به کارگیری سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR در دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ

مریم هادیان[۱]، حسن ممتاز[۲*]، امیر شاکریان[۳]

۱-دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

۲- استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

۳- استاد بهداشت مواد غذایی، گروه کنترل و بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران،

hamomtaz@yahoo.com, ha.momtaz@iau.ac.ir

چکیده

کمپیلوباکترها به ویژه دو گونه *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* با داشتن سویه‌ها و میزبان‌های مختلف، یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ انجام شد.

این مطالعه مقطعی بر روی ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از گوشت خام مرغ انجام گرفت. به منظور ژنوتایپینگ ایزوله‌ها از سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR استفاده گردید. ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت خام مرغ در روش ERIC-PCR در ۷ پروفایل، در روش RAPD-PCR در ۳ پروفایل و در روش REP-PCR در ۳ پروفایل قرار گرفتند.

تمام جدایه های مورد بررسی دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودندکه سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* را نشان می‌دهد. روش‌های مورد استفاده در این مطالعه هر کدام ابزارهای قدرتمند در دسته بندی *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* می‌باشد ولی طبق یافته‌های حاصله، روش ERIC-PCR روش مناسب‌تری نسبت به روش‌های دیگر برای تایپینگ ودسته بندی جدایه های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* می‌باشد .

کلمات کلیدی: *کمپیلوباکترژژونی*، *کمپیلوباکترکلی*، ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR

مقدمه

کمپیلوباکترها با داشتن گونه‌ها و میزبان‌های مختلف، یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شوند. در جنس کمپیلوباکتر دو گونه مهم به نام *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مسئول اصلی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکترها در انسان محسوب می‌شوند. امروزه کمپیلوباکترها از شایع‌ترین علل اسهال باکتریایی در سراسر جهان محسوب شده و بر طبق آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد از اسهال‌های میکروبی ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد (۱).

برای بیش از ۳۰ سال، استاندارد طلایی برای دسته‌بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* روش سروتایپینگ مبتنی بر آنتی‌ژن پایدار در برابر حرارت پلی‌ساکارید کپسولی بوده است. به دلیل تنوع ژنومی بالا در *کمپیلوباکتر ژژونی*، بسیاری از بخش‌های پلی ساکارید کپسولی‌در سروتیپ ها وجود دارند و درمجموع در گونه ژژونی ۴۷ سروتیپ شناسایی‌شده است، اما به دلیل واکنش‌متقاطع، سروتیپ ها به ۳۵ سروتیپ پلی ساکارید کپسولی طبقه‌بندی می‌شوند(۲).

در سایر روش‌های ایمونولوژیک نظیر، آگلوتیناسیون لاتکس و الایزا، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی کلونال برای شناسایی لیپوپلی ساکاریدها، فلاژلین یا سایر آنتی ژن‌های غشای بیرونی استفاده می‌کنند که امکان شناسایی سریع و اختصاصی‌کمپیلوباکترهای گرمادوست را بر روی محیط کشت جامد یا مایع فراهم می‌کند(۲). چندین آزمایش بیوشیمیایی مانند آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، احیای نیترات و نوار استات سرب معمولاً توسط‌سازمان‌های نظارتی مواد غذایی برای تیپ بندی ایزوله‌های جداشده انجام می‌شود(۳). آزمایش‌های بیوشیمیایی نظیر اندازه گیری فعالیت L-آلانیل آمینوپپتیداز، جهت تمایز بین کمپیلوباکتر ها از جنس‌های مرتبط و شناسایی برخی جدایه ها در سطح گونه انجام می‌شود(۵-۳).

اخیراً چندین روش مولکولی برای تشخیص ارتباط جدایه ها و منبع آلودگی معرفی شده است. تکثیر ژن‌های هدف با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روش ترجیحی برای استفاده توسط آزمایشگاه‌های نظارت و کنترل کیفی است. مزیت استفاده از PCR مقرون به صرفه بودن و سادگی آن است و سنجش‌های مبتنی بر PCR تائیدی مؤثر برای تمایز آن دسته از ایزوله‌هایی است که با سنجش‌های بیوشیمیایی قابل‌تشخیص نیستند. در مطالعات قبلی برای شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر یک منطقه متغیر از ژن *16S rRNA* ، که متمایز کننده گونه‌ها بود، مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. اخیراً، سنجش‌هایی برای هدف قرار دادن سایر ژن‌ها به منظور افزایش ویژگی و حساسیت تست‌های مولکولی و همچنین طبقه بندی ایزوله‌های بیماری زا توسعه یافته‌اند(۲).

امروزه روش‌های مولکولی یا درواقع روش‌های انگشت‌نگاری ژنومی به‌عنوان دقیق‌ترین روش‌ها برای طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها در جهت اهداف اپیدمیولوژیک تلقی می‌گردند(۶،۷). روش‌های مولکولی قدرت تشخیص و تکرارپذیری بسیار بالایی نسبت به روش‌های سنجش فنوتیپی دارند. همچنین از توانایی بالایی در تعیین تفاوت‌های ژنومی کوچک و ثبات مولکولی بالا در مقایسه با سنجش‌های فنوتیپی همان‌گونه باکتری برخوردار می‌باشند(۸). روش‌های RAPD-PCR و ERIC-PCR برای مطالعه اپیدمیولوژی *کمپیلوباکتر* مناسب می‌باشند. روش RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ مولکولی است. در سال‌های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت و دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، هزینه نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه‌ای مورد استفاده ویژه‌ای قرارگرفته است(۹). علاوه بر تکنیک RAPD-PCR تکنیک ERIC-PCR به‌منظور مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی و سنجش‌های مبتنی برRep-PCR استفاده از

پرایمرهایی می‌باشد که هدف آن‌ها توالی تکراری حفاظت‌شده در ژنوم باکتری می‌باشد. ازجمله گروه‌هایی از عناصر تکراری، توالی‌های تکراری توافقی درون ژنی انتروباکتریال یا ERIC می‌باشد (۱۰). Rep-PCR روشی برای نشانه‌گذاری ژنوم‌های باکتریایی است که الگوهای خاص به‌دست‌آمده از PCR عناصر DNA تکراری موجود درون ژنوم‌های باکتریایی را مورد بررسی قرار می‌دهد. سه مجموعه اصلی عناصر تکراری برای اهداف تایپینگ استفاده می‌شوند: توالی پالیندرومیک برون ژنی تکراری(Rep)، توالی اجماع درون ژنی تکراری انتروباکتریایی (ERIC) و عناصرBOX. ثابت شده است که روش‌های Rep-PCR و ERIC-PCR برای جداسازی و تعیین انواع گونه‌های کمپیلوباکتر مفید می‌باشند(۱۰).

از آنجایی که گوشت و فراورد های گوشتی طیور به ویژه گوشت مرغ از منابع مهم انتقال باکتری‌های غذازاد نظیر کمپیلوباکتر هستند و در مزارع پرورش آن‌ها از آنتی بیوتیک ها به شکل بی رویه استفاده می‌شود، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه سه روش وابسته به PCR یعنی روش‌های RAPD-PCR ، Rep-PCR و ERIC-PCR جهت دسته بندی نتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ انجام شد.

روش کار:

ایزوله‌ها: تعداد ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر شامل ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکتر ژژونی* (ایزوله‌های شماره ۱۸-۱) و ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکتر کولی* (ایزوله‌های ۳۶-۱۹) که در مطالعات قبلی از گوشت خام مرغ جدا شده بودند، انتخاب گردید. ایزوله‌های مورد مطالعه به شکل گلیسیرینه در محیط مایع Bolton Broth واجد ۳۰ درصد گلیسیرین در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند(۱۳-۱۱).

تأیید ایزوله‌ها: جهت تائید قطعی وجود گونه کمپیلوباکتر و شناسایی گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* در باکتری‌های ذخیره شده در محیط Bolton Broth از ردیابی ژن‌های ***16srRNA, ceuE, mapA*** به روش PCR (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی از باکتری‌های رشد کرده در این محیط با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific آلمان طبق دستورالعمل کیت، استخراج گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر (۱۴)

هدف	نام ژن	توالی پرایمر(۳ـ ۵)	اندازه محصول (جفت باز)
جنس کمپیلوباکتر	***16srRNA***	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	۸۵۷
کمپیلوباکترژژونی	***mapA***	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	۵۸۹
کمپیلوباکترکولی	***ceuE***	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	۴۶۲

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، نیم میکرومول از زوج پرایمرهای F و R (مربوط به سه ژن)، ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط هر ایزوله تنظیم شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۱۱،۱۵).

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 و ایزوله‌های جداشده در مطالعات قبلی

به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد(۱۱،۱۵).

دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌ها: جهت دسته‌بندی ژنتیکی و تیپ بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از گوشت خام مرغ از سه روش ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و شرایط انجام واکنش PCR در مورد هر کدام از این تکنیک‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است:

جدول ۲- توالی پرایمرها و شرایط انجام واکنش PCR جهت دسته بندی ژنتیکی گونه‌های *کمپیلوباکتر*

نام روش	توالی پرایمرها	شرایط انجام PCR	برنامه حرارتی واکنش PCR	منبع
ERIC-PCR	R1: ATGAAGCTCCTGGGGATTCAC R2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	5 µL PCR buffer 10X 3 mM Mgcl2 250 µM dNTP (Fermentas) 0.3 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 2 min. 45 cycle: 94 0C ---------- 45 s 38 0C ---------- 40 s 72 0C ---------- 60 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۱۱
RAPD-PCR	OPA 11:CAA TCGCCG T	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.3 µM of each primers F & R 2.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 3min. 45 cycle: 94 0C ---------- 60 s 36 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 120 s 1 cycle: 72 0C ---------- 5 min	۱۶
Rep-PCR	Rep1: IIINCGNCGNCATCNGGC Rep2: NCGNCTTATCNGGCCTAC	5 µL PCR buffer 10X 2 mM Mgcl2 200 µM dNTP (Fermentas) 0.2 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template	1 cycle: 94 0C ---------- 2 min. 31 cycle: 94 0C ---------- 30 s 40 0C ---------- 60 s 72 0C ---------- 110 s 1 cycle: 72 0C --------- 16 min	۱۷

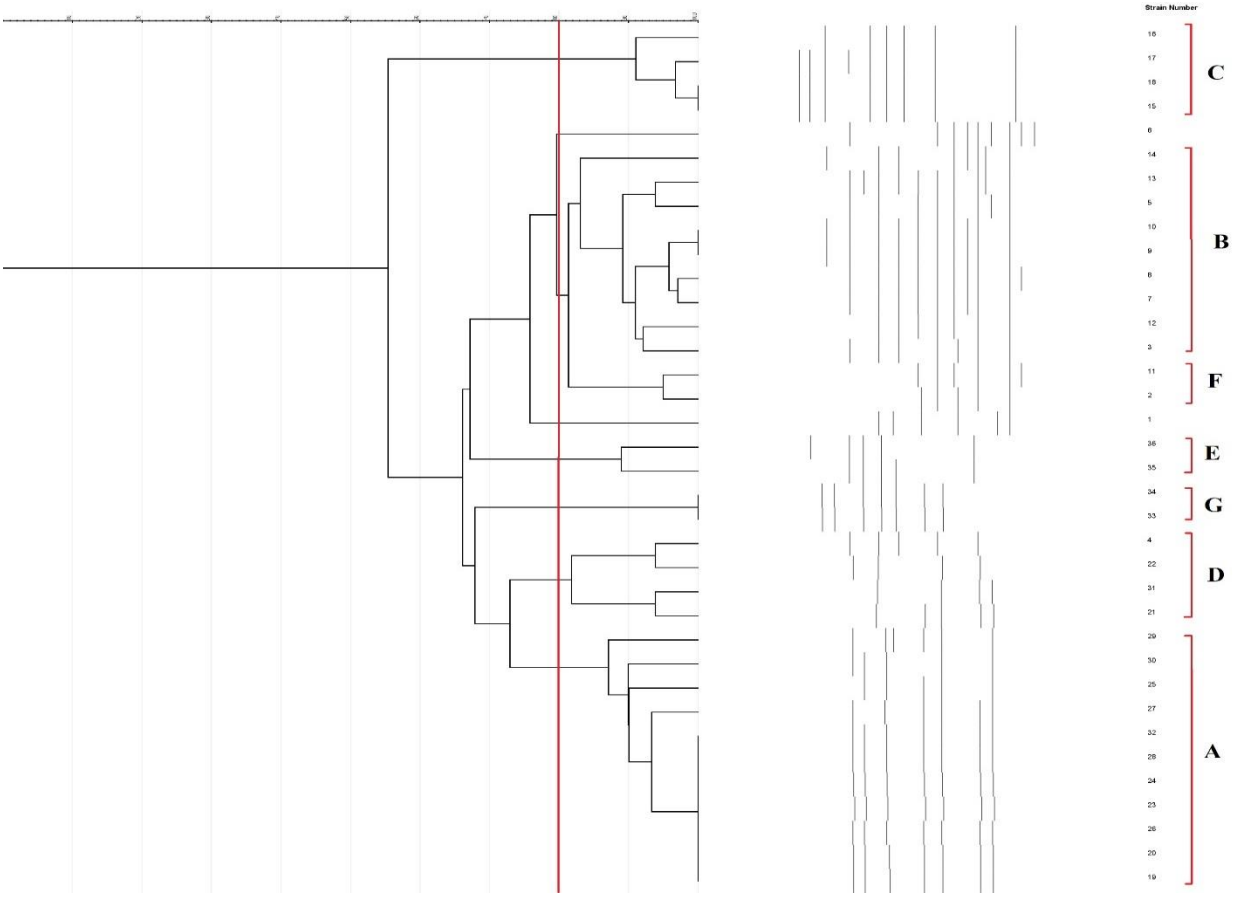
در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از الکتروفورز محصول روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت انجام و بعد از مشاهده ژل در زیر نور UV از ژل حاصله تصویربرداری و ثبت گردید.

آنالیز نتایج: در هر کدام از سه تکنیک ژنوتایپینگ، آزمایش PCR روی ایزوله‌های موردمطالعه سه نوبت انجام و پس از اطمینان از تعداد و اندازه باندهای ایجادشده در هر ایزوله، الگوی باندی حاصله طبق روش توصیه شده توسط Heras و همکاران (۲۰۱۵) به کمک نرم‌افزار Gel J آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش UPGMA شناسایی و دندروگرام مربوط به هر نشان‌گر ترسیم گردید(۱۸).

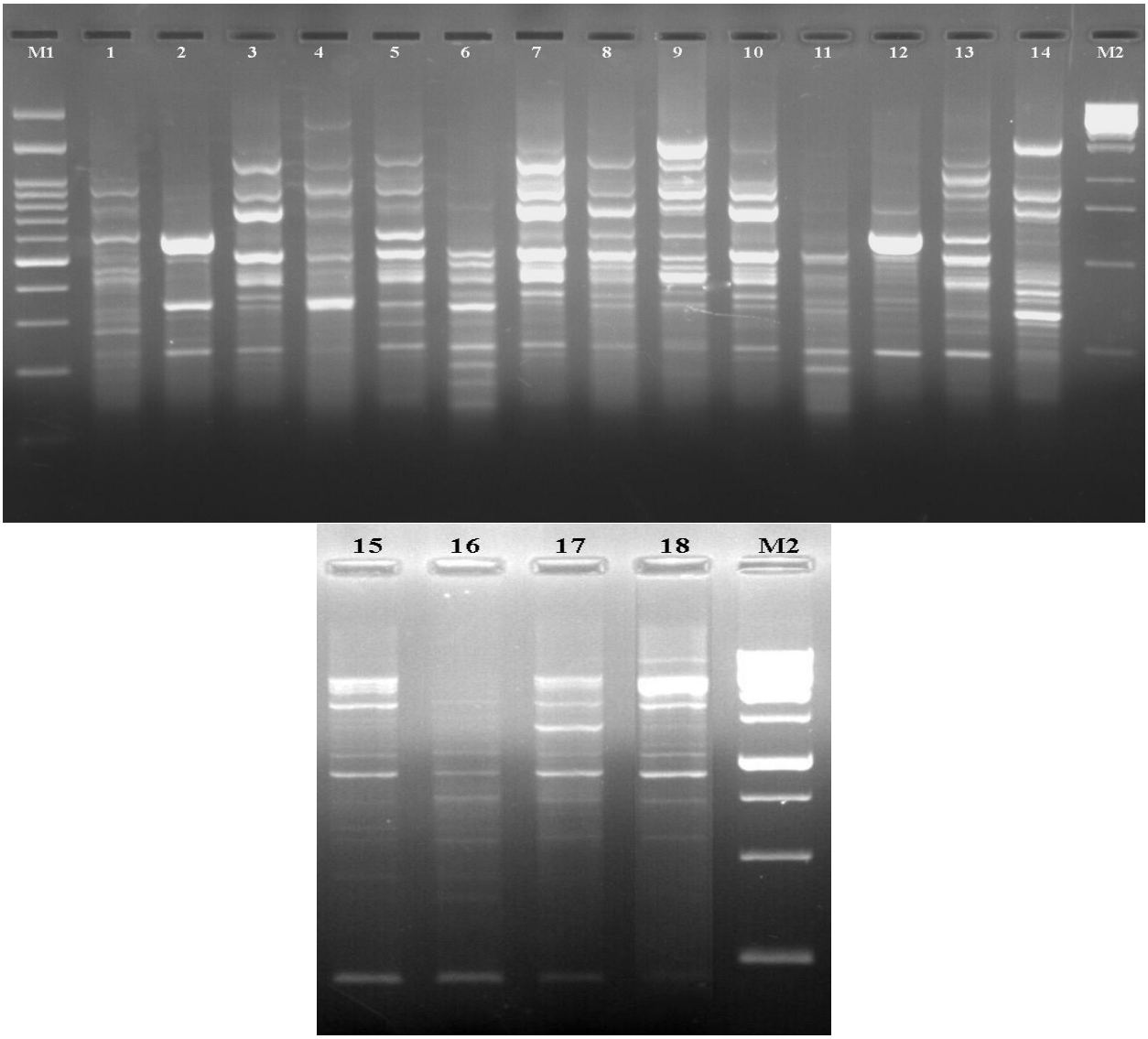
یافته‌ها:

در روش ERIC-PCR مجموع ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در ۷ پروفایل A-G با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۵/۳ درصد قرار گرفتند (شکل۱). این الگوی کلاسترینگ براساس شباهت ۵۵ در صدی وتکرار پذیری ۹۵ درصدی دارای تعدادی عضو می‌باشد. در آنالیز ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با روش ERIC-PCR باندهای مختلف در محدوده ۲۶۰۰-۱۲۰ جفت باز مشاهده شد که ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به این ایزوله‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. در ژنوتایپینگ این ۱۸ ایزوله با نشانگر ERIC-PCR، ایزوله‌های مورد نظر در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۸/۴ درصد قرار گرفتند

