مقاله اماده انتشار می باشد

بررسی فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های حدت در *کمپیلوباکتر ژژونای* جداشده از گوشت دام و طیور عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های حدت در *کمپیلوباکتر ژژونای*

علی بهنیا[1]، سیدمجید هاشمی [2*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: majidhashemi54@gmail.com

(دریافت مقاله: // پذیرش نهایی: //)

مقدمه

کمپیلوباکتریوزیس یک بیماری شایع گوارشی در سراسر جهان است. *کمپیلوباکتر ژژونای* در کشورهای صنعتی نیز بر سلامت عمومی تأثیر می‌گذارند، لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ژن‌های حدت در *کمپیلوباکتر ژژونای* جداشده از گوشت دام و طیور عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد بود. ابتدا ۲۷۲ نمونه گوشت و مرغ به‌صورت تصادفی از بازار عرضه این محصولات از شهرستان شهرکرد گردآوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد، سپس توسط روش‌های استاندارد جهت ردیابی آلودگی‌ها، فراوانی ژن‌های حدت به روش Multiplec PCR و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها اقدام شد. نتایج نشان داد میانگین آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای* در نمونه‌ها ۵۳/۶۸ درصد بود. به‌این‌ترتیب ۴۳ نمونه (۶۳/۲ درصد) برای گوشت مرغ بسته‌بندی‌شده، ۴۸ نمونه (۷۰/۶ درصد) گوشت مرغ بدون بسته‌بندی از ۱۰۰ نمونه گوشت تازه بدون بسته‌بندی ۳۴ نمونه (۳۴ درصد) و از ۳۶ نمونه گوشت چرخ شده، ۲۳ نمونه (۶۳/۹ درصد) آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونای* بودند. بیشترین و کمترین فراوانی ژن در گوشت چرخ شده به *flaA* ، ۶۵/۲ درصد و *cadF* با ۱۳ درصد بود. نتایج ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت مربوط به سیپروفلوکساسین ۹۷/۹۴ درصد و کمترین مقاومت مربوط به امی‌پنم ۹/۵۸ درصد بود. نتایج این پژوهش نشان داد انواع گوشت‌ها می‌توانند از مخازن آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای* باشند که رعایت اصول بهداشتی در کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه می‌تواند کمک فزاینده‌ای به کاهش و یا حذف آلودگی کند.

واژه‌های کلیدی: کمپیلوباکتر ژژونای، گوشت دام، گوشت طیور، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های حدت

مقدمه

تولید گوشت در گذر ۵۰ سال پیشین، چندین برابر شده است. میانگین مصرف گوشت در کشورهای شمال اروپا فراتر از ۱۰۰ گرم در روز است که مصرف سالانه، به بیش از ۳۶ کیلوگرم می‌رسد، مصرف گوشت نشانه ثروت در کشورها است و در عین حال ثابت شده است که استفاده بیش‌ازحد گوشت ارتباط تنگاتنگی با سرطان دستگاه گوارش دارد (Farvid *et al.*, 2021). گوشت سفید (مرغ و بوقلمون) از جایگزین‌های گوشت قرمز بوده که دارای چربی و آهن پائین‌تری است؛ با این حال بررسی‌های سیستماتیک موجود بر اساس مطالعات کوهورت (Cohort Studies) نشان می‌دهد که گوشت سفید ممکن است از مرگ‌ومیر ناشی از سکته و سرطان جلوگیری کند (Lupoli *et al.*, 2021). مصرف گوشت قرمز و سفید به‌صورت ناپخته یا کم‌پخت می‌تواند پدیدآورِ عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی باشد؛ چرا که این مواد غذایی به‌صورت طبیعی از مخازن میکروارگانیسم‌های پاتوژن هستند. عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت که گوشت می‌تواند از عوامل انتقال آن‌ها باشد، شامل: *کلستریدیوم* (*Clostridium*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *اشرشیاکلای* (*Escherichia coli*)، *سالمونلا* (*Salmomella*)، *پسودوموناس* (*Pseudomonas*)، *کمپیلوباکتر* (*Campylobacter*)، *لیستریا مونوستیوژنز* (*Listeria monocytogenes*) و *یرسینیا انتروکولیتیکا* (*Yersinia enterocolitica*) هستند (Eriksson *et al.*, 2023)، که یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های پاتوژن، *کمپیلوباکتر*ها است.

گونه‌های *کمپیلوباکتر* از پاتوژن‌های مشترک بین انسان، دام و پرندگان هستند که باعث رخداد طیف گوناگونی از بیماری‌های گوارشی می‌شوند. کمپیلوباکتریوزیس شایع‌ترین بیماری مشترک انسان و دام در اتحادیه اروپا و یکی از بیماری‌های باکتریایی منتقل‌شونده از غذا در ایالات‌متحده است. در میان گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر، *کمپیلوباکتر ژژونای* و *کمپیلوباکترکولای* فراوان‌ترین هستند. مطابق گزارش‌های تأیید شده در اتحادیه اروپا در سال ۲۰۲۱، ۸۸/۴ درصد عفونت‌های غذایی کمپیلوباکتر، مربوط به *کمپیلوباکتر ژژونای*، ۱۰/۱ درصد توسط *کمپیلوباکتر کولای* و ۱/۵ درصد توسط سایر گونه‌های *کمپیلوباکتر* رخ‌داده است (Authority, 2023).

