Archive of SID

گونه‌های کمپیلوباکتر به عنوان یک عامل بالقوه بیماری زا در قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی (**Agaricus mushrooms**)

امیرشاکریان

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول: *Amshakerian@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۰۷

چکیده

عفونت‌های ناشی از *کمپیلوباکتر ژژونی* به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های منتقله از غذا در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد که باعث ایجاد اسهال در اکثر کشورها می‌شود. در این بررسی ۱۰۰ نمونه قارچ دکمه‌ای خوراکی در سال ۱۳۹۳ از فروشگاه‌های عرضه انواع قارچ‌های خوراکی در شهرکرد نمونه‌برداری شد. ابتدا نمونه‌ها در محیط‌های کشت غنی کننده و اختصاصی کشت داده شدند و سپس مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز قرارگرفتند. از مجموع ۱۰۰ نمونه قارچ دکمه‌ای خوراکی اخذ شده ۱۵ نمونه (۱۵ درصد) آنها آلوده به جنس *کمپیلوباکتر* تشخیص داده شدکه ۱۳/۳ درصد آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونی* و۸۶/۷ درصد آلوده به گونه *کمپیلوباکتر کلی* بودند. براساس نتایج حاصله می‌توان گفت که مصرف خام قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* به عنوان یکی از مخاطرات بهداشتی در جوامع انسانی نقش مهمی ایفا می‌نمایند.

واژگان کلیدی: گونه‌های *کمپیلوباکتر*، قارچ دکمه‌ای خوراکی، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، شهرکرد.

مقدمه

کمپیلوباکترها ارگانیسم‌هایی هستند میله‌ای شکل، غیر هاگ‌زا، متحرک، گرم منفی وخمیده که به خانواده *کمپیلوباکتریاسه* تعلق دارند. *کمپیلوباکترها* با داشتن گونه‌ها ومیزبان‌های مختلف یکی از مهمترین وشایع-ترین باکتری‌های مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند. در خانواده *کمپیلوباکتر*دوگونه مهم به نام *ژژونی* و *کلی* مسئول غالب موارد عفونت‌های *کمپیلوباکتری* در انسان محسوب می‌شوند (; NCCLS, Hussain, 2007; Rahimi et al., 2008 2003). امروزه *کمپیلوباکترها* از شایع‌ترین علل اسهال-های باکتریایی درسراسر جهان محسوب شده و برطبق آمارهای جهانی ۲٪ تا ۳۵٪ این گونه اسهال‌ها ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد (Butzler, 2004; CDC, 2004). باتوجه به درصد آلودگی انسان به *کمپیلوباکتر* (۲۲ تا ۳۳٪) درمقایسه با میزان آلودگی به سالمونلاها (۳/۵٪) اهمیت تشخیص *کمپیلوباکتریوزیس* در انسان، دام و مواد غذایی قابل توجه می‌باشد. مواد غذایی مسئول بیش از ۸۰ درصد مورد *کمپیلوباکتریوزیس* انسان می‌باشد، که در این میان گوشت، شیر خام، آب‌های آشامیدنی آلوده و غذاهایی خام و نیم پز سبزی‌ها، میوه‌ها و قارچ‌های خوراکی مهم‌ترین عوامل خطر در وقوع *کمپیلوباکتریوزیس* در انسان گزارش شده‌اند. اگر چه در اکثر موارد آنتریت حاصل از *کمپیلوباکتر* نیازمند درمان نمی‌باشد. در موارد حاد *کمپیلوباکتریوزیس* آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده عمدتاً اریترومایسین و یا یکی از فلوروکوینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین می‌باشد (; Whyte et al., 2004 Chai et al., 2007). گزارش‌های زیادی از مقاومت *کمپیلوباکترها* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه وجود دارد (; et al., 2002 Aarestrup and Engberg, 2001 Isenbarger). نتایج بیانگر آن است که وضعیت در کشورهای در حال توسعه بحرانی است چرا که در این کشورها معمولاً آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، برای

