تعیین میزان آلودگی به سالمونلا، کمپیلوباکتر و فراوانی ژن *CDT* در نمونه‌های مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت

هانیه احدی [۱](M.Sc)، بهاره عطاران [۱](Ph.D)، رکسانا منصور قناعی [۲*](M.D)، لیلا گنجی [۳](Ph.D)، فاطمه فلاح [۲](Ph.D)، عبدالله کریمی [۲](M.D)، ایرج صدیقی [۴](M.D)، مرجان تاری وردی [۵](M.D)، علیرضا ناطقیان [۶](M.D)، نگین نهان- مقدم [۷](M.D)، مسعود آل‌بویه [۲*](M.D)

۱- دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- آزمایشگاه مرکز تحقیقات مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۵- گروه اطفال، مرکز تحقیقات بالینی بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۶- دپارتمان بیماری‌های کودکان، بیمارستان حضرت علی اصغر، تهران، ایران

۷- گروه اطفال، دانشکده پزشکی، بیمارستان بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۵۴۸۲۸۴ masoud.alebouyeh@gmail.com-ghanaieroxana@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۸

چکیده

هدف: گاستروانتریت حاد یک اختلال شایع است که ۱۲-۸٪ از مراجعه‌های سرپایی کودکان را شامل می‌شود. عفونت‌های کمپیلوباکتر و سالمونلا حدود ۸/۴٪ و ۱۱٪ از موارد اسهال جهانی را شامل شده که مرتبط با عوارض و بیماری‌های خارج روده‌ای می‌باشند. با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در بیماری‌های کودکان، هدف از این مطالعه تعیین میزان عفونت با سالمونلا، گونه‌های کمپیلوباکتر و هم‌چنین بررسی فراوانی ژن کدکننده‌ی Cytholethal distending toxin **در بروز اسهال ناشی از جامعه در کودکان مبتلا در نظر گرفته شد.**

مواد و روش‌ها: نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال از بیمارستان‌های کودکان شهرهای همدان، اردبیل، بندرعباس و بیمارستان‌های علی‌اصغر و کودکان مفید در تهران جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی از نمونه‌های مدفوع با استفاده از کیت استخراج گردید. حضور جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کولی، ژن *cdtB* کمپیلوباکتر و جنس سالمونلا از طریق پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. هم‌چنین کمینه تشخیص (LOD) این باکتری‌ها در نمونه‌های مدفوع به روش PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: بررسی نتایج آزمایشگاهی میزان LOD جهت شناسایی مستقیم را ۱۰۰ باکتری در هر گرم مدفوع تعیین گردید. بر این مبنا از میان ۱۴۴ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال حاد، یک مورد از نظر حضور کمپیلوباکتر ژژونی مثبت گردید. این نمونه از نظر حضور ژن cdtB **نیز مثبت بود. حضور جنس سالمونلا در دو نمونه از بیماران مثبت گزارش شد (۱/۴٪).**

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه میزان فراوانی کمی از ابتلا به باکتری‌های کمپیلوباکتر و سالمونلا در نمونه‌های تحت بررسی را طی پاندمی کووید۱۹ در کودکان زیر ۵ سال نشان داد. بررسی این نمونه‌ها از نظر ابتلا به ویروس‌ها و سایر عوامل میکروبی می‌تواند سبب‌شناسی بروز اسهال در کودکان مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها را روشن‌تر نماید.

