Veterinary Clinical Pathology, Vol.16, No. 63, Autumn 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1959425.1367**

Isolation and identification of *Helicobacter pullorum* from cecal content and liver of broiler poultry referred to veterinary clinics in Tabriz using culture and PCR methods

Alavi shoushtari, S.M.[1], Javadi, A.[2]*, Zarrini, G.R.[3], Mirzaie, H.[4], Hanifian, S.H.[5]

1- PhD Student, Department of Food Hygien, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Hygien, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.
4- Associate Professor, Department of Food Hygien, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
5- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding authors email: Javadi@iaut.ac.ir
(Received: 2022\8\3 Accepted: 2022\11\30)

Abstract

The potential role of *Helicobacter pullorum* as an emerging cause of foodborne infection and a common disease between humans and livestock has been proven. This bacterium has been isolated from the contents of the cecum, liver and duodenum of laying and broiler poultry, as well as from the contents of the digestive system and bile ducts in human cases of gastro-intestinal inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate *Helicobacter pullorum* infection in broiler poultry with symptoms of enteritis referred to one of the poultry clinics in Tabriz city. For this purpose, 70 samples of cecal contents and 70 liver samples from 14 broiler flocks were evaluated using bacterial culture and PCR (Polymerase Chain Reaction) methods. Based on the findings, 10 cecal content samples from 2 different herds were positive for the presence of *Helicobacter pullorum* bacteria in culture and molecular PCR tests, while none of the liver samples were positive in this respect. Considering the role of *Helicobacter pullorum* in causing mortality and damages in poultry farms and its related economic importance and the possibility of causing secondary carcass contamination during the slaughter due to presence of the bacterium in the digestive system of poultry as well as the zoonotic nature of the disease, therefore the above bacterium should always be considered as a health risk factor threatening the health of consumers.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Broiler chicken, Caecum, *Helicobacter pullorum*, Liver, PCR.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1959425.1367

جستجو و شناسایی *هلیکوباکتر پلوروم* در کبد و محتویات سکوم تعدادی از طیورگوشتی ارجاعی به درمانگاه‌های شهر تبریز، با استفاده از روش‌های کشت و PCR

سیدمحمد علوی‌شوشتری[۱]، افشین جوادی[۲*]، غلامرضا زرینی[۳]، حمید میرزائی[۴]، شهرام حنیفیان[۵]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Javadi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۲ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۹/۹)

چکیده

نقش بالقوه *هلیکوباکتر پلوروم* به‌عنوان عامل نوظهور ایجاد عفونت غذایی و یک بیماری مشترک بین انسان و دام ثابت شده‌است. این باکتری از محتویات سکوم، کبد و دوازدهٔ طیور تخم‌گذار و گوشتی و همچنین از محتویات دستگاه گوارش و مجاری صفراوی در موارد بیماری‌های التهاب معده‌ای – روده‌ای انسان، جدا شده است. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی آلودگی به *هلیکوباکتر پلوروم* در طیور گوشتی دارای علائم آنتریت ارجاعی به یکی از کلینیک‌های طیور سطح شهر تبریز بود. بدین منظور، تعداد ۷۰ نمونه محتویات سکوم و ۷۰ نمونه کبد مربوط به ۱۴ گله جوجه‌گوشتی با استفاده از روش‌های کشت باکتریایی و PCR (Polymerase Chain Reaction) مورد ارزیابی قرارگرفت. بر اساس یافته‌ها، تعداد۱۰ نمونه از محتویات سکوم مربوط به ۲ گله متفاوت، در آزمایشات مربوط به کشت و نیز آزمون مولکولی PCR، از نظر وجود باکتری *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت بودند، درحالی‌که هیچ‌یک از نمونه‌های کبد از این نظر مثبت نبود. با توجه به نقش *هلیکوباکتر پلوروم* در ایجاد تلفات وخسارت در طیور پرورشی و اهمیت اقتصادی مربوطه و جایگزینی آن در دستگاه گوارش طیور و امکان ایجاد آلودگی ثانویهٔ لاشه‌ها در حین عملیات کشتار و نیز زئونوزبودن بیماری مذکور، لذا باکتری فوق به‌عنوان یک عامل خطر بهداشتی تهدیدکننده سلامت مصرف‌کنندگان، همواره مطرح می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: *هلیکوباکتر پلوروم*، PCR، جوجه‌گوشتی، کبد، سکوم.

