

## Prevalence and Antibacterial Susceptibility of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Broiler Chickens

Fereydoon Babaie Najad Basiri<sup>1</sup>,  
Payam Haghghi Khoshkhoo<sup>2</sup>,  
Gita Akbariazad<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD in Medical Laboratory Sciences, Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Marand branch, Marand, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

(Received December 15, 2014 Accepted March 9, 2016)

### Abstract

**Background and purpose:** Thermophilic *Campylobacter* spp. are among the most frequently causes of human gastrointestinal infections worldwide which is mainly due to poultry meat consumption. This study aimed at investigating the prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* isolates collected from gastrointestinal track of broiler chickens.

**Materials and methods:** A total of 150 fecal samples were taken from 30 commercial broiler farms during 6 months in 2014. The samples were cultured and incubated in microaerophilic conditions and stained by Carbolfuchsin. The strains were then identified using biochemical tests (catalase and oxidase test). *C. jejuni* was detected by hippurate hydrolysis test and *C. coli* and *C. lari* were identified using indoxyl acetate hydrolysis. Antibiotic resistance against 12 common anti-microbial agents was tested by Kirby-Bauer method.

**Results:** Thermophilic *Campylobacter* spp. were isolated in 80% of broiler flocks and 65.3% of the samples. A total of 98 *Campylobacter* spp. isolates was found in which *C. jejuni* and *C. coli* were detected in 79.59% and 20.4%, respectively. The highest levels of resistance were found against nalidixic acid (67%) followed by ciprofloxacin (56%), and tetracycline (56%). The lowest levels of resistance were observed against gentamicin (0%), chloramphenicol (2.5 %), and erythromycin (3%).

**Conclusion:** Multiple resistance against anti-microbial agents was seen in several isolates and there was no isolate sensitive to all antibiotics.

**Keywords:** Thermophilic *Campylobacter*, Broiler chickens, Antibiotics

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(136): 185-189 (Persian).

## تعیین شیوع و تعیین حساسیت باکتریایی جدایه های ترموفیلیک کمپیلوباکتر از جوجه های گوشتی

فریدون بابایی نژاد بصیری<sup>۱</sup>

پیام حقیقی خوشخو<sup>۲</sup>

گیتا اکبری آزاد<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** کمپیلوباکتر های ترموفیلیک از عوامل مهم گاستروآنتریت عفونی انسان در سرتاسر دنیا است که عمدۀ موارد آن را به مصرف فرآورده های تهیه شده از گوشت مرغ نسبت می دهنند. تحقیق حاضر با هدف تعیین فراوانی گونه های ترموفیلیک کمپیلوباکتر در دستگاه گوارش جوجه گوشتی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها طراحی شد.

**مواد و روش ها:** طی شش ماه دوم سال ۱۳۹۳، از ۳۰ مزرعه صنعتی پرورش جوجه گوشتی، ۱۵۰ نمونه مدفع پرنده اخذ و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها در شرایط میکروآئروفیلیک و در محیط بروسلا آگار انکوبه و سپس با کربول فوشن رنگ آمیزی و با آزمایشات تحرک، اکسیداز و کاتالاز تایید شدند. برای شناسایی کمپیلوباکتر ژئونی از آزمایش هیدرولیز هیپورات سدیم و برای گونه های کلی و لاری از آزمایش هیدرولیز ایندوکسیل استات استفاده شد. برای ارزیابی مقاومت آنتی باکتریال گونه های ترموفیلیک کمپیلوباکتر نیز از روش انتشاری استفاده شد.

**یافته ها:** در مجموع ۸۰ درصد گله های پرورشی و ۶۵/۳ درصد نمونه های اخذ شده به گونه های ترموفیلیک کمپیلوباکتر آلوده بودند. از ۹۸ جدایه کمپیلوباکتر، ۷۹/۵۹ درصد به گونه ژئونی و ۲۰/۴ درصد به گونه کلی تعلق داشتند. بیشترین مقاومت به ترتیب مربوط به نالیدیکسیک اسید (۶۷ درصد)، سپروفلوكسازین (۵۶ درصد) و تتراسایکلین (۵۶ درصد) و کمترین مقاومت به جنتامایسین (۰ درصد)، کلرامفینیکل (۲/۵ درصد) و اریترومایسین (۳ درصد) بود.

**استنتاج:** پذیده مقاومت به چند آنتی بیوتیک در جدایه ها وجود داشت. هیچ سویه ای که به تمام آنتی بیوتیک ها حساس باشد، وجود نداشت.

