Archive of SID

کومش- جلد ۱۸، شماره ۱ (پیاپی ۶۱)، پائیز ۱۳۹۵

راحی یک ش سریع دقیق رای انتقا کشت باکتری‌های رشد کمپیا اکتر ژونی کمپیا اکتر کلی کان دارای ژن گاستروانتریت اکتریایی

سعید شمس [۱](Ph.D Student)، بی‌تا بخشی [۱*](Ph.D)، بهرام نیک‌منش [۲و۳](Ph.D)

۱- گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات ژنوتوز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

ا یقه و هدف: گونه‌های کمپیا اکتر حامل ژن ارد گاستروانتریت اکتریایی ا ان کمپیا باکتریوز ر تا جهان می‌باشند. ا تلا ات مهم بعد از این عفونت سندرم گیلن ا و آرتریت اکنشی می‌باشند. علی غم اهمیت عفونت جداسازی این باکتری‌های شد در آزمایشگاه‌های الینی انجام نمی‌شود هدف از این مطالعه راحی یک محیط انتقالی تغییریافته ا mCCDA ارزیابی ده ماندن باکتری، بهینه سازی شرایط کشت انجام Duplex-PCR وی کلنی‌ها نمونه‌های ستقیم فوع و مقایسه نتایج با کشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۸ سویه کوک به کمپیا اکتریوز ا مطالعه شدند. نمونه‌های فوع عمق محیط انتقالی تغییریافته ا mCCDA قرار گرفتند سپس به آزمایشگاه انتقال کشت از محیط انتقالی روی و محیط mCCDA آگار هر ۲۴ ات و تا ۷ انجام شد و پلیت‌ها تا ۷۲ ا ت برای رشد باکتری ورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. Duplex-PCR ستقیم وی کلنی‌ها نمونه‌های فوع نیز انجام شد.

یافته‌ها: تعداد باکتری‌های ایزوله شده در این مطالعه ۹ مورد (۱۵/۶٪) که بعد از ۴۸ تا ۷۲ ت روی محیط‌های کشت انتقالی مشاهده بودند. هم چنین ا استفاده از Duplex-PCR وی کلنی‌ها تعداد ۸ ایزوله کمپیا اکتر ژونی و ۱ ایزوله کمپیا اکتر کلی تائید شد. نتایج Duplex-PCR ستقیم روی نمونه بیماران نتایج کشت نیز ا هم یکسان بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روش ارائه شده در این مطالعه با حساسیتی ا ر با PCR ب برای جداسازی گونه‌های کمپیا اکتر می‌باشد به نظر می ا استفاده از این محیط انتقالی تغییریافته بهینه سازی شرایط کشت می‌تواند این باکتری‌های شد را بهتر از محیط انتقالی پایه ایزوله نماید.

واژه‌های کلیدی: کمپیا اکتر ژونی، کمپیا اکتر کلی، کری-بلیر، Duplex-PCR، گاستروانتریت

مقدمه

کمپیلوباکتر یک باکتری گرم منفی، متحرک و خمیده یا مارپیچی بوده و به شکل‌های S و یا V دیده می‌شود. خانواده کمپیلوباکتریاسه‌آ دارای دو جنس کمپیلوباکتر و آرکوباکتر است. جنس کمپیلوباکتر بیش‌ترین موارد گاستروانتریت را در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه به خود اختصاص داده و بیماری کمپیلوباکتریوزیز را ایجاد می‌کند. در میان جنس کمپیلوباکتر، بیش‌ترین موارد شیوع مربوط به گونه‌های

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۵۵۸ ۰۲۱

Email: b.bakhshi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

کمپیلوباکتر ژژونی (۹۰٪) و کمپیلوباکتر کلی (۱۰٪) می‌باشد. دیگر گونه‌ها مثل *C. lari*، *C. upsaliensis*، *C. fetus* و *C. hyointestinalis* به صورت اسپورادیک گزارش شده‌اند. این بیماری یک بیماری زئونوز بوده و عمده راه انتقال آن به انسان از طریق مصرف آب، سبزیجات و غذاهای آلوده شده (از جمله گوشت گاو، خوک، پرندگان و شیر پاستوریزه نشده) می‌باشد [۱-۳].

به دلیل مقاومت باکتری به اسیدیته معده و نمک‌های صفراوی، حداقل دوز عفونی کمپیلوباکتر ژژونی برای انسان حدود ۵۰۰ سلول می‌باشد. دوره کمون بیماری ۵-۲ روز بوده و علائم گوارشی شامل اسهال (که ممکن است خونی باشد)، سردرد، تهوع و استفراغ، کرامپ، دردهای شکمی (که ممکن است شدید بوده و علائم آپاندیسیت را تقلید کند)، التهاب کیسه صفرا و تب دیده می‌شود. هم‌چنین کمپیلوباکتر ژژونی می‌تواند باکتریمی، منتژیت و سقط جنین نیز ایجاد نماید. اگر چه معمولاً بیماری بعد از چند روز خود محدود شونده بوده ولی ممکن است تا چندین هفته نیز به طول بی‌انجامد [۴-۷].

