

شناسایی گونه های کمپیلو باکتر در مدفوع سگ و گربه های به ظاهر سالم با تکنیک "PCR" در شهرستان گنبد

مرتضی رزاقی منش^{۱*}، محمدرضا نوروزی خراسانی^۲، ماهان یغمائی^۳، فاطمه همایون^۳، محمد حسین ناصربخت^۳

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر ایران

۲- دانش آموخته، گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۳- دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

*نویسنده مسئول: Morteza_vet@gmail.com

چکیده

کمپیلوباکتریوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که موجب اسهال در انسان، سگ، گربه و دیگر حیوانات اهلی و وحشی می شود. هدف از انجام مطالعه ی حاضر، شناسایی گونه های کمپیلو باکتر در مدفوع سگ و گربه های به ظاهر سالم با تکنیک PCR در شهرستان گنبد بود. در این تحقیق با اخذ تاریخچه کامل از گربه های ارجاعی، اقدام به جمع آوری نمونه گردید. نمونه گیری به کمک سوآب استریل از ناحیه رکتوم تعداد ۱۰۰ قلاده سگ و گربه به ظاهر سالم انجام شد. برای نمونه گیری، از دو سوآب به شکل هم زمان استفاده گردید. یک سوآب برای کشت و جداسازی باکتری و نمونه سوآب دیگر به منظور استخراج DNA استفاده شد و سپس آزمون PCR انجام شد و داده های مورد نظر آنالیز آماری شدند. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که در هیچ یک از گربه ها آلودگی مشاهده نشد. در سگ ها، آلودگی به کمپیلوباکتر به میزان ۲۰،۸۳ درصد بود. آلودگی در سگ های مسن بیشتر از سگ های جوان بود، به نحوی که میزان آلودگی با افزایش سن افزایش یافت. به دلیل حضور مکرر گونه های کمپیلوباکتر در مدفوع گربه ها، این اجرام می توانند به عنوان یک عامل مخاطره آمیز، برای سلامت عمومی نقش بازی کنند. بر این اساس، تست های دوره ای و جدا کردن سگ و گربه های اسهالی از دیگر حیوانات، به خصوص سگ و گربه هایی که از گوشت خام استفاده و در پناهگاه زندگی می کنند، اهمیت زیادی دارد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر، سگ، گربه، PCR

مقدمه

مملو از موکوس، آبکی و یا رگه‌های صفر، بی‌اشتهایی جزئی و گهگاهی استفراغ، بالا رفتن درجه حرارت و الکوسیتوز همراه است (۱۲).

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. بچه گربه‌ها و توله سگ‌ها، به دلیل فقدان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و توسعه‌ی آنتی بادی محافظ، بیشتر علائم بالینی را نشان می‌دهند به طور کلی سگ‌ها و گربه‌های بالغ صاحب دار، نسبت به حیوانات ولگرد و با آنهایی که در پناهگاه و محیط‌های آزمایشگاهی نگهداری می‌شوند، کمتر مبتلا می‌گردند. فاکتورهای خطر شامل زندگی کردن با حیوان آلوده، کوچک بودن جثه حیوان، داشتن سن کمتر از ۱ سال، تغذیه با غذاهای تجاری و به ویژه گوشت خام طیور و در برخی موارد شیر غیر پاستوریزه می‌باشد. در فصل پاییز، نیز شیوع آلودگی بیشتر گزارش شده است (۶، ۱۳، ۱۴)، در ایران شناسایی کمپیلوباکتر، از سگ‌ها و گربه‌های شهر تهران گزارش شده است (۱۵). در دیگر مطالعات میزان جداسازی باکتری، از مدفوع گربه‌ها و سگ‌ها، از صفر تا ۵۰ درصد متغیر بوده است (۶، ۱۶). روش معمول برای تشخیص باکتری، تهیه 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. داروی مناسب برای درمان اسهال ناشی از کمپیلوباکتر در انسان، اریترومايسين است که جهت درمان کمپیلوباکتریوز در سگ‌ها نیز مؤثر است. از دیگر آنتی-بیوتیک‌های مورد استفاده، فورازولیدین، جنتامایسین، نئومايسين، کلیندامایسین و تتراسیکلین گزارش شده است. رعایت جنبه‌های بهداشتی برای پیش‌گیری از عفونت در انسان لازم است، چرا که عمدتاً سگ‌ها و گربه‌ها می‌توانند به عنوان منبع عفونت مطرح باشند؛ بنابراین لازم است صاحبان حیوانات خانگی هر ۶ ماه یک بار جهت انجام آزمایش مدفوع به بیمارستان‌های دامپزشکی مراجعه نمایند (۱). از آن جایی که تا کنون مطالعه‌ای بر روی کمپیلوباکتر در گربه‌های منطقه گنبدکاووس استان گلستان صورت نگرفته است، هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر در مدفوع سگ و گربه‌های به ظاهر سالم با تکنیک PCR در شهرستان گنبد بود.

