۳استفاده از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از شیر خام

غلامرضا بنی شریف[۱]، محمد حسین مرحمتی زاده[۱]، حسن ممتاز[۲*]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

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

.

* **نویسنده مسوول:** Drmarhamati@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: گونه‌های *کمپیلوباکتر* از مهم‌ترین پاتوژن های عامل گاستروآنتریت های باکتریایی هستند که عموماً از طریق مواد غذایی با منشاء حیوانی منتقل می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش کار: تعداد ۴۳ ایزوله *کمپیلوباکتر* که از شیر خام گاو، گوسفند و بز درسطح استان چهارمحال وبختیاری جدا شده بودند، انتخاب و به روش ERIC-PCR آزمایش شدند.

نتایج: ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدوده ۱۰۰تا ۲۰۰۰جفت باز بودند که در آنالیز الگوی باندینگ حاصله با ضریب تشابه تطابق ساده در سطح تشابه بالای ۸۰ درصد در قالب ۵ پروفایل اصلی طبقه بندی شدند. بجز قرابت ۱۰۰ درصدی که در ۱ مورد دیده شد، سایر ایزوله‌ها دارای قرابت ژنتیکی بین ۵۴٪ تا ۹۸٪ بودند.

نتیجه گیری: قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چند زیر گروه نشان گر قدرت تمایزدهی قابل قبول تکنیک ERIC-PCR در ژنوتایپینگ *کمپیلوباکتر* و وجود منابع مختلف آلودگی فراورده‌های لبنی با این پاتوژن می‌باشد. روش ERIC-PCR روشی ساده، سریع و کم هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *کمپیلوباکتر* ازجمله سویه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *کمپیلوباکتر*، شیر خام، دسته بندی ژنتیکی، ERIC-PCR

مقدمه

گونه‌های *کمپیلوباکتر* (*Campylobacter*) باسیل‌هایی گرم منفی, خمیده, متحرک, گرمادوست و میکروآئروفیل از خانواده *کمپیلوباکتریاسه* (*Campylobacteriacea*) بوده و یکی از عاملین مهم انتریت به نام کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند (۱). این جنس با دارا بودن گونه‌ها و میزبان‌های مختلف یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مشترک بین انسان و حیوان محسوب می‌شود(۲،۳). مطالعات نشان می‌دهد که ۹۵ درصد موارد کمپیلوباکتریوزیس در انسان توسط *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۴ درصد توسط *کمپیلوباکترکولی* و ۱ درصد به وسیله سایر گونه‌ها ایجاد می‌شود (۴). مهم‌ترین گونه کمپیلوباکتر که بیش از ۸۵ درصد از عفونت‌های روده‌ای را باعث می‌شود،*کمپیلوباکتر ژژونی* است. معمول‌ترین بیماری که در نتیجه مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری در انسان ایجاد می شودگاستروانتریت است (۵). آمار جهانی ۲۰ تا ۳۵ درصد اسهال‌ها را ناشی از این باکتری‌ها می‌داند (۶). آرتریت سپتیک و باکتریمی، عفونت‌های نادری هستند که توسط گونه‌های *کمپیلوباکتر* ایجاد می‌شوند (۷). منبع اصلی این باکتری مجرای گوارش حیوانات, به ویژه مرغ و بوقلمون می‌باشد. مصرف گوشت و مرغ نیم پز, شیر خام و آب غیر کلرینه علل عمده انتقال این باکتری به انسان و بروز کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند (۸). همچنین این بیماری در افراد با نقص ایمنی یا افراد خیلی جوان یا پیر به علت ضعف سیستم ایمنی و توانایی بیشتر این باکتری برای بیماری زایی، بیشتر دیده می‌شود (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که *کمپیلوباکتر* به طور عمده همراه با مواد غذایی با منشأ دامی انتقال می‌یابد. علاوه بر این که مصرف شیر خام در کشور ما بسیار پایین است و شیر به صورت سنتی و یا مدرن پاستوریزه می‌گردد، شیر خام آلوده به کمپیلوباکتر یکی از شایع‌ترین علت بیماری‌های روده‌ای در اثر مصرف مواد غذایی آلوده است (۱۰). در صورتی که بار میکروبی در شیر خام بالا باشد به دلیل فعالیت آنزیم‌های مقاوم به گرما در باکتری‌ها حتی بعد از عمل پاستوریزاسیون شیر خام، مواد لبنی حاصل از آن کیفیت مورد انتظار را ندارند و حامل باکتری‌ها می‌باشند (۱۱).

۲ تا ۵ روز پس از مصرف غذای آلوده, علایم کمپیلوباکتریوزیس شامل تب, دل درد و اسهال ظاهر می‌شود که اسهال ممکن است به اسهال خونی ختم گردد. معمولاً در این عفونت غذایی استفراغ وجود ندارد. برای کنترل این عفونت باید مواد غذایی گوشتی به طور کامل پخته شده و از مصرف شیر خام و آب غیر کلرینه نیز جلوگیری شود (۱۲).

بنابر مطالب گفته شده آلودگی باکتریایی شیر خام دارای اهمیت بوده و وجود یا عدم وجود *کمپیلوباکتر* جهت تأیید سلامت غذایی مواد لبنی از نقطه نظر وجود این باکتری ضروری است. به طور معمول روش‌های کشت، جداسازی و تست‌های تشخیص بر اساس خواص فنوتیپی جهت شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر به کار می‌رود (۱۳) اما از آن جا که این باکتری جز باکتری‌های سخت رشد است، جداسازی آن به وسیله روش‌های کشت دشوار می‌باشد، لذا روش‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز [Polymerase Chain Reaction (PCR)] در شناسایی کمپیلوباکتر بیش‌تر مورد اطمینان بوده و به طور تجاری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴).

