تعیین عوامل باکتریایی موجود در پوسته و زرده تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده و تمیز عرضه‌شده در تبریز

منصور خاکپور[1*]، مجتبی بزرگ‌نیا[2]

1- گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.
2- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: khakpour@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: 90/1/24 پذیرش نهایی: 90/4/31)

چکیده

بیماری‌های مشترک باکتریایی جزو مهم‌ترین بیماری‌های عفونی انسان محسوب می‌شوند. در این بین بیماری‌های قابل‌انتقال از غذا دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. از بین مواد غذایی با منشأ دامی، تخم‌مرغ به‌دلیل نوع استفاده در محصولات غذایی مانند سس‌ها، چاشنی‌های غذایی، بستنی و انواع غذاها که ممکن است به‌صورت خام یا نیم‌پز مورد استفاده قرار گیرد همواره می‌تواند به‌صورت بالقوه منشأ آلودگی و انتقال بیماری‌ها به انسان باشد. در این پژوهش با مراجعه به مرغداری‌های اطراف تبریز با نمونه‌برداری از تولیدات روزانه، تعداد 120 عدد تخم‌مرغ انتخاب و در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از انجام مراحل کشت (استفاده از محیط‌های کشت برین هارت براث، برین هارت آگار، بلاد آگار، آبگوشت تتراتیوات، آبگوشت سلنیتF، آبگوشت تیو گلیکولات، XLD آگار، سالمونلا شیگلا آگار و...) رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های اکسیداز و کاتالاز، باکتری‌های موجود بر روی پوسته و داخل زرده جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفت. از بین 120 نمونهٔ مورد بررسی، در 19 مورد(15/83٪) آلودگی زرده به اثبات رسید. از این تعداد 73/68% را گرم منفی‌ها و 26/31% را گرم مثبت‌ها شامل می‌شدند. بیشترین سهم گرم منفی‌های زرده به سودوموناس با فراوانی 8/3% وگرم مثبت‌ها باسیلوس با فراوانی 4/16% تعلق داشت. همچنین از نمونه‌های اخذشده از پوسته 119 مورد از 120 نمونهٔ پوسته دارای آلودگی‌های باکتریایی بودند که 99/16% کل نمونه‌ها را تشکیل می‌داد. از این میان 55/ 23 نمونه‌ها گرم منفی و % 76/44 گرم مثبت بودند. بیشترین سهم گرم منفی‌های پوسته مربوط به جنس سودوموناس با فراوانی 18/33% در کل پوسته‌ها بود، اشریشیا با 10/83%، پروتئوس با 5/83% و سیتروباکتر با 4/16% در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. از میان گرم مثبت‌های جداشده از پوسته بیشترین سهم متعلق به باسیلوس با فراوانی 80% بود و استافیلوکوک با 34/16%، استرپتوکوک با 15%، رودوکوک با 9/16% و میکروکوک با 7/5% در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. براساس نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان گفت که استفاده و مصرف تخم‌مرغ‌های با پوسته کثیف در محصولات غذایی یک ریسک جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود و می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌های غذازاد باکتریایی شود.

واژه‌های کلیدی: عوامل باکتریایی، تخم‌مرغ، پوسته، زرده

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

بیماری‌های زئونوز باکتریایی از با اهمیت‌ترین بیماری‌های عفونی می‌باشند (Tabatabayi, 2001) به‌طوری‌که سه بیماری سالمونلوز، سل و بروسلوز مهم‌ترین معضل عفونی جوامع انسانی محسوب می‌شوند (Quinn, 2002).

در بین بیماری‌های زئونوز بیماری‌های منتقله از غذا از اهمیت ویژه‌ای از نظر بهداشت عمومی برخوردار می‌باشند به‌طوری‌که امروزه با توجه به معضل افزایش بیماری‌های نوپدید و بازپدید مثل سل، بروسلوز، آنفولانزا و ویبریوها که اغلب توسط مواد غذایی به انسان انتقال پیدا می‌کنند لزوم ایجاد همکاری حرفه‌ای مابین پزشکان و دامپزشکان جهت ارتقاء سطح سلامت جامعه، بیش از پیش احساس می‌شود (Tabatabayi, 2001). از بین مواد غذایی با منشأ دامی تخم‌مرغ به‌دلیل نوع استفاده در تولیدات غذایی مانند: سس‌ها، چاشنی‌های غذایی، بستنی و انواع غذاها که ممکن است به‌صورت خام و یا نیم‌پز مورد استفاده قرار گیرد، همواره می‌تواند به‌صورت بالقوه منشأ آلودگی و انتقال بیماری‌ها به انسان باشد (March, 1969). به‌طوری‌که امروزه مطالعات گسترده‌ای در این زمینه صورت می‌گیرد و برخی عوامل عفونی باکتریایی نظیر: سالمونلا، کمپیلوباکتر، یرسینیا و ... اغلب از طریق تخم‌مرغ آلوده به انسان منتقل می‌شود که به‌عنوان یک مشکل بهداشتی حتی در جوامع پیشرفته محسوب می‌شود (Favier, 2008) به‌طوری‌که در دهه 80 شیوع بالای سالمونلوز در انگلستان باعث شد تا در یک دوره زمانی مصرف تخم‌مرغ در این کشور ممنوع اعلام شود (Tabatabayi, 2001). از سوی دیگر مطالعات گسترده در زمینه کاهش آلودگی‌های تخم‌مرغ از طریق استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده، پرتو فرابنفش، پرتو گاما و روش‌های حرارتی نشان‌دهنده اهمیت موضوع می‌باشد (De Reu, 2005; Favier, 2008).