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 (۵). گونه‌های این باکتری موجب اسهال در انسان، سگ، گربه و دیگر حیوانات اهلی و وحشی می‌شوند. 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 بدون علامت جدا شده‌اند (۶؛ ۷). اگر چه شایع‌ترین گونه جدا شده از حیوانات، کمپیلوباکتر آپسالینسیس است، اما این گونه تنها موجب عفونت‌های اسهال‌دیک در انسان می‌شود. هشتاد درصد عامل کمپیلوباکتریوز در انسان، کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای است (۸، ۹).

روش انتقال اجرام، دهانی-مدفوعی است. از آن جا که موارد عفونت ناشی از کمپیلوباکتر در انسان، در حال افزایش است، تعیین شیوع این پاتوژن‌ها، در حیواناتی که در تماس بسته با انسان زندگی می‌کنند، مهم است. سگ‌ها و گربه‌های آلوده ممکن است بدون علائم بالینی بوده ولی باکتری را از خود دفع نمایند، لذا تشخیص دقیق و سریع حیوانات حامل، بسیار حائز اهمیت می‌باشد؛ البته گاهی هم علائم بالینی (اسهال) در حیوانات گزارش شده است. شدت بیماری بستگی به تعداد ارگان‌سیم‌های خورده شده توسط میزبان، میزان در معرض قرار گرفتن‌های قبلی و سطح آنتی بادی محافظ در بدن دارد (۱۰). زمانی که استرس به حیوانات وارد شود، به بیماری حساس‌تر خواهند شد. دیگر پاتوژن‌های روده‌ای نظیر پاروویروس، کروناویروس، ژیا ردیا، سالمونلا و شیگلا ممکن است نقش سینرژسم بازی کنند (۶). حضور خون و لکوسیت‌ها در مدفوع، پرخونی، ادم، اولسر مخاط و گهگاهی سپتیمی نشان می‌دهد که باکتری می‌تواند تهاجمی باشد. عفونت تجربی در بچه گربه‌ها و سگ‌ها، با سوبه‌های به دست آمده از انسان‌های مبتلا به اسهال، شدت کمتری داشته است. به نظر می‌رسد که حیوانات مقاوم‌تر باشند و یا به اثرات بیماری‌زای گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر، بهتر سازگاری پیدا کرده باشند (۱۱). علائم اسهال ناشی از کمپیلوباکتر در حیوانات خانگی و نیز انسان، از مدفوع شل تا آبکی و اسهال موکویید همراه با خون متغیر است. کمپیلوباکتریوز حاد، با اسهال

مواد و روش کار

با استفاده از تکنیک هایی چون الکتروفورز افقی و بعضاً عمودی است.

روش کار تکنیک PCR

در ابتدا جهت تعیین مناسب ترین دما برای پرایمر های طراحی شده، ست آپ گرادیانت دمایی انجام شد. جهت انتخاب بهترین دما ۵ دما به ترتیب ۴۸، ۵۰، ۵۱ و ۵۲ درجه سانتی گراد که در محدوده دمای اتصال به دست آمده هنگام طراحی پرایمر بودند، انتخاب شدند. برنامه ریزی دستگاه به طوری انجام شد که به هر دو ستون متوالی فرد و زوج، یکی از دماها اعمال شود و نتیجه این مرحله، انتخاب دمای ۴۹ برای پرایمر و دمای ۵۰ درجه به عنوان مناسب ترین دما برای کارکرد بهینه ی پرایمر های طراحی شده برای گونه های کمپیلوباکتر انتخاب شد (۱۲).

ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')
ERIC-2 (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

پس از تعیین دمای بهینه ی هر پرایمر به بخش اصلی بررسی نمونه های DNA توسط تکنیک PCR رسیدیم. واکنش ها توسط دستگاه ترموسایکلر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام می شد. میزان ۱ میکرولیتر از هر نمونه در میکروتیوب های مخصوص PCR ریخته شدند. در دو میکروتیوب جداگانه میکس مستر پرایمر و آب مقطر تزریقی به نسبت های زیر آماده شده و با مقادیر زیر مواد لازم مخلوط شدند. از دستگاه اسپنر جهت مخلوط کردن بهتر و جمع آوری محتویات میکروتیوب ها در انتهای آن استفاده شد.

-پرایمر رقیق شده ۱۷

-مستر میکس ۱۰۷

-آب مقطر تزریقی ۸۷

-نمونه 1۷ DNA

پیش تر در دو میکروتیوب مشخص مخلوط پرایمر های فوروارد و ریورس رقیق شده به روش زیر آماده شد:

۱۰ میکرولیتر پرایمر فوروارد ، ۱۰ میکرولیتر پرایمر ریورس و ۸۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی در یک میکروتیوب مخلوط شده و نام گذاری شد.