واژه‌های کلیدی: اسهال، کودکان، سالمونلا، کمپیلوباکتر، Cytholethal distending toxin

مقدمه

اسهال هم‌چنان یکی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی دنیا و به خصوص کشورهای در حال توسعه می‌باشد که سالانه باعث مرگ ۴ تا ۵ میلیون کودک زیر ۵ سال می‌شود [۱]. ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها از جمله عوامل عفونی ایجادکننده اسهال محسوب می‌شوند. در این میان کمپیلوباکتر و سالمونلا به عنوان عوامل مهم باکتریایی ایجادکننده عفونت‌های دستگاه گوارش در کودکان در سراسر جهان محسوب می‌شوند [۲،۳]. در حال حاضر جنس کمپیلوباکتر دارای حداقل ۳۰ گونه و زیر گونه است. در این جنس سه گونه *Campylobacter jejuni* ، *Campylobacter coli* و *Campylobacter lari* عامل اصلی کمپیلوباکتریوزیس انسانی می‌باشند [۴]. *C. jejuni* شایع‌ترین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

عامل ایجادکننده التهاب دستگاه گوارش شناخته شده است که مسئول ۹۵-۹۰٪ موارد کمپیلوباکتریوز انسانی است [۵]. هر چند اسهال‌های ناشی از این باکتری اغلب خود محدودشونده هستند، اما عوارض ناشی از این باکتری متعدد می‌باشد. عوارض خارج روده‌ای شامل باکتریمی، منتژیت، اندوکاردیت، سلولیت، پریتونیت و آبسه‌های مغزی است. هم‌چنین سندرم گیلن باره (GBS) Guillain-Barré Syndrome، سندرم روده تحریک‌پذیر Irritable Bowel Syndrome (IBS) و ReA (Reactive Arthritis) (نوعی آرتریت) نیز از جمله عوارض التهابی هستند که معمولاً طی ۳ ماه بعد از عفونت کمپیلوباکتریایی رخ می‌دهند [۶].

بیماری زایی کمپیلوباکتر هم تحت تأثیر حساسیت میزبان و هم عوامل باکتریایی است [۷]. چندین فاکتور بیماری‌زایی مهم برای ایجاد اسهال حاد در نظر گرفته می‌شود، مانند مقاومت به نمک‌های صفراوی [۸]، تهاجم به سلول‌های اپیتلیال [۹] و تولید سم متسع‌کننده سیتولتال [۱۰]. CDT توسط سه ژن مجاور به نام‌های cdtA، cdtB و cdtC کدگذاری می‌شود [۱۱]. CDT باعث می‌شود سلول‌های یوکاریوتی در فاز G2/M چرخه سلولی متوقف شوند و از ورود آن‌ها به میتوز جلوگیری می‌کند و منجر به مرگ سلولی می‌شود [۱۲]. علی‌رغم گزارش‌های متعدد در مورد اثرات سمی CDT بر روی سلول‌های مختلف پستانداران کشت شده، ولی اطلاعات کمی در خصوص شیوع CDTدر میان سویه‌های کمپیلوباکتر وجود دارد. در این مطالعه به بررسی میزان حضور ژن CDT در سویه‌های کمپیلوباکتر پرداخته شده است.

سالمونلاهای غیرتیفوئیدی نیز حدود ۱۱٪ از کل گاستروانتریت‌ها را به خود اختصاص داده است. به‌طوری‌که بر اساس گزارش مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC) و مرجع ایمنی غذایی اروپا (EFSA)، گونه‌های سالمونلا و کمپیلوباکتر *Salmonella* spp بیش‌ترین موارد ابتلا به بیماری‌های گاستروانتریت باکتریایی را در ایالات متحده و اتحادیه اروپا به خود اختصاص داده‌اند [۱۳]. عفونت‌های ناشی از گونه‌های سالمونلا غیر تیفوییدی از علل اصلی گاستریت و انتریت در کودکان زیر پنج سال است. موارد تهاجمی عفونت‌های سالمونلا غیر تیفوئیدی مانند باکتریمی و منتژیت نیز به طور مکرر در نوزادان و کودکان کوچک گزارش می‌شود [۱۴]. از آن‌جا که عوارض و هزینه‌های ناشی از عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها (کمپیلوباکتر و سالمونلا) بالا می‌باشد، بنابراین تشخیص صحیح و سریع آن‌ها حایز اهمیت می‌باشد.

