

شمارش میکروارگانسیم های هوازی مزوفیل و جداسازی باکتری سالمونلا از تخم مرغ های مصرفی شهر اصفهان در سال ۱۳۸۹

• هادی میرانزاده (نویسنده مسئول)
عضو هیات علمی مرکز آموزش جهاد کشاورزی اصفهان
• تقی زهرائی صالحی
گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• وحید کریمی
گروه بیماری های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۱۳۵۸۹۶۷
Email: miranzadeh2@hotmail.com

چکیده

۱۳۳ عدد تخم مرغ از سطح مغازه های شهر اصفهان جمع آوری و به روش استاندارد مورد آزمایش شمارش میکروارگانسیم های هوازی مزوفیل (Total count) قرار گرفتند. همچنین بر روی ۱۸۶ عدد تخم مرغ اقدام به جداسازی باکتری سالمونلا گردید. نتایج نشان داد میزان آلودگی تخم مرغ ها از ۳۰۰۰ کلنی در گرم تا ۱۰ میلیون متغیر بود. متوسط آلودگی تخم مرغ ها ۱۶۹۳۰۰۰ کلنی در گرم بر آورد شد. محاسبه آماری با دقت ۹۵ درصد و انحراف معیار ۲/۲۳۲ نشان داد که ۷ درصد از تخم مرغ ها بار میکروبی نزدیک میانگین، ۶۸ درصد کمتر از میانگین و ۲۵ درصد بالاتر از میانگین جامعه دارند. از ۳ نمونه (۱/۶۱ درصد) باکتری *S.entritidis* جدا گردید. که در آزمایش PCR دو نمونه (۱/۰۷ درصد) *S.entritidis* مورد تأیید قرار گرفت.

کلمات کلیدی: تخم مرغ، *S.entritidis*، شمارش میکروبی، آزمایش PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 94 pp: 31-36

The count of aerobic mesophilic bacteria and isolate salmonella Spp on egg in Isfahan 1389

By: H. Miranzadeh, Institute of Scientific Applied Higher Education of Jahad – e – Agriculture, Center of Isfahan (Corresponding Author; Tel: +989131358967) T. Zahrei Salehi, Microbiology Department, Faculty of Vet. Med., Tehran University, Vahid Karimi Poultry Disease Department, Faculty of Vet. Med. Tehran University.

This Survey was Conducted on 133 eggs that they were collected from Isfahan markets, Eggs are tested for aerobic mesophilic bacteria (Total count) and 186 eggs were tested for salmonella spp. contamination. The results showed 3000 to 10 million colony per gram bacteria counted in egg samples. The mean colony count was 1693000.7 percentage samples rich to mean colony count. (95% accuracy, SD2.232) the total count rate were 68 percentage under average and 25 percentage upper average. *Salmonella enteritidis* was isolated from 3 eggs samples. among 3 cases salmonella confirmed in 2 cases by PCR.

Key words: Mesophilic bacteria, Colony count, Egg, *Salmonella enteritidis*, PCR test

