مروری

شناسایی سریع مهمترین عوامل بیماریزا در آب و مواد غذایی با استفاده ازمحیط های کشت کروموژن

(*Chromogenic Media*)

حمیدرضا توکلی

دانشیار،گروه تغذیه دانشکده بهداشت و مرکز تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی بقیها... (عج)

محمد منافی

دانشیار، مرکز تحقیقات بهداشتی دانشگاه وین ،اتریش

منصور بیات

استادیار، گروه میکروبیولوژی مرکز علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران

علی مهرابی توانا

استاد، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیها... (عج)

نویسنده مسئول: علی مهرابی توانا

تلفن:۰۹۱۲۱۰۹۷۹۵۸

پست الکترونیک:
alimehrabitavana@yahoo.com

آدرس: تهران، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بهداشت

وصول مقاله: ۸۷/۶/۶

اصلاح نهایی:۸۷/۱۰/۲۳

پذیرش مقاله:۸۷/۱۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *یکی از جدیدترین روشهای شناسایی سریع عوامل بیماریزا در آب و مواد غذایی محیطهای کشت کروموژن (رنگ آفرین) است . این محیطهای اختصاصی دارای ترکیباتی اندکه با عنوان سوسبترا برای آنزیمهای مترشحه با میکروارگانیسمها عمل کرده، بسته به نوع آنزیم رنگ خاصی را تولید می‌نمایند. هدف از این مطالعه مروری معرفی محیطهای کروموژن است که ابزاری قدرتمند در شناسایی سریع عوامل باکتریایی و قارچی در نمونه های آب و مواد غذایی اند.*

روش بررسی: *در این بررسی مطالعات انجام گرفته در سالهای ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ بر روی استفاده از محیطهای کشت کروموژن در شناسایی سریع میکروارگانیسمهای بیماریزا درآب و مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است.*

یافته ها: *مطالعات انجام یافته در کشورهای مختلف تایید می نماید که محیطهای کروموژنیک روشی اختصاصی، سریع و حساس بوده وبا استفاده از آنها می توان مهمترین میکروبهای بیماریزای قابل انتقال از طریق آب و مواد غذایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس ، اشرشیا کلی ، سالمونلا ، لیستریا منوسیتوژنز و گونه های کاندیدا براحتی شناسایی نمود.*

نتیجه گیری: *محیطهای کروموژن نسبت به سایر روشهای شناسایی میکروارگانیسمها از حساسیت و ویژگی بیشتری برخوردار بوده، می‌تواند جایگزینی مناسب برای روشهای سنتی و متداول باشد.*

واژه‌های کلیدی: *محیطهای کشت کروموژن، شناسایی سریع ،آب و مواد غذایی ، میکروارگانیسم*

مقدمه

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسمهای بیماریزا در مواد غذایی یکی از موضوعات بسیار مهم در بهداشت مواد غذایی است. در حال حاضر شناسایی و شمارش میکروبها در مواد غذایی با دو روش سنتی و مدرن انجام می‌گیرد.روشهای سنتی روشهایی هستند که غالباً وقت‌گیر بوده و علی‌رغم کم هزینه بودن همواره برای میکروب شناسان مشکل‌ساز می‌باشند. این خلاء بویژه در مواقعی که اعلام سریع نتایج از نظر پزشکی و اقتصادی حائز اهمیت است، بیشتر احساس می‌گردد (۱). اساس این روشها عموماً کشت باکتری در محیطهای مختلف و تولید کلنیهای قابل رویت در یک محیط جامد انتخابی و اجرای آزمایشهای بیوشیمیایی در محیطهای مایع است. در مورد برخی باکتریها مانند سالمونلا حتی مجبور به استفاده از مراحل پیش غنی‌سازی (Pre enrichment) ، غنی‌سازی و کشت در محیط جامد انتخابی(Selective plating) می‌باشیم. خوشبختانه با کشف روشهای سریع تشخیصی، این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است. این روشها دارای سرعت و دقت بسیار بالا ست و با کمک آنها در زمان بسیار کمتری میکروارگانیسم مورد نظر شناسایی می‌گردد(۲). از تکنیکهای جدیدی که در سالیان اخیر در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به روشهای ژنتیکی، فیزیکی، شیمیایی و ایمونولوژیکی اشاره نمود(جدول شماره ۱). Hill معتقد است هر یک از این روشها نیازمند آزمایشگاههای مجهز و کارشناسان مجرب می‌باشد و هزینه‌های نسبتاً بالایی را در بر دارد و هر یک دارای محاسن و نقاط ضعف خاصی است، با وجود این استفاده از تکنیکهایی همچون PCR و ELISA بتدریج جایگاه خود را در تشخیص میکروارگانیسمها بخوبی پیدا نموده‌اند (۳). حقیقت این است که ضرورت استفاده از روشهای شناسایی سریع پاتوژنهای غذایی بیش از پیش احساس می‌گردد. استفاده از محیطهای کروموژن نیز یکی از روشهای مناسب تشخیص سریع است که در سالیان اخیر در کشورهای پیشرفته جهان به جای روشهای سنتی جایگزین گردیده است و استفاده از این محیطهای حساس، دقیق و اختصاصی در شناسایی عوامل بیماریزا نقطه عطفی در میکروب شناسی تحلیلی محسوب شده، ابزاری قدرتمند به حساب می‌آید (۴).