گونه‌های *کمپیلوباکتر* از پراکنشِ پیرامونیِ گسترده‌ای برخوردار هستند. آن‌ها میکروآئروفیل، متحرک، مارپیچی، گرم-منفی، میله‌ای یا منحنی‌شکل هستند که در گستره‌ی pH بین ۶/۵ تا ۷/۵ و گرمای ۳۸ تا ۴۷ درجه سلسیوس رشد می-کنند؛ و قادر به رشد در گرمای پائین‌تر از ۳۰ درجه سلسیوس نیستند، چرا که ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین، که در سازگاری با دماهای پایین نقش دارند، در گونه‌های *کمپیلوباکتر* وجود ندارند. بهینه Aw رشد ۰/۹۸۷ و حداکثر تاب-آوری در غلظت ۲ تا ۴ درصد نمک بوده که جزو باکتری‌های حساس به حضور نمک هستند (Liao *et al.*, 2022).

کمپیلوباکتر ژژونای، پاتوژن مهم انسانی است که به‌عنوان عامل اصلی گاستروانتریت باکتریایی در نظر گرفته می‌شود. خوردن غذاهای آلوده به این پاتوژن، مایه‌ی پدیداریِ نشانه‌های بیماری، شامل اسهال خفیف تا شدیدِ خودمحدود-شونده‌یِ همراه با تب، حالت تهوع و گرفتگی شکم می‌شود که معمولاً بهبود این علائم به یک هفته زمان نیاز دارد؛ از دیگر پیشامدهایِ این پاتوژن می‌توان به میوکاردیت (التهاب عضله قلب)، عدم تعادل گونه‌های میکروبی و کاهش تنوع میکروبی در میکروبیوم‌های روده (Dysbiosis)، سندرم روده تحریک‌پذیر (Irritable Bowel Syndrome) و سندرم

گیلن باره (Guillain-Barre Syndrome) اشاره کرد (Tikhomirova *et al.*, 2024). عفونت‌های شدید یا سیستمیک در گروه‌های پرخطر، ازجمله زنان باردار، کودکان کمتر از ۵ سال، افراد ۶۵ سال و بالاتر و افرادی با سیستم ایمنی ضعیف رخ می‌دهد که در موارد شدید، درمان ضدمیکروبی اغلب ضروری است. فلوروکینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین) و ماکرولیدها (مانند اریترومایسین) معمولاً برای درمان ناخوشایندی‌های ناشی از این پاتوژن استفاده می‌شوند (Graham *et al.*, 2024).

گزارش‌هایی از ناکارآمدیِ طیفِ بزرگی از آنتی‌بیوتیک‌ها در بهبود بیماری‌های ناشی از عفونت‌های کمپیلوباکتریوز در کشورهای پیشرفته و در حال پیشرفت وجود دارد. مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از دلایل آن است (Dramé *et al.*, 2020)، که این امر، بستر و زمینه‌یِ پایش آلودگی به *کمپیلوباکتر* در مواد غذایی و بررسی چگونگی مقاومت آنتی-بیوتیکی را بیش‌ازپیش پراهمیت می‌سازد؛ بنابراین با توجه به مخاطرات یادشده، هدف از پژوهش پیش‌رو، بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های حدت *کمپیلوباکتر ژژونای* در گوشت دام و طیور عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد بود.

مواد و روش‌ها

-نمونه‌گیری

در گام نخست با توجه به میانگین شیوع حدود ۲۳ درصدی کمپیلوباکتر ژژونای تعداد نمونه‌ها، ۲۷۲ مورد گزینش شد(Sadeghi *et al.*, 2020).

نمونه‌گیری استوار بر الگوی تصادفی که شامل ۱۳۶ نمونه گوشت (۱۰۰ نمونه تازه و ۳۶ نمونه چرخ شده بدون بسته‌بندی) و ۱۳۶ نمونه مرغ (۶۸ نمونه تازه دارای بسته‌بندی و ۶۸ نمونه بدون بسته‌بندی) بود و از بازار فروش این محصولات، در شهرکرد گردآوری و جهت تعیین میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای، ژن‌های حدت* و مقاومت آنتی-بیوتیکی در شرایط سترون به آزمایشگاه منتقل شدند. تا هنگام آغاز پایش، نمونه‌های گوشتی در سرمای ۴-۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

-*روش جستجوی کمپیلوباکتر*

به‌منظور غنی‌سازی، ابتدا ۱ گرم از هر نمونه وزن و پس از قرار دادن در داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه بافری استریل (Mirmedia, Iran) (رقت ۰/۱) و ورتکس مناسب، در گرمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از سپری شدن این مدت، رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-7} آماده‌شده و ۰/۱ میلی‌لیتر آن بر روی محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار (Campylobacter Selective Agar) (Mirmedia, Iran) حاوی مکمل آنتی‌بیوتیکی *کمپیلوباکتر* کشت سطحی داده شد. پس از گذر زمان ۴۸ ساعت از گرمخانه‌گذاری، پلیت‌هایی که در آن کلنی باکتری رشد کرده بودند، جداسازی و ازنظر رنگ‌آمیزی گرَم و تست حرکت بررسی شدند، در صورت مشاهده باکتری به شکل باسیل خمیده، گرم منفی و متحرک، آزمون‌های بیوشیمیائی همچون کاتالاز و اکسیداز روی هر پرگنه انجام شد. مثبت بودن آزمون‌های یادشده بر روی کلنی‌های مورد آزمایش، به‌منزله‌ی محتمل بودن حضور *کمپیلوباکتر*

