

جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریامنوسایتوزنز از شیرهای خام و پاستوریزه عرضه شده در سطح فروشگاههای استان چهارمحال بختیاری

علی شریفزاده^{۱*}، مسعود اخوان^۲، علی زراسوندی^۲ و سعید آل آقا^۳

۱- مربی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد

۳- عضو هیئت علمی، مؤسسه رازی حصارک، کرج

چکیده

مصرف شیر به عنوان یک ماده غذایی اصلی، در سنین مختلف و در تمام کشورها اهمیت خاصی دارد. آلوده شدن این ماده غذایی به باکتریایی مثل یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریامنوسایتوزنز می تواند برای انسان، آثار و عوارض زیانباری داشته باشد.

در این پژوهش سعی شده وضعیت آلودگی شیر به این باکتریها بررسی شود؛ از این رو، ۲۰۰ نمونه شیر خام و ۲۰۰ نمونه شیر پاستوریزه به صورت نمونه گیری خوشه ای تصادفی تهیه و از نظر باکتریولوژی آزمایش شدند. پس از انجام آزمایشهای باکتریولوژی از بین ۲۰۰ نمونه شیر خام ۳ مورد (۱/۵٪) باکتری لیستریامنوسایتوزنز است؛ ولی از بین آن، ۲ مورد (۱٪) باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا جدا شد. با توجه به نتایج حاصله از بررسیهای محققین در کشورهای مختلف از جمله ایران در مسیر جستجوی این باکتریها، توجه دقیق به رعایت اصول پاستوریزاسیون و عدم مصرف شیرهای خام بیش از پیش توصیه می گردد.

۱- مقدمه

یرسینیا^۱ یکی از باکتریهای بیماریزای سرماگرا^۲ می باشد. این باکتری در دامنه حرارتی °C ۲-۴۵ رشد می کند. رشد این باکتری در شیر در دمای °C ۲-۰ نیز گزارش شده است. گونه انتروکولیتیکای^۳ این باکتری، در اغلب کشورها وجود داشته و از نیمه دوم دهه هفتاد، به دفعات از اختلالات گوارشی انسان جدا شده است. این بیماری در انسان، به التهاب قسمت انتهایی ایلئوم مربوط است که با اسهال، تورم غده های لنفاوی مزانتریک و نشانی هایی شبیه به آپاندیسیت همراه می باشد. برخی از عفونتهای انسانی منشأ حیوانی داشته، مثل: شیر، گوشت و ... و یا در اثر مصرف آبی است که با مدفوع حیوانات آلوده شده است؛ ولی بیشتر ابتلای انسان با مصرف غذایی است که به وسیله افراد ناقل آلوده شده است [۳، ۴، ۵]. لیستریا منوسایتوزنز^۴ یکی دیگر از باکتریهای سرماگرا می باشد که حتی در حرارت °C ۲/۵

هم قادر به رشد است و این قابلیت رشد در حرارت پایین، اساس روش غنی کردن باکتری در سرما می باشد. این باکتری در یخچال با دمای °C ۳-۴ سال می تواند زنده بماند. لیستریوز در انسان، غالباً در افراد ضعیف مانند: نوزادان، زنان حامله، افراد مبتلا به سرطان و یا پیوند کلیه و یا افراد مبتلا به نارسایی ایمنی سلولی مثل ایدز بروز می کند. گرچه راه انتقال بیماری در انسان دقیقاً روشن نیست ولی در پاره ای از موارد، ابتلا در اثر خوردن شیر و یا گوشت گزارش شده است. بیماری در انسان ممکن است سقط جنین^۵، سپتی سمی^۶ و مننژیت^۷ نوزادان و یا انسفالیت^۸، میوکاردیت^۹ و عوارض مختلف چرکی در افراد بالغ ایجاد کند [۱، ۴، ۵، ۷]. وجود چنین خصوصاتی برای این دو باکتری و همچنین به دلیل اهمیت شیر در انتقال این دو میکروارگانیسم به انسان، این مطالعه بر روی شیر خام و پاستوریزه عرضه شده در سطح فروشگاههای استان چهارمحال و بختیاری، انجام شد تا وضعیت حضور این باکتریها در شیر مشخص شود.

