Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۱: ۸۳-۷۳

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* جدا شده از نمونه‌های کبد مرغ و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بدست آمده

اشکان جبلی جوان[۱]، سید حسام الدین عمادی چاشمی*[۲]، حمید استاجی[۳]، حسین اخلاقی[۴]

۱- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴- فارغ التحصیل دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

چکیده

هلیکوباکتر پولوروم یک عامل بیماریزای گرم منفی و زئونوز است که باعث مشکلات گوارشی در انسان و پرندگان می‌شود. اهداف این مطالعه، بررسی شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ با استفاده از روش‌های کشت باکتریایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بدست آمده با استفاده از روش انتشار دیسک در نواحی مختلف شهر سمنان بود. در مجموع، ۵۰ نمونه‌ی کبد بسته بندی شده از مراکز فروش مواد پروتئینی از نواحی مختلف در شهر سمنان تهیه شد. با استفاده از روش کشت باکتریایی و آزمون‌های بیوشیمیایی، ۱۷ نمونه (۳۴٪) آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* بودند. با استفاده از تست واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که به موازات روش کشت بر روی نمونه‌های کبد انجام شد، ۱۱ نمونه (۲۲٪) از نظر آلودگی به *هلیکوباکتر پولوروم* تشخیص داده شدند. با توجه به نتایج آزمون تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تمام نمونه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بودند و کمترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، کولیستین و اریترومایسین با فراوانی ۱۴٪ مشاهده گردید. این مطالعه، اولین بررسی شیوع و مقاومت میکروبی *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ است که در شهر سمنان انجام شده و مطالعات بیشتری در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. گذشته از این، مطالعه‌ی حاضر با توجه به حساسیت پایین آزمون‌های بیوشیمیایی در تشخیص *هلیکوباکتر پولوروم* پیشنهاد می‌کند که تست واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌تواند به عنوان یک روش حساس و قابل اعتماد در شناسایی *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ استفاده شود.

کلمات کلیدی: *هلیکوباکتر پولوروم*، کبد مرغ، روش کشت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

*نویسنده مسئول: سید حسام الدین عمادی چاشمی

آدرس: : استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران . تلفن: ۳۳۶۵۴۱۲۵-۰۲۳

پست الکترونیک: hesamemadi@semnan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از پر مصرف‌ترین منابع پروتئین حیوانی که اهمیت بالایی در سبد غذایی انسان دارد، گوشت مرغ می‌باشد. همچنین، فراورده‌های جانبی طیور نظیر کبد به دلیل ارزان بودن و ارزش غذایی بالا از محبوبیت زیادی برخوردار هستند. همچنین کبد به عنوان بزرگترین غده‌ی بدن و نقشی که در متابولیسم پروتئین‌ها و چربی‌ها در اختیار دارد، از اهمیت بالایی در بدن پرنده برخوردار است (۱). مضاف بر اینکه کبد به علت میزان مواد معدنی و ویتامین‌هایی که دارد، می‌تواند یک ماده‌ی مغذی برای مصرف کنندگان باشد (۲). در نتیجه فراورده‌های طیور به لحاظ مصرف عمده‌ی آن می‌توانند یکی از راه‌های انتقال پاتوژن‌های زئونوز به انسان باشند. به علت آلودگی‌هایی که در بخش‌های مختلف پرورش طیور و کشتارگاه ها وجود دارد، احتمال انتقال عوامل بیماری‌زا با مصرف گوشت نیم‌پز یا خام به انسان وجود دارد (۴). ذکر این نکته خالی از لطف نیست که صنعت طیور ایران با تولید سالیانه حدود ۲ میلیون تن گوشت مرغ در رتبه‌ی اول در خاورمیانه قرار گرفته است (۳). از بین پاتوژن‌های زئونوز و بیماری‌زا نظیر *سالمونلا انتریکا*، *کمپیلوباکتر* و یا *اشریشیا اکلی*، گونه‌ی *هلیکوباکتر پولوروم* از اهمیت بالایی در ارتباط با سلامت انسان، بخصوص سلامت کودکان برخوردار است (۵).

