

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

دکتر نور امیر مظفری^{*}، هما فروزش تهرانی^{*}، دکتر علیرضا سالک‌مقدم^{**}،
محمد روستائی^{***}، دکتر بهرام روادگر^{***}، منیژه قاسمی^{***}

^{*}گروه میکروپزشناسی و ویروس‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^{**}گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^{***}کارشناس آزمایشگاه میکروپزشناسی 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: در این مطالعه مقطعی، ۱۰۸۱ مورد ماده غذائی از نظر وجود باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مورد آزمایش قرار گرفتند. یافته‌ها از ۱۰۸۱ مورد ماده غذائی تحت آزمایش، ۲۶۵ مورد (۲۴/۵٪) آلوده به میکروبیهای خانواده انتروباکتریاسه بودند. ۲۰۳ مورد از انتروباکتریاسه‌هایی که قادر به تولید انتروتوکسین بودند (اشریشیاکلی ۱۰۲ مورد، انتروباکتر ۴۴ مورد، کلبسیلا ۳۰ مورد و سینتروباکتر فرونیدی 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٪ انتروتوکسین‌زندهای باکتریهای روده‌ای، لزوم نظارت بهداشتی دقیق‌تر بر محصولات غذائی توصیه می‌شود.

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

مقدمه

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

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 ۸۱-۶ میلیون مورد بیماری در سال باشد (۹).

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 یرسینیا انتروکولیتیکا نیز بوجود می‌آید (۳). هدف از پژوهش حاضر، بررسی وجود انتروتوکسین مقاوم به حرارت در نزد اشریشیاکلی و سایر انتروباکتریاسه‌هایی است که باعث آلودگی مواد غذایی مورد استفاده می‌گردند.

مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۱۰۸۱ نمونه ماده غذایی 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 غذایی، 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 غذایی، 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 plate 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 کلی‌فرم‌ها 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 شناسایی 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

این ارگانیسیم‌ها تحت عنوان باسیل‌های روده‌ای (enteric bacilli) نامیده می‌شوند (۷ و ۳). در این خانواده بعضی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های گاستروانتریت 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، Shardingier 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 غذایی 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 غذایی حائز اهمیت باشند، در نتیجه در آزمایش نمونه‌های مواد غذایی، جداسازی و تعیین تعداد آنها نیز مورد توجه قرار گرفت (۱۰). E.Coli بعنوان یک پاتوژن روده‌ای نیز حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری با مکانیسیم‌های مختلفی در ایجاد اسهال نقش دارد. یکی از این مکانیسیم‌ها تولید انتروتوکسین می‌باشد. ارگان هدف در انتروتوکسین E.Coli روده کوچک است که منجر به یک اسهال آبکی ناشی از ترشح آب و الکترولیت می‌گردد. توانایی تولید این توکسین بستگی به حضور پلاسمیدی دارد که ژن تولید انتروتوکسین را کد می‌نماید (۱۶ و ۱).

اشریشیاکلی تولیدکننده انتروتوکسین، دو نوع انتروتوکسین بوجود می‌آورد، انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) heat-labile enterotoxin که مشابه انتروتوکسین ویبریولا می‌باشد و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) heat-stable enterotoxin که شامل ST_{11} (Sta)، ST_{12} (Stb) است (۴ و ۲).

Sta قادر به ایجاد اسهال در انسان بوده، بطور محکم به رستپورهای اختصاصی روده متصل می‌شود و سپس سریعاً گوانیلات سیکلاز موجود در سلول‌های مخاطی روده را

یافته‌ها

در این مطالعه مقطعی، ۱۰۸۱ مورد ماده غذایی 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٪)، انتروباکترکلوکاه ۴۴ مورد (۲۱/۶۷٪)، کلبسیلا پنومونیه ۳۰ مورد (۱۴/۷۷٪) و سیتروباکترفروندی ۲۴ مورد (۱۲/۳٪) بودند.

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

جدول ۱- توزیع فراوانی مواد غذایی آلوده به انتروباکتریاسه‌های مولد

انتروتوکسین مقاوم به حرارت		
نوع ماده غذایی	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. مواد غذایی 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.

۰/۶٪ عصاره مخمر، ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر از محیط مورد نظرا 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 ۲۰۰-۳۰۰ rpm 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 ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون، محتویات ارلن بداخل لوله سریچ‌دار 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 سریچ دار منتقل گشته و برای تزریق به موش نوزاد آماده می‌گردید (۴).

روش *Suckling Mouse Assay*: نوزادان موشهای کوچک آزمایشگاهی ۲۵ روزه که وزنی معادل ۱/۷-۲ 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 ۱ ml 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).

بحث

آلودگی مواد غذایی در کشورهای در حال توسعه یکی از علل مهم ابتلاء به بیماریهای روده‌ای بوده و با توجه به امر مهم نظارت و کنترل مواد غذایی 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 غذایی 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 سنج (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 غذایی در مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی مشخص گردید که در حال حاضر ۷٪ از مواد غذایی آلوده به انتروتوکسینوژن باکتریهای روده‌ای می‌باشند و با توجه به آنکه باکتری‌هایی 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 غذایی 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 غذایی آماده به مصرف می‌باشند لزوم نظارت بیشتر بر تولید و عرضه این محصولات را یادآور می‌شود. در پایان از خانمها معصومه عسگری و لیلا کردفره چورلو به خاطر همکاری صمیمی‌شان، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- 1- Andrew G, et al. Test for Escherichia coli enterotoxin, using infant mice : Application in a study of diarrhoea 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 Livingstone. P:1001-15.
- 10- Marshall RT, Case RA, Ginn RE. Update on standard methods, for the examination of dairy products. *J Food Prot* 1987;50:711.

۱۱- آل یاسین مهناز، امیر مظفری نور، 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.