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

شناسایی فنوتایپی و مولکولی *Campylobacter* و *Arcobacter* جدا شده از نمونه‌های محیطی در شمال ایران

مسعود قانع*[۱]، نیما بهادر[۲]، مینا اقبالی[۳]، مجید باصری صالحی[۴]

۱*و۲ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، فارس، ایران، صندوق پستی: ۱۸۱-۷۴۷۱۵

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۵۸۶-۴۶۸۱۵

۴ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروبیولوژی، کازرون، ایران، صندوق پستی: ۱۶۸-۷۳۱۳۵

m_ghane@Tonekaboniau.ac.ir

چکیده

در دهه گذشته مشاهده گردید که *Campylobacter* ها و *Arcobacter* ها از عوامل اصلی ابتلا انسان و حیوانات به التهاب روده می‌باشند. زیستگاه طبیعی اکثر گونه‌های *Campylobacter* و *Arcobacter* روده پرندگان و انواع حیوانات خونگرم می‌باشد. این ارگانیسم‌ها می‌توانند از طریق مدفوع پرندگان، حیوانات و انسان‌های آلوده به محیط مانند آب آشامیدنی وارد شوند. هدف اصلی از این مطالعه، جداسازی و شناسایی *Campylobacter* و *Arcobacter* از نمونه‌های محیطی در شمال ایران بود. جهت جداسازی از تکنیک prêt-KB و به منظور تعیین هویت و تشخیص نهایی از تست‌های فنوتایپینگ و مولکولی (سکوانسیینگ ژن 16S rRNA) استفاده گردید. از ۲۳۵ نمونه که از مدفوع حیوانات اهلی (گاو، گوسفند و اسب)، ماکیان، آب رودخانه‌ها و فاضلاب جمع‌آوری گردید، ۶۴ سویه شناسایی شد. از این تعداد ۴۸ سویه کاتالاز مثبت و ۱۶ سویه کاتالاز منفی تشخیص داده شدند. نتیجه فنوتایپینگ سویه‌های کاتالاز مثبت، شناسایی ۲۱ سویه از *Campylobacter jejuni*، ۱۳ سویه *Campylobacter coli*، ۱۰ سویه *Campylobacter lari*، ۱ سویه *Campylobacter gracilis* و ۳ سویه *Arcobacter butzleri* بود. تشخیص فنوتایپینگ تعدادی از سویه‌های جدا شده توسط تکنیک سکوانسیینگ ژن 16S rRNA تائید شد. نتایج به دست آمده نشان داد، اگرچه این باکتری‌ها تقریباً از تمامی مخازن محیطی جدا شدند، اما ماکیان و آب رودخانه‌ها به ترتیب، مخازن اصلی *Campylobacter* و *Arcobacter* می‌باشند. از این‌رو حضور این باکتری‌های بیماری‌زا در منابع محیطی مورد تحقیق می‌تواند احتمال انتقال این عوامل بیماری‌زا به انسان را از طریق مصرف محصولات غذایی و آب غیر بهداشتی افزایش دهد.

کلمات کلیدی: *Campylobacter*، *Arcobacter*، نمونه‌های محیطی، شمال ایران.

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

مقدمه

خانواده کمپیلوباکتریاسه شامل جنس‌های *Campylobacter* و *Arcobacter* می‌باشد. آن‌ها باکتری‌های گرم منفی، خمیده، شبیه بال پرنده و بدون اسپور بوده و به طور معمول در دستگاه گوارش پرندگان و حیوانات خونگرم زیست می‌کنند (۱). *Campylobacter* ها بر اساس تولید آنزیم کاتالاز به دو گروه کاتالاز مثبت و کاتالاز منفی تقسیم‌بندی می‌شوند، سویه‌های بیماری‌زای *Campylobacter* در گروه کاتالاز مثبت‌ها قرار دارند (۲و۳). در بین گونه‌های کاتالاز مثبت، *Campylobacter jejuni* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده اسهال باکتریایی در انسان می‌باشد (۴). تعداد باکتری در ایجاد عفونت بسیار پایین بوده به طوری که تخمین زده شده تنها ۵۰۰ سلول از آن می‌تواند سبب ایجاد بیماری در انسان شود (۵). این باکتری‌ها می‌توانند از طریق مصرف آب و محصولات غذایی آلوده به بدن انسان راه یابند (۶). در اوایل سال ۲۰۰۰ میلادی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها عنوان نمود بیش از ۲ میلیون عفونت کمپیلوباکتریایی هر ساله در آمریکا رخ می‌دهد (۷). گزارشات منتشر شده از کشورهای توسعه یافته نشان می‌دهد مصرف گوشت مرغ آلوده اصلی‌ترین راه سرایت *Campylobacter* می‌باشد (۸ و۹). انجمن سلامت مواد غذایی اروپا نیز طی گزارشی عنوان نمود شیوع کمپیلوباکتریوز در کشورهای صنعتی طی ۳۰ سال اخیر افزایش چشمگیری داشته است (۱۰). مطالعات اپیدمیولوژیکی که در کشورهای درحال توسعه نظیر تایلند، هندوستان، نیجریه و کنیا صورت گرفته نیز ماکیان را به عنوان مهمترین مخزن عفونت معرفی نموده است (۱۱).