* مسئول مکاتبات مقاله Sharifzadeh-Ali@yahoo.com

5. Abortion
6. Septicemia
7. Meningitis
8. Encephalitis
9. Myocarditis

1. Yersinia
2. Psychrotrophe
3. Enterocholitica
4. Listeria monocytogenes

به لیستریا منوسایتوژنز در نظر گرفته می‌شد که در این صورت برای تأیید تشخیص آزمونهای همولیز، کمپ^۲ با استافیلوکوکوس اورئوس، احیای نیترات، فسفاتاز، هیدرولیزهیپورات، تخمیر قندهای زایلوز^۳، سوکروز^۴، رامنوز^۵، ملیبوز^۶، مانیتول^۷، لاکتوز^۸، آرابینوز^۹ صورت گرفت [۸، ۹]. در خصوص جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا نیز مشابه لیستریا، در کنار شعله به رسوب حاصله ۴ ml محیط آبگوشت غنی کننده یرسینیا اضافه شده و سپس این محیط به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه °C ۲۹ قرار داده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، از محیط غنی کننده در کنار شعله به وسیله لوپ سترون نمونه برداری شده و در محیط آگار انتخابی یرسینیا به روش خطی کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ گرمخانه گذاری گردید [۲، ۶]. پس از گذشت ۲۴ ساعت پرگنه‌های به رنگ قرمز با مرکز تیره‌تر و حاشیه شفاف که ۲-۰/۵ ml قطر داشته به عنوان پرگنه مشکوک قلمداد شده و پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باسیلهای کوچک گرم منفی در زیر میکروسکوپ سایر آزمونهای تفریقی به منظور مسجل شدن تشخیص صورت می‌پذیرفت که از جمله این آزمونها، لیزین دکربوکسیلاز^{۱۰}، اورنیتین دکربوکسیلاز^{۱۱} حرکت، MR و VP، اوره، سترات، تخمیر قندهای دولسیتول^{۱۲}، مانیتول، مانوز^{۱۳}، رامنوز، اینوزیتول^{۱۴}، لاکتوز، سوربیتول^{۱۵} و سوکروز بود [۸، ۹].

۳- نتایج و بحث

پس از انجام کلیه مراحل آزمون و با صرف دقت لازم در انجام تمام مراحل نمونه برداری تا سنجش آزمایشگاهی، از شیر پاستوریزه، باکتری لیستریا منوسایتوژنز جدا نشد ولی دو مورد (۱٪) باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا از شیر پاستوریزه شهرستان شهر کرد جدا شد.

۲- مواد و روشها

این تحقیق به مدت یکسال در فاصله زمانی مهرماه ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۱ در سطح فروشگاههای استان چهارمحال و بختیاری با در نظر گرفتن $P = 50\%$ و $d = 50\%$ از ۴۰۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه عرضه شده، صورت پذیرفت. نمونه برداری به روش خوشه‌ای تصادفی^۱، از پنج شهرستان مختلف استان در شهرستانهای شهر کرد، بروجن، اردل، لردگان و فارس انجام شد. نمونه‌ها در دو شکل خام و پاستوریزه به صورت مجزا تهیه و آزمایش شد. ابتدا از هر شیشه شیر پاستوریزه ۴ ml شیر، به لوله‌های همولیز استریل به طور مستقیم وارد شد. در مورد نمونه‌های شیر خام نیز به همین صورت عمل شد. سپس همه لوله‌های حاوی نمونه، فوراً به آزمایشگاه منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی را دور ریخته و برای کشت، حدود یک میلی‌لیتر رسوب انتهایی نگهداری شد. مراحل فوق در خصوص جستجوی یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا منوسایتوژنز به تفکیک صورت می‌پذیرفت. در خصوص جداسازی لیستریا منوسایتوژنز در کنار شعله ۴ ml محیط مایع غنی کننده لیستریا به رسوب حاصله اضافه شده و سپس به مدت ۷۲ ساعت این محیط کشت در دمای یخچال قرار داده شد [۲، ۶].

پس از گذشت ۳ روز، از محیط غنی کننده در کنار شعله به وسیله لوپ سترون، نمونه برداری شده و لیستریا در محیط آگار انتخابی به روش خطی کشت شد. از آنجا که لیستریا منوسایتوژنز در مجاورت CO₂ بهتر رشد می‌کند؛ بنابراین، ۱۰٪ CO₂ نیز در گرمخانه برای کمک به رشد آن تامین گردید. این محیط کشت به مدت ۳ روز در دمای °C ۳۷ گرمخانه گذاری شد و پس از گذشت این مدت صفحاتی که پرگنه‌های مورب مشخص کوچک و کمی محدب با سطح هموار و مات داشت و دارای اطراف سبز روشن متمایل به آبی شفاف و مرکزی با شفافیت کمتر و زرد متمایل به سبز بود، جهت تشخیص، نگهداری می‌شد. البته پلتهایی که مشکوک به نظر می‌رسید برای مدت بیشتری گرمخانه گذاری شد. در مرحله بعد از پرگنه‌هایی که واجد خصوصیات فوق بودند رنگ آمیزی گرم گردید و در صورت مشاهده باسیلهای کوچک گرم مثبت در زیر میکروسکوپ و مشاهده حبابهای گاز در آزمون کاتالاز، به عنوان پرگنه مشکوک

