مطالعه فراوانی تیپ‌های مسمومیتزای انسانی کلستریدیوم بوتولینوم (A, B, E) در بعضی از ماهیان دریای شمال (سفید و کفال) و ماهیان دریای جنوب (شوریده و حلوا) ایران

ودود رضویلر[1]* حمیدرضا توکلی[2]

دریافت مقاله: ۱۰ آبان ماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

هدف: تعیین فراوانی تیپ‌های مسمومیت‌زای انسانی کلستریدیوم بوتولینوم (A, B, E) در بعضی از ماهیان دریای شمال و جنوب ایران.

طرح: مطالعه فراوانی.

حیوانات: ماهیان سفید و کفال (شمال) و شوریده و حلوا (جنوب).

روش: ۱۲۰ نمونه از چهار نوع ماهی از نظر وجود تیپ‌های مسمومیتزای انسانی کلستریدیوم بوتولینوم در دو نمونه روده و برانش (کلاً ۲۴۰ نمونه) با استفاده از محیط کشت مایع گوشت پخته مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های کشت شده بدنبال سانتریفوژ از طریق تزریق به موش مورد آزمایش تعیین توکسین قرار گرفته و با استفاده از آنتی توکسین‌های مونووالان استاندارد تیپ توکسین تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی برای تعیین میانگین حسابی و درصد نتایج بدست آمده.

نتایج: از مجموع ۱۲۰ نمونه روده و برانش آزمایش شده مربوط به ماهیان دریایی شمال در ۱۰ مورد (۸/۳۳ درصد) وجود باکتری و توکسین مورد تأیید قرار گرفت که ۸ مورد از ۶۰ نمونه روده آن‌ها (۱۳/۳۳ درصد) و ۲ مورد از ۶۰ نمونه برانش آن‌ها (۳/۳۳ درصد) مثبت بودند. همچنین از مجموع ۱۲۰ نمونه روده و برانش آزمایش شده مربوط به ماهیان دریایی جنوب تنها ۲ مورد (۱/۶۶ درصد) وجود باکتری و توکسین مورد تأیید قرار گرفت که هر دو مورد مربوط به نمونه‌های روده بوده و در نمونه‌های برانش هیچگونه آلودگی مشاهده نگردید. بطور کلی در بین گونه‌های مختلف مورد آزمایش ماهی، بیشترین میزان آلودگی در ماهیان کفال (۱۰ درصد) و پس از آن ماهیان سفید (۶/۶۶ درصد)، ماهیان شوریده (۳/۳۳ درصد) مشاهده گردید. ماهیان حلوا هیچگونه آلودگی نشان نداد. ضمناً تیپ E بعنوان کلستریدیوم بوتولینوم بعنوان شایعترین تیپ باکتری شناخته شد طوری که به تنهایی ۵۰ درصد موارد مثبت در بین ۳ تیپ مورد آزمایش (A, B, E) را بخود اختصاص داد (۵ مورد از ۱۰ مورد مثبت ماهیان دریایی شمال و یک مورد از ۲ مورد مثبت ماهیان دریایی جنوب).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به خصوصیت سرما دوستی تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم (قدرت رشد و تولید توکسین در شرایط یخچالی) و فراوانی بالای آن در نمونه‌های آزمایش شده معیارهای کنترل بهداشتی خاص و مناسبی در تولید فرآورده‌های غذایی این ماهی‌ها ضروری می‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۴۲-۳۹.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم بوتولینوم، ماهیان دریایی، مطالعه فراوانی، بهداشت غذا، سم‌زایی.

۱) گروه بهداشت موادغذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته گروه بهداشت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: vrazavi@ut.ac.ir

A Prevalence Study of Human Toxigenic Types of *Colostrium botulinum* (A, B, E) in Some Sea Water Fishes of Northern (*Rutilus frisikutum* and *Mugil ouratus risso*) and Southern (*Otulitus rubber* and *stromateus niger*) Regions of Iran

Razavilar,V.[1], Tavakoli, HR.[2]

[1]Department of Food Hygiene , Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objective: To evaluate the prevalence of human toxigenic types of *C. botulinum* (A, B, E) in some sea fishes of northern and southern regions of Iran.

Design: Prevalence study.

Animals: *Rutilus frisi kutum*, *Mugil auratus risso*, *Otulitus ruber* and *stromateus niger*.

Procedure: One hundered and twenty samples of 4 kinds of fishes were tested for *C.botulinum* types from intestine and gills (240 exominations), using cooked meat medium. After centrifugation of the samples, bioassay technic was used for toxin detection to diagnose the type of *C. botulinum*.

