



نماد کوتاه

بررسی وجود باکتری کمپیلوباکتر در نمونه های شیر خام و پنیر محلی گوسفندی در

شهرستان فارس از توابع استان چهارمحال و بختیاری به روش PCR

مهدی بهمن دهکردی*، مجتبی زنگنه، مائده سجادیان، عبدالجلیل ریگی، هلن حنایی اهواز، عیسی عباسی

بیرگانی

دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.



*نویسنده مسئول: mehdibahman25@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷

چکیده

باکتری کمپیلوباکتر می تواند از طریق شیر خام به انسان منتقل شده و باعث بیماری های غذازاد شود. این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع گونه های بیماری زای در شیر خام و پنیر محلی گوسفندی با استفاده از روش های مولکولی در شهرستان فارس از توابع استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۰ انجام شد. تعداد ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه پنیر محلی گوسفندی به صورت تصادفی از مراکز جمع آوری و خرده فروشی های شیر و لبنیات سنتی جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها در ظروف استریل و در شرایط مناسب زنجیره سرد، در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت تجاری انجام شد و سپس واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای مناسب جهت شناسایی کمپیلوباکتر صورت گرفت. از ۲۰ نمونه شیر خام دو نمونه (۱۰ درصد) آلوده به باکتری بودند و در ۲۰ نمونه پنیر محلی هیچ مورد آلوده ای یافت نشد. باتوجه به نتایج مطالعه حاضر و حضور باکتری ذکر شده در شیر، رعایت اصول بهداشتی در صنایع لبنی، فرآوری و استفاده از حرارت کافی جهت از بین بردن باکتری های نام برده در شیر خام و همچنین استفاده از روش های سریع و دقیق جهت شناسایی این باکتری امری ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: کمپیلوباکتر، شیر خام، پنیر محلی، PCR، پنیر گوسفندی



مقدمه

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی، یکی از اساسی‌ترین مشکلات موجود در جوامع بشری است (۱ و ۲). یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در انتقال و ایجاد بیماری‌های منتقله از غذا، روش تهیه، توزیع و نگهداری مواد غذایی می‌باشد که باید به صورت بهداشتی تولید شده و با کیفیت خوب در اختیار مصرف‌کننده قرار بگیرند (۳). شیر و فرآورده‌های لبنی یکی از محصولات غذایی پرطرفدار می‌باشند. شیر و لبنیات دارای مواد مغذی زیادی بوده و شامل ترکیباتی از جمله پروتئین، چربی، کلسیم، قند، فسفر و دیگر مواد مغذی ضروری می‌باشند. بدلیل ترکیبات مغذی بالا و همچنین میزان مصرف روزانه زیاد این محصولات، تولید با کیفیت، بهداشتی و ایمن شیر و فرآورده‌های آن امری ضروری است (۴).

شیر و فرآورده‌های آن می‌توانند توسط عوامل باکتریایی زیادی آلوده شوند. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به *لیستریا*، *کوکسیلا بورنتی*^۱، *اشرشیاکلی*^۲، *مایکوباکتریوم بویس*^۳، *سالمونلا تیفی موریوم*^۴ و *کمپیلوباکتر*^۵ اشاره کرد (۱ و ۵).

باکتری *کمپیلوباکتر* یکی از عوامل آلوده‌کننده شیر و لبنیات است (۶). به بیماری ناشی *کمپیلوباکتر*، *کمپیلوباکتریوزیس* گفته می‌شود. *کمپیلوباکتر* می‌تواند بیماری‌های دیگری از جمله مننژیت و سندرم گیلن باره را ایجاد کند (۷).

کمپیلوباکتر، باکتری گرم منفی بوده و در شرایط میکرواثروفیلیک به خوبی رشد می‌کند. باکتری *کمپیلوباکتر* علل عمده گاستروانتریت در کشورهای رو به توسعه و توسعه نیافته می‌باشد. از آنجا که افراد با سنین پایین‌تر از جمله کودکان و افراد با ایمنی ضعیف گروه‌های حساس‌تری به اکثر بیماری‌های غذایی می‌باشند، باکتری *کمپیلوباکتر* نیز موجب مرگ کودکان حتی در کشورهای توسعه یافته‌ای نظیر آمریکا می‌شود (۸).

مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زای *کمپیلوباکتر*، گونه‌های گرمادوست *کمپیلوباکتر ژژونی*^۶ و *کمپیلوباکتر کلای*^۷ است. امروزه شیوع بیماری‌های ناشی از *کمپیلوباکتر* بسیار بالا بوده و این باکتری از اهمیت زیادی در حیطه بیماری‌های منتقله از غذا برخوردار می‌باشد (۹).

امروزه استفاده از روش‌های تشخیصی از جمله روش‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) روش تشخیصی بسیار خوبی جهت شناسایی و ردیابی باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی است. روش PCR دارای دقت و حساسیت بالایی است (۱۰). این تحقیق به منظور بررسی وجود باکتری *کمپیلوباکتر* در نمونه‌های شیرخام و پنیر محلی گوسفندی تولید شده در شهرستان فارسان به روش PCR بر روی ۲۰ نمونه شیر و ۲۰ نمونه پنیر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه مجموعاً ۲۰ نمونه شیر خام و پنیر گوسفند از دامداری‌های استان چهارمحال و بختیاری از مهر ماه تا اسفند ماه ۱۳۹۰ جمع‌آوری (هر نمونه مربوط به یک رأس دام بوده است) و در مجاورت یخ و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید و حداکثر شش ساعت پس از نمونه‌گیری از نظر حضور گونه‌های *کمپیلوباکتر* مورد آزمایش قرار گرفتند.

¹ *Listeria*² *Coxiella bruneti*³ *Escherichia coli*⁴ *Mycobacterium bovis*⁵ *Salmonella typhimurium*⁶ *Campylobacter*⁷ *Campylobacter jejuni*⁸ *Campylobacter coli*



بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان



استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کیت سیناکلون با شماره کاتالوگ EX۶۰۰۱ استفاده گردید (شرکت سیناکلون، ایران). ۱/۵ ml پلی‌پروپیلن به ۱۰۰ µl از نمونه شیر خام اضافه شد. سپس ۴۰۰ µl Lysis buffer نیز اضافه گردید و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس انجام گرفت. ۳۰۰ µl Percipitation solution نیز اضافه گردید و به مدت پنج ثانیه ورتکس انجام شد. سپس محلول به ستون استخراج انتقال داده شد. سپس سانتریفیوژ (دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه) انجام شد. پس از آن محلول عبوری دور ریخته شد. ستون را با ۴۰۰ µl Wash buffer دو مرتبه شستشو داده و به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm انجام گرفت. سپس ستون را به یک میکروتیوب دو میلی‌لیتری منتقل و ۳۰ µl Ellution buffer به آن اضافه گردید و به مدت سه-پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس جهت بدست آوردن DNA به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت آزمون‌های مولکولی نگهداری شد.

تشخیص مولکولی

پس از استخراج DNA، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰۰ ng از DNA استخراج شده، ۲/۵ µl از محلول PCR buffer با غلظت ۱۰ برابر (۷۵ mM) تریس هیدروکلراید، ۲ mM کلرید منیزیم، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۲۰ mM آمونیوم سولفات، ۰/۲ mM dNTPs (شرکت بایونیر، کره جنوبی)، ۱/۵ U Bioneer، ۱/۵ U AmpliTaq polymerase (Korea) (South و ۱۰ pmol از هر پرایمر (Takapouzist, Iran) و در نهایت حجم مخلوط واکنش با آب مقطر استریل دیونیزه به ۲۵ µl رسانیده شد. دستگاه ترموسایکلر (USA MJ mini, BioRad) در شرایط مطلوب تنظیم گردید. برنامه حرارتی نیز شامل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۵ سیکل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر به مدت یک دقیقه مطابق با دمای ذکر شده در جدول ۱، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و در آخر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه. در نهایت محصول مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (شرکت سیناکلون، ایران) ردیابی گردید.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص *Campylobacter coli*، *Campylobacter jejuni*

