

جدایه‌های کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه‌های خانگی و الگوی ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها

مرتضی سلجوقی^۱، علی شریف زاده^{۲*}

۱- دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۵

چکیده

زمینه و هدف مطالعه: گونه‌های کمپیلوباکتر موجب اسهال در انسان، سگ، گربه و دیگر حیوانات اهلی و وحشی می‌گردند علائم اسهال ناشی از کمپیلوباکتر در حیوانات خانگی و نیز انسان، از مدفوع شل تا آبکی و اسهال موکوئیدی همراه با خون متغیر است. این باکتری از راه‌های متفاوتی جمله مواد خوراکی پخته نشده، مدفوعی دهانی، مصرف آب آلوده غیر بهداشتی و تماس با حیوانات خانگی منتقل می‌شود. لذا این تحقیق با هدف تعیین گونه‌های غالب این باکتری به همراه آگاهی از ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص در حیواناتی که در محل‌های بسته و در تماس نزدیک با انسان زندگی می‌کنند، انجام شد. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۵۰ نمونه مدفوع از سگ‌ها و ۵۰ نمونه مدفوع از گربه‌های خانگی با روش میکروبی کشت و مولکولی PCR بررسی شد. در روش میکروبی کشت فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ‌ها و گربه‌های خانگی به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش مولکولی PCR به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. **نتایج:** با انجام آزمون مربع کای (تست پیرسون)، ارتباط معنی‌داری بین آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ‌ها و گربه‌های خانگی با متغیرهای سن، نوع تغذیه، سیستم نگهداری و آلودگی با سایر بیماری‌های گوارشی در آزمون مربع کای (تست پیرسون) نشان داده شد. شایع‌ترین گونه در همه موارد آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ‌ها و گربه‌های خانگی، کمپیلوباکتر ژژونی بود. در آزمایش آنتی بیوگرام تمامی نمونه‌های جداسازی شده حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند. تمام سویه‌های جدا شده به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بودند. در مورد ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی نیز بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه ژژونی در مورد bla_{oxA}-61 و در گونه کولای در مورد aadE1 و bla_{oxA}-61 مشاهده گردید. از ۷ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن‌ها در کمپیلوباکتر ژژونی وجود داشت اما در جدایه‌های کمپیلوباکتر کولای تنها ۳ ژن cdtA, cdtF و iam1 ردیابی گردید. **نتیجه گیری:** در نهایت از این مطالعه نتیجه گرفته شد که به جهت فراوانی قابل توجه آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه‌ها و سگ‌های خانگی، و با نظر به نقشی که می‌توانند برای سلامت جوامع انسانی ایفا نمایند، انجام آزمایش‌های دوره‌ای اهمیت زیادی داشته و با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌ها مصرف آنتی بیوتیک بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: کمپیلوباکتر، سگ، گربه، حدت، مقاومت آنتی بیوتیکی

*نویسنده مسئول: علی شریف زاده

آدرس: گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: al.sharifzadeh@iau.ac.ir

مقدمه

کمپیلوباکتر یکی از عوامل مهم بیماری زای مشترک بین انسان و حیوان است. کمپیلوباکتر یک باکتری گرم منفی، میله‌ای متحرک (در اندازه $5-1/5 \times 0/5-0/2$ میکرومتر)، اکسیداز مثبت کاتالاز متغیر، فاقد اسپور و میکروآنروفلیک است. گونه‌های این باکتری موجب اسهال در انسان، سگ، گربه و دیگر حیوانات اهلی و وحشی می‌گردد (Natsos et al., 2019). از گونه‌های مهم کمپیلوباکتر در حیوانات خانگی می‌توان به کمپیلوباکتر آپسالینسیس، کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر هلموتیکوس، کمپیلوباکتر لاری، کمپیلوباکتر فلیس و کمپیلوباکتر کولای اشاره کرد که از سگ‌ها و گربه‌های اسهالی و حتی بدون علامت جدا شده‌اند (Bojanic et al., 2019). در انسان در هشتاد درصد موارد، باکتری‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای غالب می‌باشند (Acke et al., 2006). روش انتقال اجرام، غالباً مدفوعی-دهانی است و شدت بیماری بستگی به تعداد ارگانیزم‌های خورده شده توسط میزبان، میزان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و سطح آنتی‌بادی محافظ در بدن دارد. زمانی که استرس به حیوانات وارد شود، حساسیت به بیماری بیشتر خواهد بود. عفونت‌های هم‌زمان نظیر آلودگی با پاروویروس، کروناویروس، ژیاودی، سالمونلا و شیگلا ممکن است نقش سینرژسم ایفا نماید (Zenebe et al., 2020). حضور خون و لکوسیت‌ها در مدفوع، پرخونی، ادم، اولسر مخاط و گاهی سپتی سمی نشان می‌دهد که باکتری می‌تواند حالت تهاجمی داشته باشد. به نظر می‌رسد که حیوانات نسبت به آلودگی کمپیلوباکتریایی مقاوم‌تر باشند و یا به اثرات بیماری‌زای گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر، بهتر سازگاری پیدا کرده باشند (Andrzejewska et al., 2013). علائم