از جمله موارد مهم پس از عفونت با برخی سویه‌های کمپیلوباکتر، آرتریت واکنشی غیرعفونی که بیش‌تر در افراد دارای HLA-B27 دیده شده و یک بیماری اتوایمیون به نام سندرم گیلن‌باره (Guillain-Barree syndrome) اشاره نمود که به ترتیب حدود ۱٪ و ۰/۱٪ از موارد پس از عفونت را به خود اختصاص می‌دهند. در سندرم گیلن‌باره شامل Miller-Fisher و Acute Motor Axonal Neuropathy آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن O19 باکتری با گانگلیوزیدهای سطحی اعصاب محیطی واکنش متقاطع داشته که منجر به تخریب غلاف میلین می‌شود [۹،۸].

اگرچه عفونت با کمپیلوباکتر عمدتاً غیر کشنده است ولی گزارشاتی از مرگ بیماران نیز وجود دارد به گونه‌ای که حدود ۱۰۰ نفر هر ساله در آمریکا بر اثر عفونت با کمپیلوباکتر جان خود را از دست می‌دهند. آمارها نشان می‌دهد که میزان شیوع این باکتری خصوصاً در بچه‌های زیر ۵ سال در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بالا بوده و حتی شیوع بالاتر از شیگلوز را نیز نشان می‌دهد [۴،۱۰،۱۱].

به دلیل این‌که تظاهرات کلینیکی بیماری شبیه به آلودگی با دیگر باکتری‌های روده‌ای است، تشخیص کمپیلوباکتریوزیز از روی علائم بالینی به تنهایی مقدور نیست و با توجه به اهمیت آن تعیین آزمایشگاهی عفونت بسیار مهم به نظر می‌رسد.

روش‌های مختلفی برای تشخیص بیماری وجود دارد که می‌توان به هیبریداسیون فلورسنت In Situ، آگلوتیناسیون لاتکس و ایمنواسی اشاره نمود که متاسفانه این روش‌ها دارای حساسیت متغیر بوده و به‌دلیل پرهزینه بودن در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده نمی‌شوند. از روش‌های تشخیصی دیگر، روش‌های ملکولی هستند که شاید بیش‌تر از روش‌های قبلی در آزمایشگاه‌ها دیده می‌شوند. در این میان معمول‌ترین روش ملکولی، PCR است که دارای حساسیت قابل قبولی می‌باشد. این روش دارای معایب مختلفی می‌باشد که می‌توان به استفاده از UV و اتیدیوم بروماید (به عنوان کارسینوژن‌ها) در مرحله بعد از PCR (Post-PCR)، وجود مهارکننده‌ها در نمونه بالینی (نتیجه منفی کاذب) و آلودگی با اسید نوکلئیک از واکنش‌های قبلی (نتیجه مثبت کاذب) اشاره نمود. هم‌چنین اگر چه اختصاصیت PCR توسط باندهای مشاهده شده در مرحله الکتروفورز تائید می‌شود ولی اختصاصیت بیش‌تر نیاز به انجام هیبریداسیون به روش بلاتینگ محصولات PCR و یا PCR-ELISA دارد که هر دوی این روش پر هزینه و مشکل می‌باشد [۱۲-۱۴]. بر خلاف تمام روش‌های تشخیصی که در بالا گفته شد، روش مرسوم و در دسترس بیش‌تر آزمایشگاه‌های بالینی کشت می‌باشد. اگرچه کشت نیز دارای معایبی است ولی استاندارد طلایی برای تشخیص کمپیلوباکترها محسوب می‌شود. متاسفانه در بیش‌تر آزمایشگاه‌ها به‌دلیل سخت رشد بودن باکتری و عدم رعایت استانداردهای لازم در کشت آن، با وجود بیماری هم‌چنان به‌صورت منفی کاذب گزارش می‌شود. هدف از این مطالعه تغییر در محیط انتقالی کری‌بلیر، ارزیابی مدت زمان زنده ماندن باکتری در آن، بهینه‌سازی شرایط کشت و هم‌چنین انجام PCR مستقیم به

www.SID.ir

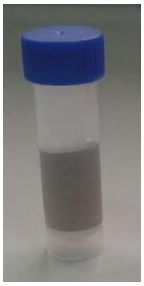
Archive of SID

عنوان یک روش با حساسیت بالا بر روی نمونه‌های مدفوعی و مقایسه حساسیت و ویژگی آن با نتایج کشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری. این مطالعه توصیفی- مقطعی از مرداد تا مهر ۱۳۹۴ انجام شد. از بین ۷۸۱ کودک دارای اسهال مراجعه‌کننده به مرکز طبی کودکان تهران، ۵۸ مورد (حدود ۷٪) مشکوک به کمپیلوباکتریوز و بدون سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک وارد مطالعه شدند. از بیماران پرسش‌نامه‌ای با مشخصات سن، علائم بالینی، استفاده از فراورده‌های لبنی غیر پاستوریزه، تماس با حیوانات و نتایج آزمایشگاهی نیز تهیه شد.

