مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۸، آبان ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی کلستریدیوم پرفرنژنس دارای ژن آنتروتوکسین *cpe* در سبزیجات خشک باز و بسته‌بندی

صدیقه قورچیان: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی مواد غذایی، بخش میکروب‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

معصومه دورقی: دانشیار، بخش میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

عباس رحیمی فروشانی: استاد، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

محمد مهدی سلطان دلال: استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی/ بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

(*نویسنده مسئول). msoltandallal@gmail.com /soltanda@sina,tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ژن آنتروتوکسین (*cpe*) در *کلستریدیوم پرفرنژنس* عامل گاستروانتریت و مسمومیت‌های غذایی است. سبزیجات خشک محل مناسبی برای ماندگاری این باکتری به دلیل داشتن اسپور که به شرایط سخت محیطی مانند دما، کمبود آب و غیره مقاوم هستند، می‌باشند. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی *کلستریدیوم پرفرنژنس* ژن *cpa* در سبزیجات خشک از نظر ژن آنتروتوکسین (*cpe*) می‌باشد.

روش کار: در یک مطالعه توصیفی طی شش ماه در سال ۱۳۹۵، تعداد ۱۴۰ نمونه سبزی خشک شامل ۷۰ نمونه باز و ۷۰ نمونه بسته‌بندی از نواحی مختلف شهر تهران بررسی شدند. پس از مرحله غنی‌سازی سبزیجات در محیط تایو گلیکولات، کشت روی محیط اختصاصی SPS سولفیت پلی میکسین سولفادیازین انجام شد. پس از شناسایی کلنی‌ها و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، وجود *کلستریدیوم پرفرنژنس* و ژن آنتروتوکسین به روش Duplex PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *cpa* و *cpe* تعیین هویت شدند.

یافته‌ها: از میان ۱۴۰ نمونه مورد بررسی، ۱۳ جدایه (۹٪/۳) از نظر فنوتیپی به عنوان *کلستریدیوم پرفرنژنس* شناسایی شد که تمام آن‌ها از لحاظ ژن *cpa* نیز مثبت بودند. هر ۱۳ جدایه شناسایی شده از لحاظ ژن *cpe* منفی بود. میزان آلودگی سبزیجات بسته‌بندی شده (۱۲٪/۸) بیش از سبزیجات باز بود (۵٪/۷).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که آلودگی در سبزیجات خشک با *کلستریدیوم پرفرنژنس* به خصوص در نوع بسته‌بندی وجود دارد و این آلودگی ممکن است در طی پروسه خشک کردن و بسته‌بندی اتفاق بیافتد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی تهران

کلیدواژه‌ها

کلستریدیوم پرفرنژنس،

انتروتوکسین،

سبزی خشک،

PCR

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۰۸

شیوه استناد به این مقاله:

Ghorchian S, Douraghi M, Rahimiforoushani A, Soltan Dallal MM. Isolation and identification of cpe-positive Clostridium perfringens in bulk and packed dehydrated vegetables. Razi J Med Sci. 2019;26(8):23-30.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(8):23-30. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Isolation and identification of cpe-positive Clostridium perfringens in bulk and packed dehydrated vegetables

Sedigheh Ghorchian, MSc, Division of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Masoumeh Douraghi, Associate Profesor, Division of Medical Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Abbas Rahimiforoushani, Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of PublicHealth, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Mohammad Mehdi Soltan Dallal, Professor, Food Microbiology Research Center / Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. msoltandallal@gmail.com

