جداسازی باکتری های گرم منفی و تعیین گروه های سرمی سالمونلاهای جدا شده از دستگاه گوارش طیور در استان ایلام

مصطفی نعمتی[1*]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۷

چکیده

مقدمه: با توجه به حجم بالای کشتار طیور در کشتارگاه های صنعتی و سیستم کشتار در این کشتارگاه ها، احتمال انتقال آلودگی هایی روده ای به لاشه و نوع این باکتری ها یک خطر بالقوه در بهداشت انسانی می باشد. در پژوهش حاضر سعی شده است نوع آلودگی به بعضی از باکتری های گرم منفی روده ای غالب در دستگاه گوارش طیور مورد بررسی قرار گیرد. هم چنین سروتیپ سالمونلاهای جدا شده تعیین گردد.

مواد و روش ها: به صورت تصادفی از کلواک و دستگاه گوارش ۴۰۰ مرغ گوشتی از ۸۰ گله(هر گله ۵ نمونه) واحد مرغداری طیور گوشتی استان ایلام که در کشتارگاه صنعتی این استان کشتار شدند نمونه گیری به عمل آمده است. کلیه نمونه ها جهت بررسی های بیوشیمیایی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه ایلام ارسال و پس از آن نمونه های مشکوک به سالمونلا جهت تعیین سروتیپ به موسسه رازی و تعدادی هم به منظور بررسی تایید تشخیص و تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نمونه ها با استفاده از روش های استاندارد شامل مراحل پیش غنی سازی، غنی سازی و کشت در محیط های اختصاصی و آزمایشات تکمیلی بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: از نمونه های گرفته شده از طیور در سنین مختلف، باکتری های روده ای متفاوتی جدا گردید که پس از بررسی های به عمل آمده باکتری های سالمونلا از ۵ گله(حدود ۶ درصد)، پروتئوس از ۷۵ گله (حدود ۹۴ درصد)، انتروباکتر از ۳۰ گله(حدود ۳۸ درصد) و اشریشیاکولای از ۴۰ گله(۵۰ درصد) جدا گردید. از سالمونلاهای جدا شده ۳ نمونه سالمونلا با آنتی ژن سوماتیک(O7(Group C1 و تعداد ۲ جدایه سالمونلا با آنتی ژن سوماتیک(O8(Group C2 و O9(Group D شناسایی شدند.

بحث و نتیجه گیری: از آن جا که در تحقیق حاضر نمونه ها در محل کشتار گاه بلافاصله قبل از کشتار طیور به ظاهر سالم تهیه گردیده، حضور جمعیت بالای باکتریایی در کلواک طیور از یک سو و مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها از سوی دیگر می تواند سبب آلودگی لاشه در مراحل مختلف به ویژه در هنگام کشتار گردد که این مسئله زنگ خطری برای مصرف کنندگان می باشد. بنا بر این، با توجه به یافته های این پژوهش رعایت اصول بهداشتی در تمام مراحل فرآیند کشتار می تواند در سلامت و بهداشت عمومی نقش به سزایی داشته باشد.

واژه های کلیدی: طیور، سالمونلا، پروتئوس، انترو باکتر، بهداشت انسانی

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Email: mostafa.nemati@ilam.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]

مقدمه

تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز جامعه دارای یک زنجیره تولید طولانی و حساس می باشد و در هر مرحله ای، اعم از پرورش و کشتار، در معرض شدید اجرام بیماری زا من جمله باکتری ها تحت تاثیر قرار می گیرد که این آلودگی برای طیور و از طریق انتقال به لاشه برای مصرف کننده مشکل ساز می باشد(۱). با توجه به این مسائل شناسایی جمعیت باکتریایی در هر منطقه می تواند نقش مهمی در مبارزه و کنترل بیماری های انسان و طیور ایفا نماید.

از این رو، کمیته مشاوره ملی بحران های میکروبیولوژیکی غذا توجه خاصی به بهداشت میکروبی غذا داشته و این کمیته اعمال سیستم های کنترلی از تولید تا مصرف را بهترین رهیافت برای بهداشت مواد غذایی معرفی کرده است(۱۵).

