Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان
مقاله پژوهشی
دوره ۲۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

شناسایی سریع باکتری کمپیلو باکتر ژژونی بر اساس واکنش PCR و ارزیابی حساسیت و اختصاصیت آن

علی رضیئی [۱]، رحیم سروری [۲،*]، حسین آقاملایی [۱]، میر لطیف موسوی [۳]

[۱] دانشجوی دوره دکتری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۳] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم سروری، دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران. ایمیل: rsorouriz@gmail.com

DOI: 10.21859/hums-24018

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۰۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

واژگان کلیدی:
اکسیدو ردوکتاز
کمپیلو باکتر ژژونی- تشخیص
واکنش زنجیره پلیمراز

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

مقدمه: کمپیلوباکتر ژژونی از عوامل اصلی و شایع مسمومیت غذایی در انسان است. شناسایی سریع و اختصاصی این باکتری نقش مهمی در تشخیص و درمان عفونت ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه طراحی واکنش PCR اختصاصی به منظور شناسایی کمپیلو باکتر ژژونی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ژن اکسیدو ردوکتاز از باکتری کمپیلو باکتر ژژونی جهت شناسایی سریع و اختصاصی این باکتری انتخاب گردید. پرایمرهای اختصاصی جهت این کار، طراحی و خصوصیات آن توسط نرم افزارهای بیو انفورماتیکی بررسی گردید. DNA باکتری با روش فنل کلروفرم استخراج شد. اختصاصیت روش طراحی شده، با استفاده از ۶ گونه باکتری بررسی شد. حساسیت واکنش PCR با روش تهیه سریال رقت از ژنوم باکتری محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پرایمر طراحی شده کاملاً اختصاصی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری کمپیلو باکتر ژژونی بوده و پس از انجام PCR تک باند ۱۶۷ جفت بازی تکثیر می‌شود. این پرایمر با ژنوم دیگر گونه‌های باکتریایی جفت نمی‌شود. حد تشخیص این واکنش ۵ پیکوگرم از DNA ژنومی باکتری می‌باشد.

نتیجه گیری: روش بهینه شده در این مطالعه روشی سریع، حساس و اختصاصی به منظور تشخیص کمپیلو باکتر می‌باشد. به منظور تأیید نتایج این مطالعه، تشخیص باکتری کمپیلو باکتر ژژونی در نمونه‌های مواد غذایی توصیه می‌شود.

مقدمه

آلودگی با کمپیلو باکتر ژژونی یکی از مشکلات عمده سلامت غذا در کشورهای اروپایی و پیشرفته جهان است. در سال ۲۰۰۸، در ۲۷ کشور اروپایی بیش از ۱۹۰۵۶۶ مورد کمپیلوباکتریوزیز انسانی گزارش گردید. بر طبق این گزارش ۴۰/۷ مورد بیماری در هر صد هزار نفر از جمعیت اروپا رخ داده است [۱, ۲]. کمپیلوباکتر ژژونی یکی از عوامل مهم بیماریزا در انسان است که سبب اسهال خونی و دیسانتری می‌شود. این باکتری از راه‌های متفاوتی شامل، مدفوعی- دهانی، تماس جنسی، خوردن شیر غیر پاستوریزه، خوردن گوشت پرندگان که بخوبی پخته نشده باشد، نوشیدن آب آلوده غیر بهداشتی و تماس با حیوانات خانگی و سگ‌های اهلی منتقل می‌شود. بیشترین موارد عفونت‌های انسان ناشی از خوردن مواد غذایی و گوشت مرغ آلوده است که بخوبی پخته نشده باشد. دوز عفونت زای این باکتری در حدود هزار تا ده هزار باکتری می‌باشد. با توجه به این که گونه‌های کمپیلو باکتر نسبت به اسید معده حساس هستند، در صورت مصرف آنتی اسید دوز عفونت زا کاهش می‌یابد. در عفونت‌های دستگاه گوارش، باکتری‌ها با استفاده از LPS و فلاژله به سلولهای مخاط روده متصل می‌شوند.