Abstract

Background: The enterotoxin (cpe) gene in *C. perfringensis is* responsible for food poisoning and gastroenteritis. The dried vegetables are suitable environment for spore forming bacteria such *C.perfringensis*, because of spore resistance against harsh environments such as temperature, dehydrate etc. The aim of this study was to isolate and identify *cpe*-positive *C. perfringens* in dried vegetable.
Methods: In a descriptive study, 140 samples including 70 bulk and 70 packed dried vegetables collected from various part of Tehran were tested. At first samples were inoculated in thioglycolate as enrichment medium, and then cultured into sulfite polymyxin sulfadiazine (SPS).
The colonies were identified by phenotypic and biochemical tests and Duplex PCR was carried out for detection of alpha toxin (*cpa*) and enterotoxin (*cpe*) genes.
Results: Out of 140 tested samples 13 samples (9.3%) were identified as *C. perfringens* in which all of them were positive for cpa but negative for cpe gene. The rate of contamination of packed vegetables was 12.8% whereas 5.7% for bulk.
Conclusion: The result of this study showed that *C. perfringens* contaminations in dried packed vegetables is possible, and that might happen during drying and packaging possess.

Conflicts of interest: None
Funding: Tehran University of Medical Sciences

Keywords
Clostridium perfringens,
cpe gene,
Enterotoxin,
Food poisoning,
PCR

Received: 08/06/2019
Accepted: 28/09/2019

Cite this article as:
Ghorchian S, Douraghi M, Rahimiforoushani A, Soltan Dallal MM. Isolation and identification of cpe-positive Clostridium perfringens in bulk and packed dehydrated vegetables. Razi J Med Sci. 2019;26(8):23-30.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنژنس یک باسیل گرم مثبت اسپوردار است که به عنوان فلور نرمال دستگاه گوارش می‌باشد. در شرایط مساعد به سرعت رشد و تکثیر کرده و توکسین‌ها و آنزیم‌هایی ترشح می‌نماید که باعث بیماری‌های گوارشی شدید می‌شوند. آلفا توکسین تقریباً توسط همه استرین‌های این باکتری تولید می‌شود و نقش اصلی در عفونت‌های گانگرن گازی، عفونت‌های روده و مسمومیت غذایی در انسان را دارد. این توکسین همچنین نقش مهمی را درچندین بیماری حیوانات به عهده دارد که شامل انتروتوکسمیا در گاوها، دیسانتری کلستریدیایی در بره‌ها، مرگ ناگهانی هموراژیک در گوساله‌ها در طی تغذیه و انتریت نکروزه در جوجه‌ها می‌شود (۱و۲). تایپ‌های B، C، D، و E به‌طور وسیعی در دستگاه گوارش حیوانات و انسان وجود دارد و باعث بیماری‌های روده‌ای در انسان و حیوانات می‌شود. در حیوانات هر ۵ تایپ سبب انتریت و انتروتوکسمیا می‌گردد (۳). به خاطر تولید بیش از ۱۵ توکسین،کلستریدیوم پرفرنژنس قادر است در انسان و حیوانات بیماری‌های گوارشی و توکسیک ایجاد نماید (۴). بیشترین تایپی که در انسان ایجاد بیماری می‌کند تایپ A کلستریدیوم پرفرنژنس است (۲). اسهال اسپورادیک یا اسهال وابسته به آنتی‌بیوتیک و مسمومیت غذایی در اثر تایپ A یا C ایجاد می‌گردد، درحالی‌که انتریت نکروزه توسط تایپ D ایجاد می‌گردد (۵). مسمومیت غذایی با نوع حاد و اغلب با منبع پیچیده، در اثر کلستریدیوم پرفرنژنس می‌باشد. دو نوع مختلف از مسمومیت غذایی که یک نوع مربوط به تایپ A یا نوع کلاسیک که دارای علائم متوسطی است و در دنیای صنعتی خیلی معمول است، و نوع دیگر که نادر است به تایپ C مربوط می‌شود و بیمار دچار انتریت نکروزه شدید می‌شود.