باکتری هایی مانند سالمونلا، پروتئوس و انتروباکتر در دستگاه گوارش طیور ممکن است حضور داشته باشند. این باکتری ها در انسان در بیماری های مختلفی مانند مسمومیت های غذایی، مننژیت نوزادان و ایجاد عفونت ادرای و سنگ های کلیوی می توانند دخالت نمایند(۶). از آن جایی که سیستم های کنترلی و تضمین ایمنی غذا تاکنون نتوانسته اند سیستم کنترلی کاملی در جهت جلوگیری از آلودگی لاشه به میکروارگانیسم ها ارائه نمایند و از بروز بیماری های منتقله در اثر مصرف لاشه های آلوده جلوگیری نمایند، شناسایی جمعیت باکتریایی در هر منطقه می تواند نقش مهمی در مبارزه و کنترل بیماری های طیور و جلوگیری از انتقال آن به انسان ایفا نمایند. تاکنون تحقیقات گسترده ای در زمینه بررسی آلودگی های لاشه به باکتری های مختلف در مراحل مختلف کشتار صورت گرفته است. تخلیه امعاء و احشاء در پروسه خط کشتار اغلب منجر به پارگی لوله گوارشی گردیده و در نتیجه موجب آلودگی بیشتر باکتریایی لاشه ها می گردد، بنا بر این آلودگی دستگاه گوارش طیور می تواند به عنوان منبع آلودگی لاشه ها در مراحل مختلف کشتار مورد توجه واقع شود. جمشیدی و همکاران از ۱۹/۲ درصد نمونه های آب گرفته شده در سیستم خنک کننده لاشه طیور در کشتارگاه، باکتری های جنس سالمونلا در شهرستان مشهد جدا نمودند(۲،۳). جوادی و همکاران نشان دادند در جاهایی که تخلیه روده ها با دخالت مستقیم کارگران به صورت دستی صورت گرفته، احتمال بریده شدن روده ها با چاقو و پارگی آن ها در اثر کشیدن و تخلیه محتویات چینه دان افزایش یافته و در نتیجه باعث بالا رفتن جمعیت استافیلوکوکوسی و سالمونلایی در لاشه می گردد(جوادی و رضویلر ۱۳۸۶).

اهداف اصلی این پژوهش بررسی آلودگی کلواک طیور به باکتری های گرم منفی روده ای در استان ایلام، شناسایی فنوتیپی آن ها با روش های بیوشیمیایی و تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک با روش مولکولار میکروبیولوژی و هم چنین بررسی خطرات احتمالی برای بهداشت انسانی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری: در این مطالعه که از شهریور ۱۳۹۱ تا آذر ماه ۱۳۹۲ در استان ایلام انجام گرفت، به صورت تصادفی ۸۰ گله مورد آزمایش میکروبی قرار گرفت. نمونه ها از کلواک و دستگاه گوارش ۴۰۰ مرغ گوشتی(هر گله ۵ نمونه) ارجاعی به کشتارگاه صنعتی طیور ایلام بلافاصله قبل از کشتار با سواب استریل تهیه و همراه با محیط های غنی کننده جهت بررسی آزمایشات بیوشیمیایی در کوتاه ترین زمان ممکن به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه ایلام انتقال داده شد. نمونه های اخذ شده به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ در جه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از این مرحله نمونه ها بر روی محیط های اختصاصی مک کانکی و محیط سالمونلا شیگلا SSagar (Merck) کشت داده شده و مشابه شرایط قبل گرمخانه گذاری گردیدند. پس از جدا سازی و خالص نمودن نمونه ها آزمایشات بیوشیمیایی شامل Suger Iron Agar (TSI)، Urease، Indol، Methyl Red (MR)، Voges Proskauer (VP)، Simmon citrate، تولید گاز H_2S، و تست حرکت(Motility) انجام شد. تعداد ۲۲ نمونه که در تست های بیوشیمیایی مشکوک به سالمونلا تشخیص داده شدند جهت تایید تشخیص و تعیین گروه سرمی در محیط شیب دار(Slant) نوترینت آگار به بخش میکروبیولوژی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]

موسسه رازی ارسال گردیدند. این نمونه ها در موسسه رازی بلافاصله پس از دریافت جهت تایید خلوص بر روی محیط های افتراقی SS Agar و McConkey کشت داده شده و کولونی های مشکوک مجدداً تحت آزمایشات بیوشیمیایی قرار گرفتند. نمونه های لاکتوز منفی، اوره منفی و تولیدکننده گاز H_2S در محیط TSI با تظاهر Alk/Acid که آزمایشات IMVC آن ها دارای نتایج به ترتیب +/−/+/− بود، انتخاب و پس از جداسازی تحت آزمایشات سرولوژیک مطابق جدول کوفمن وایت تعیین سروتیپ شدند. ابتدا سروگروپ های پلی والان شامل دو گروه اصلی آنتی سرم های سوماتیک O و سپس آنتی سرم های سوماتیک منووالان O و در نهایت آنتی سرم های فلاژلار H در مورد هر یک از جدایه ها مورد ارزیابی قرارگرفتند و نتایج ثبت گردید.