اسهال ناشی از کمپیلوباکتر در حیوانات خانگی و نیز انسان، از مدفوع شل تا آبکی و اسهال موکوئیدی همراه با خون متغیر است. کمپیلوباکتریوز حاد، با اسهال مملو از موکوس، آبکی و یا رگه‌های صفرا، بی‌اشتهایی جزئی و گاهی استفراغ، بالا رفتن درجه‌ی حرارت و لکوسیتوز همراه است. علائم بالینی در گربه‌ها نسبت به سگ‌ها، شدت کمتری دارد و در صورت بروز علائم، در گربه‌های با سن کمتر از ۶ ماه، بیشتر دیده می‌شود. بچه‌گربه‌ها و توله‌سگ‌ها، به دلیل فقدان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و توسعه‌ی آنتی‌بادی محافظ، بیشتر علائم بالینی را نشان می‌دهند. (Facciola et al., 2017). در ایران شناسایی کمپیلوباکتر، از سگ‌ها و گربه‌های شهر تهران گزارش شده است (Mosallanejad et al., 2020). روش معمول برای تشخیص باکتری، تهیه‌ی سوآب از مدفوع تازه یا گرفتن نمونه از رکتوم است. تست‌های رایج نظیر الایزا برای تشخیص کمک‌کننده هستند؛ اما روش مولکولی نظیر PCR، از دقت بالاتری برخوردار است. توجه به توانایی حمل ژن‌های مختلف مرتبط با حداث باکتریایی نظیر توکسین‌های گوارشی (cdt و ...) و عوامل مرتبط با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در آلودگی محیط به کمپیلوباکتر از اهمیت زیادی برخوردار است (Raeisi et al., 2017).

از آن جا که موارد عفونت ناشی از کمپیلوباکتر در انسان، در حال افزایش است و سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم ممکن است بدون علائم بالینی آلوده بوده و باکتری را از خود دفع نمایند، تعیین گونه‌های غالب این باکتری به همراه آگاهی از ژن‌های حداث و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به خصوص در حیواناتی که در محل‌های بسته و در تماس نزدیک با انسان زندگی می‌کنند، حائز اهمیت است که در این تحقیق به آن پرداخته شده است.



مواد و روش ها

جدایه‌های مورد مطالعه

در این مطالعه به روش تصادفی از ۱۰۰ نمونه مدفوع (۵۰ مورد سگ خانگی، ۵۰ مورد گربه خانگی)، نمونه گیری صورت پذیرفت. ترجیح تحقیق بر آن بود که حیوانات مورد نظر، در یک ماه گذشته سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک را نداشته باشند. از هر نمونه حیوانی، ۲ سواب اخذ گردید. یکی از سواب‌ها در میکروتیوب حاوی سرم فیزیولوژی برای بررسی مستقیم مولکولی و دیگری در محیط کشت انتقالی پرستون براث (Himedia, India) جهت بررسی میکروبی قرار گرفت. در روش میکروبی، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت انتقالی، به محیط *campylobacter selective agar* (CCDA) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B و سفوپرازون انتقال و به صورت خطی کشت گردید. هر دو محیط مایع و جامد، در جار مخصوص تحت شرایط میکروآنروفلیک به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۱۰ درصد دی اکسید کربن در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پرگنه‌های مشکوک به کمپیلوباکتر (انجام آزمایش اکسیداز بر روی پرگنه‌های با اندازه متوسط) انتخاب و آزمون‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، رشد در دمای ۲۵ و ۴۲ درجه سانتی گراد و تجزیه هیپورات سدیم انجام گردید (Mosallanejad et al., 2020). در روش مولکولی نیز در مورد سواب‌های مدفوعی اخذ شده، DNA مورد نیاز جهت آزمون مولکولی توسط کیت استخراج شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت آماده سازی و تا زمان انجام آزمایش در فریزر نگهداری گردید. در آزمون مولکولی از آغازگرهای اختصاصی جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های ژرونی و کولای به همراه ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده گردید.

توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر هم چنین ژن‌های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدول ۱ آمده است. در این تحقیق از DNA استخراج شده جدایه‌های مشکوک به عنوان DNA الگو و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR برای تکثیر این ژن‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دوازده و نیم میکرولیتر ماستر میکس، نیم میکرولیتر از هر پرایمر (10mM)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و دو میکرولیتر از هر نمونه DNA انجام پذیرفت. در تمام واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده گردید. برنامه‌های حرارتی در مورد ژن‌های مختلف متفاوت بود. در مورد ژن اختصاصی جنس و گونه، یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. برنامه حرارتی دستگاه PCR در مورد ژن‌های حدت، یک سیکل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، ۴۵ تا ۵۲ درجه (برحسب نوع ژن) به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در مورد ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی نیز برنامه حرارتی در قالبیک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ تا ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه برنامه ریزی گردید. برای بررسی و مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید (Banisharif et al., 2019).