اگرچه استفاده از محیطهای کروم آگار را برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ دکتر رامباخ (A. Rambach) در انستیتو پاستور فرانسه معرفی کرد و آنچه از تاریخچه بهره گیری از محیطهای کروموژن در شناسایی باکتریهای بیماریزا در آب و مواد غذایی در دسترس می باشد عمدتا" به ایشان و همکارانش معطوف می گردد، این محیطها به طور رسمی از سال ۱۹۹۱ تولید و عرضه گردیدند (۵). در دهه اخیر تحقیقات زیادی در ارتباط با شناسایی سریع میکروارگانیسمهای بیماریزا درآب و مواد غذایی با استفاده از محیطهای رنگ آفرین صورت گرفته و مقالات زیادی به چاپ رسیده است(۶-۱۱). اساس این روش ایجاد مادهٔ زمینه‌ای برای آنزیمهای اختصاصی میکروارگانیسمها بوده و بر مبنای رنگ تولید شده براحتی می‌توان نوع میکروارگانیسم را شناسایی نمود (۷). در واقع بسیاری از مواد پس از واکنش با آنزیمهای میکروبی یا دیگر اجزاء آنها محصولات رنگی یا فلورسنت تولید می کنند و از این خاصیت برای شناسایی استفاده می‌شود. سوبستراهای مورد استفاده برای محیطهای کروموژنیک عمدتاً از مشتقات فنل و ایندول و بسیاری از سوبستراهای محیطهای فلورسنت از مشتقات کومارین هستند.

مشتقات بتا دی گلوکورونید یا بتادی گالاکتورونید استفادهٔ گسترده‌ای در کیتها برای شناسایی سریع پاتوژنهای غذایی دارند. این ترکیبات با آنزیمهای میکروبی تجزیه کننده آنها متابولیزه شده، از متابولیسم آنها محصولات رنگی و یا محصولات فلورسنت تولید می‌گردد(۶). سوبستراهای ایندوکسیلی بعد از هیدرولیز با آنزیمهای باکتریال رنگ نیلی indigo روشن ایجاد می کنند. ملکولهای حاوی ترکیبات شلاته کننده فلزات مثل اسکولین Esculin و 8-Hydroxyquinoline نیز کاربرد زیادی در محیطهای کروموژن دارند . محیطهای کروموژن دارای محاسن زیادی هستند که از آن جمله می‌توان به سرعت زیاد، حساسیت بالا، اختصاصی بودن، عدم نیاز به تستهای بیوشیمیایی بعدی در

تشخیص میکروارگانیسم اشاره نمود و تحقیقات انجام یافته در سراسر جهان از سال ۱۹۹۰ تا کنون موارد فوق را ثابت نموده است .

در این مطالعه مروری مطالعات انجام گرفته در سالهای ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ بر روی استفاده از محیطهای کشت کروموژن در شناسایی سریع میکروارگانیسمهای بیماریزا درآب و مواد غذایی در نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفته است. مبنای انتخاب مطالعات توانمندی محیطهای کروموژن در شناسایی میکروارگانیسمها و نقاط ضعف و قوت این روش در مقایسه با روشهای متداول بوده است.

شناسایی عوامل بیماریزا در نمونه های آب و مواد غذایی بوسیله محیطهای کروموژن

با استفاده از محیطهای کروموژن (رنگ آفرین) میکروارگانیسمهای بیماریزای زیر قابل شناسایی هستند:

۱- **کلی‌فرمها و اشرشیاکلی**(*E.coli*)

کلی فرمها و بویژه *E.coli* شاخص میکروبی آلودگی آب و مواد غذایی محسوب می‌گردد و وجود آنها در آب آشامیدنی و مواد غذایی نشانگر آلودگی این مواد به سایر پاتوژنهای روده‌ای است ، بنابراین جداسازی و شمارش این باکتری در تعیین سطح بهداشت مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است(۱۲).

برای شناسایی کلی‌فرمها تولید اسید و گاز از لاکتوز اساس بسیاری از روشها را تشکیل می‌دهد، اما گاهی بعضی از کلی‌فرمهای مدفوعی بویژه *E.coli* به دلیل از دست دادن آنزیم فرمنت هیدروژناز *(Forment hydrogenase)* گاز تولید نمی کنند و همین امرموجب تعاریف آنزیمی جدیدی گردید که از آن جمله میتوان به وجود آنزیمهای بتا- دی گالاکتوزیداز در کلی فرمها و بتا – دی گلوکورونیداز در ۹۶ – ۹۴ درصد از سویه های *E.coli* اشاره نمود. قابل ذکر است که سایر گونه های اشرشیاکلی این آنزیم را تولید نمی کنند (۱۳). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیمها از مواد کروموژن استفاده گردیده است. برای مثال با استفاده از ماده کروموژن ۵-برومو ۴- کلرو ۳-ایندول بتا- دی‌گلوکورونید می‌توان فعالیت آنزیم بتا-دی گلوکورونیداز را در سویه‌های مختلف اشرشیاکلی اندازه گرفت . همچنین ماده کروموژن ۵-برومو ۶-کلرو ۳-ایندول- بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید برای تعیین وجود آنزیم بتا-دی-گالاکتوزیداز مورد استفاده قرار گرفته است. براساس این تعاریف جدید محیطهای کشت تجارتی گوناگونی برای جستجو و شناسایی کلی‌فرمها بویژه *E.coli* با استفاده از مواد زمینه‌ای کروموژن ابداع گردیده است که امکان کشف همزمان این میکروارگانیسمها را در آب و مواد غذایی فراهم می‌نماید. برای مثال می‌توان به محیطهای ال-ام-ایکس*(LMX broth edia)*، ردی کالت *(Ready cult media)* ، کروموکالت *(Chromo cult media)* مرک آلمان)،و محیط کلی‌آی‌دی *(Coli ID media)*بیومریو فرانسه) اشاره نمود(۱۴ ,۱۵).

