Archive of SID

تحقیقی

تعیین آلودگی به کلستریدیم بوتولینوم در دوگونه از ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده

دکتر حمیدرضا توکلی[1]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی*[2]

۱- دکتری تخصصی میکروب شناسی ، دانشیار ، گروه تغذیه مرکز تحقیقات بهداشتی ، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).

۲-دکتری تخصصی میکروب‌شناسی ، استادیار ، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).

چکیده

زمینه و هدف : *کلستریدیوم بوتولینوم به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی شناخته شده است. اسپور باکتری به‌طور گسترده‌ای در خاک، رسوبات دریاها، محیط‌های آبی و آبزیان پراکنده است. این مطالعه به منظور تعیین آلودگی به کلستریدیم بوتولینوم در دو گونه از ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده انجام گردید.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۱٤٦ نمونه ماهی فرآوری شده و نشده از دو گونه کفال طلایی و آزادماهی دریای خزر از صیدگاه شهید چمران دریاچه خزر در استان گیلان طی سال ۱۳۸۷ انجام شد. تعداد ٤٥نمونه فرآوری شده و ۲۸ نمونه فرآوری نشده ماهی کفال طلایی (Liza auratus) و نیز تعداد ۳۹ نمونه فرآوری شده و ۳٤ نمونه فرآوری نشده آزاد ماهی (Salmo Trutta caspius) مطالعه شدند. نمونه‌ها با روش‌های استاندارد ارائه شده (APHA 2001 و FDA 2003) از نظر آلودگی به کلستریدیوم بوتولینوم مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس با استفاده از آنتی‌توکسین‌های مونووالان استاندارد، تعیین تیپ گردیدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-13 و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *در ١٦ نمونه (۱۰/۹۵درصد) آلودگی به سم کلستریدیوم بوتولینوم مورد تأیید قرار گرفت. میزان آلودگی ماهیان فرآوری شده حدود ۱/۸ برابر ماهیان فرآوری نشده تعیین گردید. به‌طوری که از مجموع ۸٤ نمونه ماهی فرآوری شده در ۱۱ نمونه (۱۳/۰۹درصد) و از مجموع ٦۲ نمونه ماهی فرآوری نشده در ۵ نمونه (۷/۵۷درصد) وجود توکسین بوتولینوم ثابت گردید. همچنین تیپ E به عنوان شایع‌ترین تیپ توکسین شناخته شد. به‌طوری که از ۱۱ نمونه مثبت ماهیان فرآوری شده ٦ مورد (٥٤/۵درصد) و از ۵ نمونه مثبت ماهیان فرآوری نشده ۲ مورد (٤۰درصد) را به خود اختصاص داد و پس از آن تیپ‌های A و B قرار گرفتند. میزان آلودگی ماهی کفال طلایی در هر دو نوع فرآوری شده و نشده بیش از آلودگی آزاد ماهی بود؛ ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.*

نتیجه‌گیری : *نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آلودگی انواع ماهیان به تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم به‌ویژه تیپE می‌باشد. باتوجه به آلودگی بیشتر ماهیان فرآوری شده به این باکتری، مصرف این فرآورده در طبخ به صورت نیم‌پز و شکم‌پر می‌تواند به بروز مسمومیت غذایی منجر گردد.*

کلید واژه‌ها : *فرآوری ، کلستریدیوم بوتولینوم ، ماهی*

* نویسنده مسؤول : دکتر عباسعلی ایمانی فولادی ، پست الکترونیکی : **imanifouladi.a@gmail.com**

نشانی : تهران، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی ، تلفن ۸۸۰۶۸۹۲۴ –۰۲۱ ، نمابر ۸۸۰۳۹۸۸۳

وصول مقاله : ۸۸/۵/۴ ، اصلاح نهایی : ۸۹/۳/۱۱ ، پذیرش مقاله : ۸۹/۴/۶

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در بین عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی، عوامل باکتریال بیشترین نقش را داشته و بیش از ۷۰ درصد عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی توسط این عوامل ایجاد می‌گردد (۱). جنس کلستریدیوم دارای بیش از ۱۰۰ گونه است؛ لیکن تنها ۲۴ گونه از آنها دارای اهمیت بالینی هستند که در بین آنها کلستریدیوم بوتولینوم دارای جایگاه ویژه‌ای است. زیرا خطرناک‌ترین و کشنده‌ترین سم باکتریایی شناخته شده در طبیعت را تولید می‌نماید (۱). با توجه به اهمیت این باکتری در ایجاد مسمومیت‌های غذایی خطرناک و نیز اختلافاتی که در انتشار جغرافیایی اسپور، تیپ‌های این باکتری در مناطق مختلف وجود دارد؛ مطالعات زیادی در ارتباط با میزان فراوانی تیپ‌های شایع این باکتری در کشورهای مختلف جهان صورت پذیرفته است (۲). زیرا تعیین تیپ‌های باکتری یکی از شاخص‌های اپیدمیولوژیکی و بهداشتی است که به کمک آن می‌توان منشاء آلودگی و منابع آلوده کننده مواد غذایی را شناسایی نمود و در کنترل آنها اقدامات مؤثری را انجام داد. در ارتباط با نقش آبزیان در بروز بیماری‌هایی با منشاء غذایی مطالعات زیادی در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است (۲و۳). باکتری کلستریدیوم بوتولینوم از نظر خصوصیات آنتی‌ژنیکی به هفت تیپ A ، B ، C ، D ، E ، F و G تقسیم‌بندی گردیده است که در بین آنها تیپ‌های A ، B ، E و به ندرت F برای انسان و تیپ‌های C و D برای حیوانات مسمومیت‌زا هستند. با وجود تفاوت‌های این تیپ‌ها از نظر آنتی‌ژنیک، وزن ملکولی و محتوای اسیدآمینه؛ شباهت‌هایی در اتصال به عصب و عضله دارند(۴). تیپ A و B بیشتر منشاء خاکی و تیپ E بیشتر منشاء آبی دارد و از رسوبات دریایی، محیط‌های آبی و آبزیان مکرراً جدا گردیده‌اند (۵). در همین راستا مطالعه‌ای توسط Huss روی رسوبات مناطق ساحلی اسکاندیناوی صورت پذیرفت و در ۴۹/۹ درصد موارد آلودگی به تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم مورد تأیید قرار گرفت (۶). همچنین در مطالعه Kravchenko و Shishulina در روسیه روی ۴۰۰۰ نمونه رسوب دریایی؛ حدود ۱۰/۲۲ درصد نمونه‌ها به اسپور کلستریدیوم بوتولینوم آلوده بودند که بیشترین میزان آلودگی، متعلق به تیپ E بود (۷). در مطالعات انجام شده در ژاپن نیز تیپ E به‌عنوان شایع‌ترین تیپ کلستریدیوم بوتولینوم در محیط‌های آبی و آبزیان معرفی گشته است (۸و۹).