جدول ۱- ژن هدف، توالی نوکلئوتیدی و اندازه محصول آغازگرهای مورد استفاده جهت تشخیص جنس، گونه‌ها، عوامل مقاومت آنتی بیوتیکی و حدت کمپیلوباکتر

ژن هدف	جنس / گونه (حدت/مقاومت)	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	اندازه	دمای اتصال
16SrRNA	Genus <i>campylobacter</i>	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TATT	۸۵۷	۵۹
<i>ceuE</i>	<i>C. coli</i>	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	۴۶۲	۵۹
<i>mapA</i>	<i>C. jejuni</i>	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	۵۸۹	۵۹
مقاومت				
<i>gyrA</i>	DNA-Gyrase subunit A	ATGATGAGGCAAAAAGAGA TAAACTATGAGGTGGGATGT	۴۱۰	۵۵
<i>tet(O)</i>		GCGTTTTGTTTATGTGCG ATGGACAACCCGACAGAAG	۵۵۹	۵۴
<i>cmeB</i>		TCCTAGCAGCACAAATATG AGCTTCGATAGCTGCATC	۲۴۱	۵۴
<i>bla_{oxA-1}</i>		AGAGTATAATAACAAGCG TAGTGAGTTGTCAAGCC	۳۷۲	۵۴
<i>aphA-3-1</i>		TGCGTAAAAGATACGGAAG CAATCAGGCTTGATCCCC	۷۰۱	۵۴
<i>aadE</i>		GCTGCCGCTGGAACCT TCTTTTGCCGAATCACA	۵۲۷	۵۴
ژن حدت				
<i>cdtF</i>	Campylobacter adhesin to fibronectin	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	۴۰۰	۴۵
<i>cdtA</i>	Cytolethal distending Toxin subunit A	CCTTGTGATGCAAGCAATC ACACTCCATTGCTTTCTG	۳۷۰	۴۲
<i>cdtB</i>	Cytolethal distending Toxin subunit B	GTAAAAATCCCCTGCTATCAACCA GTTGGCACTTGGAATTTGCAAGGC	۴۹۵	۴۲
<i>cdtC</i>	Cytolethal distending Toxin subunit C	CGATGAGTTAAAAACAAAAGATA TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	۱۸۲	۴۲
<i>iam1</i>	Invasion-associated marker 1	GCGCAAAATATTATCACCC TTCACGACTACTATGCGG	۵۱۸	۵۲
<i>iam2</i>	Invasion-associated marker 2	GGCGCTTTAGGGAAGCTG CTTTAAATTGAATCACGGG	۱۳۶۰	۵۲
<i>iam3</i>	Invasion-associated marker 3	TGAGGAGCTAAGGGTGCAAA AATACTGATATTTCCACA	۲۷۰	۵۲



نتایج

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد تعیین گردید. این فراوانی در روش PCR مستقیم نمونه، به ترتیب در مورد سگ و گربه ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در گربه، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۸۰ درصد و آلودگی هم‌زمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۲۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در سگ، آلودگی به گونه کمپیلوباکتر ژرونی ۹۱ درصد، آلودگی هم‌زمان به گونه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای ۹ درصد مشاهده گردید. تصویر حاصل از ردیابی جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر در شکل ۱ آمده است. در تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از تعیین فراوانی آلودگی در دو روش کشت و مولکولی، نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) نشان داد که ارتباط معنی داری بین رده‌های سنی، نوع نگهداری، وضعیت دستگاه گوارش با آلودگی کمپیلوباکتریایی وجود دارد ($P < 0.05$). ارتباط معنی داری بین نوع جنسیت، نژاد با آلودگی کمپیلوباکتریایی مشاهده نگردید ($P < 0.05$). هم چنین همان طور که در جدول شماره ۲ آمده است بر اساس نتایج آزمون فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی در آزمایش آنتی بیوگرام که به روش دیسک انتشاری صورت پذیرفت، بین جدایه‌های کمپیلوباکتریایی بیشترین مقاومت نسبت به تتراسایکلین و کمترین مقاومت در مورد پنی سیلین و جنتامایسین مشاهده گردید. آنالیز آماری نتایج حاصل از این جدول نیز نشانگر وجود اختلاف آماری معنادار بین مقاومت آنتی بیوتیکی به تتراسایکلین و آزیترومایسین با سایر آنتی بیوتیک‌ها ($p=0.002$) بود. در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت آنتی

بیوتیکی گونه‌های کمپیلوباکتر، حضور پنج ژن کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه به روش PCR چندگانه ای ارزیابی شد که ژل حاصل از ردیابی این ژن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده و توزیع حضور این ژن‌ها در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه ژرونی در مورد *bla_{oxA-61}* و در گونه کولای در مورد *bla_{oxA-61}* و *aadE1* مشاهده گردید. در مورد ژن *aphag-1* هیچ مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده نگردید. در آنالیز آماری اختلاف آماری معناداری بین حضور دو ژن *aphag-1* و *cmeB* با سه ژن *boxA-61* و *TetO* در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0.04$) مشاهده گردید. تصویر ۲ نیز به الگوی برخی از این ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در روی ژل آگارز پرداخته است.

حضور شایع ترین ژن‌های کد کننده عوامل حدت در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولای به روش PCR ارزیابی گردید که نتایج در جدول ۳ آورده شده است. همان طور که در جدول شماره ۴ آمده است تمامی ژن‌های حدت در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی حضور داشتند. در جدایه‌های کمپیلوباکتر کولای تنها ژن‌های حدت *iam1*، *cdtA* و *cdtF* ردیابی گردید. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات این جدول با مدل آماری دقیق فیشر، اختلاف آماری معناداری بین حضور ژن‌های *Iam2* و *Iam3* با سایر ژن‌های حدت در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی ($p=0.01$) و نیز بین حضور ژن‌های *cdtF* با سایر ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌های کمپیلوباکتر کولای مشاهده گردید ($p=0.001$). شکل‌های ۳ نیز به الگوی برخی از ژن‌ها حدت کمپیلوباکتریایی در روی ژل آگارز پرداخته است.