بود. در ادامه به‌منظور خالص‌سازی، کلنی‌ها چندین بار بر روی محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار (Mirmedia, Iran) به‌صورت ایزوله کشت داده شدند. پلیت‌ها در داخل جار بی‌هوازی با گازپک نوع C به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و به‌منظور تأیید خلوص رنگ‌آمیزی گرم شدند (Ramarao *et al*., 2020, Cossettini *et al*., 2022).

-استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت Bactokia ذکرشده توسط شرکت سازنده (Kiagene-Iran) انجام شد. سپس به‌منظور ارزیابی کمیت DNA به‌دست‌آمده، میزان جذب نوری آن‌ها با استفاده از نانو دارپ و در طول‌موج‌های ۲۸۰ و260 نانومتر تعیین گردید. طول‌موج ۲۶۰ نشان‌دهنده میزان جذب نوری DNA و طول‌موج ۲۸۰ نشان‌دهنده میزان جذب نوری پروتئین در نمونه‌های استخراج‌شده است که مقدار قابل‌قبول در محدوده ۱/۸-۲/۲ است (Vizzini *et al*., 2021).

-آزمون PCR

حضور جنس *کمپیلوباکتر* در نمونه با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *16s rRNA* بررسی شد. در نمونه‌هایی که ازنظر جنس *کمپیلوباکتر* مثبت شدند؛ تعیین گونه نیز با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی ژن اکسیدوردوکتاز *کمپیلوباکتر ژوژنای* انجام گرفت. پرایمرهای اختصاصی به‌صورت F: GGAAAATCAAATAAAGTTAGAGGTAGAA و R: CCATAAGCACTAGCTAGCTGATTATC با اندازه آمپلیکون ۱۶۷ جفت باز و دمای اتصال ۵۶ درجه طراحی شدند.

همچنین حضور ژن‌های*flaA* ، *mapA*، *hipO*، و *cadF* از طریق پرایمر اختصاصی ژن موردبررسی قرار گرفتند (جدول ۱). ترکیبات لازم جهت انجام PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر به ترتیب شامل ۱۳ میکرولیتر آب مقطر، ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon-Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای Forward و Revers (Sinaclon-Iran) و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. برنامه حرارتی مورداستفاده شامل یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و درنهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام PCR، محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل در مرحله ساخت ژل با DNA safe stain صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه Gel documentation (UVI tech, UK) و در زیر نور فرابنفش رویت و عکس آن تهیه شد (Marimuthu *et al*., 2022).

جدول (۱)- لیست پرایمرهای *کمپیلوباکتر ژژونای* در پژوهش حاضر

هدف	توالی پرایمر (۳-۵)	اندازه محصول	منبع
16s rRNA	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۰۰	(Shams *et al*., 2017)

flaA	TCTGCTAAGGCTCCAAGT CTCAAGCGGCTCAAGATG	۳۶۷	(Marimuthu *et al*., 2022)
mapA	CTTGCTTGGTACGGATTG CTTGTGAAAGTCCTGGTG	۴۲۹	
hipO	TCCGAAGAAGCCATCATC GTGGTGCTAAGGCAATGA	۱۳۶	
cadF	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۰۰	(Barakat *et al*., 2020)

-مقاومت آنتی‌بیوتیکی

آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط کشت مولرهینتون (Merck, Germany)، به روش Disk Diffusion Method انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: آمپی‌سیلین (AM)، سولفامتوکسازول (SXT)، آموکسی‌کلاو (AMC)، ایمی-پنم (IM)، جنتامایسین (GM)، ریفامپین (RMP)، آمیکاسین (AC)، سیپروفلوکساسین (CIP) و تتراسایکلین (TE)، بودند (Heidarzadi *et al*., 2021).

آنالیزهای آماری

داده‌های حاصل از آزمون‌های انجام‌شده با نرم‌افزارExcel و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ آنالیز شدند. روش آماری تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، آزمون مربع‌کای و فیشر بود.

یافته‌ها

مطابق جدول (۲)، در مورد نمونه‌های گوشت تازه، از ۱۰۰ نمونه گوشت تازه بدون بسته‌بندی ۳۴ نمونه (۳۴ درصد) و از ۳۶ نمونه گوشت چرخ شده، ۲۳ نمونه (۶۳/۹ درصد) آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونای* بوده‌اند. آنالیزهای آماری نشان داد، در مقایسه درصد آلودگی نمونه‌های مختلف با یکدیگر در آزمون کای‌اسکوئر، درصد آلودگی در نمونه‌های گوشت تازه با $p<۰/۰۱$ کمتر از نمونه‌های دیگر بود.

