

شناسایی ملکولی کلستریدیوم پرفرینجنس در تعدادی از مواد غذایی با منشا خام دامی در شهر کرد، ۱۳۹۳

دکتر امیر شاکریان^۱، دکتر ابراهیم رحیمی^۱، دکتر جمال مصباح^۲، دکتر محمد موسوی^۲

چکیده

زمینه و هدف: کلستریدیوم پرفرینجنس یکی از عوامل اصلی بروز مسمومیت‌های غذایی در انسان در سراسر جهان است. این بررسی برای تشخیص و ردیابی توکسین‌های باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس در تعدادی از مواد غذایی با منشا خام دامی انجام گرفت. روش بررسی: در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ نمونه از کشک‌های صنعتی و سنتی و ۴۳ نمونه از گوشت‌های گاو و گوسفند، از مراکز فروش شهرستان شهرکرد به روش تصادفی جمع‌آوری شد. برای شناسایی باکتری مورد نظر در نمونه‌ها، از روش‌های کشت و واکنش زنجیره ای پلی‌مراز استفاده شد.

یافته‌ها: هیچ نمونه مثبتی در روش کشت میکروبی از نمونه‌ها جداسازی نشد. با این وجود فراوانی باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس در نمونه‌های کشک صنعتی و سنتی، گوشت گاو و گوسفند به ترتیب ۶،۱۰،۲۵ و ۱۳ درصد با استفاده از روش PCR، گزارش گردید. فراوانی ژن‌های *etx* و *cpi*، *cpe*، *cpb*، *cpa* در فرآورده‌های کشک مذکور به ترتیب ۳۷/۵، ۲۵، ۷۵، ۱۲/۵ و ۱۲/۵ درصد و در گوشت‌ها به ترتیب ۶۲،۵۰، ۷۵/۵، ۳۷/۵ و ۲۵ درصد تشخیص داده شد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین میزان شیوع باکتری در نمونه‌های مختلف و توکسین‌های جداسازی شده از آنها بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به آلودگی این مواد غذایی به کلستریدیوم پرفرینجنس و انتقال آلودگی از مواد غذایی به انسان، کاهش آلودگی مواد غذایی به این باکتری از جنبه‌ی سلامت عمومی ضروری است.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنس، کشک، گوشت، واکنش زنجیره ای پلی‌مراز

دریافت مقاله: دی ۱۳۹۵

پذیرش مقاله: اردیبهشت ۱۳۹۶

*نویسنده مسئول:

دکتر امیر شاکریان؛

دانشکده دامپزشکی واحد شهرکرد دانشگاه

آزاد اسلامی

Email:

amshakerian@iaushk.ac.ir

^۱استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۲دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

مقدمه

تیپ های مختلف باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس روش های متفاوتی وجود دارد که اکثراً دشوار، زمان بر و پرهزینه هستند و از حساسیت و اختصاصیت پایینی نیز برخوردار هستند. یکی از این روش ها، آزمایش ختنی سازی توکسین در موش و خوکچه هندی است. این روش بسیار مشکل، وقت گیر و پرهزینه است، از طرفی انجام آن روی حیوانات آزمایشگاهی از نظر اخلاقی غیر قابل قبول است (۱۱ و ۱۰). در روش شناسایی پادتن های پلی کلونال به روش الایزا نیز برای تشخیص توکسین های کلستریدیوم پرفرینجنس مشکلاتی مانند ایجاد واکنش متقاطع بین پادتن ها و عدم شناسایی توکسین $\beta 2$ وجود دارد، لذا یکی از روش های جدید و سریع در شناسایی باکتری مذکور استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز است (۱۱ و ۱۲). هم چنین شناسایی سریع عوامل بیماری زا اساس کنترل بیماری هاست و تعیین ژنوتیپ این عوامل برای بررسی کامل و برنامه کنترلی مورد نیاز می باشد (۱۵-۱۳). از آنجایی که مصرف شیر و فراورده های آن و هم چنین گوشت و فراورده های گوشتی یکی از مهم ترین راه های تامین پروتئین روزانه جمعیت ایران می باشند و نکته حایز اهمیت این است که درصد بالایی از مصرف کنندگان شیر معمولاً کودکان، زنان باردار و افراد مسن هستند که نسبت به افراد عادی حساسیت بیشتری در ابتلا به بیماری دارند (۹ و ۱۶)، و از طرفی با افزایش مصرف گوشت و فراورده های آن، اهمیت کنترل بهداشتی این فراورده های پروتئینی را بیشتر مشخص می کند (۱۳). از این سو فراهم کردن غذای کافی همراه با رعایت مسایل بهداشتی آن همواره مدنظر پژوهشگران و تولید کنندگان بخش ذیربط بوده است، لذا این پژوهش باهدف شناسایی ملکولی کلستریدیوم پرفرینجنس در تعدادی از مواد غذایی با منشا خام دامی در شهرکرد در سال ۱۳۹۳ صورت پذیرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی مقطعی، در بهار و تابستان سال ۱۳۹۳، تعداد ۱۰۰ نمونه کشک صنعتی و سنتی (شامل ۵۰ نمونه صنعتی، ۵۰ نمونه سنتی) و هم چنین ۴۳ نمونه گوشت (شامل ۲۰ نمونه عضله ران گاو و ۲۳ نمونه عضله ران گوسفند) از مراکز فروش واقع در شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. نمونه ها در داخل لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک سترون قرار گرفتند و بلافاصله پس از نمونه گیری در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد منتقل شدند. نمونه ها در محیط کشت

