تعیین الگوی عوامل حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد نیمچه‌های گوشتی کشتارشده در استان چهارمحال و بختیاری

غلامرضا بنی شریف[۱]، سپیده کریمی[۱]، حسن ممتاز[۲*]

۱- دانش آموخته ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۴ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۹ فروردین ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۰ خرداد ۱۳۹۸

چکیده

مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی آلودگی کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه طیور استان چهارمحال و بختیاری به دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و بررسی الگوی ویرولانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده انجام شد. در این مطالعه، تعداد ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان به طور تصادفی جمع‌آوری شد. پس از جداسازی کمپیلوباکتر به روش کشت میکروبی، برای تأیید قطعی *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جدا شده و افتراق قطعی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از ردیابی ژن‌های *16SrRNA*، *mapA* و *ceuE* به روش PCR استفاده شد و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویرولانس ایزوله‌ها ارزیابی گردید. از مجموع ۱۸۶ نمونه کبد أخذ شده، تعداد ۹۴ نمونه (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌های *کمپیلوباکتر* بودند که از این تعداد، ۶۲ نمونه آلوده به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد)، ۲۶ نمونه آلوده به گونه *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) و ۱۱ نمونه آلوده به هر دو گونه فوق بودند (۶/۴۵ درصد). تمام ژن‌های حدت بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* حضور داشتند و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA*، *cdtB*، *cdtC*، *ima* و *racR* ردیابی شد. تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه بوده و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل (۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. آلودگی بالای کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های استان چهارمحال و بختیاری به *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای این ایزوله‌ها، نشانگر خطر بالقوه کبد در انتقال آلودگی به انسان می‌باشد.

واژگان کلیدی: *کمپیلوباکترژژونی، کمپیلوباکترکولی، گوشت مرغ، فاکتورهای حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: hamomtaz@iaushk.ac.ir

مقدمه

کمپیلوباکترها گروهی از باکتری‌های گرم منفی، میکروآئروفیلیک و مقاوم به حرارت هستند که سبب بروز بیماری دستگاه گوارش انسان شده و از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل و جزء بیماری‌های زئونوز محسوب می‌گردند (۱)، به طوری که بین ۴۰ تا ۶۰ درصد کودکان کمتر از ۵ سال حداقل یکی از علائم عفونت به این عامل را در سال اول تولد نشان می دهند (۲).

بیماری ۲ تا ۳ روز پس از مصرف غذا یا آب آلوده بروز یافته و در اغلب موارد به مدت یک هفته بهبود می‌یابد مگر در مواردی که بیمار دچار بیماری‌های خودایمن مانند سندرم گیلن- باره و میلر- فیشر باشد (۳). عفونت دستگاه گوارش با *کمپیلوباکتر* می‌تواند سبب درد شکم، تب، لکوسیتوز و حضور گلبول‌های سفید در مدفوع گردد (۴).

اغلب عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر توسط دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* (حدود ۹۰ درصد موارد) و *کمپیلوباکترکولی* (حدود ۱۰ درصد موارد) بروز یافته و دیگر گونه‌ها مانند *کمپیلوباکترلاری* و *کمپیلوباکترآپسالینسیس* به صورت تک‌گیر به وقوع می پیوندند (۵).

کمپیلوباکترها پس از گونه‌های *سالمونلا* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مسمومیت غذایی از طریق شیر خام، تخم‌مرغ و ترکیبات تخم‌مرغ خام، گوشت طیور و گوشت قرمز هستند (۶، ۷).

گونه‌های مختلف *کمپیلوباکتر* توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال مخاط روده و نفوذ در آنها را دارند (۸).

اتصال، کلونیزه شدن و تهاجم به دیوارهٔ روده و در نهایت تولید توکسین توسط گونه‌های *کمپیلوباکتر* تحت کنترل برخی از ژن‌ها بوده که سویه‌های متفاوت از نظر بیماری‌زایی را به وجود می‌آورد. ژن‌های *cadF*، *racR*، *dnaJ* و *flaA* ژن‌های مهم در اتصال و کلونیزه شدن باکتری در روده محسوب می‌شوند (۹، ۱۰).

توکسین تولیدی توسط *کمپیلوباکترها* تحت کنترل ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* است که وجود هر سه تحت واحد برای فعالیت کامل توکسین لازم هستند (۱۰، ۱۱).