ژن *cpa* برای تعیین هویت و شناسایی جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس به کار می‌رود و ژن *cpe* برای بررسی انتروتوکسین جدایه‌ها می‌باشد. ژن انتروتوکسین یک کپی از تک زنجیره ناحیه بسیار متغیر کروموزوم می‌باشد که روی ترانسپوزون قرار دارد و بیشتر در ایزوله‌های مسمومیت‌های غذایی در بین دو ناحیه محافظت شده ژن‌ها قرار گرفته است (ژن *cpe* روی کروموزوم یا پلاسمید حمل می‌شود). استرین‌هایی که این ژن را بر روی کروموزوم حمل می‌نمایند در مسمومیت غذایی نقش دارند و جدایه‌هایی که این ژن را بر روی پلاسمید حمل می‌نمایند در بیماری‌هایی مانند اسهال وابسته به آنتی‌بیوتیک و اسهال تک‌گیر و سندرم مرگ ناگهانی نوزادان دخالت دارند (۲ و ۳).

مسمومیت غذایی با تایپ A به خاطر تولید شدن انتروتوکسین *cpe* می‌باشد. آنتروتوکسین در روده کوچک بعد از هضم غذای حاوی 10^7 کلستریدیوم پرفرنژنس ایجاد می‌شود. در حدود ۱۲-۸ ساعت (۶ و ۷) ساعت بعد از خوردن غذای آلوده علائم حاد، درد شکم، اسهال و استفراغ شروع می‌شود. غذای آلوده تقریباً همیشه خوب حرارت داده نمی‌شود، به‌طوری فقط سلول رویشی از بین می‌رود و فرم اسپوری در غذا باقی می‌ماند. مسمومیت غذایی با تایپ C در دنیای صنعتی امروز به ندرت دیده می‌شود و در دهه گذشته در اروپا دیده شده است. زمان انکوبه ۶-۵ ساعت و علائم با شکم درد شدید ناگهانی و اسهال (اغلب خونی) و گاهی با تهوع می‌باشد که منجر به التهاب نکروزه در روده کوچک می‌شود. اگر درمان صورت نگیرد کشنده و میزان مرگ ۲۵-۱۵ درصد حتی بعد از درمان نیز دیده می‌شود. علت اصلی بیماری به خاطر بتا توکسین همراه با دلتا و تتا توکسین می‌باشد (۸ و ۹).

تانگ و همکاران روی ۱۳۱ نمونه غذایی که شامل سبزیجات خشک نیز بود کار کردند و توانستند با روش PCR کلستریدیوم پرفرنژنس را جدا کنند. ۴۰ جدایه به دست آمده همگی دارای ژن *cpa* بودند ولی هیچ کدام از جدایه‌ها دارای ژن *cpe* نبودند (۱۰). کلبوسکا و همکاران ۲۶ نمونه سیر خشک شده را از نظر انواع کلستریدیوم‌های پروتئولیتیک و ساکارولیتیک بررسی نمودند که در نهایت ۲۲ سویه کلستریدیوم جدا گردید (۱۱).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

کلستریدیوم پرفرنژنس در سبزیجات خشک از نظر ژن آنتروتوکسین (*cpe*) می‌باشد.

روش کار

نمونه گیری از ماه فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. تعداد ۱۴۰ نمونه سبزی خشک برگدار شامل شوید، ترخون، نعناع، جعفری، گشنیز، قورمه و آش که ۷۰ نمونه سبزی خشک به صورت باز و ۷۰ نمونه سبزی خشک به صورت بسته‌بندی از ۱۰ شرکت مختلف از سطح شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نظر جداسازی و شناسایی کلستریدیوم پرفرنژنس بر اساس استاندارد ۲۱۹۷ مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۲).

شناسایی کلستریدیوم پرفرنژنس

برای شناسایی لازم است ابتدا رقت مورد نظر از نمونه سبزی خشک تهیه شود. برای رقت ۰/۱، ۱۰ گرم از سبزی خشک را در شرایط استریل وزن نموده و ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتونه به آن افزوده شد. برای تهیه رقت‌های بعدی (۰/۰۰۱-۰/۰۱) یک میلی‌لیتر از رقت قبلی وارد ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه گردید. بر اساس استاندارد 2197 حد مجاز میکروبی برای 10^2cfu/g برای هر یک گرم سبزی به کار برده شده است.

