Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, September 2024

Original Article

Molecular identification of Campylobacter species and assessment of the pathogenicity potential of these isolates in cattle, based on the presence of CDT cytotoxin genes

Seyedeh Ommolbanin Ghasemian [1], Hamid Mahmoodipour [2]

[1] Assistant Professor, Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Many Gram-negative bacteria have the ability to produce cell swelling toxins, which are composed of three subunits encoded by the *cdtA, cdtB*, and *cdtC* genes. The aim of this study was to determine the prevalence of *cdtA, cdtB*, and *cdtC* in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from cattle.

Materials and methods: In this cross-sectional study, 152 stool samples were collected from cows. All samples were tested for the isolation of *Campylobacter* species using the prêt KB method. Then, suspected *Campylobacter* samples were authenticated using DNA sequencing method of *16SrRNA* genes. Finally, *Campylobacter* isolates were evaluated for detection of *cdtA, cdtB* and *cdtC* genes.

Results: Of the 152 samples, 14 (9.20%) of cow feces were positive for *Campylobacter spp*. Of these, nine samples (64.30%) were diagnosed with *Campylobacter jejuni* and five samples (35.70%) were diagnosed with *Campylobacter coli*. The prevalence of the *cdtA, cdtB*, and *cdtC* virulence genes in cattle was 64.29, 85.71, and 85.71%, respectively. These data show that *cdtA, cdtB*, and *cdtC* are widespread among Campylobacter isolates. Statistical analysis showed that there was no significant relationship between the occurrence of *cdtA, cdtB*, and *cdtC* and Campylobacter species with the host type.

Conclusion: Resuls shows that most of these isolates produced CDT toxin at a high level and quantity. Therefore, *Campylobacter* strains isolated from cattle can be considered infectious agents for humans.

Key words: Cytolethal distending toxin, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli,* Cattle.

Received: 21 May 2024 Revised: 5 July 2024 Accepted: 31 August 2024

Correspondence to: Hamid Mahmoodipour
Tel: +98 9166711485
E-mail: hamidmahmoudipoor@yahoo.com
Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 107 - 118

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره دوم (پیاپی ۵۹) تابستان ۱۴۰۳
صفحات ۱۱۸ –۱۰۷

Original Article

شناسایی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر و ارزیابی پتانسیل بیماریزایی این جدایه‌ها در گاو، بر اساس وجود ژن‌های سم کشنده تورمی سلولی CDT

سیده ام‌البنین قاسمیان[۱]، حمید محمودی‌پور[۲*]

[۱] استادیار، گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران. [۲] استادیار، گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بسیاری از باکتری‌های گرم منفی توانایی تولید سم کشنده تورمی سلولی را دارند. این سم از سه زیرواحد کدگذاری شده توسط ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* ساخته شده است. هدف از این مطالعه تعیین شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* جدا شده از گاو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۱۵۲ نمونه مدفوع گاو جمع آوری شد. همه نمونه‌ها برای جداسازی گونه‌های کمپیلوباکتر با استفاده از روش prêt KB مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس نمونه‌های مشکوک کمپیلوباکتر با استفاده از روش توالی‌یابی DNA ژن‌های 16SrRNA احراز هویت شدند. در نهایت، جدایه‌های کمپیلوباکتر برای تشخیص ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از میان ۱۵۲ نمونه ۱۴ نمونه (۹/۲۰٪) مدفوع گاو از نظر کمپیلوباکتر مثبت بودند. از این تعداد ۹ نمونه (۶۴/۳۰٪) به‌عنوان *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۵ نمونه (۳۵/۷۰٪) به عنوان *کمپیلوباکتر کلی* تشخیص داده شدند. در سنجش توسط PCR شیوع ژن‌های حدت *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در گاو به ترتیب ۲۹/۶۴، ۷۱/۸۵، ۷۱/۸۵ درصد بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در بین جدایه‌های کمپیلوباکتر گسترده هستند. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین بروز ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* و گونه‌های کمپیلوباکتر با نوع میزبان ارتباط معنی داری وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که اکثر این جدایه‌ها سم CDT را در سطح و مقدار زیاد تولید کردند. بنابراین، سویه‌های کمپیلوباکتر جدا شده از گاو می‌تواند عامل عفونی برای انسان در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سم متسع کننده سلولی، *کمپیلوباکتر ژژونی*، *کمپیلوباکتر کلی*، گاو.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۱ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۰

مقدمه

کمپیلوباکتریوزیس شایع‌ترین بیماری باکتریایی منتقله از طریق غذا در انسان از سال ۲۰۰۵ بوده است. باکتری‌های جنس *کمپیلوباکتر*، ۳ تا ٤ برابر بیشتر از سایر انتروپاتوژن‌ها از موارد ناشی از بیماری‌های منتقله از طریق غذا جدا می‌شوند (۱). گونه‌های کمپیلوباکتر به‌عنوان یکی از شایع‌ترین علل گاستروانتریت حاد باکتریایی در انسان در سراسر جهان شناخته می‌شوند. *کمپیلوباکتر ژژونی* عامل اصلی کمپیلوباکتریوزیس انسانی است. *کمپیلوباکتر کلی* کمتر از *کمپیلوباکتر ژژونی* دیده می شود، اما گزارش شده است که باعث اسهال در انسان

*) آدرس برای مکاتبه: گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
تلفن: ۰۹۱۶۶۷۱۱۴۸۵ پست الکترونیک: hamidmahmoudipoor@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