جدول (۲)- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای* در نمونه‌های گوشتی مختلف عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد

	نوع نمونه‌ها				کل
	مرغ بسته‌بندی	مرغ بدون بسته‌بندی	گوشت تازه	گوشت چرخ شده	
تعداد نمونه	۶۸	۶۸	۱۰۰	۳۶	۲۷۲
تعداد آلوده	۴۳	۴۸	۳۲	۲۳	۱۴۶
درصد آلوده	۶۳/۲[a]	۷۰/۶ [a]	۳۴ [b]	۶۳/۹ [a]	۵۳/۶۸

در هر ردیف، اعداد با حروف غیرمشابه، باهم تفاوت معنی‌دار دارند.

مطابق جدول (۳)، بیشترین فراوانی ژن‌های حدت مربوط به ژن‌های *flaA* ، *mapA*، *hipO* و *cadF* بود. به همین ترتیب بیشترین فراوانی ژن در گوشت چرخ شده مربوط به *flaA* ۶۵/۲ درصد و کمترین میزان برای ژن *cadF* در گوشت چرخ شده با ۱۳ درصد بود. در مقایسه فراوانی حضور ژن‌های حدت بین نمونه‌های مختلف در آزمون کای‌اسکور،

درصد حضور ژن *mapA* در نمونه‌های مرغ بسته‌بندی با $p<۰/۰۵$ کمتر از مرغ بدون بسته‌بندی و گوشت تازه و با $p<۰/۰۱$ کمتر از گوشت چرخ شده بود.

جدول (۳)- توزیع ژن‌های حدت در جدایه‌های *کمپیلوباکتر ژژونای* در نمونه‌های مختلف گوشتی عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد

نام ژن	نوع نمونه‌ها (تعداد آلوده) مرغ بسته‌بندی (۴۳)	مرغ بدون بسته‌بندی (۴۸)	گوشت تازه (۳۲)	گوشت چرخ شده (۲۳)	کل (۱۴۶)
flaA	۱۶ (۳۷/۲ درصد)	۲۲ (۴۵/۸ درصد)	۱۲ (۳۷/۵ درصد)	۱۵ (۶۵/۲ درصد)	۸۵ (۵۸/۲ درصد)
mapA	۹ (۲۰/۹ درصد)[a]	۲۰ (۴۱/۷ درصد)[b]	۱۰ (۳۱/۲ درصد)[b]	۱۳ (۵۶/۵ درصد)[b]	۵۲ (۳۵/۶ درصد)
hipO	۸ (۱۸/۶ درصد)	۱۴ (۲۹/۲ درصد)	۷ (۲۱/۹ درصد)	۸ (۳۴/۸ درصد)	۳۷ (۲۵/۳ درصد)
cadF	۹ (۲۰/۹ درصد)	۱۲ (۲۵ درصد)	۱۱ (۳۴/۴ درصد)	۳ (۱۳ درصد)	۳۵ (۲۴ درصد)

در هر ردیف، اعداد با حروف غیرمشابه، باهم تفاوت معنی‌دار دارند.

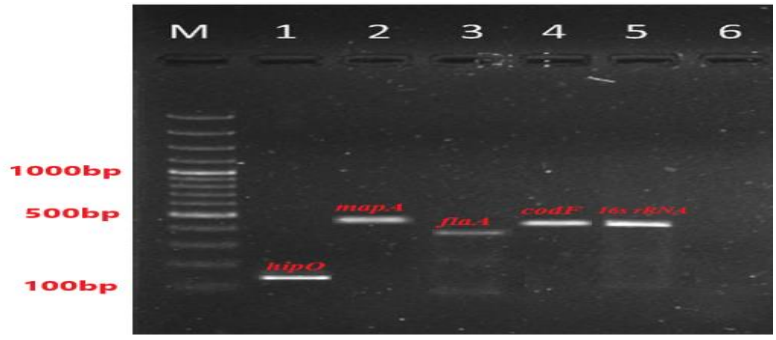
مطابق جدول (۴)، درمجموع مقاومت میکروبی در نمونه‌های آلوده به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف از خانواده‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سیپروفلوکساسین، ۹۷/۹۴ درصد و آمیکاسین، ۹۴/۵۲ درصد بود. همچنین کمترین مقاومت مربوط به ایمی‌پنم، ۹/۵۸ درصد بود.