مقدمه

هلیکوباکتر پلوروم در سال۱۹۹۴ توسط استنلی و همکاران از طیور تخم‌گذار و محتویات سکوم، کبد و دوازده طیور نیمچه گوشتی که دارا و یا فاقد هپاتیت بودند و در موارد انسانی از بیمارانی که دارای بیماری التهاب معده‌ای – روده‌ای بودند، جدا شده‌است. جنس هلیکوباکتر جزو باکتری‌های گرم منفی بوده و *هلیکوباکتر پلوروم* ازگروه هلیکوباکتر آنتروهپاتیک (entrohepatic helicobacter species)، اوره‌آز منفی، غیرهاگ‌زا، فنری شکل و خمیده است که در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس تحت شرایط میکروآئروفیلیک رشد می‌کند (Stanley *et al*., 1994; Hassan *et al*., 2014a). همچنین باکتری مذکور در دماهای ۲۵ و ۴ و ۱۸- درجه سیلسیوس به‌ترتیب ۱۱ و ۱۴ و ۱۶ ساعت زنده می‌ماند (Basharan Kahraman *et al*., 2016). کلنی‌های آن در محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون اسب، به اندازه نوک سوزن، آبکی، کمی محدب، خاکستری – سفید، آلفاهمولیتیک، فاقد رنگدانه و نیمه‌شفاف است. باکتری دارای ۴-۳ میکرومتر طول و ۰/۰-۳/۵ میکرومتر عرض و کمی خمیده و میله‌ای شکل بوده و دارای یک فلاژل منفرد و تک‌قطبی است. (Stanley *et al*., 1994; Zanoni *et al*., 2007; Jebeli javan, *et al*., 2020).

سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پلوروم* در دستگاه گوارش و کبد طیور حضور دارند. بعضی سویه‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش، مجاری صفراوی و محوطه دهانی انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانات نیز یافت می‌شوند (Stanley *et al*., 1994; Ceelen *et al*., 2006; Zanoni *et al*., 2007). قابلیت زئونوز بودن *هلیکوباکتر پلوروم* که باعث ایجاد اسهال و بیماری‌های مزمن کبدی در انسان می‌شود، به‌وسیله محققین متعددی مطرح شده است (Stanly *et al*., 1994; Steinbrueckner *et al*., 1997; Atabay *et al*., 1998; Fox *et al*., 1998; Ceelen *et al*., 2005). در مطالعه‌ای ۳۳/۶ درصد از نمونه‌های سکوم و ۳۱/۸ درصد از نمونه‌های کولون و ۱۰/۹ درصد از نمونه‌های ژوژنوم و ۴/۶ درصد از نمونه‌های کبد جوجه‌های گوشتی از نظر وجود *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت بودند (Ceelen *et al*., 2006). سیلن و همکاران در سال۲۰۰۶ و نیز سیلن و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که *هلیکوباکتر پلوروم* به موکوس دستگاه گوارش چسبیده و به‌طور متناوب در سکوم و روده جوجه‌های گوشتی مستقر و ارتباط تنگاتنگی با اپیتلیوم سطحی بافت روده دارد که سبب ترشح مداوم آن به داخل مدفوع می‌شود (Ceelen *et al*., 2006; Ceelen *et al*., 2007). همچنین محققان گزارش کرده‌اند که این باکتری به مخاط دستگاه گوارش چسبیده و بعد از ورود به ماکروفاژهای مورین، دارای قابلیت وادارکردن سلول به تولید اکسید نیتریک می‌باشد.

واکنش متقابل بین باکتری *هلیکوباکتر پلوروم* با ماکروفاژهای میزبان همچنین باعث تحریک ترشح سایتوکین‌های پیش‌التهابی نظیر TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha)، IL-1β (Interlukin-1 beta)، IL-6 (Interlukin-6) و MIP-2 (Macrophage Inhibitor Potentiator Protein-2) می‌شود (Parente *et al*., 2016).

محققان علاوه بر روش کشت میکروبی، از روش مولکولی با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی برای

ردیابی ژن 16S rRNA *هلیکوباکتر پلوروم* با محصولی به اندازه ۴۴۷ جفت باز، جهت شناسائی و تائید باکتری فوق سود برده‌اند (Stanley *et al*., 1994; Zanoni *et al*., 2007; Jebeli javan, *et al*., 2020). اسید نوکلئیک *هلیکوباکتر پلوروم* در نمونه‌های مدفوع جوجه‌های گوشتی که به‌طور تجربی به باکتری آلوده شده‌بودند وجود داشته و این امر نشان‌دهنده این است که محل اصلی استقرار باکتری مذکور، سکوم بوده و به داخل مدفوع ترشح می‌شود. لذا *هلیکوباکتر پلوروم* به‌عنوان عامل آلودگی متقاطع سطح لاشه‌ها طی فرآیند کشتار مطرح شده و می‌تواند به‌عنوان یک منبع ایجاد عفونت برای انسان مطرح باشد. البته اختلاف آشکار میزان آلودگی لاشه طیور در مطالعات مختلف مربوط به آلودگی متقاطع لاشه‌ها با محتویات سکوم در طول عملیات کشتار می‌باشد، هرچند آلودگی سطح لاشه طیور ممکن است طی حمل و نقل به کشتارگاه نیز حاصل شود (Ceelen *et al*., 2007). بنا به گزارشی، ۷۶/۴ درصد از محتویات سکوم بوقلمون‌های نمونه‌برداری شده در کشتارگاه از نظر وجود *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت بودند (Zanoni *et al*., 2011). *هلیکوباکتر پلوروم* همچنین از سکوم، کبد، کیسه زرده و کیسه‌های هوایی جوجه‌هایی که بطور تجربی به باکتری مذکور آلوده شده‌بودند و جوجه‌های تلف شده، جنین‌های تلف شده، پرده‌های جنینی و مایعات جنینی و تخم‌مرغ‌های جنین‌دار آلوده، جدا شده‌است. همچنین جدایه‌های *هلیکوباکتر پلوروم* به عنوان عامل تلفات ۳۳/۳ درصد از جوجه‌های دارای اسهال که بصورت تجربی آلوده شده‌بودند، مطرح شده و تمامی جنین تخم‌مرغ‌هایی که بصورت تجربی به باکتری فوق آلوده شده‌بودند، ظرف مدت ۴۸ ساعت پس از تلقیح باکتری در کیسه زرده، تلف شدند (Hassan *et al*., 2014). *هلیکوباکتر پلوروم* از ۴ نمونه از ۱۷نمونه گوشت مرغ گرم هم جدا شده‌است (Borges*et al*., 2015). همچنین باکتری فوق از ۲۰ درصد نمونه‌های محتویات تخم‌مرغ و ۱۱/۶ درصد از پوسته تخم‌مرغ‌ها جدا شده‌است (Galal Abdel hameed and Sender, 2015). البته در برخی موارد هم مشاهده شده که نمونه‌ها در آزمایش PCR مثبت بوده ولی در روش‌های جداسازی میکروبی، *هلیکوباکتر پلوروم* جدا نشده‌است (Ceelen *et al*., 2007).