علی‌رغم توزیع گسترده اسپورهای باکتری در محیط و متعاقب آن در مواد غذایی خام، معمولاً بوتولیسم غذایی به‌دنبال رشد و تکثیر ارگانیسم و تولید توکسین در غذای آماده شده صورت می‌گیرد و بایستی شرایط لازم برای رشد و تکثیر اسپور و تبدیل آن به شکل وژتاتیو (رویشی) فراهم گردد. عوامل زیادی روی رشد و توکسین‌زایی باکتری تأثیرگذارند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به اسیدیته (pH)، حرارت، فعالیت آب (water activity= aw)، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء (Eh)، مواد شیمیایی نظیر نیتریت و اسیدهای آلی و فرآیندهای انجام شده بر روی مواد غذایی نظیر دود دادن اشاره نمود (۱۰). اگرچه دود دادن ماهی به دلیل کاهش فعالیت آب اثر مهارکنندگی روی ارگانیسم‌های مختلف دارد؛ ولی بر اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تأثیر چندانی نداشته و برعکس می‌تواند باعث حفظ و فعالیت اسپور گردد (۱۱). بنابراین چنانچه ماهی به اسپور باکتری آلوده باشد؛ بر اثر دود دادن از بین نرفته و در صورت وجود شرایط مساعد و عدم استفاده از حرارت کافی در هنگام مصرف (به‌ویژه هنگام تهیه به‌صورت شکم‌پر) احتمال بروز مسمومیت بوتولیسم وجود دارد. این موضوع به‌طور خاص در مورد ماهیان آب‌های شیرین که بیشتر در معرض آلودگی هستند؛ از اهمیت بالاتری برخوردار است (۱۲). میزان آلودگی ماهیان به کلستریدیوم بوتولینوم به عوامل متعددی از جمله نوع ماهی، عادات غذایی، نحوه تغذیه ماهیان و محیط زندگی آنها بستگی دارد. ماهیان پرورشی آلودگی را از گل و لای و لجن آلوده کسب نموده و آبشش آنها از منابع مهم باکتری به‌شمار می‌رود؛ لذا تخلیه امعاء و احشاء موجب کاهش معنی‌داری در تعداد میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۱۳). گزارشات متعددی از نقاط مختلف جهان مبنی بر جداکردن کلستریدیوم بوتولینوم و یا بروز مسمومیت غذایی بوتولیسم در اثر مصرف فرآورده‌های دریایی وجود دارد (۱۴). در ایران نیز گزارش‌های پراکنده‌ای از وقوع مسمومیت بوتولیسم در اثر مصرف ماهیان شور یا دودی شده وجود دارد (۱۵و۱۶). لذا این مطالعه به منظور تعیین آلودگی به کلستریدیم بوتولینوم در

www.SID.ir

Archive of SID

دو گونه از ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده انجام گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی تعداد ۱۴۶ نمونه ماهی فرآوری شده و نشده از دو گونه کفال طلایی و آزادماهی دریای خزر از صیدگاه شهید چمران دریاچه خزر در استان گیلان طی سال ۱۳۸۷ بررسی شدند. تعداد ۴۵نمونه فرآوری شده و ۲۸ نمونه فرآوری نشده ماهی کفال طلایی (Liza auratus) و نیز تعداد ۳۹ نمونه فرآوری شده و ۳۴ نمونه فرآوری نشده آزاد ماهی (Salmo Trutta caspius) مطالعه شدند. نمونه‌های فرآوری شده از یک کارگاه فرآوری ماهی در استان گیلان تهیه شد.

ماهیان پس از فرآوری در کارگاه جمع‌آوری شدند و هر یک از نمونه‌ها داخل آلومینیم فویل سترون و کیسه نایلونی تمیز به اندازهٔ ۵۰×۳۰ سانتی‌متر قرار داده شدند و در مجاورت یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انتقال یافتند.