پروتئین PEB۱ یک آنتی ژن سطحی است که عامل بزرگ چسبندگی در میان سوشهای کمپیلو باکتر ژژونی است [۳]. بعضی از سوشهای کمپیلو باکتر ژژونی یک انتروتوکسین حساس به حرارت شبیه وبیریو کلرا تولید می‌کنند که در بروز اسهال آبکی اهمیت دارد. در موارد اسهال خونی تولید سیتوتوکسین گزارش شده است. محل‌های اتصال و آسیب بافت، ژئوژنوم، ایلیوم و کولونها هستند. این باکتری در روده ماکیان به تعداد فراوان یافت می‌شود [۴]. عمده منبع آلودگی در فرآیندهای ذبح ماکیان است [۵]. این باکتری علاوه بر التهاب روده، سبب سندرم گلین باره و التهاب مفاصل نیز می‌شود [۶-۸]. اهمیت بهداشتی این باکتری نیز

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

بسیار بالا می‌باشد، چرا که در آزمایشگاه‌ها و بیمارستانهای کشور تشخیص این باکتری بدلیل میکروآئروفیل بودن [۹]. در نمونه‌های انتریتی آسان نبوده و جهت رشد آن از سیستم‌های گاز پک نوع C استفاده می‌شود [۱۰-۱۲]. این امر سبب می‌شود که هزینه‌های تشخیص افزایش یافته و تشخیص آنرا در آزمایشگاه با مشکل مواجه می‌کند. در نتیجه درمان مناسب نیز در پی آن انجام نشده و بیماری بخوبی درمان نمی‌گردد.

با توجه به موارد فوق، تشخیص سریع وبه موقع انتریت ناشی از این باکتری از اهمیت فراوانی برخوردار است. آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز عمل اکسیداسیون و احیا را در زنجیره تنفسی بر عهده دارند. نقش اکسیدازها، انتقال هیدروژن از سوبسترا به اکسیژن است و نقش ردوکتازها، اضافه کردن هیدروژن به سوبستراست. در باکتری کمپیلو باکتر ژژونی این آنزیم دارای ژنهای مختلفی است. یکی از این ژنها بعنوان فاکتور ویرولانس در باکتری عمل نموده و سبب بیماریزایی می‌شود. دراین مطالعه از توالی ژن آنزیم مذکور جهت شناسایی اختصاصی این باکتری استفاده شده است.

روش‌های مختلفی جهت شناسایی سریع باکتریها بر پایه اسید نوکلیئک بکار می‌روند. برخی از این روشها عبارتند از Real Time و میکرو آری که هر یک به نوبه خود دارای معایب و مزایایی هستند. بطور مثال دردو روش مذکور اختصاصیت و حساسیت کار بسیار بالا بوده و دارای چرخه واکنش سریع هستند اما هزینه بالا و نیاز به پرسنل آموزش دیده از معایب آن محسوب می‌شود. تکنیک‌های NASABA و LAMP نیز از روشهای شناسایی میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود که دارای حساسیت و اختصاصیت بالا و هزینه پایین بوده اما مشکل اساسی در این روشها انجام طراحی پیچیده پرایمر و نیاز به میکروارگانیسم زنده و دستکاری با RNA است که نیمه عمر آن در سلول پایین است.

PCR یکی از روشهای مولکولی است که ارزش آن در شناسایی عوامل بیماریزای گوارشی شناخته شده است. این روش دارای اختصاصیت و حساسیت بالا بوده و قادر است نتایج را بصورت خودکار و قابل تفسیر ارائه نماید. از طرفی سادگی این روش در مقایسه با سایر روشها، امکان انجام آنرا در هر شرایطی میسر می‌کند. هدف از این مطالعه طراحی واکنش PCR بر اساس پرایمرهای اختصاصی ژن اکسیدوردوکتاز به منظور شناسایی سریع و دقیق کمپیلو باکتر ژژونی می‌باشد.

روش‌کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی و آزمایشگاهی است. سوش باکتری کمپیلو باکتر ژژونی (ATCC۳۳۲۹۱) از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه ومحیط کشت LB agar و LB broth از شرکت Merk تهیه گردید. همچنین کلیه مواد لازم و مورد نیاز برای تهیه واکنش PCR از شرکت سینا ژن تهیه گردید.

انتخاب قطعات ژنی و تهیه پرایمر مناسب

پس از بررسی منابع، تمام ژنها و پرایمرهایی که تاکنون جهت تشخیص کمپیلو باکتر ژژونی با استفاده از PCR استفاده شده بودند، مورد بررسی قرارگرفتند. بر اساس میزان اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی الیگو و پرایمر ۳، همچنین مقایسه آن با توالی‌های دیگر (BLAST) جفت پرایمر مطلوب برمبنای جدول ۱، جهت تشخیص کمپیلو باکتر ژژونی انتخاب گردید.