خواهد شد (۲). هر ساله تقریباً ۱٪ از جمعیت انسانی در اروپا به کمپیلوباکتر آلوده می‌شوند (۳)، همچنین میزان این بیماری در آفریقا نیز بالا می‌باشد (٤). بسیاری از حیوانات اهلی، مانند گاو، مخزن گونه‌های کمپیلوباکتر در نظر گرفته می‌شوند (۵). *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* باعث بعضی بیماری‌های در ارتباط با واکنش‌های ایمنی مانند اختلالات پلی آرتراژی، سندروم گلین باره و سندروم میلر فیشر هستند (٦و۷). دلیل تنوع آلودگی در انسان مشخص نیست، اگرچه چند بررسی نشان داده است که عوامل بیماریزای مختلف موجود در *کمپیلوباکترها* به بقای آن‌ها و ایجاد بیماری در میزبان کمک می‌کنند. به نظر می‌رسد تحرک، چسبندگی باکتری، تهاجم به اپیتلیوم روده، تولید سم و همولیزین از عوامل اصلی بیماری‌زایی گونه‌های *کمپیلوباکتر* باشند. چسبندگی و تهاجم باکتریایی، رویدادهای اولیه قبل از شروع فرآیندهای التهابی و پیشرفت اسهال هستند (۸). کمپیلوباکتر چند سیتوتوکسین منحصر به فرد تولید می‌کند که از بین آن‌ها فقط سم کشنده تورمی سلولی(CDT) به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته است (۹-۱۲). بسیاری از باکتری‌های گرم منفی توانایی تولید سم کشنده تورمی سلولی را دارند، سم کشنده تورمی سلولی، از سه زیر واحد کدگذاری شده توسط ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* ساخته شده است. هر سه محصول ژنی، برای اینکه سم از نظر عملکردی فعال باشد مورد نیاز است (۱۳و۱٤). سم Cdt (A,B,C) می‌تواند منجر به توقف سلول در مرحله G1/S یا G2/M در سیکل سلولی شود که البته بستگی به نوع سلول دارد (۱۵). سم کامل فعال، شامل مجموعه‌ای از *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* می‌باشد (۱٦).

جزء سمی توکسین CdtB می‌باشد و تزریق مقدار کمی از آن به داخل سلول به تنهایی تاثیرش به اندازه آن است که کل سم بداخل سلول تزریق شود، وظیفه دو جزء دیگر یعنی CdtA و CdtC، کمک به ورود جزء CdtB به داخل سلول است. مشخص شده است که CdtBبه عنوان یک DNase عمل می‌کند (۱۷).

گرچه نقش CdtA و Cdtc هنوز به خوبی مشخص نشده ولی از لحاظ ساختمانی به زنجیره B سم رایسین که مسئول اندوسیتوز وابسته به این سم است، شباهت دارد. به‌اضافه مشخص شده که Cdt می‌تواند منجر به فرار از مکانیسم‌های پاسخ ایمنی شده، همچنین می‌تواند مسیر را به سمت تولرانس هدایت کند (۱۸). Cdt به علاوه منجر به ترشح اینترلوکین ۸ (IL8) می‌شود (۱۹).

باتوجه به اینکه مطالعات محدودی در ایران در خصوص شیوع ژن‌های *cdt* در گاو صورت گرفته است، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر جدا شده از گاو در شهرستان بهبهان در استان خوزستان و ارزیابی پتانسیل بیماریزایی جدایه‌های کمپیلوباکتر بر اساس وجود ژن‌های سم کشنده تورمی سلولی CDT انجام شد.

مواد و روش‌ها

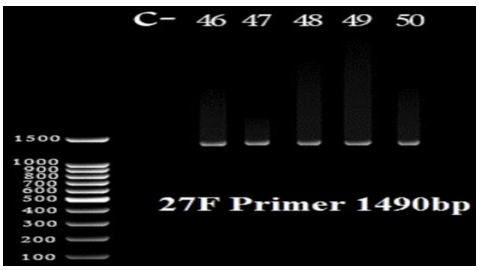
الف) جمع‌آوری نمونه: در مجموع ۱۵۲ نمونه مدفوع از گاو با استفاده از چوب استریل و کیسه‌های پلی اتیلن (مدیکال ایسون، تهران، ایران) جمع‌آوری و در مدت یک ساعت پس از نمونه‌برداری به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان منتقل شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از ورود به آزمایشگاه برای تشخیص کمپیلوباکتر مورد آزمایش قرار گرفتند.

ب) پردازش و جداسازی نمونه: تشخیص کمپیلوباکتر در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک کاپاندیس – باصری (prêt-KB) و محیط کشت عاری از خون و آنتی‌بیوتیک کاپاندیس – باصری (KB) تهیه شده از شرکت (های مدیا، بمبئی، هند) صورت گرفت. برای انجام این روش، نمونه‌های مدفوع ((w/v)۱۰٪) در سالین بافر فسفات استریل(۰/۱۰ مولار، pH≤۷) (مرک، آلمان) اضافه شد تا سوسپانسیون ۱۰٪ بدست آید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس در دمای اتاق قرار گرفت. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، ۰/۱۰ میلی‌لیتر مایع رویی از لوله بر روی محیط KB قرار گرفت (۲۰). پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیلیک گرمخانه‌گذاری شده و روزانه به مدت ۵ روز مورد آزمایش

قرار گرفتند.

