Original Article

ردیابی تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم بوتولینوم* در ۴ نوع ماده غذایی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

محمدوحید صادقی سروستانی[۱،۲]، سعید حسین زاده[۱*]، مریم پورمنتصری[۱]، مهدی فاضلی[۳]

۱- بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی فارس، شیراز، ایران.
۳- بخش علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۲/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: مسمومیت غذایی ناشی از *کلستریدیوم بوتولینوم* از مهم‌ترین مسمومیت‌های غذایی است که در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به ویژه فرآورده‌های دریایی، انواع غذاهای کنسرو شده گیاهی و گوشتی و فرآورده‌های لبنی ایجاد می‌شود. تشخیص بوتولیسم بر اساس شناسایی باکتری و یا سم آن صورت می‌گیرد. از تیپ‌های مختلف این ارگانیزم (A، B، C1،C2، D، E، F، G) سروتیپ‌های A،B،E و F در انسان بیماری‌زا هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی پتانسیل این غذاها برای ایجاد مسمومیت احتمالی و مقایسه کشت و روش‌های مولکولی جهت شناسایی *کلستریدیوم بوتولینوم* است.

مواد و روش‌ها: روش‌های بیوشیمیایی، کشت (محیط‌های غنی کننده TPGY، Cooked meat و MPCR)سه روش آزمایشگاهی برای تشخیص *کلستریدیوم بوتولینوم* در نمونه‌ها می‌باشند. برای شناسایی قابل اطمینان و سریع باکتری و سموم آن، تکنیک‌های مولکولی به کار می‌روند. سه جفت پرایمر برای شناسایی سویه‌های E،B و A طراحی شدند. بزرگی محصول PCR تیپ‌های A، B، E به ترتیب۷۸۲، ۲۰۵ و ۳۸۹ جفت باز بود.

نتایج: از ۲۹۰ نمونه جمع آوری شده درصد آلودگی به این باکتری در ماهی ۵٪، عسل ۴٪، کشک ۲/۵٪ و دوغ ۱/۲۵٪ نمونه‌ها آلوده بود. با استفاده از محیط کشت انتخابی پس از غنی سازی نمونه‌ها، فقط ۴ نمونه مثبت تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: روش‌های مولکولی، ابزاری با ارزش برای شناسایی سموم، هاگ و باکتری در مواد غذایی بوده و جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک و آزمایشگاه میکروبیولوژی غذایی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم بوتولینوم*، **MPCR**، **مسمومیت غذایی.**

مقدمه

بوتولیسم یک بیماری پارالیتیک ناشی از نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* و در موارد نادر ناشی از *کلستریدیوم بوتریکوم* و *کلستریدیوم باراتی* می‌باشد. این بیماری یک فوریت بهداشتی، درمانی است (۱).

کلستریدیوم بوتولینوم یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مولد هاگ است که از مدت‌ها پیش شناخته شده و نوروتوکسین‌های فلج کننده مختلفی تولید می‌کند (۲). سویه‌های این باکتری بر اساس نوع سم به گروه‌های I تا IV تقسیم شده‌اند که گروه‌های I و II (شامل A،B،E،F) در انسان و تیپ‌های B،C و D در گاو شناسایی شده‌اند (۳). این گروه‌ها از نظر حرارت مورد نیاز، ویژگی‌های بیوشیمیایی و تولید متابولیت‌ها، اختلاف فنوتیپی دارند (۴). سویه‌های گروه I که مزوفیل هستند، در کمتر از ۱۰°c رشد نکرده و حداقل pH برای رشد سویه‌های این گروه حدود ۴/۶ بوده و غلظت‌های نمک بیشتر از ۱۰ درصد را تحمل می‌کنند. اسپور این سویه‌ها به حرارت بسیار مقاومند. سویه‌های گروه II سایکروتروف بوده، در حدود ۳°c می‌توانند رشد کرده و رشد آن‌ها در pH حدود ۵ و غلظت نمک ۵ درصد متوقف می‌شود. مقاومت حرارتی سویه‌های این گروه کمتر از گروه I است (۵). بیماری در گروه‌های سنی مختلف از جمله نوزادان زیر یک سال که احتمال بیشتری برای ژرمینه شدن هاگ‌ها در دستگاه گوارش، ازدیاد باکتری و تولید سم دارند، ایجاد می‌شود (۶).