معمولاً مقاومت آنتی‌بیوتکی در *کمپیلوباکترها* به دلیل ایجاد موتاسیون در محل‌های اختصاصی اتصالی رخ می‌دهد به خصوص در مورد کوئینولون‌ها، اما مکانیسم‌های دیگر مثل efflux pumps نیز در بروز مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند ماکرولیدها، بتالاکتام‌ها، اریترومایسین و تتراسایکلین مؤثر هستند (۱۲، ۱۳).

مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین فراوانی آلودگی کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه طیور استان چهارمحال و بختیاری به دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* و بررسی الگوی ویرولانس ومقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی باکتری: در این مطالعه توصیفی- مقطعی که درطول ۶ ماه ابتدای سال ۱۳۹۷ در استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، تعداد ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان به طور تصادفی جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها بعد از معاینه کامل لاشه و تأیید سلامت لاشه توسط بازرس فنی کشتارگاه در حجم ۱۰ گرم از کبد هر نیمچه گوشتی کشتار شده درکیسه‌های پلاستیکی استریل اخذ و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. نمونه‌های اخذ شده در ۹۰

میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده Preston Enrichment Broth (Himedia, India) واجد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیلیک (۵ درصد O_2، ۱۰ درصد Co_2، ۸۵ درصد N_2) گرمخانه گذاری شدند.

باکتری غنی شده در محیط انتخابی (CCDA) Campylobacter Blood-Free Selective Agar حاوی آنتی بیوتیک های آمفوتریپسین B و سفاپرازون کشت وپس از رشد تست های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تجزیه هیپورات سدیم روی پرگنه های رشد یافته انجام شد(۱۵و۱۴). ایزوله های جدا شده جهت مطالعات بعدی در محیط مایع TSB کشت داده شدند.

جهت استخراج DNA ازایزوله های جدا شده از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از کشت مایع یک شبه باکتری در محیط TSB در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا گردید.

جدول۱ـ توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص گونه های *کمپیلوباکتر* و عوامل حدت در آنها

هدف	توالی پرایمر(۳ـ ۵)	دمای اتصال پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
جنس کمپیلوباکتر ***16SrRNA***	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	۵۹	۸۵۷
کمپیلوباکترژژونی ***mapA***	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	۵۹	۵۸۹
کمپیلوباکترکولی ***ceuE***	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	۵۹	۴۶۲
flaA	AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT	۵۳	۵۸۵
cadF	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۵	۴۰۰
racR	GATGATCCTGACTTTG TCTCCTATTTTTACCC	۴۵	۵۸۴
dnaJ	AAGGCTTTGGCTCATC CTTTTTGTTCATCGTT	۴۶	۷۲۰
virB11	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT CCTGCGTGTCCTGTGTTATTTACCC	۵۳	۴۹۴
ciaB	TTTTTATCAGTCCTTA TTTCGGTATCATTAGC	۴۲	۹۸۶
pldA	AAGCTTATGCGTTTTT TATAAGGCTTTCTCCA	۴۵	۹۱۳
cdtA	CCTTGTGATGCAAGCAATC ACACTCCATTTGCTTTCTG	۴۹	۳۷۰
cdtB	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	۵۱	۶۲۰
cdtC	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	۴۷	۱۸۲
wlaN	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG CCATTTGAATTGATATTTTTG	۴۶	۶۷۲
***tet*(O)**	GCGTTTTGTTTATGTGCG ATGGACAACCCGACAGAAG	۵۴	۵۵۹
***cme*B**	TCCTAGCAGCACAATATG AGCTTCGATAGCTGCATC	۵۴	۲۴۱
***bla*OXA-61**	AGAGTATAATACAAGCG TAGTGAGTTGTCAAGCC	۵۴	۳۷۲
aphA-3-1	TGCGTAAAAGATACGGAAG CAATCAGGCTTGATCCCC	۵۴	۷۰۱

ردیابی ژن‌های حدت: برای تائید قطعی *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جدا شده از ردیابی ژن *16SrRNA* به روش PCR استفاده شد که این ناحیه ژنی در تمام گونه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد (۱۶).

جهت افتراق قطعی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از PCR ژن‌های *mapA* و *ceuE* با زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد.

واکنش PCR در دستگاه (Germany) FlexCycler^2 در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱/۵ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومول NTP Mix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای RوF (مربوط به سه ژن) ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط هر ایزوله تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از : یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد.