کلستریدیوم پرفرینجنس باسیلی گرم مثبت، غیرمتحرک، هاگ زا و بی هوازی بوده که چهار نوع توکسین اصلی شامل آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا تولید می کند و برهمن اساس به تیپ های A, B, C, D, E تقسیم می شود (۱ و ۲). کلستریدیوم پرفرینجنس در محدوده ای از اسیدیته در حدود ۵/۵ تا ۷ و در محدوده ای از حرارت در حدود ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس رشد می کند. این باکتری معمولاً در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد می کند اما درجه حرارت ۴۵ درجه سلسیوس دمای مناسب برای بسیاری از سوش ها بوده و مدت زمان تکثیر آن را به حدود ۱۰ دقیقه کاهش می دهد (۴ و ۳). انواع جنس های کلستریدیوم پرفرینجنس به عنوان یک عامل بیماری زا در روده ی انسان، حیوانات اهلی و وحشی شناخته می شود و هم چنین به طور معمول در مواد محیطی مثل خاک و آب وجود دارد (۵ و ۳). بررسی ها نشان داده اند که در دهه اخیر کمپیلوباکتر و سالمونلا بیشترین علت ایجاد مسمومیت های غذایی در انسان بودند و در مرتبه بعدی کلستریدیوم پرفرینجنس قرار دارد لذا به عنوان سومین عامل مسمومیت غذایی در آمریکا و انگلیس گزارش شده است و در ژاپن پنجمین یا ششمین بیماری زای منتقله از مواد غذایی محسوب می شود (۶ و ۵). این باکتری باعث ایجاد بیماری های مهمی مانند اسهال با منشا آنتی بیوتیکی، مسمومیت غذایی، اسهال تک گیر، قانقاریا و انتریت نکروتیک در انسان می شود. در میان تیپ های مختلف باکتری، تیپ A و C عامل ایجاد مسمومیت و عفونت های غذایی در انسان است. مسمومیت غذایی ایجاد شده توسط کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A اغلب خود بهبود شونده است ولی مسمومیت غذایی ناشی از کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ C سبب ایجاد انتریت نکروتیک در انسان می شود (۸ و ۷ و ۵). در مطالعه ای برای اولین بار Aras & Hadimli در ترکیه، حضور کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ E را در گوشت بوقلمون و تیپ C را در گوشت مرغ گزارش کردند (۲). در مطالعه ای دیگر توسط پورسلطانی و همکاران از تعداد ۱۸۰ نمونه بال، کتف و سنگدان مرغ ها تنها شش نمونه کلستریدیوم پرفرینجنس شناسایی شد (۸) و هم چنین آنها نشان دادند که ۱۰۰ درصد باکتری های جدا شده حاوی ژن های *cpa* و *cpb* بودند (۱). در تحقیق Tudor و همکاران بر روی پنیر و کشک های رومانی مشخص گردید میزان ۱/۸۶ درصد از نمونه ها آلوده به کلستریدیوم پرفرینجنس بودند (۹). برای تشخیص