جدول (۴)- توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونای*

نام آنتی‌بیوتیک	نوع نمونه‌ها (تعداد آلوده) مرغ بسته‌بندی (۴۳)	مرغ بدون بسته‌بندی (۴۸)	گوشت تازه (۳۲)	گوشت چرخ شده (۲۳)	کل (۱۴۶)
AM	۲۲ (۵۱/۱۶ درصد)[a]	۳۲ (۶۶/۶۶ درصد)[b]	۲۰ (۶۲/۵)[b]	۱۳ (۵۶/۵۲ درصد)[ab]	۸۷ (۵۹/۵۸ درصد)
SXT	۲۲ (۵۱/۱۶ درصد)[a]	۲۵ (۵۲/۰۸ درصد)[a]	۱۷ (۵۳/۱۲ درصد)[a]	۱۴ (۶۰/۸۶ درصد)[b]	۷۸ (۵۳/۴۲ درصد)
AMC	۳۹ (۹۰/۷ درصد)[a]	۴۶ (۹۵/۸۳ درصد)[ab]	۳۲ (۱۰۰ درصد)[b]	۲۱ (۹۱/۳ درصد)[a]	۱۳۸ (۹۴/۵۲ درصد)
IPM	۴ (۹/۳ درصد)[a]	۵ (۱۰/۴۱ درصد)[a]	۳ (۹/۳۷ درصد)[a]	۲ (۸/۶۹ درصد)[a]	۱۴ (۹/۵۸ درصد)
GM	۲۰ (۴۶/۵۱ درصد)[a]	۲۳ (۴۷/۹۱ درصد)[a]	۱۲ (۳۷/۵)[b]	۱۰ (۴۳/۴۷ درصد)[a]	۶۵ (۴۴/۵۲ درصد)
RMP	۲۶ (۶۰/۴۶ درصد)[a]	۳۰ (۶۲/۵ درصد)[a]	۲۲ (۶۸/۷۵)[b]	۱۴ (۶۰/۸۶ درصد)[a]	۹۲ (۶۳/۰۱ درصد)
AN	۱۳ (۳۰/۲۳ درصد)[a]	۱۲ (۲۵ درصد)[a]	۱۰ (۳۲ درصد)[a]	۶ (۲۶/۰۸ درصد)[a]	۴۱ (۲۸/۰۸ درصد)
CP	۴۳ (۱۰۰ درصد)[a]	۴۶ (۹۵/۸۳ درصد)[a]	۳۱ (۹۶/۸۷ درصد)[a]	۲۳ (۱۰۰ درصد)[a]	۱۴۳ (۹۷/۹۴ درصد)
TE	۲۲ (۵۱/۱۶ درصد)[a]	۲۵ (۵۲/۰۸ درصد)[a]	۱۶ (۵۰ درصد)[a]	۱۲ (۵۲/۱۷ درصد)[a]	۷۵ (۵۱/۳۶ درصد)

در هر ردیف، اعداد با حروف غیرمشابه، باهم تفاوت معنی‌دار دارند.

شکل (۱)، نشان‌دهنده واکنش PCR در شناسایی ژن 16s rRNA و شیوع ژن‌های flaA، mapA، hipO و cadF *کمپیلوباکتر* در نمونه‌های آلوده بود.



شکل (۱)- واکنش PCR. شیوع آلودگی به ژن‌های حدت *flaA*، *mapA*، *hipO* و *cadF* کمپیلوباکتر در نمونه‌های مختلف. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱: ژن *hipO* (۱۳۶ جفت باز)، چاهک ۲: ژن *mapA* (۴۲۹ جفت باز)، چاهک ۳: ژن *flaA* (۳۶۷ جفت باز)، چاهک ۴: ژن *codF* (۴۰۰ جفت باز)، چاهک ۵: ژن *16s rRNA* (۴۰۰ جفت باز)، چاهک ۶: کنترل منفی.

بحث و نتیجه‌گیری

*کمپیلوباکتر*ها عمدتاً از طریق غذاهای آلوده با منشأ جانوری به انسان منتقل می‌شوند. آلودگی غذا به *کمپیلوباکتر* که میکروارگانیسمی حساس به سرما و گرمادوست است، می‌تواند در هنگام تولید، فرآوری، توزیع و آماده‌سازی در زنجیره‌ی تأمین مواد غذایی رخ دهد. مصرف فرآورده‌های گوشتی ناپخته‌ی آلوده به این پاتوژن به‌عنوان یک عامل خطر برای کمپیلوباکتریوزیس انسانی شناخته‌شده است (Jainonthee *et al.*, 2024). تحرک یکی از عوامل اصلی بیماری‌زایی کمپیلوباکتر است و می‌توان با دستیابی به بیان ژنی، میزان بیماری‌زایی را برحسب تحرک، تا حدودی تشخیص داد. ژن *flaA* با نرخ‌های بالاتری نسبت به *flab* بیان می‌شود و بنابراین برای تحرک کمپیلوباکتر ضروری است؛ پس توانایی *کمپیلوباکتر* برای ایجاد بیماری از طریق ژن‌های کد کننده *flaA*، *mapA*، *hipO* و *cadF* افزایش می‌یابد که دلیل آن، توانایی *کمپیلوباکتر* برای چسبیدن و حمله به سلول‌های اپی‌تلیال روده به‌واسطه حضور ژن‌های یادشده است (Abdallah *et al.*, 2022).

آلودگی گوشت با *کمپیلوباکتر ژژونای* هنگام تهی‌سازی اندرونه در کشتارگاه‌ها یا تماس دست و افزارهای آلوده‌ی کارکنان به *کمپیلوباکتر ژژونای* با انواع گوشت‌های مختلف رخ می‌دهد. در همین راستا، پژوهش پیش‌رو با انگیزه‌ی بررسی فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ژن‌های حدت *کمپیلوباکتر ژژونای* جداشده از گوشت دام و طیور عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد انجام شد که برونداد آن، آلودگی ۵۳/۶۸ درصدی به *کمپیلوباکتر ژژونای*، بیشترین فراوانی ژن در گوشت چرخ شده به *flaA* ۶۵/۲ درصد، کمترین میزان برای ژن *cadF* در گوشت چرخ شده با ۱۳ درصد، بیشترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ۹۷/۹۴ درصد، آمی‌کاسین ۹۴/۵۲ درصد و پنی‌سیلین ۹۱/۰۹ درصد و کمترین میزان مقاومت مربوط به امی‌پنم ۹/۵۸ درصد را در پی داشت.