باکتری‌های جنس *هلیکوباکتر* تقریبا به دو گروه گاستریک و انتروهپاتیک تقسیم بندی می‌شوند. باکتری‌های گاستریک هلیکوباکتر به علت تولید آنزیم اوره‌آز قادر به زنده ماندن در محیط اسیدی معده می‌باشند (۶). گونه‌ی هلیکوباکتر پولوروم از دسته پاتوژن های زئونوز و گرم منفی است که در گروه انتروهپاتیک *هلیکوباکترها* قرار گرفته و فاقد توانایی تولید اسپور است، همچنین این باکتری بدون تاژک بوده و طول سلول باکتریایی ۳ تا ۴ میکرون و عرض آن ۰/۳ تا ۰/۵ می‌باشد. این پاتوژن بیماری‌زا برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ در روده و کبد مرغ گوشتی و مرغ تخم گذار و همچنین در مدفوع انسان‌های دچار مشکلات گوارشی شناسایی شد (۸). باکتری‌های انتروهپاتیک همچون *هلیکوباکتر پولوروم* به صورت طبیعی در بافت معده توانایی زیستن ندارند و بیشتر در سطح مخاطی روده و یا کبد کلونیزه می‌شوند (۷).

هلیکوباکتر پولوروم توانایی تولید اکسیداز و غالبا کاتالاز را دارد و همانطور که ذکر شد قدرت تولید آنزیم اوره‌آز و همچنین قدرت هیدرولیز هیپورات سدیم را نیز ندارد. این پاتوژن برای رشد به شرایط میکروآئروفیلیک نیاز داشته و توانایی رشد در دمای ۳۷ تا ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد را دارا می‌باشد (۸ و ۹).

در مطالعات متعددی نشان داده شده است که این پاتوژن توانایی ایجاد آلودگی در انسان و انواع مختلفی از پرندگان نظیر مرغ گوشتی، مرغ تخم گذار، بوقلمون و مرغ شاخدار را دارد (۸، ۱۰-۱۲). اخیراً این پاتوژن از گوشت مرغ خام یا پخته نشده نیز جدا شده است که نشان‌دهنده‌ی زئونوز بودن آن می‌باشد (۵).

گزارش‌های وسیعی در خصوص وجود *هلیکوباکتر پولوروم* درقسمتهای متنوع دستگاه گوارش پرندگان بخصوص سکوم وجود دارد. در یک مطالعه، شیوع این باکتری در سکوم مرغ گوشتی و تخم گذار تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۱). گوشت مرغ و فراورده‌های آن نظیر جگر به دلیل هزینه پایین، دسترسی آسان و مواد مغذی نظیر پروتئین، ویتامین و مواد معدنی به عنوان یکی از مهم‌ترین غذاهای قابل مصرف در بین مردم ایران رواج یافته است (۱۳). در این راستا، بررسی سلامت و ایمنی این ماده‌ی غذایی امری ضروری به

www.SID.ir

Archive of SID

شمار می‌آید. با این وجود، مطالعات بسیار کمی در مورد شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در کبد مرغ در سراسر دنیا گزارش شده است. به طور کلی، بیشترین شیوع گزارش شده در مورد این پاتوژن در کبد مرغ در تحقیقات Mohamed و همکاران (۲۰۱۰) در مصر برابر با ۴۷ درصد بوده است (۱۴). ولی متأسفانه تا الان هیچ گونه مطالعه‌ای مبنی بر بررسی و شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* بر روی کبد مرغ در سرتاسر استان سمنان صورت نگرفته است. گذشته از این، مطالعات قبلی در خصوص بررسی این پاتوژن در بسته بندی‌های خوراکی نبوده و بروی لاشه‌ی پرندگان انجام شده اند؛ لذا این تحقیق برای اولین بار در سمنان به بررسی این موضوع می‌پردازد. برای درمان پاتوژن‌های بیماری‌زا نظیر *هلیکوباکتر پولوروم*، درمان با آنتی بیوتیک از بهترین روش‌ها برای کاهش بار میکروبی می‌باشد. امروزه گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در اثر مصرف غیر اصولی و بی‌رویه‌ی این مواد ضد میکروبی در کشاورزی یا دامپزشکی بخصوص در صنعت طیور به یک معضل جهانی تبدیل شده است. این مقاومت در باکتری *هلیکوباکتر پولوروم* نیز دیده می‌شود (۴). علی‌رغم موارد گفته شده، هیچ گونه مطالعه‌ای مبنی بر بررسی حساسیت یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مورد *هلیکوباکتر پولوروم* در کبد مرغ در ایران وجود ندارد.

با توجه به اهمیت مطالب فوق الذکر، این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی قطعات بسته‌بندی‌شده‌ی کبد مرغ گوشتی عرضه شده در مراکز فروش مواد پروتئینی شهر سمنان به *هلیکوباکتر پولوروم* با استفاده از روش‌های کشت باکتریایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و همچنین تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج در دامپزشکی و پزشکی با استفاده از روش انتشار دیسک صورت گرفت.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

تعداد نمونه‌ی مورد آزمایش در این مطالعه بر اساس شیوع قبلی *هلیکوباکتر پولوروم* در کشور و با استفاده از فرمول محاسبه حجم نمونه کوکران با سطح خطای ۵ درصد، ۵۰ نمونه تخمین زده شد (۱۵و ۱۷).