به دلیل شیوع بالای این باکتری در طبیعت، مواد غذایی خام ممکن است حامل اسپور باکتری باشند. گزارش‌های زیادی از شیوع اسپور سویه‌های گروه II در ماهی و فراورده‌های دریایی وجود دارد. شیوع تیپ E در آبزیان ممکن است بیش از ۴۰ تا ۷۰ درصد باشد و پس از آن در گوشت و سیب زمینی (۳۶درصد) یافت شده است. تعداد باکتری‌های گروه II *کلستریدیوم بوتولینوم* در مواد غذایی خام از کمتر از ۱ تا ۱۰۰ اسپور در هر کیلوگرم گزارش شده است (۷).

نوروتوکسین از راه‌های مختلفی انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و اشکال بالینی مسمومیت را ایجاد می‌کند با این حال زمینه‌های ژنتیکی در بروز تنوع آسیب پذیری موثرند (۸).

فرم کلاسیک مسمومیت غذایی بوتولیسم به دنبال مصرف غذای

* **نویسنده مسئول: سعید حسین زاده**، بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۱۲۲۸۶۹۵۰
Email: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

حاوی سم ایجاد می‌شود. با توجه به دوز سم، دوره کمون از ۱۲ تا ۷۲ ساعت متفاوت است. فرم غذازاد بیماری، علاوه بر علایم عمومی بوتولیسم ممکن است با نشانه‌های گوارشی مانند تهوع، استفراغ و یبوست همراه باشد (۹). میزان مرگ و میر ناشی از این مسمومیت ۳٪-۵٪ است. بزرگترین همه گیری در سال ۲۰۰۶ گزارش شده که در طی آن ۲۰۹ نفر به‌دلیل مصرف کنسروهای خانگی آلوده به تیپ A و تولید نوروتوکسین در زمان نگهداری، علایم مسمومیت را نشان دادند (۵).

سویه‌های غیر پروتئولیتیک این باکتری به ویژه تیپ E می‌تواند در دماهای حدود ۵ درجه سانتیگراد در غذاهای دریایی رشد کرده، سم تولید کند و نگهداری غذا در دمای نامناسب می‌تواند به سویه‌های پروتئولیتیک *کلستریدیوم بوتولینوم* اجازه رشد و تولید سم بدهد. ماهی و فرآورده‌های آن که در دمای ۵ درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری شده‌اند و فرآورده‌های تخمیری ماهی که در دمای اتاق نگهداری شده‌اند برای ایجاد مسمویت غذایی شدید، مخاطره مهمی محسوب می‌شوند (۱۰). تغییرات آب و هوا، کاهش سطح آب، افزایش دمای آب و افزایش تعداد ماهی‌ها سبب بالا رفتن میزان شیوع بوتولیسم ناشی از نوع E در پرندگان دریاچه میشیگان در همه گیری‌های بین سال‌های ۱۹۶۳ تا ۲۰۰۸ گردیده است (۱۱).

بیشترین موارد بوتولیسم در ایران در اثر مصرف غذاهای سنتی به ویژه سبزیجات و ماهی رخ داده است (۱۲). کشک یک فرآورده لبنی است که در ایران به صورت صنعتی و سنتی تولید می‌شود. اکثر ایرانیان، کشک سنتی را به همراه غذاهای محلی که ممکن است منجر به رشد ارگانیزم و تولید سم در این غذاها شود، مصرف می‌کنند (افزایش pH) (۱۳).

عوامل محیطی مانند دما و میزان اکسیژن و عوامل داخلی از جمله pH، فعالیت آبی، غلظت نمک و ساختار امولسیون بعضی از فرآورده‌های لبنی مانند کره رشد باکتریایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مقادیر عوامل داخلی در کره کنسرو شده (pH حدود ۶، فعالیت آبی حدود ۰/۹۴ و میزان نمک ۹/۲ درصد فرصت را برای رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* فراهم می‌کند (۱۴).