مقدمه

تخم مرغ با داشتن ۷ گرم پروتئین و ۷۶ کیلوکالری انرژی و ارزش بیولوژیک ۹۶/۵ درصد بالاترین جذب پروتئینی در بین مواد غذایی را دارا است (sharrifzadeh, ۲۰۰۸, FAO, ۲۰۰۲, mehrvar, ۲۰۰۶). ساختار تخم مرغ به گونه ای است که ۸۰۰ تا ۸۰۰۰ منفذ داشته و روی آن را ماده ای محافظ بنام کوتیکول می پوشاند. در یک تخم مرغ سالم ۱۰ تا ۲۰ درصد از منافذ فاقد کوتیکول بوده و محل مناسبی برای نفوذ باکتری ها به داخل محتویات تخم مرغ می باشند. مرغ های پیر تخم های با منافذ بیشتر تولید می کنند. همچنین منافذ باز در قسمت پهن تخم مرغ بیشتر است. محتویات تخم مرغ تازه و گرم در محیط با حرارت پائین منقبض شده و ایجاد فشار منفی می کند. در محلی که دو غشای پوسته از هم جدا می گردد و اتاقک هوایی را تشکیل می دهند. غشای داخلی همانند یک دیافراگم عمل نموده و به همراه محتویات انقباض یافته حرکت می نماید این عمل باعث نفوذ سریع هوا و پارگی کوتیکول می شود هرچه منافذ بزرگتر باشد خطر پارگی بیشتر است و شانس نفوذ باکتری ها بیشتر خواهد بود (Lake, Hudson, Cressey, Gilbert, ۲۰۰۴). بطور متوسط مدفوع مرغ دارای 10^6 باکتری در هر گرم میباشد. طی ۳۰ دقیقه پس از تخم گذاری ۲۵ درصد از باکتری ها قادر به نفوذ در تخم مرغ هستند. این در حالی است که ۶ درصد از مرغان سالم از مدفوعشان *E. coli* جدا شده (Sharrifzadeh, ۲۰۰۸, Telo, ۱۹۹۹). در سال ۲۰۱۰ اعلام شد تخم مرغ یکی از ۱۰ غذای ریسک دار برای انتقال بیماری می باشد. (Lake, Hudson, Cressey, Gilbert, ۲۰۰۴). در این بین سالمونلا ها مهم ترین آلوده کننده تخم مرغ می باشند. این باکتری ها عامل food born disease بوده و ایجاد مسمومیت غذایی، عفونت روده و سپتی سمی می کنند (Liebana, ۲۰۰۲). در گذشته عفونت های سالمونلای بسیار زیاد بوده ولی از سال ۱۹۳۰ تا ۱۹۵۰ این میزان تا ۹۰ درصد کاهش یافته است. در سال ۱۹۸۶ در اروپای شرقی ۸۴/۹ درصد از مسمومیت ها ناشی از غذا بوده (Telo, ۱۹۹۹). وقوع

بیماری در آمریکا ۱۹ مورد در یک صد هزار بوده. در حال حاضر، جاکارتا، هند، پاکستان و نپال آلوده ترین مناطق دنیا و کهکلوپه و بوبر احمد، سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، کرمانشاه، کردستان، لرستان و سمنان آلوده ترین مناطق ایران می باشند (FAO, ۲۰۰۲).

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۱۳۳ عدد تخم مرغ جهت شمارش میکروارگانیسم های هوازی مزوفیل و ۱۸۶ عدد جهت ردیابی و جدا سازی سالمونلا مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های انتخاب شده از تخم مرغ های بودند که عمدتاً در شانه های معمولی بدون بسته بندی نگه داری می شدند. تعداد نمونه بر اساس فرمول نمونه گیری با احتساب حدود اطمینان ۹۹ درصد و متوسط ۳ درصد آلودگی (مطالعات قبلی) محاسبه شد. تعداد ۶۶۱ سوپر، مرغ و ماهی فروشی و مراکز عمده فروش شناسائی شدند. پس از مطابقت آدرس ها با نقشه شهر اصفهان بر اساس مناطق دوازده گانه شهری نمونه ها تقسیم و به روش تصادفی طبقه بندی شده نمونه گیری گردید. نمونه ها در کیسه های استریل تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. در زمان آزمایش هر نمونه داخل کیسه به آرامی ماساژ داده و تا حد امکان سعی گردید مخلوط هموزن و یکنواخت تهیه گردد. سپس ۱۰ گرم از نمونه همگن شده توسط قاشق استریل به ارلن حاوی ۹۰ سی سی رقیق کننده اضافه و رقت هایی تا یک ده هزارم (۴-) تهیه و کشت نمونه ها بر اساس شمارش صفحه ای استاندارد صورت پذیرفت. (Karim, ۲۰۰۸). در قسمت دوم آزمایش بر روی ۱۸۶ عدد تخم مرغ انجام گردید. ۲۵ گرم از نمونه ماساژ داده شده داخل محیط کشت لاکتوز برات به حجم ۲۵۰ سی سی رسید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در ادامه با استفاده از آبگوشت تتراتیونات (همراه با سبز درخشان و ید) و مرحله سوم با استفاده از محیط سبز درخشان و آگار سالمونلا-شیکلا کشت داده شد به طوری که پرگنه های مجزا بدست آمد و در محیط TSI تایید شدند. برای تعیین گروه و نهایتاً سروتیپ سالمونلای جدا شده از سرم های O,H استفاده شد. جهت تعیین گروه از کشت ۲۴ ساعته وخالص باکتری در روی محیط آگار سه قندی شیرابه غلیظ با سرم فیزیولوژی تهیه و همراه با کنترل