از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی نظیر سروتاپینگ، بررسی الگوی پلاسمیدی، تعیین الگوی حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی، روش‌های متکی بربرش آنزیمی نظیرRFLP، روش‌های متکی بر PCR نظیر ERIC-PCR، RAPD-PCR، REP-PCR و BOX-PCR به عنوان روش‌های سریع جهت دسته بندی این باکتری استفاده شده است. روشRAPD- PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ مولکولی پیشرفته می‌باشد که به آسانی قابل انجام است. در سال‌های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت باالی آن، دقت باال، قابلیت تکرارپذیری، هزینه‌ی نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه‌ای مورد استفاده ویژه‌ای قرار گرفته است (۱۴).

علاوه بر تکنیک RAPD-PCR، تکنیک ERIC-PCR جهت مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی و سنجش‌های مبتنی بر ERIC-PCR استفاده ازپرایمرهایی می‌باشد که هدف آن‌ها توالی‌های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتری می‌باشد. از جمله این عناصرتکراری، توالی‌های تکراری توافقی درون ژنی انتروباکتریال یا ERIC می‌باشد که در باکتری‌های روده‌ای

گرم منفی شایع است. به طور کلی اجزاء و عناصر ۱۲۶جفت بازی، ERIC شامل یک نمونه تکراری معکوس مرکزی بسیار حفاظت شده در مناطق فراژنی می‌باشد که از این توالی تکراری جهت طراحی پرایمر در تکنیک ERIC-PCR جهت انگشت نگاری DNA استفاده می‌شود (۱۵).

با توجه به افزایش مصرف مواد لبنی در دهه گذشته و امکان بیش‌تر آلودگی باکتری‌ها، در مطالعه حاضر از روش ERIC-PCRجهت دسته بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکولی* جدا شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز استفاده شده است.

روش کار

غنی سازی نمونه‌های شیر خام

۱۰ میلی لیتر از هر کدام از نمونه‌های شیر خام در ۱۴۰۰۰دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. توده به دست آمده بعد از سانتریفوژ به ۹۰ میلی لیتر محیط پرستون براث (محیط پرستون براث ساخت شرکت Merck آلمان) جهت غنی سازی کمپیلوباکتر انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس نمونه‌ها به روش کشت خطی در محیط کشت اختصاصی (Campylobacter Selective Agar Base) ساخت شرکت مرک آلمان و بر پایه آگار خون دار کشت داده شد.

محیط Campylobacter Selective Agar Base حاوی ۷ درصد خون تجزیه شده اسب بود. همچنین هر ۵۰۰ میلی لیتر از آن شامل ۲ میلی گرم آنتی بیوتیک وانکومایسین جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به متی سیلین، ۵۰ میلی گرم پلی میکسین B جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های پسودوموناس، پاستورلا، سالمونلا، شیگلا و کلبسیلا و ۱ میلی گرم‌تری متوپریم به منظور جلوگیری از رشد *اشریشیاکلی*، انتروباکتر، کلبسیلا، استرپتوکوکوس، پاستورلا، کلستریدیوم، سامونلا، شیگلا، کورینه باکتریوم و پرتئوس بود (۱۶). سپس پلیت های فوق در شرایط میکروآئروفیلیک به همراه گازپک شامل ۵ درصد اکسیژن، ۱۰ درصد دی اکسیدکربن و ۸۵ درصد نیتروژن (گازپک ساخت شرکت Oxoid کانادا) در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری شدند (۱۷).

شناسایی و جداسازی *کمپیلوباکتر*

پلیت ها یی که حاوی پرگنه های مسطح، غیر همولیتیک، کروی، آبکی و خاکستری به قطر ۱ میلی متر بودند مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفتند. پس از شناسایی پرگنه های مشکوک با مشخصات ذکر شده در بالا در پلیت ها، پرگنه ها به روش گرم، رنگ آمیزی شدند. پرگنه هایی که واجد مشخصات کمپیلوباکتر بودند برای انجام آزمایشات تکمیلی و تأیید *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کولی*، خالص سازی و نگهداری شدند. آزمایشات تکمیلی شامل آزمایش اکسیداز و کاتالاز می‌باشند. از آزمایش اکسیداز با استفاده از دیسک اکسیداز برای تأیید کمپیلوباکتر بودن پرگنه مشکوک استفاده گردید. در ادامه نیز از آزمایش هیدرولیز هیپورات جهت تشخیص *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کولی* استفاده شد(۱۷).

ایزوله‌های جدا شده جهت مطالعات بعدی در محیط مایع TSB کشت داده شدند. جهت استخراج DNA از ایزوله‌های جدا شده از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از کشت مایع یک شبه باکتری در محیط TSB در۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا گردید.

آزمایشات مولکولی

برای تأیید قطعی *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جدا شده از ردیابی ژن *16SrRNA* به روش PCR استفاده شد که این ناحیه ژنی در تمام گونه‌های *کمپیلوباکتر* وجود دارد(۱۸). جهت افتراق گونه‌های *کمپیلوباکترژژونی* و*کمپیلوباکترکولی* ازPCR ژن‌های *mapA* و *ceuE* با زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول۱- توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت تشخیص گونه‌های *کمپیلوباکتر*

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

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل (Germany) FlexCycler2 در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱/۵ میلی مول Mgcl2، ۲۰۰ میکرومول NTP Mix، ۵/. میکرومول از زوج پرایمرهای FوR (مربوط به سه ژن)، ۰/۶ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۴ میکرولیتر از DNA مربوط هر ایزوله تنظیم شد. برنامه حرارتی مورداستفاده 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 مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

در آزمایش PCR از سویه‌های استاندارد *Campylobacter jejuni* ATCC29428 و *Campylobacter coli* ATCC43478 و ایزوله‌های جدا شده در مطالعات قبلی به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد.