این مطالعه‌ی ناحیه‌ای در شهر سمنان انجام گرفت و در ابتدا، با جست و جو در سطح شهر و شناسایی فروشگاه‌های عرضه کننده‌ی کبد مرغ در نواحی مختلف، بسته بندی‌های کبد که تولید روز بودند، خریداری شد. همه‌ی نمونه‌ها در شرایط بهداشتی و در کنار یخ در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل و بلافاصله مورد آزمایش قرار گرفتند.

جداسازی و شناسایی *هلیکوباکتر پولوروم*

نمونه برداری از کبدها در شرایط استریل و در آزمایشگاه انجام شد و مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه با استفاده از تیغ جراحی استریل به داخل لوله‌های حاوی بولتون براث (Bolton broth, Merck Germany)، خون لیز شده‌ی اسب و مکمل آنتی بیوتیک انتقال داده شد. نمونه‌ها به داخل جار بی‌هوازی با گازپک نوع C (Anaerobic Gas Pack Type C, Merck Germany) قرار داده شدند و در داخل انکوباتور با دمای ۱±۴۱/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴±۴۴ ساعت گذاشته شدند. سپس، فیلتر غشایی استات سلولز با ابعاد ۰/۶۵ (Sartorius, Germany) بر روی پلیت‌های کلمبیا آگار (Columbia agar, Merck Germany) حاوی خون دفیبرینه‌ی گوسفند قرار داده شد تا بتوان تعدای از باکتری های غیر مرتبط را که از لحاظ اندازه متفاوت می باشند را حذف کرد. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع انکوبه گذاری بر روی فیلتر ریخته شد

www.SID.ir

Archive of SID

و پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس با استفاده از پنس استریل، فیلتر از روی پلیت حذف شده و پلیت‌ها به مدت ۴±۴۴ ساعت در دمای ۱±۴۱/۵ درجه انکوبه گذاری شدند (۵).

آزمون های تشخیص افتراقی

ابتدا پلیت‌های مثبت از نظر رشد پرگنه و ریخت شناسی بررسی شدند و پرگنه‌های مشکوک به *هلیکوباکتر پولوروم* (کوچک، ریز و سفید متمایل به خاکستری) بر روی محیط کلمبیا آگار حاوی خون دفیبرینه‌ی گوسفند کشت مجدد داده شدند و سپس به مدت ۴۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. از پرگنه‌های خالص شده برای رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز و نیترات استفاده شد. تست اوره‌آز برای تفریق گونه‌ی *هلیکوباکتر پولوروم* و جنس کمپیلوباکتر استفاده شد به این صورت که نمونه‌هایی که اوره‌آز منفی بودند به عنوان *هلیکوباکتر پولوروم* در نظر گرفته شدند. نمونه‌های *هلیکوباکتر پولوروم* تأیید شده، در محیط کشت مایع قلب-مغز (Brain Heart Infusion broth, Merck Germany) همراه با گلیسرول در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا انجام آزمایش های مولکولی نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی و انجام PCR

استخراج ژنومی DNA، از نمونه های کبد خریداری شده از سطح شهر با استفاده از روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل انجام شد (۱۶). در مطالعه حاضر از تست واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص مستقیم نمونه های بافتی و همچنین برای تایید پرگنه های حاصل از روش جداسازی باکتری، استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از آغازگرهای توصیف شده به وسیله‌ی Stanley و همکاران (۱۹۹۴) استفاده گردید (۸). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر از DNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه تهیه گشت. تمامی محصولات PCR مورد آزمایش در این مطالعه از قبیل آغازگر و مسترمیکس از شرکت تجاری تکاپوزیست تهیه گشت. برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی برای انجام PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، هیبرید شدن آغازگرها در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط شدن DNA در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۹۰ ثانیه و و پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود. محصولات بدست آمده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۵ v/cm رانده شد و باندهای تشکیل شده در UV Transillumination (Padideh Nojen Pars, Iran) بررسی گردیدند. ژنوم استخراج شده از پرگنه‌های جدا شده از کبد مرغ به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