آزمایشات لازم طبق روش استاندارد ارائه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا (APHA) و سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) روی نمونه‌ها صورت پذیرفت (۱۷و۱۸). به منظور غنی‌سازی نمونه‌ها ابتدا ۱۰ گرم از روده و آبشش ماهیان مورد آزمایش توزین و معادل آن با فرفسفات ژلاتین با pH ۶/۲-۶ (Merck آلمان) به عنوان رقیق کننده اضافه گردید و توسط همزن الکتریکی (wolf انگلستان) به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط و یکنواخت گردید. برای هر نمونه دولوله آزمایش حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط با گوشت پخته (Cooked Meat Medium=CMM) (Merck آلمان) انتخاب و مقدار ۵-۳ گرم از نمونه یکنواخت شده مورد آزمایش به محیط کشت CMM اضافه گردید. سپس هر یک از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا شوک حرارتی لازم برای فعال شدن اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد گردد. نمونه‌ها به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط بیهوازی گرمخانه‌گذاری گردیدند (بیشترین غلظت توکسین پس از طی دوره رشد فعال به‌وجود می‌آید که معمولاً تا ۷ روز به طول می‌انجامد). برای کنترل شرایط بیهوازی از نوار بلودومتیلن که آبی رنگ بوده و در شرایط بیهوازی به رنگ سفید درمی‌آید؛ استفاده گردید. با توجه به این که در مورد کلستریدیوم بوتولینوم، بررسی باکتریولوژیکی نمونه‌ها در محیط کشت و جداسازی باکتری دارای ارزش تشخیصی چندانی نبوده و جستجوی باکتری و تعیین تیپ آن، بدون جستجوی توکسین امکان‌پذیر نیست (۴)؛ در این مطالعه روش کار براساس آزمون کیفی سم‌شناسی (تشخیص توکسین) و تأیید آن با استفاده از روش خنثی‌سازی توکسین(نوترالیزاسیون) با استفاده از آنتی‌توکسین تری‌والان استاندارد (ABE) انجام پذیرفت.

با توجه به این که جداسازی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه‌های غذایی ارزش تشخیصی ندارد و آلودگی با تشخیص سم اثبات می‌گردد؛ لذا از روش حساس و دقیق تزریق به حیوان زنده (Bioassay) استفاده گردید (۴). برای جستجوی توکسین با این روش، ابتدا مایع رویی نمونه‌هایی کشت داده شده درمحیط CMM که از نظر علائم ماکروسکوپی (کدورت، تیرگی محیط، تجزیهٔ گوشت محیط کشت و تولید گاز) و علائم میکروسکوپی (باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت، اسپوردار و دارای اسپور نزدیک به انتها) مشکوک به کلستریدیوم بوتولینوم بودند و احتمال وجود توکسین بوتولینوم در آنها وجود داشت؛ جمع‌آوری گردید و به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل شد و پس از سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm) و تنظیم pH بر روی ۶/۲ (با استفاده از اسید کلریدریک و سود یک نرمال)، هر نمونه برای انجام آزمایشات به سه قسمت حرارت دیده (به عنوان کنترل منفی و شاهد که در آن توکسین بوتولینوم غیرفعال گردید)، حرارت ندیده و تریپسینه تقسیم شدند (برای فعال شدن تیپ‌های غیرپروتئولیتیک کلستریدیوم بوتولینوم که قدرت تولید پروتئاز را ندارند؛ ۰/۱ میلی‌لیتر تریپسین (Difco) به ازای هر ۰/۹ میلی‌لیتر نمونه محلول استفاده شد). افزودن آنزیم‌های پروتئاز مانند تریپسین باعث تبدیل پروتوکسین به توکسین می‌گردد. برای تهیه محلول تریپسین، یک گرم تریپسین را در یک لوله تمیز ریختیم و به آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه نمودیم و pH آن بر روی ۶/۲ تنظیم شد. سپس از این محلول ۰/۱ میلی‌لیتر به ۰/۹ میلی‌لیتر عصاره باکتری کشت داده

www.SID.ir

Archive of SID

شده به نسبت ۱/۹ اضافه گردید (۱۹). از آنجایی که آلودگی مواد غذایی به باکتری کلستریدیوم بوتولینوم ارزش تشخیصی ندارد و با تشخیص سم اثبات می‌گردد؛ لذا از روش حساس و دقیق تزریق به حیوان زنده (Bioassay) استفاده گردید.

از هر یک از نمونه‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر به دوسر موش نر نژاد BALB/c به وزن ۲۵-۲۰ گرم به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و موش‌ها به مدت ۹۶ ساعت تحت کنترل قرار گرفتند. مرگ موش‌ها با علائم بوتولیسم (ژولیدگی مو، سیخ شدن گوش‌ها و دم، تنفس شکمی و کند، گوشه‌گیری، اختلال در اندام‌های حرکتی، و مرگ به علت فلجی عضلات تنفسی) نشانگر وجود توکسین بوتولینوم در نمونه‌های مورد آزمایش بود. به منظور تایید وجود توکسین بوتولینوم از آنتی‌توکسین تری‌والان (ABE) استاندارد استفاده گردید تا مشخص گردد که از نظر کیفی توکسین موجود در نمونه‌ها بوتولینوم بوده است. کار بر روی حیوانات براساس پروتکل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شد.