عسل بیشترین نقش را در بوتولیسم اطفال ایفا می‌کند و پزشکان باید در تشخیص افتراقی ضعف در اطفال، بوتولیسم را در نظر بگیرند (۱۵). به دلیل تغییر نامطلوب حرارت‌های موثر بر هاگ باکتری بر روی طعم و ساختار عسل و عدم به کارگیری فرآیند حرارتی، خطر مصرف عسل در اطفال بالا است (۶).

ویژگی های مسمویت غذایی توسط لیندستروم و کورکیولا در سال ۲۰۰۶ بیان شده است. در حالی که اکثر مطالعات اپیدمیولوژیک بر پایه فرم‌های مختلف بیماری است، پیش نیاز درمان بیماران تشخیص سریع بوتولیسم است که شامل جداسازی هاگ‌ها و سم از منابع مختلف، آزمایشات سرولوژیکی و مولکولی می‌باشد (۱۶). شناسایی مرسوم و جداسازی *کلستریدیوم بوتولینوم* براساس کشت در محیط مایع و متعاقب آن شناسایی توکسین از مایع رویی کشت، توسط سنجش حیاتی موش است. نمونه‌های مثبت بر روی محیط جامد کشت داده شده و توکسین تولید شده توسط کلونی‌ها، با آزمایش روی موش تایید می‌گردد که روشی پرزحمت و وقت گیر است (۷). به همین دلیل، شناسایی قطعه ژن نوروتوکسین توسط Polymerase Chain Reaction (PCR) یک روش جایگزین سریع می‌باشد. اخیرا Chain Reaction Polymerase Multiplex (MPCR) برای شناسایی هاگ‌ها در مواد غذایی مختلف به کار می‌رود (۱۷).

با توجه به مشکلات مطرح شده برای شناسایی باکتری و خصوصیات تیپ‌های مختلف میکروارگانیزم، مطالعه حاضر ابتدا کاربرد MPCR برای شناسایی *کلستریدیوم بوتولینوم* با استفاده از ژن‌های کد کننده نوروتوکسین این باکتری و در نهایت بررسی اپیدمیولوژیک به منظور ارائه احتمال خطر آلودگی مواد غذایی و ایجاد بوتولیسم در استان فارس را انجام می‌دهد. مطالعات پیشین در ایران به بررسی آلودگی مواد غذایی به *کلستریدیوم بوتولینوم* در استان‌های شمالی پرداخته، لذا در این مطالعه‌این آلودگی در یکی از استآن‌های جنوبی کشور مورد بررسی قرار می‌گیرد و شناسایی این باکتری را در ماهی‌های صید شده از خلیج فارس نیز برای اولین بار انجام می‌دهد.

مواد و روش‌ها

۲۹۰ نمونه شامل ۸۰ نمونه ماهی، ۵۰ نمونه عسل، ۸۰ نمونه کشک و ۸۰ نمونه دوغ از سطح استان فارس به روش هدفمند جمع آوری گردید. نمونه‌های ماهی به صورت تصادفی از ماهی‌های خلیج فارس، کشک و دوغ سنتی از محل‌های فرآوری و نمونه‌های عسل از محل های تولید تهیه شد.

نمونه‌های عسل: ۲۵ گرم از عسل در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل رقیق شد. محلول حاصل با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی برای مدت ۱۰ دقیقه با حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد تحت اثر شوک حرارتی قرار گرفت (۱۸).

نمونه‌های ماهی، دوغ و کشک: ۵ تا ۱۰ گرم از هر نمونه با همان حجم بافر فسفات ژلاتینه (PH=۶-۶/۲) به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد.

سپس نمونه‌ها به ۹ میلی لیتر محیط آب گوشت غنی کننده گوشت پخته شده (آلمان، مرک، CMM) و ۹ میلی لیتر عصاره مخمر، گلوکز، پیتون- تریپتون (آلمان، مرک، TPGY) منتقل گردید (۱۹). همه محیط‌های غنی کننده به مدت ۱۰-۷ روز در دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد به صورت بی‌هوازی با استفاده از گاز پک تیپ A (مرک، آلمان) گرمخانه گذاری شدند (۲۰،۱۸).

بعد از ۱۰-۷ روز گرمخانه گذاری، از هر نمونه بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد. همه محیط‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به صورت بی هوازی گرمخانه گذاری شدند.

