DOI: 10.22034/vj.2017.108225.1231
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی حضور کمپیلوباکتر در مرغ‌های عرضه‌شده در فروشگاه‌های سطح شهرستان کرمانشاه

• **زهرا رادفر**
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فراهان، اراک، ایران
• **آزاده فروغی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
• **مهرداد پویانمهر**
گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۸-۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۱۱-۱۶
Email: a.foroughi@raziac.ir

چکیده

کمپیلوباکتر به‌ویژه گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* شایع‌ترین علت گاستروانتریت در انسان است. گونه‌های کمپیلوباکتر غالباً به‌میزان زیادی در مجرای روده‌ای طیور کلونیزه می‌شوند. آلودگی با *کمپیلوباکتر ژژونی* معمولاً به‌وسیله خوردن مرغ نیم‌پز ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی کمپیلوباکتر در لاشه‌های مرغ عرضه‌شده در فروشگاه‌های سطح شهرستان کرمانشاه با استفاده از تکنیک PCR بود. در مجموع ۱۰۰ نمونه از انتهای کلون مرغ از مغازه‌های عرضه‌کننده مرغ زنده تهیه شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج DNA از نمونه‌ها صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از سه جفت آغازگر اختصاصی ***flaA***، ***Cadf*** و ***hipO*** صورت گرفت و نمونه‌های مثبت مشخص شدند. از بین ۱۰۰ نمونه مورد بررسی فراوانی ژن‌های ***flaA***، ***Cadf*** و ***hipO*** به ترتیب ۳۰، ۳۱ و ۲۰ درصد بدست آمد. یعنی ۳۱ نمونه از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی به گونه‌های کمپیلوباکتر آلوده بودند (۳۱ درصد) که ۲۰ تای آن‌ها *کمپیلوباکتر ژژونی* (۲۰ درصد) بودند و ۱۰ نمونه دیگر، گونه‌های کمپیلوباکتر بجز *کمپیلوباکتر ژژونی* (۱۰ درصد) بودند. ۶۹ نمونه هم از نظر حضور کمپیلوباکتر منفی (۶۹ درصد) بودند. در یک نمونه هم که فقط ژن ***flaA*** تکثیر شد، به‌نظر می‌رسد که ژن ***Cadf*** از دست رفته است. بررسی مطالعات نشان داد که میزان آلودگی به گونه‌های کمپیلوباکتر و نیز میزان شیوع آلودگی به گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* در مناطق مختلف ایران و جهان متفاوت است. دلیل این امر توسط محققین مختلف به محل نمونه‌گیری از لاشه، تکنیک‌های مختلف تشخیصی، فصول نمونه‌گیری و غیره نسبت داده شده است. با توجه به نتایج حاصل، اهمیت گوشت طیور به‌عنوان منبع بالقوه عفونت کمپیلوباکتر مشخص شد.

کلمات کلیدی: *کمپیلوباکتر ژژونی*، لاشه مرغ، کرمانشاه، PCR

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 50-57

A survey on Campylobacter spp. in chicken presented in retail stores in Kermanshah city

By: Radfar, Z., Department of Microbiology, Farahan Branch, Islamic Azad University, Farmhan, Iran. Foroughi, A., (Corresponding Author) Department of Pathology and Basic Sciences, Veterinary faculty, Razi University, Kermanshah, Iran. And Pooyanmehr, M., Department of Pathology and Basic Sciences, Veterinary faculty, Razi University, Kermanshah, Iran.

Received: 2016-11-03 **Accepted: 2017-02-04**

Email: a.foroughi@raziac.ir

Campylobacter (C.) jejuni is the most common cause of gastroenteritis in humans. Campylobacter spp. often colonize in a large amount in poultry guts. *C. jejuni* infection is usually caused by eating undercooked chicken. The aim of this study was to evaluate the frequency of Campylobacter in chicken carcasses presented in Kermanshah city stores using the PCR technique. A total of 100 samples from the end of the chicken clone were prepared from live poultry markets. After preparation of the samples, DNAs were extracted by phenol-chloroform method and optical density of the nucleic acid was measured by spectrophotometer. PCR reactions were performed and positive samples were identified. Among 100 samples, frequency of *Cadf*, *flaA* and *hipO* was 30%, 31% and 20%, respectively. It means that 31 out of 100 samples were contaminated with Campylobacter species, 20 of which were *C. jejuni* (64.5%) and 10 were Campylobacter species other than *C. jejuni* (35.5%). Sixty nine samples were campylobacter negative, (69%). In one sample that only *flaA* was amplified, it seems that *Cadf* gene has been missed. Studies showed that the prevalence of Campylobacter species and *Campylobacter jejuni* infection is variable in different parts of Iran and the world. The reason has been attributed by different researchers to sampling sites of carcasses, different diagnostic techniques, sampling season and etc. According to the results, the importance of poultry meat was determined as a potential source of Campylobacter infection.

Key words: *Campylobacter jejuni*, Chicken carcasses, Kermanshah, PCR.