سالمونلای جدا نگردید. (Sadre Arhami, ۲۰۰۰) گزارش سیستم نظارتی امریکا حاکی از آن است که سالمونلا تیفی موریوم، ۱۹/۳ درصد آلودگی و *Senritidis* با ۱۸/۶ درصد مقام اول و دوم را دارا می باشد. (Hilary, Shall thesmar, ۲۰۰۷) در سال ۱۹۸۶ مشخص گردید که *Senritidis* از طیور به انسان منتقل و بیماری زا می باشد. طی سال های ۱۹۷۳ الی ۱۹۸۷ ۵۱ درصد از بیماری های عفونی را سالمونلوز تشکیل می داده. ضریب جداسازی *Senritidis* بین سال های ۱۹۸۱ تا ۱۹۸۸ ۱۴ برابر افزایش داشته در حالی که در مورد تیفی موریوم این افزایش کمتر از ۲ برابر می باشد و اکنون *Senritidis* متداول ترین سروتیپ به ثبت رسیده است. این ارگانسیم موجب عفونت تخمدان و مجرای عبور تخم Oviduct در پرندگان می شود و بدین وسیله موجب آلودگی محتویات تخم مرغ می گردد. حرارت هایی که زرده تخم مرغ در طی فرآیند های پخت ملایم نظیر جوشانیدن ملایم یا سرخ نمودن مختصر دریافت می نماید احتمالاً جهت کشتن ارگانسیم ناکافی می باشد و چربی موجود در زرده تخم مرغ ممکن است ارگانسیم را در مقابل اسیدیته معده محافظت نماید. (Zahraei Salehi, Shekhi, ۱۹۹۹) طی پژوهشی نشان داده شده است که ارتباط نزدیکی بین سن تخم مرغ و تعداد *Senritidis* در محتویات آن وجود دارد. در این پژوهش، تمامی تخم مرغ هایی که طی ۳ هفته پس از تولید مورد آزمایش قرار گرفته بودند حاوی کمتر از ۲۰ سلول باکتری بودند، در صورتی که بیش از ۵۰ درصد تخم مرغ های دارای سن سه هفته و یا بیشتر حاوی بیش از ۱۰۰ سلول *Senritidis* بودند. (Ching, Lee, Saski, DM, Minette, ۱۹۹۲) علت تاخیر در رشد *Senritidis* در محتویات تخم مرغ ممکن است به دلیل عوامل متعددی باشد. آزمایشات انجام شده با استفاده از روش هایی که موجب تسهیل عبور سالمونلا از طریق پوسته تخم مرغ می شدند، نشان داده است که محتویات تخم مرغ تا دو هفته پس از تلقیح دچار آلودگی شدید نمی شود. این پژوهشگران نتیجه گرفته اند این امر به دلیل زمان مورد نیاز جهت عبور سالمونلاها از غشاهای پوسته تخم مرغ بوده است. ویسکوزیته سفیده تخم مرغ نیز ممکن است موجب محدودیت حرکت سالمونلا گردد. پژوهشگران چنین نتیجه گرفته اند که *Senritidis* که در غشا داخلی اطاقک هوایی تلقیح شده بود تا زمان تماس زرده یا اطاقک هوایی، رشد نکرد. همچنین نشان داده شده است که تغییرات مربوط به نگهداری، که احتمالاً مربوط به غشا زرده و یا سفیده می باشد، در اجازه رشد *Senritidis* در سفیده، بسیار حائز اهمیت است (Ching, Lee, Saski, DM, Minette, ۱۹۹۲). استفاده از تکنیک PCR برای تعیین سالمونلا توسط دیگر محققین نیز استفاده شده، مهرور و همکاران در تعیین سالمونلا جدا شده از موارد اسهال در اطفال اعلام نمودند که این روش در مشخص نمودن گونه کاربرد دارد (mehrvar, ۱۹۹۶).