اعضای جنس *Arcobacter* ارگانیسم‌های شبه کمپیلوباکتریایی هستند. آن‌ها اول بار در سال ۱۹۷۷ توسط الیس از جنین سقط شده گاو جدا گردیدند (۱۲) و در سال ۱۹۹۲ از جنس *Campylobacter* جدا شدند. جنس *Arcobacter* به وسیله قابلیت رشد در حضور اکسیژن و دماهای پایین از جنس *Campylobacter* متمایز می‌شود (۱۳). گونه معروف و بیماری‌زای آن *Arcobacter butzleri* می‌باشد (۱۴). اطلاعات جدید نشان می‌دهد *Arcobacter* ها به خصوص *Arcobacter butzleri* می‌تواند موجب بیماری روده‌ای و باکتریمی در انسان شود (۱۵). با این وجود اطلاعات بسیار محدودی در مورد مکانیسم بیماری‌زایی یا فاکتورهای ویرولانس *Arcobacter* ها در دست می‌باشد. آن‌ها به طور طبیعی در روده انسان حضور ندارند و تنها از بیماران مبتلا به اسهال، باکتریمی، اندوکاردیت و پریتونیت جدا شده‌اند (۱۶). مشابه انتقال باکتری‌های روده‌ای، راه سرایت آن‌ها نیز مدفوعی دهانی است (۱۷).

این باکتری در سراسر جهان از تعداد زیادی از حیوانات سالم جدا گردیده است. گونه‌های *Arcobacter* بر روی مواد غذایی با منشاء حیوانی از قبیل گوشت گوساله، بره، خوک و ماکیان شناسایی شده‌اند، که بیشترین میزان شیوع در گوشت ماکیان و خوک گزارش شده است. علاوه براین، آب آشامیدنی و خاک نیز می‌توانند به این باکتری آلوده شوند (۱۸). گزارشات محدودی پیرامون موارد شیوع عفونت ناشی از *Arcobacter* وجود دارد، که دلیل آن شاید این است که این ارگانیسم به طور معمول در تحقیقات کلینیکی رایج جایی ندارد.

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

در انتها باید یادآوری نمود، عفونت‌های کمپیلوباکتریایی یک معضل بزرگ جهانی برای اقتصاد و بهداشت جامعه محسوب می‌شوند (۱۰). به همین دلیل و بر اساس مدارک موجود در مورد حضور *Campylobacter* و *Arcobacter* در نواحی جغرافیایی متعدد، مطالعه فوق جهت شناخت حضور و میزان فراوانی آن‌ها در حیوانات خانگی (گاو، گوسفند و اسب)، ماکیان و منابع محیطی در شمال ایران (استان‌های گیلان و مازندران) اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه ۲۳۵ نمونه شامل نمونه‌های مدفوع حیوانات اهلی (گاو، گوسفند و اسب)، مدفوع ماکیان (مرغ، خروس و اردک)، آب رودخانه و فاضلاب از شهرستان‌های نور، نوشهر، تنکابن، رامسر، چابکسر، رودسر و لاهیجان جمع‌آوری شد. نمونه‌های آب رودخانه از مناطقی که آب حالت سکون داشت، جمع‌آوری گردید. برای این منظور از ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری که به طنابی متصل بود استفاده شد. ارلن به داخل رودخانه پرتاب گردید، پس از پایین رفتن به عمق رودخانه نمونه‌برداری صورت گرفت. ۵۰ میلی لیتر از نمونه آب جمع‌آوری شده به درون لوله‌های درب پیچ دار استریل منتقل و به آزمایشگاه ارسال گردید. همچنین با روش بیان شده بالا از کانال‌های فاضلاب نمونه‌گیری شد. نمونه‌های مدفوع با استفاده از چوب‌های استریل جمع‌آوری گردید. برای این منظور از قسمت مرکزی مدفوع حدود ۱ گرم نمونه برداشت شد و به درون لوله‌های حاوی آب مقطر استریل منتقل گردید.

تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در کوتاه‌ترین زمان و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردیدند. جهت پایین نگاه داشتن دما، تمامی لوله‌های آزمایش محتوی نمونه‌های آب، فاضلاب و مدفوع در کیف پر شده از یخ قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌گیری در فصول تابستان و پاییز صورت پذیرفت و به طور معمول زمان نمونه‌گیری از ساعت ۹ صبح تا ۲ بعد از ظهر و حداکثر زمان انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ۲ ساعت بود.

روش جداسازی باکتری از نمونه‌های جمع‌آوری شده

روش جداسازی *Campylobacter* ها و *Arcobacter* ها بر اساس تکنیک preT-KB بود (۱۹). برای انجام این تکنیک یک میلی‌لیتر از مایع مدفوع یا نمونه آب و فاضلاب به کمک سمپلرهای استریل به درون میکروتیوب‌های اپندروف منتقل و درون میکروسانتریفیوژ (اپندورف – آلمان) قرار داده شدند. نمونه‌ها در ۸۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ گردیدند و سپس میکروتیوب‌ها به آرامی از دستگاه خارج گشته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از این دوره زمانی، یک لوپ از بالای سوسپانسیون سانتریفیوژ شده را برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک – آلمان) غنی شده با گلیسرول، تریپتون و ویتامین E کشت سفره‌ای صورت پذیرفت.

تمامی پلیت‌های کشت داده شده جهت جداسازی *Campylobacter* ها در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط میکروائروفیل به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت قرار داده

شدند که جهت فراهم‌سازی شرایط میکروائروفیلیک از جار بی‌هوازی استفاده شد. برای جداسازی *Arcobacter*ها پلیت‌های مربوطه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط هوازی گرمخانه گذاری گردیدند. پس از این دوره زمانی پلیت‌ها جهت شناسایی *Campylobacter*ها و *Arcobacter* ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر روی محیط کشت پایه، کلنی هر دو نوع باکتری به شکل محدب، صاف، شفاف، بدون رنگ تا کرم رنگ به اندازه ۲-۴ میلی‌متر مشاهده گردید.

فنوتایپینگ

تمامی کلنی‌های مشکوک جهت شناسایی اولیه *Campylobacter* ها و *Arcobacter* ها مورد آزمایشات میکروسکوپی مستقیم، رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قند گلوکز قرار گرفتند. با مشاهده باسیل های خمیده در رنگ‌آمیزی گرم، متحرک بودن باکتری در روش لام مستقیم، مثبت شدن تست اکسیداز و منفی شدن تست تخمیر قند گلوکز، می‌توان تا حدود بسیار زیادی به جداسازی و شناسایی اولیه آن‌ها مطمئن شد. در مرحله بعد از تست‌های فنوتیپی معرفی شده به وسیله آتابای و کوری (۲۰) که شامل لید استات، احیای نیترات، هیدرولیز هیپورات، تولید اوره آز، رشد در محیط ۱٪ گلیسین، رشد در محیط واجد ۳/۵ درصد نمک طعام، رشد در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و سفالوتین است استفاده شد.

ژنوتایپینگ

شناسایی مولکولی بعضی سویه‌های *Campylobacter* و *Arcobacter* بر اساس سکوانسینگ ژن 16S rRNA مطابق روش زیر صورت پذیرفت.

استخراج DNA

استخراج DNA از باکتری طبق دستورالعمل شرکت سازنده (روچ – آلمان) اجرا گردید. برای تایید استخراج DNA، جذب نوری نمونه در محدوده ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه بیوفتومتر (اپندروف- آلمان) بررسی شد و مابقی نمونه در دمای (۲+ تا ۶+ یا ۱۵- تا ۲۵- درجه سیلسیوس) در فریزر قرار داده شدند.

تکثیر ژن 16S rRNA به وسیله تکنیک PCR

به منظور اجرای روند PCR، پرایمرها فوروارد و ریورس برای ژن 16S rRNA توسط شرکت تاگ کمپنهاگن (دانمارک) آماده گردید. توالی پرایمر فوروارد:

5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'

و توالی پرایمر ریورس:

5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGA-3'

می‌باشد.

مخلوط واکنش PCR برای انجام یک واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر به این صورت تهیه گردید: ۱۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (سیناژن - ایران)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (سیناژن - ایران)، ۱ میکرولیتر dNTP (سیناژن - ایران)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس (با غلظت ۱۰/mol)، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم

تـگ پلـی مـراز (سـیناژن - ایـران) و ۵ میکرولیتـر از DNA الگـو. فرآینـد PCR توسـط دسـتگاه ترمـال سـیکلر (اپنـدورف - آلمـان)، بـه صـورت زیـر انجـام گرفت.

