

مقاله کوتاه

بررسی فراوانی کمپیلوباکتر ژوژنی در محتویات سکومی گله های طیور شهرستان کرمان

محمد خلیلی^{۱*} و لادن منصوری نژاد^۲^۱ کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی^۲ کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۹

چکیده

کمپیلوباکتر ژوژنی یکی از اصلی ترین عوامل گاستروانتریت در انسان می باشد. گوشت طیور یکی از اصلی ترین منابع آلودگی به باکتری محسوب می شود. به منظور بررسی آلودگی گله های گوشتی کرمان به کمپیلوباکتر ژوژنی از محتویات سکومی ۹۰ مرغ از ۹ گله گوشتی (هر گله ۱۰ نمونه) درکشتارگاه سوایهائی تهیه و در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس نمونه ها در محیط غنی کننده، دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تحت شرایط میکروائروفیلیک انکوبه شدند. پس از سپری شدن مدت انکوباسیون به محیط آگار انتخابی کمپیلوباکتر انتقال و با شرایط فوق الذکر کشت گردید. کلونیهای مشکوک به کمپیلوباکترساب کالچرووضعیت آنها از نظر رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های مثبت کمپیلوباکتر با تست PCR جهت تأیید کمپیلوباکتر ژوژنی مورد بررسی قرار گرفتند. از میان نمونه های به دست آمده از ۹ گله فقط نمونه های یک گله (۳ نمونه از ۱۰ نمونه مربوط به یک گله) از نظر وجود کمپیلوباکتر ژوژنی با روش کشت و سپس با روش PCR مثبت گردید.

واژه های کلیدی: کمپیلوباکتر ژوژنی، کشت، واکنش زنجیره ای پلیمرز و فارمهای طیور

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۴۷، پست الکترونیک: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

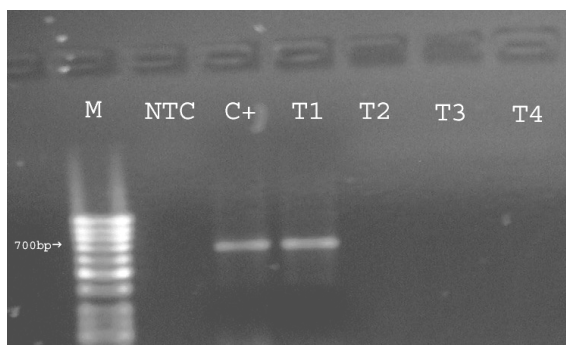
شدن آن از موارد آپاندیسیت حاد وجود دارد (۳ و ۱). کمپیلوباکتر ژوژنی از منابع متعددی نظیر: محیطهای آبی، حیوانات وحشی، حشرات و دامها جدا شده است که در این میان یکی از مخازن مهم کمپیلوباکتر در طبیعت طیور می باشد (۸). کمپیلوباکتر ژوژنی یکی از معمول ترین آلوده کننده های لاشه طیور گوشتی در طول کشتار است که منبع این آلودگی محتویات سکومی طیور می باشد (۹). هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی باکتری کمپیلوباکتر ژوژنی در محتویات سکومی گله های طیور شهرستان کرمان و تأیید نتایج باکتریولوژیکی با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بود.

گونه های کمپیلوباکتر باسیلهای خمیده، گرم منفی، غیر اسپورساز، متحرک و سخت رشد بوده و تنها در شرایط میکروائروفیلیک می توانند رشد کنند. اصلی ترین گونه کمپیلوباکتر که مسبب بیش از ۸۵ درصد از عفونتهای روده ای کمپیلوباکتریایی است، کمپیلوباکتر ژوژنی می باشد (۱). در سرتاسر دنیا کمپیلوباکتر ژوژنی به عنوان یکی از عوامل مهم بیماری اسهالی در انسان قلمداد می شود. گاستروانتریت معمول ترین بیماری است که در انسان در نتیجه مسمومیتهای غذایی ناشی از کمپیلوباکتر ژوژنی رخ می دهد. از دیگر عفونتهای نادر کمپیلوباکتریایی میتوان به آرتریت سپتیک و باکترمی اشاره کرد (۲). اخیراً گزارشاتی از ارتباط کمپیلوباکتر ژوژنی با سندرم گلن باره و جدا

شرح ذیل بود (۱۰):

CJ702F: 5'-TAC TAC AGG AGT TCA AGC TT-3'
CJ702R: 5'- GTT GAT GTA ACT TGA TTT TG-3'

محتویات master mix شامل: ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR، ۱۰× یون منیزیم به غلظت نهایی ۲ میلی مولار، پرایمرهای F,R هر کدام ۲۰ پیکومول، dNTPs ۰/۲ میلی مولار و آنزیم Taq ۲ واحد و سرانجام DNA template به میزان ۲/۵ میکرولیتر سپس حجم کل با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مراحل PCR شامل: Preheating در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه و سیکل‌های PCR، دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، آنلینگ در دمای ۵۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه به تعداد ۳۵ سیکل و در نهایت یک مرحله نهایی از extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر Mj (بیوراد، آمریکا) برنامه ریزی گردید. پس از انجام PCR نمونه های تست در کنار مارکر ۱۰۰ bp (فرمتاس، لیتوانی)، کنترل‌های منفی (NTC) و کنترل مثبت تهیه شده از شرکت Mast انگلیس (سوش کمپیلوباکتر ژوژنی ATCC33291, NCTC11322) روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم برمایند الکتروفورز گردید (شکل زیر).



