

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

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۰۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

واژگان کلیدی:

اکسیدو ردوکتاز

کمپیلو باکتر ژژونی - تشخیص

واکنش زنجیره پلیمرز

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

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 اکسیدو ردوکتاز 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

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 فلاژل 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 ویبریو کلرا تولید می‌کنند که در بروز اسهال آبکی اهمیت دارد. در موارد اسهال خونی تولید سیتوتوکسین گزارش شده است. محل‌های اتصال و آسیب بافت، ژئوزنوم، ایلیموم 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

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 کمپیلوباکتریوزیس 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

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.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی و آزمایشگاهی است. سوش باکتری کمپیلو باکتر ژژونی (ATCC33291) از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و محیط کشت agar LB 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 قرار گرفتند. 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 بر مبنای 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

بسیار بالا می‌باشد، چرا که در آزمایشگاهها و بیمارستانهای کشور تشخیص این باکتری بدلیل میکروآتروفیل بودن [۹]. در نمونه‌های انتزیتی 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 بخواهی درمان نمی‌گردد.

با توجه به موارد فوق، تشخیص سریع و به موقع انتزیت ناشی از این باکتری از اهمیت فراوانی برخوردار است. آنتی‌بیوتیک‌های 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 آنتی‌بیوتیک دارای ژنهای مختلفی است. یکی از این ژنها بعنوان فاکتور ویروالانس در باکتری عمل نموده و سبب بیماریزایی می‌شود. در این مطالعه از توالی ژن آنتی‌بیوتیک مذکور جهت شناسایی اختصاصی این باکتری استفاده شده است.

روش‌های مختلفی جهت شناسایی سریع باکتریها بر پایه اسید نوکلئیک 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 درد و 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

جدول ۱. XXX	
اندازه آمپلیکون، bp	توالی پرایمر
167	CF: GGAAAATCAAATAAAGTTAGAGGTAGAA
167	CR: CCATAAGCACTAGCTAGCTGATTATC

اورئوس، کلسترییدیوم پرفرنجس، کلسترییدیوم بوتولینوم مورد آزمایش 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.

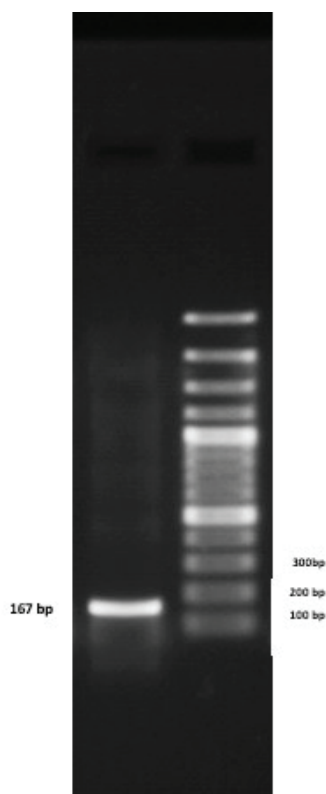
تعیین میزان حساسیت PCR

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 گردید که نتیجه آن در تصویر ۱ نشان داده شده است.



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

میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتیفریوژ گردید (15000 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 سانتیفریوژ با دور 15000 انجام شد. به رسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه کرده و جهت انجام PCR استفاده گردید.

طراحی واکنش PCR

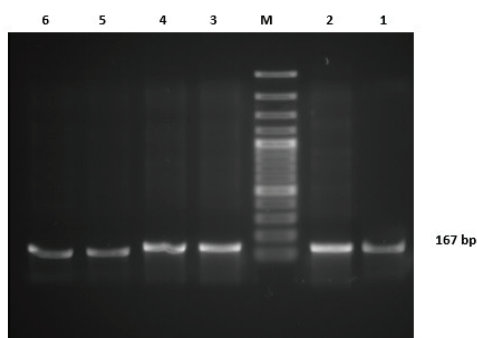
جهت رسیدن به این هدف، چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها، $dNTP$ ، $MgCl_2$ و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده گردید و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر لازم برای انجام PCR انتخاب شد. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها از درجه حرارت‌های ۵۹، ۵۸، ۵۷، ۵۶، درجه سانتی گراد استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام پذیرفت. آنزیم DNA پلیمرز Taq با حجم ۱/۵ یونیت، نمونه DNA الگو ۴۵۰ نانوگرم، پرایمرهای Forward و Reverse 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 به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه، صورت پذیرفت. سپس از هر کدام 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

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 بانندی در این واکنش‌ها حاصل نشد. در نتیجه، مشخص گردید که پرایمرهای مورد استفاده کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند (تصویر ۲).