یک میلی لیتر از نمونه‌های غنی سازی شده در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری برای استخراج DNA و انجام PCR منتقل شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت DNA سیناپور (سیناژن، ایران) انجام شد. نمونه به مدت ۱۰دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی را خارج کرده و رسوب حاصله پس از تکان دادن به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. DNA تخلیص شده مطابق توصیه سازنده کیت ۳۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده اضافه شده و در ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری گردید. غلظت DNA توسط جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر برآورد شد و

خلوص DNA به وسیله کیت O/D در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده مربوط به توالی‌های غیر مشابه ژن کد کننده توکسین باکتری در سویه‌های بیماری‌زای انسانی بود. قطعات ۲۰۵، ۷۸۲، ۳۸۹ جفت باز که به ترتیب مربوط به سروتیپ‌های E،A،B بودند (جدول ۱).

واکنش PCR: اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

جدول ۱ـ پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص تیپ‌های E.B.A *کلستریدیوم بوتولینوم*

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه (جفت باز)
Af	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT	۷۸۲
Ar	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG	=
Bf	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	۲۰۵
Br	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	=
Ef	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	۳۸۹
Er	GCTATTGTCCAAAACGGTG	=

شامل ۱ میکرولیتر ازDNA الگو، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Polyme-ase Taq DNA (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (Pmol.ml20)، ۰/۲ میکرومولار از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (۲/۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر X PCR10، ۱/۵ میکرولیتر از نمک کلرید منیزیوم (۵۰ میلی مولار) با یکدیگر مخلوط شدند (سینا ژن، ایران). واکنش PCR در ۲۷ سیکل توسط دستگاه ترموسیکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد. دناتوره کردن اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۲۵ سیکل شامل دناتوره کردن به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد و تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. سپس تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (بیور ایکس پی، چین). جهت بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد انتقال داده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با اشعه ماورا بنفش مشاهده گردید. قطعات ۷۸۲، ۲۰۵، ۳۸۹ جفت باز که به ترتیب مربوط به تیپ‌های E،B،A *کلستریدیوم بوتولینوم* می‌باشند مشاهده گردید (۲۱).

توالی ژن‌ها: توسط کیت جداسازی سریع ژل (بیونیر، آمریکا) مطابق توصیه شرکت سازنده ژن‌های مشخص شده از ژل‌ها جدا شد. بافر شماره ۱ (بافر متصل شونده به ژل) به ژل اضافه شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد گرم‌خانه گذاری شد تا ژل کاملا محلول شود و محلول به ستون باند DNA انتقال داده شد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و در لوله ۲ میلی لیتری جمع آوری شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ (بافر لیز کننده سلول) به ستون اضافه و برای ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

نتایج حاصل از دو روش آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (ویرایش شانزدهم) و آزمون مک نمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر $P<0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار پذیرفته شد.

نتایج

کشت: کلنی‌های سفید و کوچک روی آگار خون‌دار بعد از گرم‌خانه گذاری مشکوک به *کلستریدیوم بوتولینوم* بوده و گرم مثبت می‌باشند. از ۲۹۰ نمونه گرفته شده فقط ۴ نمونه بر روی آگارخون‌دار مثبت

شکل ۱ ـ نتایج MPCR مربوط به تیپ‌های E,A,B *کلستریدیوم بوتولینوم* (ژل آگاروز ۱/۵ درصد)
ردیف ۱ ـ نشانگر اندازه (bp DNA ladder100)، ردیف ۲ تا ۵ ـ نمونه‌های منفی، ردیف ۶ ـ محصول MPCR از تیپ B، ردیف ۷ ـ محصول MPCR از تیپ A، ردیف ۸ ـ محصول MPCR از تیپ E

تشخیص داده شدند.

PCR: این مطالعه تعداد متفاوت نمونه‌های مثبت آلوده به *کلستریدیوم بوتولینوم* با استفاده از روش‌های معمول و MPCR را نشان داد.

چهار نمونه از نمونه‌های ماهی (۵٪) آلوده به تیپ E باکتری، ۲ نمونه از نمونه‌های عسل (۴٪) به تیپ B باکتری و ۲ نمونه از نمونه‌های کشک (۲/۲۵٪) آلوده به تیپ A،B و یک نمونه از نمونه‌های دوغ (۱/۲۵٪) آلوده به تیپ B بودند.

