

## **Molecular surveillance and identification of *Campylobacter* in livestock and water sources in Behbahan, with a focus on the virulence genes *flaA* and *virB11*.**

**Running Title:** Molecular Surveillance of *Campylobacter* in Animal and Water Sources in Behbahan

### **Abstract**

*Campylobacter* spp. are major foodborne pathogens, with *C. jejuni* and *C. coli* being the most common species associated with human disease. Poultry and livestock serve as important reservoirs, and secretion system-related genes such as *flaA* and *virB11* play critical roles in pathogenicity. In this cross-sectional study, 392 samples from chickens, cattle, sheep/goats, and water sources in Behbahan (Iran) were analyzed. Isolation and identification of *Campylobacter* were performed using standard microaerophilic culture methods, phenotypic tests, and PCR targeting the 16S rRNA gene. The virulence genes *flaA* and *virB11* were detected by specific PCR assays. Statistical analyses used chi-square and Fisher's exact tests. *Campylobacter* spp. were detected in 12.8% (50/392) of samples. Chickens showed the highest prevalence (20.3%), followed by water (10.7%), cattle (5.7%), and sheep/goats (4.9%). Molecular identification revealed 72% *C. jejuni* and 28% *C. coli*. The *flaA* gene was present in 66% of isolates and was significantly associated with species ( $P < 0.05$ ), being more common in *C. jejuni*. No isolate carried the *virB11* gene. Poultry represents the main reservoir for potentially virulent *Campylobacter* strains in the region. The high prevalence of *flaA* highlights the virulence potential of circulating isolates. Enhanced hygiene and surveillance measures are recommended.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *flaA*, *virB11*, poultry, virulence, PCR

### **Extended Abstract**

#### **Introduction**

*Campylobacter* spp. are among the most important bacterial agents of foodborne gastroenteritis worldwide and remain a major public health concern because of their high incidence, broad host range, and association with severe post-infectious sequelae. These organisms are responsible for a substantial burden of diarrheal disease globally and have been linked to Guillain-Barré syndrome, reactive arthritis, and other neurological and immunological complications. Among the more than 30 species currently recognized within the genus *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* are the predominant causes of human campylobacteriosis. Transmission to humans occurs mainly through the consumption of contaminated food of animal origin, particularly poultry meat, but also through direct contact with colonized animals and exposure to contaminated water or environmental sources. Domestic poultry are considered the principal reservoirs of *Campylobacter*, and colonization rates in chickens are frequently high across different geographic regions. In addition to poultry, ruminants such as cattle, sheep, and goats may act as secondary reservoirs and contribute to environmental contamination through fecal shedding. The survival of *Campylobacter* in farm settings, especially under favorable microaerophilic and humid conditions, facilitates persistence and zoonotic transmission. In Iran, multiple studies have reported the presence of *Campylobacter* in poultry farms and retail meat products; however, data on indigenous livestock

raised in traditional and semi-industrial production systems, particularly in warm and humid regions of southwestern Iran, remain limited.

The pathogenicity of *Campylobacter* is multifactorial and involves a variety of virulence-associated genes related to motility, adhesion, invasion, toxin production, and immune evasion. Among these, flagellum-associated genes are of special importance because they contribute not only to bacterial motility but also to host cell interaction and colonization. The *flaA* gene, encoding flagellin A, plays a central role in intestinal colonization and is often regarded as a key determinant of virulence. In contrast, *virB11*, a gene associated with the type IV secretion system (T4SS), is less frequently detected in *Campylobacter* spp. but may be involved in plasmid transfer, horizontal gene exchange, and dissemination of virulence and antimicrobial resistance determinants.

Given the public health importance of *Campylobacter* and the scarcity of data regarding virulence-associated genes in indigenous animal reservoirs in southwestern Iran, the present study was designed to determine the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in poultry, cattle, sheep, goats, and water sources in Behbahan County, Iran, and to investigate the distribution of the secretion system-associated genes *flaA* and *virB11* in relation to host type and bacterial species.

## Material & Methods

This cross-sectional experimental study was conducted in 2024 in Behbahan County, southwestern Iran. A total of 400 samples were initially collected using multistage cluster random sampling from poultry farms, cattle farms, sheep and goat herds, and environmental water sources. After exclusion of contaminated or improperly transported samples, 392 specimens were included in the final analysis. Samples consisted of fresh fecal specimens from chickens, cattle, sheep, and goats, as well as water and wastewater samples associated with animal husbandry environments.

All samples were transported under cold-chain conditions at 4 °C and processed within four hours after collection to minimize loss of viability and reduce contamination. Isolation of *Campylobacter* spp. was performed using a microaerophilic enrichment procedure followed by cultivation on blood agar and Mueller-Hinton agar under microaerophilic conditions (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and 85% N<sub>2</sub>) at 37 °C for 72 h. Presumptive isolates were identified using standard microbiological techniques, including colony morphology, Gram staining, and biochemical tests such as oxidase, catalase, hippurate hydrolysis, nitrate reduction, and assessment of growth at different temperatures and salt concentrations. Genomic DNA was extracted from confirmed isolates using a commercial silica column-based kit according to the manufacturer's instructions. DNA purity and concentration were evaluated by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Molecular confirmation of the genus *Campylobacter* was performed by polymerase chain reaction (PCR) targeting the 16S rRNA gene. The amplified products were sequenced and compared with reference sequences in the NCBI GenBank database to identify the isolates at the species level.

To assess the virulence-related genetic profile of the isolates, specific PCR assays were conducted to detect two secretion system-associated genes: *flaA* (associated with motility and T3SS-like function; 1077 bp) and *virB11* (associated with T4SS; 470 bp). PCR amplification products were visualized by 2% agarose gel electrophoresis. Statistical analysis was performed using SPSS version 22. The associations between categorical variables, including host type, *Campylobacter* species, and presence of virulence genes, were evaluated using Pearson's chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Statistical significance was defined as a p-value <0.05.

## Discussion of Results and Conclusions

Among the 392 samples analyzed, 50 (12.8%) were positive for *Campylobacter* spp. The highest isolation rate was observed in chickens, with 37 positive samples out of 182 (20.3%). In contrast, *Campylobacter* was detected in 8 of 141 cattle samples (5.7%), 2 of 41 sheep and goat samples (4.9%), and 3 of 28 water samples (10.7%). These findings indicate that poultry represent the main reservoir of *Campylobacter* in the studied area, while livestock and environmental water sources may also contribute to bacterial circulation and transmission.

Sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed that 36 isolates (72%) were identified as *C. jejuni* and 14 isolates (28%) as *C. coli*. *C. jejuni* predominated in all sample types, particularly in chickens, whereas *C. coli* was distributed across both poultry and livestock sources. Although *C. jejuni* was more common overall, statistical analysis showed no significant association between host type and species distribution ( $p > 0.05$ ). This suggests that both species are capable of colonizing multiple animal hosts and environmental reservoirs, supporting the possibility of overlapping ecological niches and cross-species transmission. The virulence gene analysis showed that *flaA* was present in 33 of 50 isolates (66%). The frequency of *flaA* was significantly higher in *C. jejuni* isolates than in *C. coli* isolates, with 75% versus 42.9%, respectively ( $p < 0.05$ ). Most *flaA*-positive isolates were obtained from chicken samples, emphasizing the central role of poultry in maintaining virulent *Campylobacter* populations. Because *flaA* contributes to motility, colonization, and host interaction, its high prevalence indicates a substantial pathogenic potential among the isolates detected in this region. The stronger association between *flaA* and *C. jejuni* may also help explain the global epidemiological dominance of this species in human campylobacteriosis.

In contrast, the *virB11* gene was not detected in any of the isolates regardless of host source or species. This finding suggests that T4SS-associated virulence and plasmid-mediated genetic exchange may not be major mechanisms in the *Campylobacter* populations circulating in Behbahan County. However, the absence of *virB11* should be interpreted with caution, as virulence gene distribution can vary substantially by geography, host species, and time. Continued monitoring is therefore necessary to determine whether this pattern is stable across seasons and production systems.

The overall prevalence of *Campylobacter* observed in this study is consistent with prior reports from Iran and other countries with similar climatic conditions and animal husbandry practices. The relatively high prevalence in poultry reflects the known susceptibility of chickens to asymptomatic intestinal colonization and the role of poultry production systems as major reservoirs for zoonotic transmission. The presence of *Campylobacter* in cattle, sheep, goats, and water samples further indicates environmental dissemination and potential contamination pathways that may contribute to human exposure.