با توجه به اهمیت باکتری *هلیکوباکتر پلوروم* به‌عنوان عامل بیماری، تلفات و خسارت در گله‌های طیور پرورشی و نیز زئونوز بودن آن و تهدید بهداشت غذایی از طریق آلودگی لاشهٔ طیور استحصالی در کشتارگاه‌های طیور، به باکتری مذکور، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، جستجو و شناسائی *هلیکوباکتر پلوروم* در کبد و محتویات سکوم جوجه‌های گوشتی تعدادی از مرغداری‌های صنعتی استان آذربایجان‌شرقی بود.

مواد و روش‌ها

- **نمونه برداری**: در مطالعه توصیفی مقطعی (cross sectional) حاضر، در بازه زمانی مرداد تا اسفند سال ۱۳۹۹، تعداد ۷۰ نمونه محتویات سکوم و ۷۰ نمونه کبد، از نیمچه‌های ۱۴ گله مختلف طیور گوشتی استان آذربایجان‌شرقی (در مجموع تعداد ۱۰ نمونه از هرگله) که مبتلا به آنتریت بوده و به یکی از کلینیک‌های طیور سطح شهر تبریز ارجاع داده شده بودند، به‌صورت

نمونه‌گیری غیرتصادفی هدفمند (non randomized purposive sampling) تهیه گردید. بدین منظور پس از این‌که کبد و سکوم هر پرنده جدا می‌شد، بلافاصله دو سرسکوم بوسیله نخ نایلونی مسدود شده و هر یک از نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی استریل مجزا قرار گرفته و بلافاصله در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز منتقل می‌گردید. در ادامه در آزمایشگاه، ابتدا سطح خارجی نمونهٔ محتویات سکوم با استفاده از الکل اتیلیک ضدعفونی شده و به دو قسمت مساوی تقسیم و یک قسمت از آن به‌صورت استریل جهت کشت میکروبی و قسمت دیگر به‌صورت استریل در مجاورت یخ‌خشک جهت انجام آزمایش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) به آزمایشگاه بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز انتقال داده می‌شد. در مورد نمونه‌های کبد هم ابتدا نمونه‌ها به ۲ قسمت تقسیم شده و جهت انجام آزمایشات میکروبی و مولکولی، طبق الگوی فوق مورد استفاده قرار می‌گرفت. همچنین لازم به ذکر است که حداکثر ظرف مدت ۱۲ ساعت پس از نمونه‌برداری، کشت میکروبی نمونه‌ها انجام می‌شد.

- **غنی‌سازی اولیه جهت جداسازی *هلیکوباکتر پلوروم* به روش کشت باکتریایی:** ابتدا محلول یک به یک (وزن به حجم) ازنمونه‌ها در محلول فسفات بافر (phosphate buffer solution) تهیه می‌شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده به لوله ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی۴۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی مخلوط ۷/۵ گرم گلوکز (Merck, Germany) ، ۲۵ میلی‌لیتر بولتون براث (Merck, Germany) و ۷۵ میلی‌لیتر خون استریل لیزشده اسب (پارس‌پیوند، تهران، ایران) اضافه می‌گردید. سپس نمونه‌ها همگن شده و پس از انتقال به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تحت شرایط میکروآئروفیلیک (۶ درصد O_2، ۷/۱ درصد CO_2، ۷/۱ درصد H_2، ۷۹/۷ درصد N_2) با استفاده از جار بی‌هوازی و دستگاه آنوکسومات (Mart Microbiology, Netherlands)، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌گردیدند.

-**آزمایش PCR جهت بررسی حضور *هلیکوباکتر پلوروم* در نمونه‌ها:** در مطالعه حاضر از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به منظور تشخیص مستقیم وجود *هلیکوباکتر پلوروم* در نمونه‌های بافتی و تمایز از سایر هلیکوباکترها با استفاده از زوج پرایمر اختصاصی و ردیابی ژن جزء ۱۶S rRNA باکتری مذکور و بر مبنای مشاهده محصولی به اندازه ۴۴۷ جفت باز، طبق توصیف استنلی و همکاران استفاده شد. لازم به ذکر است که توالی سکانس آغازگر رو به‌جلو آن به‌صورت 5/-ATA AAT GGT AGT TGT TGT CAG-3/ و سکانس آغازگر رو به عقب مربوطه، به شکل / GAT-5/TGG CTC CAC TTC ACA-3 طبق توصیف استنلی و همکاران بود که از شرکت تکاپوزیست (تهران- ایران) خریداری و استفاده گردید (Stanley *et al.*, 1994).