**واژه های کلیدی:** کمپیلوباکتر ترموفیلیک، آنتی بیوتیک، جوجه گوشتی

### مقدمه

و جزء انواع ترموفیلیک می باشدند. هر پنج گونه مخزن حیوانی داشته و جزء بیماری های زئونوز طبقه بندی می شوند<sup>(۱)</sup>. طیور به عنوان اولین میزبان مخزن کمپیلوباکتر های ترموفیلیک معروفی شده اند. این مطالعه به کمپیلوباکترها باکتری های گرم منفی و میکرو آئروفیل، به شکل خمیده هستند که بیماری زایی پنج گونه ژئونی، کلی، فتوس، آپسالینسیس و لاری برای انسان شناخته شده است و گونه های ژئونی و کلی بیشترین اهمیت را داشته

E-mail: pkhoshkho@kiau.ac.ir

مؤلف مسئول: پیام حقیقی خوشخو - کرج: دانشگاه آزاد اسلامی کرج، دانشکده دامپزشکی

۱. دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند، ایران

۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۹/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

درصد) و از ۱۵۰ نمونه، ۹۸ نمونه (۶۵/۳ درصد) به گونه‌های ترموفيليك کمپيلوباكتر آلوود بودند. از ۹۸ جدایه کمپيلوباكتر، ۷۹/۵۹ درصد به ژرونی و ۲۰/۴ درصد به کلی تعلق داشتند. در اين بررسی به گونه لاري برخورد نشد. در ۳۵ درصد گله‌ها، هر ۵ نمونه اخذ شده آلوود بود و ۲۰ درصد گله‌ها، فاقد هر گونه آلوودگی به ميكروارگانيسم فوق بودند. همسو با نتائج مطالعات قبل در ايران و در ساير کشورها، کمپيلوباكتر ژرونی عمدۀ ترين عامل شيوع کمپيلوباكريوزيس در سطح گله‌های گوشتی بود. گرچه وجود کمپيلوباكتر به تنها يی در گله‌های طيور باعث ايجاد مشكل و ضرر اقتصادي قابل توجهی نمي شود، ولی به راحتی می‌تواند در کشتارگاه باعث آلوودگی گوشت مرغ شود. بين سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۶ میزان آلوودگی به کمپيلوباكتر در گله‌های گوشتی در کشورهای چك، ايتاليا، انگليس، و آمريكا بالاي ۷۰ درصد و در کرواسي، آلمان، فرانسه، هند، سوئيس و زاپن حدود ۴۰-۵۰ درصد و در نرورز، سوئد و تايوان حدود ۲۰ درصد گزارش شده است(۱۱-۱۲). در ايران، روند آلوودگی گوشت مرغ به اين باكتري تقریباً ثابت بوده است؛ به عنوان مثال ۵۰ درصد در سال (۱۳۸۴)، ۶۲ درصد در سال (۱۳۸۶)، ۵۵ درصد در سال (۲۰۱۰) و ۵۵ درصد در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است(۱۳).

تعیین مقاومت آنتىبيوتیکی: درصد مقاومت جدایه‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. پدیده مقاومت به چند آنتىبيوتیک در جدایه‌های کمپيلوباكتر ترموفيليك مورد بررسی نيز به چشم خورد و تقریباً تمام جدایه‌ها به بيش تراز يك آنتىبيوتیک مقاوم بودند و هیچ سويه‌ای وجود نداشت که به تمام آنتىبيوتیکها حساس باشد. اريترومايسين و فلوروکينولون‌ها (سپروفلوکسازين، تراسايكلين) از آنتىبيوتیک‌های مهم در درمان کمپيلوباكريوزيس هستند. از طرفی مقایسه میزان مقاومت جدایه‌های طيوري با نمونه‌های باليني انساني می‌تواند میزان انتقال مقاومت را تا حدودی نشان دهد. به نظر می‌رسد مقاومت به کمپيلوباكتر جدا شده از

منظور تعیین میزان فراوانی گونه‌های ترموفيليك کمپيلوباكتر در محظيات مدفوعی سکوم جوجه‌های گوشتی و بررسی مقاومت آنتىبيوتیکی سويه‌های جدا شده انجام شد.