با توجه به موارد فوق شناسایی عوامل باکتریایی موجود در تخم‌مرغ‌های عرضه‌شده به بازار از یک طرف می‌تواند امکان تدوین یک برنامه اصولی و مدون در کنترل و پیشگیری بیماری‌های ناشی از این مواد غذایی را فراهم کند و از طرف دیگر می‌تواند محکی باشد بر برنامه‌هایی که در مؤسسات تولید و عرضه تخم‌مرغ در جهت کاهش آلودگی‌ها صورت می‌گیرد.

پژوهش حاضر در نظر دارد نوع عوامل باکتریایی موجود در تخم‌مرغ‌های عرضه شده در بازار تبریز را که به مدفوع آلوده هستند شناسایی و در کنارآن مقایسه‌ای با آلودگی‌های تخم‌مرغ‌های تمیز انجام دهد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه با مراجعه به 3 مرکز تولیدکننده تخم‌مرغ که محصولات آن روانه بازار تبریز می گردد، با نمونه‌برداری از تولیدات روزانه اعم ازتخم‌مرغ‌های آلوده به مدفوع و پاک، تعداد 120 عدد تخم‌مرغ جمع‌آوری گردید. بدین‌ترتیب که از هر شانه تخم‌مرغ که حاوی تخم‌مرغ‌های آلوده بودند به‌صورت جداگانه در شرایط استریل تخم‌مرغ‌ها برداشته و بعد از قرار

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دادن آنها در کیسه‌های نـایلونی در بسـته اسـتریل، در کوتاه‌ترین زمان ممکن بـه آزمایشـگاه میکروبیولـوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـدتبریز ارسال گردید. ضمناً از هر کدام از شـانه‌هـای حـاوی تخم‌مرغ آلوده، تعداد 2 عدد تخم‌مرغ سالم بـه‌عنـوان شاهد به همان روش به آزمایشگاه منتقل شد.

در آزمایشگاه هر بار تعداد مشخصی تخم‌مـرغ تحـت آزمایش قرار گرفت بدین‌صـورت کـه پـس ازانتقـال تخم‌مرغ‌ها به آزمایشگاه، در شرایط اسـتریل در کنـار شعله، تخم‌مرغ‌ها از کیسه استریل خـارج گردیـد. بـا کشیدن سوآب آغشـته بـه سـرم فیزیولـوژی اسـتریل برروی پوسته تخم‌مرغ‌هـا، از آنهـا نمونـه تهیـه و بـه محیط بـرین هـارت بـراث (آبگوشـت قلـب و مغـز گوساله) به‌منظور غنی‌سازی انتقال داده شـد، بعـد از نمونه‌برداری از پوسته، تخم‌مرغ‌ها به‌صورت جداگانـه به‌منظور ضدعفونی در داخل بشرهای استریل حـاوی الکل 70 % که قبل از شروع آزمایش آماده شـده بـود قرار گرفتند به‌نحـوی کـه آسـیبی بـه پوسـته آن وارد نشود. تخم‌مرغ‌ها به‌مدت 1 ساعت در این شرایط رها شدند تا با ضدعفونی کامل پوسته احتمال آلودگی بـه هنگـام شکسـتن پوسـته و نمونـه‌بـرداری از زرده بـه حداقل برسد. برای تهیه نمونه از زرده تخـم‌مـرغ بـه ترتیب زیر عمل شد:

تخم‌مرغ هـا از درون بشـر بیـرون آورده شـده و بـرای جلوگیری از ورود الکل به داخل محتویات تخم‌مـرغ در هنگام شکسـتن، سـطح تخـم‌مـرغ بـا تـامپون اسـتریل به‌خوبی خشک گردید و در کنار شـعله چـراغ الکلـی و به کمک یک پنس استریل پوسته تخم‌مرغ شکسته شـده سپس به کمک یک سمپلر با سر سـمپلر اسـتریل مقـدار 1 سی‌سی از زرده نمونه‌برداری و به 2 محـیط بـرین هارت براث و تیوگلیکولات انتقال داده شد. (لازم بـه ذکر است که برین هارت براث بعد از انتقال زرده بـا لرزاننده (Shaker) کاملا مخلوط هم زده شـد). بـرین هارت براث‌های کشـت داده شـده از زرده و پوسـته بـرای 24 سـاعت در دمـای 37 درجـه سلسـیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند.

