

تعیین فراوانی آلودگی لیستریایی در محصولات لبنی ارسالی به آزمایشگاه اداره نظارت بر مواد غذایی و بهداشتی استان لرستان و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

علی مجتهدی^۱، محمد جواد طراحي^۲، اصغر سپهوند^۳، آذر دخت خاکپور^۴، اسماعیل رادسری^۵، مریم توسلی^۶، اعظم رضوانی^۷

یافته / سال ششم / شماره ۲۲

چکیده

مقدمه: لیستریا منوسایتوزنز به عنوان یک پاتوژن جدی انتقال یابنده از طریق مواد غذایی شناخته شده است. مشخص شده است که مواد لبنی ممکن است منبع سوبیه های لیستریا باشند که منجر به لیستریوزیس انسانی شود. هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان آلودگی لیستریایی از محصولات لبنی ارسالی به آزمایشگاه اداره نظارت بر مواد غذایی و بهداشتی لرستان بود.

مواد و روشها: در این مطالعه توصیفی ۷۲۰ نمونه مواد لبنی مختلف ارسالی به آزمایشگاه کنترل مواد غذایی استان لرستان از نظر وجود گونه های لیستریا مورد بررسی قرار گرفت. یک سری تستهایی شامل تولید کاتالاز، CAMP، و گز پروسکوئر (VP)، همولیز بتا و تخمیر قندهایی مانند گزیلوز و مانیتول برای تشخیص لیستریا به کار رفت و در نهایت تست آنتی بیوگرام برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی انجام پذیرفت.

یافته ها: لیستریا منوسایتوزنز در ۹/۷۲٪ نمونه ها و لیستریا اینوکوا و لیستریا سیلیگری به ترتیب در ۵/۸۳٪ و ۱/۱۱٪ نمونه ها یافت شد. گونه های دیگر لیستریا در این بررسی ایزوله نگردید. در تست آنتی بیوگرام همه ایزوله ها به پنی سیلین، آمپی سیلین، کوتریموکسازول و جنتامایسین حساس بود و ۵ ایزوله لیستریا منوسایتوزنز به اریترومایسین مقاوم بود. **نتیجه گیری:** با توجه به اینکه مواد لبنی آماده مصرف بوده و امکان آلودگی آنها با گونه های لیستریا زیاد می باشد لذا جداسازی و تشخیص این باکتری در مواد لبنی حائز اهمیت است.

واژه های کلیدی: لرستان، لیستریا، مواد لبنی، آنتی بیوگرام

- ۱- دانشجوی مقطع Ph.D باکتری شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- ۲- کارشناس ارشد آمار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- ۳- دانشجوی کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- مهندس شیمی گرایش صنایع غذایی، کارشناس بخش میکروبیشناسی اداره کنترل مواد غذایی استان لرستان
- ۵- کارشناس علوم آزمایشگاهی، مسئول آزمایشگاه اداره کنترل مواد غذایی استان لرستان
- ۶- لیسانس صنایع غذایی، مسئول بخش میکروبیشناسی مواد غذایی اداره کنترل مواد غذایی استان لرستان
- ۷- کاردان علوم آزمایشگاهی

مقدمه

مواد و روشها

جنس لیستریا شامل هفت گونه می باشد که از بین آنها لیستریا منوسایتوزنز تنها پاتوژن انسان و حیوان است. این باکتری کوکوباسیل گرم مثبت و بدون اسپور بوده که اغلب در کشت بصورت کوکسی مشاهده می شود و بی هوازی اختیاری است (۱). پس از ۴۸ ساعت بسیاری از آنها و در کشت کهنه همه آنها گرم منفی می شوند. لیستریا در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد دارای ۴ فلاژل بوده و کاملاً متحرک است؛ ولی در ۳۷ درجه سانتیگراد حرکت کاملاً منفی نیست (۲).

لیستریا منوسایتوزنز گسترش جهانی داشته و در دمای یخچال به آهستگی تکثیر می یابد. سالها است که لیستریا منوسایتوزنز به عنوان پاتوژن منتقل شونده از طریق غذا^۱ شناخته شده که باعث موارد اسپورادیک و شایع شده است (۳). مطالعات متعددی از کشورهای مختلف دلالت می کند که لیستریا منوسایتوزنز در محصولات لبنی، گوشت، سبزیجات و سایر غذاها یافت می شود. در سال ۱۹۸۳ یک شیوع لیستریوزیس در ماساچوست اتفاق افتاد که عامل آن شیر پاستوریزه بود. در شیوع دیگری در کالیفرنیا، پنیر مکزیک آلوده با لیستریا منوسایتوزنز باعث آلودگی شده بود. میزان مرگ و میر در هر دو شیوع تقریباً ۳۰٪ بود (۳).