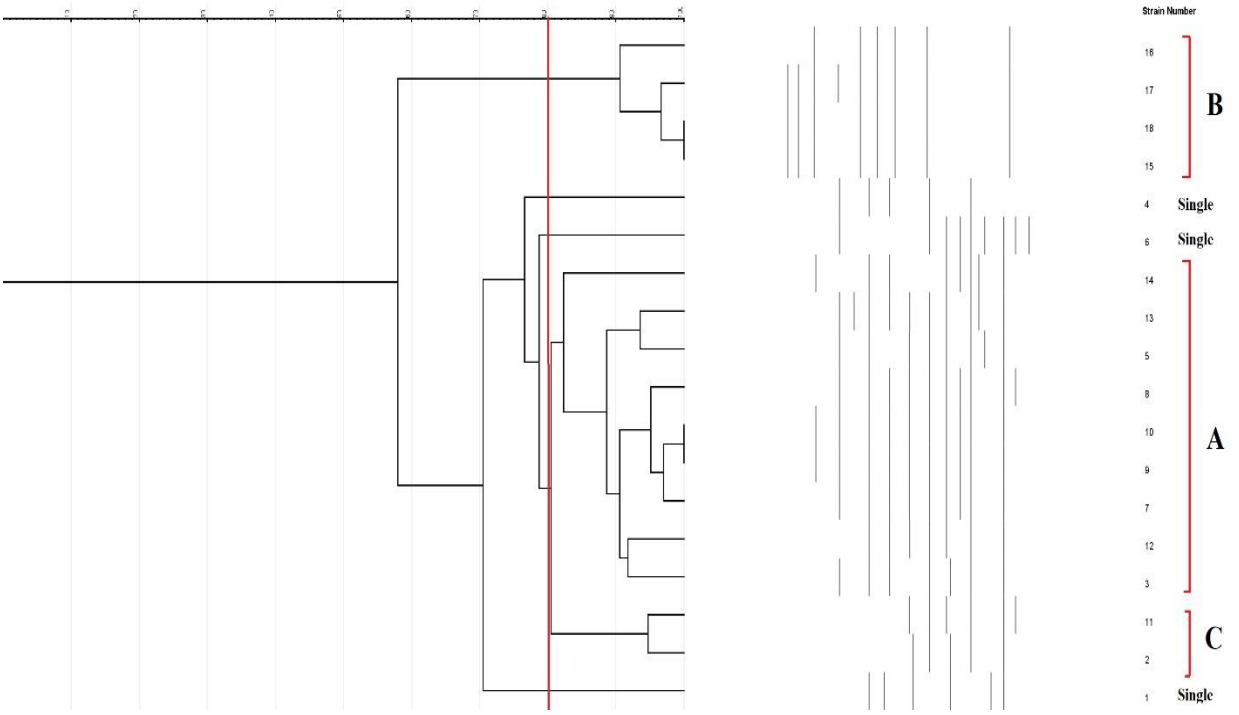
(شکل۳). الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* نشان گر حضور باندهای مختلف در محدوده ۲۸۰۰-۱۱۰ جفت باز بود که با بررسی این الگوی باندی ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در قالب ۴ پروفایل A-D با قرابتی معادل ۱۰۰-۶۲/۳ درصد تقسیم شدند (اشکال ۴ و ۵).



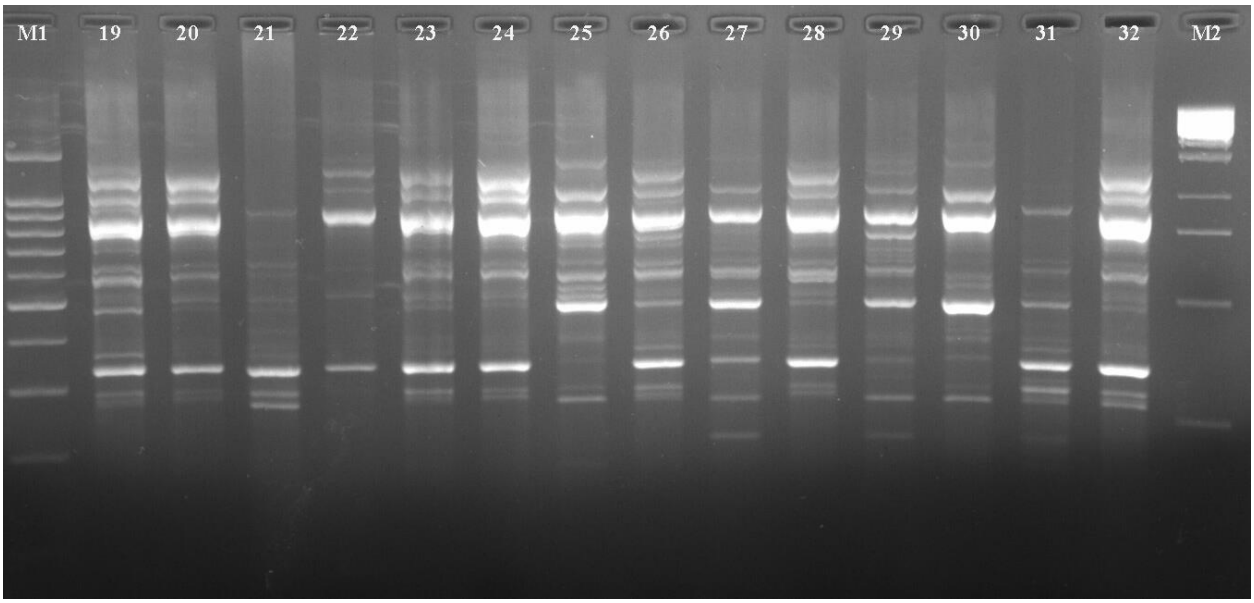
شکل ۱- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR

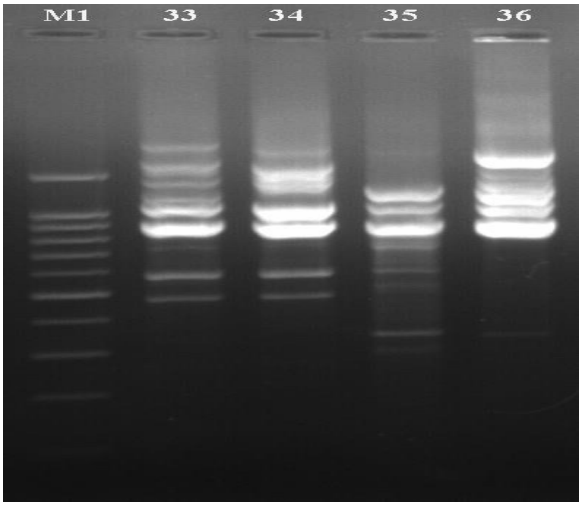


شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ
(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