اشریشیاکلی سویه *O157:H7* یک عامل بیماریزای مهم قابل انتقال از طریق غذا ست و می‌تواند باعث اسهال، کولیت خونریزی دهنده و سندرم اورمی همولتیک*(HUS)* گردد و اپیدمیهای زیادی در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به این باکتری رخ داده است (۱۶).

محیطهای کشت سنتی برای کشت نمونه‌های مشکوک به این *E.coli* مکانکی سوربیتول‌آگار است که ویژگی ضعیفی داشته و دارای موارد فراوان مثبت کاذب است. همچنین در صورت انکوباسیون بیش از حد به دلیل تغییر رنگ کلنی، براحتی قابل تشخیص نخواهد بود(۲). اخیراً محیطهای کشت انتخابی نوینی ابداع گردیده‌اند که امکان جداسازی این سویه از اشرشیاکلی را افزایش می‌دهند. از مهمترین آنها محیط آگار رنگین کمان*Rain bow* (بایولرگ امریکا)، محیط آگار بی‌سی‌ام*BCM O157H7* بیوسنت سوئیس) و محیط کروم آگار *O157* (کروم آگار فرانسه) می‌باشند. محیط اخیر به دلیل ویژگی فوق‌العاده و حساسیت بالا براحتی امکان شناسایی این باکتری بیماریزا را فراهم نموده است. حساسیت کار در این روش ۹۸٪ بوده و کلنی به رنگ ارغوانی قابل شناسایی خواهد بود. سایر گونه‌های اشرشیاکلی در این محیط به رنگ آبی یا

بیرنگ خواهد بود(۱۰, ۱۷).

۲- سالمونلا: محیطهای کشت متداول و سنتی برای شناسایی سالمونلا به دلیل استفاده از شاخص غیر اختصاصی تولید سولفید هیدروژن(*SH2*) دارای ویژگی ضعیفی اند که باعث ایجاد موارد فراوان مثبت کاذب (همچون سیتروباکتر و پروتئوس) می‌گردند(۱). بر روی محیط آگار سالمونلا آی‌دی *Salmonella ID Media (SM-ID)*(بیومریو فرانسه) کلنیهای سالمونلا با رنگ قرمز شناسایی و کشف می‌گردند، در حالی که کلی فرمها در این محیط به رنگ آبی یا بنفش و گونه‌های پروتئوس به صورت بیرنگ ظاهر می‌شوند(۱۷). خصوصیت بیوشیمیایی به کار گرفته شده در این محیط کشت عبارت است از شکل‌گیری اسید از گلوکورونات در تلفیق با یک معرف قرمز خنثی و یک مادهٔ زمینه‌ای کروموژن که امکان افتراق سالمونلا را از سایر آنتروباکتریاسه‌ها فراهم می‌آورد. همچنین عناصر انتخابی محیط عبارتند از املاح صفراوی و سبزدرخشان و آگار رامباخ (مرک آلمان)که ترکیبی از پروپیلن‌گلیکول، پتپون، عصارهٔ مخمر، سدیم‌دزوکسی‌کلات و نوترال‌رد(قرمز خنثی) هستند. محیط کشت کروموژنیک سالمونلا مانند رامباخ آگار و سالمونلا آی دی *(SM – ID)* به دلیل قدرت انتخابی زیاد، تکنسین آزمایشگاه را از اجرای آزمایشها روی کلنیهای غیر واقعی کاملاً بی‌نیاز می کند و بدین طریق فرصت کافی برای تمرکز روی کلنیهای واقعی سالمونلا فراهم می‌گردد. این خصوصیت بویژه در زمان شیوع عفونتهای سالمونلایی در مواد غذایی بسیار اهمیت دارد. محیطهای مذکور انتخابی بوده و اجازهٔ کشف آسان اکثرا گونه‌های سالمونلا را بر مبنای کلنیهای متمایز قرمز رنگ می‌دهد. عیب اصلی آگار رامباخ این است که سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی و برخی از سویه‌های نادر را کشف نمی‌کند. علاوه بر آن، سویه‌هایی از سالمونلا که قادرند بتا-دی گالاکتوزیداز تولید کنند(نظیر سالمونلا آریزونا) بر روی هر دو محیط کشت کلنیهای بنفش مایل به آبی را از خود نشان می‌دهند(۱۸).