سیاسگزاری

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی با کد ۸۷۰۰۴-۰۱-۰۱-۲۰ و پشتیبانی موسسه آموزش علمی- کاربردی جهاد کشاورزی در مرکز آموزش جهاد کشاورزی اصفهان صورت پذیرفت، نویسندگان بر خود لازم میدانند از زحمات تمامی عزیزان از جمله آقای مهندس حامد ترابی و سرکار خانم مهندس پروین قربانی که عملیات طرح را انجام دادند

اتواگلوتیناسیون و سرم پلی والان O نتیجه روی لام و محیط سیاه مطالعه گردید. آگلوتیناسیون در کمتر از ۲ دقیقه را واکنش مثبت تلقی می کنند. در ادامه با استفاده از سرم های منو والان کار را ادامه یافت. برای تعیین سروتیپ داخل گروه از پادگن های تاژگی استفاده گردید. (Karimi, Zahraei Salehi, ۱۹۹۸, ۲۰۰۶) در این تحقیق سه جدایه سالمونلا برای تایید و تعیین سرووار مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. (گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران). برای این منظور پس از تجدید کشت در محیط لوریا DNA باکتری به روش جوشاندن استخراج گردید. برای تشخیص از پرایمرهای S۱۴۱ و S۳۹ و برای شاهد منفی از آب مقطر و شاهد مثبت سوش شماره ۱۱۰ *S.tythimorium* و *Senritidis* (گنجینه باکتریایی گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) استفاده گردید. از برنامه *S.tphimor* برای سیکل حرارتی ترموسایکلر استفاده شد. (Ashrafi, ۲۰۰۲)

نتایج

نتایج بدست آمده از شمارش میکرواورگانسیم های هوازی مزوفیل به ترتیب از کمترین میزان ۳۰۰۰ کلنی تابیشترین میزان ۱۰ میلیون کلنی در هر گرم شمارش گردید. میانگین آلودگی جامعه ۱/۶۹۳/۰۰۰ کلنی بدست آمد (جدول ۲). به منظور تعیین اینکه چه تعداد از تخم مرغ ها بار میکروبی نزدیک میانگین را دارند، محاسبه آماری با دقت ۹۵ درصد و انحراف معیار ۲/۲۳۲ انجام گردید و مشخص شد که ۷ درصد از تخم مرغ ها بار میکروبی نزدیک میانگین و ۶۸ درصد کمتر از میانگین و ۲۵ درصد بالاتر از میانگین جامعه را دارند.