جهت آغاز فرآیند پلی مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به مدت ۴ دقیقه بـر روی ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد تنظیم گردید. متعاقب آن ۳۵ سیکل PCR بـه صـورت ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـرای ۴۰ ثانیـه، ۵۶ درجـه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سـانتی‌گـراد بـرای مدت ۴۰ ثانیه اجرا گردید. در نهایت بـه مـدت ۵ دقیقـه نیز عمل طویل سـازی نهـایی در ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد اجرا گردید.

الکتروفورز

بـرای انجـام الکتروفـورز، مقـدار ۵ میکرولیتـر از سـایز مـارکر ۲۰۰۰ (فرمنتـاس- روسـیه) و هـر یـک از نمونه‌ها، به داخل چاهک‌های تعبیه شـده در ژل آگـارز ۱/۵ درصد منتقل گردیدند. سـپس ولتـاژ را بـر روی ۷۵ ولت تنظیم نموده و ۶۰ دقیقه زمان در نظـر گرفتـه شـد. پس از گذشـت زمـان فـوق ژل بـه درون دسـتگاه UV تـرانس لومینـاتور (یـو- وی داک - انگلسـتان) منتقـل گردید تا باندهای تشکیل شده مشاهده شود.

تعیین توالی ژن 16S rRNA

برای تایید نهایی شناسایی سویه‌های جدا شـده در این تحقیق مقـدار ۵۰ میکرولیتـر از محصـول PCR بـه کمپانی ماکروجین کره:

(http://www.macrogen.com)

فرستاده شد.

بیوانفورماتیک

تمامی توالی‌های ژنی به دست آمده با اسـتفاده از نرم افزار BLAST موجـود در سـایت ان سـی بـی آی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

جداسازی *Campylobacter* ها *Arcobacter* ها و از منابع محیطی مختلف

نتایج به دسـت آمـده از ایـن تحقیـق نشـان داد از مجموع ۲۳۵ نمونه جمع‌آوری شده ۶۱ نمونه (۲۵/۹۵٪) از نظر حضور *Campylobacter* و ۳ نمونه (۱/۲۷٪) از نظر حضور *Arcobacter* مثبت بود. این باکتری‌هـا از تمامی منابع با فراوانی متفاوت به دست آمدند. مطابق بـا جـدول ۱ میـزان شـیوع *Campylobacter* هـا در ماکیـان بـالا و در فاضـلاب پـایین مـی‌باشـد. همچنـین *Arcobacter* تنهـا از آب رودخانـه و مـدفوع گـاو جداسازی گردید. برای بررسی‌های آماری آزمون کای دو، از نـرم افـزار SPSS اسـتفاده شـد. سـطح معنـی‌دار بـودن بـا درجـه اطمینـان ۹۵٪ یعنـی $P<۰/۰۵$ در نظـر گرفته شد. در ارتباط با رابطه میزان فراوانی با نوع نمونـه مقـدار عـددی $P = ۰/۰۱۷$ بـه دسـت آمـده اسـت و از آنجایی که مقدار عددی P کمتـر از ۰/۰۵ مـی‌باشـد در نتیجه رابطه معنی‌داری بین میزان فراوانـی بـا نـوع نمونـه وجود دارد.

جدول ۱: میزان فراوانی *Campylobacter* و *Arcobacter* از منابع مختلف محیطی

نمونه ها	تعداد نمونه	*Campylobacter* جداسازی شده	*Arcobacter* جداسازی شده
گاو	۶۳	۱۷ (۲۷)	۱ (۱/۵۸)
گوسفند	۲۲	۲ (۹)	–
اسب	۱۵	۳ (۲۰)	–
ماکیان	۴۳	۱۵ (۳۴/۸۸)	–
رودخانه ها	۶۵	۲۲ (۳۳/۸۴)	۲ (۳)
فاضلاب	۲۷	۲ (۷/۴)	–
مجموع	۲۳۵	۶۱ (۲۵/۹۵)	۳ (۱/۲۷)

*اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند

میزان فراوانی سویه های کاتالاز مثبت و منفی در نمونه های محیطی مختلف

از مجموع ۶۴ سویه *Campylobacter* و *Arcobacter* جدا شده از منابع محیطی مختلف ۴۸ سویه کاتالاز مثبت و ۱۶ سویه کاتالاز منفی بودند (جدول ۲). بالاترین میزان فراوانی سویه‌های کاتالاز مثبت و کاتالاز منفی به ترتیب در مدفوع گاو و گوسفند مشاهده گردید. همچنین سویه‌های کاتالاز مثبت از گوسفند و سویه‌های کاتالاز منفی از فاضلاب جدا نشدند. در مجموع فراوانی سویه‌های کاتالاز مثبت ۷۵٪ و انواع کاتالاز منفی ۲۵٪ گزارش گردید.