استفاده شد (۱۵و۱). برای استخراج DNA، باکتری‌های رشد کرده در طول یک شب در محیط آب پپتونه که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شده بودند، به وسیله ی کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شد. سپس برای انجام واکنش PCR از جفت پرایمرهای طراحی شده براساس ردیف نوکلئوتیدی ژن 16SrRNA باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس، استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

پیش غنی کننده آب پپتونه قلیایی (مرک آلمان)، منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی هوازی گرم خانه گذاری شدند، آنگاه از محیط مذکور بر روی محیط اختصاصی سولفیت پلی میکسین-سولفادیازین (مرک آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی هوازی گرم خانه گذاری شدند (۱۵). از پرگنه های رشد کرده در محیط مورد نظر برای انجام آزمون های تکمیلی شامل رنگ آمیزی گرم، آزمون لسیتین، آزمون تخمیر در محیط شیرتورنسل، همولیز در محیط آگار خون دار، تخمیر گلوکز، لاکتوز، ساکارز و ژلاتیناز

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس و توکسین‌های باکتریایی در نمونه‌های کشت و گوشت

منابع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (5'-3')	ژن هدف
(۱۶)	۲۷۹	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	16S rRNA
(۱۷)	۹۰۰	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCTGGGTTGTCCATTTC	<i>cpa</i>
(۱۷)	۶۱۱	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTGTATCCCA	<i>cpb</i>
(۱۷)	۵۴۱	ACTGCAACTACTACTCATACTGTG CTGGTGCCCTAATAGAAAGACTCC	<i>cpe</i>
(۱۷)	۲۹۳	AAACGCATTAAGCTCACACC CTGCATAACCTGCAATGGCT	<i>cpj</i>
(۱)	۶۵۵	GCGGTGATACCAICTATTC CCACTTACTTGTCTACTAAC	<i>etx</i>

از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام پذیرفت. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه و نهایتاً یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۱۰ دقیقه بود (۱۷). به منظور ردیابی ژن *etx* باکتری حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود که شامل: ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase و ۲۰۰ میکرومول dNTP بود. برنامه‌ای حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه بود. سپس تمام نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن 16S rRNA مثبت بودند، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندتایی (Multiplex PCR) برای ردیابی توکسین های باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس که در جدول ۱ آمده اند، ارزیابی شد (۱۶). واکنش PCR چندتایی جهت ردیابی توکسین‌ها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR buffer 10X، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر

برای انجام آزمایش PCR برای تشخیص ژن 16S rRNA، از دستگاه (Eppendorf Germany Co.) Master cycler gradient استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR، ۳۰ میکرولیتر و شامل ۹۰ نانوگرم پرایمر، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۱۰ میلی مول تریس HCl، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۵۰ میلی مول KCl و ۱ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase بود. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه بود. سپس تمام نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن 16S rRNA مثبت بودند، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندتایی (Multiplex PCR) برای ردیابی توکسین های باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس که در جدول ۱ آمده اند، ارزیابی شد (۱۶). واکنش PCR چندتایی جهت ردیابی توکسین‌ها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR buffer 10X، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر

یافته ها

محصول PCR همراه با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و روی ژل ۱ درصد آگارز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (Fermentas) در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون‌های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل گردیدند.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که هیچ یک از نمونه‌های کشک صنعتی و سنتی و هم چنین نمونه های گوشت ران گوسفند و گاو مورد بررسی از نظر حضور زنده باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در روش کشت مثبت نبودند. در روش PCR، حضور باند اختصاصی به اندازه ۲۷۹ جفت باز در الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۱ قابل مشاهده است. نتایج نشان داد که به ترتیب ۸ درصد و ۱۸/۶ درصد

از نمونه های کشک و گوشت آلوده به کلاستریدیوم پرفرینجنس بودند. فراوانی باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در کشک های صنعتی و سنتی و گوشت گاو و گوسفند در جدول ۲ قابل مشاهده است. فراوانی حضور توکسین‌های باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه های کشک و گوشت در جدول ۳ قابل مشاهده است. درمورد حضور انواع ژن ها در نمونه های گوشتی، نتایج نشان داد که ژن *cpe* بیشترین فراوانی (۷۵٪) و ژن *etx* کمترین فراوانی (۲۵٪) را داشتند. بررسی های آماری نشان‌دهنده ی اختلاف معنی‌دار آماری برای میزان شیوع انتروتوکسین‌ها در نمونه‌ها بود ($P=0/031$). فراوانی انتروتوکسین‌های باکتری بین نمونه‌های گوشت گوسفند و گاو نیز اختلاف معنی‌دار آماری نشان دادند ($P=0/027$). در شکل های ۲ و ۳ نیز، به ترتیب الکتروفورز ژل آگارز توکسین ها و ژن *etx* کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه های کشک و گوشت قابل مشاهده می باشد.