www.SID.ir

Archive of SID

درمان و پیشگیری بیماری‌ها در صنعت پرورش دام مورد استفاده قرار می‌گیرد (Son et al., 2007). قارچ-های خوراکی[1] در واقع میوه و بخش تولید مثل کننده و هاگ ساز قارچ‌های حقیقی[2] می‌باشند. امروزه مصرف انواع قارچ‌های خوراکی به دلیل طعم و مزه مطلوب، پروتئین (۷۰ تا ۹۰ درصد) و فیبر بالا و مواد معدنی با ارزش رو به افزونی است. همچنین قارچ‌های خوراکی حاوی مقادیر بالایی از آهن، سلنیوم، پتاسیم، کلسیم، فسفر و ویتامین‌های گروه B, C, D می‌باشد (Brochler et al., 2008). در خصوص تعیین میزان آلودگی قارچ‌های خوراکی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* بررسی‌هایی انجام شده است به طوری که Whyte و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای با عنوان بررسی آلودگی به *کمپیلوباکتر* در غذاهای موجود در خرده فروشی در ایرلند، میزان آلودگی قارچ خوراکی به این باکتری را ۰/۹ درصد گزارش نمودند (Whyte et al., 2004). همچنین Verhoof و همکاران از هلند در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای با عنوان تعیین آلودگی قارچ-های خوراکی، سبزی‌ها و میوه‌های خام به کمپیلوباکتر، از ۵۴۶ نمونه انواع قارچ، میوه‌ها و سبزی‌های مختلف، ۱۳ نمونه (۰/۲۳ درصد) آلودگی داشتند (Verhoof et al., 2011).از آنجائیکه اطلاعات کمی در خصوص شیوع گونه‌های *کمپیلوباکتر* در مواد غذایی به خصوص انواع قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی در ایران وجود دارد، لذا در این پژوهش اقدام به نمونه برداری از قارچ‌های خوراکی دکمه‌ای موجود در فروشگاه‌های شهرکرد گردید تا در نهایت مشخص شود که آیا این باکتری می‌تواند به عنوان یک عامل بالقوه بیماری‌زا در قارچ-های دکمه‌ای خوراکی نقش مهمی ایفا نماید.

مواد و روش کار

در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه قارچ دکمه‌ای خوراکی به صورت تصادفی ساده در سال ۱۳۹۳ از فروشگاه‌های شهرستان شهرکرد نمونه‌برداری شد همه نمونه‌ها در شرایط سترون و در کنار یخ در اسرع وقت به مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل و مورد آزمایش قرار گرفتند. مقدار ۲ گرم از هر نمونه قارچ دکمه‌ای خوراکی را درون لوله حاوی محیط انتقالی[3]ساخت شرکت مرک آلمان ریخته، سپس این لوله‌ها در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه‌گذاری شدند. پس از این مدت با روش خطی در محیط کشت اختصاصی کمپیلوباکترسلکتیو آگار[4] (ساخت شرکت مرک آلمان حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند همراه با مکمل یا ساپلمنت[5] آنتی بیوتیکی) ساخت شرکت مرک آلمان کشت داده شد. مکمل آنتی بیوتیکی شامل (تری متوپریم ۱ میلی گرم، وانکومایسین ۲ میلی گرم، پلی‌میکسین ۵۰ میکروگرم) به محیط کشت اضافه گردید. بعد از کشت در محیط اختصاصی فوق، پلیت‌ها در داخل جار بی‌هوازی به همراه گاز پک حاوی Co_2 دار آغشته به ۶ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شدند (گاز پک شامل ۵ درصد O_2، ۱۰ درصد Co_2 و ۸۵ درصد N_2 می‌باشد). سپس در گرم خانه با دمای ۴۲ درجه سلسیوس برای مدت ۴۸-۷۲ ساعت قرارداده شد. پس از طی زمان مورد نظر، پلیت‌ها را خارج کرده وهرکدام از پلیت‌هایی که حاوی پرگنه‌های مسطح، غیرهمولیتیک و خاکستری به قطر حدود ۱ میلی متر، مدور و آبکی بوده انتخاب نموده، رنگ آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز درمورد آنها انجام می‌گرفت. در رنگ آمیزی گرم، نمونه‌های حاوی باسیل‌های گرم منفی، کشیده و فنری شکل برای ادامه کار انتخاب می‌شدند. هم چنین در صورت مثبت بودن آزمایش کاتالاز، نمونه‌های مشکوک برای آزمایش هیپورات و حساسیت آنتی‌بیوتیکی، همزمان به محیط آبگوشت قلب حاوی هیپورات سدیم و آبگوشت مغذی