From a public health perspective, the detection of potentially virulent *Campylobacter* strains in indigenous animals and environmental water sources highlights the need for improved surveillance and control strategies. Strengthening biosecurity in poultry farms, improving sanitation in traditional animal production systems, and preventing fecal contamination of water sources are essential measures for reducing the burden of campylobacteriosis. Molecular monitoring of virulence determinants such as *flaA* may also help identify high-risk isolates and support targeted interventions.

In conclusion, this study demonstrates that indigenous poultry and livestock in southwestern Iran harbor *Campylobacter* spp., with chickens serving as the principal reservoir. *C. jejuni* was the dominant species, and the high prevalence of the *flaA* gene, especially among *C. jejuni* isolates, suggests substantial zoonotic potential. The absence of *virB11* indicates that T4SS-related virulence may not be widespread in the studied population. Overall, these findings emphasize the importance of integrating microbiological, molecular, and epidemiological surveillance to better understand the ecology of *Campylobacter* in animal reservoirs and to reduce the risk of transmission to humans.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *flaA*, *virB11*, poultry, virulence, PCR

## پایش و شناسایی مولکولی کمپیلوباکتر در منابع دامی و آبی بهبهان با تمرکز بر ژن های حدت *flaA* و *virB11*

**عنوان کوتاه:** پایش مولکولی کمپیلوباکتر در منابع حیوانی و آبی بهبهان

### چکیده

گونه های کمپیلوباکتر از مهم ترین پاتوژن های منتقله از غذا هستند کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی شایع ترین گونه های درگیر در بیماری انسانی به شمار می روند. طیور و دام ها مخازن اصلی این باکتری اند و ژن های وابسته به سیستم های ترشحی مانند *flaA* و *virB11* نقش مهمی در بیماری زایی دارند. در این مطالعه مقطعی، ۳۹۲ نمونه از مرغ، گاو، گوسفند/بز و منابع آبی در بهبهان بررسی شد. جداسازی و شناسایی کمپیلوباکتر با روش های کشت میکروآئروفیل، آزمون های فنوتیپی و PCR ژن *flaA* و *virB11* انجام گرفت. ژن های *flaA* و *virB11* با PCR اختصاصی ارزیابی شدند. تحلیل آماری با آزمون های کای دو و فیشر صورت گرفت. در مجموع ۱۲/۸٪ نمونه ها (۵۰/۳۹۲) دارای کمپیلوباکتر بودند. بالاترین شیوع در مرغ ها (۲۰/۳٪)، سپس آب (۱۰/۷ درصد)، گاو (۵/۷ درصد) و گوسفند/بز (۴/۹ درصد) مشاهده شد. از نظر مولکولی، ۷۲ درصد کمپیلوباکتر ژرونی و ۲۸ درصد کمپیلوباکتر کولی بودند. ژن *flaA* در ۶۶ درصد ایزوله ها یافت شد و ارتباط معنی داری با گونه باکتری داشت

( $P < 0.05$ ) و در کمپیلوباکتر ژرونی شایع تر بود. هیچ ایزوله ای حامل ژن *virB11* نبود. نتایج نشان می دهد طیور مهم ترین مخزن سویه های بالقوه بیماری زای کمپیلوباکتر در منطقه هستند. شیوع بالای ژن *flaA* نشان دهنده ظرفیت بیماری زایی قابل توجه ایزوله هاست. تقویت بهداشت و پایش مولکولی توصیه می شود.

**کلیدواژه ها:** کمپیلوباکتر ژرونی، کمپیلوباکتر کولی، *flaA*، *virB11*، طیور، ژن های حدت، PCR

### مقدمه

کمپیلوباکتر یکی از مهم ترین و شایع ترین باکتری های بیماری زای منتقله از غذا در سراسر جهان به شمار می رود. این باکتری ها سالانه موجب صدها میلیون مورد عفونت گوارشی و در برخی موارد بروز عوارض ثانویه مانند سندرم گیلن-باره<sup>۱</sup>، آرتریت واکنشی<sup>۲</sup> و عوارض نورولوژیک می شوند (۱). از میان گونه های متعدد این جنس، دو گونه کمپیلوباکتر ژرونی<sup>۳</sup> و کمپیلوباکتر کولی<sup>۴</sup> عامل اصلی کمپیلوباکتریوز انسانی هستند (۲). مسیرهای انتقال این باکتری ها به انسان شامل مصرف گوشت یا محصولات دامی آلوده، تماس مستقیم با حیوانات ناقل، و آب های آلوده می باشد (۳، ۴). طیور اهلی، به ویژه مرغ، مخزن اصلی کمپیلوباکتر محسوب می شوند؛ مطالعات نشان داده اند که بین ۳۰ تا ۹۰ درصد از جمعیت های طیور در نقاط مختلف جهان از این باکتری ها کلونیزه شده اند (۵). افزون بر طیور، نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند، بز) به عنوان منابع مهم ثانویه معرفی شده اند، زیرا

<sup>۱</sup> Guillain-Barre syndrome

<sup>۲</sup> Reactive arthritis

<sup>۳</sup> *Campylobacter jejuni*

<sup>۴</sup> *Campylobacter coli*

باکتری‌ها قادرند در محیط، آب آشامیدنی دام و کودها مدت طولانی زنده بمانند و موجب انتقال محیطی و متقاطع شوند (۷). در ایران نیز الگوهای مشابهی گزارش شده است؛ به‌ویژه در مناطق جنوب غرب کشور، که شرایط گرم و مرطوب و سبک سنتی پرورش دام منجر به افزایش بقای کمپیلوباکتر در محیط و دامداری‌ها شده است (۸، ۹). بیماری‌زایی کمپیلوباکتر حاصل مجموعه‌ای از ژن‌های حدت است که نقش آن‌ها در مراحل مختلف عفونت از جمله چسبندگی، تهاجم، کلونیزاسیون، بقا و فرار از سیستم ایمنی میزبان اثبات شده است (۱۰). ژن *cadF* پروتئینی را کد می‌کند که با اتصال به فیبرونکتین سلول‌های اپیتلیال روده، ورود اولیه باکتری را تسهیل می‌کند. ژن *ciaB* در ورود فعال به سلول‌های میزبان نقش دارد و با القای پاسخ التهابی در بافت روده مرتبط است (۱۱). ژن‌های *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* مسئول تولید توکسین سیتوتلی هستند که با آسیب DNA و توقف چرخه سلولی موجب تخریب سلول‌های میزبان می‌شود (۱۲). یکی دیگر از ژن‌های مهم، *pldA* است که با کد کردن فسفولیپاز A، موجب پایداری غشایی، مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و حفظ بقای باکتری در محیط می‌شود (۷). هم‌چنین وجود ژن *racR* که در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با چسبندگی و تهاجم نقش دارد، در افزایش توان بیماری‌زایی جدایه‌ها تأثیرگذار است (۱۳). یکی از جنبه‌های نوین مطالعات بر روی کمپیلوباکترها، بررسی سیستم‌های ترشحی است که امکان تزریق مستقیم پروتئین‌های مؤثر بیماری‌زا به سلول میزبان را فراهم می‌سازد. سیستم ترشحی نوع III (T3SS) در برخی گونه‌های کمپیلوباکتر حضور داشته و در فرآیند تهاجم و چسبندگی فعال نقش دارد. ژن *flaA* که فلاژلین A را کد می‌کند، علاوه بر تحرک، در تعامل با سیستم T3SS و ایجاد التهاب روده مؤثر است و در اغلب جدایه‌های بیماری‌زا یافت می‌شود (۱۴، ۱۵). در مقابل، سیستم ترشحی نوع IV (T4SS) که انتقال پلاسمیدها و ژن‌های حدت میان سلول‌های باکتریایی را تسهیل می‌کند، توسط ژن‌هایی از جمله *virB11* کدگذاری می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که حضور ژن *virB11* در جدایه‌های انسانی و محیطی کمپیلوباکتر نادر است، اما وجود آن با افزایش بالقوه انتقال فاکتورهای ویروالانس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی همراه است (۳). بنابراین بررسی هم‌زمان این دو ژن در جدایه‌های حیوانی می‌تواند شاخصی از توان بیماری‌زایی و خطر انتقال بین‌گونه‌ای باشد. در سال‌های اخیر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های کمپیلوباکتر رو به افزایش بوده و این موضوع نگرانی جدی در سطح جهانی ایجاد کرده است (۱۵، ۲). مقاومت به ماکرولیدها (مانند اریترومایسین)، فلوروکینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین) و تتراسایکلین‌ها به‌ویژه در جدایه‌های دامی شایع است. ژن‌های اختصاصی مقاومت از جمله *cmeA*، *cmeB*، *cmeC* و *blaOXA-61* در انتقال و بقا در محیط نقش دارند و اغلب در کنار ژن‌های بیماری‌زایی مشاهده می‌شوند. این هم‌زمانی موجب افزایش خطر انتقال سوش‌های مقاوم و شدیداً بیماری‌زا از منابع دامی به انسان شده است (۱۰). در ایران، مطالعات بسیاری در زمینه شیوع کمپیلوباکتر در طیور صنعتی و محصولات گوشتی انجام شده است (۹، ۸). اما مطالعات بر منابع دام‌های بومی و سنتی که در سامانه‌های غیرصنعتی پرورش یافته‌اند هنوز محدود است. جدایه‌های حاصل از حیوانات بومی در جنوب ایران دارای تفاوت‌های ژنتیکی قابل توجه با جدایه‌های صنعتی هستند و برخی از آن‌ها واجد ژن‌های تهاجمی مانند *cadF* و *pldA* با فراوانی بالا بوده‌اند (۸). امامی و همکاران (۲۰۲۳) نیز اشاره کرده‌اند که تماس مکرر حیوانات آزادچر با منابع آبی و انسانی، موجب افزایش تبادل ژن‌های بیماری‌زایی و مقاومت در میان گونه‌های دامی و انسانی شده است (۹). همچنین، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که شرایط اقلیمی نیمه‌گرمسیری ایران باعث تسهیل بقا و انتقال افقی پلاسمیدهای مقاوم حاوی ژن‌های T4SS مانند *virB11* بین جدایه‌های متفاوت کمپیلوباکتر شده است (۱۶). این امر اهمیت بررسی دقیق‌تر سیستم‌های ترشحی و ژن‌های حدت در جدایه‌های حیوانات بومی را برای برنامه‌ریزی کنترل بیماری در کشور دوچندان می‌کند.