در ایزوله‌های جدا شده حضور شایع‌ترین عوامل حدت ارزیابی شد. برای این منظوراز زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد:

آزمایش PCR برای هر ژن به طور جداگانه در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR 10x buffer، ۱ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۱۵۰میکرومول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و۴ میکرولیتراز DNA مربوط به هر نمونه تنظیم شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۴۵ تا ۵۳ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع ژن طبق جدول۱) ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از نمونه‌های کبد مورد مطالعه به دو روش فنوتیپی وژنوتیپی ارزیابی گردید. جهت ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل ژن‌های *blaOXA-61*، *cmeB*، *aphA-3-1* و*tet(O)* به روش PCR در قالب یک واکنش PCR چندگانه‌ای ردیابی گردید که توالی پرایمرها مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است (۱۸):

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۴ میلی‌مول $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTPmix، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای RوF مربوط به هرژن،۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله با برنامه دمایی شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه،۵۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد.

در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام و بعد از مشاهده ژل در زیر نور UV از ژل حاصله تصویربرداری وثبت گردید.

به منظور ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسکی ساده طبق معیار CLS1

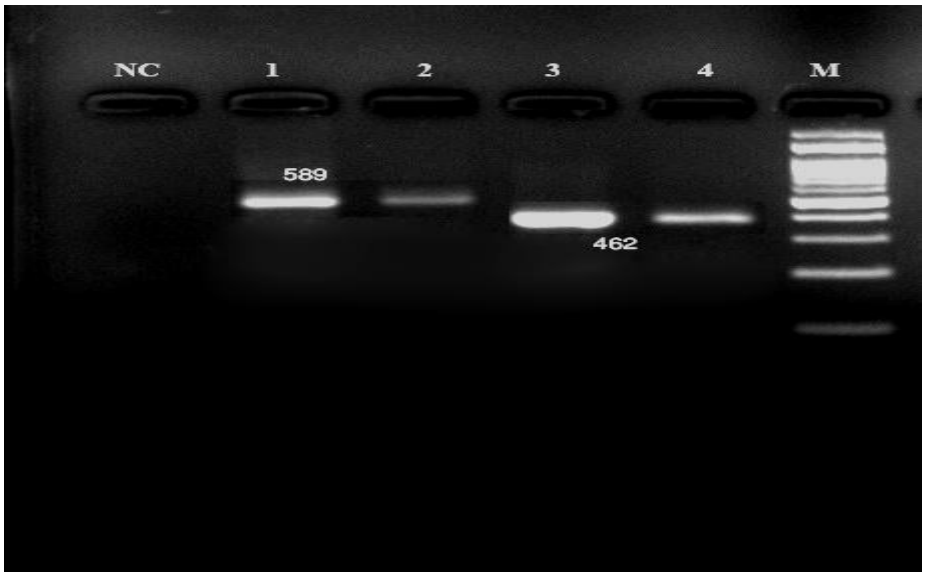
(2017) استفاده شد. ایزوله‌های جدا شده به روش متراکم در محیط مولرهینتون آگار واجد ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میلی‌گرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) ارزیابی گردید (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از نتایج با استفاده ازنرم افزار آماری SPSS ver20 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر آنالیز و وجود ارتباط آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<0.05$) بین داده‌ها تعیین گردید.

نتایج

از مجموع ۱۸۶ نمونه کبد أخذ شده از مرغ‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری تعداد ۹۴ نمونه (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌های *کمپیلوباکتر* بودند که از این تعداد، ۶۲ نمونه آلوده به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد)، ۲۶ نمونه آلوده به گونه *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) و ۱۱ نمونه آلوده به هر دو گونه فوق بودند (۶/۴۵ درصد) که در آزمایش PCR با ردیابی ژن‌های *mapA* ، *ceuE* وجود آلودگی قطعی در آنها تائید گردید. ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در تصویر ۱ نشان داده شده است.

از ۹۴ ایزوله *کمپیلوباکتر* جدا شده تعداد ۶ ایزوله متعلق به گونه‌های غیر از ژژونی و کولی بودند که در این مطالعه شناسایی و تعیین هویت نشدند.