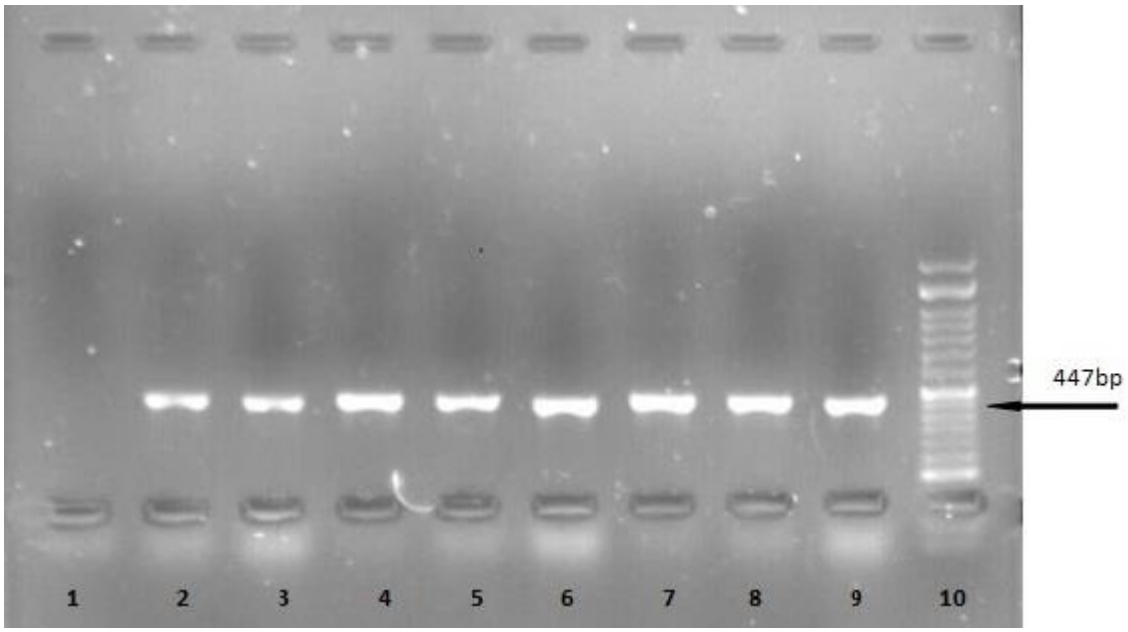
با توجه به این‌که جهت انجام PCR در مورد نمونه‌های مربوط به محتویات سکوم و بافت کبد، ابتدا نیاز به استخراج DNA ژنومی می‌باشد، لذا بدین منظور ۲۵ میلی‌گرم از هر نمونه با استفاده از کیت تجاری استخراجDNA فاورژن (Favorgen,Taiwan) و مطابق

دستورالعمل کیت، استفاده شد. در ادامه در حجم نهایی۱۲/۵میکرولیتر، مخلوط لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، حاوی۶/۲۵ میکرولیتر مسترمیکس Taq2x (Amplicon, Dense, Denmark)، ۲ میکرولیتر DNA الگو (template)، ۰/۷ میکرولیتر از هر پرایمر و ۳/۵۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شد. برنامه چرخه حرارتی برای انجام واکنش PCR هم شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه و متعاقباً ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه و بازپخت مرحله اول در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله دوم در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه اجرا شد. همچنین مرحله بسط (elongation) در دمای۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام گردید. در ادامه مقدار ۳ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد چند منظوره (CinnaGen, Tehran, Iran) به همراه۱/۴میکرولیتر DNA green viewer (Parstous, Mashhad, Iran) تهیه‌شده در۳۰ میلی‌لیتر بافر تریس استات اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید (EDTA) (pH=8) (Merck, Germany) و نیز مقدار ۲ میکرولیتر (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) DNA Ladder 100bp (Smobio, Aachen, Germany) به‌عنوان نشانگر اندازه مولکولی، بارگذاری گردید. سپس عمل الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت در بافر تریس- استات اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید 1x (EDTA) به‌مدت۳۰ دقیقه اجرا گردیده و در نهایت ژل الکتروفورزشده با استفاده از دستگاه قرائت ژل (Uvitec, Cambridge, United Kingdom) بررسی گردید. لازم به ذکر است که در PCR انجام‌گرفته، از آب مقطر دوبار تقطیر، به‌عنوان شاهد منفی استفاده شده‌است.