مقدمه

در هر سال در حدود دو میلیون موارد منتهي به مرگ به علت ابتلاء به اسهال اتفاق می‌افتد (۲۲). سالمونلا، شیگلا و کمپیلوباکتر سه عامل شایع عفونت‌های اسهالی باکتریایی در کودکان سراسر جهان هستند (۶). گوشت مرغ از پرمصرف‌ترین منابع پروتئینی حیواني در بسیاري از کشورهای جهان از جمله ایران مي‌باشد. علاوه بر ارزش پروتئینی، گوشت مرغ از نظر اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدني نیز غني است. فرآورده‌های جانبی طیور از جمله کبد، قلب، سنگدان نیز به‌طور وسیعي در بین اقشار مختلف جامعه به علت قیمت پایین، ارزش غذایی بالا و طعم متفاوت و مطلوب طرفداران زیادي دارد (۲، ۲۴). از طرف دیگر گوشت و فرآورده‌های جانبی طیور از مهم‌ترین منابع میکروارگانیسم‌های غذایی مانند سالمونلا، کمپیلوباکتر، لیستریا و اشرشیا کلی انتروپاتوژن محسوب می‌شود و گزارشات فراواني از شیوع آنتریت ناشي از کمپیلوباکتر به دنبال مصرف گوشت و فرآورده‌های طیور در سراسر جهان گزارش شده است (۹، ۱۳). در بین گونه‌های کمپیلوباکتر، کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلی مهم‌ترین گونه‌های بیماریزا برای انسان معرفي شده‌اند که با فراواني بسیار بالا نسبت به سایر گونه‌ها از موارد بیماری‌های انساني جدا شده‌اند (۵، ۱۱ و ۱۲).

کمپیلوباکتر ژژونی یکی از عوامل بیماری‌زای مهم انسان است که در ایجاد اسهال خوني نقش دارد. مخزن بزرگ این ارگانیسم، پرندگان هستند. این باکتری از راه‌های متفاوتي شامل راه مدفوعی– دهانی، تماس جنسي، خوردن شیر غیرپاستوریزه، خوردن گوشت پرندگانی که به‌خوبي پخته نشده باشد، نوشیدن آب آلوده غیربهداشتی و تماس با حیوانات خانگي و سگ‌های اهلي منتقل می‌شود (۴). کمپیلوباکتریوزیس یك بیماری مشترك بین انسان و دام و از جمله مهم‌ترین عوامل وقوع گاستروآنتریت در کشورهای پیشرفته و به‌عنوان دومین عامل گاستروانتریت پس از سالمونلا در کشورهای درحال توسعه خصوصاً در بین کودکان و افراد مسن گزارش شده است (۸).

کمپیلوباکتر دارای فاکتورهای حدّت و بقای زیادی است که مهم‌ترین آن‌ها شامل حرکت، چسبندگی، تهاجم، تولید توکسین، ساختارهای کربوهیدراتی، سیستم مصرف آهن، مقاومت چندگانه دارویی و مقاومت به صفرا می‌باشد. این باکتری دارای یک یا دو تاژک قطبی است که سبب حرکت باکتری می‌شوند. این تاژک‌ها عامل حدّت باکتری هستند. از عوامل حدّت مرتبط با تحرّک باکتری می‌توان به *FlaA* و *FlaB* اشاره

کرد که پروتئین‌های فلاژلین اصلی باکتری هستند که به ترتیب توسط ژن‌های *flaA* و *flaB* کُد می‌شوند. همچنین *CadF* (پروتئین پردهٔ بیرونی) و *CapA* (پروتئین چسبندگی A کمپیلوباکتر) از عوامل حدّت مرتبط با چسبندگی هستند که توسط ژن‌های *Cadf* و *capA* کد می‌شوند (۷). ژن *hipO*، ژن N- بنزویل گلایسین آمیدو هیدرولاز (ژن هیپوریکاز) است که باعث هیدرولیز هیپورات می‌شود. این ژن مختص کمپیلوباکتر ژژونی است و در دیگر گونه‌های کمپیلوباکتر تشخیص داده نشده است (۵، ۲۵).

یکی از بهترین روش‌ها برای تشخیص کمپیلوباکتر، PCR است. تعدادی از روش‌های PCR متداول برای شناسایی و بررسی گونه‌های کمپیلوباکتر برای طیفی از انواع نمونه‌ها از جمله مدفوع، محصولات غذایی، آب و کشت‌ها با استفاده از انواع هدف‌های ژنی مانند *hipO*، *glyA*، *ceuE*، ۲۳SrRNA و *mapA* توصیف شده است (۷).

به طور کلّی ساختار و تراکم فرآورده‌های دامی، غذایی و شرایط پرورش طیور بین کشورها و مناطق مختلف، متفاوت است که به نوبهٔ خود بر شیوع و پراکندگی زمانی کلونیزه شدن کمپیلوباکتر ژژونی در طیور و عفونت در انسان‌ها مؤثر است (۱۰).