کمپیلوباکترها باکتری‌های میکروائروفیل و گرمادوستی هستند که در دمای ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند. این ویژگی‌ها موجب شده است که روش‌های مبتنی بر کشت با چالش‌هایی همراه باشد. تجهیزات جهت فراهم کردن شرایط میکروائروفیل، نیاز به کارشناس متبحر و زمان‌بر بودن آزمایش از جمله معایب روش‌های مبتنی بر کشت هستند که موجب شده است تا استفاده از این روش‌ها تنها به آزمایشگاه‌های تحقیقاتی محدود شود. در مقابل روش‌های مبتنی بر روش‌های مولکولی و ایمونولوژیکی از سرعت انجام بالایی برخوردار هستند و هم‌چنین قابلیت شناسایی سلول‌های باکتری غیر قابل کشت viable but non-culturable (VBNC) را دارند.

با توجه به این‌که در آزمایشگاه‌های تشخیص بالینی، اسمیر مستقیم مدفوع بـه روش فوشین بازی انجام نمی‌شود و از محیط‌های انتخابی کمپیوباکتر ژوژونی در کشت مدفوع استفاده نمی‌شود، بنابراین بسیاری از موارد اسهال‌های ناشی از این باکتری بدون تشخیص باقی می‌مانند. لذا با توجه به اهمیت کمپیلوباکترها و سالمونلا در عفونت‌های اسهالی، هدف از این مطالعه تعیین میزان ابتلا به سالمونلا، کمپیلوباکتر و زیر گونه‌هایش و هم‌چنین حضور توکسین CDT در کودکان مبتلا به اسهال ساکن چند شهر ایران طی پاندمی کوید-۱۹ و ارتباط آن‌ها با شدت علائم مبتلایان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی و مقطعی نمونه‌های مدفوع کودکان مبتلا به اسهال از بیمارستان‌های شهرهای همدان، اردبیل، بندرعباس و دو بیمارستان علی اصغر (ع) و مفید در تهران طی بهمن سال ۱۳۹۹ الی خرداد سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید. این شهرها به دلیل شرایط اپیدمیلوژیکی متفاوت و وضعیت جغرافیایی نسبتاً متفاوت از شمال غرب، غرب، مرکز و جنوب ایران انتخاب گردیدند. بیماری‌های گاستروانتریتی باکتریایی غالباً مربوط به فصول گرم سال هستند و اطلاعات ناچیزی در خصوص نقش این باکتری‌ها در فصول سرد سال وجود دارد؛ جهت روشن شدن این ضعف اطلاعاتی، مطالعه حاضر در هر دو فصل سرد و گرم سال به صورت هم‌زمان صورت گرفت. بدین منظور فرم رضایت‌نامه توسط والدین یا سرپرستان کودک تکمیل و امضاء شد. نمونه مدفوع ۱۴۴ کودک مبتلا به اسهال حاد در ظرف‌های مخصوص جمع‌آوری و در مدت ۲۴-۷۲ ساعت با رعایت زنجیره سرد به مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل گردید. تمام نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کد اخلاق این مطالعه: IR.SBMU.RICH.REC.1400.020

استخراج DNA ژنومی. استخراج DNA بر اساس دستورالعمل ذکر شده توسط شرکت سازنده (BIOBASIC-

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

(CANADA) انجام شد. سپس به منظور ارزیابی کمیت DNA به‌دست آمده، میزان جذب نوری آن‌ها با استفاده از نانو دارپ DNA و در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون PCR. حضور جنس کمپیلوباکتر در نمونه با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* بررسی شد. در نمونه‌هایی که از نظر جنس کمپیلوباکتر مثبت شدند؛ تعیین گونه نیز با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی *کمپیلوباکتر ژوژنی* و *کمپیلوباکتر کلی* انجام گرفت. هم‌چنین حضور ژن *cdtB* نیز در نمونه‌هایی که از نظر حضور کمپیلوباکتر مثبت شدند از طریق پرایمر اختصاصی ژن مربوط به زیر واحد *cdtB* از توکسین CDT مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). نمونه‌هایی که از نظر حضور کمپیلوباکتر منفی شدند از نظر حضور سالمونلا با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *invA* بررسی شدند.