انسان از طریق استنشاق، خوردن یا تماس مستقیم با غذای آلوده و فرآورده های حیوانی مبتلا می گردد. زنان می توانند حامل لیستریا در واژن خود باشند و از راه مقاربت بیماری را انتقال دهند. انتقال عفونت از راه جفت در زنان باردار باعث مننژیت منتشر و سقط می گردد. مهمترین اشکال بیماری مننژیت، سپتی سمی همراه با آنژین و منو نوکلئوز، انسفالیت، کونژنکتیویت چرکی همراه با زخم قرنیه، اندوکاردیت، آبسه و ضایعات موضعی چرکی و سقط جنین می باشد (۲).

بدلیل اینکه در استان لرستان دامداری رواج زیادی دارد، این پژوهش در راستای میزان شیوع لیستریا منوسایتوزنز در محصولات لبنی که به اداره نظارت بر مواد غذایی و بهداشتی استان ارسال شد صورت گرفته است.

تعداد ۷۲۰ نمونه مواد لبنی در مدت ۱۴ ماه از اول خرداد سال ۱۳۸۰ لغایت تیر ماه ۱۳۸۱ بطور مستمر از نظر آلودگی به لیستریا منوسایتوزنز و سایر گونه های لیستریا مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه ها از طرف اداره کنترل مواد غذایی استان لرستان از مناطق مختلف استان که تحت پوشش اداره مذکور بودند با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیشناسی مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی لرستان منتقل شد و در دفاتر مخصوصی ثبت گردیده و از نظر آلودگی به لیستریا مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های ارسالی پس از توزین به میزان ۲۵ گرم یا ۲۵ سی سی در ارلن های حاوی ۲۲۵ سی سی محیط BHI^۲ به اضافه عصاره مخمر مخلوط گردیده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته یا بیشتر نگهداری شدند. پس از این مدت ارلن های فوق روی محیط های لیستریا سلکتیو آگار و پالکام و از هر کدام دو پلیت بصورت خطی کشت داده شد. پلیت اول از هر محیط در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید و پلیت دوم از محیط های فوق در ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته نگهداری گردید. سپس از هر پلیت پنج کلنی مشخص انتخاب شده و روی محیط های Blood Agar و TSYEA^۳ کشت داده شده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت (یا بیشتر بر حسب نیاز) انکوبه گردید. روی کلنی های ایجاد شده آزمایشهای تشخیصی و تکمیلی صورت گرفت. ابتدا از کلنی ها، لام گرم تهیه شد و سپس کلنی ها از نظر تولید کاتالاز مورد ارزیابی قرار گرفتند و کاتالاز مثبت بودند. تست های دیگر شامل حرکت مثبت در ۲۲ درجه سانتیگراد، MR^۴(+)، VP^۵(+)، اسکولین(+)، گلوکز(+)، مالتوز(+)، رامنوز(+)^۶ و واکنش TSI^۶ (A/A) بود. بر اساس تست CAMP با استافیلوکوکوس اورئوس (S.aureus) و رودوکوکوس اکوی (R.equ) و تخمیر گزیلوز، لیستریا منوسایتوزنز و لیستریا سیلیگری از هم افتراق داده شدند. هر دو گونه لیستریا در تست CAMP با S.aureus

1. Food Borne
2. Brain Heart Infusion Broth
3. Trypticase Soy Yeast Extract Agar
4. Methyl Red
5. Voges Proskauer
6. Triple Sugar Iron Agar

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی مواد لبنی ارسالی به اداره نظارت بر مواد غذایی خرم آباد در سال ۱۳۸۱-۱۳۸۰ بر اساس نوع ماده لبنی و آلودگی لیستریا

نوع ماده لبنی	آلودگی به لیستریا		غیر آلوده		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
شیر	۱۱۵	۹۵/۹	۳۴۰	۵۶/۷	۴۵۵
ماست	۰	۰	۱۱۹	۱۹/۸	۱۱۹
پنیر	۳	۲/۵	۶۲	۱۰/۳	۶۵
خامه	۰	۰	۳۰	۵	۳۰
دوغ	۲	۱/۶	۲۸	۴/۷	۳۰
کره	۰	۰	۱۳	۲/۱۷	۱۳
کشک	۰	۰	۷	۱/۱۶	۷
بستنی	۰	۰	۱	۰/۱۷	۱
جمع	۱۲۰	۱۰۰	۶۰۰	۱۰۰	۷۲۰

بحث

از جمله مسائل مهم و در خور توجه کشورهای در حال پیشرفت، آلودگی مواد غذایی و بویژه مواد لبنی می باشد که منجر به بیماریهای منتقل شونده از طریق غذا می گردد. برای پیشگیری و تحت کنترل درآوردن این بیماریها باید عوامل ایجاد کننده این بیماریها و روشهای جدا نمودن و شناسایی آنها و نیز راههایی که این عوامل، مواد غذایی را آلوده می کنند، شناخته شوند.