مواد و روش‌ها

در بازه زمانی فروردین تا خرداد ۱۳۹۵، تعداد ۱۰۰ نمونه از انتهای روده مرغ از مغازه‌های فروش مرغ زنده در سطح شهرستان کرمانشاه جمع‌آوری شد. به این صورت که از چهار محله از هرکدام از پنج جهت جغرافیایی شهر (شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز) و در هر محله نیز از دو فروشگاه، در یک نوبت نمونه‌برداری شد. نمونه به صورت مجزا در نایلون های پلاستیکی قرار داده و شماره‌گذاری شد و بلافاصله جهت استخراج به آزمایشگاه منتقل شد. یک سانتی‌متر از انتهای روده (محل اتصال به کلوآک) هر نمونه با قیچی بریده و به درون لوله شیشه‌ای حاوی دو میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل و شماره‌گذاری شد، و سپس به مدت دو دقیقه ورتکس شدند. پس از آن، نمونه به وسیله پنس استریل از لوله شیشه‌ای خارج و مایع باقیمانده به‌منظور سانتریفیوژ با استفاده از کاغذ صافی به داخل میکروتیوب استریل ریخته شد و شماره‌گذاری صورت گرفت. میکروتیوب‌ها به مدت پنج دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ قسمت رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر شامل پلت کف میکروتیوب باقی ماند. سپس با استفاده از روش راسل و سامبروک (۲۷) استخراج DNA صورت گرفت. در این روش ابتدا ۱۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد به همراه پنج میکرولیتر پروتئیناز K به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه و کاملاً با شیکر مخلوط شد و به مدّت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن هم حجم نمونه مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل به آن اضافه شد و کاملاً ورتکس شد. سپس پنج دقیقه در محیط آزمایشگاه به آن زمان داده شد و پس از آن به مدّت دو دقیقه در ۱۰هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس از فاز رویی، با سمپلر برداشته و در میکروتیوب دیگر قرار داده شد. در مرحله بعد، هم حجم ماده برداشته شده، ایزوپروپیل سرد به آن اضافه شد و به آرامی تکان داده شد و به مدّت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از خارج کردن از فریزر، دو دقیقه در ۱۰هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی دور ریخته شد. به رسوب، ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و به آرامی تکان داده شد. مجدداً دو دقیقه در ۱۰هزار دور در دقیقه سانتریفوژ انجام و پس از آن مایع رویی دور ریخته شد و زمان داده شد تا الکل کاملاً تبخیر و خشک شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطّر دیونیزه به میکروتیوب اضافه شد. در نهایت، نمونه‌های استخراج شده یک شب در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند و پس از آن تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد (۲۷). جهت انجام PCR از سه جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد که توالی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی‌های مورد استفاده در این مطالعه (۱۰)

ژن	توالی (۳-۵)	اندازه محصول (bp)
hipO	F: GAAGAGGTTTGGGTGGTG R: AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG	۷۳۵
Cadf	F: TTGAAGGTAATTTAGATATG R: CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۰۰
flaA	F: TTTCGTATTAACACAAATGGTGC R: CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG	۱۷۴۳

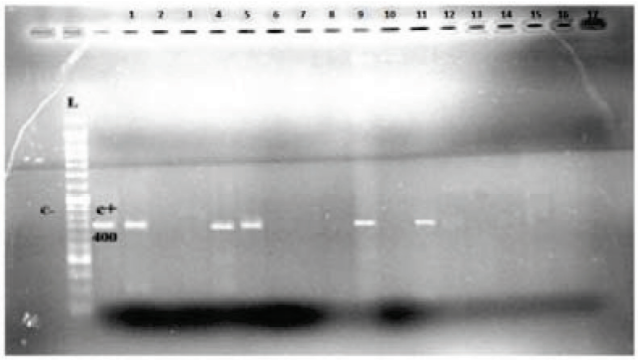
واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده ازدستگاه ترمال سایکلر (Bio Rad, USA) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که اجزاء واکنش بهینه سازی شده هر واکنش شامل آب دوبار تقطیر (۱۲/۶ میکرولیتر)، بافر PCR (۱۰X) به میزان دو میکرولیتر، کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار) به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، مخلوط نوکلئوتیدي به مقدار ۰/۴ میکرولیتر (۱۰میلی‌مولار)، ۱/۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، آنزیم Taq پلیمراز (پنج واحد در میکرولیتر) به میزان ۰/۳ میکرولیتر، DNA الگو به میزان دو میکرولیتر (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) بودند. اجرای برنامه دمایی واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر انجام گرفت. سپس محصولات در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شده و در نهایت از دستگاه ژل داک (Gel Doc) (Quantum, France ST۴) جهت نمایان شدن باندها استفاده شد. از مارکر DNA ۵۰ جفت باز (CinnaGen, Iran) برای تعیین اندازه محصولات PCR استفاده شد.

نتایج

نتایج بدست آمده از آزمایش PCR ژن های مورد بررسی، نشان داد که ژن *flaA* بیشترین فراوانی و ژن *hipO* کمترین فراوانی را در بین ژن‌های مورد بررسی دارد. از بین ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، فراوانی ژن‌های *Cadf*،*hipO* و *flaA* به ترتیب به صورت ۳۰، ۲۰ و ۳۱ درصد بدست آمد (شکل ۱).