1 Mushrooms
2 Fungus

3 Stuart Transport Agar
4 Campylobacter Selective Agar
5 Supplement

www.SID.ir

Archive of SID

انتقال داده، آن‌گاه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در گرم خانه قرار می‌گرفت و پس از آن نتایج مربوطه قرائت می‌گردید. در محیط آبگوشت قلب پس از مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم خانه‌گذاری در دمای ۴۲ درجه سلسیوس ۰/۸ میلی لیتر از محیط مورد نظر را با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول فریک کلراید ترکیب نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری نموده و نمونه‌های دارای رسوب، به عنوان *کمپیلو باکترژژونی* محسوب می‌گردید (شاکریان و همکاران، ۱۳۹۳; شاکریان و همکاران، ۱۳۹۰ ; رحیمی و همکاران، 1392 Rahimi et al., 2010b;).

آزمون حساسیت ضد میکروبی

حساسیت *کمپیلوباکترهای* جدا شده از نمونه‌ها به روش دیسک گذاری و مطابق دستور العمل (۲۰۰۳) NCCLS ارزیابی شد. با این هدف *کمپیلوباکترهای* جدا شده از نمونه‌ها پس از احیاء در شرایط سترون روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت سطحی داده شدند و پس دیسک گذاری در دمای۴۲ درجه سلسیوس در گرم خانه Co_2 دار به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. دیسک‌های آنتی-بیوتیکی مورد استفاده ساخت شرکت‌های مدیای هند شامل: نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، تتراسایکلین (۱۵ µg)، استرپتومایسین (۳۰ µg)، آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، آموکسی‌سیلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg) و انروفلوکساسین (۱۰ µg) بودند. بعد از گرم‌خانه گذاری هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک توسط کولیس مدل KT با دقت ۰/۰۲× ۱۲۵ میلی‌متر ساخت کشور چین اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت حساس و غیر حساس ثبت شد (Rahimi, 2010a).

استخراج DNA و آزمایش PCR

برای استخراج DNA، باکتری‌های رشد کرده در طول یک شب در محیط آب پپتونه که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شده بودند به وسیله کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس برای انجام واکنش PCR از جفت پرایمرهای طراحی‌شده بر اساس ردیف نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA باکتری *کمپیلوباکتر* مطابق روش تشریح شده توسط Denis و همکاران استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصول PCR در جدول ۱ آمده است.

برای انجام آزمایش PCR برای تشخیص ژن 16S rRNA، از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co.) استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR، ۳۰ میکرو لیتر و شامل ۹۰ نانوگرم پرایمر، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۱۰ میلی مول تریس HCl، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۵۰ میلی مول KCl و ۱ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase بود. برنامه‌ی حرارتی مورداستفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه بود.

جدول۱- توالی پرایمرها برای تشخیص جنس *کمپیلوباکتر* و گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی*

میکروارگانیسم	اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن
Campylobacter spp.	۸۵۷	F.5’ ATC TAA TCC CTT AAC CAT TAA AC 3’ R,5’ GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAG TAT T3’	16srRNA
C. jejuni	۵۸۹	F.5’ CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG 3’ R.5’ GCT TTA TTT GCT ATT TGT TTT ATT A 3’	*MapA*
C. coli	۴۶۲	F,5’ AAT TGT AAA TTG CTC CAA CTA TG 3’ R,5’ TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG3’	*ceuE*

www.SID.ir

Archive of SID

برای تأیید وجود قطعه تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای این منظور ۱ گرم از پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE حل و بعد از ذوب شدن مقدار ۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن اضافه و در سینی مخصوص الکتروفروز ریخته شد. سپس۱۵ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و روی ژل ۱ درصد آگارز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی (DNA Fermentas) در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت الکتروفروز گردید (Rahimi, 2010a).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار (SPSS SPPSS ver. 17 (Chicago, IL در دو سطح آماری توصیفی و استنباطی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه قارچ دکمه‌ای خوراکی از نظر آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۰۰ نمونه قارچ خوراکی دکمه‌ای بررسی شده پس از کشت در محیط غنی کننده، انتخابی و آزمایش PCR، ۱۵ نمونه (۱۵درصد) آلودگی به *کمپیلوباکتر* را نشان می‌داد. با انجام آزمایش هیپورات برای آزمون تفریقی، ۱۳/۳ درصد *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۸۶/۷ درصد *کمپیلوباکتر کلی* تشخیص داده شد.