ترکیبات لازم جهت انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب شامل ۱۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon-Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای Forward و Revrese (Sinaclon, Iran) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای هر واکنش در جدول ۱ ذکر شده است. پس از انجام هر مرحله از PCR، محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل در مرحله ساخت ژل DNA Safe stain صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاهGel documentation و در زیر نور فرابنفش رویت و عکس آن تهیه شد.

تعیین میزان LOD کمینه تشخیص توسط روش spiking

تعیین میزان LOD به طور خلاصه به شرح زیر انجام شد. سویه کمپیلوباکتر ژوژنی در محیط اختصاصی Charcoal Cephoperasone Deoxycholate Agar (CCDA) در شرایط میکروائروفیل به مدت ۲۴ ساعت در دمای انکوباتور کشت داده شد. سپس رقت‌های سریالی از باکتری در میزان CFU/gram 10^2-10^8 تهیه شد و با مقدار مناسبی از نمونه مدفوع استاندارد مخلوط شد و سپس استخراج DNA از هر یک از نمونه‌ها صورت گرفت. مقدار ۴ میکرولیتر از هر نمونه جهت انجام PCR توسط پرایمر S rRNA۱۶ جنس کمپیلوباکتر مطابق جدول ۱ صورت پذیرفت [۲۰].

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر (ژن هدف)	Sequence (5′→3′)	شرایط PCR	محصول PCR (bp)	منبع
Campylobacter genus (16S rRNA)	F:GGATGACACTTTTCGGAGC R:CTGTGTGCACGATGTTAC	94 °C, 5 min, 2 cycles of 94 °C, 1 min, 64 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 2 cycles of 94 °C, 1 min, 62 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, , 2 cycles of 94 °C, 1 min, 60 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 2 cycles of 94 °C, 1 min, 58 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 2 cycles of 94 °C, 1 min, 56 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 30 cycles of 94 °C, 1 min, 54 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 72 °C, 10 min	816	[۱۵]
C. jejuni (Cj0414)	F:CATCTTCCCTAGTCAAGCCT R:CAGAACGATCACGGTATAGAA		773	[۱۶]
C. coli (Ask)	F:AGGCAAGGGAGCCTTTAATC R:CGCTTAAACATCTATCCCTAT		364	[۱۷]
*cdt*B (CdtB)	F:GTTGGCACTTGGAATTTGCAAGGC R:RTTRAARTCNNCCYAADATCATCC	94 °C, 5 min, 35 cycles of 94 °C, 30 s, 42 °C, 15 s, 72 °C, 45 s, 72 °C, 5 min	470	[۱۸]
*Inv*A (InvA)	F:GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA R:CTGACAGTTACCAATGCTTA	94°C, 5 min, 30 cycles of 94°C, 1 min, 57°C, 30 s, 72°C, 30 s, 72°C, 10 min	285	[۱۹]

نتایج

نتایج PCR. در این مطالعه نمونه‌های مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت از نظر حضور گونه‌های *کمپیلوباکتر ژوژنی* و *کولی* و هم‌چنین *سالمونلا* مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین حضور توکسین CdtB در نمونه‌هایی که از نظر *کمپیلوباکتر* مثبت بودند با استفاده از روش مولکولی PCR بررسی شد. از میان ۱۴۴ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت، تنها ۱ نمونه از نظر *کمپیلوباکتر ژژونی* و هم‌چنین حضور ژن CdtB مثبت شد. هم‌چنین ۲ نمونه نیز حاوی جنس *سالمونلا* بودند. میزان حساسیت روش PCR در تشخیص کمپیلوباکتر در نمونه مدفوع بر مبنای تست spiking معادل 10^2 CFU/g به دست آمد.