در این تحقیق با اخذ تاریخچه کامل از گربه های ارجاعی، اقدام به جمع آوری نمونه گردید. نمونه گیری به کمک سوآب استریل از ناحیه رکتوم تعداد ۱۰۰ قلابه گربه و سگ به ظاهر سالم انجام شد. نمونه برداری تنها از حیواناتی صورت گرفت که در یک ماه اخیر، تجویز آنتی بیوتیک در آنها صورت نگرفته بودند.

نمونه گیری

برای نمونه گیری، از دو سوآب به شکل هم زمان استفاده گردید. یک سوآب برای کشت و جداسازی باکتری و نمونه سوآب دیگر به منظور استخراج DNA استفاده شد. جهت کشت و جداسازی، نمونه های سوآب مدفوعی اخذ شده، بلافاصله به محیط کشت مایع پرستون براث منتقل و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شوشتر ارسال گردید. نمونه سوآب مدفوع دیگر جهت استخراج DNA به میکروتیوب حاوی آب مقطر استریل منتقل و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد (۱).

استخراج DNA

مورد نیاز جهت این آزمون، توسط کیت استخراج DNA شرکت بیونیر، بر روی نمونه های سوآب اخذ شده و پرگنه های مشکوک انجام گردید. در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی جنس کمپیلوباکتر و گونه های آن (ژژونی، کولای، لاری و آپسالینسیس) برای ردیابی جنس و گونه های احتمالی کمپیلوباکتر در سوآب های مدفوعی و نیز تأیید جدایه های کمپیلوباکتر از پرگنه های مشکوک، در واکنش PCR چند گانه استفاده گردید (۱۶).

روش مولکولی

در بررسی حاضر، جهت بررسی حضور باکتری مورد نظر در میان گربه های مورد مطالعه از تکنیک PCR دو مرحله ای استفاده شد. روش PCR یک تکنیک جدید و پرکاربرد در مطالعات مولکولی می باشد. از جمله کاربرد های این روش می توان به شناسایی و تعیین وجود یک توالی خاص، شناسایی نقاط متیله در توالی خاص نسبت به توالی مرجع، گروه بندی افراد بر حسب ژنوتیپ خاص و تعیین کلاد افراد و ترسیم درخت های فیلوژنتیکی اشاره کرد. در این تکنیک، اساس کار بر تکثیر قطعه مورد نظر و سپس شناسایی آن

روش کار الکتروفورز DNA تکثیر شده بر روی ژل آگاروز

ابتدا جهت تهیه ژل آگاروز ۱٪ به مقدار ۷۰ میلی لیتر و با استفاده از بافر TAE X50، لازم بود محاسبات جهت به دست آوردن نسبت های صحیح از پودر آگاروز، بافر TAE و آب مقطر تزریقی مورد نیاز برای تهیه ژل انجام شود. پس از انجام محاسبات، میزان ۰.۷ گرم از پودر آگاروز توسط ترازو وزن شده و به داخل ارلن تمیز و خشکی انتقال داده شد. بافر TAE رقیق شده توسط آب مقطر به ارلن حاوی پودر آگاروز اضافه شده و درون مایکروویو قرار داده شد. حرارت دهی توسط مایکروویو تا زمانی که محلول کاملاً شفاف شود ادامه یافت. سپس، ارلن در دمای اتاق به مدت چند دقیقه قرار داده شد تا زمانی که دمای آن به ۶۰-۵۰ درجه ی سانتی گراد کاهش یافت. در این فاصله ی زمانی سینی یا tray مخصوص دستگاه الکتروفورز آماده شد. به صورتی که دو طرف tray جهت قرارگیری ژل و عدم ریخته شدن آن به خارج از tray توسط چسب نواری مسدود شد و شانه مخصوص در tray قرار داده شد. میزان ۱ میکرولیتر safe stain به محتویات ارلن اضافه شد و به آرامی هم زده شد تا safe stain به طور یکنواخت درون ژل حل شود. محتویات ارلن به درون tray انقال یافت. تا زمانی که ژل به طور کامل ببندد صبر کرده و پس از اطمینان از اینکه ژل به طور کامل به حالت جامد در آمده است، شانه از ژل خارج شده و چاهک ها از نظر سالم بودن و عدم وجود شکاف کنترل شدند. Tray حاوی ژل به تانک الکتروفورز انتقال داده شد و بافر TAE تا حدی که ۲ میلی لیتر بالا تر از ژل را بپوشاند، به تانک اضافه شد. میزان ۵ میکرولیتر Ladder در چاهک اول لود (load) شد و DNA و بافر سنگین کننده نیز در چاهک های مجاور لود شد. میزان ولتاژ ۱۰۰-۷۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه الکتروفورز برقرار شد و سپس دستگاه متوقف شده و ژل از Tray جدا شده و برای بررسی باند های مورد نظر به دستگاه کمولومینسانس بررسی ژل (Gel documentation system) منتقل شد و عکس برداری از ژل انجام شد.