جدول۲- شیوع گونه‌های *کمپیلو باکتر* در قارچ دکمه‌ای خوراکی عرضه شده در شهرکرد

تعداد نمونه	گونه‌های *کمپیلوباکتر*(٪)	*کمپیلوباکتر ژژونی* (٪)	*کمپیلوباکتر کلی* (٪)
۱۰۰	(۱۵)۱۵	(۱۳/۳)۲	(۸۶/۷)۱۳

در مجموع مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۵ گونه *کمپیلوباکتر* شامل ۲ گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۱۳ گونه *کمپیلوباکتر کلی* علیه ۱۰ آنتی‌بیوتیک رایج مورد مصرف در علوم پزشکی و دامپزشکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد هیچ کدام از ۱۵ گونه *کمپیلوباکتر* بررسی شده مقاومتی نسبت به آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین نشان ندادند. بیشترین مقاومت به ترتیب با ۵۳/۸ درصد، ۴۰ درصد و ۳۳/۳ درصد نسبت به تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید بود (جدول۳).

جدول ۳- مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* جداشده از قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی در شهرکرد به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در سال ۱۳۹۳

آنتی‌بیوتیک	فراوانی و درصد مقاومت آنتی بیوتیک‌ها		
	کمپیلوباکتر (n=۱۵)	*کمپیلوباکتر ژوژنی* (n=۲)	*کمپیلوباکترکلی* (n=۱۳)
نالیدیکسیک اسید (Na)	۵ (٪ ۳۳/۳)	۱ (٪ ۵۰)	۴ (٪ ۳۰/۷)
سیپروفلوکساسین (C)	۶ (٪ ۴۰)	۱ (٪۵۰)	۵ (٪ ۳۸/۴)
اریترومایسین (E)	۰	۰	۰
تتراسایکلین (T)	۷ (٪ ۵۳/۸)	.	۷ (٪ ۵۳/۸)
استرپتومایسین (S)	۱ (٪ ۶/۶۶)	۱ (٪ ۵۰)	۰
آمپی‌سیلین (A)	۱ (٪ ۶/۶۶)	۱ (٪ ۵۰)	۰
آموکسی‌سیلین (AM)	۴ (٪ ۲۶/۶۶)	۱ (٪ ۵۰)	۳(٪ ۲۳)
جنتامایسین (Gn)	۰	۰	۰
کلرامفنیکل (Ch)	۰	۰	۰
انروفلوکساسین (NFX)	۵ (٪ ۳۳/۳)	۱ (٪ ۵۰)	۴ (٪ ۳۰/۷)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