تصویر ۱ـ ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* در نمونه‌های کبد اخذ شده از مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۱-۴= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۵۸۹ جفت بازی مربوط به گونه *کمپیلوباکترژژونی* و قطعه ۴۶۲ جفت بازی مربوط به گونه *کمپیلوباکترکولی*)

در تجزیه وتحلیل اطلاعات حاصل از تعیین فراوانی آلودگی نمونه‌های کبد به گونه‌های *کمپلوباکترژژونی* وکولی اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی آلودگی نمونه‌های کبد به گونه *کمپیلوباکترکولی* با میزان آلودگی به گونه *کمپیلوباکترژژونی* مشاهده شد ($P=0.031$).

حضور شایع‌ترین ژن های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از نمونه‌های کبد مورد مطالعه به روش PCR ارزیابی گردید که نتایج در جدول ۲ آورده شده است :

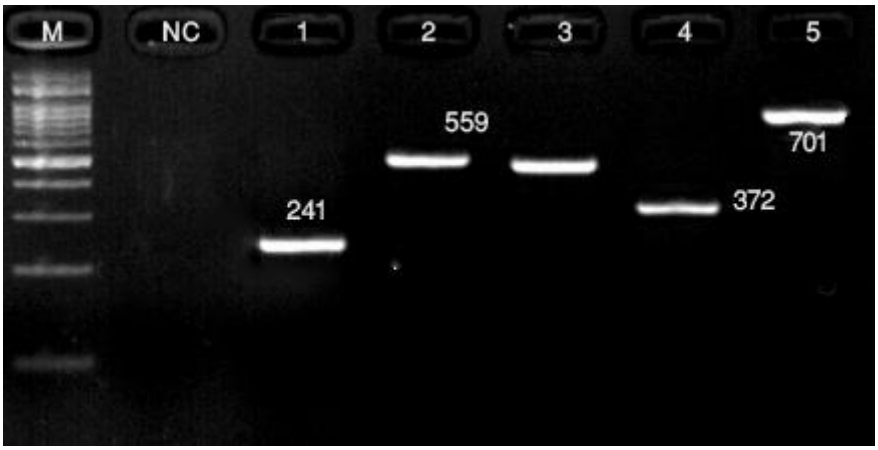
جدول۲ـ فراوانی حضور شایع‌ترین فاکتورهای حدت در گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال وبختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	*cdtA*	*cdtB*	*cdtC*	*virbll*	*wlaN*	*ciaB*	*iam*	*dnaJ*	*racR*
C. jejuni (62)	۵۹	۶۲	۶۲	۶	۵	۴۱	—	۶۰	۵۸
C. coli (26)	۲	۳	۳	—	—	—	۲۳	—	۴

همان‌گونه که در جدول فوق مشهود است تمام ژن‌های حدت بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* حضور داشتند و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA*، *cdtB*، *cdtC*، *ima* و *racR* ردیابی شد.

در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به جدول فوق با مدل آماری دقیق فیشر،اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن‌های *virbII* و *wlaN* با سایر ژن‌های حدت در ایزوله‌های کمپیلوباکترژژونی (P=0.028) و نیز بین حضور ژن *iam* با سایر ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* (P=0.019) مشاهده شد.

در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر*، حضور چهار ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه به روش PCR چند گانه‌ای ارزیابی شد که ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در تصویر۲ نشان داده شده و توزیع حضور این ژن‌ها در جدول ۳ آورده شده است:



تصویر ۲ـ ژل حاصل ازالکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۱-۵= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۲۴۱ جفت بازی مربوط به ژن *cmeB*، قطعه ۵۵۹ جفت بازی مربوط به ژن *tet(O)*، قطعه ۳۷۲ جفت بازی مربوط به ژن *blaOXA-61* و قطعه ۷۰۱ جفت بازی مربوط به ژن *aphA-3-1*)

جدول ۳ـ فراوانی حضور ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتارشده در استان چهارمحال و بختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	*blaOXA-61*	*tet(O)*	*cmeB*	*aphA-3-1*
C. jejuni (62)	۴۹	۳۲	۳	۱
C. coli (26)	۱۹	۱۰	۱۸	–

طبق اطلاعات جدول فوق تمام ۴ ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* ردیابی شدند و اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور دو ژن *tet(O)* و *blaOXA-61* با دو ژن *cmeB* و *aphA-3-1* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=0.024) مشاهده شد.

