بررسی میزان آلودگی انسان به لیستریا مونوسیتوژنز در شهر شیراز

● رؤیا فیروزی
استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
● گیتی کریم
استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
● بیژن جهانبانی
دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۶، پائیز ۱۳۷۶

چکیده

Listeria monocytogenes **اخیراً به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماری منطقه از مواد غذائی شناخته شده است. افراد آلوده و گاهی موارد افراد سالم باکتری را از طریق مدفوع دفع می‌کنند. در این بررسی ۲۰۰ نمونه مدفوع از قسمتهای مختلف شهر شیراز جمع‌آوری گردید. از کل نمونه‌ها ۳۰ نمونه آن مربوط به کارکنان کشتارگاه بود. آزمایش بر روی نمونه‌های تحت آزمایش مشخص نمود که ۳ مورد از ۲۰۰ مورد (۱/۵ درصد) دارای آلودگی با *L. ivanovi* بودند که از این تعداد، ۲ مورد (۶/۶ درصد) مربوط به کارکنان کشتارگاه بود. از کل نمونه‌های مورد نظر هیچ موردی از آلودگی با *L. monocytogenes* مشاهده نگردید.**

مقدمه

یکی از بیماریهای مشترک بین انسان و دام بیماری لیستریوز است. تظاهر این بیماری در دام به صورت مننگوانسفالیت، سپتی سمی و سقط جنین است و در انسان باعث عوارض مختلفی از جمله سپتی سمی و مننژیت بخصوص در نوزادان می‌گردد.

انسان و برخی از گونه‌های دامی می‌توانند به عنوان ناقلین روده‌ای بدون علامت مطرح باشند. تا قبل از گزارش آلودگی مواد غذائی، از لیستریوز به عنوان یک بیماری مشترک نام برده می‌شد اما بعد از آن به عنوان بیماری منتقله از مواد غذائی نیز نام برده می‌شود.

در سالهای اخیر *L. monocytogenes* به عنوان یک عامل بیماری‌زاکه از طریق غذا باعث ایجاد بیماری می‌گردد، شناخته شده است و به عنوان یک مشکل نگران کننده در صنایع غذائی مطرح است. لازم به یادآوری است که با توجه به اهمیت موضوع، سازمان بهداشت جهانی (WHO) علاوه بر تشکیل سمینار سالیانه لیستریوز، اقدام به انتشار گزارش سالیانه از نظر پراکندگی‌وبیماریزائی‌وموارد‌مثبت‌آن‌دردنیا نموده است.

مخزن طبیعی باکتری ظاهراً خاک و دستگاه گوارش انسان و سایر پستانداران می‌باشد که هر دو باعث آلودگی گیاهان، خاک، دام و پرندگان می‌گردند. انسان از طریق گرد و غبار، مصرف سبزیجات آلوده شیر، گوشت، تخم مرغ، تماس مستقیم با دام و همچنین از طریق جنسی به لیستریا آلوده می‌شود. حیوانات نیز از طریق گرد و غبار، خوردن علوفه آلوده (مثل سیلوی آلوده به باکتری لیستریا)، ترشحات حیوان آلوده، جفت حیوان آلوده، می‌گردند.

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۵۹ بیماری لیستریوز در انسان در جهان پراکنده است، بطوریکه تا سال ۱۹۶۱، ۴۰۰ مورد بیماری را گزارش کرده‌اند عقیده بر این است که بسیاری از موارد بیماری نیز گزارش نشده و میزان آن از این تعداد نیز بیشتر می‌باشد. به نظر می‌رسد که ۵-۱ درصد جمعیت، باکتری را به عنوان فلور طبیعی روده‌ای و بدون داشتن هیچگونه علائمی با خود حل می‌کنند (۱۱).