سـپس، محـیط‌هـای غنـی‌سـازی بـرین هـارت بـراث کشت‌شده با نمونه‌های پوسـته و زرده، جهـت بررسـی شواهد رشد باکتری در آن مورد بازرسی قرار گرفتند، در ادامه کار در صورت مشاهده رشد باکتری با نشانه ایجاد کدورت در محیط، 2 مسیر مورد پی‌گیری قرار گرفت:

1- در مسـیر اول، بعـد از نمونـه‌بـرداری از محـیط غنی‌سازی با آنس استریل در محیط بلاداگار به‌صـورت خطی کشت داده شد و به‌مدت 24 ساعت در انکوبـاتور گرم‌خانه‌گذاری گردید. بعد از سپری شـدن ایـن مـدت کلنی‌های رشدیافته بر روی این محیط بررسی گردیدنـد. در صورت رؤیت بیش از یک نوع کلنی بر روی محیط، اقدام به انجام کشت خالص‌سازی گردید بـدین‌صـورت که با اسـتفاده از یـک آنـس اسـتریل از هـر نـوع کلنـی متفاوت رشدیافته، بر روی یک محـیط عمـومی مغـذی همچون بلاداگار یا برین هارت آگار کشت خطی داده و بـرای 24 سـاعت در انکوبـاتور 37 درجـه سلسـیوس گـرم‌خانـه‌گـذاری گردیـد. بعـد از اتمـام مرحلـه خالص‌سازی، برای رسیدن به جنس بـاکتری جداشـده،

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مبادرت به انجام رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط OF، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و همچنین کشت در محیط مک کانکی آگار برای تفریق جنس آن‌دسته از باکتری‌ها که در رنگ‌آمیزی، گرم منفی بودند، گردید.

2- در مسیر دوم به‌دلیل اهمیت جنس سالمونلا در آلودگی‌های غذایی و خطر بالای آن برای سلامتی جوامع انسانی، به‌طور جداگانه به بررسی و جستجوی این باکتری گرم منفی پرداخته شد.

بدین‌صورت که با نمونه‌برداری از برین هارت براث با استفاده از آنس استریل مبادرت به کشت در 2 محیط مایع آبگوشت سلنیت و آبگوشت تتراتیونات گردید. پس از طی شدن زمان 18- 15 ساعته انکوباسیون در 37 درجه سلسیوس از آنها در محیط X.L.D آگار، کشت خطی به‌عمل آمد (محیط انتخابی گرم منفی‌ها و افتراقی برای سالمونلا) و با گذشت زمان 24 ساعته انکوباسیون، محیط‌های کشت‌شده XLD آگار مورد بازرسی قرار گرفت. در صورت مشاهده کلنی‌های هم‌رنگ محیط کشت، شفاف با مرکز سیاه (SH2) با مشکوک شدن به خانواده سالمونلا به بررسی توانایی تجزیه اوره و لیزین و تولید رسوب SH_2 در آنها و همچنین کشت در محیط‌های افتراقی سالمونلا شامل: مالنات، سیمون سیترات، SIM، تریپل شوگرآیرون آگار و MR-VP و در نهایت با تأیید سالمونلا مبادرت به انجام تست‌های تأیید تشخیصی با آنتی‌سرم پلی‌والان گردید.

در رابطه با سرنوشت محیط‌های کشت بی‌هوازی تیوگلیکولات، بعد از انجام کشت مستقیم از زرده، درب لوله‌ها به‌دقت بسته شده و درجه سلسیوس مورد انکوباسیون قرار گرفت. بعد از سپری شدن این مدت محیط‌ها مورد بازرسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده رشد باکتری و ایجاد کدورت در این محیط، اقدام به کشت خطی در یک محیط عمومی همچون برین هارت آگار یا بلاداگار و انکوباسیون در 37 درجه سلسیوس در جار بی‌هوازی حاوی گازپک A برای 48-24 ساعت گردید در ادامه در صورت مثبت بودن رشد باکتری در این محیط مبادرت به انجام رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های تفریقی اکسیداز و کاتالاز و کشت در محیط OF به‌منظور تشخیص تفریقی کلستریدیوم‌ها با سایر باکتری‌ها من‌جمله استافیلوکوک که هوازی- بی‌هوازی اختیاری است گردید. (لازم به ذکر است که کلستریدیوم باسیل گرم مثبت، فرمنتاتیو و اکسیداز و کاتالاز منفی است که در پژوهش ما یافت نگردید).

یافته‌ها

میزان آلودگی باکتریایی درپوسته

جدول 1: فراوانی آلودگی در پوسته

آلودگی در پوسته	فراوانی %
درکل تخم‌مرغ‌ها	99/16
در تخم‌مرغ‌های با پوسته کثیف	98/82
در تخم‌مرغ‌های با پوسته تمیز	100

جدول 2: مقایسه درصد آلودگی کل پوسته در 2 گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

حالت	Z	پارامتر
n.s	(P-Value 0.05) 0/64 < 1/96	مقایسه میزان آلودگی در پوسته

n.s: غیرمعنی‌دار
S: P<0.05
SS: P<0.01

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

میزان آلودگی در زرده

جدول3: فراوانی آلودگی در زرده

آلودگی در زرده	فراوانی %
درکل تخم‌مرغ‌ها	15/83
در تخم‌مرغ‌های با پوسته کثیف	16/47
در تخم‌مرغ‌های با پوسته تمیز	14/28