بیشترین ژن حدت در گونه ژژونی در مورد *cdtA* و در

گونه کولای در مورد *cdtF* مشاهده گردید.

جدول ۲- میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های کمپیلوباکتر به آنتی بیوتیک های مختلف

تتراسایکلین	آزیترومایسین	ونکو مایسین	جنتامایسین	پنی سیلین	جدایه میکروبی	گونه ها
۱۰۰٪ (۸)	۸۷/۵٪ (۷)	۶۲/۵٪ (۵)	۵۰٪ (۴)	۵۰٪ (۴)	۸	ژژونی- کولای

جدول ۳- فراوانی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک کمپیلوباکتریایی

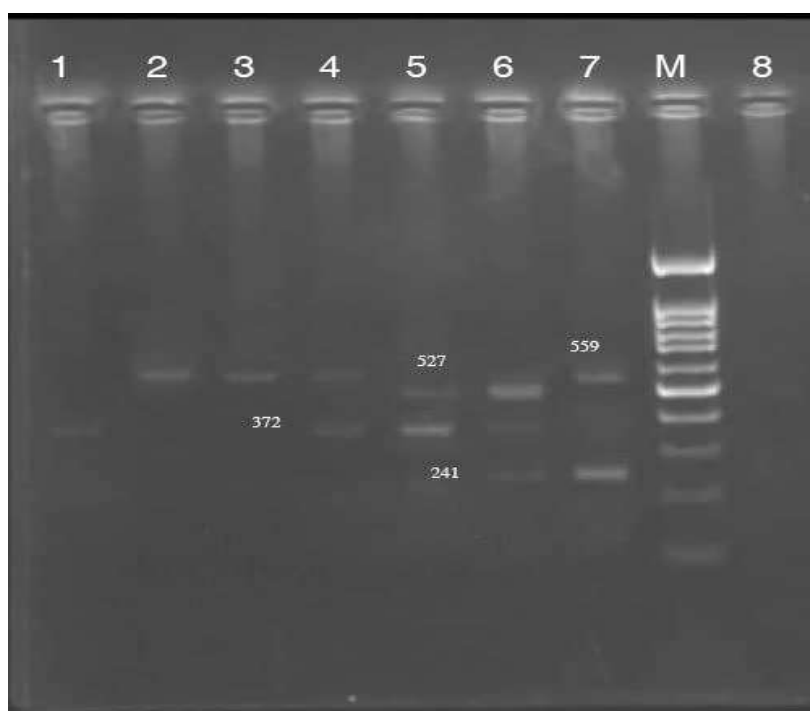
گونه (تعداد)	<i>aadE1</i>	<i>bla_{oxA}-61</i>	<i>TetO</i>	<i>cmeB</i>	<i>aphag-1</i>	<i>gyrA</i>
ژژونی (۱۴)	۸ (۵۷٪)	۱۰ (۷۱٪)	۹ (۶۴٪)	۲ (۱۴٪)	۰	۹ (۶۴٪)
کولای (۴)	۴ (۱۰۰٪)	۴ (۱۰۰٪)	۳ (۷۵٪)	۲ (۵۰٪)	۰	۲ (۵۰٪)

جدول ۴- فراوانی ژن های حدت کمپیلوباکتریایی

گونه	<i>iam1</i>	<i>iam2</i>	<i>iam3</i>	<i>cdtC</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtF</i>
ژژونی (۱۴)	۱۲ (۸۶٪)	۲ (۱۴٪)	۲ (۱۴٪)	۱۰ (۷۱٪)	۱۱ (۷۸٪)	۱۴ (۱۰۰٪)	۱۰ (۷۱٪)
کولای (۴)	۱ (۲۵٪)	۰	۰	۰	۰	۱ (۲۵٪)	۲ (۵۰٪)



شکل ۱- تصویر Multiplex PCR ژن های جنس کمپیلوباکتر به همراه گونه های ژژونی و کولای: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستونهای بعدی: قطعه ۸۵۷ جفت بازی مربوط به جنس کمپیلوباکتر و قطعات ۴۶۲ و ۵۸۹ جفت بازی گونه های کولای و ژژونی



شکل ۲- تصویر Multiplex PCR مربوط به ردیابی ژنهای کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های ژژرونی و کولای: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۸: کنترل منفی، ستونهای بعدی: قطعات ۵۵۹ جفت بازی مربوط به ژن *tet(O)* و قطعه ۲۴۱ بازی مربوط به ژن *cmeB*، قطعه ۵۲۷ جفت بازی مربوط به ژن *aadE*، قطعه ۳۷۲ جفت بازی مربوط به ژن *baloxA-61*