Statistical analysis: Descriptive study.

Results: Ten (8.33%)out of 120 tested samples of intestine and gills in northern sea fishes, were positive for *C. botulinum* toxin. In this regdred, 8 out of 60 (13.33%) intestine and 2 out of 60 (3.33%) gill samples were positive. From 120 samples of intestine and gills examined for bacterial detection in southern sea fishes only 2 samples (1.66%) were positive, which both belonged to intestine samples. Overall, the order of contamination of *C. botulinum in* 4 kinds of fishes were *Mugil auratus risso* (10%), *Rutilus frisi kutum* (6.6%), *Otulitus ruber* (3.33%) and *Stromateus niger* (0%). Type E showed the highest prevalence rate (50%) in this study.

Conclusion: From the results of this study, type *E of C. botulinum* (psychrotrophic type) showed the highest prevalence rate which indicates health hazard and therefore proper and special control measures needed for food safety.

J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:39-42,2006.

Keywords: *C. botulinum*, marine fishes, prevalence study, food safety, toxigenesis.

Corresponding author's email:vrazavi@ut.ac.ir

اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم بطور گسترده‌ای در خاک، رسوبات دریایی و آبزیان پراکنده می‌باشد(۱۴). در بین تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم تیپ‌های E,B,A بعنوان مهمترین تیپ‌های بیماریزا در انسان

جدول ۱- میزان توزیع و فراوانی کلستریدیوم بوتولینوم در ماهیان دریایی شمال (سفید و کفال). اعداد داخل پرانتز درصد موارد نسبت به تعداد نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

گونه ماهی	تعداد و نوع نمونه		تعداد موارد وجود توکسین				جمع	
			روده		برانش			
	روده	برانش						
سفید	۳۰	۳۰	(۱۰)	۳	(۳/۳۳)	۱	(۶/۶۶)	۴
کفال	۳۰	۳۰	(۱۶/۶۶)	۵	(۳/۳۳)	۱	(۱۰)	۶
جمع	۶۰	۶۰	(۱۳/۳۳)	۸	(۳/۳۳)	۲	(۸/۳۳)	۱۰

مطرح هستند. تیپ‌های B,A دارای منشاء خاکی بوده و تیپ E دارای منشاء آبی می‌باشد. اسپور این تیپ‌ها بطور گسترده‌ای در خاک، رسوبات دریاها، محیطهای آبی، و قسمتهای مختلف بدن ماهیان (روده، آبشش، و. . .) پراکنده می‌باشد (۱۶، ۱۵، ۳). گزارشات زیادی از کشورهای مختلف جهان مبنی بر میزان انتشار کلستریدیوم بوتولینوم در ماهیان مختلف، تیپ‌های شایع باکتری، و وقوع مسمومیت بوتولیسم در اثر مصرف غذاهای دریایی وجود دارد (۱۸، ۱۶، ۷، ۴، ۳، ۲). در کشور ما نیز به دلیل تهیه، نگهداری، و مصرف نادرست ماهیان فرآوری شده این مسمومیت مکرراً به وقوع پیوسته و تلفاتی را نیز به همراه داشته است که بعنوان نمونه می‌توان به وقوع چندین اپیدمی در مناطق شمالی کشور اشاره نمود (۲). میزان شیوع کلستریدیوم بوتولینوم در ماهی متغیر بوده و به عوامل متعددی از جمله نوع ماهی و نحوه تغذیه آن بستگی دارد بطوریکه احتمال وجود آلودگی در ماهیان کفزی، بعلت تماس بیشتر با گل ولای و لجن محل پرورش خود بیشتر می‌باشد در انتشار جغرافیایی تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم در کشورهای جهان اختلافاتی وجود دارد به طوری‌که در غرب ایالات متحده و بعضی از کشورهای اروپایی نظیر اسپانیا و آلمان تیپ A، در شرق ایالات متحده و بعضی از قسمتهای اروپا نظیر فرانسه، ایتالیا و انگلستان تیپ B، در هندوستان تیپ‌های D و C، در دانمارک، فنلاند، ژاپن و ایران تیپ E بعنوان شایعترین تیپ‌های باکتری معرفی گردیده‌اند (۱۸، ۱۶، ۱۳، ۱۰، ۴). بدون تردید، تعیین میزان توزیع و فراوانی باکتری و شناخت تیپهای شایع آن موضوع بسیار مهمی می‌باشد که به کمک آن می‌توان منابع آلوده کننده و تیپ آلودگی را شناسایی نمود و اقدامات مناسب به منظور کنترل بهداشتی غذاهای دریایی را انجام داد.