۳- استافیلوکوکوس‌اورئوس: عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایعترین عفونتهای غذایی در جهان است و از مهمترین عوامل پاتوژن در زمینه بالینی و عفونتهای بیمارستانی محسوب می‌گردد. منشاء باکتری پوست، مخاطات و دست انسان بوده است و اپیدمیهای زیادی در اثر آلودگی به این میکروارگانیسم گزارش گردیده است(۱۹). از مهمترین محیطهای کشت سنتی برای شناسایی این باکتری پوتیتودکستروزآگار - *Potato Deatrose Agar*) *(PDA* و مانیتول سالت آگار *(Manitol Salt Agar- MSA*) است که بر پایه غلظت بالای نمک و تخمیر مانیتول عمل می کند و دارای موارد مثبت و منفی کاذب فراوان است. همچنین محیط رایج دیگر *(Blood Agar)* است که به همراه آزمایشهایی نظیر تست کوآگولاز که باید حداقل روی ۵ - ۱۰کلنی مشکوک از هر نمونه صورت گیرد، برای تشخیص این باکتری به کار می رود (۲). محیطهای کروموژنیک استافیلوکوکوس اورئوس یک محیط منحصر به فرد با قدرت افتراقی و حساسیت بالای ۹۵٪ (معادل تست کوآگولاز)، امکان شناسایی دقیق و بسیار آسان این پاتوژن را فراهم نموده است. کلنیهای استافیلوکوکوس اورئوس بر روی این محیط دارای ۹۹/۴٪ قدرت افتراقی اند و به رنگ ارغوانی ظاهر می‌گردند و سایر سویه‌های استافیلوکوک به رنگ آبی یا بی‌رنگ در می‌آیند(۲۰-۲۲).

در سالهای اخیر تعداد روزافزونی از بیمارستانها با عفونتهای حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین *(Methicillin Resistance S.aureus- MRSA*)دست به گریبان بوده‌اند و محیطهای کشت رایج نتایج غیرقابل اعتمادی از ردیابی این سویه‌ها را نشان می‌دهند در حالی که محیطهای کروموژنیک تهیه شده برای این سویه‌های مقاوم با قدرت افتراقی و حساسیت ۱۰۰٪ تنها در یک انکوباسیون ۲۴ ساعته قادر به جداسازی این پاتوژن می‌باشند و سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک در این محیط قادر به رشد نخواهند بود(۲۳). *Diedern*و همکاران ، در سال ۲۰۰۶ محیط کروموژن جدیدی را برای تشخیص سویه های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین بکار بردند و به

نتایج مثبتی دست یافتند (۲۴).

٤- لیستریا مونوستیوژنز : این باکتری از عوامل خطرناک ایجاد کنندهٔ مسمومیتهای غذایی است و مقاومت زیادی نسبت به عوامل محیطی نظیر سرما، خشکی و گرما دارد و از مواد غذایی زیادی حتی مواد لبنی پاستوریزه جدا گردیده است(۱). کارایی محیطهای کشت سنتی نظیر آکسفورد و پالکام برای کشت و جداسازی این پاتوژن غذایی همیشه دچار ابهام بوده است. از طرف دیگر متخصصان آزمایشگاه میکروب‌شناسی مجبور به صرف زمان زیادی برای کشت و تأیید کلنیهای مشکوک در روش سنتی می باشند(۲). محیط کروموژنتیک لیستریا*(Chromoagar)* به کمک فنآوری پیشرفته، امکان جدا سازی لیستریامونوستیوژنز را در یک مرحله به طور مستقیم فراهم می‌آورد. حساسیت کار در این روش ۱۰۰٪ بوده و در نمونه کشت شده کلنیهای لیستریامونوستیوژنز به رنگ آبی خاصی دیده می‌شوند و هاله سفید رنگی که حاصل فعالیت فسفولیپیدها ست اطراف آن را فرا گرفته است و امکان تشخیص آن را به آسانی فراهم می‌سازد. لیستریا اینوکوآ در این محیط به رنگ آبی(بدون هاله) و سایر گونه‌های لیستریا به صورت بی رنگ می باشند(۱۷ ,۲۵).

٥- ویبریو: ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو وولنیفیکوس پاتوژنهایی اند که عمدتاً از طریق مصرف آب، سبزیجات و غذاهای دریایی آلوده، مسمومیت غذایی شدید ایجاد می‌نمایند(۱۶). در روش سنتی برای جداسازی و تشخیص از محیط کشت *TCBC* استفاده می گردد که علاوه بر زمان بر بودن، از حساسیت نسبتاً پایینی برخوردار است در حالی که محیط کروموژن اختصاصی ویبریو *(Chromoagar Vibrio)* براحتی این *سه* گونه ویبریو را از سایر گونه‌ها جدا می نماید و حساسیت روش ۹۸/۸٪ تعیین گردیده است. در این محیط ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریولنیفیکوس به ترتیب به رنگهای آبی، سبز و ارغوانی مشاهده می‌گردند و سایر گونه‌های ویبریو بی‌رنگ می‌باشند(۲۶).

٦- گونه‌های مختلف کاندیدا: در بین مخمرهای مختلف جنس کاندیدا نقش مهمی در ایجاد عفونتهای انسانی و فساد مواد غذایی بر عهده داشته و گزارشهای زیادی در مورد عفونتهای ناشی از کاندیدا آلبیکنس وجود دارد(۲۷). جداسازی و شناسایی جنس مخمر در آزمایشگاه چندین روز به طول می‌انجامد و از حساسیت بالایی نیز برخودار نیست، اما کروم‌آگار کاندیدا علاوه بر قابلیت شناسایی مخمرها، توان جداسازی انواع گونه‌های کاندیدا را به طور همزمان و با استفاده از رنگ ثابت کلنیها دارا می‌باشد. همچنین این محیط قادر به ردیابی گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای ضد قارچ است. اساس کار در این محیطها افزودن سوبستراهای رنگ زا برای آنزیم *β-hexosaminidase* می باشد. قدرت افتراق در این روش ۹۹٪ بوده و گونه‌های کاندیدا آلبیکنس به رنگ سبز، کاندیدا تروپیکا به رنگ آبی متالیک و کاندیدا کروزی به رنگ صورتی قابل شناسایی هستند(۲۸). در جدول شماره (۲) میکروارگانیسمهای که با محیطهای کروموژن قابل شناسایی اند نشان داده شده است.