اطلاعات دموگرافیک و بیماران. در این مطالعه در مجموع ۱۴۴ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز طبی کودکان تهیه شد (جدول ۲). بیماران دارای میانگین سنی ۵ سال و پسران و دختران ۵۹/۲٪ و ۴۰/۸٪ از نمونه‌ها را شامل شدند. اکثر کودکان مورد مطالعه اسهال آبکی داشتند و وجود اسهال خونی در ۴/۱۶٪ از نمونه‌ها نشان داده شد. در هر فرم از مدفوع میزان حضور و عدم حضور گلبول‌های سفید به طور تقریبی برابر بود. تب به عنوان بارزترین علائم گاستروانتریت در حدود ۶۹٪ از کوکان مورد بررسی مشاهده شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

جدول ۲. بررسی دموگرافیک نمونه‌های مورد بررسی مدفوع کودکان

ویژگی دموگرافیک	تعداد	درصد
جنسیت		
دختر	۵۹	٪۴۰,۸
پسر	۸۵	٪۵۹,۲
شهر بستری شده		
اردبیل	۳۲	٪۲۲,۲۲
بندرعباس	۲۵	٪۱۷,۳۶
تهران	۴۶	٪۳۱,۹
همدان	۴۱	٪۲۸,۴۷
علائم		
داشتن تب	۹۹	٪۶۸,۷۵
نداشتن تب	۴۵	٪۳۱,۲
نوع مدفوع		
آبکی	۱۱۲	٪۷۷,۷۷
نیمه آبکی	۲۶	٪۱۸
خونی	۶	٪۴,۱۶
سایر موارد	۰	٪۰
بررسی میکروسکوپی نمونه مدفوع		
حضور WBC	۷۲	٪۵۰
عدم حضور WBC	۷۲	٪۵۰
حضور RBC	۷۱	٪۴۹,۳
عدم حضور RBC	۷۳	٪۵۰,۶۹

یک مورد نمونه مثبت از نظر کمپیلوباکتر، مبتلا به اسهال آبکی و تب بوده است و همچنین حضور گلبول سفید و قرمز در مدفوع آن گزارش شده است؛ این نمونه فصل زمستان در بیمارستان مفید جمع‌آوری شده است. دو مورد نمونه مثبت از نظر سالمونلا نیز مبتلا به اسهال آبکی بوده‌اند اما یکی از آن‌ها تب نداشته است و در مدفوع هر دو گلبول سفید گزارش شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سالمونلا بیش‌ترین موارد بیماری‌های گاستروانتریت باکتریایی را در کشورهای مختلف ایجاد می‌کند [۱۳]. اگرچه برآوردها به دلیل عدم تشخیص و گزارش مداوم بسیار متفاوت است، هر ساله بین ۲۰۰ میلیون تا ۱/۳ میلیارد مورد بیماری و ۳ میلیون مورد مرگ ناشی از سالمونلا در سراسر جهان رخ می‌دهد. موارد تهاجمی سالمونلا، مانند باکتریمی و مننژیت، به طور مکرر در نوزادان و کودکان کوچک گزارش می‌شود که اهمیت بالینی این عفونت را در کودکان نشان می‌دهد [۲۱]. کمپیلوباکتر از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان است. این باکتری همچنین به عنوان یکی از دلایل اصلی اسهال ناشی از مواد غذایی در بزرگسالان و کودکان در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه شناخته شده است. عفونت‌های کمپیلوباکتر ناشی از غذا حدود ۸/۴٪ از موارد اسهالی جهانی را به خود اختصاص داده است [۲۲]. در حالی‌که نتایج مطالعات نشان داده است که شیوع عفونت ناشی از کمپیلوباکتر در میان بچه‌های کم‌تر از ۵ سال بالا می‌باشد [۲۳،۲۴]، مشکلات موجود در جداسازی این باکتری از نمونه‌های بالینی، سبب تخمین ناصحیح این عفونت در کشورهای در حال توسعه و کم‌تر توسعه‌یافته شده است.