غنی‌سازی: محیط تایو گلیکولات (Oxoid) محیط غنی کننده این باکتری می‌باشد که طبق دستورالعمل سازنده تهیه شد. از ویژگی‌های کاربرد محیط‌های غنی کننده، افزایش شانس جداسازی باکتری در نمونه است. دو لوله که هر یک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر تایو گلیکولات می‌باشد، استفاده شد و به هرکدام به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ اضافه شد. یک لوله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و لوله دیگر بدون شوک حرارتی درون جار بی‌هوازی گذاشته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یا ۴۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت و جداسازی: محیط انتخابی مورد استفاده برای جداسازی کلستریدیوم پرفرنژنس از مواد غذایی (SPS) سولفیت پلی میکسین سولفودیازین می‌باشد. افتراق ارگانیسم بر روی محیط SPS agar (*Scharlau*) بر اساس احیاء سولفات به سولفیت می‌باشد که کلنی و گاهی محیط را به رنگ سیاه درمی‌آورد. سولفودیازین مانع رشد کلی‌فرم‌ها، پروتئوس و پسودوموناس‌ها می‌شود و پلی میکسین نیز مانع رشد باکتری‌های گرم منفی می‌شود (شکل ۱).

پس از ۴۸ ساعت نگهداری کردن غنی کننده، از محیط غنی شده، شوک داده شده و بدون شوک حرارتی به اندازه ۳-۲ قطره بر روی پلیت SPS کشت خطی داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ یا ۴۴ در جه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. کلنی‌های سیاه با هاله یا بدون هاله به عنوان مشکوک به کلستریدیوم پرفرنژنس برای آزمایش‌های فنوتیپی انتخاب شد. از کلنی‌های مشکوک رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و در زیر میکروسکوپ باسیل‌های گرم مثبت بررسی شدند. چندین کلنی سیاه از نظر احیاء نیترات، مصرف ژلاتین، همولیز دوبل بر روی محیط بلادآگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، حرکت روی SIM، تولید لسیتیناز بر روی محیط Egg yolk agar، تولید اسید از قند لاکتوز و گلوکز بررسی شدند. تمامی محیط‌ها از شرکت Merck تهیه شده بودند (شکل ۲).

شکل ۱- کلنی‌های کلستریدیوم پرفرنژنس روی محیط SPS

شکل ۲- کلستریدیوم پرفرنژنس لسیتیناز مثبت روی محیط Egg yolk agar

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده

ژن هدف	توالی نوکلئوتیدی (5′-3′)	Bp	روش PCR	منبع
cpa	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CC TCTGATACATCGTGTAA	۳۲۴	Duplex PCR	(۱۳)
cpe	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAG TTGTAGATA	۲۳۳	Duplex PCR	(۱۳)

استخراج DNA: نمونه مناسب برای PCR کلنی تازه باکتری می‌باشد که بر روی محیط جامد بدون رنگ و یا محیط مایع کشت داده شده و ۱۸ تا ۲۴ ساعت بیشتر از انکوباسیون آن نگذشته باشد. سپس یک کلنی خالص از باکتری را در محیط SPS کشت داده و پس از انکوباسیون، از کشت حاصله، رسوب تهیه کرده و با استفاده از فنل کلروفرم به استخراج ژنوم پرداخته می‌شود. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفته شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- برای استفاده‌های بعدی فریز شد (۱۳).

روش انجام PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) یا PCR ، تکنیکی است که با استفاده از آن می‌توان در مدت زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون‌ها بار تکثیر نمود. این قطعه DNA ممکن است یک ژن، بخشی از یک کروموزوم یا بخش‌هایی از ژنوم یک موجود باشد.

مواد واکنش PCR: تکثیر توالی در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل آب مقطر و غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار MgCl2، بافر ۱x، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۲۵ میلی مولار پرایمر Forward، ۰/۲۵ میلی مولار پرایمر Reverse، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq پلیمراز و ۱۰ نانوگرم DNA انجام شد.