جدول ۲: تعداد موارد کاتالاز مثبت و منفی بر حسب نوع نمونه

نمونه ها	تعداد سویه های جدا شده	تعداد موارد کاتالاز مثبت	تعداد موارد کاتالاز منفی
گاو	۱۸	۱۵ (۸۳/۳۳)	۳ (۱۶/۶۶)
گوسفند	۲	–	۲ (۱۰۰)
اسب	۳	۲ (۶۷)	۱ (۳۳)
ماکیان	۱۵	۱۲ (۸۰)	۳ (۲۰)
رودخانه ها	۲۴	۱۷ (۷۰/۸۳)	۷ (۲۹/۱۷)
فاضلاب	۲	۲ (۱۰۰)	–
مجموع	۶۴	۴۸ (۷۵)	۱۶ (۲۵)

فنوتایپینگ سویه‌های جدا شده

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود از مجموع ۴۸ سویه کاتالاز مثبت جدا شده ۲۱ سویه *Campylobacter jejuni*، ۱۳ سویه *Campylobacter coli*، ۱۰ سویه *Campylobacter lari* ، یک سویه *Campylobacter gracilis* و ۳ سویه *Arcobacter butzleri* تشخیص داده شدند. از اینرو میزان شیوع *Campylobacter jejuni* و *Campylobacter*

gracilis به ترتیب بیشترین و کمترین گزارش می‌گردد. اگرچه *Campylobacter jejuni* از تمام منابع جدا گردید اما *Campylobacter coli* از فاضلاب به دست نیامد. *Campylobacter lari* نیز از تمامی منابع به جز فاضلاب و مدفوع اسب جداسازی شد. در این مطالعه همچنین *Arcobacter butzleri* از مدفوع گاو و آب رودخانه جداسازی شد. این درحالی است که *Campylobacter gracilis* فقط از آب رودخانه به دست آمد.

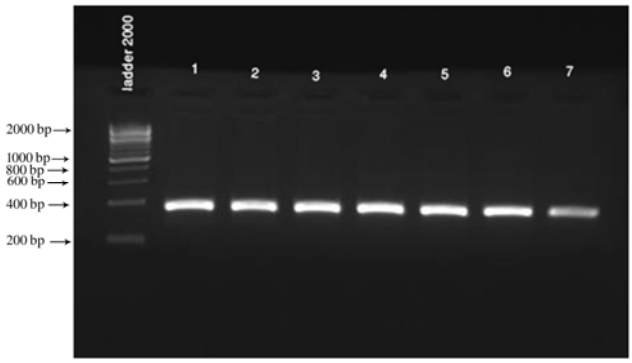
جدول ۳: فنوتایپینگ گونه‌های کاتالاز مثبت جدا شده از منابع مختلف محیطی

نمونه	تعداد موارد کاتالاز مثبت	*Campylobacter jejuni*	*Campylobacter coli*	*Campylobacter lari*	*Campylobacter gracilis*	*Arcobacter butzleri*
گاو	۱۵	۷	۴	۳	۰	۱
اسب	۲	۱	۱	۰	۰	۰
ماکیان	۱۲	۴	۳	۵	۰	۰
رودخانه ها	۱۷	۷	۵	۲	۱	۲
فاضلاب	۲	۲	۰	۰	۰	۰
مجموع	۴۸	۲۱	۱۳	۱۰	۱	۳

ژنوتایپینگ

سکوانسینگ ژن 16S rRNA که بر روی محصول PCR (شکل ۱) انجام گرفت، بجز در یک مورد واضح بود (نمونه شماره ۲ به علت نامعلوم که توسط شرکت ماکروژن[1] کشور کره گزارش شد قابل سکوانس نبود). تمامی نمونه‌ها پس از سکوانسینگ بوسیله نرم‌افزار بلاست مورد الاینمینت قرار گرفتند. همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود آنالیز بلاست سکانس 16S rRNA در مورد نمونه شماره ۱ صد درصد همولوژی را با *Campylobacter gracilis* سویه ATCC 33236 نشان می‌دهد. در مورد نمونه شماره ۳ آنالیز بلاست ۹۹٪ همولوژی را با *Campylobacter jejuni* سویه SWUN0747 نشان داد. آنالیز بلاست برای نمونه چهارم ۹۹ درصد همولوژی با *Aquaspirillum polymorphum* سویه DSM 9160 را نشان داد. در مورد نمونه‌های ۵ و ۷ به ترتیب ۱۰۰ و ۹۸٪ همولوژی با *Arcobacter butzleri* سویه ED-1 گزارش گردید. آنالیز بلاست برای نمونه شماره ۶ نود و نه درصد همولوژی با *Campylobacter jejuni* سویه SWUN1206 را نشان داد. نتایج به دست آمده از مقایسه بین تست‌های فنوتایپینگ با ژنوتایپینگ نشان داد، در اکثر موارد (به جز نمونه شماره ۴) تکنیک‌های مولکولی، روش فنوتایپینگ را مورد تایید قرار دادند.