جدول ۲: فراوانی مضمون باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه‌های کشک و گوشت جمع‌آوری شده در شهرکرد

نوع نمونه	تعداد نمونه اخذ شده	تعداد نمونه مثبت در کشت (%)	تعداد نمونه مثبت در PCR (%)
کشک صنعتی	۵۰	-	۳ (۶٪)
کشک سنتی	۵۰	-	۵ (۱۰٪)
گوشت گاو	۲۰	-	۵ (۲۵٪)
گوشت گوسفند	۲۳	-	۳ (۱۳٪)
کل	۱۴۳	-	۱۶ (۱۱/۱۹٪)

با توجه به نتایج جدول ۲، بیشترین فراوانی حضور کلاستریدیوم پرفرینجنس در فراورده های کشک مربوط به نمونه‌های کشک سنتی و کمترین فراوانی مربوط به نمونه‌های کشک صنعتی بوده

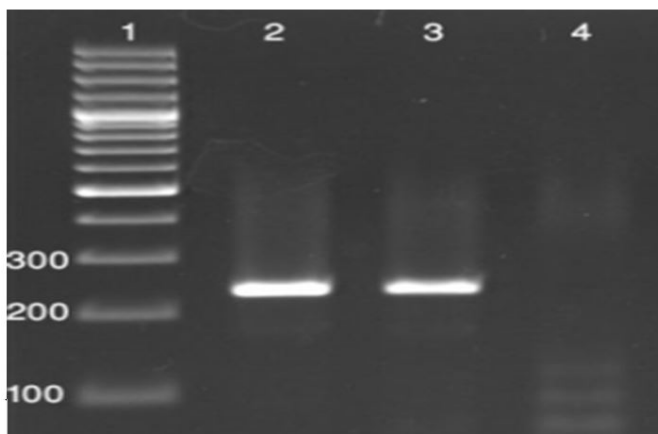
است ($P=0/033$). هم چنین بیشترین فراوانی حضور کلاستریدیوم پرفرینجنس در گوشت ها مربوط به نمونه‌های گاو و کمترین فراوانی مربوط به نمونه‌های گوسفند بوده است ($P=0/044$).

جدول ۳: فراوانی ژن های مولد انتروتوکسین‌های باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس (دیابی شده در نمونه‌های کشک و گوشت جمع‌آوری شده در شهرکرد)

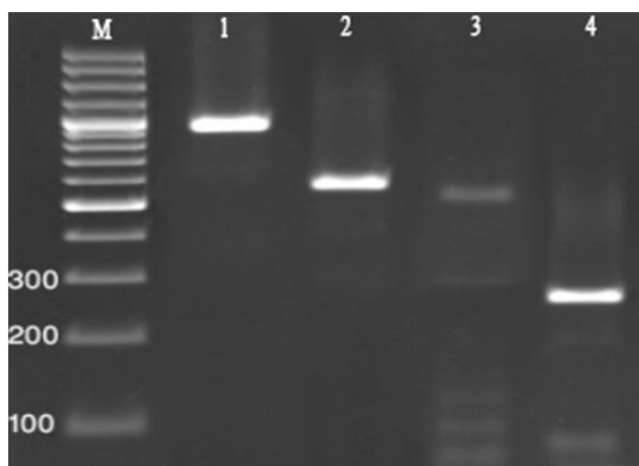
نوع نمونه	تعداد نمونه مثبت در روش PCR	فراوانی انتروتوکسین‌ها (%)				
		<i>etx</i>	<i>cpi</i>	<i>Cpe</i>	<i>Cpb</i>	<i>cpa</i>
کشک صنعتی	۳	۱ (۳۳/۳۳٪)	۱ (۳۳/۳۳٪)	۲ (۶۶/۶٪)	۱ (۳۳/۳۳٪)	۲ (۶۶/۶٪)
کشک سنتی	۵	-	-	۴ (۸۰٪)	۱ (۲۰٪)	۱ (۲۰٪)
گوشت گوسفند	۳	۱ (۳۳/۳۳٪)	۱ (۳۳/۳۳٪)	۲ (۶۶/۶٪)	۱ (۳۳/۳۳٪)	۲ (۶۶/۶٪)
گوشت گاو	۵	۱ (۲۰٪)	۲ (۴۰٪)	۴ (۸۰٪)	۳ (۶۰٪)	۳ (۶۰٪)
کل	۱۶	۲ (۱۲/۵٪)	۳ (۱۸/۷۵٪)	۶ (۳۷/۵٪)	۴ (۲۵٪)	۸ (۵۰٪)