جهت دسته‌بندی ژنتیکی و تیپ بندی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کولی* جداشده از فراورده‌های لبنی از روش ERIC-PCR استفاده شد.

آزمایش ERIC-PCR به کمک زوج پرایمرهای R1: ATGAAGCTCCTGGGGATTCAC و R2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG معرفی‌شده توسط Zorman و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد(۱۹). آزمایش PCR در این مرحله سه نوبت روی ۴۳ ایزوله انتخابی از ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کولی* جداشده، در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ، ۳ میلی مول Mgcl2، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای فوق، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله با برنامه حرارتی شامل:

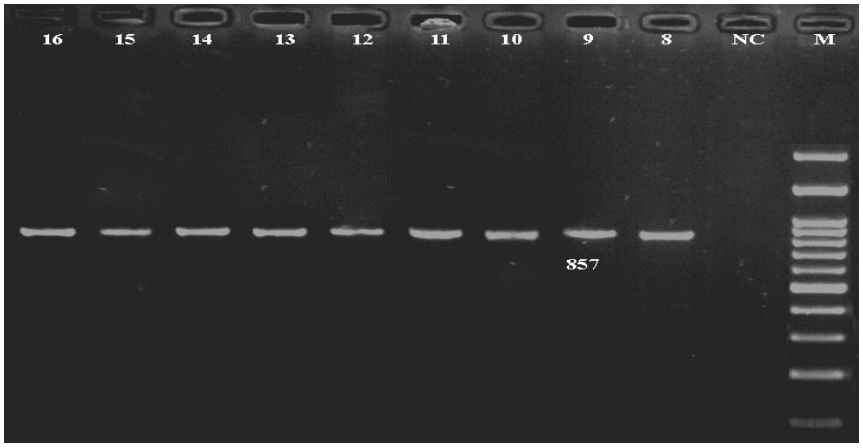
یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۵ سیکل تکراری ۹۴ سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۳۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در تمام مراحل فوق جهت ارزیابی محصول PCR، از الکتروفورز محصول روی ژل آگاروز 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.

در تکنیک ERIC-PCR آزمایش PCR روی ایزوله‌های موردمطالعه سه نوبت انجام و پس از اطمینان از تعداد و اندازه باندهای ایجادشده در هر ایزوله، الگوی باندی حاصله به کمک نرم‌افزار NTSIS آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش UPGMA شناسایی و دندروگرام مربوط به این نشان‌گر ترسیم گردید(۲۰).

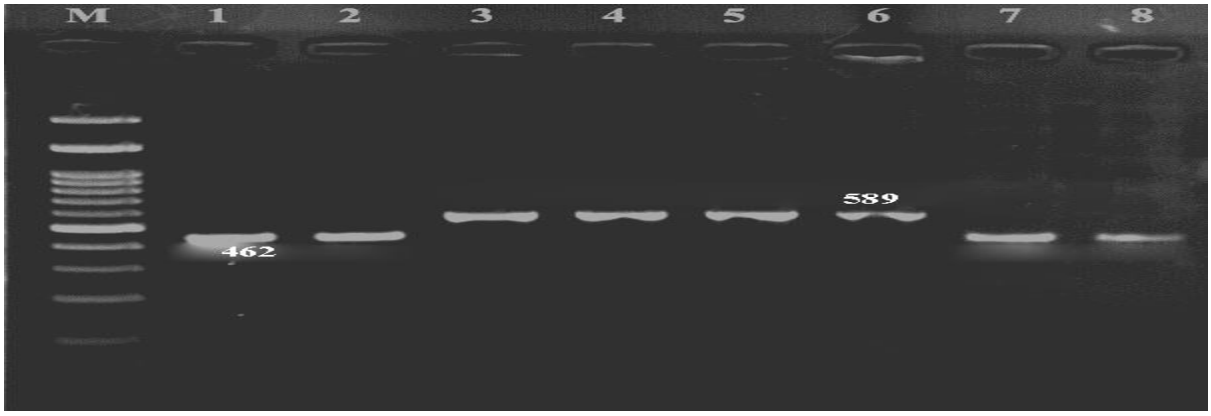
نتایج:

علاوه بز آزمون‌های میکروبی متداول به منظور تشخیص ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* از روش PCR جهت ردیابی ژن *16SrRNA* استفاده گردید نتیجه حاصل از ردیابی ژن *16SrRNA* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* مربوط به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در ایزوله‌های جداشده (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون ۱= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۱۶-۸= نمونه‌های مورد مطالعه)