شکل ۳- تصویر Multiplex PCR مربوط به ردیابی ژنهای حدت گونه های ژژرونی و کولای: ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستونهای بعدی: قطعات ۳۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *cdtA*، قطعه ۴۹۵ جفت بازی مربوط به ژن *cdtB*، قطعه ۱۸۲ جفت بازی مربوط به ژن *cdtC*

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش PCR، به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. اغلب نمونه ها آلوده به کمپیلوباکتر ژرونی (۷۵ درصد) بوده در حالی که فراوانی آلودگی به کمپیلوباکتر کولای، ۱۲/۵ درصد مشاهده گردید. در مطالعات مشابه نیز فراوانی آلودگی متفاوت می باشد به شکلی که فراوانی عفونت در آلمان (۴۷/۸ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر هلویتیکوس)، ایرلند (۴۲/۹ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، سوئیس (۴۱/۹ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، نیجریه (۱۸/۳ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، نروژ (۱۸ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، آرژانتین (۱۶ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر ژرونی)، لهستان (۸۶/۹ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر ژرونی) و برزیل (۸ درصد، گونه غالب کمپیلوباکتر ژرونی) گزارش شده است (Sandberg et al., 2002). در ایران نیز تاکنون چندین مطالعه صورت گرفته است، از جمله محمدزاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ و با استفاده از روش PCR، که بر روی ۶۰ قلاده سگ خانگی در شهر کرد صورت گرفت، شیوع آلودگی، ۱۸ مورد (۳۰ درصد) ذکر گردید که از این تعداد تنها ۵ مورد (۸/۵۵ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر ژرونی بودند (Mohammadzadeh et al., 2012). محزونیه و همکاران نیز، در تحقیق روی ۱۰۰ نمونه مدفوع گربه و سگ در تهران، ۳۹ مورد آلودگی به کمپیلوباکتر گزارش نمودند (Mahzounieh et al., 2012). هم چنین وزیران و همکاران در سال ۲۰۱۶، بر روی ۵۰ نمونه مدفوع گربه، از نظر حضور کمپیلوباکتر، شیوع آلودگی را ۲۲ درصد تعیین نمودند

(Vazirian et al., 2016). در مطالعه رحیمی و همکاران بر روی ۴۷ قلاده گربه از استان های اصفهان و فارس نشان دادند که ۲۷/۷ درصد از آنها، آلوده به کمپیلوباکتر می باشند. در این میان گونه غالب کمپیلوباکتر هلویتیکوس تعیین گردید. (Rahimi et al., 2017).

میزان جداسازی اجرام کمپیلوباکتر بسته به عوامل مختلف، از جمله موقعیت جغرافیایی، گونه حیوانی، استرس، تغییرات جیره ی غذایی (مصرف غذای خام)، آلودگی با سایر عفونت های گوارشی، محیط نگهداری و روش های مختلف تشخیص آلودگی، متفاوت می باشد (Son et al., 2007).

هم چنین در بررسی حاضر فراوانی آلودگی در سگ های با سن کمتر از یک سال، بیشتر بوده و ارتباط آماری معنی داری بین رده های سنی و فراوانی آلودگی وجود داشت. همسو با این بررسی، Selwet و همکاران در سال ۲۰۱۵، Holmberg و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Vazirian و همکاران در سال ۲۰۱۶، نیز میزان فراوانی عفونت در حیوانات جوان را بیشتر از رده های سنی بالاتر اعلام نمودند که از جمله دلایل آن می توان به ضعیف بودن توله ها به شکل مادرزادی، عدم دسترسی به مادر پس از تولد (نخوردن آغوز)، تغذیه از شیر جایگزین شونده اشاره کرد (Holmberg et al., 2015). پایین بودن سطح ایمنی در سگ و گربه های جوان، آنها را مستعد ابتلا به بیماری های مختلف، از جمله عفونت ناشی از گونه ی کمپیلوباکتر ژرونی می کند. در بررسی حاضر، ارتباط معنی داری بین جنسیت و آلودگی وجود نداشت. همسو با این یافته، محزونیه و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Lazou و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعه روی سگ ها، نشان دادند که هیچ ارتباط معنی داری بین جنس و میزان آلودگی وجود ندارد (Lazou et al., 2014). تحقیق حاضر، از این نظر با نتایج محققین



فوق همخوانی دارد. هر چند در بررسی در بررسی وزیران و همکاران، در گربه‌ها، مشاهده گردید که فراوانی آلودگی در جنس ماده بیشتر از نر می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، هم چنین ارتباط معنی‌داری بین نوع تغذیه و آلودگی وجود داشت به شکلی که فراوانی آلودگی در سگ‌های مصرف کننده‌ی غذای خام بیشتر از پخته بود. به خصوص گوشت مرغ یکی از مواد غذایی است که به شکل خام مورد استفاده‌ی گربه‌ها و سگ‌ها قرار می‌گیرد و از آن جا که پرندگان می‌توانند آلوده به کمپیلوباکتر شوند، در انتقال این عامل به حیوانات خانگی بسیار مؤثر می‌باشند. James و همکاران در سال ۲۰۱۲، نیز نشان دادند که احتمال بروز آلودگی در سگ‌هایی که از گوشت خام تغذیه می‌کنند، بیشتر می‌باشد (James., 2012). همچنین Andrzejewska و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳، بیان کردند که بسیاری از حیوانات آلوده به کمپیلوباکتر، از منابع غذایی موجود در محیط اطراف مانند گوشت خام پرندگان وحشی و سایر حیوانات تغذیه داشته‌اند (Andrzejewska et al., 2013). در تحقیق حاضر، شانس آلودگی سگ‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سگ‌های به ظاهر سالم بود. همسو با بررسی حاضر Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Selwet و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در گربه‌ها و سگ‌های مبتلا به اسهال بیشتر از سالمین است که احتمالاً به دلیل بیمار بودن حیوانات و دفع اجرام کمپیلوباکتر می‌باشد (Selwet et al., 2015). البته بحث عفونت‌های همزمان و ضعف سیستم ایمنی نیز می‌تواند مطرح باشد. در موارد بروز بیماری‌های مختلف، خوردن پسماندهای غذایی، تغییر ناگهانی رژیم غذایی و بسیاری از عوامل دیگر، اسهال اتفاق می‌افتد که متعاقب آن بدن به تدریج