کمپیلوباکتر میکروب خطرناکی است که براساس مطالعات انجام گرفته احتمال آلودگی انواع قارچ‌های خوراکی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. تاکنون مطالعه ی مشابهی در مورد آلودگی قارچ‌های خوراکی صدفی به باکتری‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در ایران مشاهده نشده است. در بررسی حاضر *کمپیلوباکتر* از ۱۵ درصد مجموع نمونه‌های قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی بررسی شده، جدا گردید که *کمپیلوباکتر کلی* با ۸۶/۷ درصد شیوع، غالب‌ترین گونه جداسازی شده بود و مابقی گونه‌های جداسازی شده با ۱۳/۳ درصد گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* بود. مطالعه‌های متفاوتی در مورد آلودگی انواع قارچ‌های خوراکی و انواع سبزی‌های خام در نقاط مختلف دنیا انجام شده است. به طوری که در مطالعه Doyle و Schoeni در سال ۱۹۸۶ میزان آلودگی قارچ‌های خوراکی عرضه شده به بازار مصرف به گونه‌های *کمپیلوباکتر* را ۱/۵ درصد گزارش نمودند (Doyle and Schoeni, 1986). در بررسی Park and Sanders در سال ۱۹۹۱در کشور کانادا در تعدادی از انواع سبزی‌ها و قارچ‌های خوراکی میزان آلودگی‌های متفاوتی از گونه‌های *کمپیلوباکتر* را گزارش نمودند، به طوری که بیشترین میزان آلودگی در کاهو و قارچ‌های خوراکی به ترتیب برابر با ۲/۵ درصد و ۳ درصد عنوان نمودند (Park and Sanders, 1991). در پژوهش Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۱ در کشور هندوستان میزان آلودگی سبزی‌های حاوی قارچ‌های خوراکی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* را ۳/۷۵ درصد گزارش نمودند (Kumar et al., 2001). هم چنین در بررسی Whyte و همکاران در سال ۲۰۰۴ میزان آلودگی قارچ‌های خوراکی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* را ۹ درصد اعلام نمودند (Whyte et al. 2004). در مطالعه Chai و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور مالزی بر روی انواع سبزی‌ها و قارچ‌های خوراکی، میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی را در دو مزرعه کشاورزی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برابر با ۱۸/۸ درصد و ۳ درصد گزارش نمودند. این محققین عنوان نمودند که در هیچ کدام ازنمونه‌های سبزی‌ها در این دو مزرعه، باکتری *کمپیلوباکتر کولی* جداسازی نشد (Chai et al., 2009) . در بررسی توسط Doorduyn و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور هلند ۰/۲۳ درصد از میوه‌ها و قارچ‌های موجود در فروشگاه‌ها به گونه‌های *کمپیلوباکتر* آلوده بودند. بر اساس این گزارش میزان آلودگی میوه‌ها و قارچ‌های بسته بندی شده (آلودگی برابر با ۰/۳۶ درصد) بیشتر از میزان این آلودگی در میوه‌ها و قارچ‌های غیر بسته بندی(میزان آلودگی برابر با ۰/۰۷ درصد) بود که علت آن را به دلیل ایجاد آلودگی تقاطعی عنوان نمودند (Doorduyn et al., 2010). ورهوف باکنز و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که میوه ها، سبزی‌ها و قارچ‌های خوراکی به عنوان منابع مهم ایجاد آلودگی به *کمپیلوباکتریوزیس* هستند (Verhoeff-Bakkenes et al., 2011) در پژوهشی توسط Buyukunal و همکاران در سال ۲۰۱۵ در شهر استانبول ترکیه بر روی انواع سبزی و قارچ‌های خوراکی، میزان آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* را ۶/۵۱ درصد عنوان نمودند (Buyukunal et al., 2015).

مهم‌ترین منابع آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر*عبارتند از دستگاه گوارش انواع حیوانات از جمله پرندگان، نشخوارکنندگان شامل گاو، گوسفند و از طرف دیگرجوندگان می‌باشند (شاکریان و همکاران، ۱۳۹۳). از مهم‌ترین منابع آلودگی مزارع و مناطق کشاورزی تولید کننده انواع قارچ‌های خوراکی، میوه‌ها و سبزی ها، مهاجرت و ورود انواع پرندگان به این مناطق بوده که شاید مدفوع آنها به گونه‌های *کمپیلوباکتر* آلوده شده باشد (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۲). هم‌چنین استفاده از انواع کودهای حیوانی و استفاده ازآب‌های