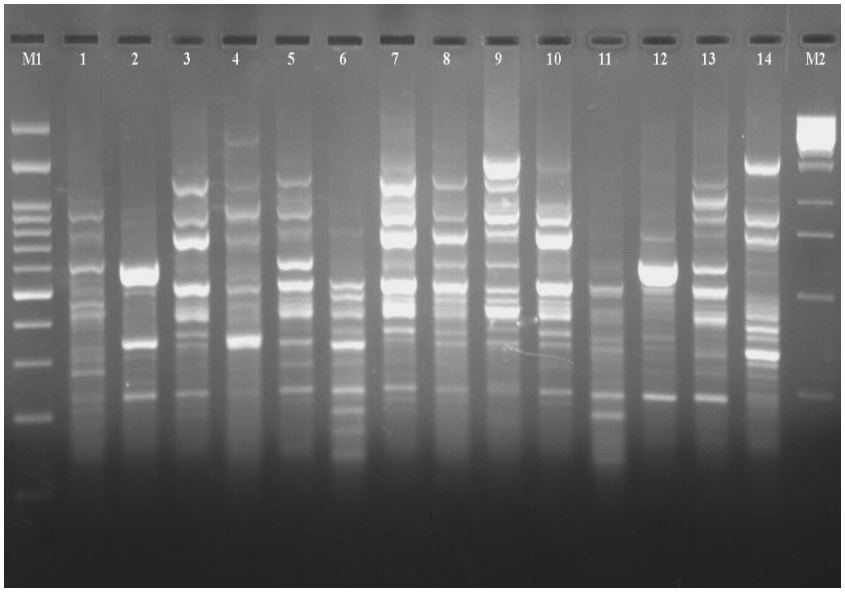
در کلنی‌های مشکوک به گونه‌های کمپیلوباکتر وجود ژن *mapA* نشانگر وجود گونه کمپیلو باکتر ژژونی و ژن *ceuE* نشان‌گر وجود گونه کمپیلوباکتر کولی بود. ایزوله‌های فاقد دو ژن به‌عنوان سایر گونه‌های کمپیلو باکتر قلمداد شدند



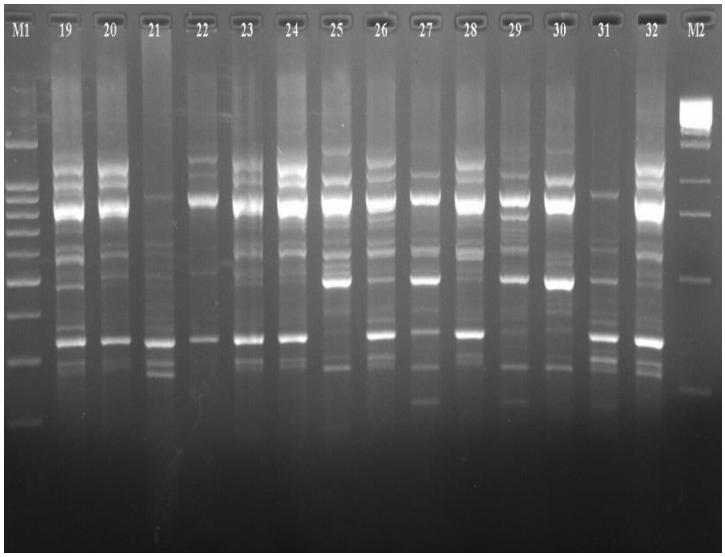
عکس ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *mapA* مربوط به گونه *کمپیلوباکترژژونی* (قطعه ۵۸۹ جفت بازی) و ژن *ceuB* مربوط به گونه *کمپیلوباکترکولی* (قطعه ۴۶۲ جفت بازی) در ایزوله‌های جداشده از شیر خام گاو، گوسفند و بز (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون‌های ۸-۱= نمونه‌های مورد مطالعه)

از مجموع ۴۳۲ نمونه اخذ شده از شیر خام گاو، گوسفند و بز، ۷۶ ایزوله کمپیلوباکتر جدا شد که جهت دسته بندی ژنتیکی ۴۳ ایزوله انتخاب شده از بین آن‌ها، از روش ERIC-PCR استفاده شد که در این راستا ۴۳ ایزوله مورد مطالعه سه نوبت با روش ERIC-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته درPCR) تصاویر حاصل از الکتروفورز (عکس‌های ۳ و ۴) آنالیز شدند .

ایزو له های انتخابی شامل، نمونه‌های شماره ۱۸-۱ گونه کمپیلوباکتر ژژونی (ایزوله‌های ۳-۱ جدا شده از شیر بز، ایزوله‌های ۱۲-۴ جدا شده از شیر گاو، ایزوله‌های ۱۸-۱۳ جدا شده از شیر گوسفند) و نمونه‌های شماره ۴۳-۱۹ گونه کمپیلوباکتر کولی (ایزوله‌های ۲۶-۱۹ جدا شده از شیر بز، ایزوله‌های ۳۸-۲۷ جدا شده از شیر گاو، ایزوله‌های ۴۳-۳۹ جدا شده از شیر گوسفند) بودند.



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به نشان‌گر ERIC-PCR روی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی*(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)



عکس ۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول ERIC-PCR روی ایزوله‌های *کمپیلوباکترکولی*(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M2= مارکر ۱ کیلو بازی DNA)

طبق تصاویر ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدود ۱۲۰تا ۳۰۰۰ جفت بازی DNAبودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد (۱وجود باند) و (۰عدم وجود باند)امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل هادر برنامه NTSYSآنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها،شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰و۱با استفاده از ضرایب جاکارد،دایس و تطابق ساده محاسبه شدکه ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتمAو هر کدام از سه ضریب فوق در جدول ۱آورده شده است.

جدول ۱-ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* و *کولی* با نشانگر ERIC-PCR

ضریب تشابه الگوریتم	ضریب تشابه جاکارد(J)	ضریب تشابه دایس (DICE)	ضریب تطابق ساده (SM)
UPGMA	0.77145	0.68810	0.77743

طبق اطلاعات جدول فوق ضریب تطابق ساده(۷۷۷./) بزرگ‌تر از دو ضریب جاکارد و دایس بوده لذا جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از این ضریب استفاده شد.