ضعیف می‌گردد و این خود عامل بروز بسیاری از عفونت‌های دیگر از جمله آلودگی به گونه‌های کمپیلوباکتر می‌باشد. برای جلوگیری از انتقال این عامل، باید محل نگهداری حیوانات و ظروف آب و غذا، مرتب با مواد آنتی‌سپتیک ضد عفونی گردد. همان طور که در جدول ۲ مشخص است تمامی نمونه های جدا شده به روش کشت در این مطالعه حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند.

گونه های کمپیلوباکتر مانند سایر ارگانیسم های ایجاد کننده بیماری مشترک انسان و دام به طور فزاینده ای به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند. توسعه بالقوه مقاومت توسط این میکروب ها مزایای عوامل ضد میکروبی را به خطر انداخته است (Davies et al., 2010). گونه های مقاوم کمپیلوباکتر می توانند از طریق خوردن مستقیم غذای آلوده یا از طریق تماس با حیوانات به انسان منتقل شوند. سازمان بهداشت جهانی عدم استفاده از آنتی بیوتیک به عنوان محرک رشد را که متعلق به یک کلاس ضد میکروبی است که در پزشکی انسانی استفاده می شود، پیشنهاد کرده است. استفاده مداوم از آنتی بیوتیک های اضافی در حیوانات باعث می شود که حیوانات نسبت به دستیابی به سویه های مقاوم ارگانیسم حساس تر شوند (Angulo et al., 2004). پیامدهای سلامت عمومی استفاده از آنتی بیوتیک در حیوانات را می توان با در نظر گرفتن هر موقعیت پاتوژن-آنتی بیوتیک مهمتر ارزیابی کرد. مقاومت چند دارویی در هر دو گونه کمپیلوباکتر از مطالعات مختلف گزارش شده است (Wieland et al., 2005. Nadalian et al., 2017).

در ایالات متحده، شیوع کمپیلوباکتر مقاوم به آنتی بیوتیک در لاشه جوجه های گوشتی ۹۹/۵ درصد به یک یا چند آنتی بیوتیک و ۲۸/۴ درصد نسبت به دو یا



چند آنتی بیوتیک نشان داده شده است. مقاومت نشان داده شده به تتراسایکلین توسط کمپیلوباکتر ژرئونی ۹۵/۵ درصد و کولای ۹۶/۳ درصد گزارش گردیده است (Son et al., 2007). به طور مشابه، مطالعه انجام شده در اسلوونی بروز مقاومت آنتی بیوتیکی برای کمپیلوباکتر کولای ۷۵/۹ درصد و کمپیلوباکتر ژرئونی ۳۸/۵ درصد اعلام گردیده است. میزان مقاومت مشاهده شده به انروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، اریترومايسين و تتراسایکلین به ترتیب ۵۸/۲، ۴۹/۱، ۱۴/۵ و ۱۲/۷ درصد بوده است. ۱۱ درصد از کمپیلوباکترهای جدا شده به اریترومايسين و سیپروفلوکساسین و ۱۲/۷ درصد از جدایه ها به تتراسایکلین و کینولون ها مقاوم بوده اند (Kurincic et al., 2007). Mackiw و همکاران نیز در مطالعه خود بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های کمپیلوباکتر را با ۹۷/۹ درصد به سیپروفلوکساسین، ۶۴/۳ درصد از همان جدایه ها به تتراسایکلین، ۹/۱ درصد به اریترومايسين و ۶/۳ درصد به اریترومايسين نشان داده اند. با این حال، ۷ درصد از ۱۴۳ سویه کمپیلوباکتر مقاوم به حداقل سه آنتی بیوتیک غیر مرتبط مقاوم بودند. مطالعه ای در مورد شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سگ ها که در هند انجام شد نشان داد که تمام جدایه های کمپیلوباکتریایی به استرپتومایسین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، لینکومایسین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین و پنی سیلین مقاوم بودند (Mackiw et al., 2012). بیماریزایی گونه های کمپیلوباکتر وابسته به عوامل مختلفی است که در این تحقیق حضور شایع ترین ژن های کد کننده عوامل حدت در دو گونه کمپیلوباکتر ژرئونی و کمپیلوباکتر کولای بررسی گردید. از ۷ ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن ها در کمپیلوباکتر ژرئونی وجود داشت اما در جدایه