آزمون حساسیت میکروبی

جهت انجام تست آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک، کشت باکتری‌ها به روی محیط مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton agar, Merck Germany) انجام پذیرفت. در این مطالعه از ۱۲ دیسک آنتی‌بیوتیکی (HiMedia, India) رایج مورد استفاده در دامپزشکی و پزشکی شامل نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، نئومایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۱۵ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، کولیستین (۱۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰

www.SID.ir

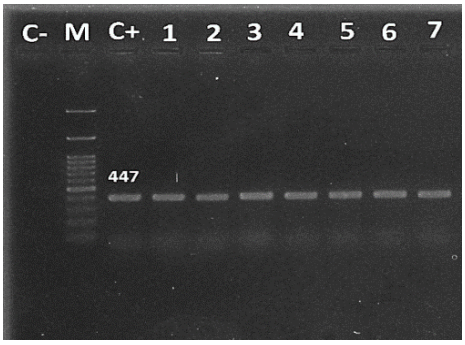
Archive of SID

میکروگرم)، کلرآمفنیکل (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلاریترومایسین (۱۵ میکروگرم) و فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم) استفاده گردید. به این منظور پس از تهیه‌ی محلول معادل نیم مک فارلند از سوسپانسیون باکتریایی، کشت در محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت به گونه ای که دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش توسط پنس استریل با فاصله‌ی معین از یکدیگر و از لبه‌ی پلیت بر روی سطح پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور CO2 دار گرمخانه گذاری شدند. در نهایت، حساسیت یا مقاومت هر یک از جدایه‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه‌ی آن با راهنمای شرکت تولید کننده‌ی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تعیین گردید.

نتایج

شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد

از ۵۰ نمونه‌ی کبد مورد آزمایش در این مطالعه، تعداد ۱۷ نمونه (۳۴٪) پرگنه‌های مشکوک به *هلیکوباکتر پولوروم* را نشان دادند که با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تأیید اولیه گردیدند. با استفاده از تست واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۱۱ نمونه (۲۲٪) آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* بودند. بنابراین شیوع واقعی *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد در شهر سمنان برابر با ۲۲ درصد گزارش گردید. شکل ۱، الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های مثبت *هلیکوباکتر پولوروم* را نشان می‌دهد.



عکس ۱. الکتروفورز محصولات حاصل از PCR جدایه‌های *هلیکوباکتر پولوروم* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. M: مارکر ۱۰۰bp، C+: سویه‌ی مثبت *هلیکوباکتر پولوروم*، C-: شاهد منفی، ۱-۷: *هلیکوباکتر پولوروم* جداشده از نمونه‌های کبد حاوی این پاتوژن.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

نتایج حاصل از بررسی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *هلیکوباکتر پولوروم* جدا شده از کبد مرغ در شهر سمنان در جدول ۱ خلاصه شده است. در این مطالعه، کلیه‌ی جدایه‌ها (۱۰۰٪) نسبت به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مقاومت نشان دادند. مقاومت در برابر تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید (۸۶٪)، کلاریترومایسین (۷۱٪)، داکسی‌سایکلین (۵۷٪)، کلرامفنیکل (۴۳٪)، نئومایسین و فسفومایسین (۲۹٪) در جایگاه بعدی قرار داشتند. کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز در برابر آمپی‌سیلین، کولیستین و اریترومایسین (۱۴٪) مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. فراوانی جدایه‌های *هلیکوباکتر پولوروم* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سه سطح مقاوم، نیمه حساس وحساس

آنتی‌بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)	۷	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)	۷	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)	۶	۸۶	۱	۱۴	۰	۰
نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)	۶	۸۶	۱	۱۴	۰	۰
کلاریترومایسین (۱۵ میکروگرم)	۵	۷۱	۱	۱۴	۱	۱۴
داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)	۴	۵۷	۲	۲۹	۱	۱۴
کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)	۳	۴۳	۲	۲۹	۲	۲۹
نئومایسین (۳۰ میکروگرم)	۲	۲۹	۲	۲۹	۳	۴۳
فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم)	۲	۲۹	۱	۱۴	۴	۵۷
آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)	۱	۱۴	۱	۱۴	۵	۷۱
کولیستین (۱۰ میکروگرم)	۱	۱۴	۰	۰	۶	۸۶
اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)	۱	۱۴	۰	۰	۶	۸۶

بحث و نتیجه گیری

هلیکوباکتر پولوروم به عنوان پاتوژنی گرم منفی در گروه انتروهپاتیک *هلیکوباکتر* قرار می‌گیرد که قابلیت انتقال به انسان از طریق خوردن گوشت خام یا نیم‌پز مرغ را دارا می‌باشد. در نتیجه، در نظر گرفتن این پاتوژن به عنوان یک پاتوژن نوظهور که می‌تواند از طریق فراورده‌های غذایی نظیر گوشت مرغ به انسان منتقل شود و باعث آلودگی و مشکلات گوارشی شود، اهمیت ویژه‌ای دارد (۵). با ذکر این نکته که در استان سمنان هیچ گونه مطالعه‌ای بر روی این پاتوژن در نمونه‌های کبد صورت نگرفته است و تمام مطالعات قبلی نیز در بسته بندی‌های خوراکی نبوده است، این مطالعه با هدف بررسی شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ گوشتی عرضه شده در مراکز فروش محصولات پروتئینی با استفاده از روش‌های کشت باکتریایی و PCR و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک در شهر سمنان شکل گرفت.