همه‌گیری بیماری‌های واگیر می‌تواند بر عفونت‌های روده‌ای تاثیرگذار باشد. کاهش و افزایش عفونت‌های ویروسی و باکتریایی روده‌ای با شروع پاندمی کوید-۱۹ در انتهای سال ۲۰۱۹ در کشورهای مختلف بررسی شده است. در مطالعه‌ای که در کشور چین صورت گرفته است، عفونت ناشی از سالمونلای غیرتیفوئید و کمپیلوباکتر کولی در ابتلای کودکان به ترتیب افزایش حدود ۱/۵ تا ۲ برابر را، بر خلاف سایر عوامل پاتوژن روده‌ای که طی پاندمی کوید-۱۹ کاهش نشان دادند، نشان داده شد [۲۵].

بر اساس نتایج مطالعه حاضر از میان ۱۴۴ نمونه بررسی شده از کودکان دارای سن کم‌تر و مساوی ۵ سال، میزان فراوانی گونه‌های *کمپیلوباکتر ژژونی* برابر با ۰/۶۹٪ تعیین گردید. میزان ابتلا به کمپیلوباکتر در ایران و سایر کشورها در شرایط غیرپاندمی ۵-۲۰٪ گزارش شده است. Malla R. Rao و همکاران تعداد ۳۹۷ نمونه مدفوع کودکان زیر ۳ سال جمع‌آوری شده در مدت ۲ سال را از نظر حضور گونه‌های کمپیلوباکتر مورد بررسی قرار دادند و موفق به شناسایی کمپیلوباکتر در ۳٪ از نمونه‌ها با استفاده از روش PCR شدند [۲۶]. هم‌چنین مطالعه مشابهی توسط امیر سعید و همکاران (۲۰۱۵-سودان) انجام شد که در آن میزان شیوع کمپیلوباکتر و سالمونلا به ترتیب ۲ و ۴٪ گزارش شد [۲۷]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط da Silva Quetz و همکارانش جهت مطالعه پراکندگی کمپیلوباکتر بر روی مدفوع کودک زیر ۵ سال با به‌کارگیری روش PCR انجام شد، ۷/۲٪ *کمپیلوباکتر ژژونی* و ۳/۶٪ *کمپیلوباکتر کلی* شناسایی گردید. هم‌چنین در این مطالعه حضور ژن *CdtB* در ۵۰٪ نمونه‌های آلوده به کمپیلوباکتر ژژونی به تایید رسید [۲۸]. در مطالعه دیگری در همدان در سال ۲۰۱۵ که با کمک روش PCR از نظر آلودگی کمپیلوباکتر بر روی کودکان انجام شده بود، میزان ابتلا ۱۰٪ گزارش شده بود [۲۹]. از آن‌جا که در مطالعه حاضر، مشابه با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته، میزان حساسیت روش PCR در تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر در نمونه مدفوع برابر با 10^2 cfu/g به‌دست آمد [۲۰]، به نظر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

می‌رسد که پایین بودن میزان فراوانی گونه‌های کمپیلوباکتر در تحقیق حاضر مرتبط با وضعیت پاندمی کوید-۱۹ و محدود بودن فصول جمع‌آوری نمونه‌ها در ماه‌های سرد و معتدل سال باشد.