های کمپیلوباکتر کولای تنها ۳ ژن *cdtA*, *cdtF* و *iam1* ردیابی گردید. نتایج مطالعات دیگر نیز با نتایج تحقیق حاضر همخوان است. در مطالعه بنی شریف و همکاران از ۱۱ ژن حدت مورد مطالعه تمام ژن های بجز *iam* در جدایه های کمپیلوباکتر ژرئونی وجود داشت و البته در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۵ ژن *cdtC* و *iam*, *recR*, *cdtA*, *cdtB* ردیابی گردید (Banisharif et al., 2019). Wiczorek و همکاران نیز فراوانی حضور ژن *iam1* در جدایه های کمپیلوباکتر ژرئونی و کمپیلوباکتر کولای جدا شده از گوشت مرغ را به ترتیب ۳۱ و ۲۷ درصد گزارش نمودند (Wiczorek., 2010).

نتیجه گیری نهایی

از آن جایی که علاقه به نگهداری حیوانات خانگی از جمله سگ و گربه به خصوص در برخی مناطق کشور رو به افزایش بوده و احتمال انتقال آلودگی کمپیلوباکتر به صاحبان این حیوانات وجود دارد؛ لذا انجام آزمایش کشت مدفوع یا بررسی آلودگی به طرق مختلف از جمله روش های مولکولی، به منظور تشخیص سریع آلودگی، جهت درمان به موقع و اقدامات پیشگیری کننده دیگر ضروری می باشد. از طرفی شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های جدا شده نشانگر مصرف بی رویه آنتی بیوتیک به ویژه آنتی بیوتیک های غیر مجاز می باشد و به همین جهت ضروری می باشد مصرف آنتی بیوتیک زیر نظر دامپزشک و بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام انجام گردد.

منابع

1. Acke, E., Whyte, P., Jones, B.R., McGill, K., Collinsand, J.D. and Fanning, S. (2006), *Prevalence of thermophilic Campylobacter species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland, Veterinary Record, 158(2): 51-54.*



10. Kurincic, M., Berce, I., Zorman, T., Mozina, S. S. (2005). *The prevalence of multiple antibiotic resistance in Campylobacter spp. from retail poultry meat*, *Food Technology Biotechnology*, **43(2)**: 157-163.
11. Lazou, T., Houf, K., Soultos, N., Dovas, C., and Iossifidou, E. (2014). *Campylobacter in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance*, *International Journal of Food Microbiology*, **173 (3)**: 54-61.
12. Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., Rozynek, E. (2012). *Antibiotic resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from food in Poland*, *Food Control*, **23(2)**: 297-301.
13. Mahzounieh, M.R., Ghorbani, M., Zahraii, M.T. (2012). *Identification of campylobacter species in feces of apparently healthy dogs and cats by mPCR*, *Comparative pathobiology*, **10(4)**: 1101-1106.
14. Mohammadzadeh, A., Hakimi, R., Sharifi, A., Ghorbani, M. (2012). *Investigation of campylobacter contamination of domestic dogs by PCR*, *sanandaj veterinary journal*, **6(2)**: 25-31.
15. Mosallanejad, B., Gharibi, D., Avizeh, R., Abbassi, R. (2020). *Isolation and characterization of Campylobacter spp. in feces of companion cats in Ahvaz district by culture and PCR methods*, *Iranian Veterinary Journal*, **16(1)**: 94-104.
16. Nadalian, M.G.h., Tadjbakhsh, H., Mokhber Dezfouli, M.R., Akbarein, H. (2017). *A review of the most important Zoonoses with a special vision towards emerging and re-emerging diseases and its status in Iran*, *Veterinary Clinical Pathology*, **11(43)**: 197-224.
17. Natsos, G., Mouttotou, N.K., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A. and Koutoulis, K.C. (2019). *The genus Campylobacter: detection and isolation methods, species identification & typing techniques*, *Journal of the Hellenic veterinary medical society*, **70(1)**: 1327-1338.
2. Andrzejewska, M., Szczepanska, B., Klawe, J.J., Spica, D. and Chudzinska, M. (2013). *Prevalence of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli species in cats and dogs from Bydgoszcz (Poland) region*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **16 (1)**: 115-120.
3. Angulo, F., Nargund, V., Chiller, T. (2004). *Evidence of an Association Between Use of Anti- microbial Agents in Food Animals and Anti- microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance*, *Journal of Veterinary Medicine*, **51(8)**: 374-379.
4. Banisharif, GH., Karimi, S., Momtaz, H. (2019). *Virulence and antimicrobial resistance pattern in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains isolated from the liver of slaughtered broiler chickens in Chaharmahal va Bakhtiari province*, *New Findings in Veterinary Microbiology*, **2(1)**: 15-25.
5. Bojanic, K., Midwinter, A., Marshall, J., Biggs, P. and Acke, E. (2019). *Isolation of emerging campylobacter species in working farm dogs and their frozen home killed raw meat diets*, *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*, **31(1)**: 23-32.
6. Davies, J., Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiol. Molecular Biology Review*, **74(3)**: 417-433.
7. Facciola, A., Rioso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S.A., Lagana, P. (2017). *Campylobacter: from microbiology to prevention*, *Journal of preventive medicine and hygiene*, **58(2)**: 79-92.
8. Holmberg, M., Rosendal, T., Engvall, E.O., Ohlson, A. and Lindberg, A. (2015). *Prevalence of thermophilic Campylobacter species in Swedish dogs and characterization of C. jejuni Isolates*, *Acta Veterinaria Scandinavica*, **57(19)**: 1-8.
9. James, G.F. (2012). *Enteric bacterial infections*. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. Greene. Vol. 1. 4th Ed. St. Louis Missouri 370-374.