با توجه به اهمیت روزافزون کمپیلوباکترها در چرخه زئونوتیک، کمبود اطلاعات درباره جدایه‌های حاصل از حیوانات بومی ایران و نقش احتمالی آن‌ها در انتقال بیماری به انسان، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع ژن‌های حدت و سیستم‌های ترشحی (*flaA* و *virB11*) در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی جداشده از حیوانات بومی (مرغ، گاو، گوسفند، بز و

منابع آب) انجام شد. همچنین ارتباط بین نوع میزبان، گونه باکتری و وجود ژن‌های بیماری‌زایی و ترشحی مورد ارزیابی قرار گرفت تا تصویر دقیق‌تری از توان اپیدمیولوژیک این جدایه‌ها در شرایط کشور ارائه شود.

## مواد و روش‌ها

### طراحی مطالعه و جامعه آماری

این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی و مقطعی<sup>۱</sup> بود که با هدف بررسی ویژگی‌های مولکولی و فنوتیپی کمپیلوباکترهای جدا شده از حیوانات بومی در شهرستان بهبهان استان خوزستان در سال ۱۴۰۳ انجام شد. جامعه آماری شامل ۴۸۷۵ رأس گاو و گوسفند و حدود ۵۰۵۰۰ قطعه مرغ موجود در دامداری‌ها و مرغداری‌های منطقه مورد مطالعه بود. حجم نمونه بر اساس جدول کرجسی و مورگان تعیین گردید و تعداد ۴۰۰ نمونه انتخاب شد (۱۷). نمونه‌گیری به روش تصادفی خوشه‌ای چندمرحله‌ای انجام شد؛ به‌طوری‌که ابتدا از میان چهار بخش شهرستان بهبهان (مرکزی، آغاجری، زیدون و تشان) دو بخش به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. سپس از هر بخش دو دامداری و دو مرغداری انتخاب گردید. از هر واحد پرورشی نیز به‌طور تصادفی ۵۰ نمونه شامل مدفوع گاو، گوسفند، بز، مدفوع طیور و نمونه‌های محیطی (آب یا فاضلاب) جمع‌آوری شد. در بررسی اولیه، ۸ نمونه به دلیل آلودگی یا عدم رعایت شرایط انتقال استریل حذف گردیدند و در نهایت ۳۹۲ نمونه برای بررسی‌های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق متغیر وابسته پتانسیل بیماری‌زایی کمپیلوباکتر و متغیرهای مستقل شامل حضور ژن‌های سیستم‌های ترشحی (T3SS و T4SS) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند.

### جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های مدفوع از بخش میانی مدفوع تازه دام‌ها با استفاده از ظروف استریل درب‌دار جمع‌آوری شد. در مورد مرغداری‌ها علاوه بر نمونه مدفوع، نمونه‌هایی از فاضلاب و خونابه‌های حاصل از کشتار نیز جمع‌آوری گردید. تمام نمونه‌ها در شرایط زنجیره سرد ۴ درجه سانتی‌گراد و در مدت کمتر از ۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌گیری در ساعات ۸ تا ۱۰ صبح انجام شد، زیرا در این زمان احتمال دفع مدفوع تازه در دام‌ها بیشتر بوده و همچنین دمای محیط هنوز بالا نرفته است که این امر می‌تواند بر بقای باکتری‌های حساس مانند کمپیلوباکتر تأثیرگذار باشد (۱۸).

### جداسازی و کشت کمپیلوباکتر

به منظور جداسازی کمپیلوباکتر از روش غنی‌سازی میکروآئروفیلیک با استفاده از دستگاه KB<sup>۲</sup> استفاده شد. در این روش، دو لوله پلاستیکی به وسیله یک لوله شیشه‌ای خمیده به یکدیگر متصل شدند. در لوله اول ۲ گرم نمونه مدفوع با ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شد و در لوله دوم ۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث قرار گرفت. مجموعه لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا شرایط مناسب برای رشد کمپیلوباکتر فراهم گردد. پس از این مرحله، از بخش میانی محیط کشت برداشت شده و روی محیط‌های بلاد آگار و مولر-هینتون آگار به روش خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط میکروآئروفیلیک (۵ درصد O<sub>2</sub>، ۱۰ درصد CO<sub>2</sub> و ۸۵ درصد N<sub>2</sub>) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند (۱۹).

<sup>1</sup>- cross-sectional experimental study

<sup>2</sup> Kappadnis-Baserisalehi

## شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها

شناسایی اولیه جدایه‌های مشکوک به کمپیلوباکتر بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد انجام شد. کلنی‌های کمپیلوباکتر روی محیط بلاد آگار به صورت کلنی‌های خاکستری، مرطوب، براق و برجسته مشاهده شدند. در رنگ‌آمیزی گرم، سلول‌ها به صورت باسیل‌های خمیده گرم منفی با آرایش S شکل یا بال مرغی دیده شدند (۲۰). برای تأیید هویت جدایه‌ها از آزمون‌های اکسیداز، آزمون کاتالاز، هیدرولیز هیپورات، احیای نیتрат، تست اوره‌آز، آزمون متیل رد (MR)، آزمون ووژس-پروسکوئر (VP)، تست ایندول، آزمون اکسیداتیو-فرمنتاتیو (O/F)، هیدرولیز ایندوکسیل استات، تولید سولفید هیدروژن در محیط TSI استفاده شد. همچنین رشد باکتری در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رشد در حضور ۱ درصد گلیسین و ۱/۵ درصد و ۳/۵ درصد NaCl، بررسی گردید. حساسیت اولیه گونه‌ها نیز با استفاده از دیسک‌های نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم و سفالوتین ۳۰ میکروگرم مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱).

## استخراج DNA

برای استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA ستون-محور (یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده شد. ابتدا سلول‌های باکتریایی توسط سانتریفیوژ رسوب داده شدند. سپس مراحل لیز سلولی با لیزوزیم و پروتئیناز K انجام گرفت و DNA با استفاده از ستون سیلیکا خالص‌سازی شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام PCR نگهداری شد.

## ارزیابی کیفیت و کمیت DNA

کیفیت و غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop spectrophotometer اندازه‌گیری شد. نسبت جذب A260/A280 برای تمامی نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشان‌دهنده خلوص مناسب DNA می‌باشد (۲۲). همچنین کیفیت DNA با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

## شناسایی مولکولی کمپیلوباکتر

برای تأیید جنس کمپیلوباکتر از تکنیک PCR با هدف ژن ۱۶ *S rRNA* استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده:

Forward: 27F

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

Reverse: 1492R

CGGTTACCTTGTTACGACTT

محصول مورد انتظار: ۱۴۹۰ bp (۲۳).