استخراج DNA و آزمایش PCR: تعداد ۱۰ نمونه از باکتری های جدا شده و شناسایی شده بر اساس تست های بیوشیمیایی، جهت تایید تشخیص و تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک انتخاب شدند. جهت استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته باکتری استفاده شد. استخراج DNA ژنومیک با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. به طور خلاصه، یک کلونی از باکتری رشد یافته در ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر حاوی Tris-EDTA قرار داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت g ۱۳۰۰۰ از مایع رویی جهت انجام آزمایش PCR استفاده شد. آزمایش PCR با هدف تکثیر در حدود bp ۵۰۰ اول یا به عبارتی یک سوم اول از ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای ذیل انجام شد.

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3́) pA (5́-و

5́-ATTACCGCGGCTGCTGG-3́)(16S_517 rvs .

واکنش گرهای PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر(غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت۲mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs (غلظت mM ۲۰۰ از هر کدام)، ۱/۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase و ۴۰ میکرولیتر آب با هم مخلوط شدند. دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه حرارتی شامل دناتوراسیون ۹۴، اتصال ۵۶ و امتداد در ۷۲ درجه سانتی گراد هر یک به مدت ۱ دقیقه انجام گردید. امتداد نهایی نیز در ۷۲ درجه سانتی گراد در زمان ۷ دقیقه به پایان رسید. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد به همراه اتیدیوم بروماید مورد شناسایی و بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی وآنالیز اسیدهای نوکلئیک: پس از اطمینان از تکثیر مناسب ژن 16S rRNA در آزمایش PCR، محصول به دست آمده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نمونه سکانس های به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای DNA Star V. 6.0 و MEGA V. 5.04 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و در پایان با توالی های موجود در بانک ژنی(.Gen Bank) مقایسه و هویت هر یک از جدایه ها بر حسب درصد اعلام گردید.

یافته های پژوهش

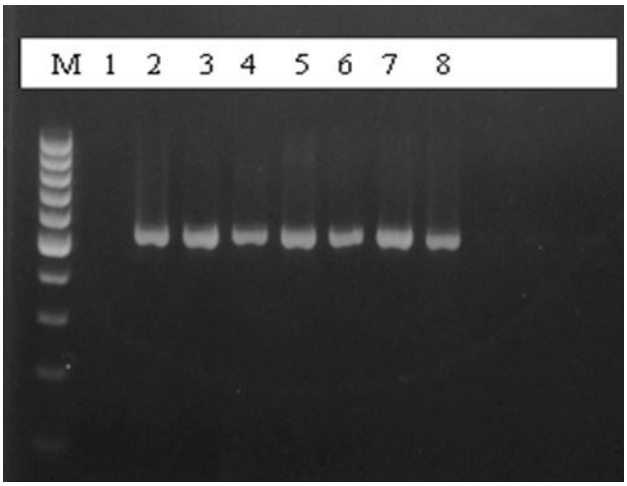
از نمونه های گرفته شده در سنین مختلف باکتری های روده ای متفاوتی جدا گردید که پس از بررسی های به عمل آمده باکتری سالمونلا از ۵ گله (حدود ۶ درصد)، پروتئوس از ۷۵ گله(حدود ۹۴ درصد)، انتروباکتر از ۳۰ گله(حدود ۳۸ درصد) و اشریشیاکولای از ۴۰ گله(۵۰ درصد) جدا گردید.

آزمایش PCR به صورت تصادفی برای تعدادی از جدایه های میکروبی انجام(شکل شماره ۱) و آنالیز توالی اسیدهای نوکلئیک به دست آمده وجود گونه های Proteus mirabilis و Enterobacter hormaechei را تایید تشخیص نمود(بانک ژن، شماره دسترسی: KF110789.1).