استخراج ژنوم

برای استخراج ژنوم از روش فنل و کلروفرم استفاده شد [۱۳]. به این ترتیب که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابتدا چند کلنی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی وارد و سپس سانتریفیوژ گردید (۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه)، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris افزوده و پس از ۱۰ دقیقه مخلوط نمودن، ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد به آن اضافه گردید. پس از آن، ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم به آن افزوده و ۱۰ بار تکان شدید داده شد. سپس در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و به محلول رویی ۷۵۰

جدول ۱. XXX

نام باکتری	توالی پرایمر	اندازه آمپلیکون، bp
Campylobacter Jejuni	CF: GGAAAATCAAATAAAGTTAGAGGTAGAA	**167**
	CR: CCATAAGCACTAGCTAGCTGATTATC	**167**

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]
Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد). به رسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده و به خوبی مخلوط نموده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ انجام شد. به رسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه کرده و جهت انجام PCR استفاده گردید.

طراحی واکنش PCR

جهت رسیدن به این هدف، چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها، dNTP،Mgcl۲ و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده گردید و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر لازم برای انجام PCR انتخاب شد. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها از درجه حرارت‌های ۵۶،۵۷،۵۸،۵۹، درجه سانتی گراد استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام پذیرفت. آنزیم DNA پلیمراز Taq با حجم ۱/۵ یونیت، نمونه DNA الگو ۴۵۰ نانوگرم، پرایمرهای Forward و Revers ۰/۵ میکرومولار و dNTP ۰/۸ میلی مولار، $mgcl_2$ ۲ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر و آب مقطر تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید. جهت انجام این کار از دمای اولیه با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با یک چرخه و دمای واسرشتگی با ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه و دمای اتصال با ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۵ چرخه و دمای بسط با ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه، صورت پذیرفت. سپس از هرکدام از نمونه‌ها ۵ میکرولیتر بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز انجام شد. جهت تأیید محصولات PCR پس از انجام واکنش PCR محصول به همراه پرایمر اختصاصی جهت تعیین سکانس به شرکت Bioneer کره ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه از شرکت مذکور، سکانس‌های ارسالی ابتدا توسط نرم افزار Chromas خوانده شد و سپس توسط نرم افزار Contig manager مرتب سازی شدند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST با سایر داده‌های بانک ژنی مقایسه شد.

تعیین میزان اختصاصی بودن PCR

برای تعیین میزان اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده، هریک از جفت پرایمرها با ژنوم گونه‌های باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری، یرسینیا انترکولیتیکا، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرنجس، کلستریدیوم بوتولینوم موردآزمایش قرار گرفت. جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها، ژنوم باکتری‌های مورد نظر تخلیص و سپس با واکنش PCR با روش فوق انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR الکتروفورز شد.

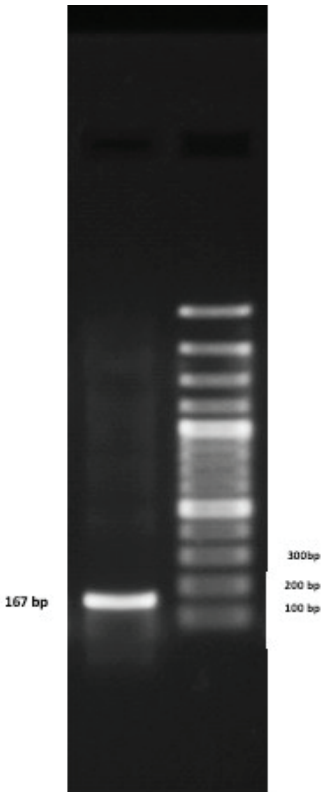
تعیین میزان حساسیت PCR

جهت این کار، ابتدا غلظت DNA ژنومیک استخراج شده از باکتری بوسیله نانو دراپ اندازه گیری شد. سپس از این DNA استخراج شده، برای باکتری رقت از 10^1 تا 10^6 تهیه گردید و در نهایت از این رقت‌های تهیه شده به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد تا حساسیت کار اندازه گیری شود.