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

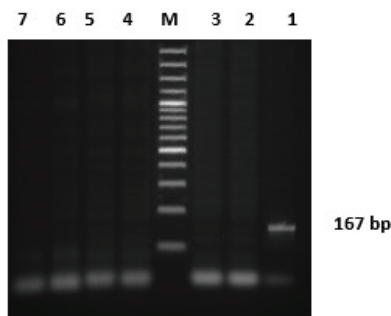
```

1- ggaaatcaaatataatagaggtagaatgtttttcaactcaactgaattgataccttaagtgc
agcctgtgaaagaatttatcctcaaatgagcaaggagaaggagctataggcttagggcgtcctatt
ttatcgtaatcagctagctagtcttatgg

Score      Expect  Identities  Gaps  Strand
309 bits(167)  1e-80  167/167(100%)  0/167(0%)  Plus/Plus

2- Query 1
   GGAAATCAAAATAAAATTAGAGGTAGAATGTTTTTCAAACCTCAAACCTGAATTTGATACC 60
3-
   |||
4- Sbjct 384386
   GGAAATCAAAATAAAATTAGAGGTAGAATGTTTTTCAAACCTCAAACCTGAATTTGATACC 384445
5-
6- Query 61
   TTAAGTGCAGCCTGTGAAAGAATTTATCCTAAAGATGAGCAAGGAGAAGGAGCTATAGGT 120
7-
8- Sbjct 384446
   TTAAGTGCAGCCTGTGAAAGAATTTATCCTAAAGATGAGCAAGGAGAAGGAGCTATAGGT 384505
9-
10- Query 121
   TTAGCGTGCCTTATTTATTCGATAATCAGTAGCTAGTGCCTTATGG 167
11-
12- Sbjct 384506
   TTAGCGTGCCTTATTTATTCGATAATCAGTAGCTAGTGCCTTATGG 384555
    
```

تصویر ۴: نتایج بلاست



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 بوتولینوم)

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 اکسیدوردوکتاز 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).

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 مرز (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

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* O157 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 پلیمرز در این مطالعه، از دقت، سرعت، حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است بطوریکه قادر به واکنش با سایر ارگانیزم‌های 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 کارایی 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 میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران در تهیه سوش مورد نظر کمال تشکر و قدردانی را اعلام می‌نمایند. ضمناً تعارض منافع در نتایج مشاهده نشد.

REFERENCES

- Pires SM, Vigue 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](https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0564) PMID: [20586609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20586609/)
- Trends E. Sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J.* 2010;8(1):1496.
- Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. *Jawetz melnick & adelbergs medical microbiology.* New Yourk: Mcgraw-Hill; 2012.
- 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](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.018) PMID: [18657873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657873/)
- Allen VM, Bull SA, Corry JE, Domingue G, Jorgensen F, Frost JA, et

- 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](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011) PMID: [17007949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1086/499969) PMID: [16425134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.335-339.2005) PMID: [15634991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2006.12.006) PMID: [17360026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.9.663)
 13. Sambrook J, Russell. *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](https://doi.org/10.1073/pnas.0503252102) PMID: [16230626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1056/NEJM199511233332102) PMID: [7477117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.016) PMID: [17433480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5549-5557.2004) PMID: [15583280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15583280/)
 21. Lastovica AJ, Le Roux E. Optimal detection of *Campylobacter* spp in stools. *J Clin Pathol.* 2003;56(6):480. PMID: [12783980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.005) PMID: [15797819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15797819/)
 24. Hajati S, Shirazi MH, Afshar D, Moghbeli M, Abadi H, Moazami A. [Molecular detection 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.

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

Ali Razei¹, Rahim Sorouri^{2,*}, Hossin Aghamollaei¹, Seyed Latif Mousavi³

¹ PhD Student, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah 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 poisoning 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 characterized 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.