جدول شماره ۱- روشهای جدید تشخیص و جداسازی میکروبهای بیماریزا در مواد غذایی(۲و۳)

ردیف	نام کلی روش	تکنیک ها
۱	روشهای فیزیکی (تشخیص سلولهای میکروبی یا فعالیت آنها)	اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی[1]- فلوسیتومتری[1]- تکنیک مستقیم میکروسکوپی
۲	روشهای شیمائی و بیوشیمیایی	سنجش[1] ATP- تعیین متابولیسم میکروبی[1]
۳	روشهای ایمونولوژیکی (بر پایه آنتی‌بادی)	ایمونوفلورسنس[1]- الایزا[1]- آگلوتیناسیون لاتکس[1]
٤	روشهای ژنتیکی	انواع PCR[1]- هیبریداسیون DNA[1]

جدول شماره ۲- میکروارگانیسم‌های قابل تشخیص توسط محیطهای کروموژن بر حسب گونه، رنگ کلنی، حساسیت ، و ویژگی(۱۷،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۳۳)

گونه	رنگ کلنی	حساسیت(درصد)	قدرت افتراق(درصد)
S.aureus	ارغوانی تا گلی	۹۵/۵	۹۹/٤
S.epidermidis	آبی	۹۵/۵	۹۹/٤
E.coli O157	ارغوانی	۹۸	۹۹
E.coli spp	آبی یا بیرنگ	۹۸	۹۹
Salmonella	قرمز	۱۰۰	۱۰۰
V.cholerae	آبی	۹۹	۹۸/۵
V.vulnificus	سبز	۹۹	۹۸/۵
V.parahaemolyticus	ارغوانی	۹۹	۹۸/۵
L.monocytogenes	آبی با هاله سفید	۱۰۰	۱۰۰
L.innocua	آبی بدون هاله	۱۰۰	۱۰۰
C.albicans	سبز	۹۹	۹۹
C.tropica	آبی متالیک	۹۹	۹۹
C.krusei	صورتی مخملی	۹۹	۹۹

تذکر: محیط کروموژن هر یک از میکروارگانیسم‌های فوق اختصاصی می‌باشد

[1] Impedance measurement
[1] Flow cyetometer
[1] ATP assay (Bioluminescence)
[1] Determination of microbial metabolism
[1] Immunofluorescence
[1] ELISA
[1] Latex aglutination
[1] Polymerase chain reaction
[1] DNA Hybridation

بحث

روشهای سنتی مورد استفاده برای شناسایی عوامل بیماریزا عموماً بر اساس کشت باکتری در محیطهای مختلف و تولید کلنیهای قابل رؤیت در یک محیط جامد انتخابی و اجرای آزمایشهای بیوشیمیایی در محیطهای مایع استوار هستند. این روشها بسیار وقت گیر می باشند. در سالهای اخیر پیشرفتهای بیوتکنولوژی باعث تغییر روشهای آزمایش مواد غذایی گردیده است و امروزه از روشهایی که اختصاصی‌تر، سریعتر و غالباً حساستر از روشهای سنتی می‌باشند، استفاده می‌گردد(۲۹). یکی از روشهای جدید که در دهۀ اخیر برای شناسایی سریع میکروارگانیسمهای بیماریزا در مورد مواد غذایی مطرح است روش استفاده از محیطهای رنگ آفرین(کروموژن) است . این روش در مقایسه با سایر روشها از حساسیت ، ویژگی و کارایی بالاتری برخوردار است.

Rahbar و همکاران در ایران در سال ۲۰۰۸ برای تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) از چهار روش و محیط آزمایشگاهی شامل Oxacillin screen agar,E-Test,Manitol Salt Agar plus و محیط کروموژن CHROM Agar MRSA استفاده نمودند که نتایج آن نشان داد محیط کروموژن مورد استفاده در مقایسه با سایر روشها از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بوده اند ، بطوریکه حساسیت و ویژگی این روش ۱۰۰ ٪ تعیین گردید (۲۹). نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده همخوانی دارد .(۳۱, ۳۰ , ۲۲).

بدیهی است که این روش مانند سایر تکنیکها دارای معایبی است. از مهمترین معایب آنها می توان به اختصاصی بودن محیط مورد استفاده، هزینه بر بودن و کاربری متفاوت این محیطها اشاره کرد .برای مثال محیط ردی‌کالت(Ready calt) فقط برای آب آشامیدنی قابل استفاده است و نمی‌توان از آن برای نمونه‌های غذایی استفاده نمود. گاهی اوقات نیز تشخیص گونه‌های باکتری با این روش امکان پذیر نیست مثلاً در مورد کلستریدیوم پرفرینجنس با این مشکل مواجه می‌گردیم، زیرا اکثراً در آب آلودگی گونه‌های مختلف این باکتری وجود دارد و پس از کشت در محیط کروموژن،رنگهای قرمز زیادی تولید می‌گردد به طوری که امکان تشخیص گونه باکتری وجود ندارد زیرا همۀ کلنیهای قرمز رنگ کستریدیوم پرفرینجنس نیستند. از سوی دیگر چون در این محیط از آمونیوم هیدروکسید استفاده می‌گردد بوی بد آمونیاک ناراحت کننده است و گاهی نیز خود آمونیاک باعث از بین رفتن کلنیها می‌گردد. . این مشکل باعث گردید که برای تفریق گونه‌های باکتری به دنبال یک محیط جدید و اختصاصی کروم آگار برای تشخیص باکتری باشند و محیط جدیدی برای تفریق گونه‌های مختلف کستریدیوم پرفرینجنس تولید گردیده است(C.P.chromagar) که قابلیت تولید رنگهای مختلف را دارا ست و تحقیقات بیشتر بر روی آن ادامه دارد(۴). همچنین در مقایسه با سایر روشهای شناسایی مانند PCR , ELISA هزینه بر است و برای هر یک از نمونه های مورد آزمایش نیاز به محیط کشت اختصاصی می باشد. در حالی که با یک کیت PCR می توان بر روی ۷۰ نمونه آزمایش کرد.