-کشت میکروبی جهت جداسازی اختصاصی *هلیکوباکتر پلوروم*: در ادامه جهت جداسازی باکتری *هلیکوباکتر پلوروم* و ارزیابی تطابق نتایج آزمایشات کشت میکروبی و مولکولی به عنوان استاندارد طلائی (golden standard)، از نمونه‌هایی که مرحله غنی‌سازی اولیه را طی کرده و در آزمایش مولکولی PCR از نظر وجود *هلیکوباکتر پلوروم*، مثبت بودند، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در فیلتر غشایی سلولزی (Sartorius, England) ریخته و مستقیماً بر روی محیط کشت کلمبیا آگار (Merck, Germany) حاوی ۵ درصد خون گوسفندی (پارس‌پیوند، تهران، ایران) قرار دادیم. سپس محیط مذکور را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط محیط هوازی قرار داده و سپس فیلترها برداشته شده و پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط میکروآئروفیلیک (۶درصد O_2، ۷/۱ درصد CO_2، ۷/۱ درصد H_2، ۷۹/۷ درصد N_2) گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از طی دوره ذکرشده، از کلنی‌های اندازه نوک سوزنی سفید – طوسی رنگ، به مقدار لازم برداشته و با تهیه گسترش میکروبی و انجام رنگ‌آمیزی گرم و بررسی و مشاهده مورفولوژی میکروسکوپیک، باکتری‌های گرم منفی، کمی خمیده و کشیده را انتخاب کرده و آزمایشات افتراقی لازم شامل آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، DNAase، هیدرولیز هیپورات، آلکالین فسفاتاز، احیای نیترات و تولید گاز H_2S در محیط TSI agar را بر روی پرگنه خالص مربوط به آن‌ها انجام دادیم.

یافته‌ها

در آزمایش PCR که در آن از جفت پرایمر اختصاصی ژن 16S rRNA *هلیکوباکتر پلوروم* استفاده شده‌بود، تعداد ۷۰ نمونه از محتویات سکوم و تعداد ۷۰ نمونهٔ کبد، مورد آزمایش قرارگرفت. تعداد ۱۰ نمونه از محتویات سکوم مثبت بودند که شامل ۱۴/۲ درصد از کل نمونه‌ها می‌باشد (۱۰ نمونه از ۷۰ نمونه). لازم به ذکر است که موارد مثبت ذکرشده مربوط به نمونه‌های گله‌های شماره ۱ و شماره ۲ بودند که ۱۴/۲ درصد از گله‌ها را شامل می‌شوند (۲ گله از تعداد کل ۱۴ گله). این درحالی است که تمامی ۷۰ نمونه کبد مورد آزمایش، در آزمایش PCR، منفی بودند. نمونه‌ای از نتایج حاصله از آزمایش PCR در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن 16S rRNA *هلیکوباکتر پلوروم* را نشان می‌دهد که در آن چاهک ۱ حاوی نمونه شاهد منفی، چاهک‌های ۲ تا ۹ حاوی نمونه‌های مثبت واجد باند ۴۴۷ جفت بازی و چاهک ۱۰ هم حاوی سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.

از طرف دیگر نتایج کشت میکروبی پس از طی مرحله غنی‌سازی اولیه، در مورد نمونه‌هایی که در آزمایش مولکولی مثبت تشخیص داده شده‌بودند نیز نشان‌دهنده مثبت بودن تعداد ۱۰ نمونه از ۷۰ نمونهٔ محتویات سکوم بود (شامل ۱۴/۲ درصد نمونه‌های سکوم) که از ۲ گله از مجموع ۱۴ گله بررسی‌شده، جداسازی شدند (۱۴/۲ درصد از کل گله‌ها). در مقابل هیچ‌کدام از نمونه‌های کبد، در کشت میکروبی هم از نظر وجود *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت نبودند. لازم به ذکر است که نتایج کشت میکروبی اعلام‌شده بر اساس خواص مورفولوژیکی و آزمایشات بیوشیمیایی مربوط

به *هلیکوباکتر پلوروم* ارائه‌شده که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

جدول ۱- خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری *هلیکوباکتر پلوروم*

باسیل گرم منفی خمیده	اکسیداز	کاتالاز	اوره‌آز	DNAase	هیدرولیز هیپورات	آلکالین فسفاتاز	احیای نیترات	تولید گاز H_2S در محیط TSI agar
+	+	–	–	–	–	±	+	+

همچنین در نهایت یافته‌های مذکور مشخص کردند که نتایج کشت باکتریایی با نتایج آزمایش مولکولی انجام‌گرفته در تحقیق حاضر منطبق بوده‌است.

بحث و نتیجه‌گیری

هلیکوباکتر پلوروم باکتری گرم منفی است که از طیور گوشتی و تخم‌گذار و موارد انسانی دارای مشکلات گوارشی جدا شده‌است. باکتری مذکور در پرندگان و انسان قدرت ایجاد بیماری داشته و از عوامل بیماری‌های مشترک بین انسان و دام محسوب می‌گردد. وجود آلودگی در مقاطع مختلف پرورش و یا عملیات آماده‌سازی و فرآوری طیور به‌عنوان عامل ایجاد آلودگی ثانویه لاشه و فرآورده‌های طیور مطرح بوده و سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید می‌کند (Stanley *et al*., 1994; Zanoni *et al*., 2007; Borges *et al*., 2015).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، مشخص گردید که ۱۴/۲ درصد از نمونه‌های مربوط به محتویات سکوم جوجه‌های گوشتی دارای علائم آنتریت (۱۰ نمونه از ۷۰ نمونه) و نیز ۱۴/۲درصد (۲ گله از ۱۴ گله) از گله‌های نمونه‌برداری شده، در آزمایش PCR و همچنین کشت میکروبی، از نظر وجود *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت بودند و اما تمامی ۷۰ نمونهٔ کبد در هر دو آزمایش ذکر شده، منفی بودند.