نتایج نشان داد از صد نمونه مورد بررسی ۳۰ نمونه واجد ژن *Cadf* بود. این امر نشان می‌دهد که ۳۰ نمونه از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی به گونه‌های کمپیلوباکتر آلوده بودند (شکل ۲).

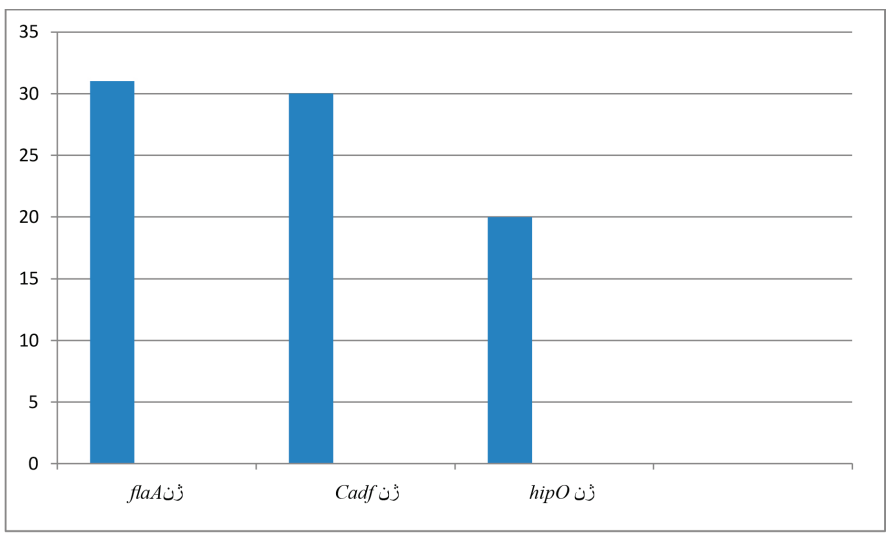
نتایج نشان داد از صد نمونه مورد بررسی، ۲۰ نمونه واجد ژن *hipO* بود. حضور این ژن که اختصاصی گونه کمپیلوباکتر ژژونی است، نشان‌دهنده کمپیلوباکتر ژژونی بودن نمونه حاوی خود است (شکل ۳).



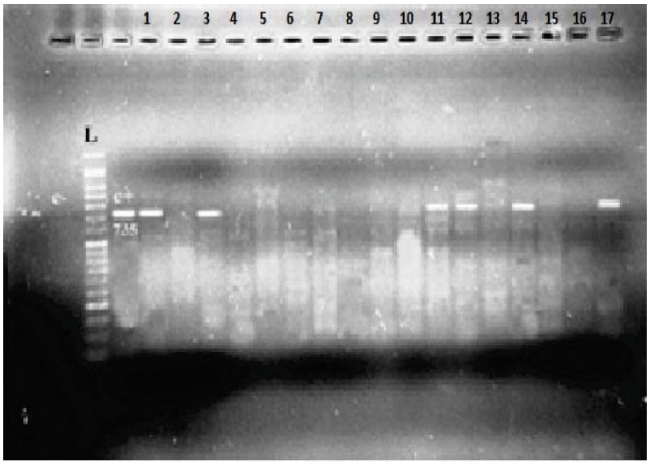
شکل ۲- باندهای به دست آمده در الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های طیور با استفاده از ژن *Cadf*، C-: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت (کمپیلوباکتر ژژونی No. ATCC ۶۵۳۳)، L: مارکر bp50، چاهک‌های ۱، ٤، ۵،۹ و ۱۱: نمونه‌های مثبت.

نتایج نشان داد از صد نمونه مورد بررسی، ۳۱ نمونه دارای ژن *flaA* بود. حضور این ژن که تاژک را کد می‌کند، نمایانگر حدت در کمپیلوباکترهای حاوی خود می‌باشد (شکل ۴).

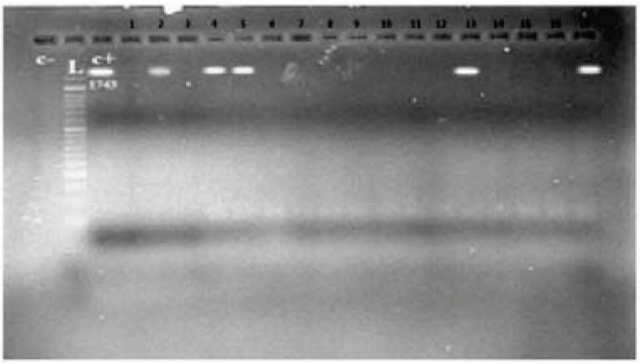
به طور کلی، نتایج حاصله نشان داد که از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی به روش PCR، بر اساس توالی ژن *Cadf* که اختصاصی جنس کمپیلوباکتر است، حداقل ۳۰ نمونه از نظر حضور کمپیلوباکتر مثبت بودند. از طرف دیگر علاوه بر این ۳۰ نمونه، یک نمونه دیگر (یعنی در مجموع ۳۱ نمونه) از نظر حضور ژن *flaA* مثبت بودند که نشان‌دهنده حاد بودن گونه‌های تشخیص داده شده است. در اینجا به نظر می‌رسد که در یک نمونه که از نظر ژن *Cadf* منفی و از نظر ژن *flaA* مثبت است و ژن *Cadf*



شکل ۱- فراوانی ژن‌های *Cadf*،*hipO* و *flaA* در ۱۳ نمونه مثبت از نظر آلودگی با کمپیلوباکتر



شکل ۳- باندهای به دست آمده در الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های طیور با استفاده از ژن *hipO*، C-: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت (کمپیلوباکتر ژژونی ATCC No. ۳۳۵۶)، L: مارکر ۵۰ bp، چاهک‌های ۱، ۳، ۱۱، ۱۲، ۱۴ و ۱۷: نمونه‌های مثبت.