جدول 4: مقایسه درصد آلودگی کل زرده در دو گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

حالت	Z	پارامتر
n.s	(P-Value 0.05) 0/3 < 1/96	مقایسه میزان آلودگی در زرده

n.s: غیرمعنی‌دار
S: P<0.05
SS: P<0.01

جدول 5: فراوانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت سطح پوسته

نوع باکتری‌های سطح پوسته	فراوانی %
گرم منفی (-gr)	23/55
گرم مثبت (+gr)	76/45

جدول6: فراوانی باکتری‌های گرم منفی (- gr) پوسته

خانواده	جنس	فراوانی در کل تخم‌مرغ‌ها	فراوانی در تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده	فراوانی در تخم‌مرغ‌های با پوسته تمیز
Enterobacteriacae	E.coli	10/83	11/76	8/57
	Enterobacter	2/5	3/52	-
	CitroBacter	4/16	4/70	2/75
	Proteus	5/83	7/05	2/75
	Salmonella	0/83	1/17	-
	Bordetella	0/83	1/17	-
	Pseudomonas	18/33	5/88	40
	Actinobacillus	1/66	2/35	-
	Francissella	1/66	2/35	-
	Aeromonas	0/83	1/17	-

جدول 7: مقایسه درصد آلودگی باکتری‌های گرم منفی در پوسته 2 گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

حالت	Z	پارامتر
n.s	0/51 < 1/96	E.Coli
n.s	1/126 < 1/96	Enterobacter
n.s	0/46 < 1/96	Citrobacter
n.s	0/89 < 1/96	Proteus
n.s	0/64 < 1/96	Salmonella
n.s	0/64 < 1/96	Bordetella
SS	4/65 > 1/96 4/65 > 2/5	Pseudomonas
n.s	0/91 < 1/96	ActinoBacillus
n.s	0/91 < 1/96	Francissella
n.s	0/64 < 1/96	Aeromonas

n.s: غیرمعنی‌دار S: P<0.05 SS: P<0.01

جدول 8: فراوانی باکتری‌های گرم مثبت(+ gr) پوسته

جنس	فراوانی در کل تخم‌مرغ‌ها	فراوانی در تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده	فراوانی در تخم‌مرغ‌های با پوسته تمیز
Bacillus	80	81/17	77/14
Staphylococcus	34/16	43/52	11/42
Streptococcus	15	15/29	14/28
Rhodococcus	9/16	9/41	8/57
LactoBacillus	0/83	1/17	-
Eryseopelotrix	3/33	3/52	2/75
Micrococcus	7/5	10/58	-
Corynebacter	3/33	4/70	-
مخمر	0/83	1/17	-

جدول9: مقایسه درصد آلودگی باکتری‌های گرم مثبت در پوسته 2 گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

حالت	Z	پارامتر
n.s	0/50 < 1/96	Bacillus
SS	3/37 > 1/96 3/37 > 2/5	Staphylococcus
n.s	0/14 < 1/96	Streptococcus
n.s	0/14 < 1/96	Rhodococcus
n.s	0/64 < 1/96	Lactobacillus
n.s	0/18 < 1/96	Eryseopelotrix
S	2/00 > 1/96 2/00 < 2/5	Micrococcus
n.s	0/64 < 1/96	Corynebacter
n.s	0/64 < 1/96	مخمر

n.s: غیرمعنی‌دار S: P<0.05 SS: P<0.01

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول 10: فراوانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت آلوده‌کننده زرده

نوع باکتری‌های آلوده‌کننده زرده	فراوانی %
گرم منفی (-gr)	73/68
گرم مثبت (+gr)	26/31

جدول 11: فراوانی باکتری‌های گرم منفی(-gr) زرده

جنس	کل تخم‌مرغ‌ها	با پوسته آلوده	با پوسته تمیز
Acinetobacter	1/66	1/17	2/85
Enterobacter	0/83	1/17	-
Pseudomonas	8/3	3/52	20
ActinoBacillus	0/83	1/17	-

جدول 12: مقایسه درصد آلودگی باکتری‌های گرم منفی در زرده دو گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

پارامتر	Z	حالت
Acinetobacter	0/65 < 1/96	n.s
Enterobacter	0/64 < 1/96	n.s
Pseudomonas	2/97 > 1/96 2/97 > 2/5	SS
ActinoBacillus	0/64 < 1/96	n.s

n.s: غیرمعنی‌دار
S: P<0.05
SS: P<0.01

جدول 13: فراوانی باکتری‌های گرم مثبت (+ gr) زرده

جنس	کل تخم‌مرغ‌ها	با پوسته آلوده	با پوسته تمیز
Bacillus	4/16	5/88	-

جدول 14: مقایسه درصد آلودگی باکتری‌های گرم مثبت در زرده 2 گروه تخم‌مرغ با پوسته تمیز و آلوده