بحث

حد مجاز بار میکروبی تخم مرغ خوراکی $10^4 \times 22$ کلنی در هر گرم می باشد. (Iranian standard ۵۲۰۳, ۶۲۰۳) در این بررسی میانگین آلودگی بیشتر از حد مجاز بدست آمد. (۱۶۹۳۰۰۰ کلنی در گرم) و ۲۴/۰۶ درصد از نمونه ها بار میکروبی کمتر از حد مجاز و ۷۵/۹۴ درصد بالاتر از حد مجاز نشان دادند. میانگین بار میکروبی بسیار بیشتر از استاندارد اعلام شده بدست آمد که البته استاندارد اعلام شده مربوط به محتویات تخم مرغ می باشد. در حالی که نتایج این مطالعه مربوط به کشت پوسته ها و محتویات است. ولی به هر حال عمده آلودگی تخم مرغ از طریق پوسته می باشد. مطالعات مشابه نیز نشان داده اند که باکتری های بیماری زا نظیر *E.coli*، پروتئوس، یرسینیا، کمپیلو باکتر از تخم مرغ جدا شده (Gilbert, Lake, Hudson, Cressey, ۲۰۰۴, Jamshidi, ۱۹۹۵). در این مطالعه از ۳ نمونه (۱۰۷ درصد) باکتری *Senritidis* جدا گردید که در آزمایش PCR دو نمونه مورد تایید قرار گرفت. مطالعات دیگر نیز نتایج مشابه را نشان داده اند. *Senritidis* شایع ترین سروتیپ جدا شده از تخم مرغ در یک مطالعه توصیفی در تهران بود (Haemi, ۱۹۹۷). در شیراز از کشت پوسته ها سالمونلا نیو پورت و از زرده ها سالمونلا تیفی موریوم جدا گردید (Jamshidi, ۱۹۹۵). میزان آلودگی در تخم مرغ های بومی اهواز ۵ درصد، شامل سالمونلا تیفی موریوم ۴ درصد و *Senritidis* ۱ درصد تعیین گردید. (Jafari, Fazlara, Deliran, ۲۰۰۶) در اصفهان از کشت ۲۵۰ پوسته تخم مرغ هیچ

جدول ۱- ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در PCR چندگانه ای تأییدی *S.entritidis*.

پرایمر	ژن هدف	ترادف	طول (bp)
ST۱۱ ST۱۴	Randoma Sequence	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA- ^۵ GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG ^۵	۴۲۹
S۱ S۴	Spvb	GCCGTACACGAGCTTATAGA- ^۵ ۵-ACCTACAGGGGCAATAAC	۲۵۰
SEFA۴ SEFA۲	SefA	GCAGCGTTACTATTGCAGC- ^۵ TGTGACAGGGACATTTAGCG- ^۵	۳۱۰

جدول ۲- تعداد کلنی شمارش شده در گرم تخم مرغ های مورد آزمایش

دامنه	تعداد
۰-۵۰۰	۵۱
۵۰۰-۱۰۰۰	۲۴
۱۰۰۰-۱۵۰۰	۱۶
۱۵۰۰-۲۰۰۰	۱۱
۲۰۰۰-۲۵۰۰	۴
۲۵۰۰-۳۰۰۰	۶
۳۰۰۰-۳۵۰۰	۴
۳۵۰۰-۴۰۰۰	۲
۴۰۰۰-۴۵۰۰	۱
۴۵۰۰-۵۰۰۰	۱
۵۰۰۰-۵۵۰۰	۰
۵۵۰۰-۶۰۰۰	۲
۶۰۰۰-۶۵۰۰	۱
۶۵۰۰-۷۰۰۰	۱
۷۰۰۰-۷۵۰۰	۱
۷۵۰۰-۸۰۰۰	۱
۸۰۰۰-۸۵۰۰	۲
۸۵۰۰-۹۰۰۰	۱
۹۰۰۰-۹۵۰۰	۲
۹۵۰۰-۱۰۰۰۰	۲