ج) شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر: همه کلنی‌های مشکوک رشد کرده در محیط کشت KB، با مورفولوژی معمولی کمپیلوباکتر در زیر میکروسکوپ، تحرک دارت مانند، رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های اکسیداز و کاتالاز تایید شدند.

جدایه‌های با ویژگی احتمالی کمپیلوباکتر تحت آزمایش‌های استاندارد شناسایی فنوتیپی کمپیلوباکتر توصیه شده توسط آتابای و کوری (۲۱) قرار گرفتند. این آزمایشات شامل تشخیص تولید H_2S توسط نوار استات سرب، احیای نیترات، رشد در گلیسین ۱٪ و نمک طعام ۳/۵۰٪، رشد در دماهای ۲۵ درجه سلسیوس، ۳۷ درجه سلسیوس و ۴۲ درجه سلسیوس، هیدرولیز هیپورات، هیدرولیز ایندوکسیل استات، تولید اوره‌آز و مقاومت به نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) و سفالوتین (۳۰ میکروگرم) بود. آزمایش‌های اضافی برای شناسایی *کمپیلوباکترها*، تولید آلکالین فسفاتاز، آزمایش اکسیداتیو تخمیری (OF Test) و تخمیر گلوکز بود. کلیه اقلام مورد استفاده در تست‌های شناسایی فنوتیپی از پارسالاب (تهران، ایران) خریداری شد. در پایان، روش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال اختصاصی باکتریایی F27 و R1492 به منظور تایید نتایج فنوتیپ و تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر انجام شد (شکل ۱) (جدول ۱).



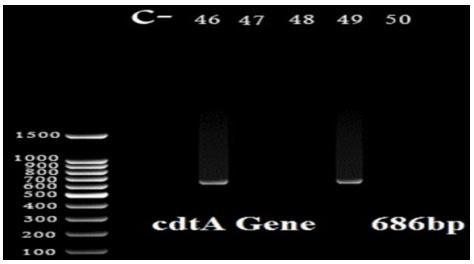
شکل ۱: ژل الکتروفورز ژن 16SrRNA *کمپیلوباکترهای* جداشده؛ ستون c: مارکر وزن مولکولی(لدر) ۱۰۰bp، ستون -C: کنترل منفی، چاهک‌های ٤٦ تا ۵۰، نمونه‌ها.

د) استخراج DNA، PCR و تشخیص ژن‌های cdtA، cdtB و cdtC: آزمایش PCR برای تشخیص *کمپیلوباکتر* و شناسایی ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* انجام شد. DNA با استفاده از روش فنل کلروفرم از کلنی مشکوک استخراج شد. PCR در ۲۵

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در PCR.

منبع	طول محصول PCR (bp)	طول پرایمر	توالی 3' ⟵ 5'	پرایمر	ژن
۲۲	۵۸۹	۲۰	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	27F	*16SrRNA*
		۲۰	CGGTTACCTTGTTACGACTT	1492R	
۲۳	۶۸۶	۱۹	CCTTGTGATGCAAGCAATC	F	*cdtA*
		۱۹	ACACTCCATTTGCTTTCTG	R	
	۵۱۰	۲۰	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	F	*cdtB*
		۲۰	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	R	
	۴۵۳	۲۳	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	F	*cdtC*
		۲۳	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	R	

میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با غلظت نهایی مخلوط واکنش PCR×۱ شامل: غلظت ۱میکروگرم–۱۰پیکوگرم از الگوی دی اکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA)، غلظت ۱–۰/۱۰ میکرومول در هر لیتر از هر پرایمر (شرکت ماکروژن، سئول، کره)، ۳/۲۰ میلی‌مول در لیتر محلول MgCl2، و ۲/۵۰–۱/۵۰ میکرولیتر تگ DNA پلیمراز انجام شد. تمامی اقلام مورد استفاده در PCR از شرکت یکتا تجهیز آزما (تهران، ایران) خریداری شده و آزمایش توسط ترمال سیکلر (Bio-Red، سنگاپور) انجام شد. یک لدر (مارکر وزن مولکولی) ۱۰۰DNA جفت باز به‌عنوان لدر مولکولی DNA استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۸۰ به مدت ٦۰ دقیقه الکتروفورز شدند. علاوه بر این، شناسایی ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* از هر DNA استخراج شده انجام شد و تمام DNA تکثیر شده با transilluminator UV (هیدولف، آلمان) مشاهده شدند (شکل ۲). پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل ۲: ژل الکتروفورز و تشخیص ژن *cdtA* جدایه‌های کمپیلوباکترها. ستون c: مارکر وزن مولکولی (لدر)bp100، ستون -C: کنترل منفی، چاهک‌های ٤٦ تا ۵۰: نمونه‌های جدا شده.

ه) ترسیم درخت فیلوژنی: ترسیم درخت فیلوژنی توالی ژن 16SrRNA برای جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار MEGA 6 انجام گرفت. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیرهمگون، درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال – همسایگی Neighbor-Joining و حداکثر درشت‌نمایی (Maximum Likelihood) ترسیم گردید. مقادیر Bootstrapping به وسیله ۵۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند.