بر اساس نتایج حاصل در مطالعه کنونی، میزان فراوانی گونه‌های سالمونلا در میان کودکان زیر ۵ سال برابر با ۱/۳۹٪ به‌دست آمد. Ali Harb و همکارانش در سال ۲۰۱۹ فراوانی این عفونت را در بچه‌های زیر ۵ سال ۱۰٪ گزارش کردند [۲۱]. هم‌چنین Bae Joon Yeol همکارانش موفق به جداسازی سالمونلا در ۷/۲٪ از نمونه‌های مدفوع در ۲۴۸ کودک زیر ۵ سال شدند [۳۰]. تاثیر پاندمی کوید-۱۹ بر میزان ابتلای سالمونلا در کودکان در مطالعه مشابهی در هلند گزارش شده است. بر اساس این مطالعه، میزان ابتلا به سالمونلا طی پاندمی کوید-۱۹ در مقایسه با وضعیت قبل از پاندمی کاهشی به‌میزان ۳۷٪-۵۵٪ نشان داده است [۳۱]. اقدامات صورت گرفته برای مقابله با ویروس کووید ۱۹ تا کنون منجر به تغییرات فاحش در اپیدمیولوژی عفونت‌های مهم از جمله عفونت‌های ناشی از آب و غذا شده است [۳۲]. دو باکتری تحت مطالعه در این تحقیق نیز از جمله پاتوژن‌های منتقله از راه غذا می‌باشند و ابتلای آن در کودکان منوط به مصرف مواد غذایی، طبخ ناکامل مواد غذایی، و تماس با سطوح و فراورده‌های آلوده است. محدودیت تردد و عدم حضور خانواده‌ها در مراکز غذایی و رستوران‌ها، شاید توجیه‌گر ابتلای کاهش یافته با این باکتری در بازه زمانی این مطالعه باشد. هم‌چنین ابتلا به ویروس SARS-CoV-2 که در کودکان منجر به بروز اسهال خواهد شد، می‌تواند توجیه‌گر نقش جایگزینی شیوع عفونت‌های باکتریایی با عوامل ویروسی به‌عنوان عامل اتیولوژیک غالب در بروز اسهال در نمونه‌های تحت بررسی باشد [۳۲،۳۳].

در این مطالعه شیوع کمپیلوباکتر و سالمونلا در کودکان کم‌تر از ۵ سال مبتلا به گاستروانتریت با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. این نتایج نشان داد که PCR یک ابزار تشخیصی بالقوه برای تشخیص مستقیم کمپیلوباکتر و سالمونلا در نمونه‌های مدفوع است. بازه‌ی زمانی تحت مطالعه، بروز پاندمی کووید ۱۹، کنترل مصرف مواد غذایی و رعایت اصول بهداشتی می‌تواند فراوانی کم‌تر عفونت ناشی از کمپیلوباکتر و سالمونلا را در این نمونه‌های کودکان در مقایسه با سال‌های گذشته در ایران توجیه نماید.

محدودیت‌ها:

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به حجم نمونه و فصول جمع‌آوری آن‌ها اشاره نمود. مراجعه بیماران در انتهای فاز اسهالی با حضور تعداد کم‌تر باکتری در نمونه‌ی مدفوع توام می‌باشد. استفاده از روش‌های پیش غنی‌سازی و غنی‌سازی می‌تواند در نمونه‌های مدفوع قبل از انجام استخراج DNA میزان دقیق‌تری از ابتلای اخیر را ارائه نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه الزهرا بابت تخصیص بودجه تحقیقاتی جهت انجام این مطالعه و همین‌طور از مرکز تحقیقات بالینی بیمارستان کودکان دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، و سایر عزیزان مشارکت کننده در این مطالعه مراتب قدردانی را به عمل می‌آورند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد و با همکاری مشترک مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و گروه میکروب‌شناسی دانشگاه الزهرا صورت پذیرفته است.