یکی از کاربردهای بسیار مفید این محیطها شناسایی سریع آلودگی آب می‌باشد و استفاده از این تکنیک در پیشگیری از بیماریهای قابل انتقال از طریق آب (Water – Borne Diseases) بسیار حائز اهمیت است. طبق نظر سازمان جهانی بهداشت (WHO) سالیانه ۲/۱ میلیون نفر در سراسر جهان از طریق مصرف آب آلوده جان خود را از دست می‌دهند. این موضوع بویژه در بحرانها و شرایط نظامی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است ، زیرا در این شرایط بایستی سریعاً و در کوتاهترین زمان ممکن نسبت به آلوده بودن یا نبودن آب مصرفی اعلام نظر کرد و استفاده از محیطهای کروموژن بسیار رهگشا خواهد بود. در روشهای سنتی برای تشخیص کلی فرمها و E.coli که شاخص آلودگی آب هستند زمان زیادی صرف می‌شود، بعلاوه اینکه چندین گروه از باکتریها هستند که قادر به تولید اسید از لاکتوز می‌باشند(مانند کلبسیلا، سیتروباکتر، آنتروباکتر و...) که شاید وجود همه آنها دال بر آلودگی آب نباشد(۲۷)،بنابراین ما نیاز

به استفاده از روشهای سریع و اختصاصی داریم تا قادر باشد کلی فرمها و خصوصاً E.coli را براحتی شناسایی نماید. بررسی ما نشان داد با توجه به اهمیت این باکتری به عنوان شاخص آلودگی آب و مواد غذایی بیشترین مطالعات بر روی این میکروارگانیسم صورت پذیرفته است. در این ارتباط Afnor و همکاران ۲۵۰۰ نمونه آب را مورد آزمایش قرار دادند که در تمامی موارد نتیجهٔ آزمایش رضایت بخش بوده است و حتی سویه‌های مختلف اشرشیاکلی نیز تشخیص داده شدند(۱۷). برای این منظور از محیطهای کشت آبگوشت فلوئوروکالت(LMX) و ردی‌کالت (Ready cult) استفاده گردید که امکان کشف سریع و همزمان کلی فرمها و اشرشیاکلی را با استفاده از ترکیب کروموژن ۵- برومو – ۴ – کلرو ۳- ایندول بتادی گالاکتوپیرانوزاید و ترکیب فلوئوروژن ۴- متیل – بتادی – گلوکورونايد در یک محیط کشت واحد فراهم می‌آورند. همچنین افزودن ماده ۱- ایزوپروپیل – بتا – دی – ۱ – تیوگالا کتوپیرانوزاید (IPTG) که به سهولت لاکتوز ایجاد می‌نماید باعث تحریک ساخت و افزایش فعالیت بتا گالا کتوزیداز می‌گردد. با این روش به طور انحصاری ۹۹٪ از اشرشیاکلیها قابل شناسایی اند. در بررسی ای که Manafi و همکاران بر روی ۱۲۴۶ نمونه آلوده به سویه های مختلف اشرشیاکلی انجام دادند، ۱۲۴۰ سویه(۹۹٪) با استفاده از محیطهای کروموژن شناسایی شدند و فقط تعداد اندکی از باکتریهای غیر کلی فرمی مانند سویه‌هایی از سراتیا، هافنیا، ویبریو و ائروموناس واکنش مثبت کاذب داشتند. وی معتقد است استفاده از این محیطها در مقایسه با روشهای استاندارد، در طی ۲۴ ساعت کلی فرمها و اشرشیاکلی را کشف می‌کند(۱۵).Banadonna و همکاران در مطالعه خود (۲۰۰۷) نشان دادند که این محیطها نسبت به سایر روشها و تستهای تأییدی از حساسیت بیشتری در تشخیص E.coli در نمونه های آب برخوردارند(۳۲). Pitkanen و همکاران نیز با استفاده از محیطهای کروموژن در شناسایی کلی فرمها در آبهای آلوده به E.coli توانایی شناسایی وجود باکتری را با این روش تایید نمودند (۳۳). Stampi و همکاران در ایتالیا از این روش برای شناسایی E.coliO157:H7 در فراورده های گوشتی گاو استفاده نمودند (۳۴) و Gonzalez و همکاران نیز برای شناسایی آلودگی غذاهای آماده مصرف (Ready-to Eat) از محیطهای کروموژن اختصاصی استفاده کرده اند(۳۵) .استفاده از محیطهای کرموژن و فلوئوروژن برای کشف فعالیت بتا– دی گالاکتوزیدز به منظور افتراق سویه های مختلف آنتروکوکها توجه قابل ملاحظه‌ای را به خود معطوف کرده است. تا کنون مواد زمینه‌ای نظیر ۴- متیل فریل- بتا- دی – گلوکوزاید و ایندوکسیل بتادی گلوکوزاید (Diofo ۱۹۹۵) برای کشف فعالیت آنزیم بتادی گلوکوزیداز شرح داده شده است. محیط ردی کالت آنتروکوکسی(مرک آلمان) از واکنش بتادی گلوکوزیداز به عنوان معرف وجود آنتروکوکها بهره می‌برد. در این واکنش ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندول – بتادی‌گلوکوپیرانوزید آزاد و سریعاً اکسید شده، تبدیل به برومو‌کلرو ایندیگو می‌گردد که رنگ آبی را در محیط آبگوشت کروموکالت و ردی کالت آنتروکوکسی ایجاد می‌نماید (۱۱،۴).