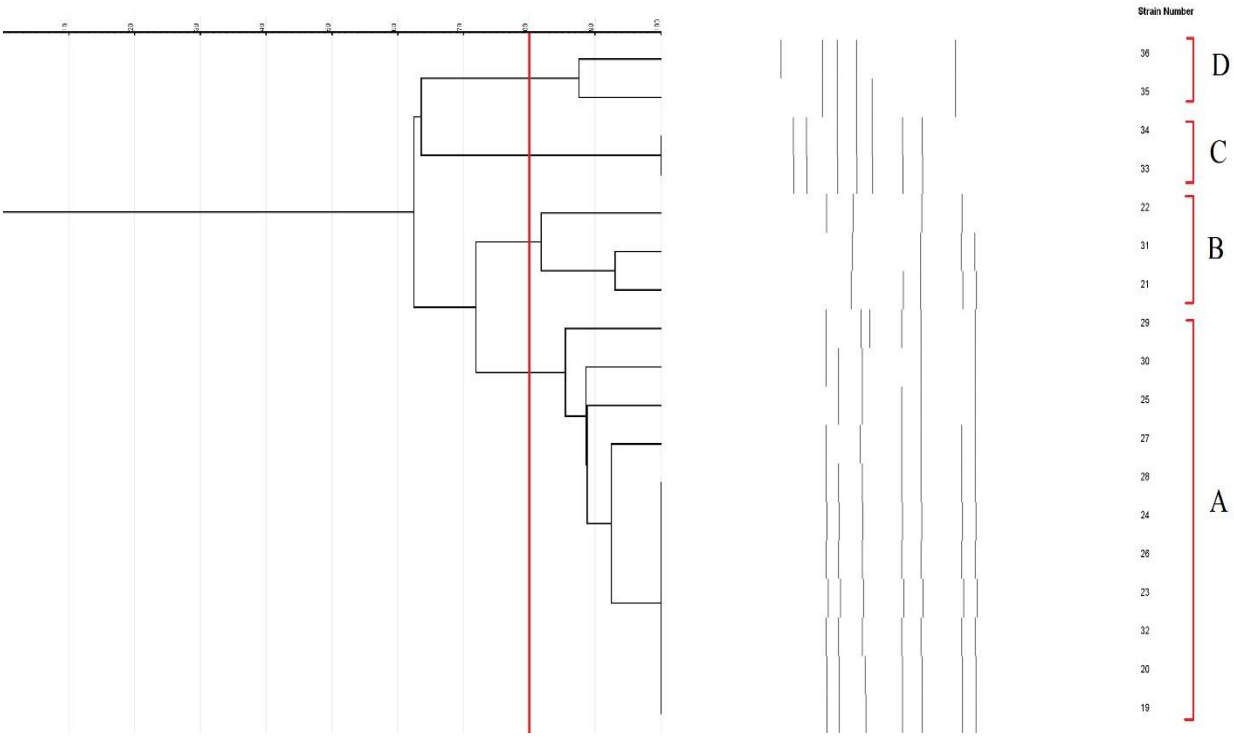


شکل ۳- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR



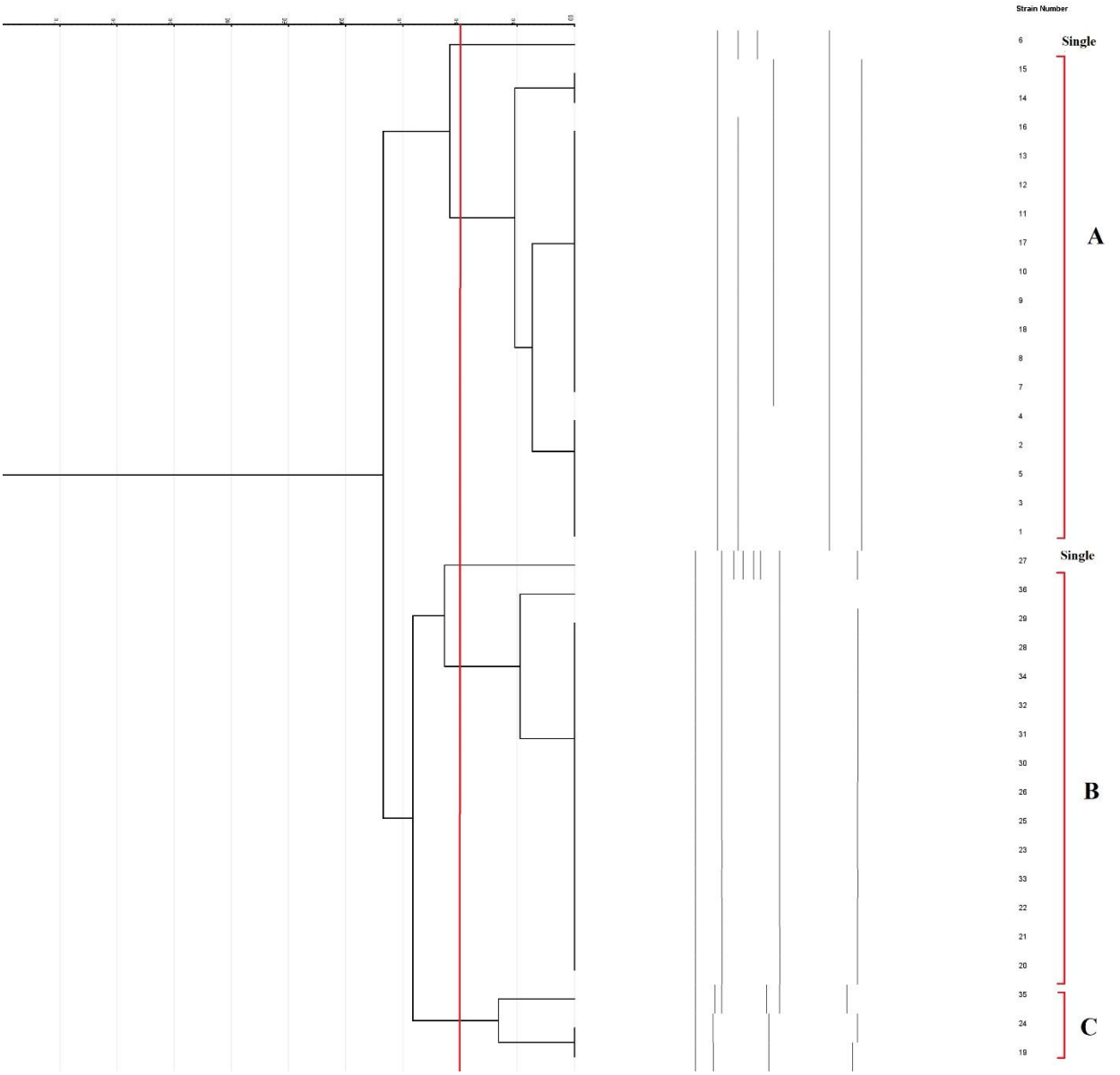


شکل ۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

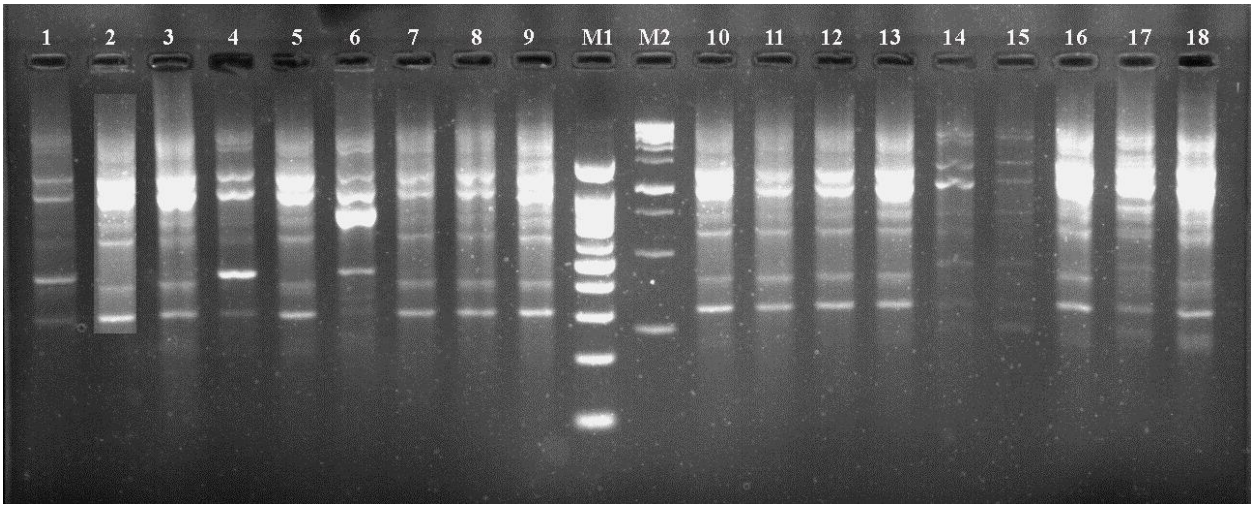


شکل ۵- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر ERIC-PCR

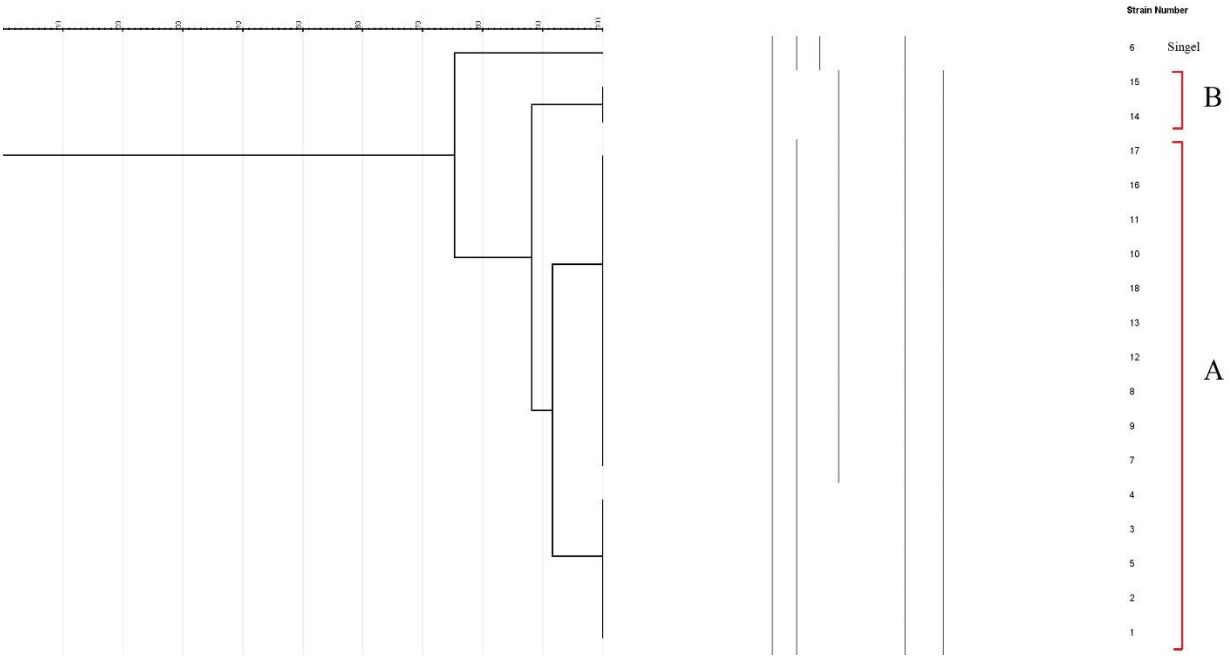
در تکنیک RAPD –PCR با کمک تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۵۵/۳ درصد قرار گرفتند (شکل ۶) طوری که ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با داشتن باندهای مختلف ۴۹۰۰-۲۲۰ جفت باز، در ۲ پروفایل A-B با قرابتی معادل ۱۰۰-۷۵/۴ درصد و ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* با محدوده باندی ۴۷۰۰-۳۱۰ جفت باز در ۲ پروفایل A-B با قرابتی معادل ۱۰۰-۷۰ درصد قرار گرفتند (اشکال ۷ تا ۱۰).



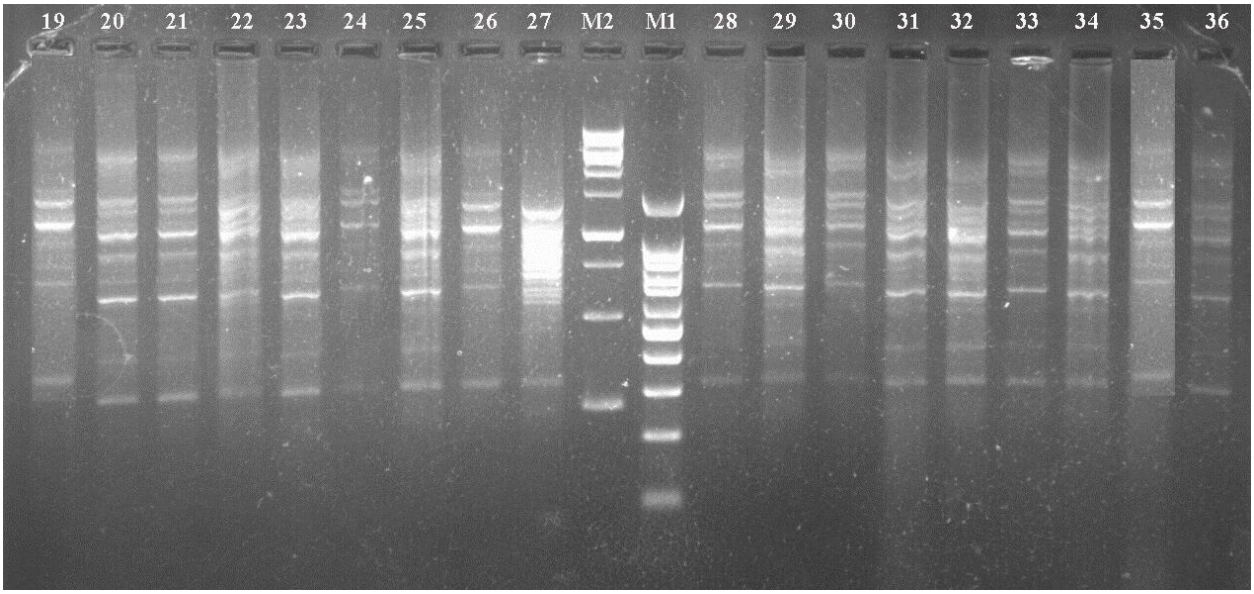
شکل ۶- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR



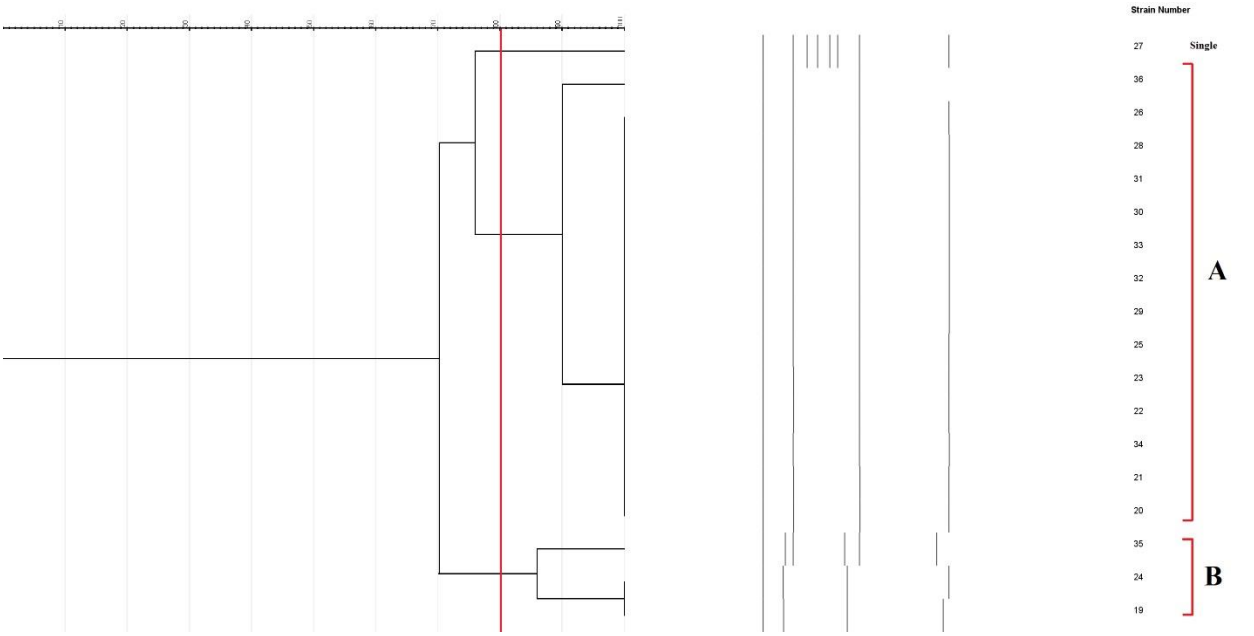
شکل ۷- ژل حاصل از الکتروفورز محصول RAPD-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۸- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR

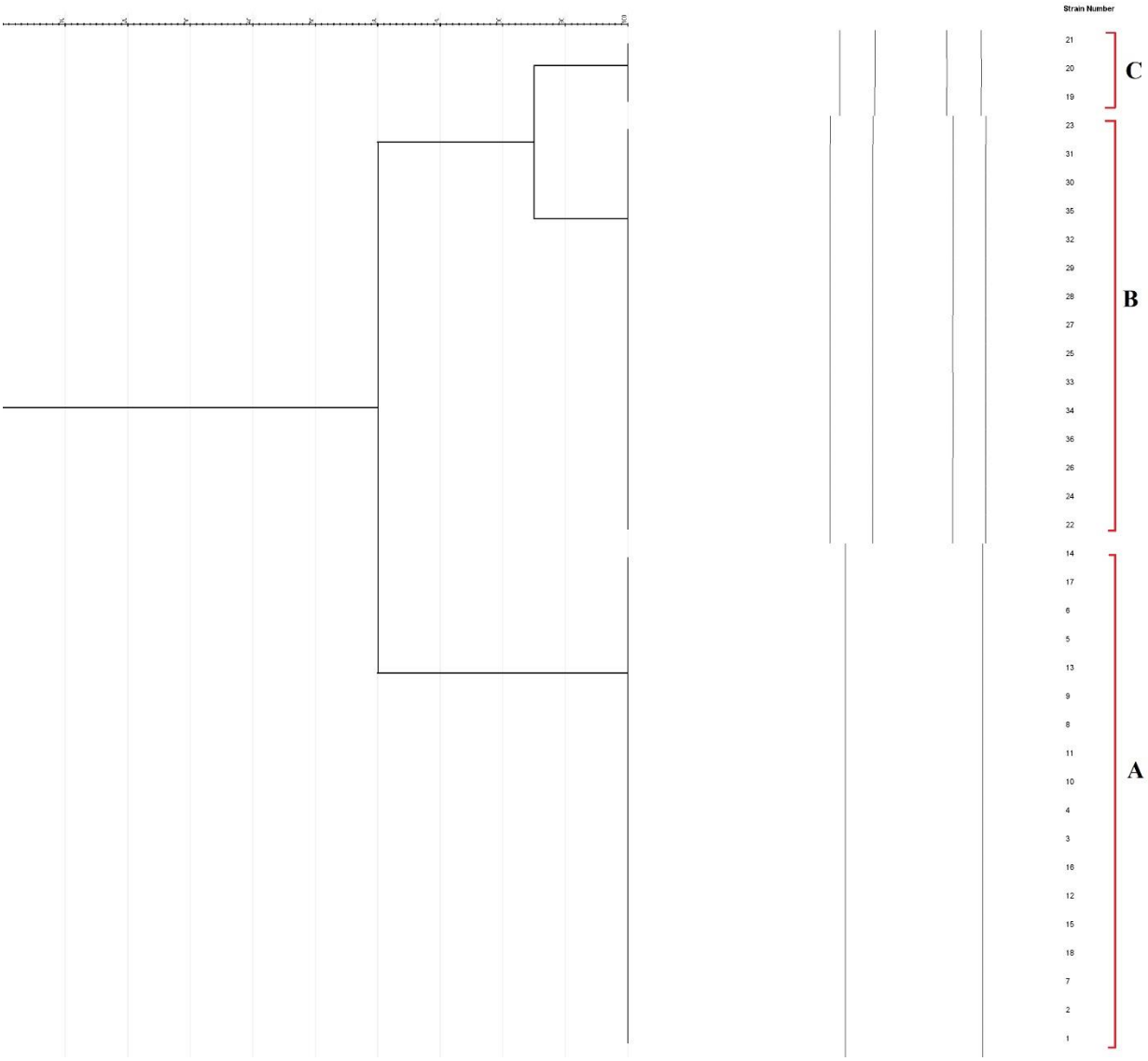


شکل ۹- ژل حاصل از الکتروفورز محصول RAPD-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



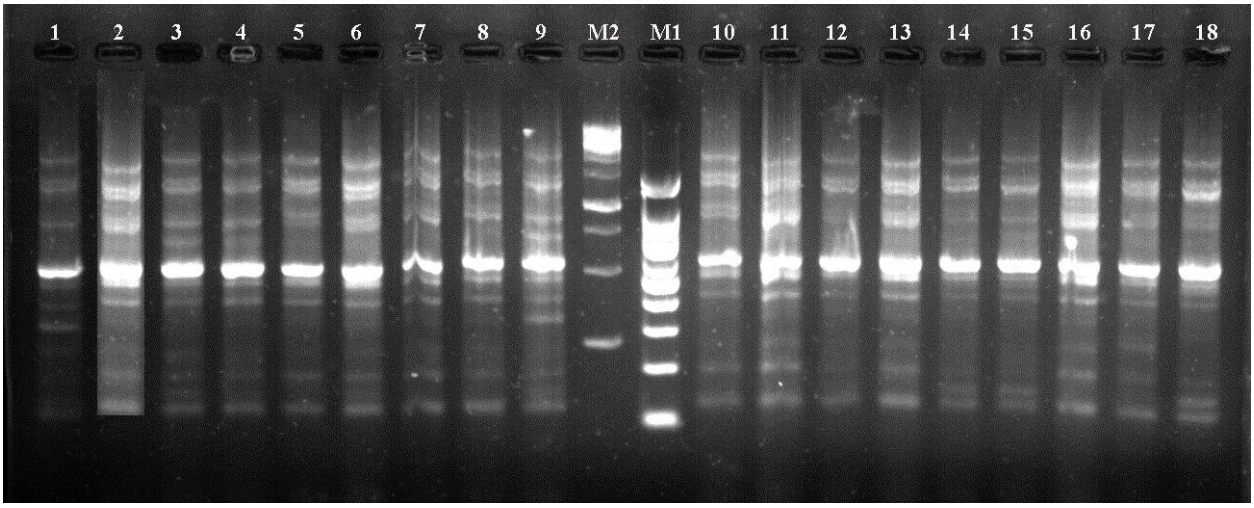
شکل ۱۰- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر RAPD-PCR

در شکل ۱۱، دندروگرام حاصل از آنالیز الگوی باندی ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه با نشان گر REP -PCR آورده شده است که همان گونه که مشهود است این ایزوله‌ها در ۳ پروفایل A-C با قرابتی معادل ۱۰۰-۶۰ درصد قرار گرفته‌اند.