تنظیمات لازم از جمله ی دمای ۴۹-۵۰ درجه (بترتیب ذکر شده برای واکنشهای سری اول یا دوم) به عنوان دمای اتصال به دستگاه داده شد و دستگاه به اصطلاح run شد تا تکثیر آمپلیکون های قطعه مورد نظر DNA انجام شود. طی چند مرحله این تکنیک بر ۹۶ نمونه ی DNA استخراج شده از نمونه های خون مورد مطالعه، طبق شرایط ذکر شده 1 انجام گردید. لازم به ذکر است که قرار دادن مواد مورد استفاده از جمله DNA، پرایمر های رقیق شده و مستر بر روی یخ در طول کار، جهت جلوگیری از رسیدن آسیب به این مواد به طور مثال دگرده شدن (degradation) پرایمر ها در اثر دمای اتاق، در این مرحله حائز اهمیت است.

مرحله	زمان	دما
Denaturation	Min3	۹۵C°
Denaturation	S20	۹۵C°
Anecaling	S30	۵۰C°
Extention	S40	۵۲C°
		دنا تورا سیون، اتصال و تکثیر به تعداد ۴۵ چرخه
Final Extention	Min5	۷۲ C°
		مرحله نهایی بعد از ۴۵ چرخه

جدول ۲ - شرایط PCR برای مرحله تشخیص نهایی

در نهایت برای اطمینان از نتایج به دست آمده تعدادی از نمونه ها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد ران شدند:

وسایل و مواد مورد نیاز برای ران کردن DNA تکثیر شده بر روی ژل آگاروز

- دستگاه الکتروفورز
- ترازو دیجیتالی
- مایکروویو
- پودر آگاروز
- بافر الکتروفورز TAE
- آب مقطر
- رنگ safe stain شرکت سینا کلون
- ladder ۵۰ و ۱۰۰ جفت باز
- بافر سنگین کننده ی مخصوص DNA یا loading buffer

بحث

کمپیلوباکتر یکی از عوامل اصلی ایجاد کمپیلوباکتریوزیس در انسان می باشد. در اتحادیه اروپا کمپیلوباکتریوزیس به عنوان شایع ترین بیماری مشترک بین انسان و دام معرفی شده است (۱۲). مهمترین گونه های بیماریزای کمپیلو باکتر در انسان شامل کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی می باشند. شیوع گونه های کمپیلوباکتر با منشأ حیوانی در بسیاری از کشورها ثبت شده است، اما اطلاعات اندکی از کشورهای در حال توسعه موجود است (۱۷). روش های مولکولی برای تشخیص گونه های کمپیلوباکتر طی سال های اخیر توسعه یافته و هم اکنون از نظر تجاری قابل دسترسی بوده و مورد استفاده قرار می گیرند. به طور معمول در حال حاضر شناسایی کمپیلوباکتر در آزمایشگاه های تشخیص طبی آلمانی بر پایه کشت، جداسازی و تست های تشخیص خواص فنوتیپی است (۱۸). از آنجایی که کمپیلوباکتر جزو باکتری های سخت رشد بوده و جداسازی آن از نمونه های شدیداً آلوده مثل مدفوع که دارای تعداد بیشمار باکتری های سریع الرشد است، مشکل می باشد لذا روش های مولکولی بر پایه PCR می توانند در شناسایی کمپیلوباکتر جانشین روش های کشت از نمونه های بالینی شوند (۱۹) و چنانچه که در مطالعه حاضر مشخص شد؛ با استفاده از روش PCR ۲۰ درصد سگ های مورد بررسی مثبت بودند و آلودگی در هیچ یک از گربه ها مشاهده نشد. در داخل کشور مطالعات معدودی بر روی میزان شیوع کمپیلوباکتر صورت گرفته است. ترکان و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۸ با بررسی شیوع کمپیلوباکتر در سگ و گربه های کشور ایران گزارش نمودند که در مجموع ۱۹ ایزوله کمپیلوباکتر از جمله دو کمپیلوباکتر ژرونی و یک کمپیلوباکتر کولی از نمونه مدفوع سگ و گربه بازیابی شد. میزان شیوع گونه های کمپیلوباکتر ۱۶.۰٪ (۸ از ۵۰) در سگ و ۲۲.۰٪ (۱۱ از ۵۰) در گربه بودند (۲۰). محمدزاده و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه ای با بررسی میزان آلودگی سگ های خانگی به جنس کمپیلوباکتر با استفاده از تکنیک PCR گزارش نمودند که از مجموع ۶۰ نمونه مدفوع سگ، ۱۸ مورد (۳۰ درصد) آلوده به کمپیلوباکتر بودند که از این میان کمپیلوباکتر ژرونی ۸.۳۳ درصد (۵ مورد) از آلودگی ها را به خود اختصاص داد (۲). مصلی نژاد و همکاران (۱۳۹۹) در مطالعه ای گونه های کمپیلوباکتر در مدفوع گربه های خانگی شهرستان اهواز با روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرز را مورد جداسازی و شناسایی قرار دادند و گزارش نمودند که در کشت