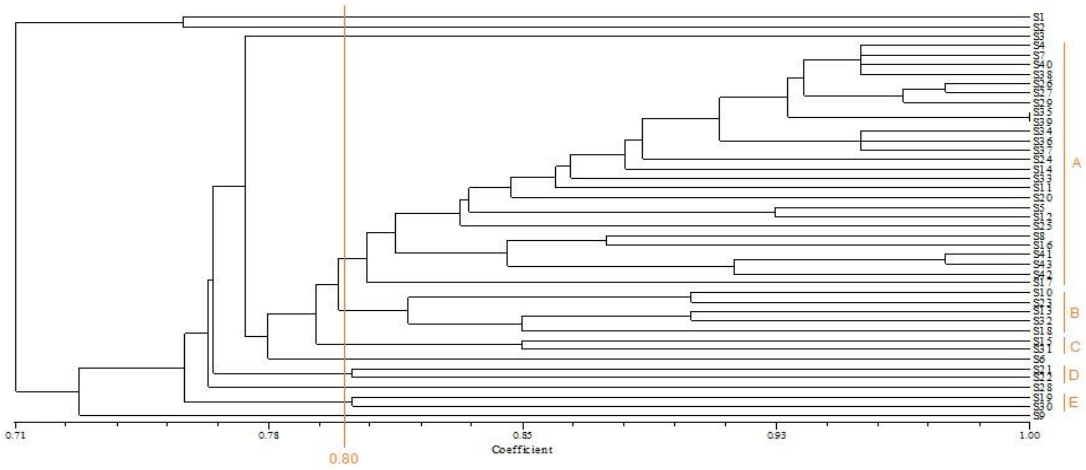
در نشانگر ERIC-PCR یک مورد ایزوله‌ها داری قرابت ۱۰۰ ٪ (ضریب شباهت ۱) بودند. قرابت ژنتیکی ۱۰۰ ٪ بین ایزوله‌های ۳۵ با ۳۹ مشاهده شد. و کمترین قرابت ژنتیکی بین ایزوله ۲۲با۱(ضزیب شباهت۵۴ ٪) وجود داشت (جدول ۲)