در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* ژن *aphA-3-1* ردیابی نشد واختلاف آماری معنی‌داری بین حضور دیگر ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ایزوله‌ها یافت نشد (P=0.126).

در آزمایش آنتی بیوگرام که جهت ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر* به روش انتشار دیسکی ساده انجام شد، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* در حضور ۸ دیسک آنتی‌بیوتیکی ارزیابی شد که نتایج در جدول ۴ آورده شده است:

جدول ۴ـ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از کبد مرغ‌های گوشتی کشتار شده در استان چهارمحال و بختیاری

گونه (تعداد ایزوله)	اریترومایسین	سیپروفلوکساسین	تتراسیکلین	استرپتومایسین	جنتامایسین	کلرامفنیکل	آمپی سیلین	نالیدیکسیک اسید
C. jejuni (62)	۳	۴۵	۲۶	۱۹	ـــ	۴	۳۲	۳۸
C. coli (26)	۴	۱۹	۲۱	۲۵	۶	۲	۱۴	۱۶

طبق اطلاعات جدول فوق تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بوده و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل(۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین وکمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. آنالیز آماری نتایج حاصل از جدول فوق نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* به اریترومایسین، کلرامفنیکل و استرپتومایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (P=0.023) بود و در ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت به کلرامفنیکل، اریترومایسین و جنتامایسین با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (P=0.034) مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که بر روی ۱۸۶ نمونه کبد از نیمچه‌های گوشتی کشتار شده درکشتارگاه‌های طیور سطح استان چهارمحال و بختیاری انجام شد، نتایج نشان داد که بیش از نیمی از نمونه‌ها (۵۰/۵۳ درصد) آلوده به گونه‌ای از *کمپیلوباکتر* هستند.

آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در شمال غرب ایران ۳۷/۷ درصد، در اصفهان ۵۶/۱ درصد، در تهران ۶۳/۲ درصد، در مشهد ۷۶ درصد و در مطالعه دیگری در شهرکرد ۴۷ درصد گزارش شده است (۱۴). در اولین گزارش آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در گوشت خام بوقلمون، بلدرچین و شترمرغ در اصفهان میزان آلودگی ۴۷/۱ درصد گزارش گردید (۱۵).

در یک مطالعه آلودگی بال‌های بسته‌بندی و عرضه شده به بازار به گونه‌های *کمپیلوباکتر* ۴۱/۶۶ درصد تعیین شد که نشان دهندهٔ خطر بالایی برای سلامتی انسان‌ها بوده است (۲۰).

علت اختلاف در میزان آلودگی به گونه‌های *کمپیلوباکتر* درمطالعه حاضر با مطالعات مشابه به سطح بهداشت کشتارگاه‌های نوع نمونه، مدیریت فارم‌های پرورش و نحوه انجام آزمایش مربوط است که در مطالعه حاضر همزمان از دو روش کشت میکروبی و PCR جهت شناسایی باکتری در یکی از اصلی‌ترین اندام‌های هدف باکتری یعنی کبد استفاده شد و شیوع نسبتاً بالایی از آلودگی گزارش گردید (۲۱).

اغلب کبدهای مورد آزمایش بیانگر آلودگی بیشتر به *کمپیلوباکترژژونی* (۶۵/۹۵ درصد) که در مقایسه با آلودگی به *کمپیلوباکترکولی* (۲۷/۶ درصد) اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد. این در حالی است که در مطالعه بر روی گوشت خام نیمچه گوشتی ۴۷ درصد میزان آلودگی بسیار بالایی را داشته است (۲۱).

همان طور که در جدول شماره ۴ دیده می‌شود، تمام ۸۸ ایزوله مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه هستند و در ۲۶ ایزوله *کمپیلوباکترکولی*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به استرپتومایسین (۹۶/۱۵ درصد) و کمترین میزان مربوط به کلرامفینیکل (۷/۶۹ درصد) بود. در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه به ترتیب بیشترین وکمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی متعلق به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۲/۵۸ درصد) و اریترومایسین (۴/۸۳ درصد) بود. مطالعات دیگر در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کمپیلوباکترها* تأیید کننده برخی یافته‌های مطالعهٔ حاضر و برخی مغایر با نتایج این پژوهش است (۲۵-۲۲).