در پژوهشی در چین روی نمونه‌های گوشتی انجام دادند، میزان آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای* را ۵۷/۵ درصد گزارش دادند که اندکی از نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش فراتر است (Tang *et al.*, 2020). پژوهشی بر روی شناسایی گونه-های *کمپیلوباکتر* در مرغ‌های کشتارگاه‌های جهرم گزارش دادند از ۳۲۸ لاشه مرغ، ۲۱۷ نمونه (۶۶/۲ درصد) آلوده به انواع *کمپیلوباکتر* بودند که ۱۴۶ نمونه (۶۷/۳ درصد) مربوط به *کمپیلوباکتر ژژونای* بود، که با نتایج این پژوهش،

ناسازگار است (Pourahmadi *et al.*, 2022). در پژوهشی که در غرب آفریقا انجام گرفت، گزارش شد از مجموع ۲۵۶ نمونه گوشت مرغ بدون بسته‌بندی، میزان آلودگی *کمپیلوباکتر* ۳۲/۸ درصد بود، که پائین‌تر از نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش در خصوص گوشت مرغ بدون بسته‌بندی (۶۳/۲ درصد) است (Kouglenou *et al.*, 2020). پژوهشی در ایتالیا انجام شد که در آن آلودگی به *کمپیلوباکتر ژژونای* ۵۷/۹۶ درصد در گوشت مرغ فاقد بسته‌بندی گزارش شد و سیپروفلوکساسین (۸۸/۲۵ درصد)، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در بین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها داشته است، که در خصوص میانگین آلودگی به *کمپیلوباکتر* در گوشت مرغ و مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم‌راستا با پژوهش حاضر است (Di Giannatale *et al.*, 2019).

پژوهشی هم‌راستا با پژوهش حاضر در تایوان انجام شد و گزارش دادند که *کمپیلوباکتر ژژونای* ۵۵/۱ درصد جدایه‌های گوشت مرغ را به خود اختصاص داد و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به جدایه سیپروفلوکساسین بود، که هم‌راستا با پژوهش حاضر است (Wei *et al.*, 2024). در پژوهشی هم‌راستا بامطالعه حاضر در تایلند نرخ آلودگی در گوشت مرغ به *کمپیلوباکتر ژژونای* را ۶۳ درصد گزارش دادند که هم‌سو با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر است. (Wangroongsarb *et al.*, 2021). یافته‌های پژوهشی در استرالیا میانگین نرخ آلودگی در انواع گوشت مرغ و گوساله را ۵۳ درصد گزارش داده‌اند، که مطابق با میانگین نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر است (Walker *et al.*, 2019). پژوهشی روی آلودگی به انواع گوشت‌های عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد به کمپیلوباکتر انجام شد که آلودگی گوشت گوساله را ۳۳ درصد و فراوانی ژن *flaA* را ۱۰۰ درصد گزارش دادند، که در خصوص میزان آلودگی هم‌راستا با پژوهش حاضر است، اما در خصوص فراوانی ژن *flaA* (۳۷/۵ درصد) پائین‌تر از پژوهش یادشده است (Rahimi *et al.*, 2024) پژوهشی مروری در جنوب آمریکا و برزیل انجام شد که نشان دادند بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سیپروفلوکساسین نسبت به انواع *کمپیلوباکتر*های جداشده از گوشت بوده است که مطابق با پژوهش حاضر است (Portes *et al.*, 2023).

بالا بودن آلودگی در گوشت مرغ نسبت به گوشت قرمز را می‌توان به دلیل مستقر بودن کمپیلوباکتر در روده‌ی ماکیان و انتقال آن ضمن مراحل کشتار تا عرضه به گوشت دانست و به همین دلیل اطمینان از پخت کامل گوشت مرغ به‌عنوان یکی از بهترین روش‌های جلوگیری از انتقال آلودگی است. سازمان جهانی بهداشت، *کمپیلوباکتر* را در فهرست باکتری‌هایی قرار داده است که آنتی‌بیوتیک‌های جدید و فوری برای آن‌ها موردنیاز است و به دلیل ظهور جهانی سویه‌هایی با سطح بالایی از مقاومت به فلوروکینولون‌ها، آن را به‌عنوان یک پاتوژن با اولویت بالا طبقه‌بندی کرده است؛ فلوروکینولون‌ها داروهای انتخابی در درمان کمپیلوباکتریوز هستند اما با این حال، روند افزایش مقاومت در گونه‌های کمپیلوباکتر جداشده از منشأ انسانی و حیوانی در ایالات‌متحده آمریکا و کانادا (۱۹–۴۷ درصد)، کشورهای اروپایی (۹۹–۱۷ درصد) و آفریقا و آسیا (بیش از ۸۰ درصد) گزارش‌شده است که بر اساس مطالعه‌ای متاآنالیز، مقاومت گونه‌های کمپیلوباکتر جداشده از منشأ انسانی و حیوانی به فلوروکینولون‌ها همچون سیپروفلوکساسین نیز در ایران شایع و از ۰ درصد تا ۸۷/۳ درصد متغیر بوده که جهش‌های ژنتیکی تک نقطه‌ای در DNA مانند جهش C257 T، شایع‌ترین

جهش، در مقاومت فلوروکینولون با واسطه کروموزومی در گونه‌های کمپیلوباکتر می‌توان ذکر کرد (Khademi and Sahebkar., 2020).