با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد ۴۳ ایزوله انتخابی در قالب ۵ پروفایل قرار گرفتند (شکل ۵).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43
S1	1.00																																										
S2	0.76	1.00																																										
S3	0.61	0.76	1.00																																								
S4	0.71	0.80	0.80	1.00																																							
S5	0.66	0.71	0.80	0.85	1.00																																						
S6	0.68	0.73	0.68	0.83	0.78	1.00																																				
S7	0.71	0.80	0.80	0.95	0.85	0.83	1.00																																			
S8	0.71	0.76	0.71	0.80	0.80	0.83	0.80	1.00																																		
S9	0.59	0.63	0.73	0.73	0.78	0.71	0.73	0.68	1.00																																	
S10	0.66	0.71	0.71	0.85	0.80	0.73	0.90	0.71	0.83	1.00																																
S11	0.68	0.73	0.78	0.88	0.83	0.80	0.88	0.73	0.66	0.78	1.00																															
S12	0.63	0.68	0.78	0.83	0.93	0.80	0.83	0.78	0.76	0.78	0.80	1.00																														
S13	0.59	0.63	0.73	0.78	0.78	0.71	0.78	0.73	0.80	0.83	0.76	0.80	1.00																													
S14	0.66	0.76	0.76	0.90	0.85	0.78	0.90	0.80	0.68	0.80	0.88	0.83	0.78	1.00																												
S15	0.63	0.73	0.78	0.83	0.83	0.71	0.83	0.78	0.76	0.83	0.80	0.76	0.71	0.83	1.00																											
S16	0.73	0.73	0.73	0.83	0.83	0.76	0.83	0.88	0.66	0.73	0.80	0.80	0.71	0.83	0.80	1.00																										
S17	0.68	0.68	0.78	0.83	0.78	0.71	0.83	0.73	0.71	0.78	0.85	0.76	0.76	0.83	0.76	0.80	1.00																									
S18	0.76	0.71	0.66	0.80	0.80	0.73	0.80	0.80	0.73	0.80	0.78	0.78	0.83	0.80	0.78	0.88	0.78	1.00																								
S19	0.63	0.73	0.68	0.78	0.73	0.71	0.78	0.68	0.66	0.73	0.71	0.80	0.66	0.73	0.76	0.71	0.66	0.68	1.00																							
S20	0.76	0.80	0.76	0.85	0.76	0.78	0.85	0.76	0.68	0.80	0.78	0.78	0.73	0.80	0.78	0.78	0.78	0.80	0.83	1.00																						
S21	0.59	0.68	0.73	0.83	0.78	0.76	0.83	0.68	0.71	0.78	0.80	0.76	0.76	0.83	0.80	0.71	0.71	0.73	0.76	0.78	1.00																					
S22	0.54	0.63	0.68	0.78	0.73	0.76	0.78	0.68	0.71	0.73	0.71	0.80	0.76	0.78	0.66	0.71	0.71	0.68	0.76	0.73	0.80	1.00																				
S23	0.66	0.66	0.66	0.80	0.76	0.68	0.80	0.66	0.78	0.90	0.78	0.73	0.78	0.80	0.78	0.73	0.83	0.80	0.68	0.76	0.73	0.68	1.00																			
S24	0.63	0.78	0.88	0.88	0.88	0.76	0.88	0.73	0.76	0.78	0.85	0.85	0.76	0.83	0.80	0.76	0.80	0.73	0.76	0.78	0.76	0.71	0.73	1.00																		
S25	0.59	0.73	0.78	0.83	0.78	0.76	0.83	0.68	0.80	0.83	0.76	0.85	0.76	0.83	0.80	0.71	0.76	0.73	0.80	0.78	0.76	0.76	0.83	0.85	1.00																	
S26	0.71	0.80	0.80	0.95	0.85	0.88	0.95	0.80	0.73	0.85	0.88	0.88	0.78	0.90	0.83	0.83	0.83	0.80	0.83	0.90	0.88	0.83	0.80	0.88	0.88	1.00																
S27	0.73	0.78	0.78	0.93	0.83	0.85	0.93	0.78	0.71	0.83	0.90	0.85	0.76	0.88	0.80	0.85	0.85	0.83	0.80	0.88	0.85	0.80	0.83	0.85	0.85	0.98	1.00															
S28	0.61	0.71	0.66	0.80	0.71	0.73	0.80	0.71	0.63	0.76	0.78	0.78	0.68	0.85	0.73	0.68	0.73	0.66	0.73	0.76	0.78	0.73	0.80	0.73	0.83	0.85	0.83	1.00														
S29	0.68	0.78	0.78	0.93	0.88	0.85	0.93	0.83	0.71	0.83	0.85	0.90	0.80	0.93	0.80	0.85	0.80	0.83	0.80	0.88	0.85	0.85	0.78	0.85	0.85	0.98	0.95	0.83	1.00												
S30	0.73	0.78	0.68	0.83	0.73	0.71	0.83	0.68	0.66	0.78	0.76	0.71	0.76	0.78	0.71	0.71	0.76	0.78	0.80	0.83	0.76	0.66	0.73	0.76	0.71	0.83	0.80	0.73	0.80	1.00											
S31	0.63	0.73	0.73	0.83	0.78	0.71	0.83	0.68	0.71	0.78	0.80	0.76	0.71	0.88	0.85	0.71	0.76	0.73	0.71	0.73	0.76	0.66	0.78	0.80	0.85	0.83	0.80	0.83	0.80	0.76	1.00										
S32	0.68	0.73	0.78	0.88	0.88	0.76	0.88	0.78	0.76	0.88	0.85	0.85	0.90	0.88	0.80	0.80	0.85	0.88	0.71	0.83	0.76	0.76	0.83	0.85	0.80	0.88	0.85	0.73	0.90	0.80	0.80	1.00									
S33	0.68	0.78	0.78	0.88	0.83	0.76	0.88	0.73	0.71	0.78	0.85	0.80	0.71	0.88	0.80	0.80	0.85	0.78	0.80	0.83	0.76	0.71	0.83	0.85	0.85	0.88	0.90	0.78	0.85	0.80	0.85	0.80	1.00								
S34	0.78	0.78	0.78	0.93	0.88	0.85	0.93	0.83	0.80	0.88	0.85	0.85	0.80	0.88	0.80	0.85	0.85	0.88	0.76	0.88	0.80	0.76	0.83	0.85	0.80	0.93	0.90	0.78	0.90	0.85	0.80	0.90	0.85	1.00							
S35	0.66	0.80	0.80	0.90	0.80	0.83	0.90	0.76	0.73	0.80	0.83	0.83	0.73	0.85	0.78	0.78	0.78	0.76	0.78	0.85	0.83	0.78	0.76	0.93	0.88	0.95	0.93	0.80	0.93	0.78	0.78	0.83	0.83	0.88	1.00						
S36	0.78	0.78	0.78	0.93	0.83	0.80	0.93	0.78	0.76	0.88	0.85	0.80	0.80	0.88	0.80	0.80	0.85	0.83	0.76	0.88	0.80	0.76	0.83	0.85	0.80	0.93	0.90	0.78	0.90	0.85	0.80	0.90	0.85	0.95	0.88	1.00					
S37	0.73	0.78	0.83	0.93	0.88	0.80	0.93	0.78	0.80	0.88	0.85	0.85	0.80	0.88	0.85	0.80	0.85	0.83	0.80	0.88	0.80	0.76	0.83	0.90	0.85	0.93	0.90	0.78	0.90	0.85	0.85	0.90	0.90	0.95	0.88	0.95	1.00				
S38	0.71	0.85	0.85	0.95	0.85	0.83	0.95	0.80	0.78	0.85	0.88	0.83	0.78	0.90	0.83	0.83	0.83	0.80	0.78	0.85	0.83	0.78	0.80	0.93	0.88	0.95	0.93	0.80	0.93	0.83	0.83	0.88	0.88	0.93	0.95	0.93	0.93	1.00			
S39	0.66	0.80	0.80	0.90	0.80	0.83	0.90	0.76	0.73	0.80	0.83	0.83	0.73	0.85	0.78	0.78	0.78	0.76	0.78	0.85	0.83	0.78	0.76	0.93	0.88	0.95	0.93	0.80	0.93	0.78	0.78	0.83	0.83	0.88	1.00	0.88	0.88	0.95	1.00		
S40	0.71	0.80	0.80	0.95	0.85	0.83	0.95	0.80	0.73	0.85	0.88	0.83	0.78	0.90	0.83	0.83	0.83	0.80	0.78	0.85	0.83	0.78	0.80	0.93	0.83	0.95	0.93	0.80	0.93	0.83	0.83	0.88	0.88	0.93	0.95	0.93	0.93	0.95	0.95	1.00	
S41	0.63	0.73	0.83	0.88	0.83	0.76	0.88	0.83	0.71	0.78	0.80	0.80	0.80	0.88	0.80	0.85	0.80	0.78	0.71	0.78	0.80	0.80	0.73	0.85	0.76	0.88	0.85	0.73	0.90	0.76	0.76	0.85	0.80	0.85	0.88	0.85	0.85	0.88	0.88	0.93	1.00
S42	0.63	0.78	0.78	0.83	0.78	0.71	0.83	0.83	0.66	0.73	0.76	0.76	0.71	0.83	0.80	0.85	0.76	0.78	0.71	0.78	0.71	0.71	0.68	0.85	0.76	0.83	0.80	0.68	0.85	0.71	0.71	0.80	0.76	0.80	0.88	0.80	0.80	0.88	0.88	0.88	0.90