شکل ٤- باندهای به دست آمده در الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های طیور با استفاده از ژن *flaA*، C-: کنترل منفی، +C: کنترل مثبت (کمپیلوباکتر ژژونی ATCC No. ۳۳۵۶)، L: مارکر bp50، چاهک‌های ۲، ٤، ٥، ۳۱ و۷۱: نمونه‌های مثبت.

از دست رفته است که با توجه به مطالعات پیشین، دور از ذهن نیست و در قسمت بحث به تفصیل در مورد آن صحبت شده است. از طرف دیگر بر اساس توالی ژن *hipO* که اختصاصی گونه کمپیلوباکتر ژژونی است، از ۳۱ نمونه کمپیلوباکتر تشخیص داده شده، ۲۰ نمونه کمپیلوباکتر ژژونی هستند که دارای اهمیت ویژه‌ای است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در جدول ۲ آمده است.

بحث

بیماري‌های انتقال یافته از طریق غذا، از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا است و کمپیلوباکتر، عمدتاً کمپیلوباکتر کولی و کمپیلوباکتر ژژونی به عنوان شایع‌ترین باکتري عامل گاستروانتریت انتقال‌یافته از غذا در انسان شناخته شده است. منبع اصلی کمپیلوباکتریوزیس انسان گوشت آلوده طیور است به طوری که ۷۰ درصد از عفونت‌های کمپیلوباکتر در انسان از طریق مصرف گوشت آلوده مرغ ایجاد می‌شود (۲۶). در انسان یا حیوانات کمپیلوباکتر معمولاً در اندام‌های تناسلی، مجرای روده‌ای و محوطه دهانی یافت می‌شود. درحالی که بیشتر گونه‌ها برای انسان‌ها بیماری‌زا هستند، حیوانات می‌توانند حامل‌های بدون علامت باشند (۱۵). در انسان، کمپیلوباکتر ژژونی گونه غالب ایجادکننده بیماری است که ممکن است نشان‌دهنده این مطلب باشد که مرغ و گاو منابع اصلی کمپیلوباکتریوز در بیماران می‌باشند (۲۰).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که از ۱۰۰ نمونه انتهای روده مرغ، ۳۰ نمونه برای ژن *Cadf*، ۳۱ نمونه برای ژن *flaA* و۲۰ نمونه برای ژن *hipO* مثبت بودند. این امر بدان معنا است که حداقل ۳۱ درصد از نمونه‌ها حاوی کمپیلوباکتر (عمدتاً کمپیلوباکتر کولی و کمپیلوباکتر ژژونی) بوده و ۲۰ درصد از نمونه‌ها حاوی کمپیلوباکتر ژژونی بودند. همچنین ۱۰ درصد نمونه‌ها، حاوی گونه‌های کمپیلوباکتر به غیر از کمپیلوباکتر ژژونی بودند. به عبارت دیگر، ۶۴/۵ درصد کمپیلوباکترها از گونه کمپیلوباکتر ژژونی و مابقی (۳۵/۵ درصد) کمپیلوباکتر غیر از ژژونی بودند. اینکه در یک نمونه ژن *flaA* وجود داشت و ژن *Cadf* وجود نداشت، دور از ذهن نیست و اگرچه دانشمندان بسیاری در ۱۰۰ درصد جدایه‌های کمپیلوباکتر این ژن را تشخیص داده‌اند (۱۰، ۱۶ و ۲۳) اما کانکل و همکاران با هدف توسعه روش‌های تشخیصی اختصاصی برای جدایه کمپیلوباکتر ژژونی بر اساس ژن حدت *Cadf* و محصول آن، نشان دادند که ژن *Cadf* در ۹۳/۵ درصد از جدایه‌های کمپیلوباکتر ژژونی که مورد بررسی PCR قرار گرفت، تکثیر شد (۱۸). در مطالعه حاضر نیز میزان تکثیر ژن *Cadf* ۹۶/۷۸ درصد به دست آمد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر (۳۰ درصد کمپیلوباکتر براساس ژن *Cadf* و ۲۰ درصد گونه *C. jejuni* بر اساس ژن *hipO*) و اینکه شایع‌ترین گونه کمپیلوباکتر حاضر در نمونه‌ها، کمپیلوباکتر ژژونی بود، در توافق با نتایج حاصل از مطالعات دانشمندانی مانند جمشیدی و همکاران است که از ۱۰۰ نمونه لاشه طیور در کشتارگاه با روش PCR بر اساس ژن *Cadf*، ۲۸ نمونه جنس کمپیلوباکتر گزارش کردند (۱۶). سلطان دلال و همکاران، نیز در مطالعه ای تحت عنوان بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی دو گونه گرمادوست کمپیلوباکتر (عمدتاً کمپیلوباکتر کولی و کمپیلوباکتر ژژونی) جدا شده از گوشت قرمز و گوشت سفید در تهران، از ۳۷۹ نمونه بررسی شده، ۱۰۹ سویه کمپیلوباکتر (۲۸/۸ درصد) جدا کردند. از این تعداد ۷۶/۱ درصد کمپیلوباکتر ژژونی و ۲۳/۹ درصد کمپیلوباکتر کولی بود. میزان جداسازی کمپیلوباکتر در نمونه‌های مرغ ۴۹/۷ درصد و در نمونه‌های گوشت ۷/۹ درصد بود (۳۰). همچنین در مطالعه هوائی و همکاران در اصفهان، در ۱۱۴ نمونه از ۳۶۸ نمونه (۳۱ درصد) مدفوع طیور کشت داده شده از نظر کمپیلوباکتر مثبت بودند که ۱۰۱ نمونه (۸۸/۶ درصد) گونه کمپیلوباکتر ژژونی و ۱۳ نمونه (۱۱/۴ درصد) گونه کمپیلوباکتر کولی بودند (۱۴). اما در مطالعه نوبایل و همکاران با هدف بررسی شیوع گونه‌های کمپیلوباکتر در نمونه‌های گوشت خام طیور در