پارامتر	Z	حالت
Bacillus	1/47 < 1/96	n.s

n.s: غیرمعنی‌دار
S: P<0.05
SS: P<0.01

بحث و نتیجه‌گیری

با بررسی نتایج به‌نظر می‌رسد فراوانی بالای باسیلوس، استافیلوکوکوس و سودوموناس می‌تواند ناشی از آلودگی‌های محیطی باشد چرا که این باکتری‌ها علاوه‌براین‌که جزو مهم‌ترین و فراوان‌ترین باکتری‌های موجود در محیط و غشاهای طبیعی می‌باشند، نسبت به شرایط بد محیطی نیز مقاومت بالایی دارند (به‌ویژه استافیلوکوکوس و سودوموناس)، همچنین از دلایل بالا بودن میزان این باکتری‌ها می‌توان به رشد ساده و سریع آنها در مقایسه با سایر باکتری‌ها اشاره کرد که باعث می‌شود نمونه‌های بیشتری در قیاس با باکتری‌های سخت رشد جدا شوند. Kaleidari و همکاران با انجام پژوهشی در سال 1385 این‌طور بیان داشتند که باسیلوس‌ها به‌طور طبیعی در مدفوع وجود دارند و آلودگی پوسته تخم‌مرغ از طریق مدفوع در بالا بردن میزان جداسازی این دسته ازباکتری‌ها حائز اهمیت است (Kaleidari, 2005). در درجه بعدی اهمیت، بالا بودن میزان آلودگی به انتِروباکتریاسه در پژوهش حاضر می‌تواند ناشی از آلوده شدن تخم‌مرغ به ترشحات دستگاه گوارش در کلوآک مرغ در حین تخمگذاری باشد. میزان بالای این دسته از باکتری‌ها در مدفوع، بالا بودن درصد جداسازی آنها را در پژوهش حاضر توجیح می‌کند. به‌ویژه بالا بودن نسبی این باکتری‌ها در تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده در این تحقیق موید مطلب فوق است.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

با بررسی نتایج پژوهش‌های مشابه و مقایسه آن با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی‌های فراوانی در این زمینه مشاهده می‌گردد.

در تحقیق Seviour و همکاران در سال 1973، باسیلوس‌ها به‌ویژه *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* از پوسته جداسازی گردید که فراوانی *باسیلوس سرئوس* جداگردیده از پوسته 16/41% بود (Seviour, 1972).

کلیدری و همکاران در سال 1385 با کار بر روی 120 عدد تخم‌مرغ قابل‌جوجه‌کشی، میزان آلودگی پوسته را 96/66% و میزان آلودگی را در زرده 3/3% گزارش نمودند. همچنین بیشترین میزان باکتری جداشده از جنس باسیلوس با فراوانی 86/6% و در درجه بعدی اهمیت استافیلوکوک با فراوانی 19/9% می‌باشد. همچنین بر طبق نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق Bruce و همکاران در سال 1978 عمده باکتری‌های آلوده‌کننده پوسته تخم‌مرغ‌های هچ نشده شامل: استرپتوکوک، استافیلوکوک، سودوموناس، میکروکوک، باسیلوس و خانواده انتروباکتریاسه بودند که با پژوهش ما هم‌خوانی دارد (Kaleidari, 2005).

De Reu و همکاران در سال 2006 با انجام تحقیقی روی پوسته تخم‌مرغ‌ها، بیشترین باکتری جدا شده را سودوموناس با فراوانی 60% اعلام نمودند، همچنین Musgrove و همکاران در سال 2008 با نمونه‌برداری از پوسته تخم‌مرغ‌ها، بیشترین باکتری غیرخانواده انتروباکتریاسه را سودوموناس ذکر نمودند که با بیشترین باکتری گرم منفی جداشده از پوسته در پژوهش ما هم‌خوانی دارد (De Reu 2006; Musgrove, 2007).

در ارتباط با میزان پایین آلودگی زرده در مقایسه با پوسته نکات ذیل قابل‌توجه می‌باشد. تخم‌مرغ دارای سدهای فیزیکی و شیمیایی متعددی است که در جلوگیری از نفوذ باکتری‌ها نقش مهمی دارد که احتمال رسیدن آلودگی به زرده را به حداقل می‌رساند.از طرف دیگر برای نفوذ آلودگی از پوسته به محتویات تخم‌مرغ فاکتور زمان بسیار مؤثر هست.

در پژوهش ما، 15/83% آلودگی در زرده به اثبات رسید. از این تعداد، بیشترین سهم به سودوموناس با فراوانی 8/3% تعلق داشت. لازم به ذکر است که 73/68% آلودگی زرده ناشی از باکتری‌های گرم منفی بود که حدود 3 برابر بیشتر از فراوانی باکتری‌های گرم مثبت جداگردیده از زرده است (26/31%) و این درحالی است که میزان این فراوانی‌ها روی پوسته دقیقاً عکس این حالت است (گرم منفی 23/55% و گرم مثبت 76/45%) این تفاوت را می‌توان تا حدود زیادی به‌خاطر قدرت ضدباکتریایی سفیده دانست. که به‌دلیل داشتن لیزوزیم باعث تخریب دیواره باکتری‌های گرم مثبت شده و مانند سدی از میزان نفوذ و رشد این باکتری‌ها می‌کاهد. همچنین De Reu و همکاران در سال 2006 با انجام تحقیقی نشان دادند که اغلب باکتری‌های نفوذی به زرده، جزو دسته گرم منفی‌ها، متحرک و غیرخوشه‌ای (تکی) بودند و بیشترین سهم را سودوموناس‌ها تشکیل می‌دادند که کاملاً با پژوهش ما تطابق دارد (De Reu, 2006).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