Campylobacter jejuni	Negative case	Positive case	Age(X)
$\frac{1}{40} = 2.5\%$	$\frac{39}{40} = 97.5\%$	$\frac{1}{40} = 2.5\%$	$0 < X < 1$
$\frac{1}{30} = 3.33\%$	$\frac{29}{30} = 96.67\%$	$\frac{1}{30} = 3.33\%$	$1 \leq X < 2$
$\frac{1}{20} = 5\%$	$\frac{19}{20} = 95\%$	$\frac{1}{20} = 5\%$	$2 \leq X < 3$
$\frac{1}{10} = 10\%$	$\frac{9}{10} = 90\%$	$\frac{1}{10} = 10\%$	$3 \leq X < 4$

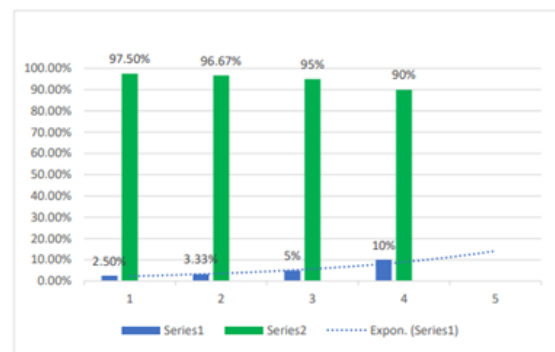
جدول ۱- میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژرونی در سگ های مورد مطالعه

روش آنالیز آمار

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری T test و محاسبه میانگین و انحراف معیار مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن است که در هیچ یک از گربه ها آلودگی به کمپیلوباکتر مشاهده نشد، با این حال، در سگ ها آلودگی به کمپیلوباکتر به میزان ۲۰.۸۳ درصد بود. آلودگی در سگ های مسن بیشتر از سگ های جوان بود، به محوی که میزان آلودگی با افزایش سن افزایش یافت. نتایج این مطالعه نشان داد که آلودگی د سگ های با رنج سنی ۱-۰ سال ۲.۵ درصد، در سگ های ۲-۱ سال ۳.۳۳ درصد، در سگ های ۳-۲ سال ۵ درصد و در سگ های بین ۴-۳ سال ۱۰ درصد بود.



نمودار ۱- میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژرونی در سگ های مورد مطالعه

باکتریایی، تنها ۲ مورد از نظر کمپیلوباکتر مثبت بودند (۱/۹۸ درصد)؛ اما در روش PCR، ۳۷ مورد آلودگی به کمپیلوباکتر تعیین گردید (۳۶/۶۳ درصد). شایع ترین گونه کمپیلوباکتر در میان گربه-های ارجاعی، کمپیلو باکتر آپسالینسیس و کمپیلوباکتر کولای بودند که به ترتیب ۲۳ و ۷ مورد (۶۲/۱۶ و ۱۸/۹۱ درصد) از ۳۷ مورد مثبت تشخیص داده شده را به خود اختصاص دادند. یک شیوع پایین تر از آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی در ۴ مورد (۱۰/۸۱ درصد) (۱). در مطالعه ای دیگر، داورزنی و نیکخو (۱۳۹۶) در مطالعه‌ای با عنوان شناسایی مولکولی کمپیلوباکتر در مدفوع سگ و گربه‌های اهلی شهرکرد به روش Multiplex PCR بیان نمودند که ۲۱ نمونه به عنوان جنس کمپیلوباکتر شناخته شدند. ۳ نمونه متعلق به گونه کمپیلوباکتر ژژونی و ۱۶ نمونه کمپیلوباکتر آپسالانسیس بودند. وزیریان و همکاران (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای با جداسازی کمپیلوباکتر از مدفوع گربه‌های شهرستان اصفهان و شهرکرد گزارش نمودند که در مجموع ۵۰ نمونه از رکتال گربه جمع‌آوری شد و از نظر حضور کمپیلوباکتر، میزان آلودگی مربوط به گربه ۱۱ مورد (۲۲ درصد) بود (۳). در مطالعه ای دیگر، محزونیه و همکاران (۱۳۹۲) با شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر در مدفوع سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز چندگانه M-PCR گزارش کردند که در مجموع ۳۹ نمونه از ۱۰۰ نمونه به عنوان آلوده به کمپیلوباکتر شناسایی شدند که از این ۳۹ نمونه، ۲ نمونه متعلق به کمپیلوباکتر ژژونی و ۱۱ نمونه کمپیلوباکتر آپسالانسیس بود (۴). شایان توجه است که تغییرات در شیوع گونه‌های کمپیلوباکتر در سگ‌ها و گربه‌ها با محل مورد مطالعه، جمعیت سگ‌های نمونه‌گیری شده، روش شناسایی و ماهیت سخت‌گیرانه ارگانسیم مرتبط است (۲۱). در سراسر کشورهای دنیا مطالعات متعددی بر روی میزان شیوع کمپیلوباکتر صورت گرفته است. برای مثال، لمون و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه ای به بررسی شیوع جنس کمپیلوباکتر در سگ‌های کشور پرتغال پرداختند و گزارش نمودند که ۴ گونه مختلف کمپیلوباکتر با روش Multiplex PCR و طیف‌سنجی جرمی MALDI-TOF شناسایی شدند که از میان آنها کمپیلوباکتر ژژونی (تعداد = ۱۴، ۴۴٪) به طور کلی بیشترین گونه‌های یافت شده بود (۲۲). شیوع عفونت در آلمان (۸/۴۷ درصد؛ گونه غالب کمپیلوباکتر هلوتیکوس)، ایرلند (۹/۴۲ درصد، گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، سوئیس (۹/۴۱ درصد گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، باربادوس