نتایج به دست آمده از منافی و همکاران با کشتهای خالص بر روی ۱۰۴ نمونه آب آشامیدنی در اتریش نشان داد که ۹۷٪ از سویه‌هایی که نتایج مثبت به همراه داشتند با عنوان آنتروکوکها شناسایی گردیده‌اند و در ۳٪ موارد با سویه‌های مثبت کاذب مواجه گردیدند(گونه‌هایی از لوکونوستوک، لاکتوکوکوس لاکتیس و ا ئروکوکوس). این روش نتایج مثبتی را با نمونه های آب پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ارائه داد. این محیط انتخابی، سریع و حساس است و همچنین به کارگیری و تفسیر آن آسان می‌باشد(۳۷).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعهٔ مروری بر تحقیقات انجام گرفته در دهه اخیر در نقاط مختلف جهان نشان می دهد که محیطهای کروموژن ابزاری بسیار سودمند برای شناسایی سریع پاتوژنهای بیماریزا در آب و مواد غذ ایی اند و با استفاده از آنها مهمترین میکروبهای بیماریزای قابل انتقال از طریق آب و مواد غذایی نظیر گونه هایE.coli, S.aureus,Salmonella

L.monocytogenesو گونه هاCandida براحتی شناسایی میگردند(۴،۱۱،۱۴،۱۵،۱۷،۱۸، ۲۰،۲۵،۲۶،۲۸،۲۹،۳۲،۳۳،۳۶) این روش در مقایسه با سایر روشها، روشی سریع، دقیق ومطمئن است و می‌تواند جایگزینی مناسب برای روشهای سنتی و متداول باشد، زیرا استفاده از این محیطها باعث گردیده است که نیاز به تهیه کشتهای فرعی و آزمونهای بیوشیمیایی اضافی برای تشخیص عوامل بیماریزا از میان برود و در اسرع وقت عوامل بیماریزا تشخیص داده شوند. این موضوع بویژه برای شرایط بحرانی (Disasters) و اضطراری برای پیشگیری از بروز بیماریهای با منشاء آب و مواد غذایی از اهمیت بیشتری برخوردار است.

با توجه به محدودیتهای موجود در شناسایی سویه های مختلف برخی از باکتریها تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری است. مطالعه بر روی سوشهای باکتریها و بررسی همزمان شناسایی باکتریهای بیماریزا با روشهایی نظیر PCR و کیتهای آشکار ساز میکروبی و مقایسه آنها با روشهای متداول از چشم انداز های تحقیقاتی آینده محسوب می گردد.

در پایان باید اذعان نمود استفاده از محیط های کروموژن نسبت به روشهای متداول هزینه براست و از نظر اقتصادی توجیهی ندارد، اما با توجه به کارایی ، حساسیت و ویژگی بالای آن و هزینه کمتر نسبت به سایر روشهای تشخیص سریع، نظیر PCRو ELISA برای شرایط بحرانی و اضطراری توصیه می گردد.

References

1-Adams MR & Moss M. *Food microbiology (3th edition),Royal society of chemistry publications, London*, UK, 2002;pp: 527-30.

2-Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. *Compendium of methods for the microbiological examination*. 3rd ed. American Public Health Association1992 ;36: 605-609.

3- Hill W.E. *The use of PCR technique for detection of Food-borne Pathogens*. J. of Food Mic., 2004; 18:1191-99.

4-James A.L, Perry J.D, Rigby A, Stanforth S.P. *Synthesis and evaluation of novel chromogenic aminopeptidase substrates for microorganism detection and identification.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2007; 17 (5):1418-1421.

5- Ten L.N, Im W.T, Kim M.K, Kang M.S, Lee S.T. *Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates*. Journal of Microbiological Methods. 2004; 56 (3):375-382.

6- Manafi M. *New developments in Chromogenic and flurogenic culture media*. Int.j. Food Mcrobial, 2000; 60: 205-18.

7- Bayat M. and Manafi M. *Chromogenic and flurogenic enzyme substrates in culture media and identification tests*.Int. J.Food Microbiol. , 2005; 131: 45-48.

8- Mardones G, Venegas A. *Chromogenic plate assay distinguishing bacteriolytic from bacteriostatic activity of an antibiotic agent*. J.of Microbiological Methods. 2000; 40 (3):199-206.

9- Keener W.K, Watwood M.E, Schaller K.D, Walton M.R, Partin J.K, Smith W.A, Clingenpeel S.R. *Use of selective inhibitors and chromogenic substrates to differentiate bacteria based on toluene oxygenase activity*. Journal of Microbiological Methods 2001; 46 (3):171-185.

10- Hara-Kudo Y, Ikedo M, Komatsu O, Yamamoto S, Kumagai S. *Evaluation of a chromogenic agar medium for isolation of Escherichia coli O26*. Food Control 2002; 13 (6-7):377-379.