در سال 2003، Cook و همکاران با انجام مطالعه‌ای بر روی عفونت‌های منتقل‌شونده از طریق پوسته تخم‌مرغ، گزارش نمودند که در 16% موارد، باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از پوسته جدا شده‌اند که در این بین بیشترین موارد شامل *اشریشیاکولای* و پروتئوس ودر درجه بعدی اهمیت سراتیا، سیتروباکتر، انتروباکتر و یرسینیا بودند. همچنین باکتری سودوموناس در 15% پوسته‌ها و 22% زرده‌ها گزارش شده است و باسیلوس‌ها با 39% فراوانی بیشترین باکتری جداشده از پوسته بودند و در نهایت باکتری‌های جنس استرپتوکوک، استافیلوکوک و میکروکوک در 20% پوسته‌ها گزارش شدند (Cook, 2003).

در ارتباط با عوامل مهم بیماری‌زای منتقل‌شونده توسط تخم‌مرغ به‌ویژه سالمونلا در پژوهش حاضر تنها یک مورد مثبت از پوسته به‌دست آمد که آن هم از *سروار انتریتیدیس* بود و هیچ سالمونلایی از زرده جداسازی نگردید. جمشیدی با انجام تحقیقی در سال 1363 بر روی پانصد عدد تخم‌مرغ مصرفی، تنها 1 مورد سالمونلا و Poppe و همکاران در سال 1992 با نمونه‌برداری از چهارده هزار تخم‌مرغ اخذشده از چند گله تخم‌گذار در کانادا فقط 1 مورد *سالمونلا انتریتیدیس* از پوسته جدا کردند (Poppe, 1992). Jones و همکاران در سال 2007 با نمونه‌برداری از تخم‌مرغ‌های مصرفی، میزان 1/1% سالمونلا از پوسته، Shareef و همکاران با ارزیابی صد عدد تخم‌مرغ بومی و تخم اردک در عراق، 6 % *سالمونلا تیفی‌موریم* از پوسته و Ching-Lee و همکاران در سال 1991 با بررسی تخم‌مرغ‌های خوراکی در هاوائی 9/4% سالمونلا از پوسته جداسازی کردند. Ozyer و همکاران در سال 1992 با تحقیق بر روی 400 عدد تخم‌مرغ صنعتی موفق به جداسازی سالمونلا از پوسته یا محتویات نشدند (Ching, 1991; Jones, 2007; Ozyer, 1999; Shareef, 1997).

در رابطه با آلودگی محتویات به سالمونلا در پژوهش ما، مورد مثبتی یافت نگردید که با تحقیق Chapman و همکاران که در سال 1998 بر روی 1000 عدد تخم‌مرغ اخذشده از گله‌ای با آلودگی طبیعی به *سالمونلا تیفی‌موریوم* انجام شد و موفق به جداسازی سالمونلا از محتویات تخم‌مرغ نشدند هم‌خوانی دارد (Chapman, 1988).

Hayemi و همکاران در سال 1376 با نمونه‌گیری از 1200 عدد تخم‌مرغ در تهران 9 مورد سالمونلا با فراوانی کمتر از 1% از محتویات تخم‌مرغ‌ها جدا کردند. همچنین در پژوهشی که در سال 1382 توسط جعفری و همکاران بر روی 300 تخم‌مرغ بومی مصرفی در اهواز انجام گرفت، 1/66% آلودگی سالمونلایی از محتویات تشخیص داده شد (Hayemi, 1997; Jaafari, 2006).

بر طبق نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق Musgrove و همکاران در سال 2007، این محققین این‌گونه بیان داشتند که انتقال از پوسته نقش مهمی در آلودگی محتویات به *سالمونلا انتریتیدیس ندارد* (Musgrove, 2007).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