## شناسایی ژن‌های سیستم ترشحی

برای بررسی ژن‌های مرتبط با سیستم‌های ترشحی، از PCR اختصاصی برای دو ژن *flaA* و *virB11* استفاده شد؛ به‌طوری‌که ژن *flaA* به‌عنوان ژن مرتبط با سیستم ترشحی نوع III و ژن *virB11* به‌عنوان ژن مرتبط با سیستم ترشحی نوع IV در نظر گرفته شد. طراحی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس مطالعات پیشین انجام گرفت (۲۴).

اندازه قطعات تکثیرشده برای ژن *flaA* برابر با 1077 bp و برای ژن *virB11* برابر با 470 bp بود (۲۴). محصولات PCR سپس بر روی ژل آگارز 2 درصد در بافر TBE الکتروفورز شدند. فرایند الکتروفورز در ولتاژ 80 ولت به مدت 45

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| Forward       | AATAAAAAATGCTGATAAAACAGGTG |
| <i>flaA</i>   |                            |
| Reverse       | TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT  |
|               |                            |
| Forward       | TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT  |
| <i>virB11</i> |                            |
| Reverse       | CCTGCGTGTCTGTGTTATTACCC    |

دقیقه انجام شد و در پایان، باندها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه UV transilluminator مشاهده و ثبت شدند.

### تحلیل آماری

تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. ابتدا شاخص‌های توصیفی برای متغیرها محاسبه گردید. سپس ارتباط بین وجود ژن‌های ویروالانس، سیستم‌های ترشحی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از آزمون‌های کای دو<sup>۱</sup> و آزمون دقیق فیشر<sup>۲</sup> بررسی شد. سطح معنی‌داری آماری  $p$  کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده

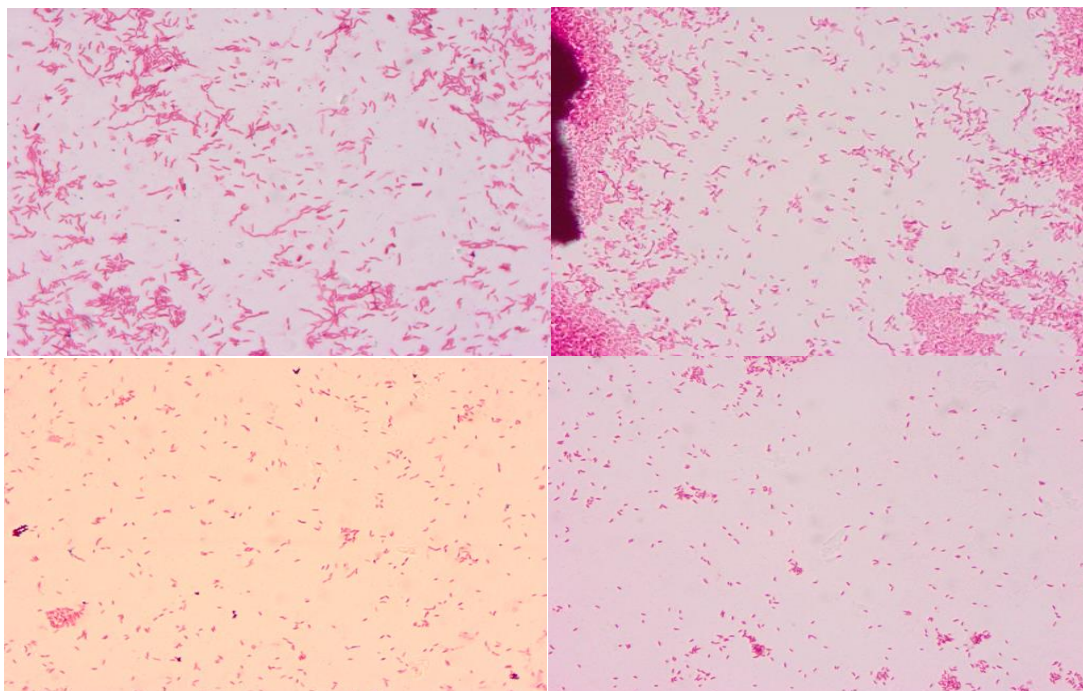
در مجموع ۳۹۲ نمونه از منابع مختلف شامل مرغ، گاو، گوسفند و بز و آب جمع‌آوری شد. بیشترین تعداد نمونه از مرغ و کمترین تعداد از آب به‌دست آمد.

#### نتایج رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی

بر اساس بررسی‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی، ۵۰ نمونه به‌عنوان جدایه‌های مشکوک به کمپیلوباکتر شناسایی شدند. شکل ۱ نمایی از باسیل‌های گرم‌منفی خمیده را نشان می‌دهد.

<sup>1</sup> Chi-square

<sup>2</sup> Fisher's exact test

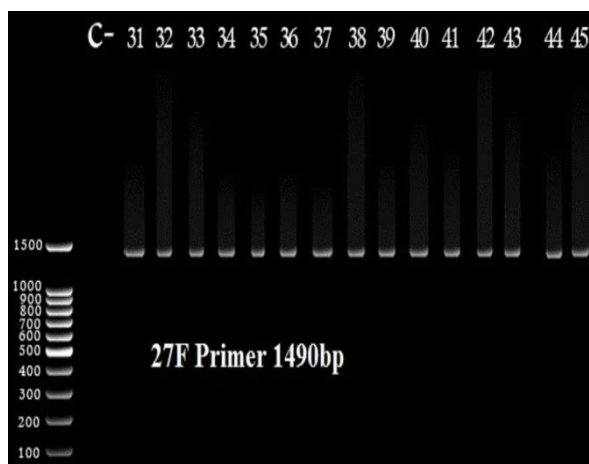
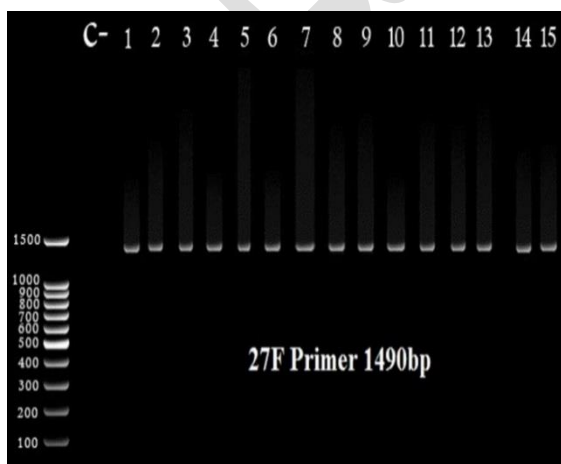


شکل ۱: نمایی از باسیل‌های خمیده گرم منفی کمپیلوباکتر (رنگ‌آمیزی گرم، X ۱۰۰۰)

Figure 1. Microscopic view of curved, Gram-negative *Campylobacter* bacilli (Gram staining,  $\times 1000$ )

#### نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تأیید شناسایی اولیه، PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن ۱۶S rRNA انجام شد. تمامی ۵۰ جدایه باند اختصاصی در ناحیه ۱۴۹۰ bp نشان دادند. نمونه‌ای از نتایج PCR در شکل ۲ ارائه شده است. محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال شدند.





شکل ۲: ژل الکتروفورز جهت مشاهده ژن 16S rRNA کمپیلوباکترهای جدا شده از نمونه‌ها  
ستون C: مارکر وزن مولکولی (لدر) 100 bp، ستون C-: کنترل منفی، چاهک‌های ۱ تا ۵۰: نمونه‌های جدا شده

Figure 2. Gel electrophoresis for visualization of the 16S rRNA gene in *Campylobacter* isolates from the samples.

Lane C: 100 bp molecular weight marker (DNA ladder); lane C-: negative control; lanes 1–50: isolated samples.

