نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول،بهار و تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۹-۱

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های کمپیلوباکتریایی حیوانات خانگی

مرتضی سلجوقی[۱] ، علی شریف زاده[۲*]

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

چکیده

کمپیلوباکتر یکی از عوامل مهم بیماری زای مشترک بین انسان وحیوان است. علیرغم آنکه غالب موارد عفونت های انسان ناشی از خوردن مواد غذایی آلوده که بخوبی پخته نشده اند می باشد ولی از راه های متفاوت دیگری از جمله مدفوعی دهانی، مصرف آب آلوده غیر بهداشتی و تماس با حیوانات خانگی نیز منتقل می شود. هدف از انجام این تحقیق تعیین فراوانی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های کمپیلوباکتریایی سگ ها و گربه های خانگی شهرستان اصفهان بود. در این تحقیق ۱۰۰ ۵۰ نمونه مدفوع از سگ ها و ۵۰ نمونه مدفوع ازگربه های خانگی با دو روش میکروبی کشت و مولکولی PCR بررسی گردید. در روش میکروبی کشت فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ ها و گربه های خانگی به ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش مولکولی PCR به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. نتایج آزمون مربع کای (تست پیرسون) ارتباط معنی داری بین آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ ها و گربه های خانگی با متغیرهای سن، نوع تغذیه، سیستم نگهداری وآلودگی با سایر بیماری های گوارشی در آزمون مربع کای (تست پیرسون) ارتباط معنی داری نشان داده شد ($p<0/01$). شایع ترین گونه در همه موارد آلودگی کمپیلوباکتریایی سگ ها و گربه های خانگی ، کمپیلوباکتر ژژونی بود. در آزمایش آنتی بیوگرام تمامی نمونه های جداشده حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند. تمام سویه های جدا شده به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بودند. در مورد ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی نیز بیشترین فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه ژژونی در مورد blaoxA-61و در گونه کولای در مورد blaoxA-61 و aadE1 مشاهده گردید. از۷ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن ها در کمپیلوباکتر ژژونی وجود داشت اما در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۳ ژنcdtA,cdtF و iam1 ردیابی گردید. در نهایت از این مطالعه نتیجه گرفته شد که به جهت فراوانی قابل توجه آلودگی کمپیلوباکتریایی در گربه ها و سگ های خانگی، و با نظر به نقشی که میتوانند برای سلامت جوامع انسانی ایفا نمایند، انجام آزمایش های دوره ای اهمیت زیادی داشته و با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه ها مصرف آنتی بیوتیک بر اساس نتیجه آنتی بیوگرام ضروری به نظر می رسد.

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

*نویسنده مسئول : علی شریف زاده

آدرس: دپارتمان میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهر کرد، ایران.

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

مقدمه

کمپیلوباکتر یک باکتری گرم منفی، میله‌ای متحرک (در اندازه ۵-۱/۵ × ۰/۵-۰/۲ میکرومتر)، اکسیداز مثبت کاتالاز متغیر، فاقد اسپور و میکروآئروفیلیک 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 هلوتیکوس*، *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، باکتری های *کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای* غالب می باشد (Acke *et al.*,2006). روش انتقال اجرام، غالبا مدفوعی- دهانی است و شدت بیماری بستگی به تعداد ارگانیسم‌های 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. عفونت های هم زمان نظیر آلودگی با *پارومویروس*، *کرونا‌ویروس*، *ژیاردیا*، *سالمونلا و شیگلا* ممکن است نقش سینرژیسم 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، بالارفتن درجه‌ی حرارت و لکوسیتوز همراه است. علائم بالینی در گربه‌ها نسبت به سگ‌ها، شدت کمتری دارد و در صورت بروز علائم، درگربه‌های با سن کمتر از ۶ ماه، بیشتر دیده می‌شود .بچه گربه‌ها و توله سگ‌ها، 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 کمک کننده هستند؛ اما روش مولکولی نظیر PCR، از دقت بالاتری برخوردار است. توجه به توانایی حمل ژن‌های مختلف مرتبط با حدت 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 گونه های غالب این باکتری به همراه آگاهی از ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص در حیواناتی که در محل های 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 بررسی به روش تصادفی از ۱۰۰ نمونه مدفوع (۵۰ مورد سگ خانگی، ۵۰ مورد گربه خانگی)، نمونه-گیری صورت پذیرفت. ترجیح تحقیق برآن بود که حیوانات مورد نظر، در یک ماه گذشته سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک را نداشته باشند. از هر نمونه حیوانی، ۲ سواپ 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 آنتی‌بیوتیک های آمفوتریسینB و سفوپرازون انتقال و به صورت خطی کشت گردید. هر دو محیط مایع و جامد، در جار مخصوص تحت شرایط میکروآئروفیلیک به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۱۰ درصد دی اکسید کربن در۳۷ 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 سواب-های 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 گونه های *ژژونی* و *کولای* به همراه ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده گردید.

