مقاله پژوهشی

تعیین میزان فراوانی جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلو باکتر ژژونی در شیر خام جمع آوری شده از شهرستان آمل بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه

علی دبیری[۱]، سمانه روحی[۲،۳و۴]، بیژن نوری[۵]، فاطمه زابلی[۶*]

۱ - گروه صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی آمل، آمل، ایران.
۲ - کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۳ - مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۴- گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج ، ایران.
۵ - مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۶- گروه میکروب شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی آمل، آمل، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: کمپیلوباکتر می‌تواند از طریق شیر خام منتقل شود. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی در نمونه‌های شیر خام بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۷۲ نمونه شیر خام در تابستان از سکوهای شیر خام در شهرستان آمل جمع آوری شدند. شناسایی فنوتیپی جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی به وسیله روش‌های آزمایشگاهی میکروبی و شناسایی مولکولی این باکتری به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه [(Multiplex-M-PCR Polymerase Chain Reaction انجام شد. با توجه به این که تنها متغیرهای در دسترس ماه انجام مطالعه و تعداد نمونه‌های مثبت بود، داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 و آزمون فیشر *Fisher's exact test* مورد محاسبه قرار گرفتند ($p < ۰/۰۵$).

نتایج: از ۷۲ نمونه، ۱۳/۸۸ درصد نمونه‌ها آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی و ۲/۷۷ درصد آن‌ها آلوده به جنس کمپیلوباکتر بودند. بیشترین و کمترین میزان آلودگی شیر خام به این باکتری به ترتیب در ماه‌های مرداد (۲۰/۸۳ درصد) و شهریور (۱۲/۵۰ درصد) بود. همچنین تفاوت معناداری بین میزان فراوانی گونه کمپیلوباکتر ژژونی و جنس کمپیلوباکتر در نمونه‌های شیر خام در ماه‌های مختلف تابستان مشاهده نشد ($p = ۰/۰۷$).

نتیجه‌گیری: مطالعه ما آلودگی شیر خام را به وسیله کمپیلوباکتر نشان داد؛ لذا رعایت اصول بهداشتی در مکان‌های تولید مواد غذایی لبنیاتی و به کاربردن روش سریع و دقیق جهت شناسایی این باکتری حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: **جنس کمپیلوباکتر، گونه کمپیلوباکتر ژژونی، شیر خام، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه**

مقدمه

مواد لبنی مانند شیر خام و محصولات آن که به وسیله میکروب‌ها آلوده می‌شوند در ایجاد بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از جمله عوامل میکروبی آلوده کننده شیر، باکتری‌های مختلف مانند *کوکسیلا بورنتی* (*Coxiella burnetii*)، *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli* O157:H7)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، *مایکوباکتریوم بویس* (*Mycobacterium bovis*)، *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* (*Mycobacterium paratuberculosis*) و *یرسینیا انتروکولیتیکا* (*Yersinia enterocolitica*) را می‌توان نام برد (۱). در این میان جنس

* **نویسنده مسئول: فاطمه زابلی**، گروه میکروب شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی آمل، آمل، ایران.
Email: microbiol_sci@yahoo.com

کمپیلوباکتر (*Campylobacter genus*) نیز یکی از مهم ترین عوامل باکتریایی آلوده کننده شیر به شمار می‌رود (۲).

کمپیلوباکترها گرم منفی، خمیده، متحرک، اکسیداز و کاتالاز مثبت می‌باشند. در آزمایش هیدرولیز هیپورات نیز گونه کمپیلوباکتر ژژونی مثبت می‌باشد (۳ و ۴). اختلالات گوارشی و اسهال ناشی از گونه کمپیلوباکتر ژژونی (*Campylobacter jejuni*) از جمله بیماری‌های عمده در کشورهای در حال توسعه بوده و حتی در کشورهای توسعه یافته نیز یکی از علل مرگ و میر به خصوص در کودکان است (۵). این باکتری سهم عمده‌ای را در ایجاد التهاب معده و روده در انسان دارد و علاوه بر ایجاد اسهال آبکی و خونی، باعث بیماری‌های ثانویه‌ای مثل التهاب غضروف‌ها، عفونت دستگاه ادراری، التهاب پرده‌های محافظتی مغز و نخاع، التهاب ناگهانی کیسه صفرا و التهاب درون قلب می‌گردد (۶ و ۷).

مطالعات نشان می‌دهد که کمپیلوباکتر به طور عمده همراه با مواد غذایی با منشا دامی انتقال می‌یابد. علاوه بر این که مصرف شیر خام در کشور ما بسیار پایین است و شیر به صورت سنتی و یا مدرن پاستوریزه می‌گردد، شیر خام آلوده به کمپیلوباکتر یکی از شایع‌ترین علت بیماری‌های روده‌ای در اثر مصرف مواد غذایی آلوده است (۸). در صورتی که بار میکروبی در شیر خام بالا باشد به دلیل فعالیت آنزیم‌های مقاوم به گرما در باکتری‌ها حتی بعد از عمل پاستوریزاسیون شیر خام، مواد لبنی حاصل از آن کیفیت مورد انتظار را ندارند و حامل باکتری‌ها می‌باشند (۹).