#### تحلیل توالی ژن ۱۶S rRNA

نتایج مقایسه توالی ژن ۱۶S rRNA جدایه‌ها با داده‌های بانک ژنی NCBI نشان داد که جدایه‌ها متعلق به دو گونه کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی هستند. جزئیات مربوط به دسترسی ژنی و گونه‌های شناسایی شده در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: تأیید شناسایی کمپیلوباکترهای جدا شده از نمونه‌های مدفوع مرغ، گاو، گوسفند و بز و آب بر اساس توالی یابی ژن 16S rRNA

Table 1. Confirmation of *Campylobacter* isolates from chicken, cattle, sheep, goat feces and water samples based on 16S rRNA gene sequencing.

| ردیف | کد جدایه | شماره دسترسی (NCBI) | جنس و گونه        |
|------|----------|---------------------|-------------------|
| ۱    | P1       | CP020776.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۲    | P2       | CP020776.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۳    | P3       | CP007193.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۴    | P4       | CP020776.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۵    | P5       | CP020776.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۶    | P6       | CP017862.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| ۷    | P7       | CP017456.1          | کمپیلوباکتر ژرونی |
| 8    | P8       | CP007181.1          | کمپیلوباکتر کولی  |
| 9    | P9       | CP007181.1          | کمپیلوباکتر کولی  |
| 10   | P10      | CP007181.1          | کمپیلوباکتر کولی  |

|    |     |            |                    |
|----|-----|------------|--------------------|
| 11 | P11 | CP007181   | کمپیلوباکتر کولی   |
| 12 | P12 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 13 | P13 | CP017862.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 14 | P14 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 15 | P15 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 16 | P16 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 17 | P17 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 18 | P18 | CP007193.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 19 | P19 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 20 | P20 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 21 | P21 | CP019977.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 22 | P22 | CP007191.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 23 | P23 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 24 | P24 | CP007193.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 25 | P25 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 26 | P26 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 27 | P27 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 28 | P28 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 29 | P29 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 30 | P30 | CP007183.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 31 | P31 | CP007183.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 32 | P32 | CP007191   | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 33 | P33 | CP019977.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 34 | P34 | CP020045.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 35 | P35 | CP007188.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 36 | P36 | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 37 | P37 | CP007193.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 38 | W1  | CP007183.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 39 | C1  | CP006702.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 40 | W2  | CP007188.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 41 | W3  | CP017862.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 42 | C2  | CP007183.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 43 | C3  | CP019977.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| 44 | C4  | CP017862.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 45 | C5  | CP020776.1 | کمپیلوباکتر ژرژونی |
| 46 | C6  | CP007183.1 | کمپیلوباکتر کولی   |

|       |    |            |                    |
|-------|----|------------|--------------------|
| 47    | S1 | CP019977.1 | کمپیلوباکتر کولی   |
| sky ۴ | C7 | CP007193.1 | کمپیلوباکتر ژژرونی |
| 49    | C8 | CP007192   | کمپیلوباکتر ژژرونی |
| 50    | S2 | CP007193.1 | کمپیلوباکتر ژژرونی |

P: مرغ، C: گاو، S: گوسفند و بز، W: آب

### شیوع کمپیلوباکتر در نمونه‌ها

بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از منابع مختلف شامل مرغ، گاو، گوسفند و بز و آب نشان داد که از مجموع ۳۹۲ نمونه مورد بررسی، ۵۰ نمونه به جنس کمپیلوباکتر ژژرونی تعلق داشتند که شیوع کلی آن ۱۲/۸ درصد بود. بیشترین میزان جداسازی کمپیلوباکتر در نمونه‌های مرغ مشاهده شد؛ به‌طوری‌که از ۱۸۲ نمونه مرغ، ۳۷ جدایه شناسایی شد و شیوعی معادل ۲۰/۳ درصد را نشان داد. در نمونه‌های گاو از مجموع ۱۴۱ نمونه، ۸ جدایه کمپیلوباکتر به‌دست آمد که بیانگر شیوع ۵/۷ درصدی بود. همچنین در نمونه‌های گوسفند و بز از ۴۱ نمونه بررسی شده، ۲ جدایه کمپیلوباکتر شناسایی شد که شیوع ۴/۹ درصد را نشان داد. در نمونه‌های آب نیز از مجموع ۲۸ نمونه، ۳ جدایه کمپیلوباکتر جداسازی شد که میزان شیوع آن ۱۰/۷ درصد بود. در مجموع، نتایج نشان داد که مرغ مهم‌ترین منبع جداسازی کمپیلوباکتر در میان نمونه‌های مورد بررسی بوده است.

### توزیع گونه‌ای جدایه‌های کمپیلوباکتر

بررسی‌های مولکولی انجام‌شده بر روی جدایه‌های کمپیلوباکتر نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به دو گونه کمپیلوباکتر ژژرونی و کمپیلوباکتر کولی هستند. در مجموع ۳۶ جدایه (۷۲ درصد) به گونه کمپیلوباکتر ژژرونی و ۱۴ جدایه (۲۸ درصد) به گونه کمپیلوباکتر کولی تعلق داشتند. در نمونه‌های مرغ، ۲۹ جدایه به گونه کمپیلوباکتر ژژرونی و ۸ جدایه به گونه کمپیلوباکتر کولی شناسایی شد. در نمونه‌های گاو، هر یک از دو گونه کمپیلوباکتر ژژرونی و کمپیلوباکتر کولی به تعداد ۴ جدایه مشاهده شد. در نمونه‌های گوسفند و بز، یک جدایه کمپیلوباکتر ژژرونی و یک جدایه کمپیلوباکتر کولی شناسایی گردید. همچنین در نمونه‌های آب، ۲ جدایه متعلق به کمپیلوباکتر ژژرونی و یک جدایه مربوط به کمپیلوباکتر کولی بود. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که گونه کمپیلوباکتر ژژرونی گونه غالب در میان جدایه‌های کمپیلوباکتر بوده و در بیشتر منابع نمونه‌گیری فراوانی بیشتری نسبت به کمپیلوباکتر کولی داشته است.

### ارتباط بین جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان

نتایج تحلیل آماری نشان داد که بین نوع نمونه و توزیع جدایه‌های کمپیلوباکتر ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

جدول ۲: جدول توافقی ارتباط بین جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان

Table 2. Association between *Campylobacter* isolates and host type

| نوع میزبان | کمپیلوباکتر ژژوئی<br>تعداد (درصد) | کمپیلوباکتر کولی تعداد<br>(درصد) | کل کمپیلوباکتر تعداد<br>(درصد) |
|------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| مرغ        | ۳۰ (۸۳/۳)                         | ۹ (۶۴/۳)                         | ۳۹ (۷۸)                        |
| دام        | ۶ (۱۶/۷)                          | ۵ (۳۷/۵)                         | ۱۱ (۲۲)                        |
| کل         | ۳۶ (۱۰۰)                          | ۱۱ (۱۰۰)                         | ۵۰ (۱۰۰)                       |

توزیع گونه‌های کمپیلوباکتر بر اساس نوع میزبان در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، بیشترین فراوانی جدایه‌ها مربوط به گونه کمپیلوباکتر ژژوئی بوده و بخش عمده‌ای از این جدایه‌ها از نمونه‌های مرغ جدا شده‌اند. همچنین گونه کمپیلوباکتر کولی نیز در هر دو منبع مرغ و دام مشاهده شد.

جدول ۳. ارتباط بین جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان بر اساس آزمون کای دو پیرسون

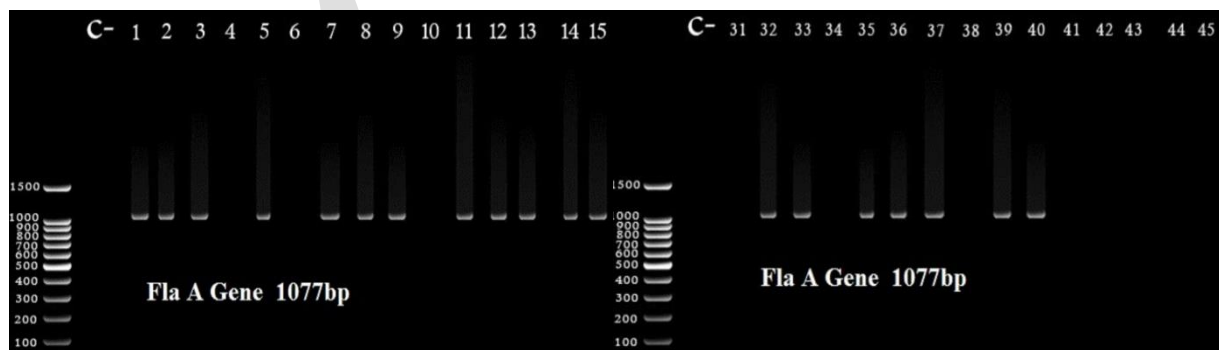
Table 3. Association between *Campylobacter* isolates and host type based on Pearson's chi-square test

| مقدار $P$ -value | آماره کای اسکوئر پیرسون<br>( $\chi^2$ ) | فرضیه (Hypothesis)                                        |
|------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| ۰/۲۵۲            | ۲/۱۳۱                                   | ارتباطی بین جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان وجود ندارد |

به‌منظور بررسی ارتباط بین نوع جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان، آزمون کای دو پیرسون انجام شد. نتایج این آزمون در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون آماری، بین نوع جدایه‌های کمپیلوباکتر و نوع میزبان ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > ۰,۰۰۵$ ).