نتایج جدول ۳، نشان دهنده ی حضور نسبتاً بالای ژن های مولد انتروتوکسین‌های باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه‌های مورد بررسی بودند. نتایج نشان داد که ژن *cpe* بیشترین فراوانی (۷۵٪) و ژن‌های *etx* و *cpi* کمترین فراوانی (۱۲/۵٪) را در نمونه های کشک

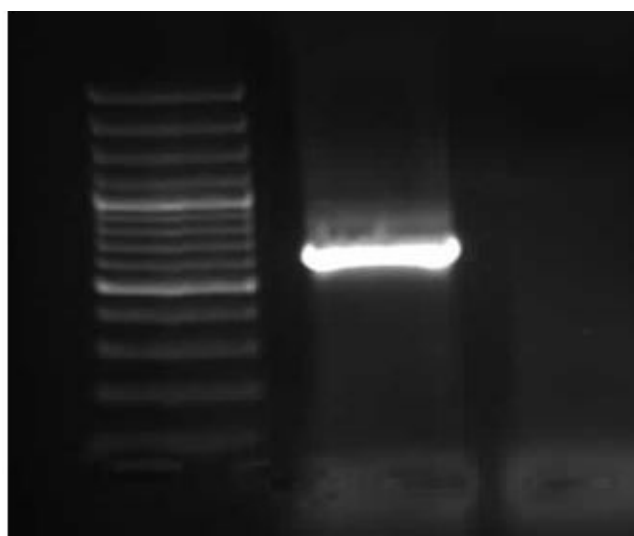
داشتند. بررسی‌های آماری نشان دهنده ی اختلاف معنی دار آماری برای میزان شیوع انتروتوکسین‌ها در نمونه‌ها بود ($P=0/023$). فراوانی انتروتوکسین‌های باکتری بین نمونه‌های کشک صنعتی و سنتی نیز اختلاف معنی دار آماری نشان دادند ($P=0/019$).



تصویر ۱: الکتروفورز ژل آگارز کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه های کشتک و گوشت در شهرکرد. خط ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، خط ۲: نمونه مثبت برای ژن 16S rRNA، خط ۳: کنترل مثبت و خط ۴ کنترل منفی می باشد



تصویر ۲: الکتروفورز ژل آگارز توکسین های کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه های کشتک و گوشت در شهرکرد. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی و خطوط ۱ تا ۴: نمونه های مثبت می باشند



تصویر ۳: الکتروفورز ژل آگارز ژن *etx* کلاستریدیوم پرفرینجنس در نمونه های کشتک و گوشت در شهرکرد. باند روشن معرف مضمور ژن مدت در باکتری است (اندازه باند ۶۵۵ جفت بازی)