توالی آغازگرهای ژن‌های اختصاصی جنس و گونه‌های *کمپیلوباکتر* هم چنین ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدول ۱ آمده است. در این تحقیق از DNA استخراج شده جدایه‌های مشکوک به‌عنوان 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 مستر 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 ۵دقیقه، 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 ژن های 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 ژن های 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 درصداستفاده گرد(Banisharif *et al.*,2019).

نتایج

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به‌ترتیب ۱۰ و ۶ درصد تعیین گردید. این فراوانی در روش PCR مستقیم نمونه، به ترتیب در مورد سگ و گربه ۲۲ و۱۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در گربه، آلودگی به گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* ۸۰درصد و آلودگی هم‌زمان به گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کولای* ۲۰ درصد تعیین گردید. در میان موارد مثبت در روش مولکولی در سگ، آلودگی به گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* ۹۱ درصد، آلودگی هم‌زمان به گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کولای* ۹ درصد مشاهده گردید. تصویر حاصل از ردیابی جنس و گونه های *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<0/01). ارتباط معنی داری بین نوع جنسیت، نژاد با آلودگی کمپیلوباکتریایی مشاهده نگردید (p<0/01). 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 جدایه های 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 بیوتیک ها (p=0.002) بود. در ارزیابی ژنوتیپی مقاومت انتی بیوتیکی گونه های *کمپیلوباکتر*، حضور پنج ژن کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کولای* جدا شده از نمونه های مورد مطالعه به روش PCR چندگانه ای ارزیابی شد که ژل حاصل از ردیابی این ژن ها در شکل ۲ نشان داده شده و توزیع حضور این ژن ها در جدول ۳ آورده شده است. . بیشترین فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه *ژژونی* در مورد *blaoxA-61* و در گونه *کولای* در مورد*blaoxA-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* و *aadE1* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p =0.04) مشاهده گردید. تصویر ۲ نیز به الگوی برخی از این ژن ها ی مقاومت آنتی بیوتیکی در روی ژل آگارز پرداخته است.

حضور شایع ترین ژن های کد کننده عوامل حدت در جدایه های کمپیلوباکتر ژژونی 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 ژن های حدت در جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونی* حضور داشتند. در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ژن های 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 ژن های *Iam2* و *Iam3* با

سایر ژن های حدت در جدایه های کمپیلوباکتر ژژونی(p =0.01) و نیز بین حضور ژن های *cdtF* با سایر ژن های مورد مطالعه در جدایه های کمپیلوباکتر کولای مشاهده گردید(p =0.001). شکل های ۳ نیز به به الگوی برخی از ژن ها 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.

بحث و نتیجه گیری

در بررسی حاضر فراوانی آلودگی کمپیلوباکتریایی در سگ و گربه، با استفاده از روش کشت، به‌ترتیب ۱۰ و ۶ درصد و در روش PCR، به ترتیب ۲۲ و ۱۰ درصد تعیین گردید. اغلب نمونه ها آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونی* (۷۵درصد) 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 هلوتیکوس*)، ایرلند (۴۲/۹ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر آپسالینسیس*)، سوئیس (۴۱/۹ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر آپسالینسیس*)، نیجریه (۱۸/۳ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر آپسالینسیس*)، نروژ (۱۸ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر آپسالینسیس*)، آرژانتین (۱۶ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر ژژونی*)، لهستان(۸۶/۹ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر ژژونی*) و برزیل (۸ درصد، گونه‌ی غالب *کمپیلوباکتر ژژونی*) 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 شهرکرد صورت گرفت، شیوع آلودگی، ۱۸ مورد (۳۰ درصد) ذکر گردید که از این تعداد تنها ۵ مورد (۸/۵۵ درصد) آلوده به *کمپیلوباکتر ژژونی* 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 وزیریان 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 استان‌های اصفهان و فارس نشان دادند که ۲۷/۷ درصد از آنها، آلوده به *کمپیلوباکتر* می باشند. در این میان گونه غالب *کمپیلوباکتر هلوتیکوس* تعیین گردید. (Rahimi *et al*.,2017).