2. Camp
3. Xylose
4. Sucrose
5. Rhamnose
6. Melibiose
7. Mannitol
8. Lactose
9. Arabinose
10. Lysine decarboxylase
11. Ornithine decarboxylase
12. Dulcitol
13. Mannose
14. Inositol
15. Sorbitol

1. Cluster random sampling

جدول ۱ نتایج حاصل از جستجوی شیرهای خام استان چهارمحال و بختیاری به یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا منوسایتوژنز

نتیجه	فراوانی یرسینیا انتروکولیتیکا	فراوانی لیستریا منوسایتوژنز	درصد موارد یرسینیا انتروکولیتیکا	درصد موارد لیستریا منوسایتوژنز
موارد مثبت	۶	۳	۳٪	۱/۵٪
موارد منفی	۱۹۴	۱۹۷	۹۷٪	۹۸/۵٪
تعداد کل	۲۰۰	۲۰۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪

جدول ۲ نتایج حاصل از جستجوی شیرهای پاستوریزه استان چهارمحال و بختیاری به یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا منوسایتوژنز

نتیجه	فراوانی یرسینیا انتروکولیتیکا	فراوانی لیستریا منوسایتوژنز	درصد موارد یرسینیا انتروکولیتیکا	درصد موارد لیستریا منوسایتوژنز
موارد مثبت	۲	۰	۱٪	۰
موارد منفی	۱۹۸	۲۰۰	۹۹٪	۱۰۰٪
تعداد کل	۲۰۰	۲۰۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪

صورتی که خوب تخمیر نشود و pH بالاتر از ۵ داشته باشد می‌تواند باعث بقای باکتری لیستریا در خود گردد). بدیهی است با این میزان کم نمی‌توان انتظار درصد بالایی از آلودگی را در شیر پاستوریزه داشت چرا که بنا به عقیده برخی از محققین دمای پاستوریزاسیون تا حد زیادی این باکتری را غیر فعال می‌کند کما اینکه در این تحقیق نیز در شیرهای پاستوریزه باکتری لیستریا منوسایتوژنز جدا نگردید.

در خصوص آلودگی سه درصدی شیر خام به یرسینیا انتروکولیتیکا و آلودگی یک درصدی شیر پاستوریزه به این باکتری نیز توجه به اهمیت این باکتری بخصوص از جنبه بهداشتی عمومی و ایجاد بیماریهایی مانند سپتی سمی، اندوکاردیت، ادنیت مزاتریک، انتروکولیت، پلی اتریت، اریتمانودوزوم همراه با تب، اسهال، دل درد، کونژکتیویت و سندرم شبه آپاندیسیت لزوم توجه بیشتر دست اندرکاران بهداشتی را بیش از پیش می‌طلبد. هر چند که این اقدامات بخصوص در مورد شیر خام صرفاً می‌تواند جنبه پیشگیرانه داشته باشد چرا که این باکتری بطور گسترده‌ای در خاک، آب شیرین، آب رودخانه‌ها و آب چاه پراکنده است. در خصوص شیر پاستوریزه نیز از آنجا که سایر محققین نیز به کرات از شیرهای پاستوریزه این باکتری را جدا کرده‌اند یافتن علت این امر کاملاً ضروری است.

برخی از محققین آلودگی شیرهای پاستوریزه را به خود فرآیند پاستوریزاسیون و برخی به آلودگی پس از پاستوریزاسیون

از شیر خام نیز سه مورد (۱/۵٪) لیستریا منوسایتوژنز و شش مورد (۳٪) یرسینیا انتروکولیتیکا جدا شد که در خصوص آلودگی با لیستریا منوسایتوژنز دو مورد مربوط به شهرستان شهرکرد و یک مورد مربوط به شهرستان بروجن بود و در خصوص آلودگی با یرسینیا انتروکولیتیکا نیز دو مورد مربوط به شهرستان بروجن، یک مورد مربوط به شهرستان اردل و سه مورد مربوط به شهرستان فارسان بود.

در استان چهارمحال و بختیاری تاکنون هیچ گونه تحقیقی در زمینه لیستریا منوسایتوژنز و یرسینیا انتروکولیتیکا در شیر خام و پاستوریزه صورت نگرفته است. در این تحقیق میزان آلودگی شیرهای خام به لیستریا منوسایتوژنز ۱/۵٪ تعیین شد که هر چند که به ظاهر میزان کمی می‌باشد ولی این مطلب بخصوص از دید بهداشت عمومی و طب انسانی اهمیت ویژه‌ای دارد. در منطقه خوزستان نیز جمشیدیان میزان آلودگی شیرهای خام به یرسینیا انتروکولیتیکا را ۲/۵٪ و میزان آلودگی شیرهای پاستوریزه را ۱٪ گزارش نمود [۲].