Nyfeld در سال ۱۹۲۹ اولین مورد مؤثق لیستریوز در انسان را از دانمارک گزارش نمود (۴). اولین مورد بیماری لیستریوز در ایران نیز در سال ۱۳۳۸ از بیماری‌که مشکوک به سل ریوی بود تشخیص داده شد (۱). همچنین از سال ۱۳۶۶ تا سال ۱۳۷۲ وند یوسفی و همکاران بررسیهائی در مورد جداسازی سروتیپ‌های مختلف *L. monocytogenes* از نمونه‌های مرضی انسان و مواد غذائی مختلف بخصوص لبنیات و نیز کاربرد آزمایشات سرولوژیکی انجام داده‌اند. نامبردگان مکرراً سروتیپ‌های 2b, 2a, 4b و 2c را از شیر خام جدا نموده‌اند (۲، ۳، ۴، ۵ و ۶).

هدف از تحقیق حاضر بررسی میزان آلودگی انسان به لیستریا در شهر شیراز می‌باشد تا وضعیت آلودگی در منطقه و میزان ناقلین بدون علامت مشخص گردند.

مواد و روش کار

الف - محیط‌های کشت

در این بررسی از محیط‌های اختصاصی کشت لیستریا مانند محیط آگار خوندار، محیط تی - ان (استات تالوس - نالیدیکسیک اسید) و محیط انتخابی داخل پلیت[1] از جمله محیط آگار خوندار حاوی ۴۰ میلی‌گرم نالیدیکسیک اسید، آگار خوندار حاوی ۴۰ میلی‌گرم نالیدیکسیک اسید و ۲۵ میلی‌گرم آکریفلاوین و ۶۲۵ میلی گرم کلرید لیتیوم جهت بررسی نمونه‌های مدفوع مناسب تشخیص داده شد. جهت تشخیص قطعی باکتری لیستریا از محیط‌های افتراقی حرکت، قندهای رامنوز، زیلوز و مانیتول استفاده گردید. آزمایش کمپ نیز با استفاده از محیط آگار خوندار و باکتری *Staphylococcus aureus* سویه دامی با همولیز بتا انجام گرفت.

ب - جمع‌آوری نمونه‌ها

جمع‌آوی نمونه‌ها طی چندین مرحله در مکان‌ها و زمان‌های مختلف در سطح شهر شیراز و کشتارگاه صنعتی انجام گرفت.

نمونه‌ها از اشخاص به ظاهر سالم، بدون علائم بیماری که هیچ نوع آنتی‌بیوتیکی هم مصرف نمی‌کردند تهیه می‌شد. در هنگام جمع‌آوری نمونه، اطلاعاتی از اشخاص در مورد جنس، سن، شغل، وضعیت جسمانی و مصرف دارو ثبت می‌شد. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها در هر مرحله، نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی انتقال داده می‌شد و عملیات مرحله جداسازی بر روی آنها انجام گیرد.

ج - کشت نمونه مدفوع

جهت حصول اطمینان‌بیشتراز‌دوروش‌استفاده می‌شد

۱- کشت مستقیم نمونه‌ها در محیط انتخابی و ادامه بررسی موارد مشکوک

۲- کشت غیر مستقیم نمونه‌ها (روش کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و روش غنی‌سازی در سرما)

در این روش مقدار معینی مدفوع (حدود ۰/۵-۰/۲ گرم) با سواپ استریل در محیط آبگوشت مغذی تی - ان کشت داده می‌شد. از هر نمونه دو لوله مجزاکشت می‌گردید. یکی از لوله‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت و روزانه به مدت یک هفته به داخل محیط انتخابی منتقل می‌گردید. لولهٔ دیگر در یخچال بادمای ۴درجه‌سانتیگراد قرار داده می‌شد و هر هفته به مدت ۲ ماه درمحیط‌انتخابی‌کشت داده می‌شد.