با توجه به میانگین به‌دست‌آمده از نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که گوشت‌های خام خرده‌فروشی و کشتارگاه‌ها، عاملی برای انتقال عامل کمپیلوباکتریوز هستند. مقایسه مرغ‌های کشتار شده در کشتارگاه‌های صنعتی و مرغ‌هایی که به‌طور سنتی کشتار می‌شوند، گویای این مطلب است که فرآیند بهداشتی کشتارگاه می‌تواند در حذف یا کاهش *کمپیلوباکتر* در گوشت طیور مؤثر باشد. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت و سایر غذاها به *کمپیلوباکتر* باید جدی گرفته شود و اقدامات بهداشتی در این زمینه ضروری است. تجویز آنتی‌بیوتیک در دام و طیور زیر نظر دامپزشک، در نظر گرفتن زمان اجباری ترک آنتی‌بیوتیک قبل از کشتار و مصرف، اعمال روش کاملاً بهداشتی در زمان کشتار، نظارت دائمی میکروبیولوژیک در کشتارگاه‌ها و لاشه‌ها، جلوگیری از فعالیت کشتارگاه‌های سنتی، آموزش بهداشتی عموم مردم در کشتارگاه‌ها، خرده‌فروشی‌ها، رستوران‌ها و محیط‌های خانگی و پخت کامل گوشت خام می‌تواند در کاهش خطر عفونت *کمپیلوباکتر* مفید باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdallah, M., Abaza, M. A., Fathy, R., Yousesf, G., Sobhy, M., Abdelhamid, H. *et al*. (2022). Detection of Some Virulence and Antibiotic Resistance Genes in Campylobacter jejuni isolated from Poultry and Human. The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 89 (12): 6373-6381.
- Authority E. F. S. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 21.
- Barakat, A. M., Abdelrazik, K. A., Elfadaly, H. A., Rabie, N. S., Sadek, S. A. Almuzaini, A. M. (2020). Prevalence, molecular detection, and virulence gene profiles of Campylobacter species in humans and foods of animal origin. Veterinary World, 13(15): 143-158.
- Cosettini, A., Vidic, J., Maifreni, M., Marino, M., Pinamonti, D. Manzano, M. (2022). Rapid detection of Listeria monocytogenes ,Salmonella, Campylobacter spp., and Escherichia coli in food using biosensors. Food Control, 137(15): 108-119.
- Di Giannatale, E., Calistri, P., Di Donato, G., Decastelli, L., Goffredo, E., Adriano,D., *et al.* (2019). Thermotolerant Campylobacter spp. in chicken and bovine meat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. PLoS One, 14(12): 1-15.

- Dramé, O., Leclair, D., Parmley, E. J., Deckert, A., Ouattara, B., Daignault, D., *et al.* (2020). Antimicrobial resistance of Campylobacter in broiler chicken along the food chain in Canada. Foodborne pathogens and disease, 17(8): 512-520.
- Eriksson, D., Råhlén, E., Bergenkvist, E., Skarin, M., Fernström, L. L., Ryden, J., *et al.* (2023). Survival of Campylobacter jejuni in frozen chicken meat and risks associated with handling contaminated chicken in the kitchen. Food Control, 145(3): 109-119.
- Farvid, M. S., Sidahmed, E., Spence, N. D., Mante Angua, K., Rosner, B. A., & Barnett, J. B. (2021). Consumption of red meat and processed meat and cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. European journal of epidemiology, 36(15): 937-951.
- Graham, A., Hawkins, L., Balasegaram, S., Narasimhan, S., Wain, J., Clarke, J., *et al.* (2024). A decade of Campylobacter and Campylobacter bacteraemias in a district general hospital and the surrounding London and South East region, England. Journal of Infection, 88(1): 15-20.
- Heidarzadi, M. A., Rahnama, M., Alipoureskandani, M., Saadati, D., & Afsharimoghadam, A. (2021). Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. Food Hygiene, 11(2): 81-92. [In Persian]
- Jainonthee, C., Chaisowwong, W., Ngamsanga, P., Meeyam, T., Sampedro, F., Wells, S. J., *et al.* (2024). Exploring the Influence of Slaughterhouse Type and Slaughtering Steps on Campylobacter jejuni Contamination in Chicken Meat: A Cluster Analysis Approach. Heliyon, 10(1): 1-17.
- Khademi, F., & Sahebkar, A. (2020). Prevalence of Fluoroquinolone-Resistant Campylobacter Species in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. International Journal of Microbiology, 2020(1), 8868197.
- Kouglenou, S. D., Agbankpe, A. J., Dougnon, V., Djeuda, A. D., Deguenon, E., Hidjo, M., *et al.* (2020). Prevalence and susceptibility to antibiotics from Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from chicken meat in southern Benin, West Africa. BMC research notes, 13(1): 1-6.
- Liao, Y. S., Chen, B. H., Teng, R. H., Wang, Y. W., Chang, J., Shiu-Yun L., *et al.* (2022). Antimicrobial resistance in Campylobacter coli and Campylobacter jejuni from human campylobacteriosis in Taiwan, 2016 to 2019. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 66(1): 15-29.
- Lupoli, R., Vitale, M., Calabrese, I., Giosuè, A., Riccardi, G., Vaccaro, O. (2021). White meat consumption, all-cause mortality, and cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies. Nutrients, 13(2): 67-76.
- Marimuthu, D., Sekar, M., Gunasaleen, L., Vivekanandan, B., Singaram, B., Raj, G. D. (2022). Sensitivity of Campylobacter jejuni Virulence genes flaA, mapA and hipO by Polymerase chain reaction. Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology, 18(5): 111-114.
- Portes, A. B., Panzenhagen, P., Pereira dos Santos, A. M., Junior, C. A. C. (2023). Antibiotic resistance in Campylobacter: a systematic review of South American isolates. Antibiotics, 12(3): 54-61.
- Pourahmadi, M., Rouhijahromi, R., Moradi, F., Faraji, Z., Farhangzargar, M. Razeghi, B. (2022). Identification of Campylobacter species in Jahrom slaughterhouse chickens in 2016-17. Pars Journal of Medical Sciences, 17(3): 1-6..
- Rahimi, E., Mousavinafchi, S. B., & Shakerian, A. (2024). Isolation, characterization, and antimicrobial resistance profiles of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from raw meat of large livestock in Shahrekord, Iran. Archives of Razi Institute, 79(1): 9-18.
- Ramarao, N., Tran, S. L., Marin, M., & Vidic, J. (2020). Advanced methods for detection of Bacillus cereus and its pathogenic factors. Sensors, 20(9): 26-38.
- Sadeghi, A., Owlia, P., Ganji, L., Besharati, S., Ahmadi, F., Tajeddin, E., *et al.* (2020). Investigation of the prevalence of Campylobacter species and their antibiotic resistance