ارزیابی همانندی دو روش آزمایش انجام شده نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P<0.05$) روش کشت میکروبی و MPCR می‌باشد.

آنالیز توالی: برای تجزیه و تحلیل داده‌های توالی مقایسه

جدول ۲ـ فراوانی *کلستریدیوم بوتولینوم* در نمونه‌ها

نمونه	تعداد نمونه‌ها	درصد نمونه‌های مثبت – (تعداد)	تیپ باکتری
دوغ	۸۰	۱/۲۵٪ ، (۱)	B
کشک	۸۰	۲/۵٪ ، (۲)	A.B
عسل	۵۰	۴٪ ، (۲)	B
ماهی	۸۰	۵٪ ، (۴)	E

BLAST1 با بانک اطلاعات ژن NCBI انجام شد.

بحث و نتیجه‌گیری

هاگ‌های باکتری به طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده شده‌اند و می‌توانند عسل را آلوده کنند (۲۲). آلودگی عسل به هاگ‌های تیپ B *کلستریدیوم بوتولینوم* بیشتر احتمال دارد که از طریق گرد و غبار حمل شده توسط زنبورها به دنبال وجود هاگ در خاک ایجاد شود (۶). در سال ۲۰۰۹ دی مدیسی و همکاران توضیح دادند که به رغم حضور مواد مهاری PCR در مواد غذایی خام، از روش MPCR می‌توان نمونه‌های مختلف بالینی، محیطی و غذا در برنامه‌های معمول مراقبت استفاده کرد. توانایی این روش برای تشخیص و افتراق ژن‌های کد کننده نوروتوکسین بسیار زیاد است (۴).

روش‌های تشخیص مسمومیت بر سنجش حیاتی با استفاده از موش، کشت و روش‌های جدید مانند MPCR استوار است (۱۷). مقایسه این روش‌ها نشان می‌دهد که PCR برای شناسایی تیپ‌های E.B.A حساس‌تر است (۴).

گرچه آزمایش‌های مولکولی قادر به تشخیص سم نیست اما می‌تواند ژن‌های کد کننده تولید سم باکتری را شناسایی کند. ژن‌های فوق مستقیما از غذا یا نمونه‌های بالینی آلوده به باکتری جدا می‌شوند (۲۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از روش مولکولی همراه با غنی سازی برای هر سه تیپ باکتری قابل اطمینان است. علاوه بر این روش PCR قادر به شناسایی تعداد کم هاگ در مواد غذایی می‌باشد (۲۰).

هنگامی که از سنجش حیاتی موش برای شناسایی توکسین در لوله‌های کشت استفاده می‌شود، مدت زمان انکوباسیون ۷-۵ روز پیشنهاد شده است و مدت انکوباسیون کمتر برای تکنیک‌های بیولوژیکی مثل PCR کاربرد دارد (۷).

جداسازی و شناسایی متداول *کلستریدیوم بوتولینوم* دشوار است، مگر این که سم تولید شده توسط باکتری، در سنجش حیاتی حیوان به تایید برسد (۴). این روش اگرچه استاندارد طلایی برای شناسایی نوروتوکسین بوتولینوم است ولی معایبی نیز به همراه دارد. علاوه بر بحث اخلاق، دشواری، هزینه و زمان بر بودن، ممکن است مرگ غیر واقعی حیوان نیز رخ دهد (۲۱).

از آنجا که تعداد این ارگانیسم در نمونه‌های آلوده طبیعی، نسبتاً پایین است (۱۰۰۰- ۱۰ اسپور در هر کیلوگرم) و محیط‌های انتخابی مناسبی نیز در دسترس نمی‌باشد؛ استفاده از روش‌های کشت جهت شمارش *کلستریدیوم بوتولینوم* در نمونه‌های حاوی سایر باکتری‌ها، دشوار یا غیرممکن است (۴).

از ۲۹۴ نمونه عسل در دانمارک، نروژ و سوئد با استفاده از MPCR به ترتیب ۲۶٪، ۱۰٪ و ۲٪ نمونه‌ها آلوده بودند که تیپ B در دانمارک و نروژ و تیپ E در سوئد غالب بود (۲۳).