در این بررسی تعداد ۷۲۰ نمونه مواد لبنی از نظر وجود لیستریا منوسایتوژنز و سایر لیستریاها مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ۱۲۰ نمونه آلودگی به لیستریا داشتند (۱۶/۶۶٪)، ۴۲ مورد مربوط به لیستریا اینوکوا (۳۵٪)، ۷۰ مورد مربوط به لیستریا منوسایتوژنز (۵۸/۳٪) و ۸ مورد مربوط به لیستریا سیلیگری (۶/۷٪) بود. در تحقیقی که توسط فاربر^۱ و همکارانش در انتاریو^۲ صورت گرفت، شیوع گونه های لیستریا ۱۲/۴٪ در شیر خام بود. همچنین لووت^۳ و همکارانش شیوع گونه های لیستریا در شیر خام را ۱۵-۵ درصد در ایالات متحده گزارش کردند (۳). در تحقیقاتی که در ایالات متحده، کانادا و اسکاتلند صورت گرفت، میزان جداسازی لیستریا منوسایتوژنز ۴/۲-۱/۳ درصد گزارش شد (۶، ۷، ۹).

مثبت و با R.equii منفی بودند؛ ولی لیستریا سیلیگری گزیلوز را تخمیر نموده در حالیکه لیستریا منوسایتوژنز از نظر تخمیر گزیلوز منفی است. ضمن اینکه لیستریا منوسایتوژنز بتا همولیز بوده و لیستریا سیلیگری همولیز بتای ضعیف دارد. در این طرح تست CAMP بجای تست آنتون بکار رفت که از نظر زمان و هزینه مقرون به صرفه بود. لیستریا اینوکوا نیز با منفی بودن تست CAMP با S.aureus و R.equii و عدم تخمیر مانیتول و عدم احیای نیترات شناسایی گردید. ضمن اینکه همولیز منفی است.

بعد از شناسایی گونه های لیستریا، تست آنتی بیوگرام روی محیط مولر هیتون آگار برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی صورت گرفت، بدین صورت که سوسپانسیونی از کشت خالص باکتری با کدورتی برابر با لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و با سواب استریل روی محیط مولر هیتون آگار در دو جهت مخالف و دور پلیت کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از این مدت قطر هاله های عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد و از روی جدول استاندارد، حساسیت و مقاومت تعیین گردید.

یافته ها

در این پژوهش ۷۲۰ نمونه مواد لبنی از کارخانجات و مراکز محلی تولید لبنیات جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت. از ۷۲۰ نمونه مواد لبنی مورد آزمایش ۱۲۰ مورد (۱۶/۶۶٪) آلوده و ۶۰۰ مورد (۸۳/۳۴٪) غیر آلوده بودند. جدول شماره ۱ انواع ماده لبنی و فراوانی آلودگی آنها را نشان می دهد (جدول شماره ۱). از ۱۲۰ مورد آلودگی با لیستریا، ۴۲ مورد مربوط به لیستریا اینوکوا (۳۵٪)، ۸ مورد مربوط به لیستریا سیلیگری (۶/۷٪) و ۷۰ مورد مربوط به لیستریا منوسایتوژنز (۵۸/۳٪) بودند. نمونه های لبنی که لیستریا منوسایتوژنز از آنها جدا گردید عبارت بودند از: شیر خام (۹۲/۸۵٪)، دوغ (۲/۸۵٪) و پنیر (۴/۳٪). همه سویه های لیستریا اینوکوا و لیستریا سیلیگری نیز از شیر خام جدا شدند. در تست آنتی بیوگرام، کلیه ایزوله ها به پنی سیلین، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، آمیکاسین، جنتامایسین و کانامایسین حساس بودند. در بین سویه های ایزوله شده یک سویه به استرپتومایسین و پنج سویه به اریترومایسین مقاوم بودند.