www.SID.ir

Archive of SID

آلوده در مزارع از دیگر عوامل مهم منابع آلودگی به شمار می‌روند (Rahimi and Ameri, 2011). شباهت‌ها و اختلاف هایی از نظر میزان آلودگی قارچ‌های خوراکی در مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌های سایر کشورها وجود دارد. در مطالعه‌های کشورهای دیگر عمدتاً کمپیلوباکتر ژژونی گونه‌ای جدا شده از قارچ ها، میوه‌ها و سبزی‌ها بوده است، این در حالی است که در مطالعه ی حاضر کمپیلوباکتر کلی گونه‌ی غالب باکتری جدا شده از قارچ‌های خوراکی می‌باشد. علت احتمالی آلودگی بیشتر و جدا سازی کمپیلوباکتر کلی به دلیل حساسیت بیشتر کمپیلوباکتر ژژونی نسبت کمپیلوباکتر کلی است و با توجه طولانی بودن فرایند جداسازی این باکتری از طریق کشت و روش PCR، لذا احتمال بقای گونه باکتری مقاوم تر یعنی کمپیلوباکتر کلی بیشتر است. از طرف دیگر با توجه به اینکه راه عمده و اصلی آلودگی از طریق خاک‌های آلوده(Jaderlund et al., 2011)، مدفوع و کودهای حیوانی است و با عنایت به اینکه کمپیلوباکتر کلی به میزان بسیار فراوان در مدفوع حیوانات وجود دارد و به همین علت آبیاری با فاضلاب و استفاده از کودهای حیوانی برای پرورش قارچ‌های خوراکی، باعث افزایش میزان آلودگی به کمپیلوباکتر کلی در قارچ‌های خوراکی موجود در فروشگاه‌ها شده است. یکی دیگر از علل تفاوت میزان آلودگی در مطالعه حاضر با سایر بررسی‌ها، شاید استفاده از مقادیر زیاد کلر و کلرامین در ضد عفونی آب‌های مورد استفاده در تولید محصولات کشاورزی به خصوص انواع قارچ‌های خوراکی و میوه‌ها و سبزی‌ها باشد. چون گونه‌های کمپیلوباکتر نسبت به مقادیر مختلف ضدعفونی کننده‌ها به خصوص ترکیبات کلر حساس هستند. از طرف دیگر نحوه برداشت قارچ‌ها، سبزی‌ها و میوه‌ها در میزان آلودگی به این باکتری متفاوت است. به طوری که در بررسی Brandl و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشخص گردید که کمپیلوباکترها بیشتر در ریشه و ریشه‌گاه (Rhizosphere) گیاهان وجود دارند و قابل جداسازی هستند (Brandl et al., 2004) . بنابراین شاید در هنگام برداشت قارچ‌های خوراکی در کارگاه‌های پرورش قارچ و یا در مزارع، این موضوع می‌تواند در افزایش و یا کاهش میزان جداسازی باکتری تأثیر داشته باشد. البته روش آزمایش، نحوه کشت و جداسازی این باکتری و شرایط نگه‌داری باکتری از جمله عوامل مؤثر در اختلاف بین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در انواع مطالعات در سراسر دنیا می‌باشد.

در بررسی حاضر مقاومت بالای گونه‌های *کمپیلوباکتر* به تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید مشاهده شد. مقاومت بالا نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها ممکن است نتیجه استفاده بی رویه این آنتی بیوتیک‌ها در صنعت دامپروری و امور دامپزشکی باشد. به طوری که در بررسی Chai و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور مالزی نشان دادند که کمپیلوباکتر ژژونی در نمونه‌های انواع سالاد و سبزی‌های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین ۹۱/۱ درصد و تتراسایکلین ۸۵/۷ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی داشتند (Chai et al., 2008). شاکریان و همکاران در سال ۱۳۹۰ گزارش نمودند که مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از خط کشتار گوسفندی نسبت به سیپروفلوکساسین (۵۸/۸ درصد) و سپس به نالیدیکسیک اسید (۴۷/۱ درصد)و تتراسیکلین (۴۱/۲ درصد) مقاومت آنتی بیوتیکی نشان دادند (شاکریان و همکاران، ۱۳۹۰). هم‌چنین در بررسی رحیمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ گزارش نمودند که مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت انواع طیور، گوسفند، بز و شتر عرضه شده در شهرکرد نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین به میزان ۷۲/۴ درصد مقاومت نشان دادند (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۲). انگلیس و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان می‌دهد که گونه‌های *کمپیلوباکتر* قادر هستند در کودهای دام‌های اهلی به خصوص گاوها و همچنین در کمپوست‌ها تا ۱۰ ماه زنده بمانند(Inglis et al., 2004) از طرف دیگر به دلیل استفاده زیاد آنتی بیوتیک‌ها در جیره گاوها برای