انتقال نمونه‌ها و کشت. در این مطالعه جهت انتقال نمونه‌ها از محیط کری‌بلیر – Micro Media (مجارستان) استفاده شد. بر اساس دستورالعمل ارائه شده در منابع، میزان آگار-آگار اضافه شده به محیط کری‌بلیر می‌بایست ۱/۶ گرم در لیتر به جای ۵ گرم در لیتر باشد [۱۵]. در این مطالعه به محیط فوق ۱/۶ گرم در لیتر آگار پایه Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar یا mCCDA (به جای آگار-آگار) و ۱۰ گرم در لیتر پیرووات سدیم اضافه شد (شکل ۱). نمونه‌های مدفوع با استفاده از سواب استریل در عمق محیط نیمه‌جامد مدیفای شده قرار گرفتند و تا زمان انتقال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس محیط‌های انتقالی دور از تغییرات دمایی و روی یخ خشک به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. نمونه‌ها بلافاصله بر روی محیط‌های mCCDA و بروسلا آگار (مرک-آلمان) حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند (بهار افشان-ایران) کشت داده شدند. محیط‌ها قبل از کشت چند دقیقه در بیرون از یخچال قرار گرفتند تا با شرایط آزمایشگاه هم دما شوند. به علاوه جهت انتخابی کردن هر دو محیط، آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم، سفوپرازون و آمفوتریسین B (ibresco- ایران) با غلظت‌های مشخص اضافه شد (جدول ۱) و سپس انکوباسیون پلیت‌ها در مجاورت گازپک C (مرک-آلمان) در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بلافاصله محیط‌های انتقالی کری‌بلیر مجدداً به داخل یخچال منتقل و تا ۷ روز کشت مجدد از آن‌ها به‌صورت روزانه بر روی محیط‌های انتخابی مذکور صورت می‌گرفت. پلیت‌های در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از نظر بررسی ظاهر کلنی و تائید مورفولوژی آن‌ها در رنگ‌آمیزی گرم با زمان بیش‌تر برای سافرانین مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند.



شکل ۱. محیط انتقالی کری بلیر تغییر یافته که به دلیل اضافه کردن آگار mCCDA کمی سیاه رنگ دیده می شود

جدول ۱. غلظت آنتی بیوتیک های (mg/L) استفاده شده در محیط‌ها

آنتی بیوتیک ها	محیط mCCDA	محیط بروسلا آگار
سدیم سفوپرازون	۳۲	۲۰
آمفوتریسین **B**	۱۰	۲
تری متوپریم	۸	۸

انجام Duplex-PCR مستقیم روی کلنی‌ها. بعد از تائید مورفولوژی باکتری‌ها، PCR مستقیم روی کلنی و بدون استخراج انجام شد. در این مرحله از پرایمرهای ارائه شده در مطالعه شمس و همکاران استفاده شد که دارای یک پرایمر مشترک F (Fu) و دو پرایمر متفاوت R (R1) و R2 بودند (جدول ۲) [۱۶]. این پرایمرها (ساخت TAG Copenhagen (Denmark) قادر بودند که در یک واکنش Duplex-PCR و بدون انجام PCR اضافه و هیچ تست بیوشیمیایی دیگری هر یک از دو باکتری کمپیلوباکتر ژژونی و کلی را در نمونه‌های بالینی شناسایی کنند. واکنش Duplex-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر دارای ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۱ میکرومولار از پرایمرها، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، یک

www.SID.ir

Archive of SID

کلنی باکتری و آب دیونیزه با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۱سیکل) جهت تخریب سلول‌های باکتریایی و سپس ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۴۳ درجه ۳۰ ثانیه (دمای اتصال پرایمرها)، ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه (۳۳ سیکل) و در مرحله آخر ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام شد. از سویه‌های C. jejuni ATCC 29428و C. coli ATCC 43478 به عنوان کنترل مثبت در واکنش استفاده شدند. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شدند.

جدول ۲. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

توالی پرایمر	ارگانیسم هدف	سایز قطعه
Fu: 5'- TTGAAGGTAATTTAGATATG-3'		
R1: 5'- TTTATTAACTACTTCTTTTG -3'	*C. coli*	461 bp
R2: 5′- ATATTTTTCAAGTTCATTAG -3'	*C. jejuni*	737 bp

آماده‌سازی نمونه‌ها، استخراج DNA و انجام Duplex-PCR مستقیم روی نمونه‌های مدفوع. برای آماده‌سازی مدفوع جهت استخراج DNA از روش ارائه شده در مقاله Yang و همکاران استفاده شد [۱۷]. به طور خلاصه حدود ۲۰ میلی‌گرم از مدفوع با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به دست آمده به تیوب جدید منتقل و سپس سانتریفیوژ مجدد در دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از آن، جهت حذف مهارکننده‌های PCR، رسوب سه بار با استون شستشو داده شد (هر مرحله سانتریفیوژ دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه). در مرحله آخر مایع رویی خارج و به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEB اضافه گردید. استخراج ژنوم با استفاده از روش جوشاندن به مدت ۱۵ دقیقه و سپس سانتریفیوژ g ۱۳۰۰۰ در ۱۰ دقیقه انجام شد. ژنوم‌ها تا انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش PCR مستقیم بر روی ژنوم مستقیم استخراج شده از مدفوع بیماران طبق شرایط توضیح داده شده در بالا (به‌جز سیکل اول در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه) انجام شد.

آنالیز آماری. با استفاده از PCR مستقیم مدفوع به عنوان یک روش با حساسیت بالاتر از کشت [۱۸]، درصد حساسیت و ویژگی نتایج کشت در این مطالعه با فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

Sensitivity = TP / (TP+FN)
Specificity = TN / (FP+TN)

نتایج

کودکان وارد شده به مطالعه میانگین سنی ۴/۰۷ سال را داشتند که از این میان، بیماران آلوده به کمپیلوباکتر دارای میانگین سنی ۳/۳ سال بودند. همه بیماران علائم بالینی شامل اسهال، تب، دل‌درد و دل‌پیچه را داشتند و حدود ۶۰٪ از آن‌ها نیز دارای حالت تهوع و استفراغ بودند. از بین بیماران آلوده به کمپیلوباکتر، فقط یک بیمار از آب غیر شرب استفاده کرده بود و مابقی هیچ سابقه‌ای از مصرف فراورده لبنی غیر پاستوریزه، تماس با حیوان و ... را نداشتند.

محیط انتقالی کری‌بلیر تغییریافته با mCCDA به خوبی توانست از رشد کمپیلوباکترها حمایت کند به این گونه که باکتری‌ها تا ۵ روز در این محیط زنده و قابل جداسازی بودند. هم‌چنین ارزیابی ماکروسکوپی و روزانه محیط‌ها (بعد از ۲۴ ساعت کشت از محیط انتقالی) رشد مبهمی از وجود کلنی‌های باکتری را نشان می‌داد ولی رشد واضح به‌صورت کلنی‌های ریز، کروی و پهن و در بعضی موارد شبیه یک قطره (Droplet-like) بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت به خوبی قابل مشاهده بودند (شکل ۲). در رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌ها نیز مورفولوژی S یا V به‌خوبی قابل مشاهده بود. مجموع کمپیلوباکترهای ایزوله شده در این مطالعه ۹ مورد (۱۶٪) بود که تقریباً هر کدام از محیط‌های کشت بروسلا آگار خوندار و mCCDA حدود ۵۰٪ در ایزولاسیون باکتری نقش داشتند. با انجام Duplex-PCR ۸ ایزوله کمپیلوباکتر ژژونی (۸۹٪) و ۱ ایزوله کمپیلوباکتر کلی (۱۱٪) شناسایی شد. هم‌چنین نتایج PCR بر روی نمونه‌های مستقیم مدفوع نتایج مشابهی را با کشت (۱۶٪) نشان داد (شکل ۳). با توجه به مقایسه نتایج

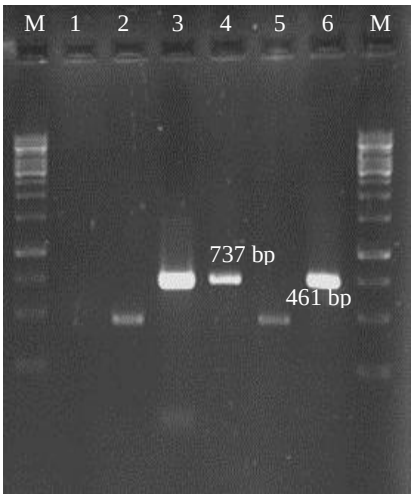
www.SID.ir

Archive of SID

کشت و PCR، حساسیت و ویژگی کشت در این مطالعه ۱۰۰ درصد تعیین شد.

به علاوه نتایج آزمایش مستقیم مدفوع نشان داد که بیش‌تر بیماران آلوده به C. jejuni دارای RBC و WBC بالا بودند ولی بیمار آلوده به C. coli در مطالعه ما هیچ RBC و WBC بالا در مدفوع آن دیده نشد و فقط بیمار دارای اسهال طولانی به مدت ۱ ماه بود.

شکل ۲: کلنی های کمپیلوباکتر ژژونی بعد از ۷۲ ساعت رشد بر روی محیط mCCDA



شکل ۳: Duplex PCR انجام شده بر روی نمونه ها. ستون های M مارکر 1Kb، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ کنترل مثبت سویه *C. coli* ATCC 43478، ستون های ۳، ۴ و ۶ نمونه های بالینی *C. jejuni*، ستون ۵ نمونه *C. coli*.

بحث و نتیجه‌گیری

کمپیلوباکتریوز یکی از عمده‌ترین بیماری‌های انتقالی از راه گوارشی در سرتاسر جهان می‌باشد. مخزن کمپیلوباکتر ژژونی و کلی به عنوان عوامل مهم ایجادکننده این عفونت، حیوانات اهلی و خصوصاً پرندگان می‌باشند. گزارشات مختلف از دیگر کشورها، شیوع رو افزایش کمپیلوباکتر را نشان می‌دهد. طبق آخرین گزارش از مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های اروپا، کمپیلوباکتریوز بیش‌ترین مورد بیماری زئونوز گزارش شده (با ۲۱۴۲۶۸ موارد انسانی تایید شده) در سال ۲۰۱۲ بوده است [۱۹].

در این مطالعه بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌های میکروسکوپی بیماران مثبت کمپیلوباکتریوز، مشخص شد که RBC و WBC در بیش‌تر آن‌ها بالا بوده ولی بر خلاف تصور برخی از آن‌ها نیز دارای RBC وWBC پایین بودند. لذا به نظر می‌رسد که همه نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه، می‌بایست از نظر تشخیص کمپیلوباکتر مورد بررسی قرار بگیرند. هم‌چنین از آن‌جا که همه بیماران آلوده و غیر آلوده به کمپیلوباکتر دارای تظاهرات بالینی مشابهی بودند، تشخیص آزمایشگاهی برای همه بسیار مهم به نظر می‌رسد.

همان‌گونه که در منابع ذکر شده، روش مرسوم برای تشخیص آزمایشگاهی کمپیلوباکتر، کشت می‌باشد. اگرچه کشت وقت‌گیر، پرهزینه بوده و تحت شرایط استرس ممکن است باکتری‌ها به سلول‌های زنده ولی غیرقابل کشت (Viable but non-culturable cells or VBNC) تبدیل شوند ولی هم‌چنان به عنوان استاندارد طلایی شناخته می‌شود [۲۰].

بر اساس منابع معتبر، کمپیلوباکتر ژژونی قادر است در مدفوع ۳ روز در دمای ۴ درجه و ۲ روز در دمای ۲۵ درجه پایدار بماند. هم‌چنین در محیط کری‌بلیر با آگار-آگار نیز می‌تواند پایداری مشابه‌ای با موارد فوق داشته باشد. بنابراین معمولاً نجام کشت بلافاصله بعد از نمونه‌گیری توصیه می‌شود [۱۵]. در مطالعه ما و با تغییرات اعمال شده و هم‌چنین بهینه‌سازی شرایط، توانستیم مدت زمان ایزولاسیون باکتری از

www.SID.ir

Archive of SID

محیط انتقالی مدیفای شده با mCCDA را به مدت ۵ روز افزایش دهیم. محیط mCCDA به عنوان یک محیط اختصاصی پایه در بیش‌تر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تحقیقاتی برای ایزولاسیون کمپیلوباکتر استفاده می‌شود. آگار پایه این محیط به دلیل داشتن ترکیباتی چون پپتون، شارکول، پیرووات سدیم و فروس‌سولفات با جذب فرم سمی اکسیژن (هیدروژن پراکساید) و ایجاد شرایط میکروآئروفیل باعث تقویت رشد کمپیلوباکتر می‌شود. هم‌چنین به دلیل دارا بودن دئوکسی کولات سدیم می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم مثبت و کلی فرم‌های ممانعت کند. در چنین شرایطی کمپیلوباکترهای حساس به راحتی می‌توانند در مجاورت با این ترکیبات از شرایط استرس و مواجهه با اکسیژن دور بوده و زنده بمانند [۲۱]. لذا محیط انتقالی ارائه شده در این مطالعه با فرمولاسیون mCCDA بسیار کارآمدتر از محیط‌های انتقالی پایه، توانست در همراهی با موارد زیر از رشد باکتری تا ۵ روز حمایت کند.

یکی دیگر از فاکتورهای مدنظر قرار گرفته در این مطالعه، رعایت شرایط محیطی مناسب شامل به حداقل رساندن نوسانات دمایی در حین انتقال، کشت و هم‌چنین عدم مواجهه با نور خورشید در زمان انتقال بود. تغییرات دمایی، خشکی و نور خورشید برای کمپیلوباکترها مناسب نبوده و باعث مرگ آن‌ها می‌شود. طبق منابع موجود، نمونه‌ها می‌بایست خیلی سریع بعد از انتقال به آزمایشگاه کشت داده شوند. هم‌چنین شرایط دمایی در آزمایشگاه برای افزایش درصد ایزولاسیون باکتری‌ها بسیار مهم است به گونه‌ای که اگر کشت در همان روز نمونه‌گیری قرار است انجام شود، می‌بایست محیط‌های انتقالی در دمای آزمایشگاه قرار گیرند ولی اگر کشت به روز بعد موکل شد، می‌بایست نمونه‌ها در یخچال نگهداری شوند [۲۲]. موارد بررسی شده در این تحقیق بلافاصله و بر روی یخ خشک و دور از نور مستقیم خورشید به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نیز تا حد امکان از نوسانات دمایی جلوگیری شد به گونه‌ای که حتی هم دما شدن محیط‌ها با دمای آزمایشگاه قبل از کشت از محیط انتقالی نیز مورد توجه قرار گرفت و توانست از تغییرات دمایی و شوک حرارتی جلوگیری کند.

فاکتور سوم ارائه شده در منابع جهت افزایش جداسازی باکتری، استفاده از دو یا بیش از دو محیط اختصاصی می‌باشد که می‌تواند به افزایش جداسازی باکتری به بیش از ۱۵٪ کمک فراوانی نماید. در این مطالعه از دو محیط انتخابی بروسلا آگار و mCCDA استفاده شد و طبق انتظار سهم هر یک از محیط‌های فوق در ایزولاسیون باکتری‌ها، تقریباً ۵۰٪ تعیین گردید. به عبارت دیگر اگر از یک محیط کشت اختصاصی استفاده می‌کردیم، به نظر می‌رسید میزان موارد مثبت به حدود ۸٪ کاهش پیدا می‌کرد. هم‌چنین در این مطالعه از آنتی‌بیوتیک‌های سفوپرازون، تری‌متوپریم و آمفوتریسین B که به صورت جداگانه تهیه شده بودند، استفاده شد زیرا که این آنتی‌بیوتیک‌ها هیچ اثر مهاری روی رشد کمپیلوباکترها نداشته و از رشد گونه‌های سودوموناس، دیگر باکتری‌های گرم منفی فلور و مخمرها نیز ممانعت می‌کنند. در کتاب Isenberg اشاره شده که افزودن آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سفالوتین، کلیستین و پلی‌میکسین B در بعضی محیط‌های انتخابی ممکن است اثر مهاری روی کمپیلوباکتر فتوس و کمپیلوباکتر آپسالینس داشته و از رشد بعضی سویه‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلی نیز ممانعت کنند. بنابراین به نظر می‌رسد عدم استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها شرایط جداسازی باکتری را بهتر نموده و تا حد امکان از آن‌ها در محیط‌های کشت استفاده نشود [۲۳،۱۵]. مکمل‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده در این مطالعه (سفوپرازون، تری‌متوپریم و آمفوتریسین B) به‌صورت کمپلکس تجاری نیز وجود داشته که توصیه می‌شود جهت تشخیص در آزمایشگاه‌های بالینی از انواع تجاری آن‌ها استفاده شود.

فاکتور چهارم در بهینه‌سازی شرایط این بود که پلیت‌ها در مجاورت گازپک C اینکوبه شدند که با ایجاد شرایط ۱۰-۸٪ CO2 و ۷-۵٪ اکسیژن می‌تواند شرایط میکروآئروفیل ایجاد نماید. هم‌چنین نکته مهم رعایت شده در زمان بررسی کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و ... استفاده از جار شمع‌دار بود به این

www.SID.ir

Archive of SID

صورت که در فواصل بررسی‌ها، پلیت‌ها بلافاصله به طور موقت درون جار شمع‌دار گذاشته می‌شدند تا شرایط میکروائروفیل هم‌چنان باقی بماند. این عمل از مواجهه باکتری با اکسیژن ممانعت کرده و امکان زنده ماندن باکتری‌ها را در زمان بررسی و ساب کالچر افزایش می‌دهد. توصیه می‌شود که حتی در صورت عدم وجود گازپک در آزمایشگاه و جلوگیری از حذف موارد مثبت بیماری، پلیت باکتری‌ها درون جار شمع‌دار اینکوبه شوند. در مطالعه Salim و همکاران که از جار شمع‌دار و سیستم میکروائروفیل Anoxomat برای ایزولاسیون کمپیلوباکتر از نمونه‌های مدفوع استفاده کرده بودند، موارد مثبت از جار شمع‌دار برابر با سیستم میکروائروفیل فوق بود [۲۴]. بنابراین جداسازی کمپیلوباکترها از درون جار شمع‌دار نیز دور از انتظار نخواهد بود.

با توجه به آمارهای موجود، نسبت ایزولاسیون کمپیلوباکتر در کشورهای در حال توسعه بین ۵ تا ۳۰٪ متغیر است. در مجموع ما توانستیم ۹ ایزوله کمپیلوباکتر (۱۶٪) ۸ مورد کمپیلوباکتر ژژونی و ۱ مورد کمپیلوباکتر کلی را با روش کشت جداسازی کنیم که نسبت به دیگر مطالعات مشابه در ایران درصد بالاتری را نشان می‌دهد. سلطان دلال و همکاران (۲۰۰۶) با هدف بررسی شیوع باکتری‌های انتروپاتوژنیک در بچه‌های زیر ۵ سال با اسهال در جنوب تهران، ۰/۹٪ کمپیلوباکتر را گزارش کردند. در مطالعه دیگر در شیراز، حسن‌زاده و همکاران (۲۰۰۷)، که شیوع کمپیلوباکتر ژژونی را در میان بیماران دارای اسهال حاد با سن ۵۸-۲ سال بررسی کرده بودند، نشان داد که ۱۱ مورد (۹/۶٪) از آن‌ها آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی بودند. در مطالعه مشابه دیگر، قربانعلی‌زادگان و همکاران (۲۰۱۴) ۶٪ کمپیلوباکتر (۴/۵٪ کمپیلوباکتر ژژونی و ۱/۵٪ کمپیلوباکتر کلی) را گزارش کردند [۲۵-۲۷]. به علاوه در تحقیق مشابه Platts-Mills و همکاران با هدف ارزیابی مقایسه کشت، EIA و PCR در کشورهای در حال توسعه برای تشخیص کمپیلوباکتر، مجموعاً ۱۲ نمونه (۴/۱٪) کشت مثبت از محیط انتقالی کری‌بلیر گزارش شده است [۲۸].

برای تشخیص کمپیلوباکترها معمولاً از ژن‌های *asp*، *cdt*، *cadF*، *16S rRNA*، *23S rRNA*، *fur*، *glyA*، *ceuB-E*، *fliY*، *ceuE* و *hipO* و برای تمایز کمپیلوباکتر ژژونی و کلی از چندین ژن استفاده می‌شود. در مطالعه Al Amri و همکاران با هدف طراحی یک مولتی پلکس PCR برای تمایز کمپیلوباکترها، از دو ژن *hipO* (برای کمپیلوباکتر ژژونی) و ژن *asp* (برای کمپیلوباکتر کلی) استفاده شده است [۲۹]. در این پژوهش فقط از پرایمرهای اختصاصی ژن *cadF* که در مطالعه قبلی ما طراحی شده بود استفاده شد که قادر به شناسایی و تمایز کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کلی در یک واکنش به طور هم‌زمان بود [۱۶].

به علاوه در این مطالعه جهت بررسی حساسیت کشت، از روش Duplex-PCR بر روی نمونه‌های مستقیم مدفوع استفاده شد تا نتایج آن با کشت مقایسه شود. بر اساس نتایج به‌دست آمده همه نمونه‌های مثبت در کشت، دارای PCR مثبت نیز بودند. بنابراین می‌توان گفت که حساسیت شرایط بهینه شده کشت برابر با حساسیت PCR می‌باشد.

در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که اگر چه مقایسه هم‌زمان محیط انتقالی طراحی شده در این مطالعه با محیط انتقالی معمول و روتین کری‌بلیر انجام نشده، ولی استفاده از این محیط به همراه رعایت فاکتورهای آزمایشگاهی و فاکتورهای محیطی ارائه شده جهت کشت و با حساسیتی برابر با PCR، می‌توان کمپیلوباکترها را با درصد بیش‌تری نسبت به محیط انتقالی پایه برای این باکتری ایزوله نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه سعید شمس دانشجوی دکترای تخصصی رشته باکتری‌شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بوده و بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده مذکور به‌دلیل حمایت‌های مالی صمیمانه تشکر می‌شود. هم‌چنین نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم بخش میکروب و انگل‌شناسی بیمارستان مرکز طبی کودکان

www.SID.ir

Archive of SID

تهران به‌دلیل همکاری در این پژوهش خصوصاً سـرکار خـانم کاشی تشکر می‌نمایند.

منابع

[1] Eberle KN, Kiess AS. Phenotypic and genotypic methods for typing Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in poultry. Poult Sci 2012; 91: 255-264.

[2] Cody AJ, McCarthy ND, Jansen van Rensburg M, Isinkaye T, Bentley SD, Parkhill J, et al. Real-time genomic epidemiological evaluation of human Campylobacter isolates by use of whole-genome multilocus sequence typing. J Clin Microb 2013; 51: 2526-2534.

[3] Korczak BM, Zurfluh M, Emler S, Kuhn-Oertli J, Kuhnert P. Multiplex strategy for multilocus sequence typing, fla typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates collected in Switzerland. J Clin Microb 2009; 47: 1996-2007.

[4] Galanis E. Campylobacter and bacterial gastroenteritis. CMAJ 2007; 177: 570-571.

[5] Udayakumar D, Sanaullah M. Campylobacter cholecystitis. Int J Med Sci 2009; 6: 374-375.

[6] Smith JL. Campylobacter jejuni infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barre syndrome, and reactive arthritist. J Food Prot 2002; 65: 696-708.

[7] Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud G. Detection of small numbers of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 1636-1643.

[8] Miljkovic-Selimovic B, Lavrnic D, Moric O, Ng LK, Price L, Suturkova L, et al. Enteritis caused by Campylobacter jejuni followed by acute motor axonal neuropathy: a case report. J Med Case Rep 2010; 4: 101.

[9] Colmegna I, Cuchacovich R, Espinoza LR. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 348-369.

[10] (CDC) CfDCaP. Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food--10 States, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 333-337.

[11] Eiland LS, Jenkins LS. Optimal treatment of campylobacter dysentery. J Pediatr Pharmacol Ther 2008; 13: 170-174.

[12] Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of campylobacter spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. J Clin Microb 2004; 42: 5125-5132.

[13] Poppert S, Haas M, Yildiz T, Alter T, Bartel E, Fricke U, Essig A. Identification of thermotolerant campylobacter species by fluorescence in situ hybridization. J Clin Microb 2008; 46: 2133-2136.

[14] Nachamkin I, Barbagallo S. Culture confirmation of Campylobacter spp. by latex agglutination. J Clin Microb 1990; 28: 817-818.

[15] Isenberg H. Clinical microbiology procedures handbook: American Society for Microbiology, Washington, DC; 2007.

[16] Shams S, Bakhshi B, Tohidi Moghadam T. In silico analysis of cadF gene and development of a duplex PCR for species-specific identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Jundishapur J Microbiol 2016; 9: e29645.

[17] Yang JL, Wang MS, Cheng AC, Pan KC, Li CF, Deng SX. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. World J Gastroenterol 2008; 14: 2872-2876.

[18] Singh H, Rathore RS, Singh S, Cheema PS. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of campylobacter jejuni in food and faecal samples. Braz J Microbiol 2011; 42: 181-186.

[19] Masdor NA, Altintas Z, Tothill IE. Sensitive detection of Campylobacter jejuni using nanoparticles enhanced QCM sensor. Biosens Bioelectron 2016; 78: 328-336.

[20] Oh E, McMullen L, Jeon B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in Campylobacter jejuni under aerobic conditions. Front Microbiol 2015; 6: 295.

[21] Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN. The ability of campylobacter media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. J Appl Bacteriol 1984; 56: 151-157.

[22] Huang H, Brooks BW, Lowman R, Carrillo CD. Campylobacter species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada. Can J Microbiol 2015; 61: 701-721.

[23] Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed: Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, PA.; 2006.

[24] Salim SM, Mandal J, Parija SC. Isolation of Campylobacter from human stool samples. Indian J Med Microbiol 2014; 32: 35-38.

[25] Dallal MM, Khorramizadeh MR, MoezArdalan K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran. East Mediterr Health J 2006; 12: 792-797.

[26] Hassanzadeh P, Motamedifar M. Occurrence of Campylobacter jejuni in Shiraz, Southwest Iran. Med Princ Pract 2007; 16: 59-62.

[27] Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Kazemnejad Lili A, Najar-Peerayeh S, Nikmanesh B. A molecular survey of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli virulence and diversity. Iran Biomed J 2014; 18: 158-164.

[28] Platts-Mills JA, Liu J, Gratz J, Mduma E, Amour C, Swai N, et al. Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. J Clin Microb 2014; 52: 1074-1080.

[29] Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA. Multiplex PCR for direct identification of Campylobacter spp. in human and chicken stools. J Med Microbiol 2007; 56: 1350-1355.

www.SID.ir

Archive of SID

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

Saeed Shams (Ph.D student)[1], Bakhshi Bita (Ph.D)[*1], Bahram Nikmanesh (Ph.D) [2,3]
1 – Dept. of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, TarbiatModares University, Tehran, Iran
2 - Zoonosis Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 – Dept. of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 3 Dec 2015; Accepted: 30 Apr 2016)

Introduction*: Campylobacter* spp. is the major cause of bacterial gastroenteritis, called campylobacteriosis, in the worldwide. Post-infectious complications of this infection are reactive arthritis and Guillain–Barré syndrome. Despite the importance of this infection, the isolation of fastidiousbacteria cannot be performed in most clinical laboratories. The aim this study was to design an alternative transport medium with mCCDA and evaluation the bacteria survival time into this medium, optimization of culture conditions of bacteria and then performance of direct duplex-PCR on colonies and stool samples. Finally, the results of the PCR and culture were compared.

Materials and Methods*:* Fifty eight children suspected to campylobacteriosis were enrolled in this study. Fecal specimens were inoculated in depth inside the altered transport medium with mCCDA and then sent to laboratory. The specimens from transport media were cultured on two media of mCCDA&brucella agar daily and up to 7 days. Each plate was evaluated for bacterial growth up to 72 hours. The duplex-PCR on colonies and stool were carried out directly.

Results*:* Total of isolated bacteria in this study was 9 cases (16%). The colonies were visible on the media after 48 to 72 h. The duplex-PCR assay on colonies detected 8 isolates of *C. jejuni* and 1 isolate *C. coli*. The results of the direct duplex-PCR on fecal specimens and cultures were the same.

Conclusion*:* The results indicate that the presented method in this study with sensitivity equal to the PCR is useful for isolation of *Campylobacter* spp. It seems that using the changed transport medium and optimization of bacterial culture conditions will be isolated these fastidiousbacteria better than basic transport media.

Keywords*: Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli*, Cary-Blair, Duplex-PCR, Gastroenteritis

* Corresponding author. Tel: ++98 21 82884558
b.bakhshi@modares.ac.ir

www.SID.ir