منبع	Product size (bp)	دمای آنیلینگ (°C)	ژن هدف	قطعات پرایمر (۳' - ۵')
۱۳	۴۶۲	۵۹	16SrRNA <i>Campylobacter coli</i>	F: AAT-TGA-AAA-TTG-CTC-CAA-CTA-CG R: TGA-TTT-TAT-TAT-TTG-TAG-CAG-CG
۱۳	۵۸۹	۵۹	16SrRNA <i>Campylobacter jejuni</i>	F: CTA-TTT-TAT-TTT-TGA-GTG-CTT-GTG R: GCT-TTA-TTT-GCC-ATT-TGT-TTT-ATT-A

نتایج



در این تحقیق از مجموع ۲۰ نمونه شیر خام دو نمونه (۱۰ درصد) آلوده به *Campylobacter* بوده و در ۲۰ نمونه پنیر محلی آلودگی با *Campylobacter* مشاهده نشده است (جدول ۲).

جدول ۲. تعداد و درصد موارد آلودگی به گونه‌های *Campylobacter* در نمونه‌های شیر خام و پنیر گوسفندی شهرستان فارس

نوع نمونه	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه آلوده	درصد نمونه آلوده
شیر خام	۲۰	۲	۱۰ درصد
پنیر محلی	۲۰	۰	۰ درصد

بحث

تحقیقات وسیعی در مورد وجود کمپیلوباکتر در شیر و لبنیات صورت گرفته که نشان‌دهنده میزان زیاد آلودگی به کمپیلوباکتر در شیر خام می‌باشد. در این مطالعه نیز آلودگی شیر خام به کمپیلوباکتر میزان ۱۰ درصد است که با تحقیقات دیگر محققان مطابقت دارد.

در مطالعه خوشبخت و همکاران (۲۰۲۲)، از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام گاو جمع‌آوری شده از سکوه‌های جمع‌آوری شیر در استان مازندران، هفت نمونه (هفت درصد) آلوده به باکتری کمپیلوباکتر ژژونی بودند و نمونه مثبتی از کمپیلوباکتر کلای مشاهده نشد (۱).

در مطالعه دبیری و همکاران (۱۳۹۴)، ۷۲ نمونه شیر خام در تابستان از سکوه‌های شیر خام در شهرستان آمل جمع‌آوری شد. شناسایی فنوتیپی جنس کمپیلوباکتر و گونه کمپیلوباکتر ژژونی به وسیله روش‌های آزمایشگاهی میکروبی و شناسایی مولکولی این باکتری به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مرز چندگانه (M-PCR) انجام شد. نتایج نشان داد که از ۷۲ نمونه، ۱۳/۸۸ درصد نمونه‌ها آلوده به گونه کمپیلوباکتر ژژونی و ۲/۷۷ درصد نمونه‌ها آلوده به جنس کمپیلوباکتر بودند (۶).

توکلی واسکس و همکاران (۱۳۹۱)، تعداد ۱۳۸ نمونه شیر از مراکز جمع‌آوری شیر شهرستان آمل در فصل‌های مختلف سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری کردند و میزان شیوع فصلی کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلای را با روش M-PCR را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در فصل بهار، کمپیلوباکتر ژژونی ۶/۶ درصد و کمپیلوباکتر کلای ۱/۵ درصد، در فصل تابستان کمپیلوباکتر ژژونی ۱/۶ درصد و کمپیلوباکتر کلای ۲/۲ درصد، در فصل زمستان کمپیلوباکتر ژژونی ۲/۹ درصد و کمپیلوباکتر کلای ۰/۸ درصد تشخیص داده شدند (۱۱).