مواد و روش کار

تعداد ۱۲۰ نمونه ماهی از ۴ گونه سفید (*Rutilus frisi kutum*)، کفال (*Mugil auratus risso*)، شوریده (*Otulitus rubber*) و حلوا (*Stromataus niger*) (هر گونه ۳۰ نمونه) مستقیماً از محل صید آنها در شمال و جنوب کشور تهیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های ماهی تا زمان آزمایش در دمای یک درجه سانتیگراد نگهداری شدند برای انجام آزمایشات از نمونه‌های روده و برانش بصورت جداگانه استفاده گردید و جمعاً ۲۴۰ نمونه روده و برانش از نظر وجود تیپ‌های E,B, A کلستریدیوم بوتولینوم مورد آزمایش قرار گرفتند.

جدول ۲- میزان توزیع و فراوانی کلستریدیوم بوتولینوم در ماهیان دریایی جنوب (شوریده و حلوا). اعداد داخل پرانتز درصد موارد نسبت به تعداد نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

گونه ماهی	تعداد و نوع نمونه		تعداد موارد وجود توکسین				جمع	
			روده		برانش			
	روده	برانش						
شوریده	۳۰	۳۰	(۲/۶۶)	۲	۰	(۳/۳۳)	۲	
حلوا	۳۰	۳۰	(۰)	۰	۰	(۰)	۰	
جمع	۶۰	۶۰	(۳/۳۳)	۲	۰	(۱/۶۶)	۲	

ابتدا مقدار ۱۰-۵ گرم از هر نمونه با مقدار معادل بافر فسفات ژلاتین مخلوط و یکنواخت گردید و سپس ۵-۳ گرم از هر نمونه در لوله‌های حاوی محیط گوشت پخته (cooked meat medium) کشت داده شد و پس از ۱۰ دقیقه حرارت در دمای ۶۰ سانتیگراد (شوک حرارتی)، به مدت ۷-۳ روز در دمای ۳۰ سانتیگراد در شرایط بیهوازی (با استفاده از واز پار) نگهداری گردیدند. مایع رویی نمونه‌های رشد کرده جدا گردید و پس از سانتریفوژ در شرایط یخچالی (۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰) و تنظیم pH (۶/۲) (توسط پتاس و اسید کلریدریک یک نرمال) هر نمونه به سه قسمت حرارت دیده، حرارت ندیده، و تریپسینه تقسیم گردید. از هر نمونه ۰/۵ میلی لیتر بصورت داخل صفاقی به موش سفید آزمایشگاهی (۲۵-۲۰ گرمی) تزریق گردید و موشها به مدت ۹۶ ساعت از نظر بروز نشانیهای بوتولیسم تحت نظر قرار گرفتند. برای تعیین تیپ توکسین از آنتی توکسین‌های مونووالان (E,B,A) استاندارد استفاده گردید (۱،۱۴).

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از این مطالعه برحسب انواع نمونه‌ها، گونه‌های مختلف ماهیان و میزان شیوع کلستریدیوم بوتولینوم در جداول شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مطالعات زیادی در مورد میزان توزیع و پراکندگی کلستریدیوم بوتولینوم

در محیطهای آبی و آبزیان صورت گرفته است که در انتشار جغرافیایی تیپ‌های این باکتری در نقاط مختلف جهان اختلافاتی را نشان می‌دهد (۱۸، ۱۶،۱۳، ۱۰، ۴). با توجه به اینکه یکی از منابع مهم این باکتری قسمتهای مختلف بدن انواع آبزیان می‌باشند.