مغازه‌های خرده‌فروشی در جنوب ایتالیا، از مجموع ۲۰۸ نمونه گوشت خام مرغ و بوقلمون در ۴۳ نمونه (۲۰/۶۷ درصد)، آلودگی با کمپیلوباکتر وجود داشت که از این تعداد، ۳۴/۹ درصد کمپیلوباکتر کولی و ۳۲/۶ درصد کمپیلوباکتر ژژونی بودند، یعنی کمپیلوباکتر کولی شایع‌ترین گونه بود (۲۱).

از طرف دیگر، مطالعات زیادی نیز درصدهای متفاوت آلودگی با گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر را نشان می‌دهند که بسیار بیشتر از نتایج حاصل از مطالعه حاضر است. برای مثال، در مطالعه‌ای که زنده‌باد و همکاران در مشهد انجام دادند، از بین ۳۶۰ نمونه گوشت ران و بال مرغ بررسی شده با روش کشت و PCR، ۲۲۷ نمونه (۶۳/۱ درصد) برای کمپیلوباکتر مثبت بودند. کمپیلوباکتر ژژونی با تعداد ۲۰۰ نمونه (۸۸/۱ درصد) نسبت به کمپیلوباکتر کولی ۲۷ مورد (۱۱/۹ درصد) شیوع بیشتر داشت (۳۱). همچنین ماکیو و همکاران در مطالعه‌ای در لهستان باکتری کمپیلوباکتر را در ۱۴۳ نمونه از ۲۱۸ نمونه گوشت مرغ (۶۵/۶ درصد) تشخیص دادند. شایع‌ترین گونه کمپیلوباکتر کولی بود، به طوری‌که ۱۰۸ نمونه (۷۵/۵ درصد) از ۱۴۳ نمونه آلوده متعلق به کمپیلوباکتر کولی بود (۱۹). نرخ جداسازی بالاتر کمپیلوباکتر کولی در مطالعات فوق می‌تواند به منطقه جغرافیایی که در آن مطالعات انجام شده در ارتباط باشد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که درصد آلودگی به کمپیلوباکتر در مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد. همچنین در مطالعات انجام شده در ایران نیز درصد آلودگی به کمپیلوباکتر متفاوت می‌باشد. به نظر می‌رسد که این تفاوت در میزان آلودگی گزارش شده ناشی از محل نمونه‌گیری از لاشه، تکنیک‌های مختلف تشخیصی اعم از روش‌های سنّتی و مرسوم مانند کشت و روش‌های نوین مانند تکنیک‌های مولکولی و محل جغرافیایی اخذ نمونه باشد. کما اینکه بررسی مطالعات نشان می‌دهد که تشخیص PCR برای کمپیلوباکتر یک جایگزین قابل اعتماد و بسیار سریع‌تر نسبت به کشت است. علاوه بر سرعت، قدرت نیز یک نیاز آشکار برای روش تشخیص است. همچنین رحیمی و همکاران در جریان یک مطالعه اعلام کردند که این تغییرات در فراوانی گونه‌های کمپیلوباکتر ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط بهداشتی در طول دوره پرورش، آلودگی متقاطع که ممکن است به دلیل تغییرات بهداشتی پرورش، پرکنی، خالی کردن امعاء و احشاء و قطعه قطعه کردن لاشه باشد و برخی شرایط محیطی مانند دمای آب تانک حرارت دادن (در مورد مرغ‌های ذبح شده در کشتارگاه)، تحمل هوای کم در گونه‌های کمپیلوباکتر،... باشد. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که آلودگی آب توسط پرندگان وحشی در کارخانه‌های فرآوری طیور، آلودگی متقاطع در طی پرکنی و خالی کردن احشاء داخلی نقش مهمی در وقوع کمپیلوباکتریوز دارد (۲۴). رحیمی اختلافات موجود بین نتایج گزارش شده از مناطق مختلف را به میزان ابتلاء طیور در مناطق مختلف، فاصله زماني بين مطالعات، اختلاف در نحوه کشتار و رعایت اصول بهداشت در طول مراحل مختلف کشتار، فصول نمونه‌گيري و حساسيت روش‌های آزمایش نسبت داد (۲۳). شاکریان و همکاران، در طی یک بررسی اعلام کردند که اختلافات مشاهده شده در تحقیقات مختلف می‌تواند احتمالاً مربوط به میزان ابتلاء طیور هر منطقه به باکتری کمپیلوباکتر ژژونی، اختلافات موجود در کل زنجیره کشتار طیور از قبیل نحوه پرکني و تخلیه امعاء و احشاء، استفاده از ماشین آلات صنعتي یا تخلیه دستي امعاء و احشاء، در مراحل حمل و نقل و توزیع به بازار مصرف، شستشوی محصولات، بسته‌بندی کردن یا در معرض هوا بودن طیور، میزان مصرف آنتی‌بیوتيك و مقادیر باقیمانده آن در لاشه‌ها پس از کشتار باشد (۲۹).