تعیین تیپ با استفاده از آنتی‌توکسین‌های مونووالان استاندارد A ، B و E که از انستیتو علمی تحقیقاتی سوتو – ورژاک مسکو به شماره ۱۲۱۰۰۲۰۴۱ به صورت ویال‌های ۱۰میلی‌لیتری لیوفیلیزه (توسط سازمان هلال احمر ایران) تهیه شده بود؛ صورت پذیرفت. برای تعیین تیپ توکسین ۴ لوله انتخاب گردید و یک میلی‌لیتر از عصاره (supernatant) نمونه‌ای که وجود توکسین بوتولینوم در آن به اثبات رسیده بود؛ به هر یک از لوله‌ها منتقل شد. به لوله اول ۰/۲۵ میلی‌لیتر آنتی‌توکسین A ، به لوله دوم ۰/۲۵ میلی‌لیتر آنتی توکسین B، به لوله سوم ۰/۲۵ میلی‌لیتر آنتی توکسین E اضافه گردید و به لوله چهارم (نمونه شاهد) هیچ نوع آنتی‌توکسینی اضافه نشد. سپس تمامی لوله‌ها به مدت یک‌ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این امر موجب تسریع در قدرت ترکیبی توکسین و آنتی‌توکسین مخلوط شده می‌گردد. هر یک از نمونه‌های چهارگانه فوق به دو موش سفید آزمایشگاهی (۰/۵ میلی‌لیتر داخل صفاقی) تزریق گردید. موش‌ها به مدت ۴ روز تحت کنترل قرار گرفتند. زنده ماندن موش‌هایی که مخلوط یک نوع توکسین و آنتی‌توکسین مربوطه را دریافت کرده بودند و تلف شدن موش‌های سایر گروه‌ها با علائم بوتولیسم، تیپ توکسین را تعیین نمود. موش‌هایی که نمونه شاهد (عصاره بدون آنتی‌توکسین) را دریافت نمودند، با علائم بوتولیسم تلف شدند. لازم به ذکر است در مواردی تمامی موش‌ها تلف گردیدند که با استفاده از بافر فسفات رقیق کننده از نمونه‌های فوق رقت‌های یک‌دوم، یک‌پنجم و یک‌دهم تهیه و آزمایش‌ها دوباره تکرار و تیپ توکسین تعیین گردید. البته می‌توان با استفاده از روش ایمنودیفیوژن توکسین را تیپ‌بندی نمود که روشی آسان‌تر از روش فوق است؛ ولی در تحقیق حاضر به‌دلیل مهیا بودن حیوان آزمایشگاهی برای سنجش بیولوژیک سم، تیپ‌بندی نیز با استفاده از حیوان انجام گردید که از اعتباری برابر با روش‌های ایمنولوژیک برخوردار است (۱۲و۲۰). در مواردی علی‌رغم خنثی‌سازی با هر آنتی‌توکسین فوق، مرگ و میر در موش دیده شد که احتمالاً مربوط به سایر سروتیپ‌هاست که در انسان اهمیت ندارد؛ ولی در موش آزمایشگاهی مهم هستند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-13 و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری آزمون کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

از مجموع ۱۴۶ نمونه ماهی مورد آزمایش، در ۱۶ نمونه (۱۰/۹۵درصد) آلودگی به کلستریدیوم بوتولینوم مورد تأیید قرار گرفت و میزان آلودگی ماهیان فرآوری شده حدود ۱/۸ برابر ماهیان فرآوری نشده تعیین گردید. به طوری که از مجموع ۸۴ نمونه ماهی فرآوری شده در ۱۱نمونه (۱۳/۰۹درصد) و از مجموع ۶۲ نمونه ماهی فرآوری نشده تنها در ۵ نمونه (۷/۵۷درصد) وجود توکسین بوتولینوم ثابت گردید؛ از نظر آماری اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود.

این مطالعه همچنین نشان داد که تیپ E شایع‌ترین تیپ باکتری در این ماهیان محسوب می‌گردد. به طوری که از ۱۶ نمونه مثبت، به تنهایی ۸مورد (۵۰درصد) را به خود اختصاص داد و تیپ‌های A و B و سایر تیپ‌ها در رده‌های بعدی با درصدهای ۱۸/۷۵ و ۱۰/۹۵ و ۱۸/۷۵ قرار گرفتند.

این تیپ هم در ماهیان فرآوری شده و هم در ماهیان فرآوری نشده؛ به عنوان تیپ غالب شناخته شد. به طوری که از ۱۱نمونه مثبت کلستریدیوم بوتولینوم در ماهیان فرآوری

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ : فراوانی نسبی میزان آلودگی گونه‌های ماهیان پرورشی و دریایی مورد آزمایش به تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم

	کل موارد مثبت تعداد (درصد)	تیپ A تعداد (درصد)	تیپ B تعداد (درصد)	تیپ E تعداد (درصد)	سایر تیپ‌ها تعداد (درصد)
کفال طلایی فرآوری شده (۴۵ عدد)	۶ (۱۳/۳۴)	۱ (۶/۲۵)	۰	۴ (۲۵)	۱ (۶/۲۵)
کفال طلایی فرآوری نشده (۲۸ عدد)	۳ (۱۰/۷۱)	۱ (۶/۲۵)	۰	۱ (۶/۲۵)	۱ (۶/۲۵)
آزاد ماهی فرآوری شده (۳۹ عدد)	۵ (۱۲/۸۲)	۱ (۶/۲۵)	۱ (۶/۲۵)	۲ (۱۲/۵)	۱ (۶/۲۵)
آزاد ماهی فرآوری نشده (۳۴ عدد)	۲ (۵/۸۸)	۰	۱ (۶/۲۵)	۱ (۶/۲۵)	۰
جمع	۱۶ (۱۰/۹۵)	۳ (۱۸/۷۵)	۲ (۱۲/۵)	۸ (۵۰)	۳ (۱۸/۷۵)

شده ۶ مورد (۵۴/۵درصد موارد مثبت) و از ۵ نمونه مثبت مربوط به ماهیان فرآوری نشده ۲ مورد (۴۰درصد موارد مثبت) را به خود اختصاص داد و پس از آن تیپ‌های A و B قرار گرفتند.