در این مطالعه میزان فراوانی باکتری در هر دو نوع ماهیان دریایی شمال و جنوب، در نمونه‌های روده بیش از نمونه‌های برانش می‌باشد: با توجه به اینکه دستگاه گوارش ماهی یکی از منابع مهم باکتری محسوب می‌گردد، بالا بودن میزان آلودگی نمونه‌های روده نسبت به نمونه‌های برانش قابل توجه می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Lalitha و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی میزان توزیع و انتشار تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم در ۶۸ نمونه ماهی دریایی و ۷۱ نمونه رسوبی، صورت گرفت، در ۲۲ درصد نمونه‌های روده و ۶ درصد نمونه‌های پوست و عضله و ۲۱ درصد نمونه‌های رسوب وجود باکتری تایید گردید. در این مطالعه همچون مطالعه ما فراوانی باکتری در نمونه‌های روده بیش از نمونه‌های دیگر بوده است. Lalitha تیپ های C,D را بعنوان شایعترین تیپ‌های باکتری در محیطهای آبی و آبزیان هندوستان معرفی نموده است(۱۰). در مطالعه‌ای که توسط Hyttia و Hielm در سال ۲۰۰۲ بر روی ۴۲۸ نمونه روده و ۲۰۸ نمونه آبشش مربوط به ماهیان صید شده از دریای بالتیک صورت گرفت، در ۲۴/۸ درصد نمونه‌های روده و ۹/۳۲ درصد نمونه‌های آبشش وجود کلستریدیوم بوتولینوم مورد تایید قرار گرفت(۸). میزان فراوانی باکتری در نمونه‌های روده و برانش ماهیان دریایی مورد مطالعه ما کمتر از میزان فراوانی آن در نمونه‌های روده در مطالعه Hyttia بوده است (جداول ۱ و ۲). در مطالعه ما میزان فراوانی باکتری در ماهیان دریایی شمال (۸/۳۳ درصد) بیش از ماهیان دریایی جنوب (۱/۶۶ درصد) می‌باشد که شاید یکی از دلایل احتمالی آن بالا بودن میزان نمک در آبهای جنوبی (شوری بیش از ۳ برابر نسبت به آبهای دریای شمال) کشور باشد.

در مطالعه Hyttia همچون مطالعه ما تیپ E بعنوان شایعترین تیپ باکتری در ماهیان دریایی معرفی گردیده است. میزان فراوانی تیپ E در مطالعه Hyttia (۷۹ درصد موارد مثبت) بیش از فراوانی آن در مطالعه ما بوده است در حالی‌که در مورد تیپ‌های A, B موضوع برعکس بوده و میزان فراوانی این تیپ‌ها در مطالعه ما بیشتر است. در مطالعه‌ای که توسط Huss و pehersen در سال ۱۹۹۸ بر روی نمونه‌های روده، آبشش، و سطوح خارجی ۱۴۰۷ نمونه ماهی صید شده از آبهای نواحی اسکاندیناوی، دریای شمال، و آتلانتیک شمالی صورت گرفت، در نمونه‌های مربوط به آتلانتیک شمالی هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید اما در ۱۲/۴ درصد نمونه‌های مربوط به آبهای اسکاندیناوی و ۴/۷۲ درصد نمونه‌های مربوط به ماهیان دریای شمال وجود باکتری مورد تایید قرار گرفت. در نمونه‌های مربوط به هر دو منطقه، میزان آلودگی نمونه‌های روده بیش از نمونه‌های آبشش و سطوح خارجی بوده است. همچنین در ۶۱ درصد موارد مثبت نمونه‌های مربوط به آبهای اسکاندیناوی و ۴۷ درصد نمونه‌های مثبت مربوط به آبهای دریای شمال تیپ E تشخیص داده شده است (۹).

میزان فراوانی باکتری در نمونه‌های روده مطالعه ما بیشتر از مطالعه Huss می‌باشد در حالی‌که میزان فراوانی باکتری در نمونه‌های برانش مطالعه Huss بیشتر از مطالعه ما بوده است. همچنین در مطالعه Huss همچون مطالعه ما فراوانی تیپ E در ماهیان دریایی بیشتر از سایر تیپ‌های باکتری بوده است و پس از آن تیپ‌های B, A قرار گرفته‌اند. Hielm و Hyttia در سال ۲۰۰۰ در فنلاند، Macdonald در سال ۱۹۹۹ در کانادا و Sakaguchi Haq در سال ۲۰۰۰ و Yamakawa در سال ۲۰۰۱ در ژاپن نیز در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که تیپ E شایعترین باکتری در محیط های آبی و آبزیان می‌باشد (۱۷، ۱۱، ۱۰، ۷، ۵). در مطالعه ما جهت تشخیص وجود توکسین و تعیین تیپ‌های باکتری از روش Bioassay استفاده گردید. مطالعات انجام شده توسط Huss, Hyttia, Yamakawa، و Lalitha نیز نشان داد که این روش علی رغم تمام معایبی که برای آن ذکر گردیده است (سرعت کم، هزینه بالا، موارد مثبت کاذب، وجود استرس زیاد هنگام تزریق، و...) هنوز هم یکی از حساسترین و دقیق‌ترین روشها برای تشخیص کلستریدیوم بوتولینوم محسوب می‌گردد. با این وجود بعضی از محققین نظیر wictome و Kristi بر این باورند که باید روشهای in vitro که دارای دقت و سرعت بیشتری هستند، جایگزین روش Bioassay گردند (۶).