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش وزن، درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله آبسه‌های کبدی، بیماری‌های دستگاه تنفس و سایر بیماری ها، لذا آنتی بیوتیک‌ها در مدفوع دام‌ها دفع شده و استفاده از این کودهای حیوانی در پرورش و تولید قارچ‌های خوراکی، احتمالاً باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی خواهد شد. بر اساس نتایج بررسی‌های محققین، مشخص شده است که ۷۵ درصد از آنتی بیوتیک تتراسایکلین تجویز شده به گاو، از طریق مدفوع دفع شده است (Inglis et al., 2004; Whiley et al., 2013). در مقابل عدم مقاومت گونه‌های بررسی شده به کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین احتمالاً ناشی از عدم استفاده و یا استفاده محدود این داروها در امور فوق الذکر می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه با مطالب ذکرشده در بررسی حاضر چنین نتیجه می‌شود که قارچ‌های دکمه‌ای خوراکی مورد آزمایش شده در سال ۱۳۹۳ در شهرکرد، به عنوان یک عامل بالقوه بیماری زا نسبت به باکتری *کمپیلوباکتر کلی* و *کمپیلوباکتر ژژونی* تلقی می‌شود، به طور کلی مقدار زیادی از مواد غذایی با منشاء گیاهی و حیوانی به عنوان حامل *کمپیلوباکتر* در انتقال این باکتری به انسان نقش مهمی دارند که در این بین انواع قارچ‌های خوراکی موجود در بازار از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند اما مهم تر از نوع ماده غذایی، عوامل مهمی که در انتقال بیماری به انسان نقش مهمی دارند شامل عدم رعایت اصول بهداشت در طی مراحل تولید غذا، جابجایی و نگهداری نامناسب غذا و مصرف غذاهای خام یا نیمه پز شده می‌باشد. بنابراین رعایت اصول بهداشت در طی مراحل تهیه و تولید قارچ‌های خوراکی، تهیه کود و کمپوست‌های مطلوب، استفاده از آب‌های کلرینه شده، حمل و نقل صحیح قارچ‌های خوراکی در زمان توزیع، نگهداری و جلوگیری از آلودگی تقاطعی و پخت کامل قارچ‌های خوراکی می‌تواند در حد بسیار زیادی در کاهش *کمپیلوباکتریوزیس* انسان مؤثر باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی و مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱. رحیمی، ابراهیم.، شاکریان، امیر.، کاظمینی، حمید رضا و گودرزی، محمد علی. (۱۳۹۲). مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از گوشت مرغ، بوقلمون، بلدرچین، کبک، شترمرغ، گاو، گوسفند، بز، و شتر عرضه شده در شهرستان شهرکرد. مجله علوم غذایی و تغذیه، دوره ۱۰، شماره ۳، صفحه ۱۰۰-۹۶.

۲. شاکریان، امیر .، رحیمی، ابراهیم و شرافتی چالشتری، رضا. (۱۳۹۳). مخاطرات میکروب‌های منتقله از مواد غذایی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد. صفحه ۲۰-۱۵.

۳. شاکریان، امیر.، رحیمی، ابراهیم و کاظمی، سیامک. (۱۳۹۰). فراوانی و مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از مراحل مختلف خط کشتار گوسفندی. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره ۴، صفحه ۶۹-۶۳.

4. Aarestrup, F.M., And Engberg, J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res. 32: 311-321.
5. Brandl, M.T., Haxo, A.F., Bates, A.H., and Mandrell, R.E. 2004. Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phylosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants. Appl Environ Microbiol. 70:1182-1189.
6. Brochler, A.I., Krishnomurthy,A., Keen, C.L., Meyers, J.F., and Greshwin, M.E. 2008. The immune biology of mushrooms. Exp Biol Med, 233/3: 259-276.
7. Butzler, JP. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infec.10:868-876.
8. Buyukunal, S.K., Issa, G., Aksu, F., and Vural,A. 2015. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits collected from

www.SID.ir

www.SID.ir

Archive of SID

supermarkets in Istanbul, Turkey. J Food Nutri Sci. 3: 152-159.