### ارزیابی ژن‌های سیستم‌های ترشحی

برای بررسی ژن‌های مرتبط با سیستم‌های ترشحی، PCR اختصاصی برای ژن‌های *flaA* و *virB11* انجام شد. نمونه‌ای از نتایج الکتروفورز در شکل‌های ۳ و ۴ مشاهده می‌شود.

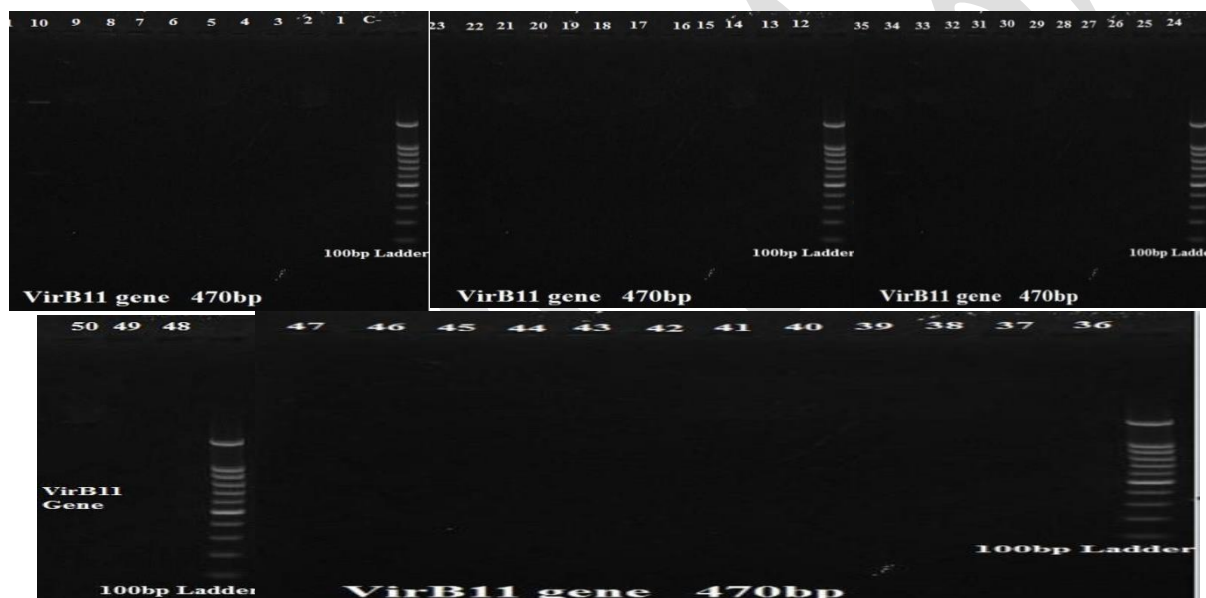




شکل ۳: ژل الکتروفورز و تشخیص ژن *flaA* جدایه‌های کمپیلوباکتر  
ستون C: مارکر وزن مولکولی (لدر) ۱۰۰bp، ستون C-: کنترل منفی، چاهک‌های ۱ تا ۵۰: نمونه‌های جدا شده

Figure 3. Agarose gel electrophoresis for detection of the *flaA* gene in *Campylobacter* isolates

Lane C: 100 bp DNA ladder (molecular weight marker); Lane C-: negative control; Lanes 1–50: *Campylobacter* isolates.



شکل ۴: ژل الکتروفورز و تشخیص ژن *virB11* جدایه‌های کمپیلوباکتر  
ستون C: مارکر وزن مولکولی (لدر) ۱۰۰bp، ستون C-: کنترل منفی، چاهک‌های ۱ تا ۵۰: نمونه‌های جدا شده

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the *virB11* gene in *Campylobacter* isolates

Lane C: 100 bp DNA ladder (molecular weight marker); Lane C-: negative control; Lanes 1–50: *Campylobacter* isolates.

#### شیوع ژن‌های مرتبط با سیستم‌های ترشحی

نتایج نشان داد که ژن *flaA* در بخش قابل توجهی از جدایه‌ها شناسایی شد، درحالی که ژن *virB11* در هیچ‌یک از جدایه‌ها وجود نداشت. همان‌طور که در جدول ۴ ارائه شده، ژن *flaA* بیشترین فراوانی را داشته است.

جدول ۴: شیوع ۴ ژن مرتبط با سیستم ترشحی در جدایه‌های کمپیلوباکتر ژرژونی و کمپیلوباکتر کولی جدا شده از تمام نمونه‌ها

Table 4. Prevalence of four secretion system-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates recovered from all samples

| سیستم ترشحی | ژن مرتبط      | کامپیلوباکتر فراوانی<br>کامپیلوباکتر ژژونی<br>(درصد) | کامپیلوباکتر فراوانی<br>کامپیلوباکتر کولی<br>(درصد) | کامپیلوباکتر کولی<br>(درصد) | فراوانی کل | کل (درصد) | آماره $\chi^2$ | مقدار $P$ |
|-------------|---------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>T3SS</i> | <i>flaA</i>   | ۲۷                                                   | ۸۱/۸                                                | ۶                           | ۱۸/۲       | ۳۳        | ۴/۶۴           | ۰/۰۳      |
| <i>T4SS</i> | <i>virB11</i> | ۰                                                    | ۰                                                   | ۰                           | ۰          | ۰         | ۰              | ۰         |

بررسی شیوع این ژن‌ها برحسب نوع نمونه نیز در جدول ۵ آمده است و نشان می‌دهد که ژن *flaA* بیشترین فراوانی را در جدایه‌های جدا شده از مرغ داشته است.

جدول ۵: شیوع ۴ ژن مرتبط با سیستم‌های ترشحی در جدایه‌های کامپیلوباکتر ژژونی و کامپیلوباکتر کولی برحسب نوع

نمونه

Table 5. Prevalence of secretion system-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates according to sample type

| سیستم ترشحی | ژن مرتبط با سیستم ترشحی | مرغ، فراوانی (درصد) | گاو، فراوانی (درصد) | گوسفند و بز، فراوانی (درصد) | ک آب، فراوانی (درصد) | فراوانی کل | آماره $\chi^2$ | مقدار $P$ |
|-------------|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------|------------|----------------|-----------|
| <i>T3SS</i> | <i>flaA</i>             | ۲۸ (۸۴/۸)           | ۳ (۹/۱)             | ۱ (۳)                       | ۱ (۳)                | ۳۳ (۶۶)    | ۲/۶۸           | ۰/۱۴      |
| <i>T4SS</i> | <i>virB11</i>           | ۰ (۰)               | ۰ (۰)               | ۰ (۰)                       | ۰ (۰)                | ۰ (۰)      | ۰              | ۰         |

#### ارتباط بین کامپیلوباکتر و ژن *flaA*

نتایج مربوط به توزیع ژن *flaA* در میان جدایه‌های کامپیلوباکتر ژژونی و کامپیلوباکتر کولی در جدول ۶ ارائه شده است. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، حضور ژن *flaA* در میان جدایه‌ها متغیر بوده و الگوی توزیع آن بین دو گونه متفاوت است. به‌منظور بررسی ارتباط معنی‌دار بین نوع کامپیلوباکتر و وجود ژن *flaA*، آزمون کای دو پیرسون انجام شد. نتایج این آزمون در جدول ۶ نشان داده شده است. بر اساس مقدار  $P$  گزارش شده ( $P < 0.005$ )، ارتباط بین نوع کامپیلوباکتر و وجود ژن *flaA* معنی‌دار بود. بنابراین، وجود این ژن با نوع گونه کامپیلوباکتر ارتباط آماری قابل توجهی نشان داد.