ماهی کفال طلایی (۲۴/۵ درصد) در مقایسه با آزاد ماهی دریاچه خزر (۱۸/۵ درصد از آلودگی بیشتری برخوردار بود. همچنین در ۳مورد (۱۸/۷۵درصد موارد مثبت) به علت در اختیار نداشتن آنتی‌توکسین اختصاصی سایر تیپ‌های توکسین بوتولینوم (C,D,F,G) تعیین تیپ توکسین میسر نگردید که احتمالاً تیپ‌هایی غیر از A و B و E بوده‌اند (جدول یک). میزان آلودگی گونه کفال طلایی در هر دو نوع فرآوری شده و نشده بیش از گونه آزاد ماهی بود (جدول یک).

بحث

در این مطالعه از مجموع ۱۴۶ نمونه از دو گونه ماهی مورد بررسی در ۱۶ نمونه (۱۰/۹۵درصد) آلودگی به تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم مورد تأیید قرار گرفت که نشان‌دهنده آلودگی نسبتاً بالای ماهیان مصرفی به‌ویژه ماهیان فرآوری شده به این باکتری است. در مطالعه‌ای که توسط Lalitha و Gopakumar در هندوستان روی ۶۱ نمونه ماهی پرورشی، ۶۸ نمونه ماهی دریایی و ۷۱ نمونه رسوب مربوط به نواحی گرمسیری انجام گرفت؛ میزان آلودگی ماهیان پرورشی و دریایی به کلستریدیوم بوتولینوم به ترتیب ۲۲ و ۲۰ درصد تعیین گردید (۱۲). در مطالعه دیگری که توسط Lalitha و Sunrendram روی ماهیان پرورشی، دریایی و میگو صورت پذیرفت؛ در ۹/۸۸درصد از ماهیان پرورشی وجود کلستریدیوم بوتولینوم تأیید گردید (۱۴). در مطالعه ما تیپ E در هر دو نوع ماهیان فرآوری شده و فرآوری نشده به عنوان شایع‌ترین تیپ توکسین کلستریدیوم بوتولینوم شناخته شد. به طوری که به تنهایی ۸ مورد از ۱۶ مورد مثبت (۵۰درصد) را به خود اختصاص داد که با مطالعه قبلی ما در سال ۱۳۸۴ در انواع دیگر ماهیان شمال و جنوب کشور تقریباً مطابقت دارد (۱۶). این موضوع نشان می‌دهد که فرآوری به روش دودی سرد، از رشد و توکسین‌زایی کلستریدیوم بوتولینوم جلوگیری نمی‌کند. در مطالعه مدرس و همکاران در سال ۱۳۷۶ درصد تیپ E (۶۷/۵ درصد) بیشتر از مطالعه حاضر بوده است (۱۵). شاید این اختلاف مربوط به تنوع نمونه مورد استفاده در مطالعه مدرس و همکاران باشد که علاوه بر ماهی، کنسرو و مواد خوراکی دیگر نیز بررسی شده بودند و از طرفی بین ماهیان پرورشی و غیرپرورشی تفکیکی قائل نشده بودند. البته مدرس در سال ۱۳۷۶ در مطالعه‌ای دیگر روی نمونه‌های انسانی مشکوک به مسمومیت با بوتولینوم بیشترین تیپ جدا شده را از نوع E گزارش کرد (۴). لذا این نکته ارتباط بین بالا بودن میزان شیوع کلستریدیوم بوتولینوم تولید کننده سم تیپE را با میزان عوارض ایجاد شده نشان می‌دهد.

همچنین در یک مطالعه دیگر Hielm و همکاران ۴۲۸ نمونه ماهی صید شده از دریای بالتیک را از نظر آلودگی به تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم بررسی نمودند و آلودگی در ۲۴/۸درصد از نمونه‌ها تأیید گردید و تیپ‌های E و A به ترتیب بیشترین موارد را به خود اختصاص دادند (۲۱). Huss و Pedersen نیز در مطالعه خود ۱۴۰۷ قطعه ماهی صید شده از آب‌های نواحی اسکاندیناوی (۷۰۷ نمونه)، دریای شمال (۴۷۰ نمونه) و آتلانتیک شمالی (۲۳۰ نمونه) را مورد آزمایش قرار دادند. در نمونه‌های مربوط به آتلانتیک شمالی هیچ‌گونه آلودگی تأیید نگردید؛ اما در ۱۲/۴درصد از نمونه‌های مربوط به آب‌های اسکاندیناوی و ۴/۷۲درصد از نمونه‌های آب‌های دریای شمال وجود کلستریدیوم بوتولینوم