با توجه به نوظهور بودن بیماری ناشی از *هلیکوباکتر پلوروم*، مطالعات محدودی در خصوص بررسی آلودگی به باکتری مذکور، در طیور انجام شده‌است. در این ارتباط بورننس و همکاران در سال ۱۹۹۶ در تحقیقی مشخص کردند که ۴ درصد محتویات سکوم جوجه‌های گوشتی سالم و ۵۰ درصد محتویات سکوم مرغان تخم‌گذار در آزمایش PCR از نظر *هلیکوباکتر پلوروم* مثبت بودند که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر، آلودگی در محتویات سکوم جوجه‌های گوشتی کمتر (۴ درصد نسبت به ۱۴/۲ درصد) و در محتویات سکوم مرغان تخم‌گذار درصد آلودگی بالاتر (۵۰ درصد نسبت به ۱۴/۲ درصد) بوده‌است (Burnens *et al*., 1996). همچنین آتابای و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مطالعه‌ای دریافتند که ۶۰ درصد سکوم‌های منجمد (۹ نمونه از ۱۵ نمونه) و ۶۰ درصد لاشه‌های تازه از دو گله متفاوت آلوده به *هلیکوباکتر پلوروم* بودند که فراوانی آلودگی در سکوم نسبت به نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر (۱۴/۲ درصد)، بیشتر بوده‌است (Atabay *et al*., 1998). سیلن و همکاران هم در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای دریافتند، ۳۳/۶ درصد (۳۷ نمونه از ۱۱۰ نمونه) از نمونه‌های سکوم و ۳۶/۶ درصد (۷ گله

از ۱۱ گلـه) از گلـه‌هـای جوجه‌گوشـتی، آلـوده بـه *هلیکوبـاکتر پلـوروم* بودنـد کـه هـم درصـد آلـودگی محتویات سکوم و هم درصد آلودگی گلـه‌هـا بیشـتر از نتایج به‌دسـت آمـده در مطالعـه حاضـر (۱۴/۲ درصـد) می‌باشـد (Ceelen *et al*., 2006). در مطالعـات دیگـری زانـونی و همکـاران و نیـز پیلـون و همکـاران در سـال ۲۰۰۷ اعلام کردند، ۱۰۰ درصد محتویات سکوم مرغـان تخم‌گـذار و جوجـه‌هـای گوشـتی و نیـز ۷۶/۴ درصـد گله‌های بوقلمون در آزمایش PCR آلوده به *هلیکوبـاکتر پلوروم* تشخیص داده شده‌انـد کـه در مطالعـات مـذکور میزان آلودگی نمونـه‌هـای سـکوم جوجـه‌های گوشـتی بیشتر از نتایج مطالعـه حاضـر (۱۴/۲ درصـد) می‌باشـد (Pilon *et al*., 2007; Zanoni *et al*., 2007). از طـرف دیگر سیلن و همکاران در سال ۲۰۰۶ تعداد ۱۱۰ نمونـه کبد را ابتدا به روش PCR آزمایش کـرده و در ادامـه از نمونه‌های مثبت PCR، کشت میکروبی انجام دادنـد کـه ۴/۶ درصد نمونه‌ها مثبت بودند (Ceelen *et al*., 2006). در مطالعه دیگری که توسط محمد و همکاران در سـال ۲۰۱۰ در مصر صورت گرفته، شیوع *هلیکوباکتر پلـوروم* در نمونه‌های کبد با استفاده از آزمـایش PCR و کشـت میکروبـی بررسـی و آلـودگی۴۷ درصـدی مشـاهده شده‌است (Mohamed *et al*., 2010). در مطالعه دیگری بهرو و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اردبیـل، بـه بررسـی آلودگی نمونه‌های کبد و لاشه طیـور مبـتلا بـه آنتریـت پرداخته و دریافتند که ۳/۵ درصد نمونه‌های کبـد آلـوده به *هلیکوبـاکتر پلـوروم* بودنـد (Behroo *et al*., 2015). حامـادا و همکـاران در سـال ۲۰۱۸ طـی مطالعـه‌ای در مصر، نمونه‌های اخذشده کبد مرغ گوشـتی از کشـتارگاه را مورد مطالعه قرار داده و گزارش کردند که ۶/۶ درصد از نمونه‌ها آلوده بودند (Hamada *et al*., 2018). جـاود و همکاران در سال ۲۰۱۹، طی مطالعه‌ای در پاکستان بـا استفاده از روش کشت میکروبی و آزمون‌های شـیمیایی، به بررسی آلودگی ۷۸ نمونه کبد به *هلیکوبـاکتر پلـوروم* پرداختند که ۹۱ درصد نمونه‌ها مثبت بودنـد (Javed *et al*., 2019). جبلـی و همکـاران در سـال ۲۰۲۰، در مطالعه‌ای شیوع آلـودگی بـه *هلیکوبـاکتر پلـوروم* را در نمونه‌های کبد عرضه‌شده در سطح شهر سمنان بـا روش کشت میکروبی و PCR بررسی کردند که نتـایج مطالعـه آن‌ها حاکی از آلودگی ۲۲ درصدی بـود (Jebeli javan *et al*., 2020). ملاحظـه مـی‌گـردد کـه میـزان آلـودگی به‌دسـت‌آمـده در نمونـه‌های کبـد در مطالعـات اخیـر ذکرشده، بیشتر از نتـایج حاصـله در ایـن خصـوص در مطالعه حاضر بـوده، چـراکـه در پـژوهش مـا، بـا روش کشـت میکروبـی، از هیچ‌یـک از نمونـه‌هـای کبـد، *هلیکوباکتر پلوروم* جدا نشد و نتیجه آزمایش PCR نیـز در مورد آن‌ها منفـی بـود. البتـه از طرفـی هـم بـه نظـر می‌رسد که نتایج حاصله از بررسی آلودگی کبد طیور، تا حدود زیادی هم‌سو با یافته‌های سایر محققین می‌باشـد، چرا کـه در اکثـر مطالعـات ذکرشـده در بـالا، ملاحظـه می‌گردد که میزان آلودگی کبد در مقایسـه بـا محتویـات سکوم، به مراتب کمتر بوده‌است.