در این مطالعه، از ۵۰ نمونه‌ی مورد آزمایش، تعداد ۱۷ نمونه با استفاده از روش کشت باکتریایی، پرگنه‌های خاص *هلیکوباکتر پولوروم* را نمایش دادند که تمامی آن‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. با استفاده از تست PCR، ۱۱ نمونه آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* بودند؛ در نتیجه شیوع واقعی *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ در شهر سمنان که در مطالعه حاضر انجام گردید، برابر با ۲۲ درصد گزارش گردید. تنها یک مطالعه مشابه در ایران انجام شده است که نتایج آن تفاوت چشمگیری با نتایج مطالعه حاضر

www.SID.ir

Archive of SID

دارد. در مطالعه‌ای که توسط بهرو و همکاران (۲۰۱۵) در اردبیل صورت گرفت، تعداد ۴۰ نمونه کبد و ران مرغ از لاشه‌های دچار گاستروانتریت از کلینیک های دامپزشکی أخذ گردید. تمامی نمونه‌ها تنها با استفاده از روش کشت باکتریایی و تأیید نهایی توسط تست‌های بیوشیمیایی آزمایش شدند و در نهایت به صورت متوسط ۳/۷ درصد از نمونه‌ها، آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* تشخیص داده شدند (۱۷). در بررسی علل این تفاوت می توان به این موارد اشاره نمود که در بررسی بهرو و همکاران، تمامی نمونه‌ها قبل از انجام آزمایش در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی نگه‌داری شدند. ذکر این نکته حائز اهمیت است که دمای انجماد یا بسیار بالا باعث از بین رفتن باکتری‌ها شده و می‌تواند اثر کشندگی بر روی آن‌ها داشته باشد (۱۸). همچنین در روش کشت باکتریایی بهرو و همکاران از فیلتر غشایی استفاده نشده بود و این مسئله می‌تواند روی توان بازیابی و حیات باکتری *هلیکوباکترپولوروم* و رقابت آن با دیگر باکتری‌ها نقش منفی داشته باشد (۱۷). در بررسی نتایج مطالعه ما و بهرو به نظر میرسد که آلودگی فراورده‌های گوشتی بخصوص کبد به *هلیکوباکتر پولوروم* در حال افزایش است و به مطالعات بیشتری در این خصوص نیاز است.

با توجه به زئونوز و نوظهور بودن *هلیکوباکتر پولوروم* و اهمیت آن در انتقال و ایجاد آلودگی در انسان، مطالعات بسیار اندکی در مورد آن در سرتاسر دنیا انجام شده است. علاوه بر این، هیچ یک از مطالعات انجام شده در مورد بسته بندی‌های خوراکی نبوده است. در مطالعه‌ای که توسط Ceelen و همکاران (۲۰۰۶) انجام شده بود، تعداد ۱۱۰ نمونه کبد مرغ از ۱۱ گله‌ی مختلف از یک کشتارگاه در شمال ایتالیا أخذ گردید. تمامی نمونه‌ها در ابتدا با استفاده از روش PCR مورد آزمایش قرار گرفته و سپس نمونه‌های مثبت، مورد کشت باکتریایی قرار گرفتند. نتایج به این صورت بود که ۴/۶ درصد از نمونه‌ها تنها با استفاده از PCR آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* بودند (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Mohamed و همکاران (۲۰۱۰) در مصر صورت گرفته بود، شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مورد آزمایش با استفاده از دو روش کشت باکتریایی و PCR برابر با ۴۷ درصد گزارش گردید (۱۴). طبق مطالعه‌ای دیگر، شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ گوشتی أخذ شده از کشتارگاهی در مصر برابر با ۶/۶۶ درصد گزارش گردید (۲۰). طبق جدیدترین مطالعه که در پاکستان انجام شده بود، از ۷۸ نمونه‌ی کبد مرغ آزمایش شده، تعداد ۷۱ نمونه (۹۱٪) با استفاده از کشت باکتریایی و تست‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. با استفاده از PCR تنها ۱۳ نمونه (۱۸/۳٪) آلوده به *هلیکوباکتر پولوروم* بودند (۲۱). اختلافات موجود در خصوص نتایج گزارش شده از مناطق مختلف را می‌توان به میزان آلودگی طیور منطقه، فاصله‌ی زمانی بین مطالعات، رعایت اصول بهداشتی در حین و بعد از کشتار و همچنین حساسیت‌های روش‌های آزمایش نسبت داد.