بحث

مطالعات اندکی در مورد آلودگی فراورده های شیر و گوشتی به باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس در ایران مشاهده می شود. بررسی حاضر نشان داد که فراورده های شیر تولیدی شامل کشک ها به عنوان عاملی برای انتقال باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس به انسان مطرح هستند. هم چنین گوشت گاوها و گوسفندها به صورت خام، پتانسیل انتقال آلودگی به انسان را دارند. به هر حال هیچ کدام از نمونه ها آلودگی به کلاستریدوم پرفرینجنس با روش کشت میکروبی را نشان ندادند. با این وجود روش مولکولی استفاده شده در این بررسی نشان از حضور ژنوم باکتری در نمونه ها بود (جدول ۲). در نمونه های کشک صنعتی و سنتی بیشترین آلودگی مربوط به کشک های سنتی بود. احتمالاً دلیل اصلی بالا بودن میزان شیوع مولکولی کلاستریدوم پرفرینجنس در نمونه های کشک سنتی، به دلیل عدم رعایت موارد بهداشتی در این فراورده ها یا وجود هاگ های آن در شیر خام و عدم رعایت موارد بهداشت شیردوشی در گاوداری ها می باشد (۱۸). در بررسی در هند توسط Gurmu و همکاران، آلودگی شیر خام و فراورده های شیر را به کلاستریدوم پرفرینجنس به ترتیب ۱۰ درصد و صفر درصد گزارش کردند (۱۸). با توجه به اینکه تاکنون مطالعات بسیار اندکی در مورد حضور کلاستریدوم پرفرینجنس در فراورده های شیر در ایران و سایر کشورها وجود دارد، احتمالاً این بررسی اولین گزارش از حضور این باکتری در کشک های سنتی و صنعتی می باشد. بر اساس نتایج، آلودگی این فراورده ۸ درصد گزارش شد. در بررسی Grass و همکاران از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰ در ایالات متحده آمریکا، میزان شیوع این باکتری در فراورده های گوشتی را ۳۵ درصد گزارش نمودند. میزان وقوع مسمومیت غذایی ناشی از باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس را ۲۸۹ نفر اعلام کردند. این بررسی نشان داد که غذاهای تهیه شده در رستوران ها، خانه ها و زندان ها به ترتیب عامل بروز مسمومیت در ۴۳، ۱۶ و ۱۱ درصد از افراد بوده است. بنابراین دستکاری هایی که توسط افراد آلوده و احتمالاً حامل باکتری روی غذاها انجام می پذیرد، می تواند یکی از اصلی ترین دلایل مسمومیت های غذایی ناشی از کلاستریدوم پرفرینجنس در جوامع بشری باشد (۱۹).

در مطالعه ی دیگری توسط Atwa & EI-Roos میزان شیوع باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس را در نمونه های بیف برگر، گوشت گاو، گوشت چرخ کرده، سوسیس، کباب لقمه ای، بیستورما، کنسرو گوشت و ژامبون به ترتیب ۱۶، ۲۸، ۳۶، ۶۸، ۲۸، ۵۲، ۶۰ و ۶ درصد گزارش کردند (۲۰). در بررسی حاضر که همسو با مطالعات قبلی است، میزان آلودگی گوشت های خام ۱۸/۶ درصد گزارش شد.

همان طور که دیده می شود، بررسی های مختلف، میزان های شیوع متفاوتی را برای باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس بیان می کنند. از جمله دلایل اصلی این تفاوت ها در میزان شیوع این باکتری می توان به نوع نمونه ها، روش نمونه گیری، روش تولید مواد غذایی، نگهداری و حمل و نقل مواد غذایی، روش انجام آزمایش، فصل، منطقه جغرافیایی و آداب و رسوم مردم اشاره کرد. بررسی در ژاپن توسط Kaneko و همکاران نشان داد که ۷۰ درصد از اغذیه گوشتی آماده مصرف در این کشور آلوده به باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس بود و از این بین تنها ۴ درصد حامل ژن *cpe* بودند اما فراوانی ژن *cpa*، ۷۴ درصد بود (۷). در مطالعه ی Wen & McClane در سال ۲۰۰۴ نیز میزان شیوع باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس در امریکا برای مواد غذایی مانند گوشت بوقلمون، مرغ، خوک، گوشت آماده مصرف خوک، گوشت آماده مصرف گوساله، ماهی، میگو، گوشت گوسفند و سوسیس را به ترتیب ۱۷، ۳۸، ۳۰، ۲۳، ۶۱، ۲۷، ۳۸، ۲۸ و ۲۴ درصد گزارش نمودند. در بین نمونه های مثبت از نظر باکتری، فراوانی تیپ های A-β2، A و ژن *cpe* به ترتیب ۱۴ درصد، ۳ درصد و ۳ درصد گزارش گردید (۲۱). جباری و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان شیوع توکسین *cpb2* را در تیپ های A، B، C و D کلاستریدوم پرفرینجنس جداسازی شده از منابع حیوانی و دامی به ترتیب ۵۴/۵ درصد، ۶۲ درصد، ۴۲/۸ درصد و ۶۹/۲۵ درصد گزارش کردند. در بررسی آنها ۵۶/۷ درصد از جدا به های کلاستریدوم پرفرینجنس دارای ژن *cpb* بودند (۲۲). در بررسی Cooper و همکاران، آلودگی ۶۹/۶ درصدی کبد مرغ های عرضه شده در توسکان آمریکا به کلاستریدوم پرفرینجنس تیپ A نشان داده شد و همگی آنها فاقد ژن *cpe* بودند (۴). در مطالعه حاضر در مورد حضور انواع ژن ها در نمونه های گوشتی، نتایج نشان داد که ژن *cpe* بیشترین فراوانی (۷۵٪) را داشته ولی در گوشت گاو، ژن *cpb* برابر ۶۰٪ و در گوشت گوسفند ۳۳/۳٪ بود. به نظر می رسد ژن های تشخیص داده شده در بررسی حاضر عوامل حداث اصلی باکتری کلاستریدوم پرفرینجنس بوده و حضور آنها موید بروز بیماری در انسان و حیوانات می باشد. با وجود این که در بررسی حاضر هیچ گونه پرگنه مشخص کلاستریدوم پرفرینجنس با استفاده از روش کشت جداسازی نشد، اما فراوانی توکسین های مختلف کلاستریدوم پرفرینجنس بسیار قابل توجه بود. از محدودیت های انجام پژوهش حاضر می توان به مواردی هم چون فراوانی بالای نمونه های فراورده های گوشتی و نمونه های کشک صنعتی و سنتی در فروشگاه ها، لذا امکان برداری به تعداد خیلی زیاد وجود نداشت.