علاوه بر موارد فوق، همه جدایه‌های کمپیلوباکتر این مطالعه اعم از کمپیلوباکتر ژژونی و غیر از آن، دارای ژن *flaA* بودند. این ژن، جزء فاکتورهای حدّت ضروری درگیر در چسبندگی و کلونیزاسیون کمپیلوباکتر در سلول‌های پوششی روده در طی عفونت انسان است. حضور این ژن در این نمونه‌ها نشان‌دهنده حاد بودن کمپیلوباکتر و در نتیجه بیماریزا بودن آن به طور بالقوه برای انسان می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده آلودگی نسبتاً زیاد طیور شهرستان کرمانشاه و مخاطرات بهداشتی مصرف گوشت طیور در انسان است. لذا جهت کاهش بار آلودگی گوشت و فرآورده‌های آن به گونه‌های کمپیلوباکتر و سایر میکروارگانیسم‌های مشابه، رعایت اصول بهداشت محیط و بهداشت فردی در کشتارگاه‌ها، به حداقل رساندن آلودگی لاشه‌ها با جلوگيري از تماس لاشه و احشاء خوراكي به محتويات دستگاه گوارش، به حداقل رساندن تماس لاشه‌ها با یکدیگر، حداقل دستکاری و استفاده از آب قابل شرب در پروسه کشتار لازم به نظر می‌رسد. همچنین رعایت اصول بهداشت در مراحل قطعه‌بندی، بسته‌بندی و حمل و نقل و حفظ زنجیره سرما در طول مرحله نگهداری گوشت تا رسیدن به دست مصرف‌کننده از اهمیت بالایی در کاهش بار آلودگی

جدول ۲- تعداد کل نمونه‌ها و تعداد موارد مثبت به تفکیک ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر

تعداد نمونه‌ها	جایگاه نمونه‌گیری	تعداد نمونه‌های مثبت کمپیلوباکتر بر اساس ژن *Cadf*	تعداد نمونه‌های کمپیلوباکتر دارای ژن حدت *flaA*	تعداد نمونه‌های مثبت کمپیلوباکتر ژژونی بر اساس ژن *hipO*
۱۰۰	انتهای روده مرغ	۳۰	۳۱	۲۰

لاشه‌ها به این پاتوژن‌ها خواهد داشت. آزمایش‌های منظم و اطلاع رسانی مناسب به مصرف‌کنندگان می‌تواند تا حد زیادي از وقوع عفونت‌های کمپیلوباکتریایی بکاهد. در این خصوص پیشگیری از آلودگی‌های متقاطع مواد غذایی آماده مصرف و پخت کامل گوشت قبل از مصرف توصیه می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد که پیش‌گیری از عفونت از طریق کاهش عفونت در حیوانات مزرعه، تغییرات مراحل کشتار و افزایش آموزش عمومی و آگاهی می‌تواند شیوع عفونت را کاهش دهد.

منابع مورد استفاده

1. Awadallah, M. A. I., H. A. Ahmed, A. A. El-Gedawy and A. M. Saad. 2014. Molecular identification of *C. jejuni* and *C. coli* in chicken and humans, at Zagazig, Egypt, with reference to the survival of *C. jejuni* in chicken meat at refrigeration and freezing temperatures. *International Food Research Journal*. 5: 1801-1812.

2. Bokaeian, M. A., H. Mohagheghi Fared and R. Gholizadeh. 2006. An investigation on contamination of poultries by Salmonella species in Zahedan (South-East Iran) during 2004. *Research Journal of Microbiology*. 1: 463-466.

3. Bolton, D.J. 2015. Campylobacter virulence and survival factors. *Food Microbiology*. 48: 99-108.

4. Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., eds. Jawetz, Melnick & Adelberg's.2007. Medical microbiology. 24th ed. Stamford, CT: Appleton & Lange.