بنابر مطالب گفته شده آلودگی باکتریایی شیر خام با اهمیت بوده و وجود یا عدم وجود کمپیلوباکتر جهت تایید سلامت غذایی مواد لبنی از نقطه نظر وجود این باکتری ضروری است. به طور معمول روش‌های کشت، جداسازی و تست‌های تشخیص بر اساس خواص فنوتیپی جهت شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر به کار می‌رود (۱۰)، اما از آنجا که این باکتری جز باکتری‌های سخت رشد است، جداسازی آن به وسیله روش‌های کشت دشوار می‌باشد (۱۱)؛ لذا روش‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز [Polymerase Chain Reaction (PCR)] که در شناسایی کمپیلوباکتر بیشتر مورد اطمینان و از نظر تجاری نیز قابل دسترسی است مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲).

در این بررسی از روش مولکولی جهت تشخیص جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی استفاده شد، زیرا روش‌های مولکولی حساسیت و اختصاصیت بالا داشته و عوامل مختلف میکروبی قابل شناسایی می‌باشند (۱۳).

آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه [Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction یکی از انواع روش‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌باشد و برای تعیین و تشخیص افتراقی و وجود احتمالی هم زمان عوامل عفونی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد زیرا در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی جهت شناسایی عامل میکروبی مورد نظر استفاده می‌شود. همچنین این روش سریع، ساده و ابزار عملی دقیق برای شناسایی کمپیلوباکتر است که توانایی تقویت تکثیر DNA، تشخیص ژن‌های بزرگ و چند ژن را به طور همزمان دارد (۱۴ و ۱۵).

مطالعات مختلف آلودگی محصولات لبنی را به وسیله کمپیلوباکتر توسط روش‌های کشت و مولکولی نشان داده است:

Khanzadi و همکاران (۱۶) به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه گزارش دادند که از ۲۰۰ نمونه شیر خام، ۸ درصد آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی و ۱۵/۵ درصد آلوده به جنس کمپیلوباکتر بودند.

Bianchini و همکارن (۱۷) به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان دادند که ۱۲ درصد از ۲۸۲ نمونه شیر خام آلوده به این باکتری بودند. Barakat و همکاران (۱۸) در مصر به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز گزارش دادند که از ۴۵۰ نمونه شیر خام ۴/۴۴ درصد نمونه‌ها آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی بودند.

در مطالعه دیگر که با استفاده از محیط‌های کشت غنی کننده و خواص فنوتیپی انجام گرفت، Kazemeini و همکاران (۱۹) گزارش دادند که از میان ۱۲۰ نمونه شیر خام، ۲/۵ درصد به کمپیلوباکتر ژژونی آلوده بودند.

شیر یکی از پرمصرف ترین لبنیات و از مواد غذایی ضرروی می‌باشد، سلامت شیر خام به صلاح بهداشت همگانی است و عدم رعایت این موضوع سطح سلامت و بهداشت جامعه و همچنین بهداشت اقتصادی را کاهش خواهد داد؛ لذا با توجه به اهمیت این موضوع شناسایی سریع و دقیق آلودگی شیر خام اهمیت دارد. در

این تحقیق اقدام به نمونه برداری از شیر خام موجود در سکوهای شیر خام، در ماه‌های گرم سال در فصل تابستان (تیر، مرداد و شهریور) در شهرستان آمل (استان مازندران) گردید و در نهایت واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه با هدف تشخیص جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی و نهایتا تعیین فراوانی این باکتری در شیر خام طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: این مطالعه در ۱۲ سکوی جمع آوری شیر خام در شهرستان آمل در استان مازندران صورت گرفت، قابل ذکر است که ۱۴ سکو در شهرستان آمل مشغول به فعالیت هستند که ۲ سکو به دلیل کم بودن ظرفیت شیر خام، این محصول را به دیگر سکوها تحویل می‌دهند. نمونه گیری در طی ۳ ماه در فصل تابستان سال ۱۳۹۲ با اجازه گرفتن از صاحبان کارخانه‌ها انجام شد. ۷۲ نمونه شیر خام، هر نمونه به اندازه ۲۰۰ میلی لیتر در سه ماه تیر، مرداد و شهریور، در هر ماه ۲۴ نمونه از کلیه سکوها جمع آوری شد. نمونه برداری به محض ورود شیر به سکوها و در اوج تازگی شیر خام و قبل از ارسال مقادیری از آن به کارخانجات یا جایگاه‌های مصرفی صورت گرفت و نمونه‌ها با استفاده از یخ و رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. قابل ذکر است که قبل از نمونه برداری، شیر خام داخل سکو توسط هم زن‌های دستی برای یک‌نواخت شدن دانسیته و چربی نمونه‌های شیر خام مخلوط شده بود.