جدول ۶: جدول توافقی ارتباط بین جدایه‌های کامپیلوباکتر با ژن *flaA*

Table 6. Contingency table showing the association between *Campylobacter* isolates and the *flaA* gene

| وضعیت ژن <i>flaA</i> | کمپیلوباکتر ژرژونی، تعداد (درصد) | کمپیلوباکتر کولی، تعداد (درصد) | کل جدایه‌های کمپیلوباکتر، تعداد (درصد) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|
| مثبت                 | ۲۷ (۰/۷۵)                        | ۶ (۰/۴۲/۹)                     | ۳۳ (۰/۶۶)                              |
| منفی                 | ۹ (۰/۲۵)                         | ۸ (۰/۵۷/۱)                     | ۱۴ (۰/۳۴)                              |
| کل                   | ۳۶ (۰/۱۰۰)                       | ۱۴ (۰/۱۰۰)                     | ۵۰ (۰/۱۰۰)                             |

جدول ۷: جدول نتایج آزمون کای دو پیرسون بین جدایه‌های کمپیلوباکتر و ژن *flaA*

Table 7. Results of Pearson's chi-square test for the association between *Campylobacter* isolates and the *flaA* gene

| Hypothesis (فرضیه)                                                   | آماره کای اسکوئر پیرسون<br>( $\chi^2$ ) | P-value مقدار |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|
| گونه‌های کمپیلوباکتر از حضور یا عدم حضور ژن <i>flaA</i> مستقل هستند. | ۴/۶۴۱                                   | ۰/۰۴۷         |

#### ارتباط بین کمپیلوباکتر و ژن *virB11*

نتایج مربوط به بررسی ژن *virB11* در جدایه‌های کمپیلوباکتر در جدول ۸ ارائه شده است. همان‌گونه که در جدول ۸ مشاهده می‌شود، هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی دارای ژن *virB11* نبودند. به دلیل عدم وجود فراوانی‌های قابل محاسبه در خانه‌های جدول، امکان انجام آزمون کای دو برای بررسی رابطه بین وجود ژن *virB11* و نوع گونه کمپیلوباکتر وجود نداشت. با این حال، بر اساس داده‌های جدول ۸، به نظر می‌رسد که میان نوع کمپیلوباکتر و ژن *virB11* ارتباطی مشاهده نمی‌شود.

جدول ۸: جدول توافقی ارتباط بین جدایه‌های کمپیلوباکتر با ژن *virB11*

Table 8. Contingency table showing the association between *Campylobacter* isolates and the *virB11* gene

| وضعیت ژن <i>virB11</i> | کمپیلوباکتر ژرژونی، تعداد (درصد) | کمپیلوباکتر کولی، تعداد (درصد) | کل جدایه‌های کمپیلوباکتر، تعداد (درصد) |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|
| مثبت                   | ۰ (۰/۰)                          | ۰ (۰/۰)                        | ۰ (۰/۰)                                |
| منفی                   | ۳۶ (۰/۱۰۰)                       | ۱۴ (۰/۱۰۰)                     | ۵۰ (۰/۱۰۰)                             |
| کل                     | ۳۶ (۰/۱۰۰)                       | ۱۴ (۰/۱۰۰)                     | ۵۰ (۰/۱۰۰)                             |

#### بحث

کمپیلوباکترها از مهم‌ترین عوامل باکتریایی ایجادکننده گاستروانتریت در انسان محسوب می‌شوند و به‌ویژه از طریق مواد غذایی با منشأ حیوانی منتقل می‌شوند. در مطالعه حاضر، از مجموع ۳۹۲ نمونه جمع‌آوری‌شده از منابع مختلف شامل مرغ، گاو،

گوسفند و بز و آب، تعداد ۵۰ جدایه متعلق به جنس کمپیلوباکتر شناسایی شد که شیوع کلی ۱۲۰۸ درصد را نشان داد. بیشترین میزان جداسازی در نمونه‌های مرغ مشاهده شد (۲۰۳ درصد)، در حالی که در نمونه‌های دام و آب میزان پایین‌تری گزارش شد. این نتایج با یافته‌های بسیاری از مطالعات بین‌المللی همخوانی دارد که طیور را مهم‌ترین مخزن طبیعی کمپیلوباکتر معرفی کرده‌اند و نقش اساسی آن را در انتقال عفونت به انسان نشان داده‌اند (۱، ۲). علت این موضوع را می‌توان در شرایط زیستی روده طیور، دمای بدن نسبتاً بالا، تراکم بالای نگهداری در مزارع صنعتی و احتمال آلودگی متقاطع در مراحل کشتار و فرآوری جستجو کرد (۲۵).

مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان نیز شیوع بالای کمپیلوباکتر در طیور را گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، Humphrey و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بیش از ۶۰ درصد گله‌های مرغ گوشتی در برخی کشورهای اروپایی به کمپیلوباکتر آلوده هستند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که آلودگی گوشت مرغ در زنجیره تولید می‌تواند نقش مهمی در انتقال این باکتری به مصرف‌کنندگان داشته باشد (۱۰). بنابراین، یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر شیوع بیشتر کمپیلوباکتر در مرغ با روند جهانی گزارش‌شده در مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد و اهمیت کنترل بهداشتی در صنعت طیور را برجسته می‌سازد. در بررسی گونه‌ای جدایه‌ها، نتایج نشان داد که کمپیلوباکتر ژرونی یا فراوانی ۷۲ درصد گونه غالب بوده و کمپیلوباکتر کولی با ۲۸ درصد در رتبه بعدی قرار دارد. این الگوی توزیع با بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک مطابقت دارد که کمپیلوباکتر ژرونی را عامل اصلی کمپیلوباکتریوز انسانی معرفی کرده‌اند و سهم آن را در عفونت‌های انسانی بین ۷۰ تا ۹۰ درصد گزارش کرده‌اند (۲، ۲۶). توانایی بیشتر این گونه در کلونیزاسیون دستگاه گوارش طیور، قابلیت سازگاری با شرایط محیطی و وجود مجموعه‌ای از عوامل حدت مؤثر می‌تواند از دلایل غالب بودن آن باشد (۲۶).

در مطالعه حاضر، اگرچه بیشترین فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های مرغ مشاهده شد، آزمون آماری کای‌دو نشان داد که بین نوع میزبان و گونه کمپیلوباکتر ارتباط آماری معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). این نتیجه بیانگر آن است که هر دو گونه کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی می‌توانند در منابع مختلف حیوانی حضور داشته باشند و دام‌ها نیز می‌توانند به عنوان مخازن بالقوه این باکتری عمل کنند. مطالعات اپیدمیولوژیک پیشین نیز نشان داده‌اند که توزیع گونه‌های کمپیلوباکتر در میزبان‌های مختلف به عوامل متعددی از جمله شرایط اقلیمی، شیوه‌های پرورش دام، مدیریت بهداشتی و حتی تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها وابسته است (۱، ۲۶).

در این مطالعه، حضور کمپیلوباکتر در نمونه‌های آب نیز مشاهده شد، هرچند میزان آن نسبتاً پایین بود. وجود این باکتری در منابع آب می‌تواند نشان‌دهنده آلودگی محیطی ناشی از دفع فضولات حیوانی یا ورود پساب‌های دامداری و کشتارگاه‌ها به منابع آب باشد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کمپیلوباکتر می‌تواند برای مدت معینی در محیط‌های آبی زنده بماند و از این طریق در چرخه انتقال بیماری نقش داشته باشد (۲۷). بنابراین، پایش میکروبی منابع آب از نظر حضور این باکتری می‌تواند از نظر بهداشت عمومی اهمیت داشته باشد.

در بخش بررسی ژن‌های مرتبط با سیستم‌های ترشحی، نتایج نشان داد که ژن *flaA* در ۶۶ درصد جدایه‌ها وجود دارد. ژن *flaA* یکی از ژن‌های کلیدی در ساختار فلاژل کمپیلوباکتر است که نقش مهمی در حرکت باکتری، کلونیزاسیون روده میزبان و توانایی تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال ایفا می‌کند (۱۰). وجود این ژن در درصد قابل توجهی از جدایه‌ها نشان‌دهنده پتانسیل بیماری‌زایی بالای این سویه‌ها است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که حضور ژن‌های مرتبط با فلاژل در کمپیلوباکتر با افزایش توانایی کلونیزاسیون و انتقال در زنجیره غذایی مرتبط است (۲۸). در مقابل، ژن *virB11* که به سیستم ترشحی نوع چهارم T4SS مرتبط است، در هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی شناسایی نشد. سیستم‌های ترشحی نوع چهارم در برخی سویه‌های کمپیلوباکتر در انتقال عوامل حدت و DNA نقش دارند و ممکن است در افزایش بیماری‌زایی دخیل باشند (۲۶). با این حال،

حضور این ژن‌ها در میان سویه‌های مختلف کمپیلوباکتر بسیار متغیر گزارش شده است و در بسیاری از مطالعات نیز فراوانی پایین یا حتی عدم حضور آن گزارش شده است. بنابراین، عدم شناسایی ژن *virB11* در مطالعه حاضر ممکن است نشان‌دهنده ویژگی‌های ژنتیکی خاص سویه‌های منطقه مورد مطالعه باشد.