eggs with salmonella spp in Shiraz *Journal of babel medicine*. vol4.No4 pp55-62

- 19- Lake, R. Hudson, A. cresse, P. Gilbert, S. (2004) *Risk Proile: salmonella (nontyphoidal) in and on eggs*. New Zealand.4,33
- 20- Liebana, E; Garcia-migural. (2002) Investigation of salmonella enteric serovar Dublin for animals and hu mans from England. *Journal of applied microbiology*.93:732-744
- 21- Mayahi, M; M, Ghorbanpour, R, kavosi (2005) the survey of poultry carcass to salmonella in Ahvaz slaughterhouse. 14th vet, congres Tehran-Iran
- 22- Mayahi, M; and et all (2002) study on prevalence of salmonella bacteria in broiler chicks of Ahvaz poultry farm 2nd symposium of WPSA Iran branch.tehran –Iran
- 23- Mehrvar, N; Akhavan; A, Mehrvar A, (2006) *Discrimination of salmonella serotypes isolated from children aged less than 15yr, with diarrhea by PCR-ribotyping*. Iran medical university 14(5)185-188
- 24- Morse, DL. Birekhead, GS. (1994) Outbreak and sporadic egg associated cases of salmonella enteritidis (New Yourk's experience). *AmJ public Health*; 84(5): 859-860.
- 25- Karim, G. *microbial practice in food*. Tehran university press 3th edit. pp23-28.191-195
- 26- Pawin Padungtodij. B. Kaneene (2006) Salmonella in food animals and humans in northern Thailand, *International journal of food microbiology* 108 pp 346-654
- 27- Saderashrafi, M; and et all (2007) *The survey of salmonella infectious in guial egg*. 5th national congress of zoonoses.Iran-Karaj.
- 28- Sharifzadeh, A., Abbaszadeh, S. Naderinejad, Fheydari, S. (2008) Study of importance of Poultry production and hot point during slaughter notability b.4th symposium of poultry disease. Iran- sharekord.p74
- 29- Shekhi, N. (1995) *Internationalsalmonella control chakavak journa* vol4. no4pp55-62
- 30- Telo, A; B, Bijo; K, Sulaj; E, Beli. (1999) Ocurance of salmonella Spp, in important eggs into Albania. *International J.f*. 49;169-171
- 31- Zahraei salehi, T. (1999) *Salmonella*. tehran university press. pp51-98.101-118

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■

منابع مورد استفاده

- 1- Abedini, M. (2008) *egg infectious, with human pathogens and efficacy in food hygiene*. 15th veterinary congress.tehran ,Iran
- 2- Aghazadeh Meskki, M; Zahraii. T, Fakharii A, (2005) suevy of salmonella contamination 14th.veterinarycongress. Tehran –Iran
- 3- Ashrafii, A. (2003) *Propagation inva Salmonella Tiphymorium by PCR as bacteria idenfication*. Veterinary thesis Tehran university No2136. pp107-132
- 4- Bozorgmehrfard, M. Shojadost, B. (1996) *Guide of poultry disease*. vol1. Kosar.published Tehran. pp107-132
- 5- Ching, Lee, MR. Sasaki, DM. Minette, Hp. (1991) Salmonella egg survey in Hawaii: evidence for routine bacterial surveillance. *Am J Public Health*; 81(6): 764-766.
- 6- Dordari, Sh; H, Hamid; S, Bokai (2005) *The survey of salmonella on poultry meat in store*. 14th vet, congres Tehran-Iran
- 7- FAO corporate document Repository. (2002) Risk Assmtns of salmonella in eggs and broiler chickens. interpretative summary. <http://www.fao.org/es/esn.pp8-11>
- 8- Gupte, S. (2006) *The short text book of medical microbiology*. 9th ed ,jpee:Indian ;2006.p,218-232
- 9- Hashemi, A; and et all (2007) *The survey of salmonella infectious on human and poultry in Kerman*. 5th national congress of zoonoses. Iran-karaj.
- 10- Haemi, P. Hadian, Z. Velaii, N. (1997) The survey of contamination of native eggs with salmonella spp in Tehran. *Iranian vet. Journal*. vol5.NO1.pp27-30
- 11- Hilary. Shall Thesmar, RD. (2007) *Egg safety center*. Washington.
- 12- <http://www.eggsafety.Org>
- 13- <http://www.fao.Or/docrep/005/Y.439eo.Htm#top> of page
- 14- <http://www.nz.Fsa.Govt.nz/science/data-sheets/salmonella-egg.Pdf>.
- 15- Iranian standard, (2002) *First revision 6203*. Egg microbiological specification and test methods. Institute of standards and industrial research of Iran
- 16- Iranian standard, 1st revision ,5272. Microbiology of food and animal feeding stuffs –horizontal method for the enumeration of microorganisms colony –count technique at 30.c. Institute of standards and industrial research of Iran
- 17- Jafari, R. Fazlara, A. Deliran, A. (2006) The survey of contamination of native eggs with salmonella spp In Ahvaz *Iranian vet*.2NO2pp55-62
- 18- Jamshidi, A (1995) The survey of contamination of native