با مطالعه نتایج، مشخص می‌شود که آلوده بودن یا نبودن پوسته به مدفوع نمی‌تواند دلیل بر عدم وجود باکتری باشد. نکته‌ای که می‌بایست مورد توجه قرار گیرد این است که آلوده بودن پوسته به مدفوع می‌تواند منجر به افزایش تعداد باکتری بر روی پوسته شده و ریسک آلوده کردن محتویات را افزایش دهد. همان‌طورکه De Reu و همکاران در سال 2006 در تحقیق خود این‌گونه نتیجه‌گیری کردند که پوسته تخم‌مرغ‌های مورد نفوذ قرار گرفته (دارای ترک) در مقایسه با پوسته‌های مورد نفوذ قرار نگرفته و همچنین محتویات تخم‌مرغ‌های آلوده به مدفوع در مقایسه با محتویات تخم‌مرغ‌های غیرآلوده، به‌طور مشخصی میزان بالاتری از آلودگی باکتریایی را نشان می‌دهند. Jones و همکاران با انجام تحقیقی در سال 2004 نشان دادند که تخم‌مرغ‌های شسته‌شده تجاری به‌طور مشخصی دارای آلودگی کمتری از لحاظ جمعیت باکتریایی نسبت به تخم‌مرغ‌های نشسته هستند. نکته دیگری که از نظر سلامت جامعه واجد اهمیت است این مسأله است که بالا بودن میزان آلودگی پوسته در هنگام شکستن پوسته تخم‌مرغ به‌منظور استفاده از تخم‌مرغ به‌صورت خام، می‌تواند باعث آلودگی محتویات و بروز آلودگی گردد (De Reu, 2006; Jones, 2007).

در ارتباط با نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون آماری Z موارد ذیل قابل‌ذکر است:

1- مقایسه درصد آلودگی کل پوسته در دو گروه مورد آزمایش (تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده و تمیز) در دو سطح اطمینان 95% و 99% با توجه به P-Value اختلاف معنی‌دار نیست. این نتایج نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که آلوده بودن و یا نبودن پوسته به مدفوع نمی‌تواند دلیلی بر بودن یا نبودن باکتری باشد. در ارتباط با مقایسه جداگانه هر کدام از جنس‌های باکتریایی تقریباً در ارتباط با تمامی جنس‌ها میزان جداسازی باکتری از تخم‌مرغ‌های با پوسته آلوده بیشتر بود هرچند برخی از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند به‌ویژه در مورد خانواده انتروباکتریاسه، جنس باسیلوس، استافیلوکوک، استرپتوکوک . اما نتایج از لحاظ آماری در مورد برخی از این جنس‌ها همچون استافیلوکوک و میکروکوک معنی‌دار بودند.

تنها استثناء، جداسازی بیشتر جنس سودوموناس در گروه با پوسته تمییز می‌باشد. با توجه به نتایج خام، متوجه می‌شویم که اغلب موارد مربوط به نمونه‌های اخذشده از یکی از مراکز می‌باشد که می‌تواند ناشی از آلودگی بالای محیطی این مرکز باشد.

2- در ارتباط با آلودگی زرده در دو گروه مورد آزمایش، میزان جداسازی باکتری در گروه با پوسته آلوده بیشتر بود، به‌ویژه در مورد باکتری‌های گرم مثبت هیچ مورد مثبتی در گروه با پوسته تمیز جدا نشد درحالی‌که در 5/88% موارد، گروه با پوسته آلوده، باکتری گرم مثبت جدا گردید.

در مورد باکتری‌های گرم منفی نیز فراوانی انتروباکتریاسه در گروه با پوسته آلوده بیشتر بود. جداسازی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

سودوموناس بیشتر در گروه با پوسته تمیز نیز ناشی از نحوه نمونه‌برداری می‌باشد که در بالا توضیح داده شد.

با توجه به نتایج فوق به‌نظر می‌رسد که آلوده نبودن پوسته به مدفوع نمی‌تواند در مصرف تخم‌مرغ به‌صورت خام یا نیم‌پز اطمینان‌بخش باشد. وجود آلودگی مدفوعی بر روی پوسته تخم‌مرغ باعث افزایش تعداد باکتری بر روی آن گشته و ریسک آلودگی محتویات تخم‌مرغ به‌ویژه در زمان شکستن تخم‌مرغ را در پی خواهد داشت. عدم استفاده از تخم‌مرغ‌های به‌شدت آلوده از لحاظ ظاهری و همچنین شستشوی با دقت تخم‌مرغ‌های با آلودگی ظاهری کمتر قبل از شکستن آن جهت دسترسی به محتویات به‌منظور کاهش ریسک انتقال عوامل باکتریایی به محتویات، اکیداً توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از آقای ابراهیم شرقی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز قدردانی می‌گردد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