از تعداد ۲۲ نمونه مشکوک به سالمونلا ارسالی به موسسه رازی ۳ نمونه سالمونلا واجد آنتی ژن سوماتیک(Group C1) O7 و تعداد ۲ جدایه دارای آنتی ژن سوماتیک(Group C2) O8 و Group) O9 D) تشخیص داده شدند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]

لازم به ذکر است بیشتر این سه باکتری مورد بررسی قرار گرفته اند و عدم گزارش دیگر باکتری های گرم منفی روده ای در این گزارش دلیلی بر عدم وجود آن ها نمی باشد.



شکل شماره ۱. نتایج PCR بر روی ژل آگاروز برای تعدادی از نمونه های جدا شده از دستگاه گوارش طیور
ردیف M : مولکولار سایز مارکر bp ۱۰۰، ۱: کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت، ۳ تا ۸: نمونه های جدا شده.

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر بیشترین آلودگی کلواک طیور به ترتیب مربوط به باکتری های پروتئوس، اشریشیاکولای، انتروباکتر و سالمونلا گزارش گردید که با توجه به نتایج آزمایشات تکمیلی، سروتیپ سالمونلا O8, O7 و O9 و گونه های انتروباکتر هورمچیای و پروتئوس میرابیلیس با آزمایشات مولکولار بیولوژی تشخیص داده شد. مطالعات مختلف از سراسر دنیا آلودگی طیور به باکتری های مختلف روده ایی از جمله سالمونلا را نشان می دهد. هم چنین گزارشات متعددی در خصوص آلودگی لاشه های طیور در ایران و دیگر نقاط جهان به این باکتری ها وجود دارد که بیانگر اهمیت این موضوع می باشد. اکبر مهر در سال ۱۳۸۹ گزارشی از آلودگی ۸/۶۵ درصد طیور به سالمونلا ارائه نموده که بیشترین آلودگی با سالمونلاهای گروه سرمی D بوده که با این تحقیق از نظر فراوانی و نوع سروار گزارش شده، مطابقت دارد(۴).

باکتری هایی که در دستگاه گوارشی یک پرنده حضور دارند در صورت پاره شدن و عدم تخلیه کامل امعاء و احشاء می توانند لاشه خود پرنده و هم چنین آب سیستم های شست و شو و خنک کننده که تمام لاشه ها از آن عبور می کنند را آلوده نمایند(۲) که این مسئله می تواند بهداشت انسانی را در معرض خطر قرار دهد.

سلطان دلال و همکاران(۱۳۸۵) در یک تحقیق در مورد بیماران کلیوی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران متوجه شدند که پس از باکتری اشریشیاکولای(۳۶/۹ درصد) شایع ترین باکتری میله ای گرم منفی جدا شده از بیماران کلیوی پروتئوس ها(۱۰/۴ درصد) می باشند که این باکتری ها به آنتی بیوتیک های کلیندا مایسین، تتراسایکلین، آمپی سیلین و اگزاسیلین مقاوم بودند(۵). بر اساس گزارشات، پروتئوس میرابیلیس که در این تحقیق به تعداد زیاد از طیور به ظاهر سالم آماده کشتار جدا شده است، می تواند عفونت های انفرادی در طیور و هم چنین منجر به تشکیل سنگ های استرووویت(Struvite stone) و آپاتیت(Apatite stone) در انسان گردد(۶). با توجه به این که باکتری پروتئوس در بیماری زایی طیور از اهمیت زیادی برخوردار نیست کمتر مورد توجه قرار می گیرد اما انتقال آن از طریق مصرف لاشه های آلوده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]

می تواند از یک طرف خطر عفونت های ادراری و ایجاد سنگ کلیه و از طرف دیگر افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی را به دنبال داشته باشد. باکتری انتروباکتر هورمچیای که در این پژوهش جداسازی و تعیین توالی شد، می تواند به عنوان عامل مننژیت در نوزادان و هم چنین به عنوان یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی مطرح باشد(۶،۷).

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آلودگی دستگاه گوارش طیور به باکتری های سالمونلا، پروتئوس و انتروباکتر می باشد و با توجه به تحقیقات گسترده ای که در زمینه انتقال آلودگی از دستگاه گوارش به لاشه و متعاقب آن احتمال آلودگی مصرف کنندگان و کسانی که در امر تهیه و توزیع طیور نقش دارند خطری است که باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد و در این زمینه پیشنهادات ذیل ارائه می گردد:

۱-نمونه های جمع آوری شده از نظر مقاومت های آنتی بیوتیکی مورد مطالعه قرار گیرد.