به‌نظر می‌رسد عوامل مختلفی مـی‌تواننـد در بـروز اختلاف در نتایج بـه‌دسـت آمـده در تحقیقـات فـوق و یافته‌های پژوهش حاضر، دخالت داشته‌باشـند. بـه‌طـور مثال در استفاده از نمونـه‌های تـازه بـه‌جـای نمونـه‌های منجمد، احتمال جداشـدن بـاکتری *هلیکوبـاکتر پلـوروم* بیشتر می‌باشد و نیز دمای انجمـاد یـا دمـای بسـیار بـالا باعث از بین رفتن و مرگ باکتری می‌گردد (Takano *et*

al., 1979). همچنین نوع محیط کشت انتخابی، ترکیبات استفاده‌شده در آزمایش PCR و محیط‌های کشت باکتریایی، مخصوصاً مکمل مورد استفاده در محیط کشت (خون لیزشده اسب و پلی‌میکسین B) و شرایط گرمخانه‌گذاری، از جمله انجام در دمای محیط و شرایط هوازی، در میزان موفقیت و درصد جداسازی باکتری مذکور تاثیر دارند (Ceelen *et al*., 2006; Akhlaghi *et al*., 2021). همچنین استفاده از فیلترهای سلولزی نیز با حذف باکتری‌های رقیب، به‌عنوان عامل بهبوددهنده بازیابی و حیات باکتری فوق مطرح می‌باشند (Zanoni *et al*., 2007; Zanoni *et al*., 2011; Borges *et al*., 2015; Basharan Kahraman *et al*., 2016).

مطالعه حاضر وجود آلودگی به *هلیکوباکتر پلوروم* را در گله‌های گوشتی تائید می‌کند و نیز مشخص کرد که روش کشت استفاده‌شده با استفاده از فیلتر غشایی، روشی مناسب برای جداسازی باکتری مذکور از محتویات سکوم و کبد بوده و از طرفی هم آزمایش PCR به عنوان روشی دقیق و حساس و مورد اطمینان برای تأیید قطعی این عامل بیماری‌زا می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد. لذا در تحقیقات مربوط به بررسی آلودگی گله‌ها، جایگزینی روش‌های سریع‌تر و دقیق‌تر همانند PCR بجای روش‌های قدیمی و سنتی کشت میکروبی که زمان‌بر و هزینه‌بر می‌باشند، پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

اطلاعات ارائه شده در مقاله حاضر، از نتایج رساله دکترای تخصصی (کد رساله: ۱۰۲۳۲۳۲۷۵۴۲۲۵۶۸۴۸۰۰۴۱۶۲۶۴۵۶۸۲) نویسنده اول استخراج شده‌است. همچنین نویسندگان از زحمات آقای دکتر به‌آذین‌رخشان که در امر نمونه‌برداری و خانم مهندس امامی که در انجام آزمایشات مولکولی، و آقای دکتر رضایی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بابت همکاری و کمک شایانی که داشتند، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آورند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع‌ای ندارد.

منابع

- Akhlaghi, H., Emadi chashmi, S.H. and Jebeli javan, A. (2021). Development of a noval and specialized cultivation method for isolating Helicobacter pullorum from chichken meat. Iranian journal of veterinary research, Shiraz University, 74(1): 76-80.
- Atabay, H.I., Corry, J.E.L. and On, S.L.W. (1998). Identification of unusual Campylobacter- Like isolates from poultry products as Helicobacter pullorum. Journal of Applied Microbiology, 84(6): 1017-1024.
- Basharan Kahraman, B., Metiner, K., DirenSigirci, B., Chelik, B., Adiguzel, M.C., Bagcigil, A.F., *et al.* (2016). The effect of different storage temperatures and times on the viability of Helicobacter pullorum. Kafkas University Veterinary Journal, 22(3): 457-459.