S43	0.66	0.76	0.80	0.85	0.80	0.73	0.85	0.85	0.68	0.76	0.78	0.78	0.78	0.85	0.83	0.88	0.78	0.80	0.73	0.80	0.78	0.78	0.71	0.83	0.73	0.85	0.83	0.71	0.88	0.73	0.73	0.83	0.78	0.83	0.85	0.83	0.83	0.85	0.85	0.90	0.98	0.93	1.00

جدول ۲- ماتریکس شباهت ژنتیکی بین ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* جدا شده از شیر خام بر پایه الگوریتم تطابق ساده



شکل ۵- دندروگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های *کمپیلوباکتر* برمبنای الگوریتم تطابق ساده (Simple Match)

بحث

کمپیلوباکتریوز یک بیماری گوارشی ناشی از غذای مشترک انسان و دام است که بیشتر از طریق شیر و فرآورده‌های حیوانی غیر پاستوریزه یا آلوده به انسان منتقل می‌شود (۲۲). با توجه به سهم بالای محصولات طیور در انتقال گونه‌های کمپیلوباکتر، نقش شیر خام گونه‌های حیوانی در چندین پژوهش ایرانی شناسایی شده است (۲۳). 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. همچنین *کمپیلوباکتر* امروزه به‌عنوان یکی از عوامل مهم در عفونت‌های باکتریایی با منشأ غذایی موردتوجه قرارگرفته است. این باکتری سالیانه ۴۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می‌کند. مطالعات جدید نشان می‌دهد که در کشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه عفونت‌های ناشی *کمپیلوباکترها* در انسان رو به افزایش است (۲۴).

درگذشته از روش‌های فنوتیپی ازجمله سروتایپینگ جهت دسته بندی سویه‌های این باکتری استفاده می‌شد. امروزه روش‌های مولکولی جایگزین روشهای مرسوم فنوتیپی شده است. چند روش برای دسته بندی سویه‌های مختلف *کمپیلوباکتر* طراحی و ارائه شده است. ارزیابی سیستم‌های مختلف طبقه بندی باکتری‌ها در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بر پایه معیارهای مهمی نظیر توان تمایزدهی تکنیک، قابلیت تعیین تیپ و تکرارپذیری روش مربوطه می‌باشد. روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی برای تیپ بندی سویه‌های *کمپیلوباکتر* شناخته شده است روش‌های فنوتیپی نظیر سروتایپینگ و فاژتایپینگ قدرت تمایزدهی پایینی دارند از این رو روش‌های ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا، هزینه پایین، کاربرد آسان و سریع در شناسایی و دسته بندی سویه‌های *کمپیلوباکتر* کاربرد پیدا کرده‌اند(۲۵).

اخیراًروش های مختلفی برای تعیین منشأ و منبع میکروب‌ها به کاررفته‌اند. روش‌هایی مثل ریبوتایپینگ،ERIC-PCR ، RAPD-PCR و RFLPبه طرز موفقیت آمیزی برای متمایز کردن سویه‌های باکتری‌های مختلف استفاده شده‌اند. ازکاربردی ترین روش‌ها در تیپ بندی سویه‌های *کمپیلوباکتر* روش‌های مبتنی بر PCRبه ویژه سه روش RAPD– -ERIC PCR،PCRو RFLP-PCR می‌باشد، در این مطالعه نیز از روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ایزوله‌های کمپیلوباکتر جداشده از فراورده‌های لبنی دراستان چهارمحال و بختیاری استفاده شد

۴۳ ایزوله *کمپیلوباکتر* با نشانگر،ERIC-PCR آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آن‌ها با ضریب تطابق ساده تعیین گردید. به جزشباهت ۱۰۰درصدی که در یک مورد بین ایزوله‌های ۳۵ با۳۹

مشاهده شد بیش‌ترین و کمترین درصد قرابت ۵۴٪ تا۹۸٪ بین ایزوله‌های مورد مطالعه دیده شد و همان گونه در درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس ضریب تطابق ساده مشهود است،

Ahmed و همکاران (۲۰۱۵) در مصر، از روشERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کمپیلوباکترژژونی* جداشده از منابع انسانی و مرغ استفاده کردند. ایزوله‌های جداشده از ۲۸۷ نمونه مرغ (۱۳۱ سواپ رکتوم،۳۹ نمونه پوست مرغ، ۸۷ نمونه گوشت خام مرغ و۳۹ نمونه بافت سکوم روده) و۲۴۶ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به گاستروآنتریت بعد از تائید مولکولی به روش Real-Time PCR و روش ERIC-PCR آنالیز شدند. در این مطالعه ۳۱ ایزوله *کمپیلوباکترژژونی* جداشده در ۱۸ پروفایل قرار گرفتند که ۲ پروفایل مربوط به ایزوله‌های انسانی و دامی مشترک بود (۲۶).

در مطالعه Lgwaran، Okoh (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* و۳۶ 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* موردمطالعه در ۲۹ پروفایل و۴ 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(۲۷).

Ammar و همکاران (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 (۲۸).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک ERIC-PCRجهت دسته بندی ژنتیکی سویه‌های *کمپیلوباکتر* به عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های پاتوژن دار استفاده شد. .استفاده از روش ERIC-PCR در ژنوتایپینگ ایزوله‌های جداشده نشان‌گر وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله‌ها بود و نشان داد که ایزوله‌های قرارگرفته در یک پروفایل احتمالاً می‌توانند نحوه انتقال مشابهی داشته باشند.

