که در آب و خاک، مواد تجزیه شده و رودهٔ بزرگ انسان، حیوانات و حشرات یافت می‌شوند. بدلیل این جایگاه طبیعی در انسان،

www.SID.ir

Archive of SID

این ارگانیسم‌ها تحت عنوان باسیل‌های روده‌ای (enteric bacilli) نامیده می‌شوند(۷و۳).

در این خانواده بعضی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماریهای گاستروآنتریت مانند عوامل تب تیفوئیدی و دیسانتری باسیلی نیز قرار دارند. همچنین بسیاری از عفونت‌های خارج روده‌ای و بیماریهای منتقله از غذا توسط این گروه از باکتری‌ها بوجود می‌آیند. تاکنون ۳۱ جنس و ۱۳۹ گونه و بیوگروپ در این خانواده نامگذاری گردیده است(۸). در سال ۱۹۸۲، Shardinger پیشنهاد نمود که یکی از اعضای این خانواده یعنی Escherichia coli (E.coli) به جهت آسان بودن جداسازی آن نسبت به سایر پاتوژن‌های روده‌ای، بعنوان یک باکتری اندیکاتور برای تعیین آلودگی مواد غذائی بکار گرفته شود(۱۰). پس از آن مشخص گردید بعضی از باکتری‌های این خانواده که اصطلاحاً کلی‌فرم (coliform group) نامیده می‌شوند نیز می‌توانند از نظر بهداشت مواد غذائی حائز اهمیت باشند،در نتیجه در آزمایش نمونه‌های مواد غذائی، جداسازی و تعیین تعداد آنها نیز مورد توجه قرار گرفت(۱۰). E.Coli بعنوان یک پاتوژن روده‌ای نیز حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری با مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد اسهال نقش دارد. یکی از این مکانیسم‌ها تولید انتروتوکسین می‌باشد. ارگان هدف در انتروتوکسینE.Coli روده کوچک است که منجر به یک اسهال آبکی ناشی از ترشح آب و الکترولیت می‌گردد. توانائی تولید این توکسین بستگی به حضور پلاسمیدی دارد که ژن تولید انتروتوکسین راکد می‌نماید(۶و۱).

اشریشیاکلی تولیدکننده انتروتوکسین، دو نوع انتروتوکسین بوجود می‌آورد، انتروتوکسین حساس به حرارت heat-labile enterotoxin (LT) که مشابه انتروتوکسین ویبریوکلرا می‌باشد و انتروتوکسین مقاوم به حرارت heat-stable enterotoxin (ST) که شامل Sta (ST_I) , STb (ST_{II}) است (۴و۲).

STa قادر به ایجاد اسهال در انسان بوده، بطور محکم به رسپتورهای اختصاصی روده متصل می‌شود و سپس سریعاً گوانیلات سیکلاز موجود در سلول‌های مخاطی روده را فعال ساخته، یک پاسخ ترشحی به همراه ممانعت از جذب سدیم و کلر بوسیله غشاء روده کوچک را سبب می‌گردد. STa علاوه بر اشریشیاکلی در نزد سایر انتروباکتریاسه‌ها از جمله، کلبسیلا، پنومونیه، انتروباکترکلوآکه، سیتروباکترفروندی و یرسینیاانتروکولیتیکا نیز بوجود می‌آید (۳). هدف از پژوهش حاضر، بررسی وجود انتروتوکسین مقاوم به حرارت در نزد اشریشیاکلی و سایر آنتروباکتریاسه‌هائی است که باعث آلودگی مواد غذائی مورد استفاده می‌گردند.

مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۱۰۸۱ نمونه ماده غذائی در مدت دوازده ماه از تیر ماه ۱۳۷۶ لغایت تیر ماه ۱۳۷۷ به طور مستمر از نظر آلودگی به باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها از طرف اداره نظارت بر مواد غذائی، آرایشی، بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ایران از مناطق تحت پوشش شامل غرب تهران، کرج، ساوجبلاغ، شهریار و رباط کریم با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل می‌گردید. در آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذائی، آرایشی و بهداشتی مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی، نمونه‌ها در دفاتر مخصوص ثبت گردیده و از نظر آلودگی به باکتریهای مزوفیل، کلی‌فرم، اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های ارسالی پس از توزین به میزان ۱۰ گرم در شیشه‌های استریل، تحت شرایط استریل، با ۹۰ میلی‌لیتر رینگر استریل مخلوط گردیده و پس از ده دقیقه، جهت شمارش باکتریهای کلی‌فرم و مزوفیل، روش pour plateبا استفاده از محیط‌های نوترینت آگار و مک کانکی آگار مورد استفاده قرار می‌گرفت. با قرار دادن پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت جهت کلی فرم‌ها و ۴۸ ساعت جهت مزوفیل‌ها شمارش انجام می‌گردید. سپس کشت‌های مثبت جهت تعیین نوع باکتری مورد بررسی قرار گرفته و پس از آزمایش‌های افتراقی- تشخیصی انتروباکتریاسه‌ها، جهت شناسائی جنس و گونه باکتری، عمل استخراج توکسین صورت می‌گرفت.

روش تهیه توکسین: ابتدا محیط Trypticase soy broth را طبق روش استاندارد تهیه نموده و پس از اضافه نمودن

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۶٪ عصاره مخمر، ۱۵ـ۱۰ میلی‌لیتر از محیط مورد نظررا داخل ارلن ۵۰ میلی‌لیتر ریخته و تعداد معینی از کلنی‌ها را در آن حل نموده به نحوی که جذب مایع در طول موج ۶۲۰nm به مقدار ۵٪ باشد. سپس ارلن حاوی باکتری بر روی روتاتور با دور rpm ۳۰۰ـ۲۰۰ در انکوباتور ۳۵°c قرار داده می‌شد. علت استفاده از روتاتور افزایش اکسیژن محیط کشت (بوسیله تکان دادن ارلن) و همچنین آزادسازی توکسین توسط باکتری به داخل محیط است. بعد از ۲۴ـ۱۸ ساعت انکوباسیون، محتویات ارلن بداخل لوله سرپیچ‌دار استریل منتقل می‌گردید. پس از سانتریفوژ نمودن به مدت ۳۰ دقیقه و شفاف شدن محتویات لوله، مایع رویی توسط پیپت پاستور استریل به لوله استریل سرپیچ دار منتقل گشته و برای تزریق به موش نوزاد آماده می‌گردید (۴).

روش Suckling Mouse Assay: نوزادان موشهای کوچک آزمایشگاهی ۵ـ۲ روزه که وزنی معادل ۲ـ۱/۷ گرم داشتند حدود ۲ ساعت قبل از آزمایش از مادرشان جدا شده و به دسته‌های سه‌تایی تقسیم می‌شدند (بعلت ممانعت از تغذیه نوزادان با شیر مادر). سپس مایع تزریقی که شامل ۲ قطره اوانس بلو ۱٪ بازای هر ml ۱ از مایع شفاف بدست آمده از سانتریفوژ است، به میزان ۰/۱cc برای هر موش از طریق دهان به درون شکم(intragastrically) توسط سرنگ‌های یک میلی‌لیتر انسولین تلقیح می‌شد، برای سهولت تلقیح روکش سیم‌های بسیار نازک به سر سوزن متصل می‌گردید. سپس هر سه موش که در یک گروه قرار داشتند و یک عصاره باکتری به آنها خورانده شده بود در خانه‌های مخصوصی قرار داده و بمدت ۳ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (حرارت آزمایشگاه) قرار می‌گرفتند. همراه با نمونه‌های مجهول یک گروه کنترل منفی نیز مورد آزمایش قرار می‌گرفت. پس از سپری شدن زمان آزمایش، با فشار دادن گردن موشها بوسیله پنس، آنها را کشته و پس از باز کردن شکم، روده توسط ترازوی حساس وزن می‌شد و با توزین باقیمانده بدن موشها، نسبت وزن روده به وزن باقیمانده بدن ($gut/body_{Ratio}$) محاسبه می‌گردید. بر اساس رفرانس‌های موجود نسبت‌های بالاتر از ۸۵٪ مثبت و کمتر از آن منفی تلقی می‌گردید (۵و۴).

یافته‌ها

در این مطالعه مقطعی، ۱۰۸۱ مورد ماده غذائی طی مدت ۱۲ ماه جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفتند که تعداد ۲۶۵ مورد (۲۴/۵٪) آلوده به میکروب‌های خانواده انتروباکتریاسه بودند. از این تعداد ۲۰۳ مورد (۱۸/۷٪) جهت تولید انتروتوکسین مورد آزمایش قرار گرفتند. باکتری‌های جدا شده شامل اشریشیاکلی ۱۰۲ مورد (۵۰/۲۴٪)، انتروباکترکلواکه ۴۴ مورد (۲۱/۶۷٪)، کلبسیلا پنومونیه ۳۰ مورد (۱۴/۷۷٪) و سیتروباکترفروندی ۲۴ مورد (۱۲/۳٪) بودند.

از نظر نوع ماده غذائی محصولات لبنی، شیرینیها، محصولات گوشتی، آب میوه و بستنی بیشترین آلودگی را نشان می‌دادند (جدول شماره ۱).

جدول ۱ـ توزیع فراوانی مواد غذائی آلوده به انتروباکتریاسه‌های مولد انتروتوکسین مقاوم به حرارت

نوع ماده غذائی	موارد جدا شده	درصد
محصولات لبنی	۵۵	۲۷
شیرینی جات	۳۸	۱۸/۷
محصولات گوشتی	۱۸	۸/۸۶
آب میوه	۱۷	۸/۳۷
بستنی	۳۹	۱۹/۲
سایر محصولات	۳۶	۱۷/۷

از نظر شیوع فصلی بیشترین میزان آلودگی به ترتیب در تابستان(۳۰٪) ، بهار(۲۵٪) ، زمستان(۲۴٪) و پائیز(۲۱٪) گزارش شد. در نمونه‌های فوق،آزمایش توانایی تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) به روش SMA صورت گرفت که از مجموع ۲۰۳ مورد باکتری جدا شده، ۱۴ مورد (۷٪) از نظر تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت مثبت بودند. باکتریهای تولیدکننده انتروتوکسین مقاوم به حرارت شامل اشریشیاکلی ۹ مورد، انتروباکتر ۲ مورد، کلبسیلا ۲ مورد و ۱ مورد سیتروباکترفروندی بودند.

موادغذائی که از آنها باکتریهای مولد انتروتوکسین مقاوم به حرارت جدا گردید: لبنیات ۳ مورد، شیرینی تر ۲ مورد، بستنی ۴ مورد، آب میوه ۲ مورد و سایر موارد ۱ مورد را شامل می‌گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

آلودگی مواد غذائی در کشورهای در حال توسعه یکی از علل مهم ابتلاء به بیماریهای روده‌ای بوده و با توجه به امر مهم نظارت و کنترل مواد غذائی متاسفانه بیماریهای منتقله از طریق غذا بخصوص آنهایی که بصورت خام مصرف می‌شوند هنوز یکی از علل عمده انتقال بیماریهای روده‌ای بخصوص در کودکان محسوب می‌گردد. در این بررسی با استفاده از روش بیولوژیک SMA نشان داده شد که انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده انتروتوکسین مقاوم به حرارت و مهمترین آنها اشریشیاکلی هنوز یکی از عوامل مهم باکتریایی در ایجاد بیماریهای حاد ناشی از آلودگی مواد غذائی به شمار می‌روند. با توجه به مطالعاتی که در سالهای اخیر بر روی میزان شیوع انتروتوکسین مقاوم به حرارت در بیماران مبتلا به گاستروآنتریت صورت گرفت مشخص گردید میزان شیوع آن در تهران ۱۴/۳٪ می‌باشد (۱۱) با در نظر گرفتن میزان شیوع اسهال ناشی از انتروتوکسین مقاوم به حرارت در بعضی نقاط کشور از جمله استان هرمزگان (۲۲٪) و شهر سنندج (۱۷/۱٪) مشخص می‌گردد که موقعیت جغرافیائی، آب و هوا، مسائل فرهنگی، اقتصادی و اجتماعی در میزان شیوع نقش مهمی دارند (۱۱).