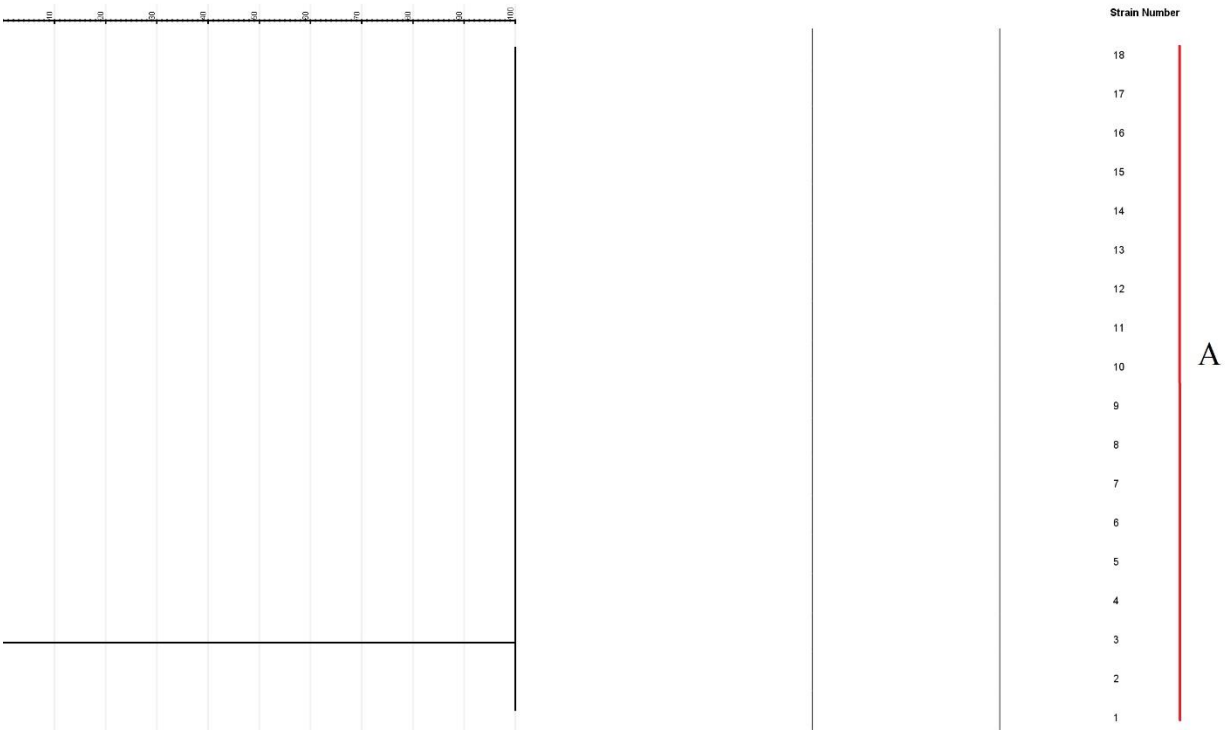


شکل ۱۱- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR

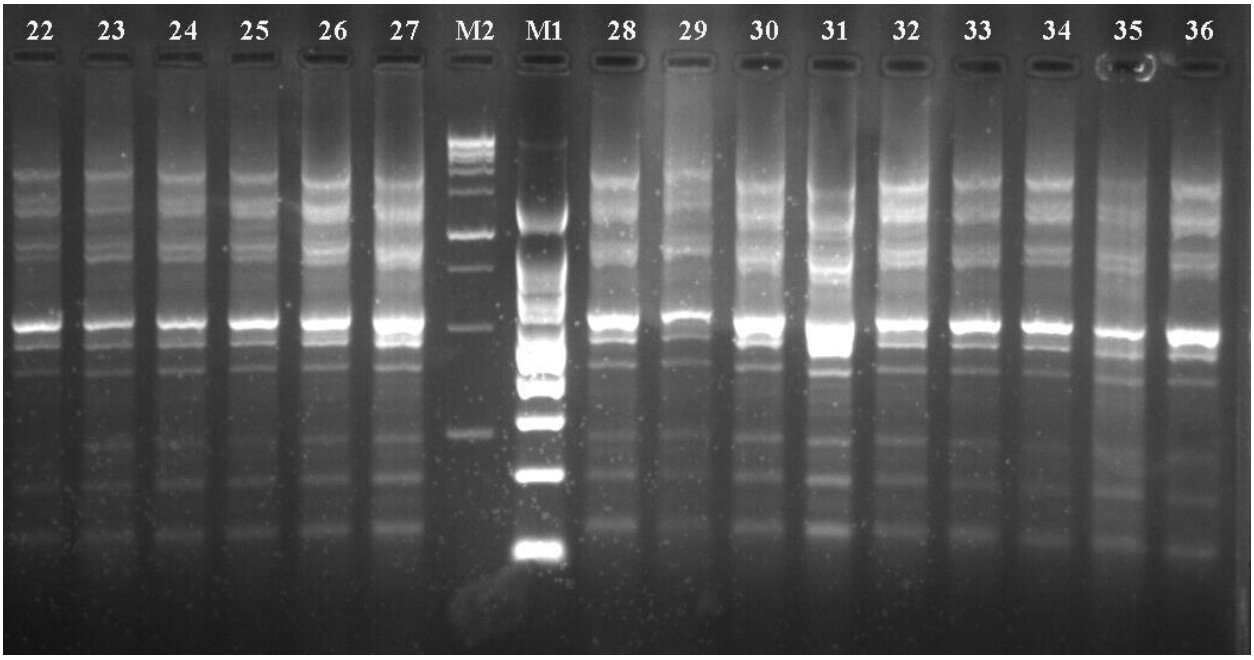
در آنالیز ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* با این نشانگر، باندهای مختلف معادل ۲۱۰۰-۱۱۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱۲) که همگی در ۱ پروفایل با قرابتی معادل ۱۰۰-۸۰ درصد قرار گرفتند (شکل۱۳). در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی*، در الکتروفورز محصول REP -PCR باندهای مختلف در محدوده، ۱۹۰۰-۱۱۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱۴) که در آنالیز الگوی باندی حاصله، قرابتب معادل ۱۰۰ درصد در بین آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱۵).



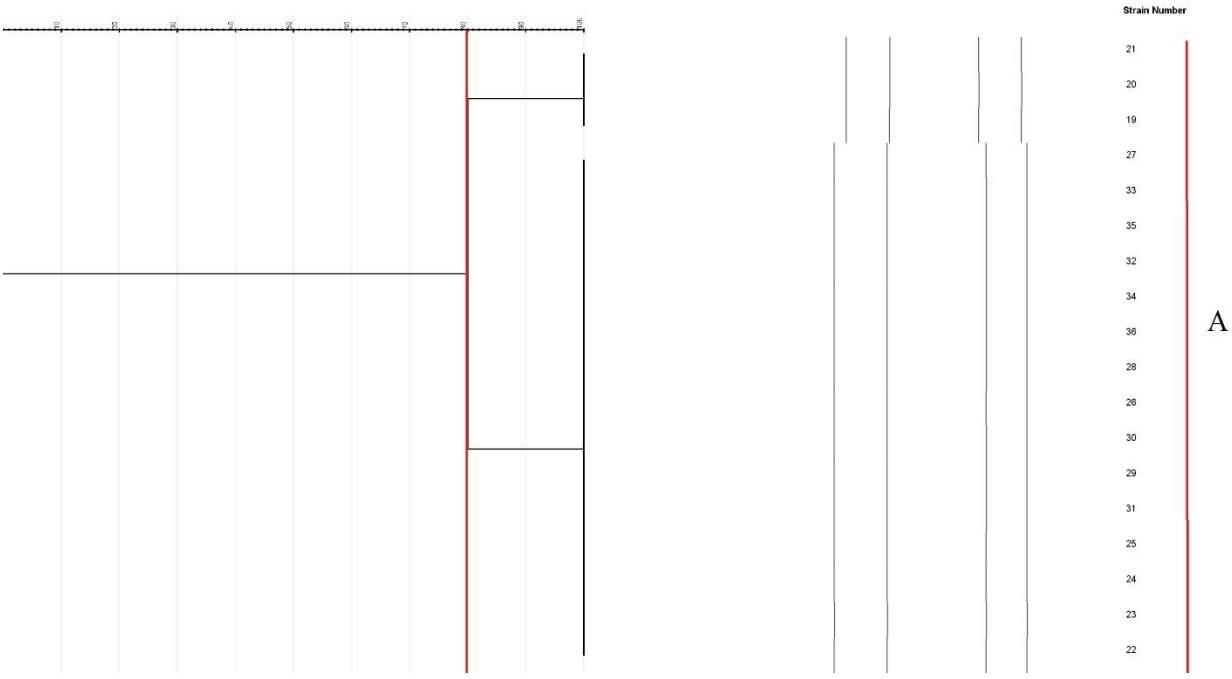
شکل ۱۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول Rep-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ
(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۱۳- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر ژژونی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR



شکل ۱۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول Rep-PCR در مورد ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از گوشت خام مرغ (ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



شکل ۱۵- دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلو باکتر کولی* جدا شده از گوشت خام مرغ با نشانگر Rep-PCR

بحث:

تشخیص سریع و دقیق پاتوژن‌های زئونوز برای رسیدگی به وضعیت بیمار، کنترل بیماری و حفاظت از سلامت عمومی امری ضروری می‌باشد. یکی از پاتوژن‌های مهم زئونوز، باکتری کمپیلوباکتر است که به‌عنوان عامل اصلی ایجاد عفونت باکتریایی در دستگاه گوارش شناخته شده است. طیور (شامل گوشت خام، فرآورده‌های مرغ و محصولات جانبی) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خطر برای ایجاد کمپیلوباکتریوز انسانی شناسایی شده‌اند(۱۹). در مطالعه Kovalenko و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که پوست مرغ شایع‌ترین محل برای کلونیزه شدن گونه‌های گرمادوست *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* بوده و این محصول با بیش‌ترین موارد بروز کمپیلوباکتریوزیس در انسان مرتبط است (۲۰). درمطالعه حاضر از سه روش مبتنی بر PCR یعنی ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR به منظور ژنوتایپینگ جدایه های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* استفاده شد و الگوی ژنتیکی جدایه های مورد نظر با سه روش یاد شده ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نشان دادکه جدایه های مورد مطالعه در هریک از ۳ روش مورد استفاده دارای الگوی باندی (قطعات تکثیر شده DNA) متفاوتی هستند .این تنوع در تعداد باندها می‌تواند مربوط به توالی پرایمر مورد استفاده، دسترسی به مکان‌های متعدد اتصال پرایمر در ژنوم و یا کیفیت DNA الگو باشد. تمام جدایه های مورد مطالعه دارای الگوی باندی پلی مورفیک بودند و هیچ مونوفورمیسم باندی برای هیچ کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشد. وجود الگوی باندی پلی مورفیک در استفاده از تکنیک‌های به کار برده شده نشان می‌دهد که سرعت بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* وجود دارد و سازگاری واقعی در این باکتری‌ها با ژنومی به طول ۵۵۷۰ فریم خوانش راپیش بینی می‌کند. نکته مهم در تفسیر نتایج حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های میکروبی با تکنیک‌های وابسته به PCR این است که، ایزوله‌هایی که دارای الگوی باندی کاملاً مشابه بوده و هیچ تفاوتی در تعداد و اندازه‌های قطعات تکثیر شده در PCR ندارند، به‌عنوان یک کلون محسوب می‌شوند. کلونی که بیشترین فراوانی را داشته باشد کلون A محسوب می‌شود و ایزوله‌هایی که در ۳-۲ باند با کلون A متفاوت باشند کلونA_1، ایزوله‌هایی که دارای ۶-۴ باند متفاوت باشند کلون A_2 و ایزوله‌هایی با حداقل ۷ باند متفاوت، کلون نامرتبط قلمداد می‌شوند (۲۱). در مطالعه Igwaran، Okoh در سال ۲۰۲۰ از مجموع ۴۰۲ ایزوله کمپیلوباکتر جداشده از منابع مختلف (گوشت، شیر گاو و آب) در مناطق مختلف، ۸۵ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و ۶۷ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* شناسایی شد که از این تعداد ۷۱ ایزوله (۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* و ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی*) جهت مطالعه ژنوتایپینگ انتخاب شدند. آنالیز الگوی باندی حاصل از آزمایش ایزوله‌ها با روش ERIC-PCR با نرم‌افزار GelJ نشان دادند که ۳۶ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* مورد مطالعه در ۲۹ پروفایل و ۴ کلاستر و ۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* در ۲۹ پروفایل و ۶ کلاستر قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان‌گر تنوع ژنتیکی بالا در ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جداشده از منابع مختلف بود(۲۲). در مطالعه حاضر در روش-ERIC PCR، ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت خام مرغ در ۷پروفایل و ۱۸ ایزوله انتخابی *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* به ترتیب در ۳ و۴ پروفایل قرار گرفتند . در مطالعه‌ای در ایران، Staji و همکاران (۲۰۱۸)، به مقایسه دو روش RAPD و ERIC در دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جداشده از مدفوع جوجه‌های گوشتی و بوقلمون پرداختند. در این مطالعه ۶۰ ایزوله (۳۰ ایزوله جداشده از مدفوع جوجه‌های گوشتی و ۳۰ ایزوله جداشده از مدفوع بوقلمون‌های پرورشی) ارزیابی شد.۶۰ ایزوله مورد نظر در روش RAPD در ۶ پروفایل و در روش ERIC در ۲۱ پروفایل قرار گرفتند. یکی از پروفایل‌های متعلق به ایزوله‌های جداشده از جوجه‌های گوشتی قرابتی معادل ۸۳ درصد با ایزوله‌های جداشده از مدفوع بوقلمون داشت. وجود این تشابه ژنتیکی نشان‌گر آلودگی متقاطع بین نمونه‌ها بود (۱۶). در مطالعه حاضر، با به کارگیری تکنیک RAPD-PCR ۳۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شده از گوشت خام مرغ در ۳ پروفایل

و ۱۸ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* مورد مطالعه، هر کدام در ۲ پروفایل قرار گرفتند. Ammar و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر، خصوصیات مولکولی (الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع عوامل حدت) و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جداشده از منابع انسانی و دامی را ارزیابی کردند. در این مطالعه ۳۲/۸ درصد از ایزوله‌های جداشده از مدفوع انسان و گوشت خام مرغ مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی داشته و در روش ERIC-PCR در ۵ کلاستر قرار گرفتند (۲۳). مطالعات انجام شده در خصوص ژنوتایپینگ ایزوله‌های میکروبی، شباهت قابل توجهی را بین منبع سویه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و بروز عفونت همه گیر با این باکتری در زمان استفاده از نشانگر RAPD-PCR در یک دوره زمانی خاص در منطقه‌ای تعریف شده را معرفی می‌کند (۲۷-۲۴). مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ نشان داد که برخی از سویه‌های *کمپیلوباکترکولی* هیچ گونه پلی موزفیسم باندی در الکتروفورز محصول PCR نداشتند و شباهت ژنتیکی بالای ۱۰۰ درصد را نشان دادند. در این مطالعه،۳۵ ایزوله *کمپیلوباکترکولی* آنالیز شده در ۲۹ ژنوتیپ گروه بندی شدند (۲۸). مطالعات قبلی نشان دادند که REP-PCR می‌تواند به طور قابل اعتمادی تحت گروه‌های کمپیلوباکتر را از همدیگر متمایز کند و به عنوان یک روش تایپینگ ارزان و قابل اعتماد استفاده شود(۲۹).

Behringer و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۱۰۰ نمونه از طیور زنده و گوشت طیور گوشتی را جمع‌آوری کرده و با روش‌های flaA-RFLP، MLST، PFGE، REP-PCR آنالیز کرده‌اند. تمام این روش‌ها همزمان برای تشخیص *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* انجام شد. ژنوتایپینگ ایزوله‌ها با روش REP-PCR برای تمایز سویه‌های *کمپیلوباکترژژونی* بهتر از *کمپیلوباکترکولی* بود ولی در هر دو روش REP-PCR و flaA-RFLP ایزوله‌های وجود داشتند که بین *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* غیرقابل تمایز بودند و به نظر می‌رسید به‌صورت تصادفی بوده و هیچ ارتباطی به گونه، مکان و منبع ندارد. اما نتایج PFGE و MLST مرتبط با مکان جغرافیایی نمونه‌ها بود. دو روش، PFGE و MLST بیشترین هماهنگی و تشابه را با هم داشتند. و همچنین قدرت تمایز بالاتری نسبت به REP-PCR وflaA-RFLP برای تفکیک *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* از خود نشان دادند (۳۰).

Ghorbanalizadgan و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۴۰۰ نمونه از مدفوع کودکان زیر ۵ سال را از نظرحضور ژن *flaA* در گونه‌های کمپیلوباکتر به روش RFLP مورد بررسی قرار داده و با نرم‌افزار MEGA آنالیز کردند که به ترتیب ۴۳ و ۱۲ نمونه از نمونه‌های موردمطالعه از نظر سایت‌های بررسی در ژن *flaA* متفاوت و جدید بودند. روش RFLP روشی، ارزان و سریع و قابل‌اعتماد برای مطالعات اپیدمیولوژیک جدایه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و تعیین منابع آلودگی در جوامع بزرگ و کوچک است (۳۱).

در انتخاب نوع روش تیپ بندی مولکولی، باید قدرت تکنیک، تکرارپذیری نتایج، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سهولت تفسیر نتایج را در نظر گرفت. روش‌های نوین مولکولی برخلاف روش‌های متداول فنوتیپی که بر مبنای خصوصیات ظاهری و تغییرپذیر می‌باشند، بر پایه ترادف غیرقابل تغییر یا کم تغییرپذیر ژنی در میکروارگانیسم مربوطه استوار بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها در مقایسه با روش‌های سنتی، قدرت افتراق دهی بالاتر و کاربرد گسترده‌تری برای انواع گونه‌های میکروبی دارند (۳۲).

در مطالعه Strakova و همکاران (۲۰۲۳)، چهار روش مختلف ژنوتایپینگ باکتری‌ها شامل روش‌های Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST), Multilocus Sequence Typing (MLST), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) و Multiplex PCR binary Typing جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* جدا شده از منابع مختلف غذایی مقایسه گردید. نتایج نشان داد که هر چند روش multiplex PCR binary typing دارای حساسیت کمتری از سه روش دیگر است اما می‌تواند برای

ژنوتایپینگ باکتری‌ها بر پایه حضور انواع ژن‌های حدت مورد استفاده قرار گیرید (۳۳).

بر اساس مطالعاتی که در گذشته انجام شده میزان بالایی از پلی مورفیسم در ژنوم این باکتری گزارش شده است(۱۶،۱۷). ارتباط بین نتایج روش‌های به کار برده شده نشان می‌دهد که در ایزوله‌های کمپیلوباکتر جدا شده پلی مورفیسم زیادی وجود دارد که اکثراً به دلیل سرعت بالا در تغییرات ژنتیکی است. این تنوع بالا ممکن است یکی از مزایای انتخابی برای یک سویه باشد تا خود را به محیط عادت دهد و می‌تواند برای انتشار و اهلی شدن سویه‌های وحشی مفید باشد. تنوع ژنتیکی می‌تواند ناشی از استقرار متقاطع یا آلودگی با منبع یکسان یا کسب ژن‌های مستقل از سویه‌های محیطی باشد. انتقال دام به دام نیز هر چند احتمال پائینی دارد، اما احتمال آن صفر نیست. تائید انتقال آلودگی متقاطع به طور دقیق و صحیح امکان پذیر نمی‌باشد، زیرا عوامل مختلفی در این امر دخالت دارند و وجود هر یک از الگوهای باندینگ در باکتری کمپیلوباکتر می‌تواند سویه محیطی غالب در یک مکان را نشان دهد.