منابع

1. Izat AL, Gardner FA, Denton JH, Golan FA. Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. Poultry Science. 1988 Nov 1;67(11):1568-72.
2. Karenlampi R, Kalso S, Ponka A, Schildt M, Hakkinen M, Hanninen ML. Isolation and PFGE typing of Finnish *Campylobacter jejuni* strains from cattle, poultry and organic hens Abstracts of 5th World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin, Germany. 2004; 7-11:165
3. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. Clinical Infectious Diseases. 1995 May 1:1092-9.
4. Alterkruse SF, Boor KJ, Cook M, Cole E, Freier T, Jaykus L, King R, Mazzotta A, Kowalcyk B, Perencevich E, Ruple A. Analytical utility of campylobacter methodologies. Journal of Food Protection. 2007 Jan 20; 70(1):241-50.
5. Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. Journal of Infectious Diseases. 1997 Dec 1;176 (Supplement_2):S103-5.
6. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases. 1999 Sep;5(5):607.
7. Christopher FM, Smith GC, Vanderzant C. Examination of poultry giblets, raw

milk and meat for *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. Journal of Food Protection. 1982 Feb 1;45(3):260-2.
8. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media; 2008 Feb 5.
9. Hesari J, Ehsani MR, Khosrowshahi A, Ghaemi N. Effect of psychrotrophic bacteria and somatic cell count on proteolysis and sensory properties of UF white cheese. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2005 Sep 23;1(2).
10. Rosyidi A, Budhiharta S, Asmara W, Yudhabuntara D. Phenotypic and genotypic detection of *Campylobacter jejuni* at local chicken and chicken meat. Animal Production. 2010;12(2):128-34.
11. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller WG, Konkel ME. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. Journal of Clinical Microbiology. 2004 Dec;42(12):5549-57.
12. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Disease of poultry 12th Edition, Blackwell Publishing Professional, 2008; 657-90.
13. Lastovica AJ, Le Roux E. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. Journal of Clinical Microbiology. 2001 Nov;39(11):4222.
14. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley JP. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. Journal of Clinical Microbiology. 1997 Oct;35(10):2568-72.
15. Soleimanjahi H, Bamdad T, Kermanian M. Diagnosis of Enterovirus and mumps virus in CSF samples of patients with aseptic meningitis by RT-PCR assay. Daneshvar Medicine. 2008 Aug 22;15(3):75-80.
16. Shahrokhabad R, Rahimi E, Mommtaz H. Investigation of morbidity and antibacterial resistance of *Campylobacter* spp. sample isolation from broilers slaughter in Rafsanjan city using basic culture method. Veterinary Researches & Biological Products. 2011 Jun 22;24(2):53-8.
17. Khanzadi S, Jamshidi A, Soltaninejad V, Khajenasiri S. Isolation and identification of *Campylobacter jejuni* from bulk tank milk in Mashhad-Iran. World Applied Sciences Journal. 2010;9(6):638-43.
18. 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 May 1;89(5):1015-20.
19. Zorman T, Heyndrickx M, Uzunović-Kamberović S, Možina SS. Genotyping of Campylobacter coli and C. jejuni from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. International Journal of Food Microbiology. 2006 Jul 1;110(1):24-33.
20. 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 Dec;16(1):1-8.
21. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 1991 Dec 25;19(24):6823-31.
22. TCR from Poultry. Antimicrobial resistance and antibiogram of thermotolerant Campylobacter recovered from poultry meat in Baghdad markets, Iraq. Archives of Razi Institute. 2022;77(1):249-55.
23. Taghizadeh M, Nematollahi A, Bashiry M, Javanmardi F, Mousavi M, Hosseini H. The global prevalence of *Campylobacter* spp. in milk: A systematic review and meta-analysis. International Dairy Journal. 2022 Oct 1;133:105423.
24. Fani MJ, Mokhtarian D H, Mohsenzadeh M, Ghahramani M,

Moshki M. Detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry carcasses slaughtered in Gonabad poultry slaughterhouse. Internal Medicine Today. 2009 Jul 10;15(2):30-5.

25. Kamerbeek J, Schouls LE, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 1997 Apr;35(4):907-14.
26. Ahmed HA, El Hofy FI, Ammar AM, Abd El Tawab AA, Hefny AA. ERIC-PCR genotyping of some Campylobacter jejuni isolates of chicken and human origin in Egypt. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2015 Dec 1;15(12):713-7.
27. 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 Jan 1;10(1):1830701.
28. 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 Dec 22;11(1):3.

Application of ERIC-PCR method for genetic classification of campylobacter strains isolated from raw milk

GholamReza Banisharif[1], Mohammad Hosein Marhamatizadeh[1*], Hassan Momtaz[2]

1. Department of Food Safety and Quality Control, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

* Corresponding author: Drmarhamati@gmail.com

Abstract

Introduction and purpose: *Campylobacter* species are one of the most important pathogens causing bacterial gastroenteritis, which are generally transmitted through food of animal origin. The present study was conducted with the aim of genetic classification of *Campylobacter* isolated from raw milk of cows, sheep and goats in Chaharmahal and Bakhtiari province.

Methods: 43 isolates of *Campylobacter* isolated from raw milk of cows, sheep and goats in Chaharmahal and Bakhtiari provinces were selected and confirmed by ERIC-PCR method.

Results: The studied isolates revealed banding patterns ranging from 100 to 2000 open pairs, which were further classified into 5 main profiles with a similarity coefficient of simple matching at a similarity level above 80%. Except for 100% affinity which was observed in 1 case, other isolates had genetic affinity between 54% and 98%.

Conclusion: The placement of the studied isolates in several subgroups showed the acceptable discrimination power of the ERIC-PCR technique in *Campylobacter* genotyping and the presence of different sources of contamination of dairy products with this pathogen. ERIC-PCR method is a simple, fast and low-cost method to describe the genetic diversity of different *Campylobacter* strains, including *Campylobacter jejuni* and *coli* strains.

Keywords: *Campylobacter*, Raw milk, Genetic classification, ERIC-PCR