[1] Macrogene



شکل ۱: آگارز ژل الکتروفورز: اولین چاهک سمت چپ سایز مارکر شماره ۲۰۰۰، ستون ۱ تا ۷ محصول PCR سویه های جدا شده را نشان می دهد.

جدول ۴: مقایسه بین تکنیک‌های فنوتیپینگ و مولکولی در تشخیص گونه‌های Campylobacter و Arcobacter

شماره نمونه	تشخیص فنوتایپینگ	تشخیص ژنوتایپینگ
۱	*Campylobacter gracilis*	۱۰۰٪ همولوژی با *Campylobacter gracilis* سویه ATCC 33236
۲	*Campylobacter coli*	غیر قابل سکوانس
۳	*Campylobacter jejuni*	۹۹٪ همولوژی با *Campylobacter jejuni* سویه SWUN0747
۴	*Campylobacter lari*	۹۹٪ همولوژی با *Aquaspirillum polymorphum* سویه DSM 9160
۵	*Arcobacter butzleri*	۱۰۰٪ همولوژی با *Arcobacter butzleri* سویه ED-1
۶	*Campylobacter jejuni*	۹۹٪ همولوژی با *Campylobacter jejuni* سویه SWUN1206
۷	*Arcobacter butzleri*	۹۸٪ با *Arcobacter butzleri* سویه ED-1

بحث

Campylobacter ها و *Arcobacter* ها ارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند از طریق مواد غذایی مانند گوشت، شیر، آب و تماس با حیوانات مزرعه به انسان منتقل شوند. به همین دلیل عفونت ناشی از آن جزو عفونت‌های مشترک بین انسان و دام تلقی می‌شود (۲۱). بنابراین فاکتورهای خطر برای ابتلا به این نوع عفونت شامل مصرف آب و مواد غذایی غیر بهداشتی می‌باشد (۲۲، ۲۳و ۲۴).

جهت شناسایی منابع عفونت نیاز به مطالعه در خصوص جداسازی سویه‌های این دو باکتری از زنجیره مواد غذایی و محیط می‌باشد. در این مطالعه از روش‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص گونه‌های مختلف *Campylobacter* و *Arcobacter* استفاده شد. همچنین از سکوانسینگ ژن 16S rRNA جهت تایید تست‌های فنوتایپینگ کمک گرفته شد. در مطالعات متعددی که در همین زمینه اجرا گردید از روش سکوانسینگ ژن 16S rRNA جهت شناسایی *Campylobacter* و *Arcobacter* استفاده شده است. به عنوان مثال Mateo و همکاران (۲۵) با استفاده از روش PCR حضور *Campylobacter jejuni* و *Campylobacter coli* را در محصولات ماکیان خام تشخیص دادند. همچنین Morris و همکاران (۲۶) *Campylobacter* ها را با استفاده از

روش سکوانسینگ ژن 16S rRNA شناسایی نمودند. بر اساس اطلاعات به دست آمده تقریباً ۸۶٪ تشخیص فنوتایپینگ به وسیله روش‌های ژنوتایپینگ تایید گردید.

در بین تمام مخازن شناخته شده ماکیان مهمترین منبع برای عفونت کمپیلوباکتریایی هستند (۲۷). زیرا پراکندگی گونه‌های مختلف *Campylobacter* در گوشت جوجه مشابه با سویه‌های جدا شده از انسان می‌باشد. به همین دلیل پیشنهاد شده است که مصرف محصولات خام نقش مهمی در عفونت انسان بازی می‌کنند (۱۱). حیوانات خانگی و ماکیان می‌توانند یک رابطه‌ای بین زیست گاه طبیعی *Campylobacter* ها و انسان ایجاد نمایند. از این‌رو مطالعه حاضر جهت جداسازی این باکتری‌ها از نمونه‌های مدفوع (حیوانات اهلی و ماکیان)، آب رودخانه‌ها و فاضلاب اجرا گردید. میزان فراوانی *Campylobacter* ها در ماکیان نسبتاً بالا گزارش گردید و در این بین *Campylobacter jejuni* بیشترین گونه شناسایی شده در ماکیان تشخیص داده شد. مطالعات متعدد صورت گرفته نیز نشان داده‌اند ماکیان مهمترین مخزن برای *Campylobacter jejuni* بوده و غالباً با ایجاد عفونت در انسان در مرتبط می‌باشد (۲۸و۲۹). در مجموع ماکیان، گاو، اسب و گوسفند به عنوان مخازن آلودگی در این ناحیه جغرافیایی (شهرستان‌های غرب استان مازندران و شرق استان گیلان) شناخته شدند.