غنی سازی نمونه‌های شیر خام: ۱۰ میلی لیتر از هر کدام از نمونه‌های شیر خام در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. توده به دست آمده بعد از سانتریفوژ به ۹۰ میلی لیتر محیط پرستون براث (محیط پرستون براث ساخت شرکت Merk آلمان) جهت غنی سازی کمپیلوباکتر انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس نمونه‌ها به روش کشت خطی در محیط کشت اختصاصی (*Campylobacter Selective Agar Base*) *Campylobacter Selective Agar Base* ساخت شرکت Merk آلمان) و بر پایه آگار خون دار بود کشت داده شد. محیط Campylobacter Selective Agar Base حاوی ۷ درصد خون تجزیه شده اسب بود. همچنین هر ۵۰۰ میلی لیتر از آن شامل ۲ میلی گرم آنتی بیوتیک وانکومایسین جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به متیسیلین، ۵۰ میلی گرم پلی میکسین B جهت جلوگیری از رشد پسودوموناس (*Pseudomonas*)، پاستورلا (*Pastorella*)، سالمونلا (*Salmonella*)، شیگلا (*Shigella*) و کلبسیلا (*Klebsiella*) و ۱ میلی گرم تری متوپریم به منظور جلوگیری از رشد اشریشیاکلی، انتروباکتر (*Enterobacter*)، کلبسیلا، استرپتوکوکوس (*Streptococcus*)، پاستورلا، کلستریدیوم (*Clostridium*)، سالمونلا، شیگلا، کورینه باکتریوم (*Corynebacterium*) و پرتئوس (*Proteus*) بود، آنتی بیوتیک‌های مذکور ساخت شرکت Mast انگلستان بودند (۲۰).

سپس پلیت‌های فوق در شرایط اتمسفر میکروآئروفیلیک به همراه گازپک شامل ۵ درصد اکسیژن، ۱۰ درصد دی اکسیدکربن و ۸۵ درصد نیتروژن (گازپک ساخت شرکت Oxoid کانادا) در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند (۱۶).

شناسایی و جداسازی کمپیلوباکتر: پلیت‌ها از انکوباتور خارج و آن‌هایی که حاوی پرگنه‌های مسطح، غیر همولیتیک، کروی، آبکی و خاکستری به اندازه قطر ۱ میلی متر بودند مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفتند. پس از شناسایی پرگنه‌های مشکوک با مشخصات ذکر شده در بالا در پلیت‌ها، نمونه‌ای از آن‌ها توسط آنس به روی یک لام منتقل و بر اساس روش گرم، رنگ آمیزی و بخش‌های مختلف لام در زیر میکروسکوپ نوری و با عدسی ۱۰۰ بررسی شد. این نکته قابل ذکر است که جهت اطمینان در کار، سایر پرگنه‌ها که فاقد مشخصات کمپیلوباکتر بودند نیز به وسیله رنگ آمیزی گرم رنگ شدند. اما نمونه‌هایی که واجد مشخصات کمپیلوباکتر بودند برای انجام آزمایشات تکمیلی و تایید کمپیلوباکتر ژژونی، خالص سازی و نگهداری شدند. آزمایشات تکمیلی شامل آزمایش اکسیداز و کاتالاز می‌باشند. از آزمایش اکسیداز با استفاده از دیسک اکسیداز برای تایید کمپیلوباکتر بودن پرگنه مشکوک استفاده گردید. در ادامه نیز از آزمایش هیدرولیز هیپورات جهت تشخیص کمپیلوباکتر ژژونی استفاده شد (۱۶).