phenotypes among poultry meat samples in 22 regions of Tehran, Iran. Daneshvar Medicine, 27(6): 1-8.

- Shams, S., Ghorbanalizadgan, M., Haj Mahmmodi, S., Piccirillo, A. (2017). Evaluation of a Multiplex PCR Assay for the Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Infection Epidemiology and Microbiology, 3(1): 6-18.
- Tang, M., Zhou, Q., Zhang, X., Zhou, S., Zhang, J., Tang, X., *et al.* (2020). Antibiotic resistance profiles and molecular mechanisms of Campylobacter from chicken and pig in China. Frontiers in Microbiology, 11(1): 59-69.
- Tikhomirova, A., McNabb, E. R., Petterlin, L., Bellamy, G. L., Lin, K. H., christopher, AS., *et al.* (2024). Campylobacter jejuni virulence factors: update on emerging issues and trends. Journal of Biomedical Science, 31(1), 45-56.
- Vizzini, P., Vidic, J., Manzano, M. (2021). Enrichment Free qPCR for Rapid Identification and Quantification of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, and C. upsaliensis in Chicken Meat Samples by a New Couple of Primers. Foods, 10(10): 23-41.
- Walker, L. J., Wallace, R. L., Smith, J. J., Graham, T., Saputra, T., Symes, S., *et al.* (2019). Prevalence of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni in retail chicken, beef, lamb, and pork products in three Australian states. Journal of Food Protection, 82(12): 2126-2134.
- Wangroongsarb, P., Cheunban, N., Jittaprasatsin, C., Kamthalang, T., Saipradit, N., Chaichana, P., *et al.* (2021). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Campylobacter isolated from retail chickens in Thailand. International Journal of Food Microbiology, 33(9): 109-119.
- Wei, H. L., Liao, Y. S., Chen, B. H., Teng, R. H., Wang, Y. W., Chang, JH., *et al.* (2024). Antimicrobial resistance and genetic relatedness among Campylobacter coli and Campylobacter jejuni from humans and retail chicken meat in Taiwan. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 38(1): 27-34.

Investigation of the frequency of antibiotic resistance and presence of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolated from livestock and poultry meat supplied in Shahrekord

Antibiotic resistance and virulence genes in *Campylobacter jejuni*

Behnia, A.[1], Hashemi, S. M. [2*]

1- M.Sc Graduate, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: majidhashemi54@gmail.com

Abstract

Campylobacteriosis is a common disease worldwide. *Campylobacter jejuni* is also used in industry for public health. This research aims to Investigate the frequency of antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and the presence of virulence genes isolated from livestock and poultry meat supplied in Shahrekord. First, 272 meat and chicken samples were randomly collected from the market of these products in Shahrekord city and transferred to the laboratory, Then standard methods were used to track the contamination, and frequency of virulence genes by Multiplex PCR method and antibiotic resistance evaluation of the isolates. The results showed that the determination of *Campylobacter jejuni* in the samples was 53.68%. In this way, 43 samples (63.2 %) of packaged meat, 48 samples (70.6 %) of chicken meat without packaging, out of 100 samples of fresh meat without packaging, 34 samples (34 %) And out of 36 minced meat samples, 23 samples (63.9%) were infected with *campylobacter jejuni*. The most and least genes in minced meat were *flaA*, 65.2%, and *cadF*, 13%. The results showed that the resistance to ciprofloxacin was 97.94% and the lowest resistance to imipenem was 9.58%. The results of this research showed that all types of meats can be reservoirs for Campylobacter jejuna, which can help to reduce or eliminate consumption by following the hygiene principles in slaughterhouses and centers.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, Animal meat, Poultry meat, Antibiotic resistance, Virulence gene