و) آنالیز آماری داده‌ها: اطلاعات جمع‌آوری شده بعد از طبقه‌بندی وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ شد، پس از اطمینان از صحت ورود داده‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از روش‌های آمار توصیفی و تحلیلی انجام گرفت. همچنین از آزمون‌های کای ۲ و پیرسون برای آنالیز آماری استفاده شد. در آزمون‌های انجام شده ضریب اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

این تحقیق از شهریور ۱۴۰۱ تا بهمن ۱۴۰۱ در شهرستان بهبهان، خوزستان، ایران انجام شد. در کل ۱۵۲ نمونه مدفوع از گاوهای دامداری‌های شهرستان بهبهان جمع‌آوری گردید. از کل این تعداد ۱۴ نمونه، بر اساس کشت در محیط‌های کشت اختصاصی و تهیه گسترش رنگ آمیزی گرم، به‌عنوان *کمپیلوباکتر* تشخیص داده شدند. سپس برای تشخیص و افتراق گونه‌های *کمپیلوباکتر* از آزمایش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. تمامی *کمپیلوباکتر*های جدا شده از مدفوع گاوها، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. تشخیص قطعی جدایه‌های کمپیلوباکتر توسط PCR تایید گردید. بر این اساس از ۱۴ کمپیلوباکتر جدا شده، تعداد ۹ نمونه (۶۴/۳۰٪) به‌عنوان *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۵ نمونه (۳۵/۷۰٪) به عنوان *کمپیلوباکتر کلی* تشخیص داده شدند. به غیر از دوگونه *ژژونی* و *کلی*، گونه‌های دیگر *کمپیلوباکتر* در این بررسی مشاهده نشد (جدول ۲و۳). همچنین درصد شیوع جدایه‌های کمپیلوباکتر در نمونه‌های مدفوع گاو نشان داد که میزان شیوع باکتری *کمپیلوباکتر ژژونی* ۶۴٪ و شیوع باکتری *کمپیلوباکتر کلی* ۳۶٪ می‌باشد.

جدول ۲: درصد شیوع جدایه‌های *کمپیلوباکتر* در نمونه‌ها.

کمپیلوباکتر / نمونه	*کمپیلوباکتر ژژونی* تعداد (درصد)	*کمپیلوباکتر کلی* تعداد (درصد)	جمع (جنس کمپیلوباکتر) تعداد (درصد)
گاو	۹ (۶۴/۳۰)	۵ (۳۵/۷۰)	۱۴ (۱۰۰)
جمع	۹(۶۴/۳۰)	۵ (۳۵/۷۰)	۱۴ (۱۰۰)

جدول ۳: تایید شناسایی کمپیلوباکترهای جداشده از نمونه‌های مدفوع گاو بر اساس توالی‌یابی ژن 16SrRNA.

شماره نمونه	جدایه	کد دسترسی در بانک ژن	جنس و گونه
۱	C1	CP047477.1	*Campylobacter jejuni*
۲	C2	CP047481.1	*Campylobacter jejuni*
۳	C3	OX442413.1	*Campylobacter Coli*
۴	C4	CP054847.1	*Campylobacter jejuni*
۵	C5	CP044171.1	*Campylobacter jejuni*
۶	C6	CP047481.1	*Campylobacter jejuni*
۷	C7	CP022551.1	*Campylobacter jejuni*
۸	C8	CP007181.1	*Campylobacter coli*
۹	C9	CP059374.1	*Campylobacter coli*
۱۰	C10	CP092025.1	*Campylobactec coli*
۱۱	C11	CP007181.1	*Campylobacter coli*
۱۲	C12	CP053659.1	*Campylobacter jejuni*
۱۳	C13	CP047481.1	*Campylobacter jejuni*
۱۴	C14	CP053659.1	*Campylobacter jejuni*

C: گاو

شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در گاو به ترتیب ۶۴/۲۹، ۸۵/۷۱، ۸۵/۷۱ درصد بود.

در جدول ۵ تشخیص مولکولی کمپیلوباکتر و ژن *cdtA* مشاهده می‌شود که از مجموع ۹ نمونه *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۶ نمونه (۶۶/۶۷٪) دارای ژن *cdtA* و ۳ نمونه (۳۳/۳۳٪) فاقد این ژن بودند. همچنین در میان ۵ نمونه *کمپیلوباکتر کلی*، ۳ نمونه (۶۰٪) دارای ژن *cdtA* و ۲ نمونه (۴۰٪) این ژن را دارا نبودند. طبق آزمون کای دو پیرسون در سطح معنی‌داری ۵ درصد، نوع

کمپیلوباکتر (*ژژونی یا کلی*) با وجود ژن *cdtA* ارتباط ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).

همچنین در جدول ۵ تشخیص مولکولی کمپیلوباکتر و ژن *cdtB* مشاهده می‌شود که از مجموع ۹ نمونه *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۸ نمونه (۸۹/۸۸٪) دارای ژن *cdtB* و ۱ نمونه (۱۱/۱۱٪) فاقد این ژن بوده‌اند. در میان ۵ نمونه *کمپیلوباکتر کلی*، ٤ نمونه (۸۰٪) دارای ژن *cdtB* و ۱ نمونه (۲۰٪) این ژن را دارا نبودند. طبق آزمون کای دو پیرسون در سطح معنی‌داری ۵ درصد، نوع کمپیلوباکتر (ژژونی یا کلی) با وجود ژن *cdtB* ارتباط ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).