## مواد و روش ها

نمونه‌گيري و جداسازی: از ۳۰ مزرعه صنعتی پرورش جوجه گوشتی، به طور اتفاقی ۱۵۰ نمونه سوآب مدفوعی (۵ سوآب از هر گله) از جوجه‌های گوشتی سالم در آخر دوره پرورش در استان البرز، طی شش ماه (مهرماه لغايت اسفند ماه ۱۳۹۳) اخذ شد. سوآب‌ها در محيط پپتون واتر به آزمایشگاه منتقل و ۴۸ ساعت در شرایط ميكروآئروفيليك در درجه سانتي گراد انکوبه و با آزمایشات بيوشيمياي اكسيداز و كاتالاز تاييد شدند. تمام کمپيلوباكترها اكسيداز مثبت و انواع ترموفيليك کمپيلوباكتر (ژرونی، کلی و لاري) که از طيور جدا مي شوند، کاتالاز مثبت هستند. برای تفريقي گونه‌ای از آزمایش هيدروليزيپورات سديم (برای گونه ژرونی) و آزمایش هيدروليزي ايندوکسيل استات (برای گونه کلی) استفاده شد(۲،۳).

آزمایش حساسیت نسبت به عوامل آنتىبيوتیکی از روش کيفي حساسیت باكتريالي با ديسک ديفوزيون به روش استاندارد Kirby-Bauer استفاده شد. دوازده آنتىبيوتیک و غلاظت آنها (بر حسب ميكرو گرم) عبارت بودند از: اريترومايسين(۱۵)، انروفلوکسازين(۵)، تراسايكلين(۳۰)، استرپتومايسين(۱۰)، جنتامايسين(۱۰)، اسپكتينومايسين(۱۰۰)، آمبى سيلين(۱۰)، سپروفلوکسازين(۵)، آموکسى سيلين(۳۰)، كلارامفنينكيل(۳۰)، ناليديكسيك اسيد(۳۰) و نئومايسين(۳۰). برای استاندارد کردن مقدار باكتري موجود با کدورت استاندارد ۰/۵ مك فارلن د مقايسه(۴،۲) و تفسير شد(۵).

## یافته ها و بحث

شيوع: نتائج نشان داد که از ۳۰ گله، ۲۴ گله (۸۰

جدول شماره ۱: درصد مقاومت دارویی ۹۸ جدایه کمپیلوباکتر ترموفیلیک نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین استرپتومایسین ریترومایسین کلرامفینیکل جنتامایسین نومایسین آموکسی سیلین اتروفلوکسازین تراسایکلین سیپروفلوکسازین نالیدیکسیک اسید	جدایه										
	کمپیلوباکتر	ک. ذوزخونی	ک. کلی	۵/۴	۴/۲	۴/۷	۹	۴/۷	۳	۲/۵	۰
۶۷	۵۶	۵۶	۴۲	۱۶/۶	۱۵	۲۹	۰	۲/۵	۳	۶	۵/۴
۶۵	۵۹	۵۸	۴۳	۱۸/۲	۱۵/۵	۳۴	۰	۲/۴	۳	۶	۴/۲
۶۹	۴۲	۴۵	۳۶	۹۰	۱۲	۱۴	۰	۲/۲۵	۲/۲۵	۴/۷	۹

مطابقت دارد و خوشبختانه هنوز سویه‌های کمپیلوباکتر نسبت به اریترومایسین که اولین انتخاب آنتی بیوتیکی برای درمان کمپیلوباکتریوزیس انسانی است، مقاوم نشده‌اند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج این مطالعه، میزان آسودگی به کمپیلوباکتر در بین گله‌های مرغ گوشتی استان البرز را ۸۰ درصد نشان می‌دهد که درصد نسبتاً بالایی است. مساله نگران‌کننده، مقاومت زیاد کمپیلوباکتر به سیپروفلوکسازین و تراسایکلین به عنوان انتخاب‌های اول درمان موارد انسانی، می‌باشد. حساسیت بالا به جنتامایسین، کلرامفینیکل، اریترومایسین، استرپتومایسین و اسپکتینومایسین دیده می‌شود که می‌توان از این آنتی بیوتیک‌ها برای درمان کمپیلوباکتریوزیس در انسان و حیوان استفاده کرد.