از نتایج مهم این پژوهش، وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین گونه کمپیلوباکتر و حضور ژن *flaA* بود ( $P > 0.005$ ). این یافته نشان می‌دهد که توزیع این ژن در میان گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر یکسان نیست و احتمالاً در گونه کمپیلوباکتر ژژونی فراوانی بیشتری دارد. از آنجا که این ژن در حرکت‌پذیری و تهاجم باکتری نقش دارد، وجود آن می‌تواند در افزایش توان بیماری‌زایی سویه‌ها مؤثر باشد (۲۵). برخی مطالعات نیز نشان داده‌اند که تفاوت در توزیع ژن‌های حدت میان گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر می‌تواند در تفاوت‌های اپیدمیولوژیک و بالینی عفونت‌ها نقش داشته باشد (۲۸).

از دیدگاه بهداشت عمومی، نتایج این مطالعه اهمیت کنترل آلودگی کمپیلوباکتر در زنجیره تولید مواد غذایی، به‌ویژه در صنعت طیور را برجسته می‌سازد. اجرای برنامه‌های ایمنی زیستی در مزارع پرورش طیور، رعایت اصول بهداشتی در کشتارگاه‌ها، کنترل آلودگی متقاطع در فرآوری مواد غذایی و نظارت مستمر بر کیفیت آب می‌تواند نقش مهمی در کاهش شیوع این باکتری داشته باشد (۲۹). علاوه بر این، استفاده از روش‌های مولکولی پیشرفته برای شناسایی ژن‌های حدت و تعیین الگوهای ژنتیکی سویه‌ها می‌تواند به درک بهتر اپیدمیولوژی این باکتری و طراحی راهکارهای پیشگیرانه کمک کند. مطالعه نشان داد که بیشترین آلودگی کمپیلوباکتر در نمونه‌های مرغ مشاهده شد و پس از آن گاو، آب و در نهایت گوسفند و بز قرار گرفتند؛ این یافته نقش مهم طیور را به‌عنوان مخزن اصلی این باکتری در انتقال به انسان برجسته می‌کند (۳۰). همچنین، شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی *cadF*، *ciaB*، *cdtA*، *cdtB* و *pldA* نشان داد که جدایه‌های به‌دست‌آمده دارای پتانسیل بالای تهاجمی و بیماری‌زایی هستند (۳۰). در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که کمپیلوباکتر همچنان به‌عنوان یک عامل مهم بیماری‌زا در منابع حیوانی حضور دارد و طیور نقش اساسی در چرخه انتقال آن ایفا می‌کنند. بنابراین، پایش مداوم این باکتری در منابع غذایی و محیطی و بررسی عوامل حدت آن می‌تواند در کنترل عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر و ارتقای سلامت عمومی مؤثر باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۳۹۲ نمونه مورد بررسی، ۵۰ جدایه کمپیلوباکتر شناسایی شد که شیوع کلی آن ۱۲.۸ درصد بود. بیشترین میزان جداسازی مربوط به نمونه‌های مرغ بود که نشان‌دهنده نقش مهم طیور به‌عنوان مخزن اصلی این باکتری است. در بررسی گونه‌ای، کمپیلوباکتر ژژونی گونه غالب شناخته شد و پس از آن کمپیلوباکتر کولی قرار داشت. همچنین بررسی ژن‌های مرتبط با سیستم‌های ترشحی نشان داد که ژن *flaA* در بخش قابل توجهی از جدایه‌ها وجود دارد و بین نوع گونه و حضور این ژن ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده شد، در حالی که ژن *virB11* در هیچ‌یک از جدایه‌ها شناسایی نشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های مورد بررسی از نظر عوامل حدت دارای تنوع ژنتیکی بوده و برخی از آن‌ها دارای پتانسیل بیماری‌زایی بالاتری هستند. با توجه به اهمیت کمپیلوباکتر به‌عنوان یکی از عوامل مهم بیماری‌های منتقله از غذا، تقویت برنامه‌های بهداشتی در زنجیره تولید طیور، پایش میکروبی منابع غذایی و محیطی و انجام مطالعات مولکولی گسترده‌تر برای شناسایی عوامل حدت و مسیرهای انتقال این باکتری ضروری به نظر می‌رسد.

## منابع

- [1] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union One Health 2022 zoonoses report. *EFSA J.* 2023;21(12):e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- [2] Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):687-720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- [3] Omole Z, Dorrell N, Elmi A, Nasher F, Gundogdu O, Wren BW. Pathogenicity and virulence of *Campylobacter jejuni*: What do we really know? *Virulence.* 2024;15(1):2436060. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2436060>
- [4] Rahimi E, Mousavinafchi SB, Shakerian A. Isolation, characterization, and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from raw meat of large livestock in Shahrekord, Iran. *Arch Razi Inst.* 2024;79(1):41-54. <https://doi.org/10.32592/ARI.2024.79.1.41>
- [5] Mousavinafchi SB, Rahimi E, Shakerian A. *Campylobacter* spp. isolated from poultry in Iran: Antibiotic resistance profiles, virulence genes, and molecular mechanisms. *Food Sci Nutr.* 2023;11(2):1142-1153. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3152>
6. Sheppard SK, Maiden MC. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(8):a018119. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018119>
- [7] Awad WA, Hess C, Hess M. Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction: A review. *Avian Pathol.* 2018;47(4):352-363. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1475724>
- [8] Hashemi M, Asadi Touranlou F, Adibi S, Afshari A, Shakeri G. Foodborne bacteria in Iran: A 23-year systematic review of high-risk foods. *Iran J Vet Sci Technol.* 2024;16(36):1-47. <https://doi.org/10.22067/ijvst.2024.87069.1357>
- [9] Emami MS, Shakerian A, Chaleshtori RS, Rahimi E. Distribution of virulence genes in *Campylobacter* spp. isolated from *Agaricus* mushrooms in Iran. *Biomed Res Int.* 2023;2023:1872655. <https://doi.org/10.1155/2023/1872655>
- [10] Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.* 2015;48:99-108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>
- [11] Hadiyan M, Momtaz H, Shakerian A. Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene profile and molecular typing of *Campylobacter* species isolated from poultry meat samples. *Vet Med Sci.* 2022;8(6):2482-2493. <https://doi.org/10.1002/vms3.944>

- [12] Bolinger H, Kathariou S. The current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(12):e00416-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00416-17>
- [13] Sproston EL, Ogden ID, MacRae M, Forbes KJ, Dallas JF, Sheppard SK, et al. Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. *J Appl Microbiol.* 2010;109(3):829-838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04711.x>
- [14] van Vliet AH, Ketley JM. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2001;(30):45S-56S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01353.x>
- [15] Shen Z, Wang Y, Zhang Q, Shen J. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol Spectr.* 2018;6(2):ARBA-0013-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017>
- [16] Golz JC, Stingl K. Natural competence and horizontal gene transfer in *Campylobacter*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2021;431:265-292. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8_10)
- [17] Politano M, Walton RO. Statistics and research methodology: A gentle conversation. 3rd ed. *Hang Time Publishing, Ltd. Co.*; 2022.
- [18] Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int J Food Microbiol.* 2007;117(3):237-257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006>
- [19] Baserisalehi M, Bahador N, Kapadnis BP. A novel method for isolation of *Campylobacter* spp. from environmental samples, involving sample processing, and blood- and antibiotic-free medium. *J Appl Microbiol.* 2004;97(4):853-860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02375.x>
- [20] Bessède E, Solecki O, Sifré E, Labadi L, Mégraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(11):1735-1739. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03468.x>
- [21] Atabay HI, Corry JE. The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol.* 1998;84(5):733-740. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00402.x>
- [22] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [23] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons; 1991. p. 115-175.

- [24] 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. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 4):345-348. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>
- [25] Hermans D, Pasmans F, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Rasschaert G, et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(2):89-98. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0676>
- [26] Skarp CPA, Hänninen ML, Rautelin HIK. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(2):103-109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- [27] Bronowski C, James CE, Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;356(1):8-19. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12488>
- [28] Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:340605. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- [29] World Health Organization. Campylobacter: Background document for the WHO guidelines for drinking-water quality and the WHO guidelines on sanitation and health. Geneva: World Health Organization; 2024. 14 p. <https://doi.org/10.2471/B09124>
- [30] Ghasemian SO, Mahmoodipour H. Prevalence of *Campylobacter* isolates from native animals based on the presence of certain virulence genes. *J Microb Biol (BJM)*. 2024;13(49):77-94. <https://doi.org/10.22108/bjm.2024.140567.1583>