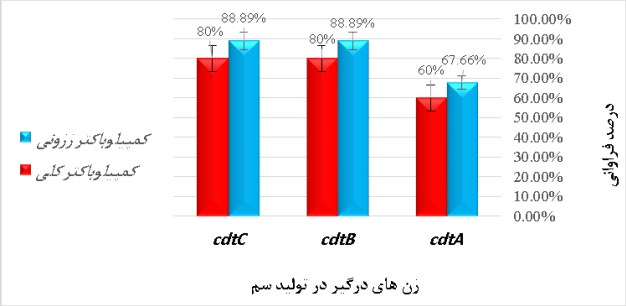
از سوی دیگر تشخیص مولکولی کمپیلوباکتر و ژن *cdtC* نشان داد که از مجموع ۹ نمونه *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۸ نمونه (۸۹ /.۸۸٪) دارای ژن *cdtC* و ۱ نمونه (۱۱/۱۱٪) فاقد این ژن بوده‌اند. همچنین در میان ۵ نمونه *کمپیلوباکتر کلی*، ٤ نمونه (۸۰٪) دارای ژن *cdtC* و ۱ نمونه (۲۰٪) این ژن را نداشتند. طبق آزمون کای دو پیرسون در سطح معنی‌داری ۵ درصد، نوع کمپیلوباکتر (ژژونی یا کلی) با وجود ژن *cdtC* ارتباط ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).

بنابراین تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین بروز ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* و گونه‌های کمپیلوباکتر ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p\leq ۰/۰۵$). نتایج دقیق تشخیص PCR ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در دو گونه کمپیلوباکتر به‌دست آمده از مدفوع گاو در جدول ٤ نشان داده شده است. درصد شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکترکلی* جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاو در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است.

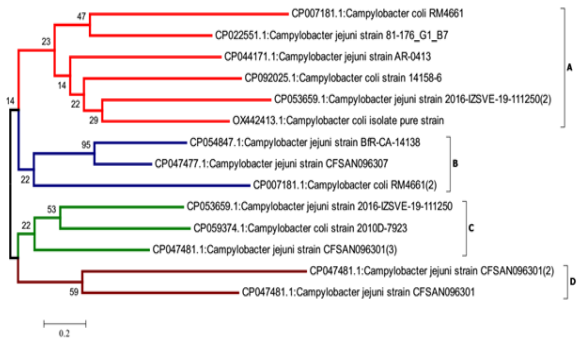
درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های ژن 16SrRNA جدایه‌های پژوهش حاضر ترسیم گردید. جدایه ها در چهار گروه اصلی قرار گرفتند. گروه A شامل جدایه‌های CP007181.1، CP022551.1، CP044171.1، CP092025.1، CP053659.1 و OX442413.1 می‌باشد. گروه B شامل جدایه‌های CP054847.1، CP047477.1 و CP007181.1 می‌باشد. گروه C شامل جدایه‌های CP053659.1، CP059374.1 و CP047481.1 می‌باشد. گروه D شامل دو جدایه CP047481.1 بود (شکل ۳).

جدول ٤: شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکلی* جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاو.

نمونه	گونه	تعداد	ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC*		
			ژن‌های درگیر در تولید سم		
			cdtA تعداد (درصد)	*cdtB* تعداد (درصد)	*cdtC* تعداد (درصد)
مدفوع گاو	*کمپیلوباکتر ژژونی*	۹	٦ (٦٦/٦٧)	۸ (۸۸/۸۹)	۸ (۸۸/۸۹)
	کمپیلوباکتر کلی	۵	۳ (٦۰)	٤ (۸۰)	٤ (۸۰)
	جمع	١٤	۹ (٦٤/۲۹)	۱۲ (۸۵/۷۱)	۱۲ (۸۵/۷۱)



نمودار ۱: درصد شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* *کمپیلوباکترژژونی* و *کمپیلوباکترکلی* جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاو.



شکل ۳: درخت فیلوژنی بر اساس متد Neighbor-Joining و توالی‌یابی ژن 16SrRNA جدایه‌های مورد بررسی، مقادیر بوت استرپ (٪) به‌دست آمده از ۱۰۰۰ شبیه سازی در گره‌ها نشان داده شده است. مقادیر بوت استرپ کمتر از ۷۰٪ نشان داده نمی‌شود. نوار: ۰/۲۰ تعویض در هر سایت.

بحث

تحقیقات بر روی ویژگی‌های حدت باکتری‌های بالقوه بیماری‌زا در حیوانات اهلی و در غذاهای با منشاء حیوانی برای ایمنی مصرف کننده ضروری است. اگرچه برای ارزیابی خطر کمپیلوباکتریوزیس، شناسایی ژن‌های حدت در گونه‌های کمپیلوباکتر جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاو ضروری است، اما تاکنون در شهرستان بهبهان استان خوزستان به جز تحقیقات نویسنده این مقاله، تحقیقات گسترده‌ای در این خصوص صورت نگرفته است. عوامل مختلفی برای وضوح نوع بالینی متغیر مرتبط با عفونت کمپیلوباکتر پیشنهاد شده‌اند و ویژگی‌های فنوتیپی مرتبط با گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر می‌تواند با تنوع ژنتیکی آن‌ها مرتبط باشد (۲۴). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در جدایه‌های کمپیلوباکتر از نمونه‌های مدفوع گاو می‌باشد. مطالعه حاضر طی شهریور ماه ۱۴۰۱ الی بهمن ماه ۱۴۰۱ انجام شد. از ۱۵۲ نمونه مورد بررسی، ۱۴ نمونه مثبت و به جنس کمپیلوباکتر تعلق داشتند. تعداد نمونه‌های مثبت کمپیلوباکتر در گاو ۹/۲۰٪ از کل نمونه‌های مورد بررسی بود. از ۱۴ نمونه مثبت کمپیلوباکتر، ۹ نمونه (۶۴/۳۰٪) به‌عنوان *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۵ نمونه (۳۵/۷۰٪) *کمپیلوباکتر کلی* بود. بدیهی است که می‌توان نتیجه گرفت که *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در گاوهای شهرستان بهبهان وجود دارد. نتایج تحقیق ما نشان داد که میزان شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* در گاو به ترتیب ۶۴/۲۹، ۸۵/۷۱، ۸۵/۷۱ درصد بود.