برنامه PCR برای ژن *cpa* و *cpe*: ژن *cpa* برای تائید جنس کلستریدیوم پرفرنژنس و ژن *cpe* برای تأیید انتروتوکسین مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه PCR شامل یک حرارت اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل متشکل از حرارت ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab Germany) انجام گرفت. از نمونه سوش استاندارد کلستریدیوم پرفرنژنس ۱۰۶۱۵۷ PTTC: (دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) واجد ژن *cpa* و *cpe* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد و در ولتاژ ۱۰۰-۸۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر توسط دستگاه ژل داک مشاهده و عکس برداری گردید. دناتوره اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دناتوره ۹۴ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه، انیلینگ ۵۵ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه، طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد سه دقیقه و طویل سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه استفاده شد (جدول ۱).

آنالیز آماری: پس از گردآوری داده‌ها و ورود آن به نرم افزا SpSS نسخه ۲۰ با استفاده از شاخص Odds Ratio و فاصله اطمینان ٪ ۹۵ ارتباط بین وجود باکتری و نوع بسته‌بندی آزمون گردید.

یافته‌ها

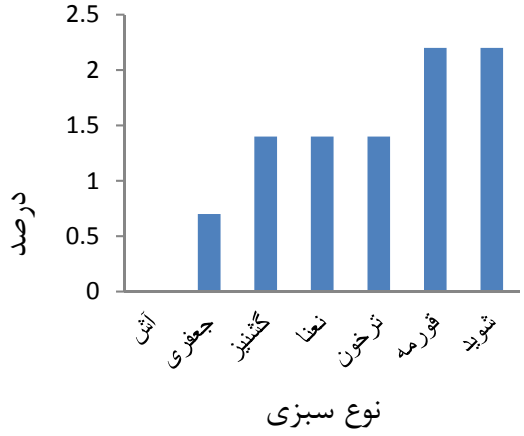
پس از رشد باکتری روی محیط کشت اختصاصی، کلنی‌هایی که از نظر مصرف نیترات، آزمایش لسیتیناز، همولیز دو گانه، فقدان حرکت در SIM، مصرف قند گلوکز و لاکتوزمثبت بودند، به عنوان کلستریدیوم پرفرنژنس شناسایی شدند.

از میان ۱۴۰ نمونه (سبزی خشک باز و بسته‌بندی) مورد مطالعه، ۱۳ جدایه (۹٪/۳) شناسایی شد. میزان جداسازی کلستریدیوم پرفرنژنس از ۷۰ نمونه سبزی خشک بسته‌بندی شده ۹ جدایه (۱۲٪/۸) و از ۷۰ نمونه سبزی باز ۴ جدایه (۵٪/۷) بود (نمودار ۱ و جدول ۲).

جهت مقایسه باکتری کلستردیوم پرفرنژنس در دو گروه نمونه‌های سبزی خشک بسته‌بندی و باز از شاخص OR استفاده گردید، که نتایج آن در جدول شماره ۱ آمده است و نشان می‌دهد که OR=۲/۴۳ می‌باشد، یعنی شانس وجود باکتری در نمونه‌های بسته‌بندی ۲/۴۳ برابر همان شانس در نمونه‌های باز