www.SID.ir

Archive of SID

تأیید گردید. در این مطالعه نیز تیپ E به تنهایی ۴۶/۶درصد موارد مثبت را به خود اختصاص داد (۲۲). Huss در مطالعه دیگری ۲۸۴ نمونه خاک و رسوب نواحی اسکاندیناوی (شامل ۱۸۴ نمونه رسوب دریاها و دریاچه‌ها و ۱۰۰ نمونه خاک مناطق جنگی) را مورد آزمایش قرار دادند. میزان فراوانی کلستریدیوم بوتولینوم و نمونه‌های مربوط به دریاها و دریاچه‌ها ۳۲درصد تعیین گردید و تیپ E به تنهایی ۸۹/۹درصد موارد مثبت را به خود اختصاص داد. از نمونه‌های مربوط به مناطق جنگلی آلودگی در ۶درصد نمونه‌ها تأیید گردید که تیپ B به‌عنوان شایع‌ترین تیپ معرفی گردید؛ اما تیپ E جدا نشد که با توجه به شایع بودن تیپE در مناطق دریایی این نتیجه قابل انتظار بود (۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که احتمالاً بین تیپ‌های شایع کلستریدیوم بوتولینوم در آبزیان و محیط پرورش آنها ارتباط مستقیمی وجود دارد. زیرا در مطالعاتی که توسط توکلی و همکاران به طور جداگانه روی پراکندگی تیپ‌های A و B و E کلستریدیوم بوتولینوم بر روی ماهیان دریای شمال و جنوب ایران و رسوبات مناطق ساحلی صورت پذیرفت؛ نشان داده شد که هم در ماهیان شمال ایران و هم در رسوبات مناطق ساحلی استان‌های شمالی ایران (گیلان و مازندران) تیپ E به عنوان شایع‌ترین تیپ باکتری مطرح است (۵و۱۶و۲۳و۲۴). مطالعات Lalitha و Surendran در هندوستان (۱۴)، Huss در اسکاندیناوی (۶) و Yamakawa و Nakamura در ژاپن (۸) نیز این موضوع را به خوبی نشان می‌دهد. Yamakawa و Nakamura در مطالعه خود ۹۸ نمونه رسوب - مربوط به چهار رودخانه ژاپن را مورد بررسی قرار دادند که در مجموع در ۱۱ مورد (۱۱/۲۲درصد) وجود باکتری تأیید گردید که ۶ مورد آن (۵۴/۵درصد) مربوط به تیپ E بود و پس از آن تیپ B و C قرار گرفتند (۸).

در مطالعه اخیر برای اثبات وجود توکسین بوتولینوم به صورت کیفی (ژولیدگی مو، سیخ شدن گوش‌ها و دم، تنفس شکمی و کند، گوشه‌گیری، اختلال در اندام‌های حرکتی و مرگ به علت فلجی عضلات تنفسی) از روش Bioassay استفاده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که این روش علی‌رغم تمام نقاط ضعفی (سرعت کم، هزینه بالا، آزار دیدن حیوان، وجود موارد مثبت کاذب و استرس زیاد موقع تزریق به موش) که برای آن ذکر شده؛ هنوز هم به عنوان یک روش حساس و دقیق برای تشخیص کیفی (۹۵درصد) توکسین بوتولینوم مطرح می‌باشد که در مطالعات قبلی نیز از این روش استفاده شده است (۵و۱۶). محققان دیگری نظیر Lalitha و Surendran (۱۴)، Lalitha و Gopakumar (۱۲)، Hielm و همکاران (۲۰)، توکلی و طباطبایی (۱۶) و توکلی و رضوی لار (۵) نیز در مطالعات خود از این روش استفاده نموده و توانایی آن را در تشخیص توکسین بوتولینوم نشان داده‌اند. با این حال برخی از محققین نظیر Wictome و همکاران بر این باورند که بایستی روش‌های In vitro جایگزین روش Bioassay گردند (۲۵) و برخی مانند Ferreira و Edmonds معتقدند که حساسیت روش‌های In vitro تنها در مورد تشخیص سویه‌های غیرپروتئولیتیک کلستریدیوم بوتولینوم، بیش از روش Bioassay است و این موضوع در مورد سویه‌های پروتئولیتیک صدق نمی‌کند (۲۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ماهیان فرآوری شده دارای آلودگی بیشتری نسبت به ماهیان فرآوری نشده هستند و دودی کردن به روش سرد به دلیل تغییر در شرایط اکسیداسیون و احیاء زمینه را برای رشد و توکسین‌زایی کلستریدیوم بوتولینوم فراهم می‌نماید.

Kautter نیز ۲۱۴ قطعه ماهی غیردودی و ۱۰۱ ماهی دودی شده را که در شرایط وکیوم بسته‌بندی شده بودند را از نظر تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم آزمایش نمود و میزان آلودگی در ماهیان دودی و غیردودی به ترتیب ۱۰/۲ درصد و ۵/۴درصد تعیین شد (۱۳). نتایج به دست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده در ایران و دیگر کشورهای جهان نشان می‌دهد که مصرف غذاهای دریایی به‌ویژه ماهیانی که به روش سنتی (دودی، شور و تخمیری) تهیه و فرآوری می‌گردند؛ یکی از علل مهم بروز مسمومیت غذایی بوتولیسم هستند. در ایران طی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۲ در مجموع ۳۴۱ مورد مشکوک به بوتولیسم به ثبت رسیده است که بیشترین موارد آن (۳۹/۵۸درصد) مربوط به استان‌های شمالی کشور بوده است و ۳۱/۰۸درصد در اثر مصرف ماهی شور و تخم‌ماهی (اشپل) رخ داده است و این مواد غذایی به‌عنوان شایع‌ترین مواد غذایی ایجاد کننده مسمومیت بوتولیسم شناخته