- Behroo, sh., Javadi, A. and Rad, M.G. (2015). Helicobacter pullorum prevalence in patients with gastroenteritis in humans and chicken in the provience of Ardabil in 2014. Indian Journal of Fundamental Applied Life Science, 5(2): 87-94.
- Borges, V., Santos, A., Correia, C.B., Saraiva, Menard, A., Vierira, L., Sampaio, D.A., *et al*. (2015). Helicobacter pullorum isolated from fresh chicken meat. Antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogene. Applied and Envronmental Microbiology, 81(23): 8155-8163.
- Burnens, A.P., Stanly, J. and Nicolet, J. (1996) Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms. New York: Springers Sciences and Businness Media, pp: 291-293.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Verschaegen, G., Ducatelle, R. and Haesebrouc, K.F. (2005). Prevalance of Helicobacter pullorum among Patients with Gastrointestinal diseases and clinically healthy persons. Journal of Clinical Microbiology, 43(6): 2984-2986.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Van Den Bulck, K., On, S.L.W., Baele, M., Ducatelle, R., *et al*. (2006). Helicobacter pullorum in chickens, Belgium. Emerging Infectious Diseases, 12(2): 263-267.
- Ceelen, L.M., Decostere, A., Chiers, K., Ducatelle, R., Maes, D. and Haesebrouck, F. (2007). Pathogenesis of Helicobacter pullorum infection in broilers. International Journal of Food Microbiology, 116(2): 207-213.
- Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Shen, Z., Feng, Y., Taylor, N.S., Paster, B.J., *et al*. (1998). Hepatic Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. Gastroenterology, 114(4): 775-763.
- Galal Abdel Hameed, K. and Sender, G. (2011). Prevalence of Helicobacter pullorum in Egyptian hens eggs and in vitro susceptibility to different antimicrobial agents.Animal Science Papers and Reports, 29(3): 257-264.
- Hamada, M., Elbehiry, A., Marzouk, E., Moussa, I.M., Hessain, A.M., Alhaji, J.H., *et al*. (2018). Helicobacter pylori in a poultry slaughterhouse: prevalence, genotyping and antibiotic resistance pattern. Saudi journal of biological science, 25(6): 1072-1078.
- Hassan, A.K., Shahata, M.A., Refaie, E.M. and Ibrahim, R.S. (2014). Pathogenicity testing and antimicrobial susceptibility of Helicobacter pullorum isolates from chicken origin. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2(1): 72-77.
- Jamshidi, A., Bassami, M.R., Salamati, H. and Mohammadi, S. (2014). Isolation and identification of Helicobacter pullorum from cecal content of broiler chickens in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 15(2): 179-182.
- Javed, K., Gul, F., Abbasi, R., Zaidi, R.A., Noreen, Z., Bokhari, H., *et al*. (2019). Prevalence and role of type six secretion system in pathogenesis of emerging zoonotic pathogen Helicobacter pullorum from retail poultry. Avian Pathology, 48(6): 557-563.
- Jebeli javan, A., Emadi chashmi, S.H., Staji, H. and Akhlaghi, H. (2020). Comparison of culture and PCR method in prevalence of Helicobacter pullorum isolated from chicken liver samples and determination of antibiotic resistance profile of the isolates. Journal of Veterinary Microbiology, 16(2): 73-83.
- Mohamed, M., Ragab, I., Shahata, M.and EI-Refaie, M. (2010). Helicobacter pullorum among poultry in ASSIUT Egypt: Genetic Characterization,Virulence and MIC. International Journal of Poultry Science, 9(6): 521-526.
- Parente, M.R., Monteiro, J.T., Martins, G.G. and Saraiva, L.M. (2016). Helicobacter pullorum induces nitric oxide release in murine macrophages that promotes phagocytosis and killing. Microbiology, 162(3): 503-512.
- Pilon, C., Prouzel-Mauleon, V., Menard, A. and Megraud, F. (2005). Development of a real-time quantitative PCR specific to Helicobacter pullorum. Thirteenth international workshop on Campylobacter, Helicobacter and related organisms (CHRO). Abstracts of scientific Presentations, Sep 4-8th, Gold coast, Queensland, Australia, pp: 62.
- Stanly, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., On, S.L.W., Porter, A., *et al.* (1994). Helicobacter

pullorum sp.nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. Microbiology, 140(12): 3441-3449.

- Steele, W.T. and McDermott, S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of campylobacter jejuni from feces. Pathology, 16(3): 263-265.
- Steinbruckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Weiner, S., Rump, G.A., Deissler, W., *et al*. (1997). Isolation of Helicobacter pullorum from patients with enteritis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 29(3): 315-318.
- Takano, M., Yasin, M. and Shibasaki, I. (1979). Bacteriological effects of freezing with chemical agents. Journal of Food Scince, 44(1): 112-115.
- Zanoni, R.G., Rossi, M., Giacomucci, D., Sanguinetti, V. and Manfreda, G. (2007). Ocurrence and antibiotic susceptibility of Helicobacter pullorum from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. International Journal of Food Microbiology, 116(1): 168-173.
- Zanoni, R.G., Piva,S., Rossi, M., Pasquali, F., Lucchi, A., De Cesare, A., *et al*. (2011). Occurrence of Helicobacter pullorum in Turkeys. Veterinary Microbiology, 149(3-4): 492-496.