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

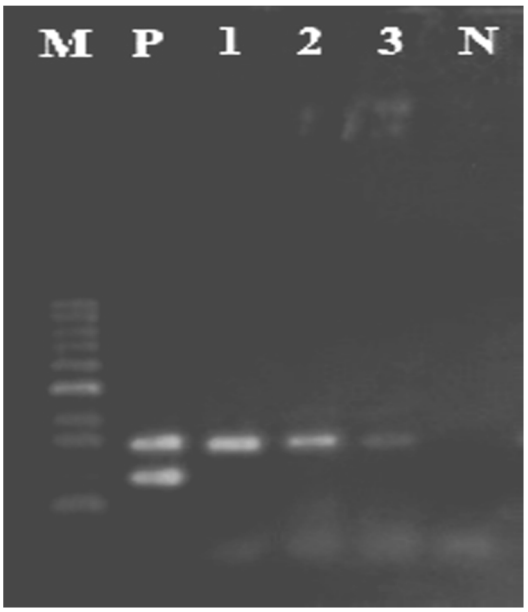


نمودار ۱- توزیع *کلستریدیوم پرفرنژنس* در میان انواع سبزی

جدول ۲- توزیع *کلستریدیوم پرفرنژنس* بر حسب نوع بسته بندی

نوع بسته بندی	باکتری کلستردیوم پرفرنژنس		تعداد	OR=۲/۴۳
	+	−		
بسته بندی	۹	۶۱	۷۰	فاصله اطمینان ۹۵٪
باز	۴	۶۶	۷۰	(۱/۳ و ۵/۲)
جمع	۱۳	۱۲۷	۱۴۰	

می‌باشد. چون فاصله اطمینان عدد یک را در بر نمی‌گیرد بنابراین نوع بسته‌بندی با وجود باکتری ارتباط معناداری دارد.



شکل ۳- الکتروفورز حاصل از Duplex PCR ژن *cpa* و *cpe* M مارکر مولکولی ۱۰۰bp، P جدایه کلستریدیوم پرفرنژنس ۱۰۶۱۵۷ واجد ژن *cpa* و *cpe*، N کنترل منفی (فاقد DNA ژنومی)، ۳-۱ جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس جدا شده از سبزیجات خشک واجد ژن *cpa* (324bp) و فاقد ژن *cpe* (233bp)

در ۱۰۰٪ جدایه‌ها با توجه به باند ۳۲۴ جفت بازی در روش Duplex PCR دارای ژن *cpa* و به عنوان کلستریدیوم پرفرنژنس تأیید شدند، اما هیچ یک از جدایه‌ها دارای ژن *cpe* نبودند.

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم نبود آب در سبزیجات خشک برخی از باکتری‌ها به خصوص اسپوردارها قادر به رشد و تکثیر در سبزیجات می‌باشند. مطالعات زیادی در مورد جداسازی، تیپ بندی و بررسی ژن‌های مختلف توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنژنس در سراسر جهان انجام شده است، اما در مورد مواد غذایی و خصوصاً سبزیجات خشک مطالعات محدودی صورت گرفته است. سبزیجات خشک به روش‌های مختلفی استفاده می‌شوند و آلودگی میکروبی این سبزیجات احتمالاً می‌تواند بیماری ایجاد نماید، به خصوص اگر در پایان پخت به غذا اضافه شوند یا روی غذا بدون پخت و حرارت اضافه شوند. به خاطر زنده ماندن اسپور در حرارت ناکافی و ماندن غذا در دمای اتاق به مدت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

طولانی و ذخیره نادرست، خطر مسمومیت با این پاتوژن وجود دارد. علی‌رغم فراوانی پایین سویه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس *cpe* مثبت در محصولات غذایی به خصوص گوشت و مرغ و سبزیجات خشک که به میزان کمتر وجود دارند، این مواد غذایی به عنوان منبعی برای تولید توکسین هستند و می‌توانند طغیان‌های غذایی ایجاد نمایند.

در این پژوهش ۹/۳٪ سبزیجات خشک به کلستریدیوم پرفرنژنس آلوده بودند که این امر احتمالاً حاکی از بقاء باکتری در سبزیجات می‌باشد. وجود اسپور در این باکتری از یک سو و وفور اسپور در محیط از سوی دیگر و مقاومت اسپور به شرایط خشکی، دما و عوامل می‌تواند در ایجاد مسمومیت نقش داشته باشد. مطالعه ساگو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی سبزی خشک و ادویه‌ها در اروپا نشان داد که از ۱۳۲ نمونه (۰/۴٪) آلودگی کلستریدیوم پرفرنژنس وجود داشت (۱۴). در مطالعه سوسپدرا و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۵۳ نمونه سبزیجات خشک و ادویه‌ها بررسی شد و آن‌ها ۱۰٪ آلودگی با باکتری‌های هوازی و ۲۰٪ آلودگی انتروباکتریاسه را گزارش نمودند، ولی آلودگی به باکتری‌های اسپوردار (کلستریدیوم و باسیلوس) یافت نشده بود که این امر می‌تواند به دلیل نبود امکانات کافی، نحوه عدم شناسایی باکتری‌های اسپوردار و بی‌هوازی باشد. مناسب پروسه خشک کردن، بسته‌بندی و یا شرایط آب و هوایی منطقه جغرافیایی ارتباط داشته باشد که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت (۱۵).