5. Caner, V., Coka, Y., Cetin, C., Sen, A., Karagenc, N., 2008. The detection of *hipO* gene by real-time PCR in thermophilic Campylobacter spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94: 527–532.

6. Charles, M.D., Holman, R.C., Curns, A.T., Parashar, U.D., Glass, R.I., Bresee, J.S. 2006. Hospitalization associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 25: 489-93.

7. Debretsion, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Nganwa, D., Yehualaeshet, T., 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Molecular and Cellular Probes*. 21: 177-181.

8. Franchin, P.R., Ogliari, P.J., Batista, C.R.V. 2007. Frequency of thermophilic Campylobacterin broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *British Poultry Science*. 48: 127-132.

9. Frederick, A., Huda, N. 2011. Campylobacter in poultry: Incidences and possible control measures. *Research Journal of Microbiology*. 6: 182-192.

10. Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Kazemnejad, Lili. A., Najar-Peerayeh, sh. and Nikmanesh, B. 2014. A Molecular Survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Virulence and Diversity. *Iranian Biomedical Journal*. 18: 158-164.

11. Gill, C.O., and Hartrs, L.M. 1984. Hamburgers and broiler chickens as potential sources of human *Campylobacter enteritis*. *Journal of Food Protection*. 47: 96-99.

12. Hamidian, M., Sanaei, M., Bolfion, M., Dabiri, H., Zali, M.R. and Walther-Rasmussen, J. 2011. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, Iran. *Canadian Journal of Microbiology*. 57: 143–148.

13. Hassani Tabatabayi, A., Firouzi R.2005. Diseases of animals due to bacteria. 2nd ed., Tehran University Publication.Tehran.

14. Havaii, S.A., Pishva, E., Tabibian, A., Rabbani, M., Haghshenas, F., and Narimani, T. 2007. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *coli* isolated from poultry meat Cytolethal distending toxin-producing cell culture method in Isfahan. *Iranian journal of Medical Microbiology*. 3: 17-23 (In Persian).

15. Humphrey, T., O'Brien, S., and Madsen, M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*. 117: 237-257.

16. Jamshidi, A., Bassami, M.R., and Farkhondeh T. 2008. Isolation and identification of Campylobacter spp. And Campylobacter coli from poultry carcasses by conventional culture method and multiplex PCR in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Reseach*. 9: 132-137.

17. Khoshbakht, R., Tabatabaei, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S.S., and Shirzad Aski, H. 2013. Distribution of Nine Virulence-Associated Genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated from Broiler Feces in Shiraz, Southern Iran. *Foodborne pathogens and disease*. 10: 1-7.

18. Konkel, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Garvis, S.G., and Yoon, J. 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *Cadf* virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 510-517.

19. Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K.. and Rożynek, E. 2012. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*. 23: 297-301.

20. Nielsen, E.M., Engberg, J., and Madsen, M. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 19: 47–56.

21. Nobile, C., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C. and Pavia, M. 2013. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of Campylobacter spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*.

32: 715-718.
22. Purdy, D., Buswel, C.M., Hodgson, A.E., McApine, K.. and Henderson Iavd Leach, S.A. 2000. Charactrization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni. Journal of Medical Microbiology.* 49: 437-47.
23. Rahimi, E. 2013. Survey on Campylobacter spp. contamination of chicken maet and its by-products in Shahre-Kurd. *Iranian Veterinary Journal.* 9 (1): 30-36 (In Persian).
24. Rahimi, E., Momtaz, H. and Bonyadian, M. 2010. PCR detection of Campylobacter sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. *Food Control.* 21: 692-694.
25. Rizal, A., Kumar, A. and Sharan Vidyarthi, A. 2010. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *Internet Journal of Food Safety.* 12: 29-34.
26. Saife, Y.M., Fadly, F.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K. and Swayne, D.E. 2008. Disease of poultry. 12th edition, Blackwell Publishing Professional..
27. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning; a laboratory manual. (3th ed). Cold Spring Harbor Laboratory.
28. Schmidt-Ott, R., Brass, F., Scholz, C. and Gross, U. 2005. Improved serodiagnisis of *Campylobacter jejuni* infections using recombinant antigens. *Journal of Medical Microbiology.* 54: 761-767.
29. Shakerian, A., Rokni, N., Sharifzadeh, A., Alagha, S. and Talebian, R. 2005. *Campylobacter jejuni* as a Potential Pathogen in Liver of Broilers Chickens in Slaughtered & Retail Market Broilers in Shahr-e- Kord, Iran. *Journal of Food Science and Technology.* 1 (4): 43-50 (In Persian).
30. Soltan Dallal, M.M., Sanaei, M., Taremi, M., Moezardalan, S., Edalatkhah, H., Azimirad, M., and Zali, M.R. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of thermophilic *Campylobacter spp. (jejuni and coli)* Isolated from Beef and Raw Chicken in Tehran. *The scientific journal of Zanjan University of Medical sciences.* 17 (68): 85-92 (In Persian).
31. Zendehbad, B., Khayatzadeh, J. and Alipour, A. 2015. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of Campylobacter spp. isolates of retail broiler meat in Iran. *Food Control.* 53: 41-45.