در طول زمان‌های مختلف، کشت پاتوژن‌های سخت رشد نظیر *هلیکوباکتر پولوروم*، مسئله‌ی بسیار سخت و مشکل برانگیزی بوده است. در حقیقت، بسیاری از محققان با در نظر گرفتن سخت رشد بودن و نامناسب بودن محیط‌های کشت برای رشد این پاتوژن‌ها، از تحقیق و جست و جو بازمانده‌اند (۵). در مطالعه‌ی حاضر، از روش کشتی استفاده شد که Borges و همکاران در سال ۲۰۱۵ به وسیله‌ی آن توانستند نمونه‌های گوشت مرغ را برای اولین بار جداسازی و ایزوله کنند (۵). در مقابل روش کشت، بسیاری از

www.SID.ir

Archive of SID

محققان از روش PCR برای تشخیص پاتوژن‌های سخت رشد استفاده می‌کنند که روشی سریع و ارزان برای تشخیص پاتوژن‌های سخت رشد از قبیل *هلیکوباکتر پولوروم* می‌باشد (۲۲). در این راستا و در مطالعه‌ی حاضر، از ۱۷ نمونه‌ی تأیید شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، ۶ نمونه با استفاده از PCR تأیید نشدند. این تفاوت در نتایج را می‌توان به شباهت فنوتیپی بین میکروارگانیسم‌ها نسبت داد و اینکه تست‌های بیوشیمیایی می‌توانند در سویه‌های مختلف متفاوت باشند و زیاد قابل اتکا نیستند (۴). به عنوان مثال، برخی از سویه‌های جنس کمپیلوباکتر توانایی هیدرولیز اوره را ندارند و در تشخیص تفریقی با *هلیکوباکتر پولوروم* می‌توانند ما را با مشکل مواجه کنند و باعث بروز موارد مثبت و منفی کاذب شوند (۲۳). علاوه بر این، گونه‌ی *هلیکوباکتر کانادنسیس* نیز به عنوان یک پاتوژن اوره‌آز منفی می‌تواند در تفریق با *هلیکوباکتر پولوروم* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی محققین را دچار اشتباه کند (۲۴).

از دیگر جنبه‌های این مطالعه، بررسی و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تأیید شده با استفاده از PCR بود که با استفاده از ۱۲ دیسک آنتی‌بیوتیکی رایج در دامپزشکی و پزشکی و روش انتشار دیسک انجام شد. ذکر این نکته اهمیت دارد که تا الان هیچ گونه مطالعه‌ای مبنی بر انجام مقاومت یا حساسیت آنتی‌بیوتیکی *هلیکوباکتر پولوروم* در ایران انجام نشده است. گذشته از این، تنها یک مطالعه در سرتاسر دنیا به بررسی این موضوع پرداخته است که نتایج مطالعه‌ی حاضر با آن تحقیق مقایسه می‌شود (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر تمامی جدایه‌ها، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین را نشان دادند. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Mohamed و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مقابل دو آنتی‌بیوتیک ذکر شده دیده شد. همچنین در این مطالعه، مقاومت نسبت به اریترومایسین، ۱۰۰ درصد گزارش گردید. اما در مطالعه‌ی حاضر، کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مقابل اریترومایسین مشاهده گشت. در هر دو مطالعه، مقاومت نسبت به تتراسایکلین در جایگاه بعدی قرار داشت. در مطالعه‌ی حاضر، کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مقابل آمپی‌سیلین، کولیستین و اریترومایسین با ۱۴٪ فراوانی مشاهده گردید. در حالیکه در مطالعه‌ی انجام شده توسط Mohamed و همکاران (۲۰۱۰)، کمترین مقاومت نسبت به کولیستین و آمپی‌سیلین با صفر درصد فراوانی مشاهده گردید (۱۴). مسئله‌ی مهم بعدی این بود که در مطالعه‌ی حاضر، همه‌ی جدایه‌ها حداقل نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاومت را نمایش دادند، که نشان دهنده‌ی وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این پاتوژن می‌باشد. همچنین، استفاده‌ی غیر مجاز و بیش از اندازه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور، باعث وقوع پاتوژن‌های مقاوم می‌شود. به طورکلی، این مطالعه پیشنهاد می‌دهد که شیوع این پاتوژن در حال افزایش بوده و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن برای کاهش بار میکروبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در نهایت این مطالعه به درستی نشان داد که شیوع *هلیکوباکتر پولوروم* در نمونه‌های کبد مرغ در فروشگاه‌های عرضه کننده‌ی این محصول در شهر سمنان در مقایسه با تحقیقات قبلی در استانهای دیگر نظیر اردبیل افزایش یافته است. همچنین با توجه به میزان بالای مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این مطالعه، لزوم جلوگیری از مصرف بی‌رویه و غیر اصولی آنتی‌بیوتیک در صنعت طیور ضروری می‌باشد. مطالعه حاضر مشخص کرد که روش کشت