خوشه ژن *cdt* از سه ژن مجاور هم *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* تشکیل شده است. سم CDT از پروتین CdtB به‌عنوان زیرواحد فعال آنزیمی و دو زیرواحد هترودایمری CdtA و CdtC تشکیل شده است که مسئول اتصال هولوتوکسین به غشای سلولی هستند (۶).

همسو با نتایج تحقیق حاضر خوشبخت و همکاران (۲۰۱۳) تحقیقی بر روی جدایه‌های کمپیلوباکتر انجام دادند. ایشان به بررسی توزیع ۹ ژن مرتبط با تهاجم در *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* جدا شده از مدفوع مرغ پرداختند. در این مطالعه ۱۰ ژن تهاجم بین گونه‌های جدا شده *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* از نمونه‌های مدفوعی جوجه بریانی، گاو و گوسفند مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه شیوع بالای ۸ ژن تهاجم از جمله ژن‌های *cdt* را نشان داد، اگرچه *کمپیلوباکتر ژژونی* فعالیت سیتوتوکسیک بیشتری در مقایسه با *کمپیلوباکتر کلی* نشان داده اما در این مطالعه هر دو گونه حرارت دوست کمپیلوباکتر شیوع ۱۰۰٪ ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* را نشان دادند. نتایج این تحقیق همسو با تحقیق حاضر می‌باشد (۲۵). Casabonne و همکاران (۲۰۱۶) در آرژانتین نشان دادند که ژن *cdtB* در ۱۰۰٪ از جدایه‌های *کمپیلوباکتر* مورد آزمون وجود دارد (۶). همچنین Zhong و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی تنوع ژنتیکی *کمپیلوباکتر ژژونی*‌های جدا از مواد غذایی خرده فروشی در چین پرداختند و دریافتند که ژن *cdt* با شیوع ۸۰٪ در جدایه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد، که نشان می‌دهد اکثر گونه‌های جدا شده ممکن است قدرت پاتوژنی کاملی داشته باشند (۲۶). Koolman و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی به بررسی توزیع ژن‌های مرتبط با تهاجم در جدایه‌های کمپیلوباکتر پرداختند. این مطالعه حاوی اطلاعاتی در مورد ژن‌های بیماری‌زایی در ۲۴ گونه جدا شده کمپیلوباکتر (عمدتا *کمپیلوباکتر ژژونی*) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* بین گونه‌های جدا شده شیوع بالایی داشتند. با وجود اینکه *cdtB* در تمام گونه‌ها شناسایی شد، اما ژن‌های *cdtA* و *cdtC* نسبت به ژن *cdtB* شیوع کمتری داشتند (۲۷)، که نتایج این تحقیق نیز همسو با نتایج مطالعه حاضر بود.

در مطالعه‌ای دیگر Lapierre و همکاران (۲۰۱۶) خصوصیات حساسیت ضد میکروبی و ارتباط آن‌ها با ژن‌های تهاجم مرتبط با اتصال، تهاجم و سیتوتوکسیسیتی در *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* جدا شده از حیوانات، گوشت و انسان را بررسی کردند. نتایج نشان داد که گونه‌های *کمپیلوباکتر* به طور متوسط ۶ ژن تهاجم را حمل می‌کنند. در کل، شیوع ژن تهاجم در گونه‌های *کمپیلوباکتر* بالا بود و شایع‌ترین ژن‌های شناسایی شده شامل *cadF*، *flaA*، *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* بودند. در حالی

که کمترین ژن شایع *wlaN* بود. در مورد گونه‌های جدا شده از نمونه‌های مدفوعی گاوی، شایع‌ترین ژن‌ها (۷۱٪) *cdtC*، *cadF* (۶۶٪) و (۶۳٪) *cdtA* بودند، هنگام آنالیز نتایج مشاهده شد که گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* درصد بالایی از ژن‌های تهاجم را نسبت به *کمپیلوباکتر کلی* دارند. شایع‌ترین ژن برای *کمپیلوباکتر ژژونی* *pldA* (۸۲٪) و کمترین ژن شایع *cdtA* (۵۴٪) بود، در حالی که در *کمپیلوباکتر کلی*، نتایج مخالفی دیده شد، به طوری که شایع‌ترین ژن (۴۵٪) *cdtA* و کم‌ترین ژن (۱۷/۸۰٪) *pldA* بودند (۲۸). همچنین همسو با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر Lapierre و همکاران نشان دادند که ۶۰/۲۰٪ باکتری‌های شناسایی شده *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۳۹/۸۰٪ *کمپیلوباکتر کلی* بودند. در این مطالعه، تفاوت قابل توجهی در تعداد ژن‌های تهاجم موجود در *کمپیلوباکتر کلی* و *کمپیلوباکتر ژژونی* وجود داشت، *کمپیلوباکتر ژژونی* تعداد بالاتری از ژن‌های تهاجم داشت (۲۸).