بیماری‌زایی گونه‌های *کمپیلوباکتر* وابسته به عوامل مختلفی است که در این مطالعه حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ بررسی شد. از ۱۱ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن‌ها بجز ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* وجود داشت اما در ایزوله های *کمپیلوباکترکولی* تنها ۵ ژن *cdtA, cdtB, cdtC, iam, recR* ردیابی گردید.

در مطالعه Bardoň و همکاران (۲۰۱۷)، در ۷۳ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از انسان، ژن‌های *iam* و *virBII* وجود نداشتند و سه ژن *cdtA, cdtB, cdtC*، به ترتیب با فراوانی، ۹۸/۶، ۹۵/۹ و ۹۴/۵ درصد شایع‌ترین عوامل حدت ردیابی شده بودند. در این مطالعه، در ۷۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت طیور، تنها ژن *iam* ردیابی نشد و در ۳۶ سویه *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ تنها ۴ ژن *cdtB, cdtC, iam, recR* ردیابی شدند (۹) که با مطالعه حاضر همراستا است.

Wieczorek و Osek (۲۰۰۸)، فراوانی حضور ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت مرغ را به ترتیب ۳۱ و ۲۷ درصد گزارش کردند (۲۶).

Wieczorek (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای دیگر، فراوانی حضور ژن *iam* در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت مرغ را معادل ۱۰۰ درصد و در

سویه‌های *کمپیلوباکترکولی* معادل ۱۵ درصد گزارش کرد (۲۷).

آلودگی بالای کبد نیمچه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه‌های استان چهارمحال و بختیاری به *کمپیلوباکتر* و خصوصاً دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* نشانگر خطر بالقوه کبد در انتقال آلودگی به انسان می‌باشد، از طرفی شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های جدا شده، نشانگر مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های غیر مجاز نظیر کلرامفنیکل در صنعت پرورش طیور در کشور است لذا توصیه می‌گردد که اصول بهداشتی در طول خط کشتار مرغ و فروشگاه‌های عرضه گوشت مرغ رعایت گردد و مصرف آنتی‌بیوتیک فقط زیر نظر دامپزشک فارم و بر اساس نتیجه آنتی‌بیوگرام انجام شود.

References

1- Quetz JD, Lima IF, Havt A, Prata MM, Cavalcante PA, Medeiros PH, Cid DA, Moraes ML, Rey LC, Soares AM, Mota RM. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. J Med Microbiol. 2012;61(4):507-13.

2- Riddle MS, Guerry P. Status of vaccine research and development for *Campylobacter jejuni*. Vaccine. 2016;34(26):2903-6.

3- Salehi M, Shafaei E, Bameri Z, Bokaeian M, Mirzaee B, Mirfakhraee S, Rigi TB, Akbari M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni*. Int J Infect. 2014;1(2).

4- Mazaheri M, Haji Rezaei M, Aalinezhad M, Sharif MR, Akhavan T. Clinical and laboratory characteristics of pediatric *Campylobacter* spp. Acute Gastroenteritis. Arch Pediat Infect Dis. 2016;6:1-6.

5- Rastyani S, Alikhani MY, Sedighi I, Kazemi S, Farhadi KH, Arabestani MR. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children with acute diarrhea in health centers of Hamadan, Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2015;2(4): e29791.

6- Shams S, Bakhshi B, Moghadam TT. In Silico analysis of the *cadF* gene and development of a duplex polymerase chain reaction for species-specific identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(2): e29645.

7- Ghasemian Safaei H, Jalali M, Hosseini A, Narimani T, Sharifzadeh A, Raheimi E. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retails markets by *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in Shahrekord, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(4):249-53.

8- Lawson AJ. Campylobacteriosis. In: **Palmer SR, Soulsby L, Torgerson PR, Brown DWG, eds.** Oxford Textbook of Zoonoses. 2nd edition, New York, USA, Oxford University Press, Inc., 2011, pp. 136-145.

9- Bardoň J, Pudová V, Koláčková I, Karpíšková R, Röderová M, Kolář M. Virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter* spp. in the Czech Republic. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2017;66(2):59-66.

10- Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A, Sack DA, Endtz HP. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1485-8.

11- Lara-Tejero M, Galán JE. *CdtA*, *CdtB*, and *CdtC* form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. Infect Immun. 2001;69(7):4358-65.

12- Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. Microb Infect. 2006;8(7):1967-71.

13- Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2124-31.