تعداد جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس جدا شده از سبزیجات خشک بسته‌بندی بیشتر از سبزیجات باز بود که این امر می‌تواند به دلیل بی‌هوازی بودن باکتری باشد. چرا که در سبزی بسته‌بندی شده ممکن است شرایط بی‌هوازی برای رشد و تکثیر باکتری فراهم شود. علاوه بر این، نامطلوب بودن شرایط پروسس سبزیجات در کارخانه‌ها، رعایت نکردن نکات بهداشتی در حین شستشو یا جابه‌جایی بسته‌بندی ازجمله دلائل دیگر باشد.

جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس جدا شده از نمونه‌های سبزیجات خشک از لحاظ ژن آلفا توکسین و انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند و همچنین برای ۱۳ جدایه که از نظر تست های بیوشیمیایی تأیید شده بودند، Duplex PCR انجام شدکه همه جدایه‌ها از لحاظ ژن *cpa* مثبت و از لحاظ ژن *cpe* منفی بودند. ژن *cpa* برای تعیین هویت و شناسایی جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس به کار می‌رود و ژن *cpe* برای بررسی انتروتوکسین جدایه‌ها می‌باشد. ۱۰۰٪ جدایه‌ها در مطالعه حاضر، *cpa* مثبت اما از لحاظ *cpe* منفی بودند.

اگر چه پژوهشی بر روی سبزیجات خشک در ایران انجام نشده است، اما روی فرآورده های گوشتی ازجمله گوشت طیور پژوهش هایی شده است. در مطالعه پور سلطانی و همکاران در ۲۰۱۴ بر روی ۱۸۰ نمونه گوشت مرغ بسته‌بندی شده، ۶ جدایه کلستریدیوم پرفرنژنس به دست آمد. برای تایپ بندی کلستریدیوم از روش Multipelex PCR و Single PCR ژن *netB* و tpeL برای آنتریت نکروزان در طیوراستفاده کردند (۱۶). درمطالعه ای دیگر در ایران زندی و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی ۱۲۰ نمونه مدفوع شتر مرغ کار کردند و با روش Multiplex PCR نشان دادند که ۱۰۰٪ جدایه‌ها از نظر آلفا توکسین مثبت بودند که تا به حال در ایران گزارش نشده بود. در مطالعه حاضر از روش Duplex PCR استفاده شد که نیازی به مقدار زیاد انتروتوکسین و اسپور زایی در شرایط آزمایشگاه ندارد (۱۷). در مطالعه ارول و همکاران در ۲۰۰۸ از روش Multiplex PCR روی ۱۸۰ نمونه گوشت بوقلمون، ۲۲ جدایه کلستریدیوم پرفرنژنس جدا کردند که ژن *cpa* در همه ایزوله ها مثبت بود، اما ژن *cpe* در همه ایزوله‌ها منفی شد (۱۸). یافته های مطالعه حاضر همانند ارول، دارای ژن *cpa* و فاقد ژن *cpe* بودند. این یافته‌ها نشان می‌دهد در نمونه‌های گوشتی هم ممکن است سویه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس بدون ژن آنتروتوکسین وجود داشته باشند.