International Journal of Antimicrobial Agents, **29(4)**: 451-455.

24. Vazirian, B., Torkan, S., Khamesipour, F. (2016). *Isolation of Campylobacter species in feces of cats of Isfahan and Shahrekord. First national conference zoonosis*, 1-2.

25. Wieland, B., Regula, G., Danuser, J., Wittwer, M., Burnens, A.P., Wassenaar, T.M., Stark, K.D. (2005). *Campylobacter spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP*, *Journal of Veterinary Medicine*, **52 (4)**: 183-189.

26. Wiczorek, K.(2010). *Antimicrobial resistance and virulence markers of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from retail poultry meat in Poland*, *Bull Vet Inst Pulawy*, **54**:563-9. 27. Zenebe, T., Zegeye, N., Egale, T.(2020). *Prevalence of campylobacter species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in ethiopia: a systematic review and meta-analysis*, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **19(61)**:2-11.

27. Zenebe, T., Zegeye, N., Egale, T.(2020). *Prevalence of campylobacter species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in ethiopia: a systematic review and meta-analysis*, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **19 (61)**:2-11.

18. Raeisi, M., Khoshbakht, R., Ghaemi, E. A., Bayani, M., Hashemi, M., Seyedghasemi, N. S., Shirzad-Aski, H. (2017). *Antimicrobial resistance and virulence-associated genes of Campylobacter spp. isolated from raw milk, fish, poultry, and red meat*, *Microbial Drug Resistance*, **23(7)**: 925-933. 19. Rahimi, E., Alipoor-Amroabadi, M., Khamesipour, F. (2017). *Investigation of prevalence of thermotolerant Campylobacter spp. in livestock feces*, *Canadian Journal of Animal Science*, **97(2)**, 207-213.

20. Rodrigues, C. G., Melo, R. T., Fonseca, B. B., Martins, P. A., Ferreira, F. A., Araújo, M. B., Rossi, D. A. (2015). *Occurrence and characterization of Campylobacter spp. isolates in dogs, cats and children*, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **35**: 365-370.

21. Sandberg, M., Bergsj, B., Hofshagen, M., Skjerve, E., Kruse, H. (2002). *Risk factors for Campylobacter infection in Norwegian cats and dogs*, *Preventive Veterinary Medicine*, **55 (4)**: 241- 253.

22. Selwet, M., Clapa, T., Galbas, M., Slomski, R., porzucek, F. (2015). *The Prevalence of Campylobacter spp. and occurrence of virulence genes isolated from dogs*, *Polish Journal of Microbiology*, **64(1)**: 73-76.

23. Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., Harrison, M. A. (2007). *Antimicrobial resistance of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses*,



Campylobacter isolates in Dogs and Cats and the pattern of their virulence and antibiotic resistance genes

Saljoughi M¹, Sharifzadeh A^{2*}

1. Graduate of Veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine , , Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 14 December 2026 Accepted: 09 January 2026

Abstract

Introduction: Campylobacter is one of the important common pathogens between humans and animals. Despite the fact that the majority of human infections are caused by eating contaminated food that has not been properly cooked, it is also transmitted through different ways, such as fecal-oral, consumption of unsanitary contaminated water, and contact with pets. The purpose of this research was to determine the frequency of virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter isolates from pets in Isfahan city. **Materials and methods:** In this research, 100 samples of feces of pets were analyzed with two culture and PCR methods. In the culture method, the frequency of Campylobacter infection in domestic dogs and cats were determined as 10% and 6%, respectively, and in the PCR method as 22% and 10%. **Results:** The results of the chi square test (Pearson test) showed a significant relationship between the contamination of pets with the variable of age, type of feeding, maintenance system and contamination with other digestive disease. The most common species in all cases of campylobacter infection of pets was Campylobacter jejune. In the antiprogram test, all isolated samples were resistant to at least one antibiotic. All isolated strains were resistant to tetracycline antibiotic. Regarding antibiotic resistance genes, the highest frequency of antibiotic resistance genes was observed in C. jejune species in the case of bla_{oxa}-61 and in C. Coli species in the case of bla_{oxa}-61 and aadE1. Of the 7 virulence genes studied, all genes were present in Campylobacter jejune, but only 3 genes cdtA, cdtF and iam1 were detected in Campylobacter coli isolates. **Conclusion:** Finally, due to the significant frequency of campylobacter infection in pets and considering the role they can play for the health of human societies, it is very important to carry out periodic tests and due to the high prevalence of antibiotic resistance in isolates, it seems necessary to use. Antibiotics based on the results of the antiprogram.

Keywords: Antibiotic resistance, Campylobacter, Cat, Dog, Virulence

*Corresponding author: Ali Sharifzadeh

Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord ,Iran

E. mail: sharifzadeh@iaushk.ac.ir