الکتروفورز محصولات PCR. M مارکر ۱۰۰ bp، NTC کنترل منفی، C+ کنترل مثبت، T1-4 نمونه های تست.

از نتایج باکتریولوژیکی فقط ۳ نمونه مربوط به یک گله مثبت شد که با روش PCR که روی ژن *vir* انجام گردید وجود باند ۷۰۲ جفت بازی تأیید شد. به این ترتیب ۱۱/۱

نمونه گیری: نمونه گیری به تعداد ۹۰ سوآپ از سکوم طیور ۹ گله انجام شد. سوآپها بلافاصله وارد محیط ترانسپورت شد و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.

کشت باکتریولوژیکی: به محض رسیدن نمونه به آزمایشگاه پس از یک ورتکس اولیه از هر محیط انتقالی ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹/۹ سی سی محیط پرستون براث (هایمدیا، هند) واجد *campylobacter selective supplement IV* (هایمدیا، هند) حاوی آنتی بیوتیکهای وانکومايسين، پلی میکسین و تری متوپریم و خون دفیبرینه گوسفند (۵ درصد) انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تحت شرایط میکرواثروفیلیک ایجاد شده با گازپک *Campygen* (هایمدیا، هند) انکوبه کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط براث را روی محیط آگار انتخابی کمپیلوباکتر (هایمدیا، هند) انتقال و با شرایط فوق کشت گردید. پس از سپری شدن مدت کشت، کلونیهای مشکوک به کمپیلوباکتر ساب کالچر و وضعیت آنها از نظر رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی، تست اکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های مثبت کمپیلوباکتر از نظر باکتریولوژی که اکسیداز و کاتالاز مثبت داشته و در رنگ آمیزی گرم منفی با ظاهری شبیه به پرند در حال پرواز رؤیت شدند با تست واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) جهت تأیید *Campylobacter jejuni* مورد بررسی قرار گرفتند.

روش PCR: اسید نوکلئیک باکتری با کمک کیت استخراج AccuPrep (بیونیر، کره) استخراج گردید. استخراج اسید نوکلئیک با این کیت بر اساس به کارگیری محلولهای لیز کننده و سپس انتقال محتویات روی ستونهای حاوی فیلترهای سیلیکا (میکروکالومن) و باند شدن اسید نوکلئیک به ذرات سیلیکای کف فیلتر استوار است. در این مطالعه از توالی اسید نوکلئیک چاپ شده توسط TSAI که قادر به آمپلی فای کردن قطعه اختصاصی ۷۰۲ جفت بازی از ناحیه متغیر ژن *vir* بود، استفاده گردید که سکانس آنها به

برای رشد بهتر باکتری از یک محیط غنی شده براث (پرستون) و محیط آگار انتخابی کمپیلوباکترحاوی آنتی بیوتیک و خون دفیبرینه گوسفند استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در ۱۱/۱ درصد از گله ها یا ۳/۳ درصد از کل نمونه ها آلودگی با کمپیلوباکتر ژوژنی وجود دارد که استفاده از پرایمر اختصاصی برای ناحیه متغیر ژن Vi نیز صحت آن را تأیید کرد. گزارشات مختلفی در مورد کمپیلوباکتر ژوژنی به عنوان فلور نرمال طیور وجود دارد. در ایران تنها یک مطالعه چاپ شده در مورد آلودگی فلور سکوم طیور وجود دارد که مربوط به هوایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در اصفهان است که نتایج آن حاکی از آلودگی ۶۷ درصد نمونه های سکومی طیور به کمپیلوباکتر ژوژنی می باشد (۴). در مطالعه ای که طارمی و همکاران در مورد آلودگی گوشت طیور در تهران انجام دادند صرفنظر از گونه باکتری ۶۳ درصد آلودگی گوشت طیور تهران را به کمپیلوباکتر گزارش کردند (۱۱). Magistrado و همکاران آلودگی ۵/۹ درصد طیور را در فیلیپین به کمپیلوباکتر ژوژنی گزارش کردند (۶). گزارشات مختلف از برخی مناطق حتی حاکی از آلودگی تا ۱۰۰ درصد می باشد (۷). برای مشخص شدن میزان واقعی آلودگی فارمهای طیور در ایران نیازه انجام مطالعات مشابه و در طیف وسیع تر در فارمهای طیور وجود دارد.