14- Banuo AS, Saeide AN. Isolation and survey for drug resistance of *Campylobacter jejuni* in poultry feces in Kerman. Iranian J Med Microbiol. 2016;9(4):95-8. [In Persian].

15- Rahimi E, Tajbakhsh E. Prevalence of *Campylobacter* species in poultry meat in the Esfahan city, Iran. Bulgarian J Vet Med. 2008;11(4):257-62.

16- Rahimi E, Momtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-Kasemi M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. Poult Sci. 2010;89(5):1015-20.

17- Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J Med Microbiol.

2003;52(4):345-8.

18- Obeng AS, Rickard H, Sexton M, Pang Y, Peng H, Barton M. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. J Appl Microbiol. 2012;113(2):294-307.

19- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S26: Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

20- Hosseinzadeh S, Mardani K, Aliakbarlu J, Ghorbanzadehghan M. Occurrence of *Campylobacter* in chicken wings marketed in the northwest of Iran. Int Food Res J. 2015;22(1):41-5.

21- Rahimi E, Ameri M. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. Food Control. 2011;22(8):1165-70.

22- Nahar N, Rashid RB. Genotypic analysis of the virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter* species in silico. J Bioanal Biomed. 2018;10(1):13-23.

23- Iglesias-Torrens Y, Miro E, Guirado P, Llovet T, Muñoz C, Cerdà-Cuéllar M, Madrid C, Balsalobre C, Navarro F. Population structure, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers, and wild birds. Front Microbiol. 2018;9.

24- Babaie Najad Basiri F, Haghighi Khoshkhoo P, Akbariazad G. Prevalence and antibacterial susceptibility of thermophilic Campylobacter spp. in broiler chickens. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;26(136):185-9. [In Persian].

25- Khoshbakht R, Tabatabaei M, Hoseinzadeh S, Raeisi M, Aski HS, Berizi E. Prevalence and antibiotic resistance profile of thermophilic Campylobacter spp. of slaughtered cattle and sheep in Shiraz, Iran. Vet Res Forum. 2016;7(3):241-6.

26- Wieczorek K, Osek J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. Bull Vet Inst Pulawy. 2008;52(1):211-6.

27- Wieczorek K. Antimicrobial resistance and virulence markers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from retail poultry meat in Poland. Bull Vet Inst Pulawy. 2010;54:563-9.

Virulence and antimicrobial resistance pattern in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from the liver of slaughtered broiler chickens in Chaharmahal va Bakhtiari province

GholamReza Banisharif[1], Sepideh Karimi[1], Hasan Momtaz[2*]

1- Post graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2- Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: March 5, 2019; Revise: April 18, 2019; Accept: June 10, 2019

Summary

The aim of this study was to determine the prevalence of liver contamination in broiler chickens slaughtered in Chaharmahal va Bakhtiari Province in two species of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and to investigate the virulence and antibiotic resistance of isolated strains. In this study, 186 liver samples from broiler chickens slaughtered in the slaughterhouses of the province were randomly collected. After the isolation of *Campylobacter* by microbial culture, for definitive confirmation of *Campylobacter* in isolated strains and definitive differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, the detection of *16SrRNA*, *mapA* and *ceuE* genes was performed by PCR method. Antibiotic resistance pattern and distribution of virulence factors were evaluated. Of the 186 liver samples collected, 94 samples (50.53%) were infected with *Campylobacter* species, of which 62 cases were infected with *Campylobacter jejuni* (65.95%), 26 infected samples were *Campylobacter coli* (27.6%) and 11 samples were contaminated with both species (6.45%). All virulence genes except the *iam* gene were present in *Campylobacter jejuni* isolates, and in *Campylobacter coli* strains only 5 *cdtA, cdtB, cdtC, ima* and *racR* genes were detected. All of the 88 isolates studied had multiple antibiotic resistance and in 26 isolates of *Campylobacter coli*, the highest antibiotic resistance was observed for streptomycin (96.15%) and the lowest was chloramphenicol (7.69%). In *Campylobacter jejuni* strains, the highest and lowest antibiotic resistance levels belonged to the two antibiotics ciprofloxacin (72.58%) and erythromycin (4.83%), respectively. High prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chickens slaughtered in Chaharmahal va Bakhtiari slaughterhouses and high antibiotic resistance of these isolates indicate a potential risk of liver contamination in human transmission.

Keywords: *Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Chicken meat, Virulence factors, Antibiotic resistanc*