جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله کوتاه

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

محمد خلیلی[۱،*] و لادن منصوری نژند[۲]

[۱]کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

[۲] کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذائی

تاریخ دریافت: ۸٦/٥/۲۸ 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 سواپهائی تهیه و در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس نمونه ها در محیط غنی کننده، دمای ٤۲ 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 وجودکمپیلوباکتر ژوژنی با روش کشت و سپس با روشPCR مثبت گردید.

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

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳٤۱۳۲۲۲۰٤۷،پست الکترونیک: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

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 کمپیلو باکتر 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 کمپیلوباکتریائی میتوان به آرتریت سپتیک و باکترمی اشاره کرد (۲). اخیراً گزارشاتی از ارتباط کمپیلوباکتر ژوژنی با سندرم گلن باره و جدا شدن آن از موارد آپاندیسیت حاد وجود دارد (۱و۳). 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 پلیمراز (PCR) بود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

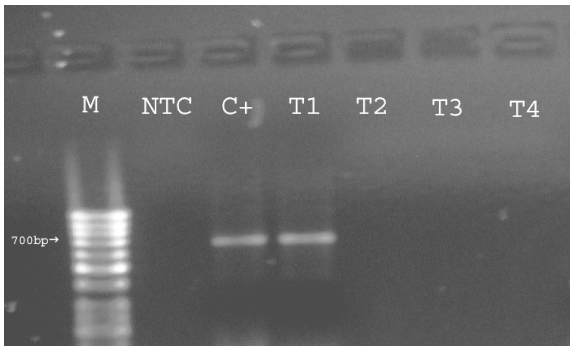
کشت باکتریولوژیکی: به محض رسیدن نمونه به آزمایشگاه پس از یک ورتکس اولیه از هر محیط انتقالی ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹/۹ سی سی محیط پرستون براث (هایمدیا، هند) واجد campylobacter selective supplement IV (هایمدیا، هند) حاوی آنتی بیوتیکهای وانکومایسین، پلی میکسین و تری متوپریم و خون دفیبرینه گوسفند (۵ درصد) انتقال داده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد، تحت شرایط میکروائروفیلیک ایجاد شده با گازپک Campygen (هایمدیا، هند) انکوبه کرده و ۱۰۰ میکرولیتر ازمحیط 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 کمپیلوباکترا 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 پرنده در حال پرواز رؤیت شدند با تست واکنش زنجیره ای پلیمراز(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 نوکلوئیک 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 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 بافرPCR ×۱۰، یون منیزیوم 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 templet 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 ۹٤ درجه به مدت ٤٥ ثانیه، آنلینگ در دمای ۵۰ درجه به مدت ٤٥ 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 bp ۱۰۰ (فرمنتاس، 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 برماید الکتروفورز گردید(شکل زیر).



الکتروفورز محصولات PCR. M مارکر bp ۱۰۰، 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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 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 کمپیلو باکتر 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 ۲۰۰٦ در اصفهان است که نتایج آن حاکی از آلودگی ٦/۷ درصد نمونه های سکومی طیور به کمپیلوباکتر ژوژنی می باشد(٤). در مطالعه ای که طارمی و همکاران در مورد آلودگی گوشت طیور در تهران انجام دادند صرفنظر از گونه باکتری ٦۳ درصد آلودگی گوشت طیور تهران را به کمپیلو باکتر گزارش کردند(۱۱). Magistrado و همکاران آلودگی ۵/۹ درصد طیور را در فیلیپین به کمپیلوباکتر ژوژنی گزارش کردند (٦). 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 نیازبه انجام مطالعات مشابه و در طیف وسیع تر در فارمهای طیور وجود دارد.

منابع

1- Altekruse, 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 micoaerophilic 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