الزمنان و همکاران (۲۰۱۶)، میزان شیوع کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلای در شیر خام و لبنیات مانند پنیر و ماست را با استفاده از روش مولکولی بررسی کردند. نتایج نشان داد از مجموع ۱۵۰ نمونه شیر خام، پنیر و ماست (از هر محصول ۵۰ نمونه)، ۳۷ نمونه (۲۴/۶ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر بودند که میزان آلودگی کمپیلوباکتر ژژونی در شیر ۲۰ درصد، در پنیر ۱۴ درصد و در ماست هشت درصد، گزارش گردید و نمونه مثبتی از کمپیلوباکتر کلای گزارش نشد (۱۲).

مودی و همکاران (۲۰۱۵)، میزان شیوع باکتری کمپیلوباکتر در شیر خام و محصولات لبنی را با استفاده از روش مولکولی بررسی کردند. از مجموع ۲۸۰ نمونه (۸۵ نمونه شیر بوفالو، ۶۵ نمونه شیر گاو، ۳۰ نمونه بستنی، ۳۰ نمونه پنیر و ۳۰ نمونه از نوعی پنیر



بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان



کاتیج هندی)، گونه های کمپیلوباکتر در هفت نمونه شیر خام (۲/۹۱ درصد) مثبت اعلام شد که تمام موارد جدا شده گونه کمپیلوباکتر ژژونی بوده کمپیلوباکتر کلای در هیچکدام از نمونه ها شناسایی نشد (۱۳).

نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

امروزه سریع ترین روش جهت تشخیص این باکتری روش های مبنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز می باشد و انواع این روش ها نیز به نوبه خود حساسیت و ویژگی های مختلف دارند. از جمله مزیت های روش های مولکولی از جمله واکنش زنجیره ای پلی مرز این است که حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری نسبت به روش های متداول آزمایشگاهی و کشت دارند. شناسایی میکروارگانیسم به وسیله این روش ها بسیار دقیق تر و قابل اعتمادتر است، زیرا باکتری طی فرآیند کشت ممکن است از بین رفته و به درستی تشخیص داده نشود، در نتیجه موارد مثبت بسیاری از دست داده می شود، اما روش واکنش زنجیره ای پلی مرز به نوعی انگشت نگاری میکروبی بوده و حتی وجود حداقل باکتری را در نمونه تشخیص می دهد. شناسایی این باکتری در مواد غذایی می تواند راهی جهت شناسایی منبع شیوع عفونت های حاصل از این باکتری و بنابراین یکی از مراحل مهم پیشگیری از بیماری های حاصله از کمپیلوباکتر به شمار رود. بنابراین این نوع مسائل در مطالعات بعدی می بایست بیشتر مورد توجه باشد و در رفع آن کوشش بیشتری صورت گیرد. در انتها با توجه به این نکته که غذای سالم و مغذی مهمترین منبع انرژی انسان می باشد و میکروب ها نیز برای رشد نیاز به مواد مغذی دارند، بنابراین تشخیص عوامل بیماریزا و راه های آلوده شدن مواد غذایی الزامی است. با توجه به این موارد، این مطالعه می تواند با تعیین میزان فراوانی این باکتری در شیر و پنیر 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 سریع تر 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 دام های شیری و حفظ سلامت آن در برابر بیماری ها، تجویز به موقع واکسن های دام، رعایت اصول بهداشتی در مراحل شیر دوشی و بعد از آن، شستشو و ضد عفونی کردن کلیه دستگاه های شیر دوشی پس از هر بار دوشیدن شیر و رعایت نظافت در محیط دامداری ها و کارگران توصیه می شود.

تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در جمع آوری نمونه همکاری کردند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

فهرست منابع

- [1]. Rahem Khoshbakht1, Hamidreza Kazemeini1, Zahra Panahi 2022. Molecular detection of *Campylobacter* species and *Salmonella* spp. In cattle raw milk specimens in Mazandaran province. Iranian Journal of Food Science and Technology JFST No. 125, Vol. 19, July 2022. [In Persian]
- [2]. Van Kessel JS, Karns JS, Perdue ML. 2003. Using a portable real-time PCR assay to detect *Salmonella* in raw milk. Journal of food protection. 66(10):1762-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1762>.
- [3]. World Health Organization. 2015. World Health Day Kit 2015-From farm to plate, make food safe. WHO Regional Office for South-East Asia.