در یک مطالعه از ۶۲ نمونه ماهی، ۵ مورد (۷/۵٪) تیپ E باکتری با استفاده از خنثی سازی سم در ایران شناسایی شد (۱۳).

بین سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ در ایران ۳۴۱ مورد مشکوک به بوتولیسم که از این میان بیشترین تعداد موارد بیماری در سال ۱۳۸۶ (۲۸/۲۸٪) و کمترین آن در سال ۱۳۸۲ (۱۲/۶٪) گزارش شده است. در مجموع ۴/۵۸٪ از غذاهای ایرانی سنتی آلوده به *کلستریدیوم بوتولینوم* بودند.

توکلی و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۱۳۱ نمونه (۵۷ نمونه پنیر،۱۱نمونه کشک،۶۳ نمونه ماهی نمک سود)۱۲ نمونه را با استفاده از روش سنجش حیاتی موش مثبت تشخیص دادند. در این مطالعه از نمونه‌های کشک سنتی هیچ کدام آلوده به کلستریدیوم بوتولینوم نبود اما ۴ مورد در ماهی تیپ‌های E، B، A (۳/۰۶ ٪) و ۲ مورد در پنیر تیپ A (۱/۵۲٪) شناسایی گردید.

شبان و همکاران در سال ۲۰۱۱، تعداد ۲۵۰ نمونه غذایی (۵۰ نمونه عسل، ۱۰۰ نمونه محصولات ماهی و ۱۰۰ نمونه محصولات گوشت) را در شهر اسیوط مصر، جهت بررسی حضور *کلستریدیوم بوتولینوم* و اسپور آن جمع آوری کردند و روش MPCR را برای شناسایی تیپ های A، B و E و F این باکتری در نمونه‌ها استفاده کردند. طبق نتایج آن‌ها ۱۳ نمونه عسل (۲۶٪)، ۱۶ نمونه محصولات ماهی (۱۹٪) و ۲۱ محصولات گوشتی (۲۱٪) از نظر *کلستریدیوم بوتولینوم* مثبت بودند. طبق این تحقیق استفاده از MPCR در غربالگری جهت حضور اسپور بوتولینوم در نمونه‌های عسل موفقیت آمیز بود (۲۴).

در بین مواد غذایی مصرف شده، فرآورده‌های دریایی تهیه شده به روش سنتی (۳۱/۰۸٪) و دوغ سنتی (۱/۴۶٪)، کشک سنتی (۵/۲۷٪) به عنوان مواد غذایی ایجاد کننده مسمومیت غذایی بوتولیسم شناخته شدند (۱۳).

تغییرات اکسیداسیون احیا (RH)، pH، حرارت و میزان نمک فاکتورهایی هستند که محیط مناسبی برای تولید سم فراهم می‌کنند (۹).

این مطالعه نیز نشان می‌دهد که تیپ E *کلستریدیوم بوتولینوم* در نمونه‌های ماهی غالب است همان‌طورکه در مطالعات توکلی و

وحدانی گزارش گردیده است (جدول ۲).

در سال ۱۹۸۸ حیدرنیا و معمار باشی وجود سم بوتولیسم در کشک را تایید کردند. بنابراین عرضه کشک پاستوریزه در ایران توسط وزارت بهداشت توصیه گردید. در مطالعه فوق اعتقاد داشتند که *کلستریدیوم بوتولینوم* در شرایط بی هوازی در کشک سم تولید می‌کند. در سال‌های اخیر به دلیل پاستوریزاسیون اجباری کشک، هیچ موردی از مسمومیت بوتولیسم ناشی از مصرف کشک گزارش نشده است. سم در pH کمتر از ۴/۶ در کشک تولید نمی‌شود اما زمانی که pH به ۵/۵-۶/۵ افزایش یابد *کلستریدیوم بوتولینوم* رشد کرده و سم تولید می‌کند.

در سطح جهانی نیز گزارش‌های متعددی در مورد بوتولیسم با مصرف غذاهای سنتی وجود دارد به عنوان مثال در سال ۱۹۹۱ در مصر همه گیری بوتولیسم گزارش شد که ۹۹ نفر مسموم شده و ۱۸ نفر از آن‌ها در گذشتند. مطالعات انجام شده در چین، فرانسه، کانادا، آلاسکا و ژاپن مسمومیت بوتولیسم به دنبال مصرف ماهی خام و بسته بندی در خلاء را نشان می‌دهند.

نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه در سایر کشورها نشان می‌دهد که تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم بوتولینوم* ممکن است در مواد غذایی سنتی ایرانی (دوغ، کشک)، عسل و ماهی وجود داشته باشد. از آنجا که این مواد غذایی معمولا به صورت خام یا نیمه پخته مصرف می‌شوند، مصرف آن‌ها خطر ابتلا به بوتولیسم را در برخواهد داشت. بنابراین بهبود آموزش و بهداشت عمومی در تمام مراحل فرآوری غذا، اجتناب از مصرف مواد غذایی خام و آموزش منظم کنترل کیفیت غذاها می‌تواند به طور موثری از مسمومیت غذایی و یا سایر عوارض عفونی ناشی از مصرف محصولات آلوده به *کلستریدیوم بوتولینوم* پیشگیری کند. لازم به توضیح است که در صورتی که امکان مطالعه بر روی تعداد بیشتری نمونه و مواد غذایی متنوع تری انجام گردد قطعا نتایج مطلوب تری نیز به‌دست خواهد آمد.

References

1. Pier CL, Chen C, Tepp WH, Lin G, Janda KD, Barbieri JT, et al. Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. FEBS Letters. 2011; 585(1): 199–206.
2. Prevot AR. Rapport d'introduction du president du sous-comite Clostridium pour I'unification de la nomenclature des la nomenclature des types toxigeniquesde C. botulinum. IBBN.1953;3 (1): 120-23.
3. Kummel J, Krametter-F R, Six G, Brunthaler R, Baumartner W, Alenbrunner-M R. Descriptive study of botulism in an Austrian dairy herd: a case report. Veterinary Medicina.2012;57(3):143-149.
4. Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum types A, B, E and F in food and fecal material. AEM. 2001;67(12): 5694-5699.
5. Peck MW, Stringer SC, Carter AT. Clostridium botulinum in the post-genomic era. Food Microbiol. 2010;52(2): 1-9
6. Nevas M, Lindström M, Hörman A, Keto-Timonen R, Korkeala H. Contamination routes of Clostridium botulinum in the honey production. Environment Microbiol. 2006;8(6): 1085-1094.
7. lindsrom M, Kiviniemi K, Korkeala H. Hazard and control of group II (non-proteolytic) Clostridium botulinum in modern food processing. IJ Food Microbiol. 2006;108(3):92-104.
8. Thajeb T, Chen YM, Dai DF, Thajeb DD, Thajeb P. Botulism: A Frequently Forgotten Oil Malady. IJ Gerontology.2007;1(3):118-124.
9. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clinical Microbiol. Rev. 2006;19(2): 298-314.
10. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Clostridium botulinumin fish and environmental samples from a Coastal Area in Northern France.AS for Microbiol. 2002;68(12):5870-6.
11. Lafrancois BM, Riley SC, Blehert DS, Ballmann AE. Links between type E botulism outbreaks, lake levels, and surface water temperatures in Lake Michigan, 1963–2008. J Great Lakes Research. 2011; 37(1): 86–91.
12. Barari M, Kalantar E. An outbreak of type A and B botulism associated with traditional vegetable pickle in Sanandaj. IIJCID. 2010;5(2):111-112.
13. Tavakoli HR, Zeynali M, Mehrabi Tavana A. Scrutiny of food-borne botulism intoxication in Iran during 2003-2007 with the food hygiene view point. Hakim Res J. 2009;11(4): 38- 46.
14. Taylor RH, Dunn ML, Ogden LV, Jefferies L K, Eggett DL, Steele FM. Conditions associated with Clostridium sporogenes growth as a surrogate for Clostridium botulinum in nonthermally processed canned butter. J Dairy Sci. 2013;96(5) :2754–2764
15. Smith JK, Burns S, Cunningham S, Freeman J, Mc Lellan A. The hazards of honey: infantile botulism. BMJ Case Reports. 2010. Available from:http://casereports.bmj.com/content/2010/bcr.05.2010.3038.full
16. Dario DM, Anniballi F, Wyatt GM, Lindström M, Delibato E, Korkeala H, et al. Multiplex PCR for detection of botulinumneurotoxin-producing clostridia in Clinical, Food, and Environmental Samples. AEM. 2009; 75 (20): 6457–61.
17. Ahmed SH, Badary MS, Mohamed WA, Elkhawaga AA. Multiplex PCR for detection and genotyping of C. botulinum types A, B, E and F neurotoxin genes in some Egyptian food products. J Am Sci. 2011;7 (10): 176-190.
18. KupluluÖ, Muammer G, Haydar Ö, Ahmet K. Incidence of Clostridium botulinum spores in honey in Turkey. Food Cont. 2006;17 (3): 222-224.
19. Marshall Robert T. Standard methods for the examination of dairy products. 16th ed. USA: APHA; 2003.P.342-