بیماریهای انسفالیت، سقط جنین، سپتی سمی، اندوکاردیت و بیماریهای جلدی- گوارشی از جمله بیماریهایی است که در صورت کم توجهی می‌تواند خطر آفرین باشد. علیرغم همخوانی نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین، میزان کم آلودگی به لیستریا منوسایتوژنز را می‌توان با تعداد کم گاوداریهای صنعتی در سطح استان و استفاده کمتر از سیلو - که یکی از منابع بالقوه عفونت محسوب می‌شود تا حدی مرتبط دانست [۶]. (سیلو در

به هر حال به نظر می‌رسد که توجه به مواردی مثل عدم مصرف شیرهای خام، انجام اصول دقیق پاستوریزاسیون و رعایت تاریخ انقضای شیر پاستوریزه حداکثر ۴۸ ساعت پس از تولید و نگهداری صحیح شیر پاستوریزه می‌تواند در کاهش آلودگی به این باکتری نقش بسزایی داشته باشد.

۴- تشکر و قدردانی

نگارندگان بدینوسیله از همکاری و مساعدت جناب آقای مجید ریاحی و جناب آقای سهراب صفری قدردانی می‌نمایند.

نسبت می‌دهند که مشخص کردن این امر تحقیق دیگری را می‌طلبد. برخی از محققین معتقدند که سویه‌های یرسینیا انتروکولیتیکا قادر به تحمل دمای پاستوریزاسیون نمی‌باشند. این محققین معتقدند احتمالاً در اثر آلودگی شیر پاستوریزه پس از عمل پاستوریزاسیون است که وجود این باکتری در شیر پاستوریزه مکرراً گزارش می‌شود [۷].

پاگان و همکاران، شش سویه مختلف یرسینیا انتروکولیتیکا را به میزان ۱۰ باکتری در هر میلی‌لیتر شیر وارد کردند که با آزمون مجدد آنها پس از پاستوریزاسیون، مشاهده شد سه سویه از این تعداد بطور غیر منتظره‌ای در برابر حرارت مذکور مقاوم بوده‌اند [۸].

۵- منابع

تألیف جیمز، ام. جی. جلد دوم، انتشارات دانشگاه مشهد، (۱۳۷۶): صفحه ۳۸۹-۴۳۵.

[۸] مرک؛ راهنمای عملی میکروبی‌شناسی، انتشارات شرکت بازرگانی مرک، (۱۳۷۱): صفحه ۱۸۵-۱۸۶، ۲۳۱-۲۳۲ و ۳۵۴-۳۵۶.

[9] Carter, G. R; Quinn, P. J; Carter, M. E; Markey, B. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolf Company, pp: 173, 210-221.

[10] Padilha, M. R; Fernandes, S. F. 2001. Isolation of Pathogenic bacteria in Pasteurized type C sold in recife city, Ipernambuco, Brazil *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* pp: 167-171.

[11] Pagan, R; Manas, R; Raso, J. 1999. Heat resistance of yersinia enterocolitica grown at different temperatures and heated in different media. *International Journal food Microbiology*. 47 pp: 59-66.

[۱] ادیب‌فر، م؛ میکروبی‌شناسی پزشکی، انتشارات مؤلف، چاپ اول، (۱۳۷۵): صفحه ۲۵۰-۲۵۹.

[۲] جمشیدیان، م و باباخانی، ا؛ جستجوی یرسینیا انتروکولیتیکا در شیرهای خام و پاستوریزه منطقه خوزستان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۷۸): دوره ۵۴، شماره ۱، صفحه ۹.

[۳] ذوقی، ا؛ بیماریهای قابل انتقال بین انسان و حیوان، تألیف جیمز اچ استیل، انتشارات جهاد سازندگی، (۱۳۷۲): صفحه ۳۹۹-۴۱۵.

[۴] رضویلر، و؛ میکروبی‌های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۸): صفحه ۹۶-۱۰۳.

[۵] شیمی، ا؛ باکتری‌شناسی دامپزشکی و بیماریهای باکتریایی، چاپ اول، مؤسسه نشر جهاد، (۱۳۷۶): صفحه ۱۳۰-۲۳۹.

[۶] طباطبایی، ع و فیروزی، ر؛ بیماریهای باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۸۰): صفحه ۷۵-۷۷.

[۷] مرتضوی، ع و خداپرست، م؛ میکروبیولوژی غذایی مدرن،