در صورت رشد باکتری در محیط آگار انتخابی و مشکوک شدن به باکتری لیستریا، برای تشخیص قطعی مراحل بعدی ادامه می‌یافت. این مراحل شامل کشت مجدد از پرگنه مشکوک، رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، آزمایش حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد، آزمایش کمپ، تخمیر قندهای رامنوز، زیلوز، و مانیتول بود. در خاتمه با مراجعه به جدول ویژگیهای بیوشیمیائی جنس لیستریا نمونه مشکوک مورد تائید قرار می‌گرفت (۳).

نتایج

در این بررسی تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع مورد آزمایش قرار گرفت و بعد از انجام مراحل مختلف ذکر شده، ۳ مورد لیستریا جدا گردید. هر سه نمونه گونه *L. ivanovi* تشخیص داده شد.

نتایج جهت تأیید به مؤسسه رازی ارسال گردید و گونه ivanovi مورد تأیید مؤسسه قرار گرفت. در این بررسی هیچ مورد مثبتی از *L. monocytogenes* مشاهده‌نگردید. جدول ش ۱ اطلاعات مربوط به افراد تحت مطالعه و نتایج به دست آمده را نشان می‌دهد.

بحث

مطالعات متعددی در این زمینه در دنیا انجام شده است و نتایج بررسی حاضر با مطالعات محققین دیگر مورد ارزیابی قرار گرفته است. Moller و Bojesen (۱۹۶۵) در کپنهاک اظهار داشتند که یک درصد مردم عادی و ۵-۴ درصد کارکنان کشتارگاه باکتری را از طریق مدفوع دفع می‌کنند بدون اینکه علائم بیماری را نشان دهند (۱۴). Ralovich میزان دفع *L. monocytogenes* را در اروپا ۹-۱/۸ درصد اعلام نمود (۱۱).

Kwantes و همکاران در سال ۱۹۷۱ از ۵۰۰ نمونه مدفوع ۳۲ مورد *L. monocytogenes* جداکرد و Ortel در همان سال ۶ مورد مثبت از ۱۲۵ نمونه مدفوع بالغین و ۴ مورد مثبت از ۳۷۸ نمونه مدفوع نوزادان تازه متولد شده و بچه‌ها راگزارش نمود (۱۳).

Iuppi و همکاران در سال ۱۹۸۸ در ایتالیا، در یک بررسی روی مدفوع انسان از ۵۱۳ نمونه، ۷ مورد *L. monocytogenes* و ۲ مورد *L. inocua* جدا نمودند، یعنی حدود ۱/۹ درصد میزان آلودگی راگزارش نمودند (۷).

Marth و همکاران در سال ۱۹۸۸ در گزارشی عنوان نمودند که حیوانات آلوده و گاهی حیوانات سالم (ناقلین) باکتری را از طریق مدفوع دفع می‌کنند و این مورد برای انسان هم صدق می‌کند (۹).

Mac Gowan و همکاران در سال ۱۹۹۰ در بررسی بر روی مدفوع افرادی که عمل پیوند کلیه را انجام داده بودند ۵/۶ درصد (۱۰ مورد مثبت از ۱۷۷ نمونه) آلودگی لیستریائی راگزارش نمودند که بیشترین گونه جدا شده *L. monocytogenes* بود و بیشترین سویه جدا شده سویه 4b بود (۸).

در سال ۱۹۹۱، Iida و همکاران از مجموع ۱۷۰۵ نمونه مدفوع گاو، خوک، سگ، گربه، جوجه و موش جمع‌آوری شده، آلودگی با *L. monocytogenes* را در گاو ۱/۹ درصد، خوک ۰/۶ درصد، سگ ۰/۹ درصد و موش ۶/۵ درصد اعلام نمودند و هیچ مورد مثبتی در گربه و جوجه گزارش ننمودند (۵).

Siragusa و همکاران در سال ۱۹۹۲ در گزارش خود جداسازی گونه‌های مختلف لیستریا از مدفوع گاو را اعلام نمودند (۱۲).