استخراج DNA: پرگنه‌هایی که در آزمایشات میکروسکوپی به عنوان کمپیلوباکتر تایید شدند و در آزمایش تکمیلی اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند، جهت اطمینان از خالص بودن آن‌ها و کنترل کیفیت محیط‌های کشت، کشت مجدد داده و دوباره خالص سازی شدند. همچنین در محیط‌های کشت کهنه، باکتری‌ها به خوبی رشد نمی‌کنند، بنابراین جهت اطمینان بیشتر از کشت تازه و ۲۴ ساعته، زنده و تازه باکتری جهت استخراج DNA استفاده شد. سپس DNA این نمونه‌ها به روش جوشاندن استخراج شد. به این ترتیب که پرگنه‌های یکسان موجود در پلیت‌های محیط کشت اختصاصی بعد از جمع آوری به ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر غیریونی استریل انتقال یافته و مخلوط شد و سپس در داخل بن ماری حاوی آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا جوشانیده شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه داخل یخ قرار داده شدند تا سریعا سرد شوند. بعد تحت شرایط ۱۳۰۰۰ دور و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جهت انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه، مایع رویی حاصل از سانتریفوژ به عنوان الگوهای DNA مورد استفاده قرار گرفتند (۲۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه: در این مطالعه دو جفت Forward Primer و Reverse Primer جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی تهیه شده از شرکت زیست باران (ساخت شرکت Qiagen ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین پرایمرها به وسیله نرم افزار مولکولی Oligo, BLAST از لحاظ وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات پرایمرها نیز آزمایش و ارزیابی شدند. یکی از جفت پرایمرهای اختصاصی شامل پرایمر ژن cad F می‌باشد که ژن کد کننده پروتئین ۳۷ کیلو دالتونی غشای خارجی سلولی [Campylobacter adhesin to (CadF) fibronectin] و اختصاصی جنس کمپیلوباکتر است. CadF عمل اتصال کمپیلوباکتر را به گلیکو پروتئین زمینه‌ای فیبرونکتین واسطه گری می‌کند (۲۲). جفت پرایمر بعدی، ژن کد کننده زیر واحد پروتئینی آنزیم اوبی کینون اکسیدو ردوکتاز می‌باشد که عمل اکسیداسیون و احیا کوآنزیم نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید را [Nicotinamide adenine (NADH) dinucleotide] را در زنجیره تنفسی کمپیلوباکتر ژژونی بر عهده دارد و اختصاصی این گونه است (جدول ۱) (۲۳). ژنوم DNA استخراج شده از کمپیلوباکتر ژژونی که حضور دو ژن cad F و[Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)] در آن به وسیله سکونسینگ یا توالی یاب تایید شده است به عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی در دانشگاه تهران) جهت تایید و افتراق جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی از حضور احتمالی سایر باکتری‌ها و آلودگی‌های ایجاده شده و آب مقطر به عنوان کنترل منفی در همه مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر مستر میکس *(Master Mix)* با غلظت 1X بود. مستر میکس شامل تریس هیدروکلراید [Tris-Hydrochloride (HCL)]با غلظت ۲۰ میلی مولار، پتاسیم کلراید [Potassium Chloride (*KCl*)] با غلظت ۵۰ میلی مولار، آمونیم کلراید [Ammonium Chloride (NH_4Cl)] با غلظت ۳۰ میلی مولار، کلرید منیزیم [Magnesium Chloride ($MgCl_2$)] با غلظت ۲/۵ میلی مولار، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات [Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)] با غلظت ۰/۳ میلی مولار، گلیسرول ۳/۲ درصد، حلال *IGEPAL*® CA-630 با غلظت ۰/۰۸ درصد، *Tween*® *20* با غلظت ۰/۰۷ درصد، آنزیم تک پلیمراز با غلظت ۱۰۰ واحد در میلی لیتر بود که در pH=۸/۹ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داشت (مستر میکس ساخت شرکت سینا ژن ایران). سایر ترکیبات نیز شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۰ Pmol با دمای ذوب [*Melting Temperature* (*Tm*)] اشاره شده، ۱ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتراستخراج شده، تقریبا ۹ میکرولیتر آب غیریونیزه و ۱ میکرولیتر Dimethyl Sulfoxide (*DMSO*) بود که به علت فاصله داشتن دمای ذوب پرایمرها جهت کمک به افزایش کارآیی و اختصاصی شدن واکنش به آن اضافه شد و نهایتا حجم نهائی به ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه در Thermocycler (دستگاه Thermocycler ساخت شرکت Techne انگلستان) در دمای شروع فعالیت آنزیمی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، همراه با ۳۳ چرخه ۳ مرحله‌ای شامل دمای واسرشته سازی ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای همسرشته سازی ۵۴ درجه سانتی گراد و دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد و نیز یک مرحله گسترش نهایی۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد (جدول ۲) (۱۳). سپس

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه جهت تشخیص گونه کمپیلوباکتر ژژونی و جنس کمپیلوباکتر در نمونه‌های شیر خام

ژن هدف	توالی پرایمر ها ('3→'5)	دمای ذوب پرایمر (°C)	اندازه محصول PCR (bp)
cad F	F 5'-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG-3' R 5'-CTA ATA CC (C or T) AAA GTT GAA AC-3'	F= 52 R= 50	400
NADH	F 5'-CAA ATA AA (G or A) TTA GAG GTA GAA TGT -3' R 5'- GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T-3'	F= 62 R= 64	160

جدول ۲. شرایط استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه جهت تشخیص گونه کمپیلوباکتر ژژونی و جنس کمپیلوباکتر در نمونه‌های شیر خام

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه	دما	زمان	تعداد چرخه
مرحله شروع فعالیت آنزیم	۹۴ درجه سانتی گراد	۴ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۴ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	۳۳
همسرشته سازی	۵۴ درجه سانتی گراد	۴۵ ثانیه	
گسترش	۷۲ درجه سانتی گراد	۲ دقیقه	
گسترش نهایی	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	۱

الکتروفورز روی بافر [Tris Acetate-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)] انجام گرفت. در این مطالعه از ژل اگارز ۱/۵ درصد و DNA یا مارکر ۱۰۰ bp با وزن مولکولی استاندارد بین ۱۰۰ bp تا ۱۰۰۰ bp (تهیه شده از شرکت Fermentas آمریکا) استفاده گردید. حرکت DNA تحت جریان الکتریکی در ولتاژ ۱۰۰ ولت از سمت قطب منفی به سمت مثبت انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل به آرامی داخل رنگ اتیدیوم بروماید انتقال داده و پس از ۱۰ دقیقه ژل به ظرف محتوی آب مقطر برده شد تا رنگ اضافی از سطح ژل شسته شود. سپس ژل را روی دستگاه Gel Doc Transilluminator قرار داده و بعد از ظاهر شدن باندها در صفحه مانیتور با مقایسه اندازه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه در ۱۶۰ bp و ۴۰۰ با مارکر تعیین اندازه ۱۰۰ bp، به اندازه مولکول تکثیر یافته پی برده شد (شکل ۱) (۱۶).

آنالیز آماری: با توجه به این که شیوع این باکتری در ماه‌های گرم سال نسبت به سایر ماه‌ها بیشتر می‌باشد، ماه‌های تابستان و همچنین تعداد نمونه‌های مثبت به عنوان متغیرین در نظر گرفته شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون فیشر (*Fisher's exact test*) و نرم افزار SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) مورد محاسبه قرار گرفتند ($p < ۰/۰۵$).