نتیجه گیری

شیر به طور کامل و دقیق انجام گردد. هم چنین فرآورده های سستی شیر به طور بهداشتی تولید شده و بسته بندی گردد.

با توجه به نتایج به دست آمده به نظرمی رسد نیاز به انجام مطالعات اپیدمیولوژیک کامل تری در مناطق گسترده تری در ایران برای شناسایی آلودگی ها به کلستریدیوم پرفرینجنس در مواد غذایی مختلف لازم است. هم چنین در تمام مراحل زنجیره ی تولید فرآورده های شیر و گوشتی نیز، به بررسی نقاط خطر پرداخته شود. پیشنهاد می شود که اصول تعیین نقاط کنترل بحرانی و ارزیابی مخاطرات در فرایند خط کشتار در کشتارگاه های دام و هم چنین در فرایند تولید فرآورده های

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل یک فعالیت پژوهشی مستقل می باشد، بدین وسیله از همکاران مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و تشکر می شود.

منابع

1. Poursoltani M, Mohsenzadeh M, Razmyar J & Peighambari MS. Toxinotyping of clostridium perfringens strains isolated from packed chicken portions. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2014; 8(1): 9-17[Article in Persian].
2. Aras Z & Hadimli HH. Detection and molecular typing of clostridium perfringens isolates from beef, chicken and Turkey meats. *Anaerobe* 2015; 32(1): 15-7.
3. Gizachew H. A review on clostridium perfringens food poisoning. *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology* 2017; 4(3): 104-9.
4. Cooper KK, Bueschel DM & Songer JG. Presence of clostridium perfringens in retail chicken livers. *Anaerobe* 2013; 21(1): 67-8.
5. Komatsu H, Inui A, Sogo T & Fujisawa T. Clostridium perfringens. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine* 2012; 70(8): 1357-61.
6. Addis M & Sisay D. A review on major food borne bacterial illnesses. *Journal of Tropical Diseases & Public Health* 2015; 3(1): 176.
7. Kaneko I, Miyamoto K, Mimura K, Yumine N, Utsunomiya H, Akimoto S, et al. Detection of enterotoxigenic clostridium perfringens in meat samples by using molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(21): 7526-32.
8. Poursoltani MRJ, Mohsenzadeh M & Peighambari M. Isolation and antibiotic susceptibility testing of clostridium perfringens isolated from packaged wing, neck, liver and gizzard of broilers in retail stores of Northeastern of Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2013; 7(1): 35-9[Article in Persian].
9. Tudor L, Ilie LI, Mitranescu E, Ciocarlie N & Logoe I. The assessment of microbiological quality of some traditional Romanian cheese. *Lucrari Tinifice Medicina Veterinaria* 2009; 8(2): 315-20.
10. Guerra MMM, Almeida AM & Willingham AL. An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses in food production animals in the caribbean region. *Tropical Animal Health and Production* 2016; 48(1): 1095-108.
11. Ahsani MR, Mohammadabadi MR & Shamsaddini MB. Clostridium perfringens isolate typing by multiplex pcr. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2010; 16(4): 573-8.
12. Baums CG, Schotte U, Amsberg G & Goethe R. Diagnostic multiplex pcr for toxin genotyping of clostridium perfringens isolates. *Veterinary Microbiology* 2004; 100(1-2): 11-6.
13. Ahsani M & Shamsaddini B. Compare of two methods of direct pcr and pcr with dna extraction in clostridium perfringens typing. *Iranian Veterinary Journal* 2013; 8(4): 5-12[Article in Persian].
14. Michaud V, Gil P, Kwiatek O, Prome S, Dixon L, Romero L, et al. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of rna and dna viruses by direct pcr. *Journal of Virological Methods* 2007; 146(1-2): 257-65.
15. Irikura D, Monma C, Suzuki Y, Nakama A, Kai A & Fukui-Miyazaki A. Identification and characterization of a new enterotoxin produced by clostridium perfringens isolated from food poisoning outbreaks. *PLoS One* 2015; 10(11): 138-183.