(۳/۳۷ درصد؛ گونه غالب کمپیلوباکتر هلوتیکوس)، نیجریه (۱۸۳ درصد؛ گونه غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، نروژ (۱۸ درصد؛ گونه ی غالب کمپیلوباکتر آپسالینسیس)، آرژانتین (۱۶ درصد؛ گونه غالب کمپیلوباکتر ژژونی)، لهستان (۸۶/۹ درصد؛ گونه ی غالب کمپیلوباکتر ژژونی) و برزیل (۸ درصد؛ گونه غالب کمپیلوباکتر ژژونی) گزارش شده است (۶). با انجام مطالعات اپیدمیولوژیک، شیوع عفونت ناشی از کمپیلوباکتر و گونه غالب آن در مناطق مختلف دنیا، متفاوت ذکر شده است. از مهم ترین دلایل ذکر شده میتوان به تفاوت در جمعیت مورد مطالعه، جمعیت متفاوت گربه های اسهالی و سالم، سن و تراکم متفاوت گربه ها، سبک زندگی، تکنیکهای مختلف به کار برده شده جهت تشخیص، موقعیت جغرافیایی منطقه، جیره ی غذایی و نیز فصل نمونه برداری اشاره نمود. دنیس و همکاران در کشور فرانسه در سال فیلم برای شناسایی کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر گولی از دو روش PCR و روش های مرسوم استفاده کردند. آنها نشان دادند که میزان حساسیت روش در سال ۱۹۹۷، ۲۵ نمونه اسهالی سگ را به روش PCR مورد بررسی قرار دادند که ۲۰ مورد از نمونه ها حاوی توالی اختصاصی کمپیلوباکتر بود که از این تعداد ۱۷ نمونه از نظر کمپیلوباکتر ژژونی، ۲ نمونه از نظر کمپیلوباکتر کولی و ۱ نمونه از نظر کمپیلوباکتر ایتسینالیس مثبت بودند (۲۲). نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که آلودگی با کمپیلوباکتر در سگ های مسن بیشتر از سگ های جوان است. در مطالعه ای برخلاف مطالعه حاضر، موسر و همکاران گزارش کرده اند که میزان آلودگی سگهای جوان نسبت به سگ های بالغ بیشتر است (۲۳) ولی در این تحقیق هیچ رابطه معنی داری بین شیوع کمپیلوباکتر با سن گربه های مورد بررسی وجود نداشت. در کشور پرو طی یک بررسی، میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در بین طوطی ها ۸٪ نشان داده شد. در بررسی پرندگان وحشی انگلستان شمالی، آمریکا و نیوزلند میزان آلودگی به کمپیلوباکتر به ترتیب ۱/۱، ۲/۸ و ۵/۱۲٪ گزارش شد (۲۴). این در حالی است که میزان موارد آلودگی به کمپیلوباکتر در بین سگها در بیشتر موارد بالای ۵۰٪ گزارش شده است سگ و گربه به عنوان مخازن کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر آپسالانسیس هستند. مخزن کمپیلوباکتر لاری معمولا پرندگان می باشد اما از سگ و گربه هایی که با پرندگان نگهداری می شوند نیز جدا شده اند (۲۵). درارتباط با آلودگی مواد غذایی به کمپیلوباکتر کارهای زیادی در ایران انجام شده، از جمله جمشیدی و همکاران یکصد