همان گونه که بیان شد، گونه‌های *Arcobacter* نیز یک باکتری بیماری‌زای انسانی است که از طریق آب و مواد غذایی به جامعه انسانی راه می‌یابد (۲۴). با این حال در مورد اپیدمیولوژی گونه‌های *Arcobacter* اطلاعات ناچیزی در دست می‌باشد. در کشورهای صنعتی، مواد غذایی غیر بهداشتی به عنوان مهمترین راه برای آلودگی انسان به عفونت شناخته شده است (۳۰). *Arcobacter butzleri* در یک طیف وسیعی از محصولات گوشتی خام شامل گوشت جوجه، گوساله، خوک و بره شناسایی شده است. بیشترین شیوع آن در گوشت ماکیان گزارش شده است (۲۳و۳۰). گونه‌های مختلف این باکتری در آب رودخانه و کانال‌های آب نیز شناسایی شده‌اند. این باکتری می‌تواند به سطوح لوله‌های آب متصل شده و از این طریق وارد زنجیره غذایی انسان شود. به غیر از آب، خاک نیز می‌تواند به این باکتری آلوده باشد.

نتایج به دست آمده از این تحقیق در واقع اولین گزارش از جداسازی *Arcobacter* از آب‌های رودخانه و حیوانات اهلی در ایران محسوب می‌شود. نکته حائز اهمیت شیوع بالای گونه‌های بیماریزای *Campylobacter* و *Arcobacter* در آب رودخانه‌های استان‌های شمالی کشور می باشد که علت آن را می‌توان به شرایط آب و هوایی خاص در شمال ایران، که منطقه‌ای با آب و هوای مرطوب می‌باشد نسبت داد.

Baserisalehi و همکاران (۱۱) بیان نمودند فراوانی *Campylobacter* ها در محیط بستگی به شرایط اقلیمی دارد. آن‌ها اظهار نمودند میزان فراوانی *Campylobacter* ها در شرایط آب و هوایی خشک کمتر از شرایط آب و هوایی مرطوب می‌باشد. اطلاعات به دست آمده از فراوانی *Campylobacter* در مطالعه حاضر این فرضیه را تایید می‌کند. لازم به ذکر است شرایط آب و هوایی در استان‌های گیلان و مازندران بارانی و مرطوب بوده و تغییرات دمایی بین ۱۲

تا ۳۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بارش‌های فراوانی که در اکثر فصول سال در استان‌های شمالی کشور وجود دارد، ورود این عوامل بیماریزا را از خاک‌های آلوده به آب‌های سطحی و در ادامه به زنجیره غذایی تسهیل می‌کند.

اگرچه در مورد ابتلا به عفونت‌های کمپیلوباکتریایی و شناسایی مخازن عفونت در ایران چندین مطالعه اجرا شده اما جداسازی *Campylobacter* و *Arcobacter* از آب‌های رودخانه و فاضلاب برای اولین بار در ایران صورت پذیرفت. با توجه شناسایی گونه‌های بیماری‌زای آن‌ها از منابع محیطی مختلف جامعه پزشکی کشور می‌بایست به نقش این دو باکتری در ایجاد عفونت‌های گوارشی و عوارض پس از آن توجه بیشتری نمایند.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که این پژوهش در آنجا اجرا گردیده و مسئولین و اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Baserisalehi, M. and Bahador, N., 2008. A study relationship of plasmid with antibiotic resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. isolates from environmental samples. Asian Network for Scientific Information, ISSN 1682-296X.
2. Blaser, M.J.; Hardesty, H.L.; Powers, B. and Wang, W.L., 1980. Survival of *C.fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. Journal of Clinical Microbiol, 11: 309-313.
3. Blaser, M.J.; Wells, J.G.; Feldman, R.A.; Pollard, R.A. and Allen, J.R., 1983. The Collaborative Diarrheal Disease Study Group. *Campylobacter* enteritis in the United States: a multicenter study. Ann Intern Med. 98:360-5.
4. Cardinale, E.; Dromigny, J.; Tall, F.; Ndiaye, M.; Konte, M. and Perrier, J.D., 2003. Fluoroquinolone susceptibility of *Campylobacter* strains, Senegal. Emerging Infection Disease, 9 (11): 1479-1484.
5. Black, R.E.; Levine, M.M.; Clements, M.I.; Hughes, T.P. and Blaser. M.J., 1989. Experimental *C. jejuni* infection and human. Journal Infectious Disease, 157:472-479.
6. Aydin, F.; Gumussoy, K.S.; Ica, T.; Sumerkan, B.; Esel, D.; Akan, M. and Odemir, A., 2007. The prevalence of *C. jejuni* in various sources in Kayseri, Turkey and molecular analysis of isolated strains by PCR-RFLP. Turkish Journal Veternary Animal Science, 31(1): 13-19.
7. Mead, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M. and Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5(5): 607-625.
8. Tauxe, R.V., 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrial nations. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, editors. *Campylobacter jejuni*: current and future trends. Washington: American Society for Microbiology, 9-12.
9. Rivoal, K.; Denis, M.; Salvat, G.; Coin, P. and Ermel, G., 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. Letters in Applied Microbiology, 29: 370-374.
10. Heuer, O.E.; Pedersen, K.; Andersen, J.S. and Madsen, M., 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Letters of Applied Microbiology, 33: 269-274.