9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Preliminary Food Net data on the incident of infection with pathogens transmitted commonly through food–selected sites, United States, 2003. Morbid Mortal Weekly Report. 53: 338-343.
10. Chai, L. C., Robin, T., Ragavan, U.M., Gunsalam, J.W., Bakar, F. A., Ghazali, F. M., Radu, S., and Kumar, M.P. 2007. Thermophilic *Campylobacter spp*. in salad vegetables in Malaysia. Int J Food Microbiol. 117: 106-111.
11. Chai, L. C., Fatimah, A. B. , Ghazali, F. M., Lee, H.Y., Tunung, R., Shamsinar, A.T., Laila, R. A.S., Thahirahtul, A. Z., Malakar, P.M., Nakaguchi,Y., Nishibuchi, M., and Son, R. 2008. Biosafety of *Campylobacter jejuni* from Raw Vegetables Consumed as Ulam with Reference to their Resistance to Antibiotics. Int Food Res J. 15:125-134.
12. Doorduyn, Y., van Den Brandhof, W.E., van Duynhoven, Y.T.H.P., Breukink, B.J., Wagenaar, J.A., and van Pelt, W. 2010. Risk factors for indigenous Campylobacter jejuni and Campylobacter coli infections in the Netherlands: A case-control study. Epidemiol Infect. 138: 1391–1404.
13. Doyle, M.P., and Schoeni, J.L. 1986. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms, Appl Exp Microbiol. 51: 449-450.
14. Hussain, I., Shahid Mahmood, M., Akhtar, M., and Khan, A. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. Food Microbiol. 24: 219-222.
15. Inglis, G.D., Kalischuk, L.D., and Busz, H.W. 2004. Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. J Appl Microbiol. 97: 410–420.
16. Isenbarger, DW., Hoge, CW., Srijan, A., Pitarangsi, C., Vithayasai, N., Bodhidatta, L., Hickey, KW., and Cam, P. 2002. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996-1999. Emerg Infec Dis.8: 175-180.
17. Jaderlund, L., Angela Sessitsch, A., and Arthurson, V. 2011. Persistence of Two *Campylobacter jejuni* Strains in Soil and on Spinach Plants .Appl Environ Soil Sci.1:1-7.
18. Kumar, A., Agarwal, R.K., Bhilegaonkar, K.N., Shome, B.R., and Bachhil, V.N. 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. Int J Food Microbiol. 67:153-155.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne,21.
20. Park, C.E., and Sanders, G.W. 1991. Occurence of thermotolerant *campylobacters* in fresh vegetables sold at farmers outdoor markets and supermarkets. Can J Microbiol. 38: 313- 316.
21. Rahimi, E., and Ameri, M. 2011. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. Food Control, 22: 1165-70.
22. Rahimi, E., and Tajbakhsh, E. 2008. Prevalence of *Campylobacter* species in poultry meat in the Esfahan city, Iran. Bulg J Vet Med. 11: 257-262.
23. Rahimi, E. 2010 a. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter* spp. in retail raw sheep and goat meat in Shahrekord, Iran. Global Vet. 4: 504-509.
24. Rahimi, E., Momtaz, H., and Bonyadian, M. 2010b. P.C.R. detection of *Campylobacter* spp. From turkey carcasses during processing plant in Iran. Food Control. 21: 692-694.
25. Son, I., Englen, MD., Berrang, ME., Fedorka-Cray, PJ., and Harrison, MA. 2007. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. Int J Food Microbiol.113:16-22.
26. Verhoeff-Bakkenes, L., Jansen, H.A.P.M., Veld, P.H., Beumer, R.R., Zwietering, M.H., and van Leusden, F.M. 2011. Consumption

www.SID.ir

Archive of SID

of raw vegetables and fruits: A risk factor for *Campylobacter* infections. Int J Food Microbiol. 144: 406–412.

27. Whiley, H., Akker, B.V.D., Giglio, S., and Bentham, R. 2013. The Role of Environmental Reservoirs in Human *Campylobacteriosis*. Int J Environ Res Public Health. 10: 5886–5907.

28. Whyte, P., Mcgill, K., Kowley ,O., Madden ,R.H., Moran, L., Carroll, C., Leary, A.O., Fanning, S., Colling, J.D., Mcnamara, E., Moore, J.E., and Cormican, M. 2004. Occurrence of *Campylobacter* in retail food, in Irish. Int J Food Microbiol. 95: 111-118.

www.SID.ir

Archive of SID

Campylobacter spp. as a Potential Pathogen in the edible mushrum (Agaricus mushrooms)

Shakerian A.

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Corresponding author: *Amshakerian@yahoo.com*

Received: 2016.01.30 Accepted: 2016.04.08

Abstract

Campylobacter spp. infections are of the most important foodborne diseases in many countries causing diarrhea in consumer. In this study, a total of 100 edible mushrums (*Agaricus mushrooms*) were purchase in order to detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* at 2014 year in retail market of Shahrekord city, Central of Iran. All of the samples were cultured in enrichment and specific bacteriological media and then used for Polymerase Chaine Reaction (PCR) method for detection of *C. jejuni* and *C. coli*. Out of 100 samples, 15 % were found to be contaminated with *Campylobacter* spp. From 15 positive samples, 13.3 % and 86.7 % were positive for *C. jejuni* and *C. coli*, respectively. Therefore the consumption of raw edible mushrum to *C. jejuni* and *C. coli* constitutes health hazard for human in this city.

Keywords: *Campylobacter* spp., Edible mushrum, Retail market, PCR, Shahrekord.

www.SID.ir