56.
20. Nevas M, Hielm S, Lindström M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of Clostridium botulinum types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. IJFMicrobiol. 2002;72(1-2):45-52.
21. Saadati M, Nazarian SH, Tavallaee M, Amani J, Shirzad H. Identification of Clostridium botulinum type A, B and E by Multiplex PCR.TebNezami.1994;25 (3):231-238. [In Persian]
22. Olivieri C, Marota I, Rollo F, Stefania Luciani S. Tracking plant, fungal, and bacterial DNA in honey specimens. JFS.2012;57(1)222-227.
23. Nevas M, Lindstom M, Hautamaki K, Puoskari S, KorKeala H. Prevalence and diversity of clostridium botulinumtypes A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. IJFMicrobiol.2005; 105(2): 145-151.
24. Shabaan HA, Mohamed SB, Wegdan AM, Amal AE. Multiplex PCR for detection and genotyping of C. botulinumtypes A, B, E and F neurotoxin genes in some Egyptian food products. J Am Sci. 2011;7(10):102-110.
25. Chaudhry R. Botulism: A diagnostic challenge. Ind J Med Res. 2011;134(1): 10-12.

Original Article

Monitoring Various Types of *Clostridium Botulinum* in Four Kinds of Food Stuff Using Multiples PCR

Sadeghi Sarvestani V[1,2], Hosseinzadeh S[1*], Poormontaseri M[1], Fazeli M[3]

1- Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Institute of Applied Scientific Higher Education of Jahad-e Agriculture, Education Center of Farsjahad-e Agriculture, Shiraz, Iran.
3- Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 06 May 2013 Accepted: 21 Sep 2013

Abstract

Background & Objective: Food poisoning (FP) caused by C. botulinum is the most serious feature of FP inpeople consuming the contaminated foodstuffs (Canned meat, vegetarian foods, dairy products and seafood products). Botulism is basically detected by the identification of live bacteria and/or its toxins. Among various types of microorganisms (i.e. A, B, C1, C2, D, E, F), serotypes A, B, E and F are considered as the main human pathogens. The present study was aimed at investigating the possible roles of various foodstuffs to induce the food intoxication and also to compare the culture and molecular assays for identifying the microorganism.

Materials &Methods: Three Lab techniques including biochemical, culture (enriched in TPGY and cooked meat medium) and MPCR were used to detect C. botulinum in the samples. As the molecular based techniques have recently employed for the rapid and reliable identification of the bacteria and its toxins, the PCR assay, using three pairs of primers were designed and optimized to identify A, B and E strains in the contaminated specimens. The PCR was able to amplify 782, 205 and 389 bp genes specified for A, B and E types of the bacteria, respectively.

Results: Total number of 290 specimens including fish, honey,"kashk"and"Dough" were tested, in which 5%, 4%, 2.5% and 1.25%, were found positive, respectively. Using selective culture of the specimens on the enriched samples, it was shown that just four samples were found positive.

Conclusion: As a final conclusion, the molecular based techniques are recommended as a reliable tool to detect C. botulinum and, its toxins and spores in foodstuffs. Moreover, it is strongly advised to use it in food microbial Lab and also the epidemiological surveys.

Keywords: **Clostridium botulinum, MPCR, Food poisoning.**

*** Corresponding author: Hosseinzadeh Saeid,** Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
Tel: +98 9171120133
Email: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir