Archive of SID

Original Article

The Frequency of Infection with *Campylobacter*, Its Species Diversity, and Antimicrobial Resistance in Stool Samples of Patients with Community-Acquired Gastroenteritis in Tehran

Atena Sadeghi [1, 2], Parviz Owlia [1, 2], Leila Ganji [3], Saeid Besharati [1, 2], Fatemeh Ahmadi [4], Fereshteh Fani [5], Gholamreza Puladfar [5], Masoud Alebouyeh [6,*]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Molecular Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
[3] Health Reference Laboratory Research Center, Reference Health Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Iran
[4] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[5] Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[6] Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background:
Campylobacter species are among foodborne pathogens that are known as the main cause of inflammatory diarrhea in humans. In this cross-sectional study, we investigated the prevalence of *Campylobacter* spp. and their drug resistance status in fecal samples of patients with community-acquired gastroenteritis in Tehran.

Materials and Methods:
In this survey, infection with *Campylobacter* spp. was evaluated in 400 stool samples of patients with diarrhea. Accordingly, microscopic examination to show the presence of exudative diarrhea, rejection of fungi and parasitic infections, enrichment and culture in a specific medium under microaerophilic conditions, determination of biochemical identity, and molecular confirmation at genus and species levels for *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis* were performed. Antibiotic resistance patterns were determined by E-test and disk diffusion methods, and the presence of the dominant gyrA gene mutations in the quinolone-resistance domain of *C. jejuni* isolates was determined by using Mismatch Amplification Mutation Assay-polymerase chain reaction (MAMA-PCR)[1].

Results:
A total of 28 strains of *Campylobacter* were isolated from the samples obtained from the patients with diarrhea. The most common species were *C. jejuni* (6%), *C. coli* (0.5%), *C. lari* (0.25%), and other unknown species (0.25%). The highest antibiotic resistance rate was observed against tetracycline and ampicillin (53.5% and 50%, respectively), and the lowest rate was detected for nalidixic acid and ciprofloxacin (28.5% and 28.5%). Multiple drug resistance (MDR) phenotype was detected among 51.8% of the strains.

Conclusion:
Results of this study indicated *C. jejuni* as the main *Campylobacter* species responsible for community-acquired diarrhea among the studied patients. The high rate of resistance to antibiotics and MDR phenotype in these strains compared with other countries is considered a risk, especially in the treatment of invasive infections.

Keywords: Community-acquired diarrhea; *Campylobacter spp.*; Tehran; Multi-drug resistance, Gyrase A, Minimum inhibitory concentration, MAMA-PCR.

please cite this paper as:
Sadeghi A , Owlia P, Ganji L, Besharati S , Ahmadi F , Fani F, Puladfar GR, Alebouyeh M. The Frequency of Infection with Campylobacter, Its Species Diversity, and Antimicrobial Resistance in Stool Samples of Patients with Community-Acquired Gastroenteritis in Tehran. *Govaresh* 2020;25:93-102.

1. Mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction

*Corresponding author:
Dr. Masoud Alebouyeh
Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Telefax: + 98 21 22226941
E-mail: masoud.alebouyeh@gmail.com.

Received: 29 Mar. 2019
Edited: 30 May 2020
Accepted: 31 May 2020

www.SID.ir

Archive of SID

گوارش/ دوره ۲۵، شماره ۲/ تابستان ۱۳۹۹-۱۰۲/۹۳

مقاله پژوهشی

بررسی میزان فراوانی عفونت به *کمپیلوباکتر*، تنوع گونه ای دخیل، و میزان مقاومت دارویی در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به گاستروانتریت ناشی از جامعه در شهر تهران

آتنا صادقی[۱،۲]، پرویز اولیاء[۱،۲]، لیلا گنجی[۳]، سعید بشارتی[۱،۲]، فاطمه احمدی[۴]، فرشته فانی[۵]، غلامرضا پولادفر[۵]، مسعود آل بویه[۶،*]

[۱] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد تهران. ایران
[۲] مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت، آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ایران
[۴] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
[۵] مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[۶] مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
گونه های *کمپیلوباکتر* از جمله پاتوژن های روده ای منتقله از راه غذا هستند که بعنوان عامل اسهال التهابی در جوامع انسانی شناخته می شوند. در این تحقیق تلاش شده است تا در یک مطالعه مقطعی بر نمونه های مدفوع بیماران دچار گاستروانتریت ناشی از جامعه، به بررسی شیوع گونه های *کمپیلوباکتر* و وضعیت مقاومت دارویی در آنها در بیماران شهر تهران بپردازیم.

روش بررسی:
در این بررسی ۴۰۰ بیمار علامت دار مبتلا به اسهال در شهر تهران از نظر ابتلا به عفونت *کمپیلوباکتر* مورد بررسی قرار داده شد. بدین منظور بررسی میکروسکوپی جهت رد عفونت انگلی و قارچی و تعیین اسهال ترشحی، غنی سازی و کشت در محیط اختصاصی تحت شرایط میکروائروفیل، تعیین هویت بیوشیمیایی، و تایید مولکولی در سطح جنس و گونه های *کمپیلوباکتر ژژونی*، *کمپیلوباکتر کولی*، *کمپیلوباکتر لاری*، و *کمپیلوباکتر آبسالینسیس* به انجام رسید. الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها با استفاده از روش E-test و انتشار از دیسک انجام و حضور موتاسیون ژنی غالب gyrA در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کوئینولون ها در جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونی* با روش اختصاصی Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA-PCR) صورت گرفت.

یافته ها:
تعداد ۲۸ جدایه *کمپیلوباکتر* از نمونه های اسهالی بیماران جداسازی گردید. *کمپیلوباکتر ژژونی* بیشترین گونه(۶٪)، بود و سایر گونه ها به ترتیب شامل *کمپیلوباکتر کولی*(۰/۵٪)، *کمپیلوباکتر لاری* (۰/۲۵٪) و گونه های نامشخص دیگر (۰/۲۵٪) بود. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در ۷ آنتی بیوتیک مورد مطالعه در مورد تتراسایکلین و آمپی سیلین به ترتیب (۵۳/۵ و ۵۰ درصد) و کمترین در نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین (۲۸/۵ درصد) گزارش شد. فنوتیپ مقاومت دارویی چندگانه(MDR) در ۵۱/۸ درصد این سویه ها شناسایی شد.

نتیجه گیری:
نتایج این تحقیق موید آن بود که *کمپیلوباکتر ژژونی* عامل اصلی بروز عفونت ناشی از *کمپیلوباکتر* در بیماران تحت مطالعه بوده، گرچه سایر گونه های *کمپیلوباکتر* نیز دارای این توانایی می باشند. مقاومت بالای این جدایه ها به آنتی بیوتیک ها و فراوانی الگوهای مقاومت چندگانه در آنها در مقایسه با سایر کشورها بعنوان یک خطر، بویژه در درمان عفونت های تهاجمی محسوب می شود.

کلید واژه: اسهال ناشی از جامعه، گونه های *کمپیلوباکتر*، تهران، مقاومت دارویی چند گانه، ژیراز A، حداقل غلظت مهاری، ماما-پی سی-آر

گوارش/ دوره ۲۵، شماره ۲/ تابستان ۱۳۹۹-۱۰۲/۹۳

***نویسنده مسئول: مسعود آل بویه**
مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تلفکس: ۲۲۲۲۶۹۴۱-۰۲۱
پست الکترونیک: masoud.alebouyeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۰
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۹/۰۳/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۱۱

زمینه و هدف:

بیماری اسهال همچنان یک معضل مهم پزشکی است و باعث ایجاد عوارض متعدد و مرگ و میر قابل توجهی در کشورهای در حال توسعه می شود.(۱) *کمپیلوباکتر*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *اشریشیا کلای* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مهمترین عوامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال هستند. عفونت های ناشی از *کمپیلوباکتر* به عنوان یکی از مهمترین بیماری های منتقله از غذا در بسیاری از کشورهای جهان رخ می دهد (۲)، به طوری که سالانه بیش از ۴۰۰ میلیون مورد *کمپیلوباکتریوزیس* در سراسر جهان ثبت می شود.(۳)

www.SID.ir

Archive of SID

بیماران مبتلا به *کمپیلوباکتریوزیس* علایمی مشابه سایر عفونت های روده ای، ازجمله اسهال، درد شکم، تب و استفراغ را نشان می دهند، در حالی که این بیماری معمولاً یک بیماری خود محدود شونده است.(۴) علایم حاد از اسهال آبکی طولانی تا اسهال خونی همراه با تب، گرفتگی شکم و وجود لکوسیت در مدفوع متغیراست و می تواند مدت طولانی تری باقی بماند.(۶,۵) همچنین در سال های اخیر نقش این باکتری در ایجاد بیماری های گوارشی مانند سرطان روده بزرگ و بیماری التهابی روده مورد توجه قرار گرفته است.(۷)

انتقال *کمپیلوباکتر* به انسان از طریق خوردن غذای آلوده یا آب یا از طریق تماس مستقیم با حیوانات، به ویژه طیور صورت می گیرد.(۸) همچنین دوز عفونی باکتری پایین بوده، به طوری که تعداد بسیار کمی از *کمپیلوباکتر* (کمتر از ۵۰۰ عدد واحد شکل دهنده کلنی) می توانند باعث بروز بیماری در انسان شود.(۹) عفونت *کمپیلوباکتر* در همه گروه های سنی رخ می دهد، در حالی که در کشورهای کم درآمد و درحال توسعه بیشترین علامت عفونت در کودکان خردسال مشهود است و عفونت در بزرگسالان به صورت بدون علامت بروز می کند.(۱۰) با این وجود، تحقیقات نشان داده است که هر دو عفونت علامت دار و بدون علامت با سوء تغذیه در ارتباط باشند (۱۰,۹).

از میان ۳۲ گونه و ۱۳ زیرگونه شناخته شده *کمپیلوباکتر*، گونه های گرمادوست[1] *ژژونی* و *کولی* بیشترین گونه های جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال انسان بوده است. سایر گونه ها نیز مانند *کمپیلوباکتر لاری* و *آبسالینسیس* به طور اسپورادیک گزارش شده اند.(۳, ۱۱) این گروه با بیشترین میزان بروز عفونت در نوزادان زیر ۲ سال است و باعث بروز اسهال متوسط تا شدید در نوزادان و کودکان خردسال می شود.(۱۳) اگرچه گاستروانتریت ناشی از *کمپیلوباکتر* خود محدود شونده است، اما در موارد طولانی شدن مدت بیماری، درمان آنتی بیوتیکی توصیه می شود. ماکرولیدها (اریترومایسین، آزیترومایسین و کلاریترومایسین)، فلوروکینولون ها (سیپروفلوکساسین) و تتراسایکلین ها از جمله آنتی بیوتیک های توصیه شده برای درمان عفونت های ناشی از *کمپیلوباکتر* هستند.(۱۲) متاسفانه افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در *کمپیلوباکترهای* جدا شده از انسان، حیوانات و محیط زیست به سرعت در حال تبدیل شدن به یک نگرانی مهم در مورد سلامت عمومی است.(۱۶-۱۴)، به طوری که مقاومت در برابر داروهای تجویز شده برای درمان کمپیلوباکتریوزیس در بسیاری از کشورها گزارش شده است (۱۵-۱۳).

با توجه به اهمیت این عفونت و ارتباط آن با بیماری های روده تحریک پذیر و سندرم گیلن باره، شناسایی دقیق و زود هنگام عفونت *کمپیلوباکتر* در یک جامعه نقش مهمی را در کاهش شدت علایم، جلوگیری از عوارض ناخواسته و همینطور کنترل بیماری دارد.(۱۶, ۱۷) بدین منظور در مطالعه حاضر، بررسی میزان فراوانی عفونت به *کمپیلوباکتر* در نمونه‌های مدفوع بیماران سرپایی مبتلا به گاستروانتریت با هدف جداسازی و شناسایی گونه های مختلف *کمپیلوباکتر* از افراد مبتلا به گاستروانتریت و همچنین تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و موتاسیون gyr A در آنها در شهر تهران انجام شد.

1. thermophile

روش بررسی:

جمع آوری نمونه های مدفوع:

در این مطالعه توصیفی تعداد ۴۰۰ نمونه مدفوع از بیماران سرپایی دچار اسهال مراجعه کننده به دو بیمارستان عمومی آموزشی و دو بیمارستان فوق تخصصی اطفال در سطح شهر تهران با طی تیرماه سال ۱۳۹۷ لغایت اسفند سال ۱۳۹۷ جمع آوری گردید. اطلاعات دموگرافیک بیماران، شامل عدم سابقه بستری در بیمارستان طی ۶ ماه گذشته، عدم مصرف آنتی بیوتیک در دو هفته اخیر، سن، جنس، عدم ابتلا به بیماری زمینه ای (همچون IBS، سلیاک) و مصرف دارو، از طریق تکمیل پرسشنامه جمع آوری شد. هیچ یک از نمونه های دارای معیارهای خروج در این مطالعه وارد نگردید. تمامی نمونه ها با رعایت زنجیره سرد بصورت تازه در کمتر از ۲ ساعت یا در محیط انتقالی Amies در زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل شدند.

بررسی میکروسکوپی، غنی سازی، و کشت نمونه‌های مدفوع:

در این بررسی نمونه های مدفوع بیماران جهت رد عفونت های انگلی و قارچی، و بررسی حضور لوکوسیت و مخاط در مدفوع جهت تایید وجود اسهال اگزوداتیو مورد بررسی میکروسکوپی و رنگ آمیزی قرار داده شدند. برای غنی سازی نمونه های مدفوع تازه، پس از تهیه سوسپانسیون (۱ گرم مدفوع در یک میلی لیتر نرمال سالین)، این مخلوط با استفاده از غشاء استات سلولز با ابعاد ۰/۶۵ µm بر روی محیط CCD-agar فیلتر شد. همچنین نمونه‌هایی که توسط سواپ استریل در محیط انتقالیAmies به آزمایشگاه منتقل شده بودند، بدون انجام فیلتراسیون بر روی محیط CCD-agar کشت شدند. پلیت ها به مدت ۵-۱ روز در شرایط میکروآئروفیلیک و در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفتند. کلنی‌هایی که از لحاظ خصوصیات میکروسکوپی و آزمایش های بیوشیمیایی مشکوک به کمپیلوباکتر بودندبه محیط Columbia agar حاوی ۱۰٪ خون گوسفند منتقل و برای مدت زمان ۲۴ ساعت در شرایط میکروآئروفیل و در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

استخراج DNA:

جهت تایید تشخیص جدایه های *کمپیلوباکتر* از آزمون های مولکولی استفاده گردید. بدین منظور DNA کلنی هایی که با روش های فنوتیپی به عنوان *کمپیلوباکتر* شناسایی شده بودند با روش جوشاندن استخراج گردید.

شرایط PCR:

تایید و شناسایی جدایه های مشکوک در سطح جنس و گونه های *ژژونی* و *کولی* به ترتیب با روش PCR و multiplex PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام پذیرفت. ترکیبات لازم جهت آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب شامل ۱۰ میکرولیتر از محلول Master mix (امپلیکون- دانمارک)، ۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس و گونه *کمپیلوباکتر*

باکتری	طول محصول (جفت‌باز)	ژن هدف	توالی پرایمر	منابع
Genus *Campylobacter*	812	16S rRNA	'F: 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3 'R: 3'-CATTGTAGCACGTGTGTC-5	(۱۹)
C. Coli	364	Ask	'F: 5'-AGGCAAGGGAGCCTTTAATC-3 'R: 3'-TATCCCTATCTACAAATTCGC-5	(۲۰)
C. jejuni	773	cj0414	'F: 5'-CATCTTCCCTAGTCAAGCCT-3 'R: 3'-AAGATATGGCACTAGCAAGAC-5	
C. upsaliensis	86	LpxA	'F: 5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3 'R: 3'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-5	(۲۱)
C. lari	251	GlyA	'F: 5'TAGAGAGATAGCAAAAGAGA -3 'R: 3'-TACACATAATAATCCCACCC-5	

میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار (سینا کلون-ایران)، ۱ میلی مولار از پرایمر فوروارد ، ۱ میلی مولار از پرایمر ریورس و ۴ نانوگرم DNA انجام شد. برنامه حرارتی اپتیمایز شده شامل یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۱دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال ۱ دقیقه در ۶۴-۵۴ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد.

ترکیبات لازم جهت آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب شامل ۱۰ میکرولیتر از محلول Master mix (امپلیکون- دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار (سینا کلون-ایران)، ۰/۵ میلی مولار از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس Col1,2 و ۰/۵ میلی مولار از هر یک از پرایمرهای Jun3,4 و ۴ نانوگرم DNA انجام شد.

ترکیبات لازم جهت ازمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب شامل۱۰ میکرولیتر از محلول Master mix (امپلیکون- دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار (سینا کلون-ایران)، ۰/۵.میلی مولار پرایمر Forward، ۰/۵ میلی مولار پرایمر Reverse و ۴ نانوگرم DNA انجام شد. شرایط دمایی واکنش: یک سیکل ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی-گراد دناتوراسیون اولیه سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال۹۰ثانیه در ۵۸ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد.

ترکیبات لازم جهت آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمر از جهت تشخیص موتاسیون gyrA در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب شامل۱۰ میکرولیتر از محلول Master mix (امپلیکون- دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار (سینا کلون-ایران)، ۰/۵، میلی مولار پرایمر Forward، ۰/۵ میلی مولار پرایمر Reverse و ۴ نانوگرم DNA انجام شد. شرایط دمایی واکنش: یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (دناتوراسیون اولیه) سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال ۱ دقیقه در ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد، برنامه Modify شده است (۱۸).

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):

الگوی مقاومت میکروبی جدایه های *کمپیلوباکتر* به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (Germany-Biochemica)، جنتامایسین(Canada-BioBasic)، نالیدیکسیک اسید (E-test-Sweden- AB BIO DISK)، تتراسیکلین(Merck - Germany - 30mg)، اریترومایسین (Merck-Germany - 15mg)، سیپروفلوکساسین (Merck - Germany - 5mg) و کلیندامایسین (E-test - Sweden - AB BIO DISK) با استفاده از روش ها مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه از روش انتشار از دیسک جهت شناسایی *کمپیلوباکترهای* مقاوم و حساس به اریترومایسین، تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین (Merck-Germany) در محیط Mueller-Hinton agar(Merck-Germany)حاوی ۵٪ خون گوسفند استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه ی سانتی گراد و در شرایط میکروآئروفیل انکوبه گردیدند. در این بررسی از سویه های استاندارد *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureous* ATCC 29213 برای کنترل دیسک ها استفاده شد.

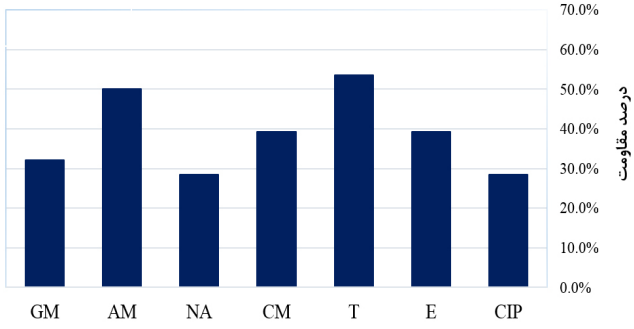
تعیین حساسیت جدایه های *کمپیلوباکتر* به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید و کلیندامایسین با روش E.test (Sweden - AB BIO DISK) مشخص گردید. بنابراین دیسک ها بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند (Merck-Germany) تلقیح شده با باکتری قرار داده شدند و پس از انکوباسیون تحت شرایط مشابه روش انتشار از دیسک هاله ی عدم رشد بررسی شد. هاله ی عدم رشد بزرگتر از ۸ میلی متر برای کلیندامایسین و هاله ی عدم رشد بزرگتر از ۳۲ میلی متر برای نالیدیکسیک اسید به عنوان مقاومت در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی gyr A

پرایمر	توالی (5′ to 3′)	Reference
GZgyrA4	R: CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG	(۱۸)
GZgyrA5	F: ATT TTT AGC AAA GAT TCT GAT	
GZgyrA6	R: CCA TAA ATT ATT CCA CCT GT	
GZgyrA7	F: TTA TTA TAG GTC GTG CTT TG	
GZgyrA8	R: TAG AAG GTA AAA CAT CAG GTT	
CampyMAMAgryA1	F: TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT	
CampyMAMAgyrA5 (mutation detection primer)	R: CAA AGC ATC ATA AAC TGC AA	



CIP = Ciprofloxacin, E = Erythromycin, T = Tetracycline, CM = Clindamycin, NAL = Nalidixic acid GEN = Gentamicin, AMP = Ampicillin

نمودار ۱: میزان فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در *کمپیلوباکترهای* جداشده از نمونه های مدفوع

همچنین تعیین حساسیت به دو آنتی بیوتیک جنتامایسین (Canada-BioBasic) و آمپی سیلین (Germany-Biochemica) با روش رقت در آگار انجام شد. بدین منظور محیط مولر هینتون آگار خوندار (۵ درصد خون گوسفند) حاوی غلظت های متوالی از دو آنتی بیوتیک جنتامایسین (۲-۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) وآمپی سیلین (۴-۶۴ میکروگرم در میلی لیتر) تهیه و به محیط ها معادل نیم MacFarland از کشت تازه ی باکتری تلقیح شد. پلیت ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

بر اساس دستوالعمل CLSI سویه‌های دارای هاله ی رشد بزرگتر از۳۲ میکروگرم در میلی لیتر برای آنتی بیوتیک جنتامایسین و بزرگتر ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر برای آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاوم و کمتر از آن حساس در نظر گرفته شدند.(۱۵)

بررسی موتاسیون ژنی (gyrA)

DNA جدایه های *کمپیلوباکتر ژوژنی* مقاوم به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین با روش جوشاندن استخراج شد. با به کار گیری آزمایش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۲) ابتدا تایید وجود *کمپیلوباکترژژونی* با استفاده از پرایمرهای (CampyMAMAgryA1) و (GZgyrA4) و سپس بررسی موتاسون gyrA با پرایمرهای (CampyMAMAgryA1) و (CampyMAMAgyrA5) انجام شد. محصول PCR پس از انجام الکتروفورز از نظر حضور باندهای مورد نظر، بررسی شدند.

یافته ها:

در مطالعه حاضر، ۴۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهر تهران، بر اساس معیارهای ورود مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. از این تعداد ۴۱ درصد نمونه ها (۱۶۴ نفر) زن و ۵۹ درصد (۲۳۶ نفر) مرد گزارش گردید که کمترین آنها ۲۱ روزه و بیشترین ۸۲ ساله بودند (جدول ۳). وجود عفونت انگلی و قارچی در هیچیک از نمونه های اسهالی به تایید نرسید. با استفاده از روش فنوتیپی تعداد ۲۸ عدد *کمپیلوباکتر* به عنوان عامل عفونت در محیط کشت جداسازی شد. همچنین بر اساس روش های مولکولی به منظور تایید جدایه های مشکوک، میزان فراوانی گونه های *کمپیلوباکتر ژژونی*، *کولی* و *لاری* به ترتیب ۶ درصد (۲۴ نفر)، ۰/۵ درصد (۲ نفر) و ۰/۲۵ درصد (۱ نفر) گزارش شد (جدول ۳). در یک مورد گونه باکتری مشخص نشد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به گونه ی *کمپیلوباکتر ژژونی* در میان بالغین بود. همچنین آلودگی با این باکتری اختلاف معناداری را در میان خانم ها و آقایان نشان نداد (p value > 0.05).

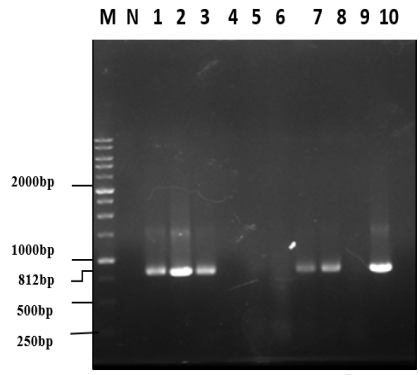
بررسی ارتباط بین جداسازی *کمپیلوباکتر* و اشکال مرفولوژیک نمونه های مدفوع تحت مطالعه نشان داد که ۸۱ درصد جدایه های *کمپیلوباکتر* از نمونه های Loose، ۱۶ درصد اسهالی و ۲ درصد از نمونه های دچار اسهال خونی جدا شده بودند. مقایسه اشکال مورفولوژیک نمونه های مدفوع تحت بررسی و ارتباط آن ها با آلودگی به *کمپیلوباکتر* مؤید بالاتر بودن جداسازی این باکتری در نمونه های Loose در مقایسه با سایر اشکال مورفولوژیک بود. بررسی فراوانی کمپیلوباکتر در نمونه های مدفوع بیماران دارای اسهال التهابی (حضور موکوس و اپی تلیال سل و سلول های ایمنی) در مقایسه با نمونه های غیر التهابی اختلاف معنا داری را نشان نداد (p value > 0.05). در مجموع ۴۱ درصد نمونه های تحت بررسی التهابی و ۵۸ درصد این نمونه ها غیر التهابی بودند. مقایسه نتایج کشت میان نمونه های بیماران دچار اسهال التهابی در مقایسه با نوع غیر التهابی اختلاف معناداری را از نظر عفونت *کمپیلوباکتر* نشان نداد (۴۰/۷ درصد در مقایسه با ۵۹/۳ درصد). فراوانی مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسیکلین، اریترومایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، آمپی سیلین و جنتامایسین به ترتیب ۵۳/۵ درصد، ۳۹/۲ درصد، ۳۹/۲ درصد، ۲۸/۵ درصد، ۲۸/۵ درصد، ۵۰ درصد و ۳۲/۱ درصد بود. بررسی نتایج مقاومت دارویی در جدایه های *کمپیلوباکتر* نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین در مقایسه با سایر آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه بیشتر بود. ۲۸/۵ و ۳۹/۲ درصد مقاومت مشابهی نسبت به نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین، اریترامایسین در مدفوع انسانی دیده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: فراوانی آلودگی به گونه های مختلف *کمپیلوباکتر* در جنس و سن های مختلف بیماران

متغیر		*C.jejuni* تعداد (٪)	*C.coli* تعداد (٪)	*C. lari* تعداد (٪)	*C. upsaliensis* تعداد (٪)	Other species تعداد (٪)
جنس	زن (n = 400)	9(2.25%)	2(0.5%)	1(0.25%)	-	-
	مرد (n = 400)	15(3.75%)	-	-	-	1(0.25%)
سن	1 > سال (n = 35)	2(3.7%)	1(1.8%)	-	-	-
	2-9 سال (n = 36)	5(13.8%)	-	-	-	-
	10-19 سال (n = 17)	1 (5.8%)	-	-	-	1 (5.8%)
	19 < سال (n = 249)	16(5.4%)	1(0.3%)	1(0.3%)	-	-
شکل موفولوژیک نمونه	اسهال آبکی (n = 65)	4(6.1%)	1(1.5%)	-	-	-
	اسهال شل (n = 320)	20(6.25%)	1(0.3%)	1(0.3%)	-	1(0.3%)
	اسهال خونی (n = 9)	-	-	-	-	-



چاهک های ۲-۱۰ مربوط به نمونه، چاهک ۱:کنترل مثبت، N: کنترل منفی، M: DNA Ladder

شکل ۱: تکثیر ژن 16S rRNA جهت شناسایی جنس *کمپیلوباکتر*

بحث:

گونه های کمپیلوباکتر به عنوان عوامل مولد در شیوع بیماری ها و موارد اسپورادیک اسهال و عفونت های دستگاه گوارش در سراسر جهان شناخته شده هستند. در گزارشی که اخیراً توسط مطالعات جهانی Multicentre Global Enteric ارائه شده است، *کمپیلوباکتر* را به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال در کشورهای در حال توسعه معرفی کرده است.(۲۲) مطالعه حاضر در قالب یک مطالعه مقطعی به بررسی فراوانی جنس *کمپیلوباکتر* در نمونه های مدفوع بیماران سرپایی دچار گاستروانتریت، تعیین مهم ترین گونه های باکتریایی مرتبط و مقاومت دارویی جدایه ها در دو جمعیت بالغین و کودکان پرداخته است.

بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، *کمپیلوباکتر ژوژنی* با میزان فراوانی ۶ درصد بیشترین گونه ی جدا سازی شده از بیماران بود. شهیدی و همکاران موفق به شناسایی ۶/۴٪ آلودگی *کمپیلوباکتر ژژونی* در کودکان دچار اسهال حاد در شیراز شدند.(۲۳) مطالعه قربانعلی زادگان و همکاران نیز، *کمپیلوباکتر ژوژنی* فراوانترین گونه جداسازی شده بود. به طوری که از میان ۷۵۰ نمونه گرفته شده از بیماران مبتلا به اسهال باکتریایی، ۳۱ مورد *کمپیلوباکتر ژژونی* (۹۴درصد) و ۲ مورد کمپیلوباکتر کولی (۶ درصد) شناسایی گردید.(۲۴) به نظر می رسد حجم نمونه گرفته شده و همینطور زمان نمونه گیری از جمله دلایل تفاوت نتایج دو مطالعه باشد.

شمس و همکاران در بررسی ۵۸ کودک با علایم گاستروانتریت، آلودگی به *کمپیلوباکتر* را ۹ مورد (۱۶ درصد) گزارش کردند که از این میان تعداد ۸ جدایه *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۱ جدایه *کمپیلوباکتر کولی* بودند.(۲۵) دیوسالار و همکاران از میان ۷۴ نفر از افراد مشکوک به اسهال عفونی ۲۰ نمونه (۲۷ درصد) از نظر *کمپیلوباکتر ژژونی* مثبت گزارش کردند.(۲۶)

در مطالعه حاضر، ۷ درصد از بیماران مبتلا به گاستروانتریت دچار عفونت *کمپیلوباکتر* بودند. این یافته با نتایج مطالعه ی رحیمی و همکاران(۲۷)، (۷/۸درصد)، مطابقت دارد اما در مقایسه با مطالعه ی ضیایی و همکاران (۱/۷ درصد) افزایش قابل توجهی نشان می دهد که این اختلاف می تواند به علت نوع روش بکار گرفته شده در تشخیص باکتری باشد.(۲۸)

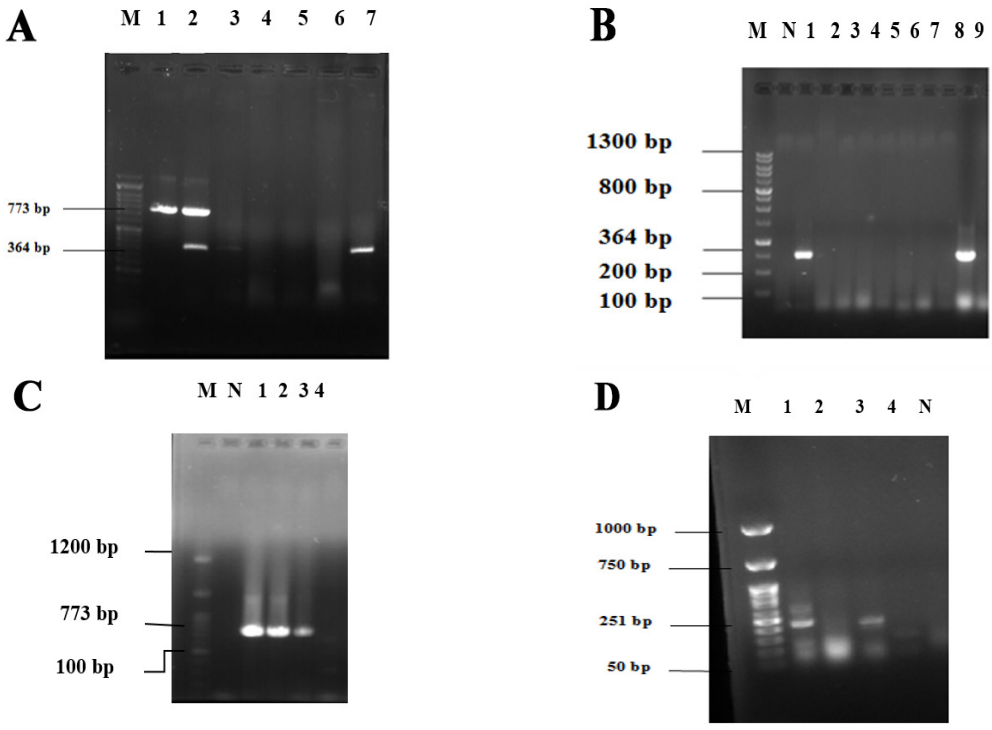
مسئله مقاومت آنتی بیوتیکی به نگرانی جهانی در خصوص بهداشت عمومی تبدیل شده است اگر چه این مسئله در کشورهای در حال توسعه به دلیل مصرف گسترده و کنترل نشده از عوامل ضد میکروبی به سرعت رو به وخامت است.(۲۹، ۳۰) در مطالعه حاضر، میزان مقاومت ۲۸ گونه *کمپیلوباکتر* جداسازی شده در برابر ۷ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، گونه های *کمپیلوباکتر* بیشترین درصد مقاومت را به تتراسایکلین (۵۳/۵ درصد) و کمترین درصد مقاومت را به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید (۲۸/۵ درصد) داشتند. هرچند سازمان جهانی بهداشت[1] استفاده از جنتامایسین را به عنوان یک جایگزین در موارد سپسیس و باکتریمی در نوزادان توصیه نموده است(۳۱)، اما استفاده طولانی مدت از جنتامایسین می تواند منجر به اختلالات کلیوی در کودکان شود (۳۲). این در حالی است که در مطالعه اخیرگونه های *کمپیلوباکتر* میزان مقاومت به جنتامایسین ۳۲/۱ درصد گزارش شد.

در مطالعه ای که در آفریقا جهت بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

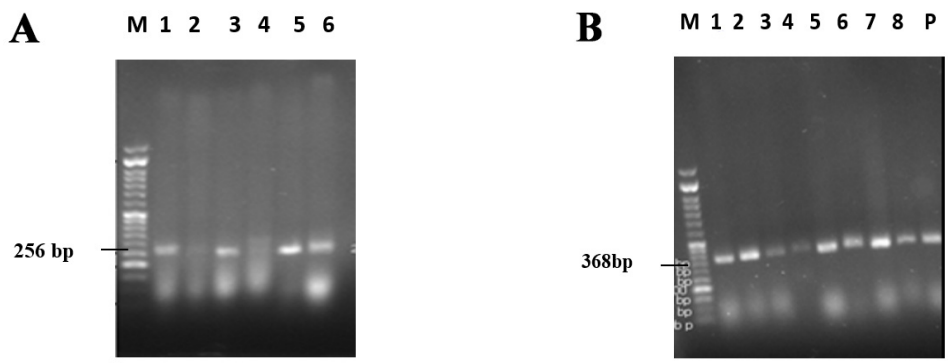
1. World Health Organism

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: A: مالتیپلکس PCR جهت تعیین همزمان ژن های cj0414 و Ask. تصویر B: تکثیر ژن ask جهت شناسایی گونه ی *کمپیلوباکتر کولی*؛ تصویر C: تکثیر ژن cj0414 جهت شناسایی گونه ی *کمپیلوباکتر ژژونی*؛ تصویر D: تکثیر ژن glyA جهت شناسایی گونه ی *کمپیلوباکتر لاری*



شکل ۳: A: تعیین حضور ژن مقاومت در نمونه؛ تصویر B: کنترل ژن های تعیین گر موتاسیون ACA –> ATA

بر روی نمونه های مدفوع با روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، اریترامایسین و تتراسایکلین به ترتیب ۱۳/۸ و ۱۰/۳ درصد و نالیدیکسیک اسید ۲۴ درصد بود که نسبت به مطالعه ما کمتر می باشد.(۳۳) همچنین در مطالعه دیگری میزان شیوع مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین را در میان جدایه های بالینی *کمپیلوباکتر ژژونی* ۲۴/۲ درصدگزارش شدکه تقریبا مشابه نتایج مطالعه کنونی (۲۸درصد) است.(۳۴) با توجه به شیوع فزاینده مقاومت فلوئوروکینولون در گونه های *کمپیلوباکتر*، ماکرولیدها داروی جایگزین انتخابی برای درمان *کمپیلوباکتریوزیس* انسان بودند.(۳۵) بروز مقاومت *کمپیلوباکتر* در برابر ماکرولیدها در جدایه های بالینی قبلاً نادر بود، به ویژه در کشورهای توسعه یافته (۳۶)، با این حال، گزارش های اخیر از نقاط مختلف جهان نشان می دهد که گونه های *کمپیلوباکتر* مقاومت در برابر این دسته از آنتی بیوتیک ها را به دست آورده است. در مطالعه حاضر میزان مقاومت در برابر ماکرولید ها ۳۹/۲ درصد بود. مطالعات قبلی در آفریقای جنوبی حداکثر ۵۳ درصد مقاومت در برابر ماکرولیدها را نشان داده است.(۱۵, ۳۷) یک مطالعه در کانادا میزان مقاومت در برابر تتراسایکلین را در بین جدایه های *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۳۹ درصد گزارش نمود(۳۸)، که کمتر از میزان گزارش شده در مطالعه حاضر بود (۵۳/۵

www.SID.ir

Archive of SID

درصد). در مطالعه حاضر خطر بالقوه بالایی از شکست درمان در عفونت *کمپیلوباکتر* نشان داده شد که بر نظارت بر مصرف یا تجویز آنتی بیوتیک و تلاش برای استراتژی های جایگزین جهت درمان عفونت های باکتریایی تاکید می کند فنوتیپ مقاومتی MDR، خصوصاً در مورد ماکرولیدها، فلوئوروکینولون ها و تتراسایکلین ها یک نگرانی قابل توجه است و در *کمپیلوباکتر* بسیار نگران کننده تلقی می شود، زیرا این سه کلاس به طور کلی به عنوان داروهای سطح اول برای درمان انتریت ناشی از *کمپیلوباکتر* در نظر گرفته می شوند.(۳۹)

در قطر، امارات متحده عربی، MDR از ۶/۳ درصد از سویه های *کمپیلوباکتر* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال خونی گزارش شد.(۴۰)

جهش C257T (Thr-86-Ile) به عنوان اصلی ترین مکانیسم مقاومت در مقاومت به کوئینولون معرفی شده است (۱۸, ۴۱) در این مطالعه، جهش (Thr-86-Ile) C257T در ژن gyrA برای همه جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین اهمیت آماری قابل توجهی را نشان داد (p value = < 0.001) .