1. Farber
2. Ontario

3. Lovett

منوسایتوزن را دارا می باشد. لیستریا اینوکوا از مدفوع انسان و حیوان بدست می آید و غیر بیماری زا است (۵). بنابراین جداسازی آن از مواد لبنی آلودگی با مواد دفعی را نشان می دهد.

لیستریا سیلیگری نیز بطور وسیع در طبیعت پراکنده است و از سبزیجات و مدفوع حیوانات بدست می آید (۲). نکته ای که در این بررسی از اهمیت برخوردار است وجود لیستریا منوسایتوزن در شیر خام، دوغ و پنیر می باشد که دوغ و پنیر آماده مصرف می باشند و شیر خام در بسیاری از مناطق روستایی بدون جوشاندن و بدون پاستوریزه شدن مصرف می شود، که این مسئله بویژه در خانمهای باردار می تواند باعث مننژیت منتشر و سقط جنین گردد.

بنابراین شناسایی دامهای آلوده و جوشاندن و یا پاستوریزه نمودن مواد لبنی بویژه شیر خام در مناطقی که دامداری رواج دارد می تواند باعث جلوگیری از تلفات انسانی و کاهش زیانهای اقتصادی گردد.

References

1. Connie RM, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology , second edition. W.B. SANDERS Company, 2000: 382
- ۲- ادیب فر، پ. میکروبیشناسی پزشکی، تهران، نور دانش، ۱۳۸۰ ص: ۲۵۲
3. Ahrabi SS, Ergiiven S, GunalpA. Detection of listeria in raw and pasteurized milk. Centr. Eur. J. Publ. Hlth 6,1998; 3 :254-255
4. Fenlon DR, Wilson J, and Donachie W. The incidence and level of Listeria monocytogenes contamination of food sources at primary production and initial pricessing. Journal of Applied Bacteriology 1996; 81: 641-650
5. Joklik, Willett, Amos and Wilfert. Zinsser microbiology 20th Ed. Appleton and Longe. Norwalk, California 1992: 480
6. Lovett J, Francis DW, Hunt JM. Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J Food Prot 1987; 50: 188-192

همچنین در سال ۱۳۷۰ وند یوسفی و مرادی روی ۳۰۰ نمونه شیر خام، آلودگی لیستریا منوسایتوزن را بررسی کردند و ۳۴ نمونه مثبت (۱۲/۳٪)، بدست آوردند (۹). در سال ۱۳۷۱ صدر زاده روی ۳۷۳ نمونه پنیر که از شیر خام تهیه شده بود بررسی نموده و ۵ نمونه مثبت (۱/۳۴٪) از لیستریا منوسایتوزن بدست آورد (۱۰) و بالاخره در تحقیقی که توسط حسین خان ناظر روی ۲۰۰ نمونه شیر خام در سال ۱۳۷۷ صورت گرفت، ۱۵ نمونه مثبت (۷/۵٪) بدست آمد (۱۱). در این تحقیق که در خرم آباد لرستان صورت گرفت در مجموع ۷۲۰ نمونه ارسال شده به اداره نظارت بر مواد غذایی و بهداشتی استان لرستان، لیستریا منوسایتوزن (۹/۷۲٪)، لیستریا اینوکوا (۵/۸۳٪) و لیستریا سیلیگری (۱/۱۱٪) از کل نمونه ها را بخود اختصاص دادند. در این بررسی نشان داده شد که در بین فرآورده های لبنی، شیرخام بیشترین آلودگی به لیستریا

7. Farber JM, Sander GW, Malcomn SA. The presence of Listeria spp. In raw milk in Ontario. Can J Microbiol 1988; 34: 95-100
8. Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The occurrence of Listeria species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. Int. J. Food Microbiol 1991: 12: 197-206
- ۹- وند یوسفی ج، مرادی بیدهدندی س. بررسی لیستریا منوسایتوزن در شیرخام و پاستوریزه در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۱۷ زمستان ۱۳۷۱، صص: ۶۵-۵۷
- ۱۰- صدرزاده پ. وضعیت پنیرهای تازه و سفید ایران از نظر لیستریا منوسایتوزن، علوم و صنایع غذایی، شماره ۴ (زمستان ۱۳۷۱)، صص: ۳۳-۲۹
- ۱۱- خان ناظر ح، وندیوسفی ج، مرادی بیدهدندی س. بررسی میزان آلودگی شیر خام و پاستوریزه به دو روش کشت و ایمونوفلورسانس. مجله علمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز، شماره ۲۵، ۱۳۷۷، ص: ۵۴