نتایج

در این بررسی، از مجموع ۷۲ نمونه تعداد ۱۰ (۱۳/۸۸ درصد) نمونه از نظر کمپیلوباکتر ژژونی و ۲ (۲/۷۷ درصد) نمونه از نظر جنس کمپیلوباکتر مثبت بودند. همچنین کمترین میزان فراوانی این باکتری در نیمه اول ماه‌های تیر و شهریور (۸/۳ درصد) و بیشترین میزان فراوانی در نیمه دوم تیر ماه و نیمه اول مرداد ماه بود (۲۵ درصد). به طور کلی ترتیب میزان فراوانی در ماه‌های



شکل ۱. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه روی ژل آگارز جهت شناسایی ایزوله‌های جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی جدا شده از شیر خام. (-): کنترل منفی، (+): کنترل مثبت، M: خط کش *Ladder*، ستون ۱، ۳ و ۴: نمونه‌های شیر خام فاقد کمپیلو باکتر، ستون ۲ و ۶: نمونه دارای کمپیلوباکتر ژژونی شامل ژن NADH- ubiquinone oxidoreductase subunit gene در بخش ۱۶۰ bp و ژن *cad* F در بخش ۴۰۰ bp قابل مشاهده می‌باشند، ستون ۵: نمونه شیر خام دارای جنس کمپیلوباکتر شامل ژن NADH- ubiquinone oxidoreductase subunit gene در بخش ۴۰۰ bp

مرداد (۲۰/۸۳ درصد)، تیر (۱۶/۶۶ درصد) و شهریور (۱۲/۵۰ درصد) بود (جدول ۳). قابل ذکر است که پرگنه‌های رنگ شده در قسمت روش کار که مشخصات زیر میکروسکوپی مربوط به کمپیلوباکتر را نداشتند، مورد بررسی‌های بعدی قرار نگرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری

گونه‌های کمپیلوباکتر به عنوان یکی از عوامل مهم در عفونت‌های باکتریایی با منشا غذایی مورد توجه می‌باشند. این باکتری از موارد مولد اسهال و پاتوژن غذایی درکشورهای مختلف می‌باشد که انتقال آن از شیر به انسان در موارد متعدد گزارش شده است. عفونت حاصل از این باکتری به صورت انفرادی و اغلب در فصول بهار و تابستان شایع می‌باشد (۲ و ۲۴).

در مطالعه حاضر، از مجموع ۷۲ نمونه شیر خام، ۱۳/۸۸ درصد از نمونه‌ها از نظر کمپیلوباکتر ژژونی و ۲/۷۷ درصد از نمونه‌ها از نظر جنس کمپیلوباکتر مثبت بودند که نشان دهنده این مطلب می‌تواند باشد که ممکن است گونه کمپیلوباکتر ژژونی بیشتر از سایر گونه‌ها شیر را آلوده کند. اگر چه محاسبات آماری نشان داد که تفاوت معناداری بین فراوانی گونه کمپیلوباکتر ژژونی و جنس کمپیلوباکتر در نمونه‌های شیر خام بین ماه‌های مختلف تابستان وجود نداشت ($p = ۰/۰۷$) اما طبق نتایج به دست آمده، کمترین میزان فراوانی این باکتری در نیمه اول ماه‌های تیر و شهریور و بیشترین میزان فراوانی در نیمه دوم تیر ماه و نیمه اول مرداد ماه مشاهده شد که بیانگر شیوع بیشتر این باکتری در نیمه‌های گرم تر ماه‌های فصل تابستان است. اما رعایت موازین بهداشتی همچنین می‌تواند از عوامل کاهش میزان فراوانی این باکتری در ماه‌های مختلف باشد و می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در بخش‌هایی از فصل که میزان فراوانی این باکتری کمتر است نکات بهداشتی بیشتر رعایت شده است.

جدول ۳. نتایج حاصل از آلودگی نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده به جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی در ماه‌های مختلف تابستان

زمان نمونه گیری	نیمه اول تیر	نیمه دوم تیر	نیمه اول مرداد	نیمه دوم مرداد	نیمه اول شهریور	نیمه دوم شهریور
تعداد نمونه	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲
تعداد موارد مثبت گونه کمپیلوباکتر ژژونی	۱	۳	۲	۲	۱	۱
تعداد موارد مثبت جنس کمپیلوباکتر	۰	۰	۱	۰	۰	۱
درصد آلودگی	۸/۳	۲۵	۲۵	۱۶/۶۶	۸/۳	۱۶/۶۶
درصد آلودگی در ماه‌های مختلف	۱۶/۶۶		۲۰/۸۳		۱۲/۵۰	