- [4]. Rostrosa NK. 1973. Technology of milk and dairy products. ([url={https://api.semanticscholar.org/CorpusID:99241766}](https://api.semanticscholar.org/CorpusID:99241766))
- [5]. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens & Disease*. 2(2):115-29. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115>.
- [6]. Dabiri A, Rouhi S, Nouri B, Zaboli F. 2016. The prevalence of *Campylobacter* genus and *campylobacter jejuni* species in raw milk collected from Amol by Multiplex-Polymerase chain reaction. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 5(4):516-525. [In Persian]
- [7]. Adedayo O, Kirkpatrick BD. 2008. *Campylobacter jejuni* infections: update on presentation, diagnosis, and management. *Hospital Physician*. 44(7):9.
- [8]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 52(15):340-3.
- [9]. Jay, J.M. 1996. *Modern Food Microbiology*, International Thomson Publishing. 556-559. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7473-6>
- [10]. Strålin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. 2005. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomytila pneumonia* to be used on sputum samples. *Apmis*. 113(2):99-111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130203.x>.
- [11]. Tavakoli Vasks A, Karim G, Sharifi Soltani M, Nasiri D, Pourjafar H. 2012. Investigation of seasonal prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk of Amol by multiplex-polymerase chain reaction. 4(4): 82-86. [In Persian]
- [12]. El-Zamkan MA, Hameed KG. 2016. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. *Veterinary World*. 9(10):1147. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1147-1151>.
- [13]. Modi S, Brahmabhatt MN, Chatur YA, Nayak JB. 2015. Prevalence of *Campylobacter* spp. in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Veterinary World*. 8(1):1. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1-8>.



"This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws". This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Zoonosis.

**Short Communication Article**

Investigating the presence of *Campylobacter* in samples of raw milk and local sheep cheese in Farsan city of Chahar Mahal and Bakhtiari provinces by PCR method

Mahdi Bahman Dehkordi^{*}, Mojtaba Zangeneh, Maedeh Sajadian, Abdoljalil Rigi, Helen Hanaie Ahvaz, Isa Abbasi birgani

Ph.D. Student of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.



***Corresponding author:** mehdibahman25@yahoo.com

Received: 2023/07/18

Accepted: 2023/08/16

Abstract

Campylobacter is a Gram-negative, microaerophilic bacterium that can be transmitted to humans through the consumption of raw milk, causing foodborne diseases. This study investigated the prevalence of pathogenic species in raw milk and local sheep cheese using molecular methods in Farsan city of Chaharmahal and Bakhtiari provinces in 2013. Twenty samples of raw milk and 20 samples of local sheep cheese were randomly collected from collection centers and traditional milk and dairy stores. All the samples were transferred to the laboratory as soon as possible in sterile containers under suitable cold chain conditions. DNA extraction from the samples was done using a commercial kit, and then polymerase chain reaction (PCR) was performed using appropriate primers to identify *Campylobacter*. Of the 20 samples of raw milk, 2 (10%) were contaminated with the bacteria, and none of the 20 samples of local cheese were infected. According to the results of the present study and the presence of the mentioned bacteria in milk, it is necessary to observe hygiene principles in the dairy industry, to process and use sufficient heat to destroy the bacteria in raw milk, and to use fast and accurate methods to identify this bacterium.

Keywords : *Campylobacter*, Raw milk, Local cheese, PCR, Sheep cheese

How to cite this article: Bahmandehkordi M, Zangeneh M, Sajadian M, Rigi A, Hanaieahvaz H, Abbasibirgani I. Investigating the presence of *Campylobacter* in samples of raw milk and local sheep cheese in Farsan city of Chahar Mahal and Bakhtiari provinces by PCR method. *Journal of Zoonosis*. 2023; 3 (2): 11-17.