منابع

- Ÿ Chapman, P.A., Rhodes, P. and Rylands, W.(1988). *Salmonella typhimurium* phage type 141 infections in Sheffield during 1984 and 1985: association with hens' eggs. Epidemiology and infection, 101: 75-82.
- Ÿ Ching–Lee, M.R. and Katz, A.R. (1991). Salmonella egg survey in Hawaii. Evidence for routine bacterial surveillance. American Journal of Public Health, 81(60): 764-766.
- Ÿ Cook Mark, I., Beisinger Steven, R., Toranzos Gary, A., Rodriguez Roberto, A. and Arendt, W.J. (2003). Trans-shell infection by pathogenic micro-organism reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation. Proceedings of the Royal Society, 270: 2233-2240.
- Ÿ De Reu, K., Grijspeerdt, K., Herman, L., Heyndrickx, M., Uytendaele, M., Debevere, J., Putirulan, F.F. and Bolder, N.M. (2005). The effect of a comerical UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. Letters in applied Microbiology, (42): 144-148.
- Ÿ De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J. and Herman, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. British Poultry Science, 46(2): 142-149.
- Ÿ Favier, G.I., Escudero, M.E. and De Guzman, A.M.S. (2008). Thermal inactivation of *Yersinia Entrocolitica* in liquid egg products. Journal of Food Safety, 28: 157-169.
- Ÿ Jaafari, R., Fazlara, A. and Dalirannia, A. (2006). An investigation into Salmonella contamination of native hens eggs in Ahvaz, Iranian Veterinary journal, 2: 58-63.
- Ÿ Jones, D.R. and Musgrove, M.T. (2007). Pathogen prevalence and microbial levels associated with restricted shell eggs. Journal of Food Protection, 70(9): 2004-2007.
- Ÿ Hayemi, P., Hadian, Z. and Velaii, N. (1997). The distribution of Salmonella infection in egg yolks consumed in Tehran Province, Iran Veterinary Association Journal, 10: 27-30.
- Ÿ Kalidari, G.A., Pourakhondi Darzi, H. and Hashemitabar, G.R. (2005). Isolation and identification of facultative aerobic- anaerobic gram-positive bacteria in hatching eggs. Journal of Veterinary Research, 61:115-118.
- Ÿ March, B.E. (1969). Bacterial infection of washed and unwashed eggs with reference to Salmonellae. Applied Microbiology, 17: 98-101.
- Ÿ Musgrove, M.T., Northcutt, J.K., Jones, N.A. and Harrison, M.A. (2007). Enterobacteriacae and Related Organisms Isolated from Shell Eggs Collected During Commercial Processing. Poultry Science, 87: 1211-1218.
- Ÿ Ozyer, M. and Inal, U. (1999). Studies on the isolation of Salmonella from eggs. Etlik-Veterinary Microbiology-Dergisi, 7(2): 109-115.
- Ÿ Poppe, C., Johnson, R.P., Forsbery, C.M. and Irwin, R.I. (1992). *Salmonella enteritidis* and other Salmonellae in laying hens and eggs from flocks with Salmonella in their environment. Canadian Journal of Veterinary Research, 56(3): 226-232.
- Ÿ Quinn,P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002). Veterinary Microbiology Disease by Blackwell Science, 2: 176-180.
- Ÿ Seviour Elizabeth, M., Sykes Felicity, R. and Board, R.G. (1972). A microbiological survey of the incubated eggs of chickens and waterfowl. British Poultry Science, 13: 549-556.
- Ÿ Shareef, A.M., Al-Sanjary, R.A. and Hassan, A.A. (1997). Recovery of two types of Salmonella from eggs of range rearing hens and ducks. Iraqi Journal of Veterinary Science, 10(2): 25-28.
- Ÿ Tabatabayi, A.H. and Firouzi, R. (2001). Diseases of animals due to Bacteria. Tehran University Press, pp. 255-259 [In Farsi].

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

A comparative study of bacterial agents in eggs, with or without eggshell's contamination that produced in Tabriz.

Khakpoor, M.[1*], Bozorgnia, M. [2]

1. Department of pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine , Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Ggraduated of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Corresponding author email: khakpour@iaut.ac.ir
(Received: 2011/4/13 Accepted: 2011/7/22)

Abstract

Objective

Zoonotic bacterial diseases are considered as the most important human infectious diseases. In this category, a disease that transfer and infect human through food has an special role. Among foods with animal origin, eggs due to their application as food ingredient in food products, like sauces, spices, ice creams and other food products that may use in half cooked or crude forms, always has the potential to transfer microbial pathogens to human. This study is about to prove that presence of remainder feces on eggshells leads the penetration of bacterial agents into egg yolk. A total of 120 daily egg samples (with and without fecal contamination) were collected from henneries around Tabriz and transferred immediately to microbiology laboratory. After performing microbial examinations (using BHI Broth, BHI Agar, Blood Agar, Selenite F, Tetrationate, XLD,SS Agar),Gram Staining, Oxidase and Catalase tests, bacteria of eggshells and egg yolks has been identified. Out of 120 eggs, 15.83% bacterial contaminants were found in egg yolks samples. Among them, 73.68% were gram negative and 26.31% were gram positive. Among gram negatives, Pseudomonas with occurrence of 8.3% and in gram positives group, Bacillus with abundance of 4.16% were the most frequent bacterias. Also in samples collected from eggshells, 99.16% of the eggs demonstrated bacterial contamination which 23.55% of positive samples were among gram negative group and 76.44% were gram positive. The most contribution of eggshell gram negative bacterias were relevant to Pseudomonas, E.coli, Proteus and Citrobacter with respectively 18.33%,10.83%,5.83% and 4.16% rations. Among gram positive bacteria that isolates form eggshell samples for the most frequent bacterias, were Bacillus, *Staphylococccus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus* and *Micrococcus* with respectively 80.00%, 34.16%, 15%, 9.16% and 7.5% rations. Use and consumption of eggs with shells contaminated with faces in food products is a serious risk factor for human health and can lead to zoonotic bacterial diseases by transferring bacterial pathogens.

Key words: Bacterial contamination, Egg, Eggshell, Egg yolk

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com