Briones و همکاران در سال ۱۹۹۲ در گزارشی اظهار داشتند که مدفوع انسان و حیوانات ناقل بدون علامت و بیمار، نقش مهمی در انتقال بیماری لیستریوز دارا می‌باشند (۲).

Mac Gowan و همکاران در سال ۱۹۹۴ گزارشی مبنی بر جداسازی گونه‌های مختلف لیستریا از مدفوع را چاپ نمودند (۸).

با توجه به مطالعات فوق و نتایج به دست آمده از بررسی حاصل نتیجه‌گیری می‌شود که میزان آلودگی در تحقیق حاضر (۱/۵ درصد) با میزان آلودگی بررسی شده در دیگر نقاط دنیا مشابهت داشته و حد پائین آن را در بر می‌گیرد. با توجه به جدول شماره (۱) میزان آلودگی در کارکنان کشتارگاه ۶/۶ درصد می‌باشد که کمی بیشتر از گزارش Moller و Bojesen در سال ۱۹۶۵ می‌باشد که این اختلاف احتمالاً به دلایل فاصله زمانی و افزایش میزان آلودگی و یا تفاوت رعایت اصول بهداشتی می‌باشد. با توجه به جدول فوق میزان آلودگی در میان افراد مؤنث ۱/۳ درصد و در میان افراد مذکر ۱/۶ درصد می‌باشد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول شماره ۲- تعداد موارد مثبت جدا شده در هر روش کشت و در هر مرحله از کشت

نوع کشت	کشت مستقیم	کشت نمونه غنی‌سازی شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد	کشت غنی سازی شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد			
			کشت اول	کشت دوم	کشت سوم	کشت چهارم
تعداد	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
موارد مثبت	-	-	-	۱	۳	-

با توجه به جدول شماره ۲ نتیجه می‌گیریم که غنی‌سازی در سرما (۴ درجه سانتیگراد)، روش بسیار خوبی نسبت به دو روش دیگر جداسازی لیستریا از مدفوع می‌باشد و این وضعیت اهمیت غنی‌سازی در سرما را نشان می‌دهد. از مجموع مطالب و ارقام ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی به لیستریا و دفع آن از طریق مدفوع در شهر شیراز وجود دارد و می‌بایست با ارائه و انجام طرحی جامع و کامل نسبت به کاهش آن اقدام نمود.

پاورقی

1- Selective plating medium

منابع مورد استفاده

۱-کریمی، یونس، پورمنصور، مهدخت و آسمار، مهدی ۱۳۶۲. توکسوپلاسموز، تولارمی و لیستریوز، انتشارات انستیتو پاستور ایران، ص ۲۵۳-۱۴۰.

۲- وندیوسفی، جلیل؛ مرادی بیدهندی، سهیلا؛ عاملی، مسعود، بررسی میکروبیولوژی *Listeria monocytogenes* به عنوان یک زئونوز. دومین کنگره ملی زئونوزها، آبان ۷۲، تبریز.

۳- وندیوسفی، جلیل؛ مرادی بیدهندی، سهیلا؛ *Listeria monocytogenes* و سروتیپ‌های جدا شده از شیر خام به عنوان عامل زئونوزیس در ایران. دومین کنگره ملی زئونوزها، آبان ۷۲، تبریز.

۴- وندیوسفی، جلیل و همکاران، لیستریوز و تشخیص آن با روشهای ALLO و IF. اولین کنگره سراسری میکروبیولوژی، آبان ۷۱، ساری.

۵- وندیوسفی، جلیل؛ مرادی بیدهندی، سهیلا؛ لیستریا و لیستریوزیس. اولین کنگره سراسری میکروبیولوژی، آبان ۷۱، ساری.

۶- وندیوسفی، جلیل و همکاران، آلودگی شیر به *Listeria monocytogenes* و بررسی مسائل بهداشتی و اقتصادی آن، ششمین کنگره ملی صنایع غذائی، مهر ماه ۱۳۷۲، رامسر.