11. Baserisalehi, M.; Bahador, N. and Kapadnis, B., 2007. Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from domestic animal and poultry in south of Iran. Pakistan journal of biological science, 10(9): 1519-1524.
12. Ellis, W.A.; Neill, S.D.; O'Brien, J.J.; Ferguson, H.W. and Hanna, J., 1977. Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. Vet Rec, 100:451–2.
13. Vandamme, P.; Pugina, P.; Benzi, G. and van Etterijck, R., 1992. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. Journal Clinical Microbiol, 30:2335-7.
14. Lehner, A.; Tasara, T. and Stephan, R.. 2005. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 102: 127-135.
15. Houf, K. and Stephan, R., 2007. Isolation and characterization of the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* from human stool. Journal of Microbiological Methods, 68: 408-413.
16. Vandenberg, O.; Dediste, A.; Houf, K. and Ibekwem, S., 2004. *Arcobacter* Species in Humans. Emerging infectious disease, 42: 1851–1852.
17. Altekruse, S.F. and Swerdlow, D.L., 2002. *Campylobacter jejuni* and related organisms. In D.O. Cliver & H.P . Riemann (Eds.) Foodborne diseases, 103-112.
18. Keller, S.; Räber, S.; Tasara, T. and Stephan, R., 2006. Prevalence of *Arcobacter butzleri* in fecal samples, on carcasses and in retail meat of cattle, pig and poultry in Switzerland. Archiv für Lebensmittelhygiene, 57: 64-68.
19. Baserisalehi, M.; Bahador, N. and Kapadnis, B., 2004. A novel method for isolation of *Campylobacter* spp. from environmental samples, involving sample processing and blood and antibiotic free medium. Journal Applied microbio1, 97: 853-860.
20. Atabay, H.I. and Corry, J.E.I., 1997. The prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacters* in broiler chickens. Journal of Applied Microbiology, 83:619-626.
21. Coker, A.O.; Isokpehi, R.D.; Thomas, B.N.; Fagbenro-Beyioku, A.F. and Omilabu, S.A., 2000. Zoonotic infections in Nigeria. Overview from a medical perspective. Acta Trop, 37: 215-221.
22. McMahon, D.J. and Mahmood, F., 1993. Endemic *Campylobacter* in south Auckland. CDNZ, 93: 70-72.
23. Houf, K. and Stephan, R., 2007. Isolation and characterization of the emerging foodborne pathogen Arcobacter from human stool. Journal of Microbiological Methods, 68: 408-413.
24. Keller, S.; Räber, S.; Tasara, T. and Stephan, R., 2006. Prevalence of *Arcobacter butzleri* in fecal samples, on carcasses and in retail meat of cattle, pig and poultry in Switzerland. Archiv für Lebensmittelhygiene, 57: 64-68.
25. Mateo, E.; Cárcamo, J.; Urquijo, M.; Perales, S. and Fernández-Astorga, A., 2006. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. CABI Abstract.
26. Morris, G.A.J.; Ikumapayi, U.N.; Antonio, M. and Adegbola, R., 2008. A novel *Campylobacter jejuni* sequence type from a culture-negative patient in the Gambia. PLoS ONE, 3(3): e1773.
27. Kapperud, J.; Skjerve, L.; Vik, K.; Hauge, A.; Lysaker, A.; Aalmen, S.M.; Ostrof, S. and Potter, M., 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler hocks. Epidemiology Infection, 111: 245-250.
28. Harrios, N.V.; Thompson, D.; Matin, D.S. and Nolan, C.M., 1986. Survey of *Campylobacter* and other bacterial contaminations of pre-market chicken and retail poultry and meats, King county, Washington. Am. Journal Public Health, 76: 401-405.

29. Humphery, T.J.; Henleyand, A. and Lanning, D.G., 1993. The colonization of broiler chickens with *Camp. Jejuni* some epidemiological investigations. Epidemiology Infection, 110: 601-607.

30. Collado, L.; Guarro, J. and Figueras, M.J., 2009. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. Journal of Food Protection, 72 (5): 1102-1106.