www.SID.ir

Archive of SID

شده‌اند (۴و۵و۱۵و۱۶و۲۳و۲۴و۲۷). طبق گزارش آخوندزاده و همکاران نیز تهیه ماهی شور و دودی شده به روش سنتی در شمال ایران به دلیل استفاده از روش دودی سرد (دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد) و مصرف آن با طبخ به صورت شکم‌پر و نیم‌پز یکی از دلایل بروز مسمومیت غذایی بوتولیسم است (۱). در کشور ژاپن نیز طی ده سال اخیر ۱۱۶ مورد مسمومیت بوتولیسم به ثبت رسیده است که بیشترین موارد آن مربوط به مصرف فرآورده‌های تخمیر شده به روش سنتی رخ بوده است. زیرا در این شرایط پتانسیل اکسیداسیون و احیاء (Eh) کاهش یافته و زمینه برای رشد باکتری‌های بی‌هوازی نظیر کلستریدیوم بوتولینوم مهیا می‌گردد (۹). طبق گزارش Macdonald وقوع ۳۹ مورد مسمومیت بوتولیسم در کانادا نیز مردم را نسبت به مصرف غذاهای دریایی تهیه شده به روش سنتی نگران کرده است. زیرا تمامی موارد بوتولیسم در این کشور به دلیل مصرف این فرآورده‌ها رخ داده است که دلایل عمده آن این است که سویه‌های تیپ‌های غیرپروتئولیتیک کلستریدیوم بوتولینوم مانند تیپ E قادرند حتی در شرایط یخچال (۳/۳ درجه سانتی گراد) نیز رشد کرده و توکسین‌زایی نمایند و از سوی دیگر این فرآورده‌ها بدون حرارت کافی مصرف می‌گردند. لذا توکسین بوتولینوم غیرفعال نشده و موجب بروز مسمومیت می‌گردد (۲۸).

با توجه به آلودگی ماهیان فرآوری شده به این باکتری مصرف این فرآورده به صورت نیم‌پز و شکم‌پر می‌تواند به بروز مسمومیت غذایی منجر گردد. لذا آموزش همگانی، عدم تهیه غذاهای دریایی به روش سنتی و غیربهداشتی، استفاده از روش‌های صحیح و نوین فرآوری مواد غذایی، تخلیه امعاء و احشاء ماهی بعد از صید، استفاده از حرارت کافی در موقع مصرف مواد غذایی و کنترل و نظارت مسؤولین بهداشتی بر مراکز تهیه و تولید مواد غذایی از مهم‌ترین اقدامات برای پیشگیری از آلودگی مواد غذایی و بروز مسمومیت غذایی بوتولیسم محسوب می‌گردند (۱۷).

از محدودیت‌های این مطالعه عدم بررسی سایر سروتیپ‌ها بود که به علت عدم تهیه آنتی‌توکسین سایر تیپ‌های کلستریدیوم بوتولینوم (C,D,F,G)، مشکلات در تهیه و هزینه بالای آن، انجام نشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آلودگی انواع ماهیان به تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم به‌ویژه تیپE می‌باشد. باتوجه به آلودگی بیشتر ماهیان فرآوری شده به این باکتری، مصرف این فرآورده در طبخ به صورت نیم‌پز و شکم‌پر می‌تواند به بروز مسمومیت غذایی منجر گردد. اصلاح روش فرآوری، استفاده از حرارت کافی و آموزش بهداشت همگانی هنگام مصرف در پیشگیری از مسمومیت بوتولیسم می‌تواند مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسؤولان مرکز تحقیقات فرآورده‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) که امکان انجام این پروژه را در آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی فراهم نمودند؛ تشکر می‌نماییم.

References

1. Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food control. 2006; 17(3): 183-8.

2. Davies AR, Capell Ch, Jehanno D, Nychas GJE, Kirby RM. Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control. 2000;12(2):67-72.

3. Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes Infect. 2000 Nov;2(13):1651-60.

4. Modarres Sh. A survey of clostridium botulinum in food poisoning in Iran. Tehran Univ Med J. 1997, 55(6)30-4. [Article in Persian]

5. Tavakoli HR, Razavilar V. Isolation of Clostridum botiulinum (Types A, B, E) in Sediments from Coastal Areas in the North of Iran. Iranian J Publ Health. 2003; 32(3): 37-40.

6. Huss HH. Distribution of Clostridium botulinum. Appl Environ Microbiol. 1980 Apr;39(4):764-9.

7. Kravchenko AT, Shishulina LM. Distribution of Clostridium botulinum in soil and water in the U.S.S.R. In: Ingram M, Roberts TA (eds.) Botulism 1966. London: Chapman and Hall Limited. 1967; pp:13-20.

8. Yamakawa K, Nakamura S. Prevalence of Clostridium botulinum type E and coexistence of C. botulinum nonproteolytic type B in the river soil of Japan. Microbiol Immunol. 1992;36(6):583-91.

9. Yamasaki S. Incidence of food borne botulism in Japan during 1977–1998. IASR. 2000; 21:241-2.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Graham AF, Mason DR, Maxwell FJ, Peck MW. Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic Clostridium botulinum at chill temperature. Lett Appl Microbiol. 1997 Feb;24(2):95-100.