زئونوز می باشد. میزان جداسازی اجرام کمپیلوباکتر بستگی به عوامل مختلف، از جمله محیط نگهداری حیوان دارد، به نحوی که در محل های متراکم نظیر پناهگاه ها، شیوع عفونت بالاتر خواهد بود. فاکتورهای خطر در این زمینه عواملی نظیر استرس، تغییرات جیره ی غذایی از جمله مصرف غذای خام و افزایش شیوع بیماری های گوارشی ذکر شده است (۶). در مطالعه ی حاضر، میزان شیوع کمپیلوباکتر (۶۳/۳۶ درصد) در یک حد نسبتاً بالا به دست آمد. از دلایل احتمالی آن می توان به دسترسی گربه های خانگی به محیط بیرون و دیگر عوامل خطر (نظیر اسهالی بودن، دسترسی به غذای خام و سن زیر ۱ سال) اشاره کرد.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که آلودگی به کمپیلوباکتر در گربه های مورد مطالعه، به میزان ۲۰/۸۳ درصد بود. آلودگی در سگ های مسن بیشتر از سگ های جوان بود، به نحوی که میزان آلودگی با افزایش سن افزایش یافت.

لاشه طیور را به دو روش m-PCR و روش های مرسوم مورد بررسی قرار دادند و میزان آلودگی را به روشهای مرسوم، ۷۸٪ و به روش m-PCR، ۲۸٪ گزارش کردند (۲۶). اهمیت بررسی میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در مواد غذایی به این دلیل است که گوشت مرغ یکی از مواد غذایی مورد استفاده سگ و گربه می باشد. در کل می توان گفت سگ ها نسبت به سایر حیوانات از جمله پرندگان، در انتقال کمپیلوباکتر به انسان از اهمیت بیشتری برخوردار می باشند. سگهای خانگی به طور معمول ارتباط نزدیکی با افراد خانه خصوصاً بچه ها دارند. آلوده بودن ۳۲٪ از سگهای سالم به کمپیلوباکتر، نشان می دهد که سگها و گربه های سالم هم می توانند به عنوان یک حامل کمپیلوباکتر برای انسان تهدیدکننده باشند.

افرادی که سگ و گربه نگهداری می کند باید توجه داشته باشند، همانطوری که افراد یک خانواده ملزم به رعایت یکسری اصول بهداشتی هستند، در ارتباط با سگ و گربه نیز رعایت اصول بهداشتی، از جمله عدم تماس با مدفوع حیوان، الزامی است. اگرچه کمپیلوباکتر آپسالانسیس فلور نرمال روده سگ و گربه هاست و رعایت اصول بهداشتی در این زمینه کفایت می کند ولی کمپیلوباکتر ژژونی عامل کمپیلوباکتریوز از جمله بیماری های

منابع

۱. مصلی نژاد ب، غریبی د، آویزه ر، عباسی ر. ۱۳۹۹. جداسازی و شناسایی گونه های کمپیلوباکتر در مدفوع گربه های خانگی شهرستان اهواز با روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرارز، فصلنامه دامپزشکی ایران، ۶۶ (۱): ۹۴-۱۰۴.
۲. محمدزاده ع، حکیمی آلنی ر، شریفی ا، قربانی م. ۱۳۹۱. بررسی میزان آلودگی سگ های خانگی به جنس کمپیلوباکتر با استفاده از تکنیک PCR، پژوهش های بالینی دام های بزرگ (دامپزشکی)، ۶ (۲): ۲۵-۳۰.
۳. وزیریان ب، ترکان س، خامسی پور ف. ۱۳۹۵. جداسازی کمپیلوباکتر از مدفوع گربه های شهرستان اصفهان و شهرکرد، همایش ملی بیماری های مشترک انسان و دام، شهرکرد، ۱، ۱-۱.
۴. محزونیه م، قربانی م، زهرایی صالحی ت. ۱۳۹۲. شناسایی گونه های کمپیلوباکتر در مدفوع سگ ها و گربه های به ظاهر سالم با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرارز چندگانه، پاتوبیولوژی مقایسه ای ایران، ۱۰ (۴): ۱۱۰۱-۱۱۰۶.
5. Santaniello A, Varriale L, Dipineto L, et al. (2021). Presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Dogs under Training for Animal-Assisted Therapies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(7):3717.
6. Szczepanska B., Andrzejewska M., Spica D., Klawe J.J. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiol*. 1: 17:80.
7. Martin, J. and Blaser, MJ. (2015). Diseases caused by Gram- negative bacteria. In: Kasper. Fauci. Hauser. Longo. Jameson. And Loscalzo. (Eds). *HARRISONS PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE*, 19: 1058-1060.
8. Wagenaar, JA.; French NP. and Havelaar, AH. (2013). Preventing *Campylobacter* at the source why is it so difficult. *Clinical Infectious Diseases*, 57(11): 1600-1606.
9. James, G.F. (2012). Enteric bacterial infections. In: Greene, C. (Eds). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4 th Ed.; St. Louis, Missouri, Pp: 370-374.
10. Inglis, GD.; Boras, VF. and Houde, A. (2011). Enteric campylobacteria and RNA viruses associated with healthy and diarrheic humans in the Chinook health region of southwestern Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1): 209-219.
11. Vandamme, P.; Debruyne, L.; De Brandt, E. and Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9): 2016-2022.
12. Jamshidi, A., Bassami, M. R., Farkhondeh, T. (2008): Isolation and identification of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter coli* from poultry carcasses by conventional culture method and multiplex PCR in *Research* 9: 132-136.