امروزه سریع ترین روش جهت تشخیص این باکتری روش‌های مبنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌باشد و انواع این روش‌ها نیز به نوبه خود حساسیت و ویژگی‌های مختلف دارند (۲۵). Singh و همکاران (۲۶) در هند به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان دادند که از مجموع ۹۵ نمونه محصولات دامی که شامل لبنیات نیز بود، نمونه‌های شیر خام و پنیر از لحاظ وجود کمپیلوباکتر ژژونی منفی تشخیص داده شدند. در مطالعه دیگر Rahimi و همکاران (۲۷) در ایران به وسیله آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان دادند از مجموع ۵۵۲ نمونه محصولات لبنی شامل شیر خام، ۹/۳ درصد از نمونه‌ها آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی بودند. نتایج مطالعات ما در مقایسه با نتایج مطالعه Rahimi و Singh میزان کمتری از آلودگی را نشان داده است. آلودگی میکربی در مراحل مختلف آماده سازی مواد غذایی مانند پاستوریزاسیون و فریز کردن روی می‌دهد. عوامل مختلف مانند دمای نامناسب نمونه‌ها، آلودگی ظروف حاوی نمونه‌ها، رعایت نکردن اصول بهداشتی در بین کارکنان و کارگران کارخانه و عوامل بهداشت محیطی در میزان آلودگی توسط کمپیلوباکتر ژژونی تاثیر دارد (۲۰). Modi و همکاران (۲۸) در هند به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و Murinda و همکاران در آمریکا (۲۹) به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چند گانه میزان این باکتری را در نمونه‌های شیر خام به ترتیب ۲/۹۱ درصد و صفر گزارش کردند. در تحقیق ما که در طی سه ماه تابستان صورت گرفت اختلاف معناداری بین فراوانی کمپیلوباکتر ژژونی در نمونه‌های جمع آوری شده شیر خام در ماه‌های مختلف تابستان مشاهده نشد و بیشترین میزان فراوانی این باکتری طی سه ماه ۱۶/۶۶ درصد بود که از مطالعه Huang و Murinda بیشتر بود و این اختلاف ممکن است به علت نمونه گیری در مناطق مختلف جغرافیایی، فصل نمونه گیری و شرایط آب و هوایی باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که انتقال بیماری‌های ناشی از این باکتری در فصل‌های بهار و تابستان شایع تر است (۲۴).

Hussain و همکاران (۳۰) در پاکستان به وسیله کشت میکروبی نشان دادند که میزان کمپیلوباکتر ژژونی در ۴۵ نمونه شیر خام ۸/۸ درصد بود که تقریبا شبیه به نتایج حاصل از مطالعه ما در نیمه اول تیر و شهریور بود اما در مطالعه دیگر که توسط El-Sharoud (۳۱) در مصر به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چند گانه روی ۵۰ نمونه شیر خام انجام شد ۲ درصد آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی بودند که نسبت به مطالعه ما کمتر بود. از جمله مزیت‌های روش‌های مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چند گانه این است که حساسیت و اختصاصیت بسیار زیادتری نسبت به روش‌های متداول آزمایشگاهی و کشت دارند. شناسایی میکروارگانیسم به وسیله این روش‌ها بسیار دقیق تر و قابل اعتمادتر صورت می‌گیرد، زیرا باکتری طی کشت ممکن است از بین برود و به درستی تشخیص داده نشود، در نتیجه موارد مثبتی را از دست می‌دهیم، اما روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چند گانه نوعی انگشت نگاری میکروبی بوده و حتی وجود حداقل میزان نمونه باکتری را در نمونه تشخیص می‌دهد (۳۲). از طرف دیگر وجود آلودگی در موادی مانند پرایمر، آنزیم‌ها و همپنین نمونه‌ها می‌تواند علت عملکرد ناصحیح روش‌های مولکولی شود که دقت و احتیاط لازم را در هنگام کار ملزوم می‌سازد، بنابراین یکی از علل اختلاف در نتایج مطالعات گوناگون می‌تواند کاربرد روش‌های مختلف شناسایی جهت تشخیص آلودگی باکتریایی باشد (۳۳). همچنین از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به این موارد اشاره کرد: در این مطالعه توزیع کمپیلوباکتر در نمونه‌های شیر خام مورد بررسی قرار گرفت ولی همه شیر خام که به صورت مایع است در سکوهایی که ممکن است دارای این عامل میکروبی بوده باشند در نمونه گیری ما نگنجیده باشند، ممکن است باکتری در نمونه در هنگام انتقال از بین رفته باشد و یا یک سری از خطاها در حین آزمایش علت عدم شناسایی آن‌ها شده باشد. همچنین به علت کمبود منابع مالی امکان جمع آوری تعداد بیشتر نمونه در این فصل و یا در فصول مختلف و مقایسه فصول مختلف و نمونه‌ها از نظر میزان فراوانی این باکتری با هم وجود نداشت. اما اهمیت تحقیق ما در این مطلب می‌باشد که شناسایی این باکتری در مواد غذایی می‌تواند راهی جهت شناسایی منبع شیوع عفونت‌های حاصل از این باکتری و بنابراین یکی از مراحل مهم پیشگیری از بیماری‌های حاصله از کمپیلوباکتر به شمار رود. بنابراین این نوع مسائل در مطالعات بعدی می‌بایست بیشتر مورد توجه باشد و در رفع آن تلاش بیشتری صورت گیرد. در انتها با توجه به این نکته که غذای سالم و مغذی مهم‌ترین منبع انرژی انسان می‌باشد و میکروب‌ها نیز برای رشد نیاز به مواد مغذی دارند، بنابراین تشخیص آلودگی، عوامل بیماری و راه‌های آلوده شدن غذاها لازم