این یافته مشابه سایر مطالعات است که نشان دهنده اهمیت افزایش مقاومت است.(۴۴-۴۲) در مطالعه ی کویی[1] و همکاران با هدف شناسایی یک روش سریع جهت تشخیص موتاسیون تک نوکلئوتیدی (C-257 to T) در ژن gyrA، ۷۸ سویه *کمپیلوباکتر ژژونی* دارای مقاومت به فلوروکینولون با روش (MMAMA-PCR[2]) تایید شدند و به این نتیجه رسیدند که یک روش امیدوار کننده برای شناسایی سریع *کمپیلوباکتر ژژونی* با جهش خاص در ژن gyrA که مسئول مقاومت در برابر فلوروکینولون ها است می باشد.(۴۵)

مطالعه ی سعید[3]، ۱۱۸ سویه *کمپیلوباکتر* را از نظر حضور ژن gyrA باروش MAMA PCR مورد بررسی قرار دادند. مقاومت سویه ها با روش E-test برای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین انجام شد. در ۸۹ جدایه *کمپیلوباکتر ژژونی* مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید جهش تشخیص داده شد. ۱۱ جدایه حساس توسط پرایمرهای MAMA شناسایی نشدند. نتایج، ۱۰۰ درصد سازگاری MAMA PCR و نتایج MIC و تجزیه و تحلیل توالی ژن gyrA را تایید کرد و به عنوان یک روش سریع برای غربالگری مقاومت به فلوروکینولون ها معرفی شد.(۴۶)

این نتایج با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. یکی از مزایای MAMA PCR نسبت به سایر روش های شناسایی تغییرات در gyrA، تشخیص سریع ژنوتیپ تغییر یافته و قابلیت اطمینان به نتایج است.

در مطالعه ی دیگری، ۲۲۰ نمونه برروی محیط CCD agar کشت داده شدند و با روش Multiplex PCR تایید شدند. طبق استانداردهای EUCAST MIC، با استفاده از میکرودایلوشن براث برای تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، نالیدکسیک اسید، کانامایسین، جنتامایسین و اریترومایسین انجام شد که در ۹۸ سویه *کمپیلوباکتر ژژونی* میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۸۷/۸ و نالیدیکسیک اسید ۸۱/۶ درصد و نسبت به اریترامایسین و جنتامایسین حساس بودند. جهش (Thr-86-Ile) C257T در ژن gyrA از کلیه جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید با روش PCR (MAMA-PCR) تشخیص داده شد و ۱۰۰ درصد منطبق بود.(۴۷) روش ما نیز در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی طبق استاندارد WHO بود و نتایج درصد مقاومت به اریترامایسین و جنتامایسین را ۳۷/۱ و ۳۱/۴ درصد نشان داد. مقاومت به ماکرولیدها به خصوص اریترامایسین در اکثر کشورهای جهان هم در مورد *کمپیلوباکتر کولی* و هم *کمپیلوباکتر ژژونی* از منابع انسانی، ماکیان و منابع حیوانی به طور گسترده ای وجود دارد.

نتیجه گیری:

کنترل و پیشگیری از *کمپیلوباکتریوزیس* در انسان نیاز به دانش در مورد راه های انتقال و مقاومت به آنتی بیوتیک ها دارد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، حضور سه گونه *کمپیلوباکتر* (*ژژونی، کولی، لاری*) را در نمونه مدفوع مبتلایان به گاستروانتریت ناشی از جامعه نشان داد. وجود درجات مختلفی از مقاومت به آنتی بیوتیک ها، به ویژه در مورد داروهای خط اول درمان تجربی مورد استفاده در درمان عفونت *کمپیلوباکتر*، اجرای مطالعات نظام مراقبت را در این حوزه مورد تاکید قرار نشان میدهد.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارضی در میان نویسندگان وجود ندارد.

1. Cui M
2. multiplex-mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction
3. Said MM

REFERENCES:

1. Li Y, Zhang S, He M, Zhang Y, Fu Y, Liang H, et al. Prevalence and molecular characterization of Campylobacter spp. isolated from patients with diarrhea in Shunyi, Beijing. *Front Microbiol* 2018;9:52.
2. Young DM, Biao J, Zheng Z, Hadler J, Edberg SC. Isolation of Campylobacter jejuni in Hunan, the People's Republic of China: Epidemiology and comparison of Chinese and American methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;5:143-9.
3. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of Campylobacter infection. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:687-720.
4. Islam Z, van Belkum A, Wagenaar J, Cody A, de Boer A, Sarker S, et al. Comparative population structure analysis of Campylobacter jejuni from human and poultry origin in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:2173-81.
5. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental Campylobacter jejuni infection in humans. *J Infect Dis* 1988;157:472-9.
6. Ruiz-Palacios GM. The health burden of Campylobacter infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clin Infect Dis* 2007;44:701-3.
7. Van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain–Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* 2014;10:469.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Whiley H, Van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10:5886-907.
9. Acheson D, Allos BM. Campylobacter jejuni infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-6.
10. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2002;8:237-43.
11. Hatanaka N, Shimizu A, Somroop S, Li Y, Asakura M, Nagita A, et al. High prevalence of Campylobacter ureolyticus in stool specimens of children with diarrhea in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2017;70:455-7.
12. Perez-Boto D, Herrera-León S, Garcia-Pena F, Abad-Moreno J, Echeita M. Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among Campylobacter isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol* 2014;43:176-82.
13. Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2014;170:1-9.
14. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014;22:438-45.
15. Shobo CO, Bester LA, Baijnath S, Somboro AM, Peer AK, Essack SY. Antibiotic resistance profiles of Campylobacter species in the South Africa private health care sector. *J Infect Dev Ctries* 2016;10:1214-21.
16. Dingle KE, Colles FM, Ure R, Wagenaar JA, Duim B, Bolton FJ, et al. Molecular characterization of Campylobacter jejuni clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg Infect Dis* 2002;8:949.
17. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. Campylobacter species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:555-67.
18. Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin Resistance in Campylobacter jejuniIsolates: Detection of gyrA Resistance Mutations by Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and DNA Sequence Analysis. *J Clin Microbiol* 1999;37:3276-80.
19. Buchan BW, Olson WJ, Pezewski M, Marcon MJ, Novicki T, Uphoff TS, et al. Clinical evaluation of a real-time PCR assay for identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (Campylobacter jejuni and C. coli), and Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2013;51:4001-7.
20. Rozynek E, Dzierzanowska-Fangrat K, Jozwiak P, Popowski J, Korsak D, Dzierzanowska D. Prevalence of potential virulence markers in Polish Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol* 2005;54:615-9.
21. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, et al. Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *J Med Microbiol* 2007;56:1467-73.
22. Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health* 2015;3:564-75.
23. Aminshahidi M, Arastehfar A, Pouladfar G, Arman E, Fani F. Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella with high rate of extended-spectrum Beta-lactamase production: two predominant etiological agents of acute diarrhea in Shiraz, Iran. *Microb Drug Resist* 2017;23:1037-44.
24. Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Shams S, Najar-Peerayeh S. Pulsed-field gel electrophoresis fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains isolated from clinical specimens, Iran. *Int Microbiol* 2019:22:391-8.
25. Shams S, Bakhshi B, Nikmanesh B. Designing a rapid and accurate method for transportation and culture of the Campylobacter jejuni and Campylobacter coli-fastidious bacteria in the children with bacterial gastrointestinal symptoms. *Koomesh* 2016;18:71-8.
26. Divsalar G, Kaboosi H, Khoshbakht R, Shirzad-Aski H, Ghadikolaii FP. Antimicrobial Resistances, and Molecular Typing of Campylobacter jejuni Isolates, Separated from Food-Producing Animals and Diarrhea Patients in Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2019;65:194-200.
27. Rahimi M, Alam B, Musavi L, Adimi P, Tayebi Z, Masumi M. Evaluation of patients with bloody diarrhea than infection with Campylobacter jejuni. *Med Sci J Islam Azad Uni* 2010;3:212-5.
28. Ziaie N, Mozafari N, Kuhsari H, Moradi A, Tabrai A, Dadgar T. Distribution of campylobacter in diarrheal samples in Gorgan city. *J Lab Sc* 2009;2:63-9.
29. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:232-60.
30. Ghosh R, Uppal B, Aggarwal P, Chakravarti A, Jha AK. Increasing antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni isolated from paediatric diarrhea cases in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *J Clin Diagn Res* 2013;7:247-9.
31. Fuchs A, Bielicki J, Mathur S, Sharland M, Van Den Anker JN. Reviewing the WHO guidelines for antibiotic use for sepsis in neonates and children. *Paediatr Int Child Health* 2018;38:S3-S15.
32. McWilliam SJ, Antoine DJ, Smyth RL, Pirmohamed M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. *Pediatr Nephrol* 2017;32:2015-25.
33. Sangaré L, Nikiéma A, Zimmermann S, Sanou I, Congo-Ouédraogo M, Diabaté A, et al. Campylobacter Spp. epidemiology and antimicrobial susceptibility in a developing country,

www.SID.ir

Archive of SID

Burkina Faso (West Africa). *African J Clin Experiment Microbiol* 2012;13:110-7.

34. Engberg J, Neimann J, Nielsen EM, Aarestrup FM, Fussing V. Quinolone-resistant Campylobacter infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1056.
35. Bolinger H, Kathariou S. The current state of macrolide resistance in Campylobacter spp.: trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 2017;83:e00416-17.
36. Alonso R, Mateo E, Churruca E, Martinez I, Girbau C, Fernández-Astorga A. MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains. *J Microbiol Methods* 2005;63:99-103.
37. Samie A, Ramalivhana J, Igumbor E, Obi C. Prevalence, haemolytic and haemagglutination activities and antibiotic susceptibility profiles of Campylobacter spp. isolated from human diarrhoeal stools in Vhembe District, South Africa. *J Health Popul Nutr* 2007;25:406-13.
38. Guévremont E, Nadeau É, Sirois M, Quessy S. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic Campylobacter from humans, swine, and chicken broilers. *Can J Vet Res* 2006;70:81-6.
39. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, and C. fetus subsp. fetus. *J Clin Microbiol* 2002;40:4744-7.
40. Ghunaim H, Behnke JM, Aigha I, Sharma A, Doiphode SH, Deshmukh A, et al. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in Campylobacter isolates from patients with severe diarrhoea. *PloS One* 2015;10:e0119268.
41. Zirnstein G, Helsel L, Li Y, Swaminathan B, Besser J. Characterization of gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in Campylobacter coli by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2000;190:1-7.
42. EFSA C. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA* 2010;8:1-370.
43. El-Adawy H, Hotzel H, Düpre S, Tomaso H, Neubauer H, Hafez HM. Determination of antimicrobial sensitivities of Campylobacter jejuni isolated from commercial turkey farms in Germany. *Avian Dis* 2012;56:685-92.
44. Hungaro HM, Mendonça RCS, Rosa VO, Badaró ACL, Moreira MAS, Chaves JBP. Low contamination of Campylobacter spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control* 2015;51:15-22.
45. Cui M, Wu C, Zhang P, Wu C. Development of multiplex-mismatch amplification mutation-PCR assay for simultaneous detection of Campylobacter jejuni and mutation in gyrA gene related to fluoroquinolone resistance. *Foodborne Pathog Dis* 2016;13:642-5.
46. Said MM, El-Mohamady H, Fawkia M, Rockabrand DM, Ismail TF, Monteville MR, et al. Detection of gyrA mutation among clinical isolates of Campylobacter jejuni isolated in Egypt by MAMA-PCR. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:546-54.
47. Adiguzel MC, Sigirci BD, Celik B, Kahraman BB, Metiner K, Ikiz S, et al. Phenotypic and genotypic examination of antimicrobial resistance in thermophilic Campylobacter species isolated from poultry in Turkey. *J Vet Res* 2018;62:463-8.

www.SID.ir