یافته‌ها

بهینه سازی فرایند PCR جهت تکثیر ژن اکسیدوردوکتاز

با توجه به شرایط بهینه شده از نظر مواد مصرفی در واکنش و سیکل حرارتی مناسب، واکنش PCR برای این ژن با پرایمرهای اختصاصی آن انجام شد و نهایتاً تک باند ۱۶۷ جفت بازی حاصل گردیدکه نتیجه آن در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ژنی اکسیدوردوکتاز با کتری کمپیلوباکترژژونی

www.SID.ir

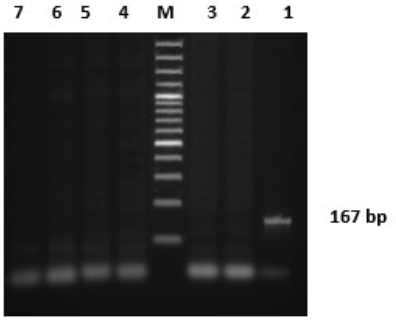
Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

تعیین میزان اختصاصی بودن PCR

برای تعیین میزان اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده، هریک از جفت پرایمرها با ژنوم گونه باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری، یرسینیا انترکولیتیکا، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرنجس، کلستریدیوم بوتولینوم تحت آزمایش قرار گرفت. پس از انجام الکتروفورز هیچ گونه باندی در این واکنش‌ها حاصل نشد. در نتیجه، مشخص گردید که پرایمرهای مورد استفاده کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند (تصویر ۲).

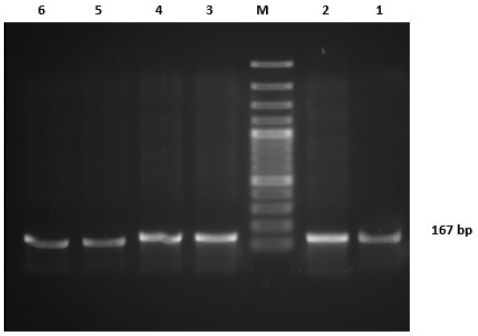


تصویر ۲: بررسی میزان اختصاصی بودن واکنش PCR
چاهک شماره ۱: کنترل مثبت ستونهای شماره ۲ تا ۷: عدم ایجاد باند پس از PCR با باکتری چاهک شماره ۲ (استافیلوکوکوس اورئوس) چاهک شماره ۳ (یرسینیا انترکولیتیکا) چاهک شماره ۴ (سالمونلا تیفی) چاهک شماره ۵ (شیگلا دیسانتری) چاهک شماره ۶ (کلستریدیوم پرفرنجس) چاهک شماره ۷ (کلستریدیوم بوتولینیوم)

تعیین میزان حساسیت PCR

پس از انجام واکنش PCR طبق شرایط بهینه شده بخش دوم و الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل آگارز نتیجه مورد بررسی قرار گرفت. رقت سازی تا 10^{6} از DNA ژنومیک انجام شد و از این رقت‌های تهیه شده واکنش PCR صورت گرفت. با استفاده از این روش حد تشخیص روش بهینه شده ۵ پیکو گرم محاسبه گردید (تصویر ۳).

تأیید محصولات PCR: با بررسی و مقایسه سکانس‌ها با سکانس‌های موجود در بانک توالی‌های ژنی، مشخص گردید که توالی‌های بدست آمده دقیقاً مربوط به ژن اکسیدوردوکتاز باکتری کمپیلو باکتر ژژونی می‌باشد. نتایج توالی یابی و مقایسه آن با توالی‌های ثبت شده در پایگاه بانک ژنی بوسیله نرم افزار BLAST نشان داد قطعه تکثیر شده ۱۰۰ درصد با ژن اکسیدو ردوکتاز کمپیلوباکتر ژژونی مطابقت دارد. تمام سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی که با این توالی شباهت دارند متعلق به زیرگونه‌های کمپیلو باکتر ژژونی بوده و گونه‌ها و سویه‌های دیگری که دارای مشابهت با این توالی باشند در بانک ژنی وجود ندارد (تصویر ۴).