11- Wutor V.C, Togo C.A, Limson J.L, Pletschke B.I. A *novel biosensor for the detection and monitoring of [beta]-d-galactosidase of faecal origin in water*. Enzyme and Microbial Technology .2007; 40 (6):1512-1517.

12- Muller EE, Ehlers MM, Grabow WOK. *The occurrence of E. Coli O157 : H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption*. Water Research 2001; 35 (13):3085-3088.

13- Beauchamp C.J., Simao-Beaunoir A.M, Beaulieu C, Chalifour F.P. *Confirmation of E. coli among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips screening rejects and paper sludges*. Water Research .2006; 40 (12):2452-2462.

14- Manafi M, Romans H, Geissler K.M. *Quantative Determination of total Coliforms and E.coli in marine waters with chromogenic and flourogenic media.* J. Appl. Bacteriol.2004; 98: 280-285.

15-Geissler K, Manafi M, Amorós I, Alonso JL.*Quantitative determination of total coliforms and Escherichia coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media*. J Appl Microbiol. 2000;88(2):280-5.

16- Tavakoli H.R. *The study of bacterial pathogens (E,coli , S.aureus , V.paraheamolyticus) in seafoods of Iran.* World aquaculture congress, Italy, 2006;pp: 117-118.

17- Afnor S, Alonso B. *Detection of E.coli O157H7 in water samples by chromogenic media*. J. Applied and Environ. Mic . 2004; 69: 6103-6110.

18-Gaillot O, Kuhn H, Wonde B. *Evaluation of Rambach agar detection of Salmonella subspecies*. J. Appl. Environ. Microbiol. 2005;60: 749-751.

19-Archer G.L. *Staphylococcus aureus: A well-armed pathogen*. Clin. Infect.Dis.1998; 26: 1179-1181.

20-Gaillot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P.*Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of Staphylococcus aureus from human clinical specimens*. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1587-91.

21-Voss A. and Doebbelinf B.N. *The worldwide prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents. 1995; 5:101-106.

22-Taguchi H, Kaneko T. and Onozaki M. *Evaluation of a new chromogenic medium for isulation of MRSA*. Kansenshogako Zasshi(Japanese). 2004; 78:54-58.

23- Athanasopoulos A, Devogel P, Beken C, Pille C, Bernier I, Gavage P.*Comparison of three selective chromogenic media for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus detection*. Pathol Biol (Paris). 2007;55(8-9):366-9.

24-Diederen BM, van Leest ML, van Duijn I, Willemse P, van Keulen PH, Kluytmans JA. *Performance of MRSA ID, a new chromometric medium for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 586-588.

25- Manafi M., Restaino P, Schubert L, Isolation and detection of L. *monocytogens using protect media*. J. Appl. Bacteriol. 2005; 62: 244-51.

26-Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishina T, Saitoh A, Nakagawa H, Ichihara T,etal. *Detection of TDH-producing Vibrio parahaemolyticus O3:K6 from naturally contaminated shellfish using an immunomagnetic separation method and chromogenic agar medium*.Kansenshogaku Zasshi. 2001;75(11):955-60.

27-Varnam A.H, Evans M.G. *Foodborne Pathogens: An Illustrated Text.* (Paperback) , Wolfe, London, 1996:327-53.

28- Odds F.C, Bern R. *Evaluation of Candida Chromagar media for detection of Candida Spp*. J. of Food mic . 2004; 37:1023-29.

29-Rahbar M, Islami P and Saremi M. *Evaluation of a new CHROM AGAR Medium for detection of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008,11(3):496-498.

30- Stoakes L, Reyes R, Daniel J, Lennox G, John MA, Lannigan R, Hussain Z. *Prospective comparison of a new chromogenic medium, MSRA select, to CHROMagar MSRA and manitol-salt medium supplemented with oxacillin or cefoxtin for detection of methicilin- resistant Staphylococcus aureus* .J. Clin. Microbiol. 2006; 44:637-639.

31 Flayhart D, Hindler JF, Bruckner DA, Hall G, Shrestha RK, Vogel SA, etal. *Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aurus from surveillance cultures of the anterior nares*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:5536-5540.

32-Bonadonna L, Cataldo C, Chiaretti G, Coccia A, Semproni M. *A new method for the detection of coliforms and Escherichia coli in water intended for human consumption*. Ig Sanita Pubbl. 2005;61(6):569-84.

33- Pitkanen T, Paakkari P, Miettinen I.T, Heinonen-Tanski H, Paulin L, Hanninen M.L. *Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and Escherichia coli in non-disinfected water*. Journal of Microbiological Methods. 2007; 68 (3):522-529.

34- Stampi S, Caprioli A, De Luca G, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F. *Detection of Escherichia coli O157 in bovine meat products in northern Italy*. International Journal of Food Microbiology .2004; 90 (3):257-262.

35- Gonzalez R.D, Tamagnini L.M, Olmos P.D, de Sousa G.B. *Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and Escherichia coli determination in ready-to-eat foods*. Food Microbiology. 2003; 20 (5):601-604.

36- Manafi M, Kremsmaier B. *Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting Escherichia coli O157:H7 in food*. International Journal of Food Microbiology. 2001; 71 (2-3):257-262.

37 -Manafi M. Betts S.A, Windhager k. *Rapid Identification of Entrococci in water with a new Chromogenic assay*. Abstract of the 97th meeting of the American Society for microbiology, Miami, U.S.A. 2005.