13. Zilbauer, M.; Dorrell, N.; Wren, BW. and Bajaj-Elliott, M. (2008). *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2): 123-129.
14. Byrne C.M., Clyne M. & Bourke B. (2007) *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiology* 153, 561–569.
15. Levin, RE. (2007). *Campylobacter Jejuni*, A Review of its Characteristics, Patogenicity, Ecology, Distribution, Sub species Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*, 21(4): 271-347.
16. Vandenberg, O., Skirrow, M.B., Butzler, J.P. (2005): *Campylobacter* and *Arcobacter*. Mashhad iran, *Iranian Journal of Veterinary Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections*, 2: 1541-1553.
17. Rao, MR.; Naficy, AB.; Savarino, SJ.; Abu-Elyazeed, R.; Wierzba, TF.; Peruski, LF.; Abdel-Messih, I.; Frenck, R. and Clemens, JD. (2001). Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. *American Journal of Epidemiology*, 154: 166–173.
18. Rodriguez, C.G.; Melo, R.T.; Fonseca, B.B.; Martins, P.A.; Ferreira, F.A.; Araújo, M.B.J. and Rossi, D.A. (2015). Occurrence and characterization of *Campylobacter* spp. isolates in dogs, cats and children. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 35 (4): 365-370.
19. Sandberg, M.; Bergsj, B.; Hofshagen, M.; Skjerve, E. and Kruse, H. (2002). Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 55 (4): 241-253.
20. Silva, J.; Leite, D.; Fernandes, M.; Mena, C.; Gibbs, PA. and Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in microbiology*, 2: 1- 12.
21. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009 Jan;67(1):6-20
22. Thépault A, Rose V, Queguiner M, Chemaly M, Rivoal K. Dogs and Cats: Reservoirs for Highly Diverse *Campylobacter jejuni* and a Potential Source of Human Exposure. *Animals (Basel)*. 2020 May 12;10(5):838. doi: 10.3390/ani10050838. PMID: 32408633; PMCID: PMC7278488.
23. Torkan S, Vazirian B, Khamesipour F, Dida GO. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* species in dogs and cats in Iran. *Vet Med Sci*. 2018 Nov;4(4):296-303. doi: 10.1002/vms3.117. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30168285; PMCID: PMC6236136.
24. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. 1997. *Biotechniques*. 2013 Jun;54(6):314-20.
25. Wieland, B.; Regula, G.; Danuser, J.; Wittwer, M.; Burnens, A.P.; Wassenaar, T.M. and Stark, K.D. (2005). *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular

characterization with AFLP. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52 (4): 183-189.

26. Yamazaki-Matsune, W.; Taguchi, M.; Seto, K.; Kawahara, R.; Kawatsu, K.; Kumeda, Y. et al. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56 (11): 1467-1473.

Identification of *Campylobacter* Species in Feces of Apparently Healthy Dogs and Cats by PCR Technique in Gonbad City

Morteza Razaghi Manesh^{1*}, Mohammad Reza Norozi Khorasani², Mahan Yaghmaee³, Mohamad Hossein Naserbakht³, Fatemeh Homayoon³

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
2. Graduated from Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Shushtar, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar Branch, Shushtar, Iran

*Corresponding author: Morteza_vet@yahoo.com

Abstract

Campylobacteriosis is a common disease between humans and animals that causes diarrhea in humans, dogs, cats and other domestic and wild animals. The purpose of this study was to identify *Campylobacter* species in feces of apparently healthy dogs and cats by PCR technique in Gonbad city. In this research, samples were collected by obtaining a complete history from the referred cats. Sampling was done using a sterile swab from the rectal area of 100 apparently healthy dogs and cats. For sampling, two swabs were used at the same time. One swab was used for culture and isolation of bacteria and the other swab sample was used for DNA extraction and then PCR test was performed and the desired data were statistically analyzed. The results obtained in the present study indicated that no contamination was observed in any of the cats. In dogs, *Campylobacter* infection was 20.83%. Infection was higher in old dogs than in young dogs, so that the rate of infection increased with age. Because of the frequent presence of *Campylobacter* species in cat feces, these organisms can play a role as a risk factor for public health. Accordingly, periodic tests and separating dogs and cats with diarrhea from other animals, especially dogs and cats that use raw meat and live in shelters, are very important.

Keywords: *Campylobacter*, Dog, Cat, PCR