تصویر ۳: تهیه رقت در اندازه‌های ۱۰-۱ تا ۱۰-۶ (چاهک شماره ۱ تا ۶) وچاهک شماره ۷ نشانگر

تصویر ۴: نتایج بلاست

بحث

کمپیلو باکتر ژژونی یکی از عوامل اصلی انتریت در جهان محسوب می‌شود. علاوه بر این عوارضی مانند انتریت های ناشی از این باکتری‌ها بارها گزارش شده است [۹, ۱۴]. کمپیلو باکتر ژژونی یکی از عوامل اصلی ایجاد کمپیلو باکتریوزیس در انسان است و در اتحادیه اروپا کمپیلو باکتریوزیس به عنوان شایع‌ترین بیماری مشترک بین انسان و دام معرفی شده است. مهم‌ترین گونه‌های بیماریزای کمپیلو باکتر در انسان شامل کمپیلو باکتر ژژونی و کولی است [۱۵]. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) یک واکنش سریع و حساس برای تشخیص DNA بعنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم است. این روش در قیاس با سایر روشهای تشخیصی، از جمله کشت از حساسیت و اختصاصیت بالاتری برخوردار است و بر خلاف روش کشت نیازی به زنده بودن باکتری در نمونه مورد نظر نیست [۱۶]. در این مطالعه پس از تأیید فنوتیپی باکتری کمپیلو باکتر

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

ژژونی با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، کاتالاز، تست TSI و هیدرولیز هیپورات، طراحی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بسیار اختصاصی برای شناسایی این باکتری انجام گردید. از آنجایی که یافتن یک توالی ژنی اختصاصی گونه و محافظت شده برای انجام یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز الزامی است [۱۷، ۱۸]. در ابتدای این مطالعه بررسی پرایمرها در شرایط Insilico انجام شد و نشان داده شد که آغازگرهای طراحی شده، اختصاصیت بالایی با کمپیلو باکتر ژژونی دارند. پس از طراحی اختصاصی پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای مولکولی مناسب و تأیید آن با استفاده از روشهای بیوانفورماتیکی، اختصاصیت این جفت پرایمر با شش نمونه باکتری مشابه بررسی گردید و مشخص شد که این پرایمر با ژنوم هیچکدام ازاین باکتری‌ها جفت نشده که نشان دهنده اختصاصیت کامل آنها به کمپیلوباکترژژونی می‌باشد. بررسی نرم افزار مولکولی این ژن و پرایمرهای ارائه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن اکسیدو ردوکتاز، یکی از مناسب‌ترین توالیهای شناخته شده در شناسایی کمپیلو باکتر ژژونی می‌باشد. حد تشخیص این روش پس از تهیه رقت‌های متوالی، ۵ پیکو گرم بدست آمد که در مقایسه باسایر مطالعات مشابه، مطلوب می‌نماید [۶, ۷]. روش‌های سنتی شناسایی کمپیلو باکتر مبتنی بر محیط کشت عموماً ۴ روز و جهت تأیید گونه باکتری ۷-۶ روز بطول می‌انجامد. از طرفی شناسایی گونه ژژونی از سایر گونه‌ها بر اساس تست هیدرولیز هیپورات صورت می‌گیرد که ممکن است همیشه صحیح نباشد [۱۹]. روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌های کمپیلو باکتر طی سالهای اخیر توسعه یافته و هم اکنون از نظر تجاری قابل دسترس بوده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. بطور معمول در حال حاضر شناسایی کمپیلوباکتر ژژونی در آزمایشگاه تشخیص طبی انسانی، بر پایه کشت، جداسازی و تستهای تشخیص فنوتیپی است [۲۰]. از آنجایی که کمپیلو باکتر، جزء باکتریهای سخت رشد می‌باشد، جدا سازی آن مشکل بوده، لذا روشهای مولکولی بر پایه PCR می‌توانند در شناسایی کمپیلو باکتر منجر به افزایش دقت در شناسایی آن بهمراه روش‌های کشت از نمونه‌های بالینی شوند [۲۱]. در سال ۲۰۰۳ گیلبرت و همکاران با استفاده از نمونه‌های مواد غذایی به شناسایی این باکتری پرداختند که در مقایسه با مطالعه اخیر از حساسیت کمتری برخوردار بود [۲۲]. همچنین در سال ۲۰۰۵ نایاک و همکاران در نمونه‌های غذایی و بالینی با استفاده از این ژن به شناسایی باکتری پرداختند. آن‌ها در این تحقیق سه ژن را در نمونه‌های غذایی و نمونه‌های کلینیکی بررسی کردند که یکی از ژنها، ژن مورد مطالعه ما بوده است. آن‌ها اختصاصیت مطالعه خود را برای دو گونه باکتری کمپیلو باکتر ژژونی و کمپیلو باکتر کولی ۹۷ درصد گزارش کردند [۲۳]. در تحقیقی که در سال ۹۲ توسط حاجتی و همکاران صورت گرفت به شناسایی این باکتری پرداختند که صرفاً اختصاصیت این باکتری با باکتری *E. coli* O۱۵۷ بررسی شد و حساسیت آن محاسبه نگردید [۲۴]. در تحقیقی دیگر نیز که توسط ساری و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد نشان داده شد که از ۱۰۰ نمونه‌ای که در آن مطالعه استفاده شده بود ۷۶ درصد آن با تست هیپورات مثبت شد در حالیکه با استفاده روش PCR، ۲۸ درصد نمونه‌ها مثبت ارزیابی گردید. این مطلب بیان کننده این واقعیت است که روش PCR نسبت به روشهای شناسایی سنتی، روشی بهتر و دقیق‌تر می‌باشد [۲۵].