درصد از گله ها از نظر آلودگی با کمپیلوباکتر ژوژنی مثبت شدند.

روشهای مختلفی برای تشخیص باکتری کمپیلوباکترژوژنی در نمونه های مختلف وجود دارد. از آنجایی که باکتری سخت رشد بوده لذا برای جدا سازی بهتر بایستی از محیطهای اختصاصی حاوی عوامل رشد استفاده کرد. از طرف دیگر در هنگام جدا سازی باکتری از نمونه های شدیداً آلوده مثل نمونه های مدفوعی که تعداد بسیار بالایی از میکروارگانیسمهای با رشد سریع و آسان گیر وجود دارد، چاره ای جز اضافه کردن ساپلمنتهای آنتی بیوتیکی وجود ندارد (۵). روشهای کشت مدفوع در مورد باکتری کمپیلوباکتر ژوژنی مشکلات فوق را داشته و در مورد تشخیص باکتری به طور مستقیم از مدفوع با روشهای مولکولی مانند روش PCR بخاطر وجود ممانعت کننده های مختلف عموماً حساسیت بالایی وجود ندارد. در این تحقیق با لحاظ قرار دادن همه مشکلات مربوط به حساسیت باکتری در برابر عوامل محیطی مضر چون تغییر دما (گرما)، تماس طولانی مدت در برابر هوا و نیز با علم به آلودگی میکروبی نرمال بالای محتویات سکومی سعی گردید تا پس از نمونه گیری بلافاصله نمونه در محیط ترانسپورت قرار گیرد و در کنار یخ در سریعترین زمان به آزمایشگاه انتقال داده شود. برای غلبه بر فلور میکروبی بالای نمونه از ساپلمنت آنتی بیوتیکی استفاده گردید و

منابع

- 1- Altekruze, S., Stern, NJ., Fields, PI., Swerdlow, DL., 1999. *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 28-35.
- 2- Blaser, MJ., 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis.* 176 (2): 103-105.
- 3- Campbell, LK., Havens, JM., Scott, MA., 2006. Molecular detection of *Campylobacter jejuni* in archival cases of acute appendicitis. *Modern Pathol.* 19: 1042-1046.
- 4- Havaei SA., Salehi R. Bokaeian M., Fazeli A., 2006. Comparison of PCR and Culture Methods for Diagnosis of Enteropathogenic *Campylobacter* in Fowl Feces. *Iranian Biomed. J.* 10 (1): 47-50
- 5- Lastovica AJ., Le Roux E., 2001. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *J Clin.Microbiol.* 39: 4222-4223.
- 6- Magistrado, PA., Garcia MM., Raymundo, AK., 2001. Isolation and polymerase chain reactionbased detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines. *Inter. J Food Microbiol.* 70 (1-2): 197-206.

- 7- O'sullivan, NA., Fallon, R, Carrol, C., 2000. Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using a PCR/DNA probe membrane based colorimetric detection assay. *Molecular and Cell probes*, 14 (1): 7-16.
- 8- Skirrow, MB., 1990. *Campylobacter*. *Lancet*, 336: 921-929.
- 9- Son I., Mark D., Englen A., 2007. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *Inter. J. Food Microbiol.* 113(1):16-22.
- 10- TSAI, HJ., Huang, HC., Tsai, HL., Chang, CC., 2006. PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis of *Campylobacter jejuni* Isolates from humans, Chickens and Dogs in Northern Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 68(8): 815-819.
- 11- Taremi, M., Soltan Dallal, MM., Gachkar L., Ardalan S., Zolphagaharina K., Zali MR., 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. *Iranian J Food Microbiol.* 108: 401-403.

Short paper

Frequency of *Campylobacter jejuni* in cecal content of Kerman poultry farms

Khalili M^{1*} and Mansourinajand L.²

¹ Pathobiology Dept., School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

² Food Hygiene Dept., School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

Campylobacter is the most common cause of acute bacterial gastroenteritis in humans worldwide. The common source of infection is contaminated food, particularly poultry. To investigate the occurrence of *Campylobacter jejuni* in kerman poultry farms, 90 cecal samples from 9 poultry farms (10 samples each farm) were taken. Samples enriched in Preston Enrichment broth, then were plated on *Campylobacter* selective agar supplemented with defibrinated sheep blood and incubated for 48 hour at 42 °C under microaerophilic condition. Presumptive *Campylobacter* colony from each plate was cultured and tested for Gram staining, production of catalase and oxidase. *Campylobacter* positive colonies were confirmed with polymerase chain reaction (PCR). *Campylobacter jejuni* was isolated and confirmed from 3.3% samples.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, culture, PCR, poultry farms