Lalitha, Hielm, Huss، Yamakawa, Macdonald همچون بر این باورند که بین فراوانی و انتشار تیپهای مختلف کلستریدیوم بوتولینوم در محیطهای آبی و آبزیان پرورش یافته در این محیطها ارتباط مستقیم و نزدیکی وجود دارد(۹،۱۷). این موضوع در مورد مناطق شمالی کشور ما نیز صدق می‌کند زیرا در مطالعه‌ای که توکلی در سال ۲۰۰۲ بر روی میزان توزیع و انتشار تیپ‌های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم در رسوبات نواحی ساحلی دریای خزر انجام داد، تیپ E بعنوان شایعترین تیپ باکتری (۵۴/۵ درصد موارد مثبت) شناخته شد(۱۲). در مطالعه اخیر نیز تیپ E بعنوان شایعترین تیپ باکتری به تنهایی ۵۰ درصد موارد مثبت را به خود اختصاص داده است. با توجه باینکه در مناطق شمالی کشور ما چندین اپیدمی بوتولیسم به دلیل مصرف فرآورده‌های حاصل از ماهی نظیر ماهیان دودی، شور، کنسرو شده، و بسته بندی شده رخ داده است(۲). بنابراین برای جلوگیری از بروز مسمومیت احتمالی بوتولیسم، توجه به روشهای صحیح تهیه، نگهداری، و مصرف این فرآورده‌ها و انجام اقداماتی نظیر تخلیه سریع امعاء و احشاء، استفاده از دمای زیر ۳ درجه سانتیگراد نگهداری برای غذاهای پروسس شده به منظور پیشگیری از رشد باکتری و تولید توکسین توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و همچنین همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه بهداشت و کنترل مواد غذایی سرکار خانم طیار، آقای مصیب واحدی، آقای سعید محفوظی و آقای محمدرضا عمادی در انجام این طرح سپاسگزاری می‌گردد.

References

۱. رضویلر، و. (۱۳۷۸): میکروبهای بیماری زا در مواد غذایی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۶۸-۱۶۳.

۲. مدرس، ش. (۱۳۷۵): نقش انواع کلستریدیوم بوتولینوم در آلودگی مواد غذایی در ایران، مجموعه مقالات نهمین کنگره صنایع غذایی، صفحه: ۲۹۸-۲۹۰.

3. Brett, M. (1999): Botulism in the U.K Eurosurveillance monthly archives 4:119-12.
4. Eddie, B. (1995): Fifty years of botulism in the U.S. and Canada. J. Med. 289: 1002-1010.
5. Hielm, S. and Hyttia, E. (2000): Detection of C.Botulinum in fish and environmental samples using PCR and Bioassay techniques. Int.J.Food Microbiol. 31: 357-65.
6. Hilferich, W., Winter, K. (2001): Food toxicology text. Printed in the U.S.A. 5.
7. Huss, H. H. and Pedersen, A. (1998): *C. botulinum* in fish. Nord Vet Med. 31: 214-21.
8. Hyttia, E. and Hielm,S. (2002): Prevalence, molecular Epidemiology and growth of *C. Botulinum* in fish and fishery products in Baltic sea. (Online Source).
9. Lalitha, K.V. and Gopakamar, K. (2000): Distribution and ecology of *C. botulinum* in fish and aquatic environments. J. Food Microbiology. 17: 535-41.
10. Macdonald, D. (1999): The outbreak of type E Botulism in seafoods products in Canada; CDC archives 33: 390-95.
11. Sakaguchi, G. and Haq, I. (2000): Prevalence of *C. botulinum* in fishes in Osaka, Japan. J Med. Sci. boil. 33: 2-6.
12. Tavakoli, H. R.(2002): Detection of *C. Botulinum* types A, B and E from coastal areas sediments of Iran. Proceeding of 3th international congeress of natural resources, Russia, Moscow. 154-8.
13. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (1992): Compendiun of methods for the microbiological examinations of foods. American public health association.
14. Varnam, A. and Evans, H. (1991): Foodborne pathogens text. Wolf publishing, London, England.
15. Wermer. E. and Cowden, M. (2003): Botulism in the European Union, Euro surveihance monthly archives. 4: 112-17.
16. Wictome, M. and Kirsti, A. (2001): Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods. FEMS. Immun. 16: 319-23.
17. Yamakawa, K. (2001): Prevalence of *C. botulinum* types E and B in the rivers soils of Japan. Microbial-Immunol. 36: 583-91.
18. Yamasaki, S. (2000): Incidence of food-borne botulism in Japan 1977-1998. IASR, 21: 241-42.