16. Wu J, Zhang W, Xie B, Wu M, Tong X, Kalpoe J, et al. Detection and toxin typing of clostridium perfringens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by pcr. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(3): 807-10.
17. Gad W, Hauck R, Krüger M & Hafez H. Prevalence of clostridium perfringens in commercial Turkey and layer flocks. *Archiv Für Geflüge Lkunde* 2011; 75(1): 74-9.
18. Gurmu EB, Hazarika RA, Borah P & Barua AG. Prevalence of enterotoxigenic clostridium perfringens in foods of animal origin, Guwahati, India. *Journal of Environmental and Occupational Science* 2013; 2(1): 45-50.
19. Grass JE, Gould LH & Mahon BE. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by clostridium perfringens, United States, 1998-2010. *Foodborne Pathogens and Disease* 2013; 10(2): 131-6.
20. Atwa EI & EI-Roos NAA. SIncidence of clostridium perfringens in meat products at some Egyptian governorates. *International Journal of Microbiology Research* 2011; 2(3): 96-203.
21. Wen Q & McClane BA. Detection of enterotoxigenic clostridium perfringens type A isolates in American retail foods. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(5): 2685-91.
22. Jabbari A, Tekyei F, Esmailizad M & Pilehchian Langroudi R. Occurrence of beta2 toxigenic clostridium perfringens isolates with different toxin types in Iran. *Archives of Razi* 2012; 67(2): 133-7[Article in Persian].

Molecular Detection of Clostridium Perfringens in Some Raw Animal Food Origin Products in Shahrekord, 2014

Shakerian Amir¹ (Ph.D.) - Rahimi Ebrahim¹ (Ph.D) - Mesbah Jamal² (D.V.M) - Mousavi Mohammad² (D.V.M)

1 Professor, Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2 Ph.D. in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Received: Dec 2016

Accepted: Apr 2017

Background and Aim: Clostridium perfringens is one of the major agents of food poisoning in humans around the world. This study was accomplished to identify and track the toxins of Clostridium perfringens bacterium in some raw animal food origin products in Shahrekord.

Materials and Methods: In this study, 100 samples of traditional and commercial curd and 43 samples of beef and lamb meats were randomly collected from Shahrekord's shopping center in 2014. Then to identify the bacteria in samples cultivation and polymerase chain reaction (PCR) method were used.

Results: In culture method no positive samples were isolated. However, frequency of Clostridium perfringens bacterium in traditional and commercial curd samples and beef and lambs samples have been reported as 6, 10, 25 and 13 percent using PCR method, respectively. Frequency of *cpa*, *cpb*, *cpe*, *cpi* and *etx* genes were detected in curd samples were 37.5, 25, 75, 12.5 and 12.5 percent respectively and in meat samples 62, 50, 75.5, 37.5 and 25 percent respectively. Statistically significant differences were observed between the prevalence of the bacterium in various samples and their isolated toxins ($p < 0.05$).

Conclusion: With attention to infection of above food samples to Clostridium perfringens and also its transfer by foodstuffs to human, it is necessary to reduce food pollution of this organism for of public health.

Keywords: Clostridium Perfringens, Curd, Meat, PCR

* Corresponding Author:

Shakerian A;

Email:

amshakerian@iaushk.ac.ir