با توجه به بررسی انجام شده بر روی مواد غذائی در مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی مشخص گردید که در حال حاضر ۷٪ از مواد غذائی آلوده به انتروتوکسینوژن باکتریهای روده‌ای می‌باشند و با توجه به آنکه باکتری‌هائی از جمله کلبسیلا، انتروباکتر و سیتروباکترفروندی که در زمره باکتری‌های گروه کلی فرم قرار می‌گیرند قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشند، حضور آنها می‌باید در مواد غذائی مورد اهمیت قرار گیرد. نکته قابل توجه دیگر میزان شیوع باکتری‌های تولیدکننده انتروتوکسین مقاوم به حرارت در محصولاتی نظیر بستنی، آب میوه و شیرینی است. از آنجا که این نوع مواد غذائی آماده به مصرف می‌باشند لزوم نظارت بیشتر بر تولید و عرضه این محصولات را یادآور می‌شود.

در پایان از خانمها معصومه عسگری و لیلا کردقره چورلو به خاطر همکاری صمیمی‌شان، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1- Andrew G, et al.Test for Escherichia coli enterotoxin, using infant mice : Aplication in a study of diarrhae in children in Honolulu. ***Infect Immune*** 1972; 125(4): 407-411.

2- Chao AC, et al.Activation of intestinal CFTR cl- channel by heat stable enterotoxin and guanylin in via cAmp-dependent protein kinase.***EMBo J*** , 13(5): 1065-72.

3- Baron EJ, Fingold SM ***Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.*** 9th edition 1999; 509-532.

4- Forte LR, et al. Stimulation of intestinal cl- transport by heat stable enterotoxin : Activation of cAmp – dependent protein kinase by cGmp. ***Am J Physiol*** 263 (3pT1): c 607-15.

5- Giannella RA. Suckling model For detection of heat stable E.coli enterotoxin : characteristics of the model. ***Infect Immune*** 1976;14:95-9.

6- Hart CA, et al. Diarrhoea caused by E.coil. ***Ann Trop Pediatr*** 1993; 13(2): 121-31 (Abstract).

7- Jiklik, Willett, Amons, et al.(eds). ***Zinsser Microbiology***. 20 th edition, 1993, Appleton and Lange: Norwalk, colifornia. P:405-407.

8- Koneman Ew, Allen SD, Janda WM, et al(eds). ***Color atlas and text book of Diagnostic Microbiology***. 5th edition, 1997; Philadelphia: J.B.Lippincot Company.P:253-353.

9-Mandel GL, Douglas RG, Bennett JE(eds). ***Principles and practices of Infectious Disease.*** 3rd edition, 1990; New york: Churchil Livingstonc. P:1001-15.

10- Marshall RT, Case RA, Ginn RE. Update on standard methods, for the examination of dairy products. ***J Food Prot*** 19877;50:711.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱- آل یاسین مهناز، امیر مظفری‌نور، فروهش تهرانی هما. ***پایان نامه دکترای علوم آزمایشگاهی***.بررسی شیوع باکتریهای مولد آنتروتوکسین مقاوم به حرارت (انتروباکتریاسه) جدا شده از اسهال کودکان و نوزادان مراجعه کننده به بیمارستانهای کودکان مفید و حضرت علی اصغر (ع) در سال ۱۳۷۴.

www.SID.ir