11. Dodds KL, Brodsky MH, Warburton DW. A retail survey of smoked ready to eat fish determines their microbiological quality. J Food Prot. 1992;55(3):208–10.

12. Lalitha KV, Gopakumar K. Distribution and ecology of Clostridium botulinum in fish and aquatic environments of a tropical region. Food Microbiology. 2000 Oct; 17(5): 535-41.

13. Kautter DA. Clostridium Botulinum type E in smoked fish. Journal of Food Science. 1964 Nov-Dec; 29(6): 843-9.

14. Lalitha KV, Surendran PK. Occurrence of Clostridium botulinum in fresh and cured fish in retail trade in Cochin (India). Int J Food Microbiol. 2002 Jan;72(1-2):169-74.

15. Modarres Sh. [A survey of Clostridium Botulinum in contamination of food articles in Iran]. Sci Med J Ahwaz Jundishapur Univ Med Sci. 1998;23(3):33-40. [Article in Persian]

16. Tavakoli HR, Tabatabaei AH. [The distribution study of A, B and E types of Clostridium Botulinum in some natural fishes species of Iran (Salmo Trutta Fario, Sander Lucioperca, Pamadassys Argenteus and Scombromorus Cormmerson)]. Kowsar Med J. 2005;10(1): 13-20. [Article in Persian]

17. FDA. Quantitative assessment of relative risk to public health from food borne pathogens in cold- smoked fishery. Center for food safety and applied nutrition. USA. 2003; pp:18-20.

18. Pouch Downes F, Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th. Washington: American Public Health Association. 2001; pp: 105-19, 325-67, 371-415, 637-58.

19. Lindström M, Nevas M, Hielm S, Lähteenmäki L, Peck MW, Korkeala H. Thermal inactivation of nonproteolytic Clostridium botulinum type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. Appl Environ Microbiol. 2003 Jul;69(7):4029-36.

20. Hielm S, Hyytiä E, Ridell J, Korkeala H. Detection of Clostridium botulinum in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol. 1996 Aug; 31(1-3):357-65.

21. Hielm S, Hyytiä E, Andersin AB, Korkeala H. A high prevalence of Clostridium botulinum type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. J Appl Microbiol. 1998 Jan;84(1):133-7.

22. Huss HH, Pedersen A. C botulinum Scandinavian waters. Nord Vet Med. 2001:31(5):214-21.

23. Tavakoli HR. The toxin detection of proteolytic and Non – proteolytic of Clostridium botulinum (Types A, B, E) in Iranian fishes. European Aquaculture Congerress. Norway. 2004.

24. Tavakoli HR. A prevalence study of Clostridium botulinum types in some fresh and smoked cultivated fishes in Iran. World Aquaculture Congress. Barcelona (Spain). 2005.

25. Wictome M, Newton KA, Jameson K, Dunnigan P, Clarke S, Gaze J, et al. Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999 Jul; 24(3):319-23.

26. Ferreira JL, Edmonds P. Comparison of in vitro methods and bioassay technique for detection of C. botulinum toxins. Food Microbiol. 1999;75(4): 234-9.

27. IHM/CDC. The prevalence rate of botulism disease in Iranian provinces during 2002–2007. Iranian Health ministry Archives. 2007; pp:320-4.

28. Macdonald D. The outbreak of type E botulism in seafoods products in Canada. CDC archives. 1999;33: 390-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Paper

Determination of contamination with Clostridium botulinum in two species of processed and non prosecced fish

Tavakoli HR (PhD)[1], Imani Fooladi AA (PhD)*[2]

[1]Associate Professor, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Baghyatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: The Clostridium botulinum is one of the most important causative of food poisoning. Spores of Clostridium botulinum spread out in the soil, the sea sediments, the marine environments and the marine animals. In recent years use of the marine food products like as fish and cultured fish are elevated. The aim of this study was done to compare between processing and non processing fish infected by predominant type of Clostridium botulinum.

Materials and Methods: This descriptive study was done on the 146 samples of fish in two species of processed and non prosecced that collected from Gilan province in Iran during 2008. These samples included the Liza auratus Fish (45 processed fish and 28 non processed fish) and the Salmo Trutta caspius Fish (34 processing fish and 39 non processing fish). The samples examined according to the APHA2000 and FDA2003 protocols. Data Analyzed with SPSS-13 and Chi-Square test.

Results: 16 (11%) of samples (13% of the processed fish and 7.5% of non processed fish) were confirmed that infected by Clostridium botulinum. Also the dominant type of exotoxin was Type E. The Type E exotoxin was determined from 11 of the samples (6 processed fish and 5 non processed fish).

Conclusion: This study showed that fish are infected by Clostridium botulinum special the type E. also use of fish in bad preparation (half cooking and add material in its stomach) may cause the food poisoning.

Keywords: Processing, Clostridium botulinum, Liza auratus Fish, Salmo Trutta caspius Fish

*** Corresponding Author: Imani Fooladi AA (PhD), E-mail: imanifouladi.a@gmail.com**

Received 26 July 2009 **Revised** 1 June 2010 **Accepted** 27 June 2010

This paper should be cited as: Tavakoli HR, Imani Fooladi AA. [Determination of contamination with Clostridium botulinum in two species of processed and non prosecced fish]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2010;13(1):79-87. [Article in Persian]

www.SID.ir