میزان جداسازی اجرام *کمپیلوباکتر* بسته به عوامل مختلف، از جمله موقعیت جغرافیایی، گونه حیوانی، استرس، تغییرات جیره‌ی 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 رده‌های سنی و فراوانی آلودگی وجود داشت. همسو با این بررسی، Selwet و همکاران در سال ۲۰۱۵، Holmberg و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Vazirianو همکاران در سال ۲۰۱۶، نیز میزان فراوانی عفونت در حیوانات جوان را بیشتر از رده‌های سنی بالاتر اعلام نمودند که از جمله دلایل آن می‌توان 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 گربه‌های جوان، آنها را مستعد ابتلا به بیماری‌های مختلف، از جمله عفونت ناشی از گونه‌ی *کمپیلوباکتر ژژونی* می‌کند. در بررسی حاضر، ارتباط معنی‌داری 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 سگ‌ها، نشان دادند که هیچ ارتباط معنی‌داری 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 وزیریان 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 Andrzejewskaو 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 Rodriguez *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 ضدعفونی گردد. همان طور که در جدول ۲ مشخص است تمامی نمونه های جداشده 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). گونه‌های 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 بیوتیک‌های اضافی در حیوانات باعث می‌شود که حیوانات نسبت به دستیابی به سویه‌های مقاوم ارگانیسم حساس‌تر شوند (Angulo *et al.*,2004). پیامدهای

سلامت عمومی استفاده از آنتی بیوتیک در حیوانات را می‌توان 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 ژژونی 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 ژژونی ۳۸/۵ درصد اعلام گردیده است. میزان مقاومت مشاهده شده به انروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین و تتراسایکلین به ترتیب ۵۸/۲، ۴۹/۱، ۱۴/۵ و ۱۲/۷ درصد بوده است. ۱۱ درصد از کمپیلوباکترهای جدا شده به اریترومایسین 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 های کمپیلوباکتر را با ۹۷/۹ درصد به سیپروفلوکساسین، ۶۴/۳ درصد از همان جدایه ها به تتراسایکلین ، ۹/۱ درصد به اریترومایسین و ۶/۳ درصد به اریترومایسین نشان داده اند. با این حال، ۷ درصد از ۱۴۳ سویه کمپیلوباکتر مقاوم به حداقل سه آنتی بیوتیک غیرمرتبط مقاوم بودند. مطالعه‌ای در مورد شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سگ‌ها 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 ژژونی و کمپیلوباکتر کولای بررسی گردید.از 7 ژن حدت مورد مطالعه، تمام ژن ها در *کمپیلوباکتر ژژونی* 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 ژژونی وجود داشت و البته در جدایه های کمپیلوباکتر کولای تنها ۵ ژن *iam,recR,cdtA,cdtB* و *cdtC* ردیابی گردید(Banisharif *et al*.,2019). Wieczorek و همکاران نیز فراوانی حضور ژن *iam1* در جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کولای* جداشده از گوشت مرغ را به ترتیب ۳۱ و ۲۷ درصد گزارش نمودند(Wieczorek.,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 روش‌های مولکولی، به منظور تشخیص سریع آلودگی، جهت درمان به موقع و اقدامات پیشگیری کننده‌ی دیگر ضروری می‌باشد. 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.

2. Andrzejewska, M., Sczepanska, 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 Diagnstic 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.

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., Rożynek, E. (2012). *Antibiotic resistance in Campylobacterjejuni and Campylobactercoli 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*

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, Inernational 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. Wieczorek, 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., Eguale, T.(2020). *Prevalence of campylobacter species in human,animaland 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., Eguale, 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.

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 Zooneses 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.
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*

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

Examination the pattern of virulence and antibiotic resistance genes in Campylobacter isolates from pets

Saljoughi M[1] , 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:18August 2023 Accepted: 29 November2023

Abstract

The Middle-East, known-to-be the birthplace for animal domestication, is among the few remained geographical theaters in the world where glanders-stricken solipede and human cases are still reported. In the Persian environment with some 60 years of maleination test history in its horse, mule and donkey populations, mini or midi outbreaks of glanders are seen now and then mostly in the Western and central regions. This work was aimed to characterize the phenotypic and genotypic properties of the most recently-collected isolates of Burkholderia mallei in Iran (A tiger sample and 3 horse samples). Bacterial culture, Biochemical tests, complement fixation test and Western blot, Flip 407-PCR, Bim A-PCR and also Strauss reaction tests were included in the assessment. The results obtained from experiments conducted on four isolates from Tehran, Kordan, Oshnavieh and Semirum outbreaks, displayed the expected characteristics of B. mallei. Whether our isolates of interest represent the local/regional population(s) of B. mallei, we assume further molecular epidemiology studies will enable us to address.

Keywords: Glanders, Solipedes, Iran

**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