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شده با استفاده از فیلتر غشایی، روشی مناسب تر برای جداسازی *هلیکوباکتر پولوروم* از نمونه‌های کبد می‌باشد و تست PCR به عنوان روشی دقیق و حساس برای تأیید این عامل بیماریزا می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد؛ مطالعات بیشتری در خصوص بررسی این عامل بیماریزا و راه‌های کاهش بار میکروبی آن مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را نسبت به ریاست دانشکده دامپزشکی و آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان بابت فراهم نمودن تجهیزات و مواد لازم جهت انجام این تحقیق را ابراز میدارند.

منابع

1- Suzuki, H., Yamamoto, S. (2009). *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. *Food Control*, **20:** 531-7.

2- Jung, Y., Porto-Fett, A.C.S., Shoyer, B.A., Henry, E., Shane, L.E., Osoria, M., Luchansky, J.B. (2019). Prevalence, levels, and viability of *Salmonella* in and on raw chicken livers. *Journal of Food Protection*, **82:** 834–43.

3- Hashemi, M., Sadeghi, A., Saghi, M., Aminzare, M., Raeisi, M., Rezayi, M., Tavakoly Sany, S.B. (2019). Health Risk Assessment for Human Exposure to Trace Metals and Arsenic via Consumption of Hen Egg Collected from Largest Poultry Industry in Iran. *Biological Trace Element Research*, **188:** 485–93.

4- Qumar, S., Majid, M., Kumar, N., Tiwari, S.K., Semmler, T., Devi, S., Baddam, R., Hussain, A., Shaik, S., Ahmeda, N. (2017). Cross Genome Dynamics and Molecular Resistant *Helicobacter pullorum* Isolates Obtained from Broiler and Free-Range Chickens in India. *Applied and Environmental Microbiology*, **83:** 1–15.

5- Borges, V., Santos, A., Correia, C.B., Saraiva, M., Ménard, A., Vieira, L., Sampaio, D.A., Pinheiro, M., Gomez, G.P., Olestro, M. (2015). *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat: Antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **81:** 8155–63.

6- Pot, R.G.J., Stoof, J., Nuijten, P.J.M., De Haan, L.A.M., Loeffen, P., Kuipers, E.J., Van Vliet, A.H.M., Kusters, J.G. (2007). UreA2B2: A second urease system in the gastric pathogen *Helicobacter felis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, **50:** 273–9.

7- Sterzenbach, T., Sae, K.L., Brenneke, B., Von Goetz, F., Schauer, D.B., Fox, J.G., Suerbaum, S., Josenhans, C. (2007). Inhibitory effect of enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on innate immune responses of mouse intestinal epithelial cells. I*nfection and Immunity*, **75:** 2717–28.

8- Stanley, J., Linton, D., Burnes, A.P., Dewhirt, F.E., On, S.L.W., Porter, A., Owen, R.G., Costas, M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov. genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*, **140:** 3441–9.

9- Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Weiner, S., Rump, J., Deissler, W., Bereswill, S., Kist, M. (1997). Isolation of *Helicobacter pullorum* from Patients with Enteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **29:** 315–8.

10- Nebbia, P., Tramuta, C., Ortoffi, M., Bert, E., Sola, S.C., Robino, P. (2007). Identification of enteric *Helicobacter* in avian species. *Schweiz Arch*

www.SID.ir

Archive of SID

freezing with chemical agents. *Bactericidal Effect of Freezing with Chemical Agents*, **44:** 112–5.

19- Ceelen, M.L., Decostere, A., Van Den Bulck, K., On, S.L., Baele, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (2006). *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, **12:** 263–7.