است، تا این که از بیماری‌هایی که در اثر مصرف غذاهای آلوده ایجاد می‌شوند پیشگیری کنیم. به طور کلی با توجه به این که شهرستان آمل در استان مازندران که یکی از مناطق مرطوب کشور می‌باشد واقع شده است، در فصل تابستان دمای هوا بیشتر می‌باشد، همچنین شهرستان مذکور دارای کارخانجات صنایع لبنی بوده و از جمله مهم‌ترین قطب‌های صنایع غذایی به شمار می‌رود، بنابراین با توجه به این موارد این مطالعه می‌تواند با تعیین میزان فراوانی این باکتری در شیر هشداری جهت رعایت اصول مختلف بهداشتی، جستجوی راه‌کارهای مناسب برای کاهش آلودگی شیر در مراکز جمع آوری شیر خام، جلوگیری از ورود انواع آلودگی و تشخیص آلودگی جهت پیشگیری سریعتر در خطوط تولید شیر خام و اجرای اقدامات نظارتی در راستای حفظ بهداشت عمومی باشد. در این راستا جهت پیشگیری از آلودگی شیر خام و کاهش بار میکروبی آن، مراقبت از دام‌های شیری و حفظ سلامت آن در برابر بیماری‌ها، تجویز به موقع واکسن‌های دام، رعایت اصول بهداشتی در مراحل شیر دوشی و بعد از آن، شستشو و ضد عفونی کردن کلیه دستگاه‌های شیر دوشی پس از هر بار دوشیدن شیر و رعایت نظافت در محیط دام‌داری‌ها و کارگران توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه بخش پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی آیت الله آملی واحد آمل سپاس‌گزاری می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Oliver OP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Pathog Dis. 2005;2 (2):115-129.
2. Ziaei N, Amir Mozafari N, Kouhsari H, Moradi A, Tabarai A, Dadgar T, et al. Prevalence of Campylobacter jejuni in diarrhea samples in Gorgan, East north of Iran. MLJGOUMS. 2009;2(2):36-42. [Article in Persian]
3. Shirazi MH, Vaise Malekshahi Z, Afshar D, Ranjbar R, Hajikhani S. Drug resistance among Campylobacter jejuni strain isolated from children with diarrhea in Tehran. JBUMS. 2013;15(1);79-83. [Article in Persian]
4. Eshraghi SS, Talebi M, Pourshafie M, Salari M. The prevalence and molecular characterization of vancomycin resistant gram positive cocci isolated from patients in Tehran. Iran J Med Microbiol. 2007;1(3):9-15. [Article in Persian]
5. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses selected sites, United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51(15):325–329.
6. Jacobs-Reitsma W, Lyhs U, Wagenaar J. Campylobacter. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2008. P. 627-644.
7. Adedayo O, Kirkpatrick B. Campylobacter jejuni infections: update on presentation, diagnosis, and management. Hosp Physician. 2008; 44(7): 9-15.
8. Jay JM. Modern Food Microbiology. 5th ed. Delhi: CBS Publishers and Distributors, New Delhi Press; 1992. P. 556-559.
9. Hesari J, Ehsani MR, Khosroshahi A, Ghaemi N. Effect of psychrotrophic bacteria and somatic cell count on proteolysis and sensory properties of UF white cheese. IFSTRJ. 2007;1(2): 43-54.
10. Rosyidi A, Budhiharta S, Asmara W, Yudhabuntara D. Phenotypic and genotypic detection of Campylobacter jejuni at local chicken and chicken meat. Anim Prod. 2010; 12 (2):128-134.
11. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PML, Horn ST, et al. Differentiation of Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, and Campylobacter upsaliensis by a Multiplex PCR developed