پژوهش حاضر نشان داد علی‌رغم انتظار خریداران بر استفاده از مواد غذایی بسته‌بندی به جهت اطمینان بیشتر از بهداشتی بودن ماده غذایی، باکتری‌های بی‌هوازی به دلایل فیزیولوژیک در شرایط بسته‌بندی رشد بیشتری نسبت به شرایط غیر بسته‌بندی دارند. میزان آلودگی سبزیجات خشک بسته‌بندی شده نسبت به سبزیجات خشک باز، احتمالاً نشان دهنده رعایت نکردن شرایط بهداشتی در پروسه خشک کردن و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]

بسته‌بندی می‌باشد. به نظر می رسد در نوع بسته‌بندی شده باکتری بی‌هوازی مواجهه کمتری با اکسیژن دارد و شرایط برای رشد و نمو باکتری بهتر فراهم می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله با کد اخلاقی IR.TUMS.REC.1394.775 نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی موادغذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۸۴۳۹ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

References

1. Brynestad S, Granum PE. Clostridium perfringens and foodborne infections. Int J Food Microbiol; 2002 Apr 5.74(3):195-202.

2. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning. Food Microbiol; 2011 Apr.28(2):192-8.

3. Miyamoto K, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic Clostridium perfringens: detection and identification. Microbes Environ; 2012.27(4):343-9.

4. Lebrun M, Mainil JG, Linden A. Cattle enteroto-xaemia and Clostridium perfringens: description, diagnosis and prophylaxis. Vet Rec; 2010 Jul 3.167(1):13-22.

5. Juntermanns B, Radunz S, Heuer M, Vernadakis S, Reis H, Gallinat A, et al. Fulminant septic shock due to Clostridium perfringens skin and soft tissue infection eight years after liver transplantation. Ann Transplant; 2011 Jul-Sep.16(3):143-6.

6. Grass JE, Gould LH, Mahon BE. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by Clostridium perfringens, United States, 1998–2010. Foodborne Pathog Dis; 2013 Feb.10(2):131-6.

7. Miyamoto K, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic Clostridium perfringens: detection and identification. Microbes Environ; 2012.27(4):343-9.

8. Ghoneim NH, Hamza DA. Epidemiological studies on Clostridium perfringens food poisoning in retail foods. Rev Sci Tech; 2017 Dec.36(3):1025-32.

9. Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. Enterotoxic Clostridia: Clostridium perfringens Enteric Diseases. Microbiol Spectr; 2018 Sep.6(5).

10. Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of Clostridium perfringens isolates from retail foods in the United States. Appl Environ Microbiol; 2003.69(3):1642-6.

11. Kłębukowska L, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Microbiological contamination of dried and lyophilized garlic as a potential source of food spoilage. J Food Sci Tech; 2013.52(3):1802-7.

12. Institute of Standards and industrial Research of Iran (ISIRI). 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of Clostridium perfringens Colony-count technique. ISIRI No. 2197, 1st revision, Karaj: Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 18 P.

13. Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H. Clostridium perfringens A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. J Clin Microbiol; 2008 Jan.46(1):371-3.

14. Sagoo SK, Little CL, Greenwood M, Mithani V, Grant KA, McLauchlin J, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. Food Microbiol; 2009 Feb.26(1):39-43.

15. Sospedra I, Soriano JM, Mañes J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs c ommercialized in Spain. Plant Foods Hum Nutr; 2010 Dec.65(4):364-8.

16. Poursoltani M, Mohsenzadeh M, Razmyar J. Toxinotyping of Clostridium perfringens strains isolated from packed chicken portions. Iran J Med Microb; 2014.8(1):9-17.

17. Zandi E, Mohammadabadi M, Ezzatkhah M, Esmailizadeh A. Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iranian J Appl Anim Sci; 2014.4(4):795-801.

18. Erol I, Goncuoglu M, Ayaz ND, Bilir Ormanci FS, Hildebrandt G. Molecular typing of Clostridium perfringens isolated from turkey meat by multiplex PCR. Lett Appl Microbiol; 2008 Jul.47(1):31-4.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.8.6.0]