20- Hamada, M., Elbehiry, A., Marzouk, E., Moussa, I.M., Hessain, A.M., Alhaji, J.H., Heme, H.A., Zahran, R., Abdeen, E. (2018). *Helicobacter pylori* in a poultry slaughterhouse: Prevalence, genotyping and antibiotic resistance pattern. *Saudi Journal of Biological Science*, **25:** 1072–8.

21- Javed, K., Gul, F., Abbasi, R., Zaidi, R.A., Noreen, Z., Bokhari, H., Javed, S. (2019). Prevalence and role of Type six secretion system in pathogenesis of emerging zoonotic pathogen *Helicobacter pullorum* from retail poultry. *Avian Pathology*, **48:** 557-563.

22- González, A., Piqueres, P., Moreno, Y., Cañigral, I., Owen, R.J., Hernández, J., Ferrus, M.A. (2008). A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. *International Microbiology*, **11:** 1–6.

23- Matsuda, M., Moore, J.E. (2004). Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **70:** 4415–8.

24- Fox, J.G., Chien, C.C., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Shen, Z., Melito, P.L., Woodward, D.L., Roodgers, F.G. (2000). *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *Journal Clinical Microbiology*, **38:** 2546–9.

Tierheilkd Journal, **149:** 403–7.

11- Zanoni, R.G., Rossi, M., Giacomucci, D., Sanguinetti, V., Manfreda, G. (2007). Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **116:** 168–73.

12- Zanoni, R.G., Piva, S., Rossi, M., Pasquali, F., Lucchi, A., De Cesare, A., Manfreda, G. (2011). Occurrence of *Helicobacter pullorum* in turkeys. *Veterinary Microbiology*, **149:** 3492–6.

13- Sadeghi, A., Hashemi, M., Jamali-Behnam, F., Zohani, A., Esmaily, H., Dehghan, A.A. (2015). Determination of chromium, lead and cadmium levels in edible organs of marketed chickens in Mashhad, Iran. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, **2:** 134–8.

14- Mohamed, M., Ragab, I., Shahata, M., EI-Refaie, M. (2010). *Helicobacter pullorum* among poultry in ASSIUT-Egypt: Genetic Characterization, Virulence and MIC. *International Journal of Poultry Science*, **9:** 521–6.

15 Singh, A.S., Masuku, M. (2014). Sampling techniques and determination of sample size in applied statistics research: an overview. *International Journal of Economics, Commerce and Management*, **2:** 1–22.

16- Bello, N., Francino, O., Sánchez, A. (2001). Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13:** 162–4.

17- Behroo, S., Javadi, A., Rad, M.G. (2015). *Helicobacter pullorum* prevalence in patients with gastroenteritis in humans and chicken in the province of Ardabil in 2014. *Indian Journal of Fundamental Applied Life Science*, **5:** 87–94.

18- Takano, M., Yasin, M., Shibasaki, I. (1979). Bacteriological effects of

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 16, Issue 2, 2020

Comparison of culture and PCR method in prevalence of *Helicobacter pullorum* isolated from chicken liver samples and determination of antibiotic resistance profile of the isolates

Jebelli Javan, A.[1]; Emadi Chashmi, S.H.[*2]; Staji, H.[3]; Akhlaghi, H.[4]

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

4- D.V.M. Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

Received: 19 July 2020 *Accepted: 10 January2021*

Abstract

Helicobacter pullorum is a gram-negative and zoonotic pathogen which can cause gastroenteritis in human and poultry. The purposes of this study were to evaluate the prevalence of H. pullorum in chicken liver samples using culture methods and polymerase chain reaction (PCR) as well as to assess the antibiotic resistance of the isolates using the disk diffusion method in various regions of Semnan. A total of 50 packed liver samples were collected from various regions of Semnan city. By use of culture method and biochemical tests, 17 samples (34%) were found to be positive for H. pullorum. By use of PCR test which was performed in parallel with culture method and biochemical tests, 11 (22%) samples were confirmed H. pullorum. With regard to the results of antibiogram test, all of the samples were resistant to ciprofloxacin and gentamicin, and the lowest resistance rate was observed against ampicillin, colistin and erythromycin with 14%. This study is the first report on prevalence and antibiotic resistance of H. pullorum in chicken liver samples in Semnan and more studies are needed in this regard. Furthermore, due to low sensitivity of biochemical tests in recognition of H. pullorum, the present study suggests that the PCR test, as a sensitive and reliable method, can be used to detect H.pullorum from chicken liver samples.

Keywords: Helicobacter pullorum, chicken liver, culture method, polymerase chain Reaction, antibiotic resistance

**Corresponding author: Seyed Hesamodin Emadi Chashmi*

Address: Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

Tel: (+98)23-33654125

Email: hesamemadi@semnan.ac.ir

www.SID.ir