تحقیقی توسط Rizal و همکاران (۲۰۱۰) در هند بر روی *کمپیلوباکتر ژژونی* انجام گرفت. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که شیوع ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* به‌ترتیب ۵۰٪، ۲۷/۷۷٪ و ۲۷/۷۷٪ می‌باشد (۲۹). نتایج این تحقیق مخالف با تحقیق حاضر است که ممکن است در این خصوص دلایل ژنتیکی و تغییر و تنوع جدایه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف نقش داشته باشند.

طبق توپولوژی درخت فیلوژنی و امتیاز بوت استرپ، جدایه‌های *کمپیلوباکتر* به چهار گروه تقسیم شدند. خوشه A بزرگترین خوشه و شامل جدایه‌های CP007181.1، CP022551.1، CP044171.1، CP092025.1، CP053659.1 و OX442413.1 بود. در این گروه زیر گروهی با حمایت ۴۷ درصد (Bootstrapping) متشکل از CP007181.1 و CP022551.1 بود که نزدیک‌ترین فاصله ژنتیکی را بهم دارند. بعلاوه زیر گروهی دیگر در خوشه A وجود دارد که متشکل از دو جدایه CP053659.1 و OX442413.1 است که با حمایت ۲۹ درصد نزدیک‌ترین فاصله ژنتیکی را به هم دارند. در خوشه B زیرگروهی با دو جدایه CP054847.1 و CP047477.1 است که با حمایت ۹۵ درصد نزدیک‌ترین سویه‌ها به هم می‌باشند. در خوشه C زیرگروه با دو جدایه CP053659.1 و CP059374.1 و با حمایت ۵۳ درصد نزدیک‌ترین فاصله ژنتیکی را بهم دارند. در خوشه D جدایه CP047481.1 با حمایت ۵۹ درصد وجود دارد که یک سویه می‌باشد. نتایج تحقیقی که توسط Carrillo و همکاران (۲۰۱۲) بر روی فیلوژنی گونه‌های *کمپیلوباکتر کلی* و *کمپیلوباکتر ژژونی* انجام شد همسو با تحقیق حاضر می‌باشد (۳۰). Kovanen و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی به بررسی خصوصیت ژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنی جدایه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* در غرب فنلاند پرداختند که نتایج تحقیق آن‌ها نیز همسو با تحقیق حاضر است (۳۱). همچنین Quino و همکاران (۲۰۲۲) در تحقیقی که به بررسی آنالیز ژنومی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در پرو پرداختند نتایج مشابه با مطالعه حاضر به دست آوردند (۳۲).

نتیجه‌گیری

جدایه‌های کمپیلوباکتر از نظر وجود ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* تنوع گسترده‌ای را نشان دادند، اما شناسایی یک توالی نوکلئوتیدی خاص که فاکتور حدت را کد می‌کند، به این معنی نیست که این ژن‌ها بیان می‌شوند و محصولات آن‌ها توانایی ایجاد بیماری را دارند. اما می‌توان گفت که احتمالاً می‌تواند یک بیماریزای بالقوه برای انسان باشد. تعداد ژن‌های حدت موجود در گونه‌های بیماری‌زا ما را قادر می‌سازد پیش‌بینی کنیم که آیا بیماری در انسان پیشرفت می‌کند یا خیر. شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* در گاوهای شهرستان بهبهان نشان می‌دهد که اکثر این جدایه‌ها سم CDT را در سطح و مقدار زیاد تولید کردند. به‌خصوص سویه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* که در سطوح زیاد سم تولید کردند که این مطلب می تواند شیوع اسهال ناشی از این باکتری را در اهالی منطقه بهبهان توجیه کند. بنابراین، سویه‌های کمپیلوباکتر جدا شده از گاو می تواند عامل عفونی برای انسان در نظر گرفته شود. با توجه به شیوع بالای ژن‌های *cdtB* و *cdtC*، نتایج مطالعه ما نشان داد که این ژن‌ها