نتیجه گیری:

در مقایسه روش‌های مختلف ژنوتایپینگ عوامل عفونی، سهولت در انجام کار و به کارگیری روش مورد نظر حائز اهمیت است. از طرف دیگر هرچه تعداد باندهای ایجاد شده برای یک جدایه در یک تکنیک بیشتر باشد امکان افتراق بین سویه‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین با توجه به دو مورد یاد شده و بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه روش ERIC-PCR روش مناسب‌تری برای تایپینگ و دسته بندی جدایه های مختلف کمپیلوباکتر می‌باشد .از طرفی تکنیک‌های مورد استفاده در این مطالعه یعنی روش‌های ERIC-PCR و-Rep PCR و RAPD-PCR هر کدام ابزارهایی قدرتمند در دسته بندی گونه‌های کمپیلوباکتر هستند. اما روش‌های پیشرفته‌تر مولکولی مانند PFGE به منظور ژنوتایپینگ این باکتری توصیه می‌گردد. با توجه به این که منبع جداسازی جدایه ها با یکدیگر متفاوت است، بنابراین برقراری ارتباط آماری بین الگوهای باندی ایجاد شده در هر تکنیک مقدور نمی‌باشد.

منابع:

1. Shakrian A, Rukni N, Sharifzadeh A, Al-Agha S, Talebian R. Campylobacter jejuni as a potential pathogen in the liver of slaughtered poultry and poultry meat supply stores in Shahrekord. Iranian Journal of Food Sciences and Technology. 2014;1(4):43-50 [In Persion].
2. Soto-Beltrá n M, Lee BG, Amézquita-López BA, Quiñones B. Overview of methodologies for the culturing, recovery and detection of Campylobacter. International Journal of Environmental Health Research. 2023 Mar 4;33(3):307-23.
3. Feucherolles M, Nennig M, Becker SL, Martiny D, Losch S, Penny C, Cauchie HM, Ragimbeau C. Investigation of MALDI-TOF mass spectrometry for assessing the molecular diversity of Campylobacter jejuni and comparison with MLST and cgMLST: a luxembourg one-health study. Diagnostics. 2021 Oct 20;11(11):1949.
4. Fung F, Wang HS, Menon S. Food safety in the 21st century. Biomed. J., 41 (2): 88-95.
5. Jo Y, Oh HM, Yoon Y, Lee SY, Ha JH, Kim WI, Kim HY, Han S, Kim SR. Enrichment broth for the detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in fresh produce and poultry. Journal of food protection. 2017 Nov 1;80(11):1842-50.
6. Marotta F, Di Marcantonio L, Janowicz A, Pedonese F, Di Donato G, Ardelean A, Nuvoloni R, Di Giannatale E, Garofolo G. Genotyping and antibiotic resistance traits in Campylobacter jejuni and coli from pigs and wild boars in Italy. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2020 Oct 15;10:592512.
7. Marotta F, Garofolo G, Di Marcantonio L, Di Serafino G, Neri D, Romantini R, Sacchini L, Alessiani A, Di Donato G, Nuvoloni R, Janowicz A. Antimicrobial resistance genotypes and phenotypes of Campylobacter jejuni isolated in Italy from humans, birds from wild and urban habitats, and poultry. PloS one. 2019;14(10):e0223804.
8. Shakir ZM, Alhatami AO, Ismail Khudhair Y, Muhsen Abdulwahab H. Antibiotic resistance profile and multiple antibiotic resistance index of Campylobacter species isolated from poultry. Archives of Razi Institute. 2021;76(6):1677-86.
9. Salimi H, Owlia P, Yakhchali B, Rastegar Lari A. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients using PCR– restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis. Iranian Journal of Medical Sciences. 2010;35(3):236-41.
10. Wolska K, Kot B, Jakubczak A, Rymuza K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Folia Histochemica et Cytobiologica. 2011;49(4):734-8.
11. Hadiyan M, Momtaz H, Shakerian A. Prevalence, antimicrobial resistance,

virulence gene profile and molecular typing of Campylobacter species isolated from poultry meat samples. Veterinary Medicine and Sciences. 2022;8(6):2482-93.
12. Rahimi E, Momtaz H, Bonyadian M. PCR detection of Campylobacter sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. Food Control. 2010;21(5):692-4.
13. 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. Poultry science. 2010;89(5):1015-20.
14. Bardoň J, Pudova V, Koláčková I, Karpíšková R, Röderová M, Kolář M. Virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter spp. in the Czech Republic. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne. 2017;66(2):59-66.
15. BaniSharif GR, Karimi S, Momtaz H. Determining the pattern of virulence factors and antibiotic resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains isolated from the liver of meat halves slaughtered in Chaharmahal and Bakhtiari province. New finding in Veterinary Microbiology. 2019;2(1):15-25 [In Persian].
16. Staji H, Birgani SF, Raeisian B. Comparative clustering and genotyping of Campylobacter jejuni strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis. Annals of microbiology. 2018;68(11):755-62.
17. Yadav R, Yadav J, Gahlot K, Purva M, Deora A, Kumar P, Nathawat P, Rathore NS, Maherchandani S, Kashyap SK. Repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) typing of Campylobacter jejuni isolated from poultry. Veterinary Practitioner. 2017;18(2).160-2.
18. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ–a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. BMC bioinformatics. 2015;16(1):1-8.
19. Hormeno L, Palomo G, Ugarte-Ruiz M, Porrero MC, Borge C, Vadillo S, Piriz S, Dominguez L, Campos MJ, Quesada A. Identification of the main quinolone resistance determinant in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by MAMA-DEG PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2016;84(3):236-9.
20. Kovalenko K, Roasto M, Liepinš E, Mäesaar M, Hörman A. High occurrence of Campylobacter spp. in Latvian broiler chicken production. Food control. 2013;29(1):188-91.
21. Banisharif G, Momtaz H. Genotyping of Pseudomonas aeroginusa isolated from hospital infections. Journal of Microbial World. 2016;9(2):96-107 [In Persion].
22. Igwaran A, Okoh AI. Molecular determination of genetic diversity among Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from milk, water, and meat samples using enterobacterial Repetitive intergenic

consensus PCR (ERIC-PCR). Infection Ecology & Epidemiology. 2020;10(1):1830701.
23. Ammar AM, El-Naenaeey ES, El-Malt RM, El-Gedawy AA, Khalifa E, Elnahriry SS, Abd El-Hamid MI. Prevalence, antimicrobial susceptibility, virulence and genotyping of Campylobacter jejuni with a special reference to the anti-virulence potential of Eugenol and beta-resorcylic acid on some multi-drug resistant isolates in Egypt. Animals. 2020;11(1):3.
24. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of Campylobacter jejuni strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. Avian diseases. 2003;47(1):101-7.
25. Workman SN, Mathison GE, Lavoie MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of Campylobacter spp. in Barbados. Journal of clinical microbiology. 2005;43(6):2642-50.
26. Stabler RA, Larsson JT, Al-Jaberi S, Nielsen EM, Kay E, Tam CC, Higgins CD, Rodrigues LC, Richardson JF, O'Brien SJ, Wren BW. Characterization of water and wildlife strains as a subgroup of C ampylobacter jejuni using DNA microarrays. Environmental microbiology. 2013;15(8):2371-83.
27. Chuma IS, Nonga HE, Mdegela RH, Kazwala RR. Epidemiology and RAPD-PCR typing of thermophilic campylobacters from children under five years and chickens in Morogoro Municipality, Tanzania. BMC infectious diseases. 2016;16:1-1.
28. García-Sánchez L, Melero B, Diez AM, Jaime I, Canepa A, Rovira J. Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. Preventive veterinary medicine. 2020;176:104935.
29. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. Journal of clinical microbiology. 2005;43(1):199-207.
30. Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. Journal of microbiological methods. 2011;84(2):194-201.
31. Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Najar-Peerayeh S. PCR-RFLP provides discrimination for total flaA sequence analysis in clinical Campylobacter jejuni isolates. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2016;69(5):373-7.
32. Loeb M. Host genomics in infectious diseases. Infection & chemotherapy. 2013;45(3):253-9.
33. Strakova N, Michova H, Shagieva E, Ovesna P, Karpiskova R, Demnerova K. Genotyping of Campylobacter jejuni and prediction tools of its antimicrobial resistance. Folia Microbiologica. 2023;10:1-3.

Using of ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR methods for genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat

Maryam Hadiyan[1], Hassan Momtaz[2*], Amir Shakerian[3]
[1]Ph.D student of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,
[2*]Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,
[3]Department of Food Hygine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,

Email: hamomtaz@yahoo.com, ha.momtaz@iau.ac.ir

Abstract
Campylobacter, especially the two species *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, having different strains and hosts, are considered one of the most important and common pathogenic bacteria between humans and animals. The present study was conducted with the aim of genetic classification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat.
This cross-sectional study was conducted on 36 strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from raw chicken meat. In order to genotyping the isolates, three methods ERIC-PCR, RAPD-PCR, and Rep-PCR were used. 36 *Campylobacter* strains isolated from raw chicken meat were placed in 7 profiles in ERIC-PCR method, in 3 profiles in RAPD-PCR method and in 3 profiles in REP-PCR method.
All investigated strains had a polymorphic band pattern, which shows a high rate of polymorphism in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomes. The methods used in this study are powerful tools for genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, but according to the findings, the ERIC-PCR method is a more suitable method than other methods for typing and classifying *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains.
Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, ERIC-PCR, RAPD-PCR, Rep-PCR