from the nucleotide sequence of the lipid A gene lpxA. J Clin Microbiol. 2004; 42(12):5549-5557.
12. Lastovica AJ, Roux EL. Efficient isolation of Campylobacter upsaliensis from stools. Clin Microbiol. 2001; 39(11): 4222–4223.
13. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol. 1997; 35 (10): 2568-2572.
14. Kermanian M, Bamdad T, Soleimanjahi H, Samiee Sh. Diagnosis of Enterovirus and Mumps virus in CSF samples of patients with aseptic meningitis by RT-PCR assay. Daneshvar. 2008;15(76):75-80.
15. Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydophila pneumoniae to be used on sputum samples. APMIS. 2005; 113(2): 99-111.
16. Khanzadi S, Jamshidi A, Soltaninejad V, Khajenasiri. Isolation and indentification of Campylobacter jejuni from bulk tank milk in Mashhad – Iran. World Appl Sci J. 2010;9(6):638-643.
17. Bianchini V, Borella L, Benedetti V, Parisi A, Miccolupo A, Santoro E, et al. Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of Campylobacter jejuni in dairy herds in northern Italy. Appl Environ Microbiol. 2014;80 (6):1832–1837.
18. Barakat AMA, Sobhy MM, El Fadaly HAA, Rabie NS, Khalifa NO, Ramadan ES, et al. Zoonotic hazards of Campylobacteriosis in some areas in Egypt. Life Sci J. 2015;12(7): 9-14.
19. Kazemeini H, Valizade Y, Parsaei P, Nozarpour N, Rahimi E. Prevalence of Campylobacter species in raw bovine milk in Isfahan, Iran. Middle East J Sci Res. 2011; 0 (5): 664-666.
20. Shahrokhabad R, Rahimi E, Momtaz H. Investigation of morbidity and antibacterial resistance of Campylobacter spp. sample isolation from broilers slaughter in Rafsanjan city using basic culture method. Veterinary Journal. 2011; 23 (2): 53-58. [Article in Persian]
21. Nayak R, Stewart TM, Nawas MS. PCR identification of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni by partial sequencing of virulence genes. Mol Cell Probes. 2005; 19 (3): 187-193.
22. Krause-Gruszczynska M, Van Alphen LB, Oyarzabal OA, Alter T, Hänel I, Schliephake A, et al. Expression patterns and role of the CadF protein in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. FEMS Microbiol Lett. 2007;274(1):9-16.
23. Weerakoon DR, Olson JW. The Campylobacter jejuni NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Utilizes Flavodoxin Rather than NADH. J Bacteriol. 2008; 190 (3): 915–925.
24. Mokhtarian DH, Mohsenzadeh M, Ghahramani M, Moshki M, Fani MJ. Detection and identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from poultry carcasses slaughtered in Gonabad poultry slaughterhouse. GMUHS. 2009; 15(3): 30-36. [Article in Persian]
25. Aghamollaei H, Azizi Barjini K, Moosazadeh Mogaddam M. Rapid Detection of Pseudomonas Aeruginosa by PCR method using specific primers of quorum sensing LasI gene. Armaghane-danesh. 2013;18(9):722-735. [Article in Persian]
26. Singh H, Rathore RS, Singh S, Cheema PS. Comparative analysis of cultural isolation and pcr based assay for detection of campylobacter jejuni in food and faecal samples. Braz J Microbiol. 2011; 42(1): 181–186.
27. Rahimi E, Sepehri S, Momtaz H. Prevalence of Campylobacter species in milk and dairy products in Iran. Revue Méd Vét. 2013;164 (5): 283-288.
28. Modi S, Brahmbhatt MN, Chatur YA, Nayak JB. Prevalence of Campylobacter species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. Vet World. 2015; 8 (2015): 1-8.
29. Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. Problems in isolation of Campylobacter jejuni from frozen-stored raw milk and bovine fecal samples: genetic confirmation using multiplex PCR. Foodborne Pathog Dis. 2004;1(3):166-171.
30. Hussaina I, Mahmooda MS, Akhtarb M, Khan A. Prevalence of Campylobacter species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. Food Microbiol. 2006;24 (3):219–222.
31. El-Sharoud WM. Prevalence and survival of Campylobacter in Egyptian dairy products. Food Res Int. 2009; 42 (5-6): 622–626.
32. Bakhtiari B, Soltan Dallal M, Zaemi Yazdi J, Fallah J, Amir Mozaffari N, et al. Evaluation of PCR method for diagnosis of group B Streptococcuscarriage in pregnant women. Iran J Med Microbiol. 2007; 1 (2): 1-8.
33. Shahhosseiny MH, Ghahri M, Moslemi E. Design of an internal control (IC) for molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Microbial World 2014; 7 (2): 97-108.

Original Article

The Prevalence of Campylobacter Genus and Campylobacter jejuni Species in Raw Milk Collected from Amol by Multiplex- Polymerase Chain Reaction

Dabiri A[1], Rouhi S [2, 3, 4], Nouri B [5], Zaboli F [6*]

1 - Department of Food Industry, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University of Amol, Amol, Iran.
2 - Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
3- Cellular & Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
4- Microbiology Department, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
5- Social Determinants of Health Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
6- Microbiology Department, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University of Amol, Amol, Iran.

Received: 10 Aug 2015 Accepted: 16 Dec 2015

Abstract

Background & Objective: Campylobacter can be transmitted through the raw milk. The purpose of this study was to determine the prevalence of Campylobacter genus and Campylobacter jejuni (C. jejuni) species in raw milk samples.

Materials & Methods: In this study, 72 samples of raw milk were collected of the platforms milk in the Amol city in summer. Phenotypic identification of Campylobacter genus and C. jejuni species using microbiology laboratory methods and molecular identification of this bacterium using Multiplex- Polymerase Chain Reaction (M-PCR) were performed. The data was calculated using the SPSS 16.0 software and the *Fisher's* exact *test* ($p < 0.05$).

Results: Among the 72 samples, 13.88% of samples were contaminated with C. jejuni and 2.77% were contaminated with Campylobacter genus. The highest prevalence rate for this bacterium was in July (20.83%) and the lowest prevalence rate was in September (12.5%). The significant difference between the prevalence of the Campylobacter genus and C. jejuni species in raw milk samples in various months of summer was not observed ($p = 0.07$).

Conclusion: This study showed the raw milk contamination with Campylobacter, and thereby the sanitation in the dairy food production places and the use of fast and accurate method to identify this bacterium is important.

Keywords: **Campylobacter genus, Campylobacter jejuni species, Raw Milk, Multiplex-PCR Method**

[*]**Corresponding author: Fatemeh Zaboli,** Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University of Amol, Amol, Iran.
Email: microbiol_sci@yahoo.com