احتمالاً در گونه‌های کمپیلوباکتر حفظ می‌شوند و می‌توانند به عنوان فاکتورهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های *کمپیلوباکتر* در شهرستان بهبهان، استان خوزستان مورد استفاده قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان مورد حمایت مالی قرار گرفته است. بدین‌ویسله نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Authority EFS, Prevention ECfD, Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSa Journal. 2018;16(12):e05500.
2. Shahid MA, Saeed A, Rahman SU, Salman MM, Bhatti SA, Nazir MM, Zahid MN. Pathobiology, public health significance, and control of Campylobacter infections. 2023.
3. Al Hakeem WG, Fathima S, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. *Campylobacter jejuni* in poultry: Pathogenesis and control strategies. Microorganisms. 2022;10(11):2134.
4. Hlashwayo DF, Sigaúque B, Bila CG. Epidemiology and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. in animals in Sub-Saharan Africa: A systematic review. Heliyon. 2020;6 (3).
5. Fani F, Aminshahidi M, Firoozian N, Rafaatpour N. Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes of Campylobacter isolates from raw chicken meat in Shiraz, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research. 2019;20(4):283.
6. Casabonne C, Gonzalez A, Aquili V, Subils T, Balague C. Prevalence of seven virulence genes of *Campylobacter jejuni* isolated from Patients with diarrhea in Rosario. Argentina Int J Infect. 2016;3(4):e37727.
7. Heikema AP, Strepis N, Horst-Kreft D, Huynh S, Zomer A, Kelly DJ, et al. Biomolecule sulphation and novel methylations related to Guillain-Barré syndrome-associated *Campylobacter jejuni* serotype HS: 19. Microbial genomics. 2021;7(11).
8. Tegtmeyer N, Sharafutdinov I, Harrer A, Soltan Esmaeili D, Linz B, Backert S. Campylobacter virulence factors and molecular host–pathogen interactions. Fighting Campylobacter Infections: Towards a One Health Approach. 2021:169-202.
9. Bolton DJ. Campylobacter virulence and survival factors. Food microbiology. 2015;48:99-108.
10. Han X, Guan X, Zeng H, Li J, Huang X, Wen Y, et al. Prevalence, antimicrobial resistance profiles and virulence-associated genes of thermophilic Campylobacter spp. isolated from ducks in a Chinese slaughterhouse. Food control. 2019;104:157-66.
11. Laconi A, Tolosi R, Drigo I, Bano L, Piccirillo A. Association between ability to form biofilm and virulence factors of poultry extra-intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Veterinary Microbiology. 2023;282:109770.
12. Kailoo S, Shreya, Kumar Y. Cytolethal distending toxin: from genotoxin to a potential biomarker and anti-tumor target. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021;37 (9):150.
13. Pons BJ, Vignard J, Mirey G. Cytolethal distending toxin subunit B: a review of structure–function relationship. Toxins. 2019;11(10):595.

14. Hinenoya A, Ichimura H, Yasuda N, Harada S, Yamada K, Suzuki M, et al. Development of a specific cytolethal distending toxin (cdt) gene (Eacdt)–based PCR assay for the detection of *Escherichia albertii*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2019;95(2):119-24.

15. Denmongkholchai S, Tsuruda K, Sugai M, Mongkolsuk S, Matangkasombut O. Host Chromatin Regulators Required for Aggregatibacter actinomycetemcomitans Cytolethal Distending Toxin Activity in *Saccharomyces cerevisiae* Model. Infection and Immunity. 2021;89:8.

16. Yeh J-Y, Lin H-J, Kuo C-J, Feng C-L, Chou C-H, Lin C-D, et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin C exploits lipid rafts to mitigate *Helicobacter pylori*-induced pathogenesis. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;8:617419.

17. Linz B, Sharafutdinov I, Tegtmeyer N, Backert S. Evolution and Role of Proteases in *Campylobacter jejuni* Lifestyle and Pathogenesis. Biomolecules. 2023;13(2):323.

18. Lopes GV, Ramires T, Kleinubing NR, Scheik LK, Fiorentini ÂM, da Silva WP. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. Microbial pathogenesis. 2021;161:105265.

19. Maktabi S, Ghorbanpoor M, Hossaini M, Motavalibashi A. Detection of multi-antibiotic resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in beef, mutton, chicken and water buffalo meat in Ahvaz, Iran. Veterinary Research Forum. 2019;10(1):37.

20. Shange N, Gouws P, Hoffman LC. Campylobacter and Arcobacter species in food-producing animals: Prevalence at primary production and during slaughter. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019;35:1-16.

21. Atabay H, Corry J. The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. Journal of Applied Microbiology. 1997;83(5):619-26.

22. Lane D. 16S-23S rRNA Sequencing, Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1991. Chichester: Wiley.125-75.

23. Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. Journal of medical microbiology. 2003;52(4):345-8.

24. Boer Pd, Wagenaar JA, Achterberg RP, Putten JPv, Schouls LM, Duim B. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. Molecular microbiology. 2002;44(2):351-9.

25. Khoshbakht R, Tabatabaei M, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Aski HS. Distribution of nine virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from broiler feces in Shiraz, Southern Iran. Foodborne pathogens and disease. 2013;10(9):764-70.

26. Zhong X, Wu Q, Zhang J, Shen S. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from retail food in China. Food Control. 2016;62:10-5.

27. Koolman L, Whyte P, Burgess C, Bolton D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of Campylobacter isolates. Foodborne pathogens and disease. 2015;12(5):424-32.

28. Lapierre L, Gatica MA, Riquelme V, Vergara C, Yañez JM, San Martin B, et al. Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans. Microbial Drug Resistance. 2016;22(5):432-44.

29. Rizal A, Kumar A, Vidyarthi AS. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. Internet Journal of Food Safety. 2010;12:29-34.

30. Carrillo CD, Kruczkiewicz P, Mutschall S, Tudor A, Clark C, Taboada EN. A framework for assessing the concordance of molecular typing methods and the true strain phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using draft genome sequence data. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012;2:57.

31. Kovanen S, Rossi M, Pohja-Mykrä M, Nieminen T, Raunio-Saarnisto M, Sauvala M, et al. Population genetics and characterization of *Campylobacter jejuni* isolates from western jackdaws and game birds in Finland. Applied and Environmental Microbiology. 2019;85 (4):e02365-18.

32. Quino W, Caro-Castro J, Hurtado V, Flores-León D, Gonzalez-Escalona N, Gavilan RG. Genomic analysis and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Peru. Frontiers in microbiology. 2022;12:802404.