7- Briones, V. et al. 1992. Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. Am. J. vet. Res., Vol 53, No. 2, PP: 191-193.

8- Carter, G.R., Chengappa, M.M., 1991. Essentials of a veterinary bacteriology and mycology. 4th. ed, Lea and Febiger, PP: 150-163.

9- Cliver, D.O., 1990. Foodborne disease. Academic press, INC, Harcourt Brace Jovanovich publishers. PP: 248-256.

10- Iida, T., Kanzaki, M., Maruyama, T., Inoue, S. and Kaneuchi, C., 1991. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan, Jor. Vet. Med. Sci 53(5) PP: 873-875.

11- Librach, I.M. and Seth, P.K., 1961. Human listerial meningitis. Jor. Clin. Path. 14, PP: 193-195.

12- Luppi, A., Bucci, G., Maini, P. and Rocourt, J., 1988. Ecological survey of *Listeria inocua* in Ferrara area (northern Italy) zentable Bakteriol Mikrobiol Hyg., 469(9) PP: 266-75.

13- Mac Gowan, A.P., Marshall, R.J., Mackay, I.M., Reeves D.S., 1991. Listeria faecal carriage by renal transplant recipients, haemodialysis patients and patients in general practice: its relation to season, drug therapy, foreign travel, animal exposure and diet. Epid. Infec. 106(1), P: 157-166.

14- Marth, E.H., 1988. Disease characteristics of *Listeria monogytogenes*. Food Tech. PP: 165-168.

15- Ortel, S., 1977. New serovariant and/or anitgen combination of *Listeria monoytogenes*. zbl, Bakt. Hyg. 239: 342-346.

16- Ruser, E.T., Marth, E.H., 1991. Listeria and listeriosis and food safety; Marcel Dekker, Inc.

17- Siragusa, G.R. et al., 1993. Isolation of Listeria Spp. from feces of feedlot cattle. Jor. of food prot. 56 (2), PP: 102-109.

18- Wilson, S. and Parker, M.T., 1993. Principles of bacteriology, virology and immunity, 7th. Ed, Parker, M.T., London. Vol. 3, PP: 26-31.

14- Wilson, S. and Parker, M.T., 1983. Principles of bacteriology, virology and immunity, 7th. Ed. Parker, M.T., London. Vol. 2, PP: 53-59.

جدول شماره ۱- اطلاعات مربوط به افراد تحت مطالعه

شغل	تعدادنمونه	جنس		سن						تعداد	تعداد
		مؤنث	مذکر	<۱۰	۱۹-۱۰	۲۹-۲۰	۳۹-۳۰	۴۹-۴۰	۵۰<	تعدادموارد	مورد مثبت
کاسب a	۳۰	-	۳۰	-	۳	۱۱	۶	۲	۸	-	-
محصل	۳۸	۱۹b	۱۹	۱۸	۱۶b	۱۴	-	-	-	۱	٪۳/۷
خانه‌دار	۲۳	۲۳	-	-	-	۹	۴	۳	۷	-	-
کارگرکشتارگاه	۳۰	-	۳۰b	-	-	۵b	۱۳b	۸	۴	۲	٪۶/۶۲
دانشجو c	۴۰	۲۰	۲۰	-	-	۳۴	۶	-	-	-	-
کودک	۱۸	۸	۱۰	۱۸	-	-	-	-	-	-	-
متفرقه	۲۱	۶	۱۵	-	-	۷	۴	۳	۷	-	-
کل	۲۰۰	۷۶	۱۲۴	۳۶	۱۹	۷۰	۳۳	۱۶	۲۶	۳	٪۱/۵

a-مشاغلی‌که با مواد غذایی سروکار دارند(مثل کارگررستوران و...) b - موارد مثبت c - صرفاً دانشجویان دامپزشکی که با حیوانات سروکاردارند.