۲-ادرار افراد مبتلا به بیمارهای کلیوی در استان از نظر نوع آلودگی باکتریایی و الگوی مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گیرد.

۳-باکتری های جدا شده از طیور در این تحقیق با باکتری های جدا شده از بیماران کلیوی از نظر منشاء مورد بررسی قرار گیرند.

۴-در کشتارگاه های طیور نظارت ویژه ای بر کارکنان بخش جداسازی امعاء و احشاء صورت پذیرد و قبل از ادغام لاشه ها در تانک شست و شو و خنک کننده لاشه ها یک بار شسته شوند.

هزینه انجام این تحقیق بر اساس قرارداد شماره ۵/۱۴۶د مورخ ۹۱/۸/۱ از محل اعتبارات دانشگاه ایلام پرداخت گردیده و کلیه حقوق این طرح برای معاونت پژوهشی دانشگاه ایلام محفوظ می باشد.

References

1. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity islands. J Bacteriol2003; 185:3624-35.

2.Jamshidi A, Naghdipour D. Contamination of water used for chilling of poultry carcasses to Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis using multiplex-PCR method. J of Vet Res2011; 66:149-52.

3.Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol2003;69:3687-94.

4.Akbar mehr J. [Identification of salmonella groups and hilA gene by PCR]. Microbial Biotech J Islamic Azad Univ2010; 6:33-8.(Persian)

5.Soltan dalal M, Mirshafii A, Norozi M, Zerati H, Bakhtiari R. Check the pattern of drug resistance of Proteus strains isolated from patients with urinary tract infection. J Sci Res Shahed Uni2005;62:29-34.

6. Carter GR, Wise, DJ. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6th ed. Iowa State Press Ames IA; 2004.

7.Camposa LC, Lobiancoa LF, Sekia LM, Santosb RMR, Asensia MD. Outbreak of Enterobacter hormaechei septicaemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil. Clin Microbiol News2007;22:119-20.

8.Javadi A, Razavilar V. [The health hazards of a slaughterhouse using the HACCP system]. Pajohesh Sazandegi2007;74:39-45.(Persian)

9.National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Generic HACCP application in broiler slaughter and processing. J Food Prot1997:60:579–604.

10.Jamshidi A, Naghdipour D, Contamination of water used for chilling of poultry carcasses to Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis using multiplex-PCR method. J Vet Res 2011;66:149-52.

11.Winfield MD, Groisman E A. Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. Appl Environ Microbiol2003; 9:3678-94.

12.Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. Eur J Clin Invest2008; 38:90-6.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]

Gram- Negative Bacteria Isolation and Salmonella serotyping from Poultry's Alimentary Canal in Ilam Province

Nemati M[1*]

(Received: October 14, 2014 Accepted: December 28, 2014)

Abstract

Introduction: The contamination of poultry carcasses in slaughter house according to the number of poultry and systems has a risk for human health. In this research some Gram- negative bacteria were isolated from alimentary canal. In addition, serotyping of Salmonella was performed.

Materials & methods: Four hundred alimentary canal specimens from 80 industrial poultry farms (5 chickens per farm) were sampled and sent to Ilam University laboratory. Gram-negative bacteria were isolated and identified by mean of standard biochemical tests. The serotyping of salmonella isolates was carried out by the Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Sequence analyses for a representative selection of Gram-negative bacteria were performed commercially by Macrogen, South Korea.

Findings: Out of 80 flocks, species of some genera including Proteus, Escherichia, Enterobacter and Salmonella were isolated form 75 (94 %), 40 (50%), 30 (38%) and 5 (6%) flocks, respectively. The results showed that three salmonellae were identified as Salmonella O7 (Group C1), one O8 (Group C2) and the other as O9 (Group D).

Discussion & Conclusions: The high presence of the bacteria in poultry's alimentary tract in slaughter house immediately before they were slaughtered may be a pose for human health hazards. Thus, based on the findings of this study poultry's alimentary tract bacteria should be considered as a potential source of contamination for the public health.

Keywords: Poultry, Salmonella, Proteus, Enterobacter, Human health

1. Dept of Microbiology, Faculty of Para- Veterinary, Ilam University, Ilam, Iran
** Correspondin author Email: mostafa.nemati@ilam.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-03-12]