موارد انسانی و طیوری در گزارشات کشورهای مختلف نسبت به فلورو کینولون‌ها بالا و نسبت به جنتامایسین، اریترومایسین، استرپتومایسین و اسپکتینومایسین کم باشد (۱۵، ۱۴، ۱۱، ۶) که این نتایج با یافته‌های ما همسو می‌باشد. میزان مقاومت بالا به سیپروفلوکسازین و نالیدیکسیک اسید در بین جدایه‌های کمپیلوباکتر می‌تواند نشان دهنده مقاومت متقاطع بین آن‌ها باشد که نکته مهمی در بهداشت و سلامت عمومی است.

مقایسه نتایج مطالعات قبلی در ایران و نتایج ما تایید کننده برخی یافته‌ها (۱۶، ۱۳) و مغایر با برخی دیگر است (۱۷). لازم به ذکر است که مصرف این آنتی بیوتیک‌ها (که حساسیت بالایی را نشان می‌دهند) در صنعت طیور در مقایسه با سایر آنتی بیوتیک‌ها کم تر است. نتایج ما با پژوهش‌های قبلی در سایر کشورها

## References

- Doyle MP, Beuchat LR, Montville ThJ. Food Microbiology: Fundamentals and frontiers, 2<sup>nd</sup> ed. Washington: ASM Press; 2001.
- Farin Kia. Prevalence of *Campylobacter* infection in commercial broiler chickens in Tehran province, Dissertation of veterinary medicine, Islamic Azad University, Karaj branch. 2007.
- Naderi Nasab M, Rashed T, Nazem M .Laboratory bacteriology. Mashhad: Imam Reza University press; 2003. (Persia).
- Sanaie M. Antibacterial susceptibility pattern of *Campylobacter* spp in red meat and poultry meat in Tehran, MS thesis dissertation, Islamic Azad University, Science and Research branch. 2005.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 8<sup>th</sup> ed. NCCLS document M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2003.
- Bardon J, Kolar M, Cekanova L, Hejnar P, Koukalova D. Prevalence campylobacter jejuni and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. Zoonoses Public Health 2009; 56(3): 111-116.
- Prukner-Radovcic E, Horvatek D. Prevalence of campylobacter spp. in broiler chickens in Croatia. 12<sup>th</sup> European poultry conference 2006, Verona, Italy. 10-14 Sep, 2006.
- Newell DG, Fearoley C. Source of campylobacter colonization in Broiler

- chickens. *Appl Environ Microbiol* 2003; (69)8: 4343-4351.
9. Wittwer M, Keller J, Wassenaar TM, Stephan R, Howald D, Regula G, Bissig-Chaisat B. Genetic Diversity and Antibiotic resistance patterns in campylobacter population Isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2004; 71(6): 2840-2847.
  10. Saba FD, Parkar SFD, Sachdev D, deSouza N, Kamble A, Suresh G, et al. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of thermophilic Campylobacters in ceca and carcasses of poultry birds in the “live-bird market”. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7(21): 2442-2453.
  11. Kaijser B, Ronner AC, Engrall ED, Andersson L. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in campylobacter jejuni and campylobacter coli from humans and chickens in Sweden. *Int J Food Microbiol* 2004; 96(2): 173-179.
  12. Rahimi E, Momtaz H, Ameri M, Ghasemian-Safaei H, Ali-kasemi M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. *Poult Sci* 2010; 89(5): 1015-1020.
  13. Dabiri H, Aghamohammad Sh, Goudarzi H, Noori M, Ahmadi-Hedayati M, Ghoreyshiamiri SM. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Campylobacter* species Isolated From Chicken and Beef Meat. *Int J Enteric Pathol* 2014; 2(2): e17087.
  14. Elzbieta Mackiw E, Korsak D, Rzewuska K, Tomczuk K, Rozynek E. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Contl* 2012; 23(2): 297-301.
  15. Borck Hog B, Stehr Larsen L, Torpdahl W. *Campylobacter* in DANMAP, Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, ISSN 1600-2032. DANMAP 2013. Available from: [www.danmap.org](http://www.danmap.org). Accessed October 2, 2015.
  16. Taremi M, Soltan Dallal MM, Gachkar L, Moez Ardalan S, Zolfagharian K, Zali MR. Prevalence and antimicrobial resistance of campylobacter isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran, *Int J Food Microbiol*. 2006; 108(3): 401-403.
  17. Ghane M, Bahador N, Baserisalehi M, Eghbali M. A comparative study on antimicrobial susceptibility of campylobacter spp. Isolates from fecal samples of domestic animals and poultry in Tonekabon and Shiraz, Iran. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)* 2011; 2(2): 21-26.