نتیجه گیری

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این مطالعه، از دقت، سرعت، حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است بطوریکه قادر به واکنش با سایر ارگانیسم‌های مولد مسمومیت غذایی یا پاتوژنهای میکروبی نیست. از طرفی انجام آن در کمتر از ۳ ساعت صورت می‌گیرد که نشان از زمان مناسب جهت بکار گیری آن در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. جهت تأیید کارآیی این واکنش طراحی شده در این مطالعه، پیشنهاد می‌شود شناسایی باکتری کمپیلو باکتر ژژونی در نمونه‌های مواد غذایی با استفاده از این روش در مطالعات بعدی انجام شود.

سپاسگزاری

کلیه نویسندگان از همکاریهای صمیمانه پژوهشگران گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران در تهیه سوش مورد نظر کمال تشکر و قدردانی را اعلام می‌نمایند. ضمناً تعارض منافعی در نتایج مشاهده نشد.

REFERENCES

1. Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(11):1351-61. DOI: 10.1089/fpd.2010.0564 PMID: 20586609
2. Trends E. Sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA J. 2010;8(1):1496.
3. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz melnick & adelbergs medical microbiology. New Yourk: Mcgraw-Hill; 2012.
4. Reich F, Atanassova V, Haunhorst E, Klein G. The effects of Campylobacter numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with Campylobacter. Int J Food Microbiol. 2008;127(1-2):116-20. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.018 PMID: 18657873
5. Allen VM, Bull SA, Corry JE, Domingue G, Jorgensen F, Frost JA, et

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

al. Campylobacter spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. Int J Food Microbiol. 2007;113(1):54-61. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011 PMID: 17007949

6. Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, et al. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. J Infect Dis. 2006;193(4):547-55. DOI: 10.1086/499969 PMID: 16425134
7. Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. J Clin Microbiol. 2005;43(1):335-9. DOI: 10.1128/JCM.43.1.335-339.2005 PMID: 15634991
8. Pope JE, Krizova A, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Ouimet JM. Campylobacter reactive arthritis: a systematic review. Semin Arthritis Rheum. 2007;37(1):48-55. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2006.12.006 PMID: 17360026
9. Wai SN, Nakayama K, Umene K, Moriya T, Amako K. Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. Mol Microbiol. 1996;20(6):1127-34. PMID: 8809765
10. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and Campylobacter coli direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol. 1997;35(10):2568-72. PMID: 9316909
11. Fernandez H, Pison V. Isolation of thermotolerant species of Campylobacter from commercial chicken livers. Int J Food Microbiol. 1996;29(1):75-80. PMID: 8722188
12. Stern NJ, Line JE. Comparison of three methods for recovery of Campylobacter spp. from broiler carcasses. J Food Protect. 1992;55(9):663-6. DOI: 10.4315/0362-028X-55.9.663
13. Sambrook J. Rusell. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
14. Champion OL, Gaunt MW, Gundogdu O, Elmi A, Witney AA, Hinds J, et al. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(44):16043-8. DOI: 10.1073/pnas.0503252102 PMID: 16230626
15. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. N Engl J Med. 1995;333(21):1374-9. DOI: 10.1056/NEJM199511233332102 PMID: 7477117
16. Khan IU, Gannon V, Kent R, Koning W, Lapen DR, Miller J, et al. Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds. J Microbiol Methods. 2007;69(3):480-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.02.016 PMID: 17433480
17. Shirazi MH, Vaise Malekshahi Z, Afshar D, Ranjbar R, Hajikhani S. [Drug resistance among *Campylobacter jejuni* strain isolated from children with diarrhea]. J Babol Univ Med Sci. 2013;15(1):79-83.
18. Rosyidi A, Budhiharta S, Asmara W, Yudhabuntara D. Phenotypic and genotypic detection of *Campylobacter jejuni* at local chicken and chicken meat. Animal Product. 2010;12(2).
19. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and C. coli. Lett Appl Microbiol. 1999;29(6):406-10. PMID: 10664985
20. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, et al. 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. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5549-57. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5549-5557.2004 PMID: 15583280
21. Lastovica AJ, Le Roux E. Optimal detection of Campylobacter spp in stools. J Clin Pathol. 2003;56(6):480. PMID: 12783980
22. Gilbert C, Winters D, O'Leary A, Slavik M. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, Salmonella spp., and Escherichia coli O157:H7. Mol Cell Probes. 2003;17(4):135-8. PMID: 12944114
23. Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS. PCR identification of Campylobacter coli and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. Mol Cell Probes. 2005;19(3):187-93. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.11.005 PMID: 15797819
24. Hajati S, Shirazi MH, Afshar D, Moghbeli M, Abadi H, Moazami A. [Molecular cetection of *Campylobacter jejuni* by using a specific locus]. Iran J Infect Dis Trop Med. 2014;18(62):59-62.
25. Sari A, Jamshidi A, Bassami MR. [Isolation and identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses using conventional culture methods and multiplex PCR assay]. Int J Veter Res. 2011;5(1):31-5.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.21859/hums-24018]

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:37 +0330 on Tuesday September 26th 2017

Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences Original Article

No 83, Volume 24, Issue 1

Rapid Detection of Campylobacter jejuni by Polymerase Chain Reaction and Evaluation of its Sensitivity and Specificity

Ali Razei [1], Rahim Sorouri [2,*], Hossin Aghamollaei [1], Seyed Latif Mousavi [3]

[1] *PhD Student, Applied Biotechnology Research Center, Bqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran*

** Corresponding author: Rahim Sorouri, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: rsorouriz@gmail.com*

DOI: 10.21859/hums-24018

Received: 27.09.2016
Accepted: 15.04.2017

Keywords:
Campylobacter jejuni- diagnosis
Oxidoreductase
Polymerase Chain Reaction

How to Cite this Article:
Razei A, Sorouri R, Aghamollaei H, Mousavi SL. Rapid Detection of Campylobacter jejuni by Polymerase Chain Reaction and Evaluation of its Sensitivity and Specificity. *Sci J Hamadan Univ Med Sci*. 2017;**24**(1):56-62. DOI: 10.21859/hums-24018

© 2017 Hamadan University of Medical Sciences.

Abstract

Introduction: Campylobacter jejuni is one of the most common causes of food poising in human. Rapid and specific detection of these bacteria has an important role in diagnosis and treatment of infection. The aim of this study was to design a specific PCR for the detection of Campylobacter jejuni.

Methods: In this experimental study, oxidoreductase gene from the Campylobacter jejuni was selected for rapid and specific detection. For this purpose, specific primers were designed and charecterized by bioinformatics software. Bacterial genome was extracted by phenol-chloroform method and PCR was optimized to obtain a specific product. Specificity of the designed reaction was investigated using six bacterial species. The sensitivity of the PCR reaction was calculated by the serial dilutions method.

Results: The designed primer was specific to oxidoreductase gene of Campylobacter jejuni and after optimization, a unique 167-bp band was amplified. This primer was specific to Campylobacter jejuni and did not show any cross reaction with other bacterial genomes. The detection limit of this reaction was 5 pg of genomic DNA.

Conclusion: The optimized PCR used in this study was a rapid, sensitive, and specific method for detection of Campylobacter jejuni. For confirmation of this method, detection of C. jejuni from food samples is proposed.

www.SID.ir