مشارکت و نقش نویسندگان

هانیه احدی، دکتر بهاره عطاران و دکتر مسعود آل‌بویه در ایده و طراحی مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها؛ دکتر لیلا گنجی، دکتر رکسانا منصور قناعی، دکتر فاطمه فلاح، دکتر عبدالله کریمی و دکتر مسعود آل‌بویه در آنالیز و تفسیر نتایج؛ و دکتر مسعود آل‌بویه، دکتر لیلا گنجی و هانیه احدی در نگارش نسخه اول مقاله مشارکت داشتند. دکتر مرجان تاری وردی، دکتر علیرضا ناطقیان، دکتر ایرج صدیقی و دکتر نهال مقدم در معاینه کودکان، تکمیل پرسش‌نامه و مدیریت ارسال نمونه‌ها مشارکت نمودند. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Li Ying, Zhang Sh, He Mu, Zhang Y, Fu Y, Liang Ha, et al. Prevalence and molecular characterization of Campylobacter spp. isolated from patients with diarrhea in Shunyi. Beijing Front Microbiol 2018; 9: 52. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00052 PMid:29434579 PMCid:PMC5790792

[2] Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. Anim Nutr 2018; 4: 250-255. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006 PMid:30175252 PMCid:PMC6116329

[3] Jazayeri Moghadas, Irajian A, Kalantari G, Monem F, Salehian M, Rahbar A, et al. Prevalence of Campylobacter jejuni in diarrheic children in Semnan (Iran). Koomesh 2008; 297-300. (Persian).

[4] Babazadeh D, Ranjbar R. Campylobacter in the middle east. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2021; 1: 1-8.

[5] Lastovica A J, Allos BM, Clinical significance of Campylobacter and related species other than Campylobacter jejuni and C. coli. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ. Campylobacter. 3rd Edition. ASM Press. 2008; p.123-149. https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch7

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[6] Endtz HP, Campylobacter Infections. In: Ryan ET, Hill DR, editors. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands. 2020; p. 507-511. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00050-8

[7] Wysok B, Wojtacka J, Kivistö R. Pathogenicity of Campylobacter strains of poultry and human origin from Poland. Int J Food Microbiol 2020; 334: 108830. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108830 PMid:32841810

[8] Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of Campylobacter jejuni. Infect Immun 2003; 71: 4250-4259. https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4250-4259.2003 PMid:12874300 PMCid:PMC165992

[9] Russell RG, O'Donnoghue M, Blake Jr DC, Zulty J, DeTolla LJ. Early colonic damage and invasion of Campylobacter jejuni in experimentally challenged infant Macaca mulatta. J Infect Dis 1993; 168: 210-215. https://doi.org/10.1093/infdis/168.1.210 PMid:8515112

[10] Konkel ME, Monteville MR, Rivera-Amill V, Joens LA. The pathogenesis of Campylobacter jejuni-mediated enteritis. Curr Issues Intest Microbiol 2001; 2: 55-71.

[11] Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of Campylobacter strains isolated from poultry in Thailand. Microbiol Immunol 2007; 51: 909-991. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03974.x PMid:17895609

[12] Ganji L, Alebouyeh M, Shirazi M, Ebrahimi Daryani N, Mirshafiey A, Eshraghi S, et al. Detection of cdtB gene among enteric bacteria in patients with gastroenteritis and irritable bowel syndrome. Koomesh 2019; 21: 181-187. (Persian).

[13] Divsalar G, Kaboosi H, Khoshbakht R, Shirzad-Aski H, Ghadikolaii F. 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. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.06.001 PMid:31300113

[14] Graham SM. Salmonellosis in children in developing and developed countries and populations. Curr Opin Infect Dis 2002; 15: 507-512. https://doi.org/10.1097/00001432-200210000-00009 PMid:12686884

[15] Linton D, Owen R, Stanley J. Rapid identification by PCR of the genus Campylobacter and of five Campylobacter species enteropathogenic for man and animals. Res J Microbiol 1996; 147: 707-718. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)85118-2 PMid:9296105

[16] Wang RF, Slavik MF, Cao WW. A rapid PCR method for direct detection of low numbers of campylobacter jejuni 1. J Rapid Methods Autom Micribiol 1992; 1: 101-108. https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.1992.tb00074.x

[17] 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: 2568-2572. https://doi.org/10.1128/jcm.35.10.2568-2572.1997 PMid:9316909 PMCid:PMC230012

[18] Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J, Madsen M. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in Campylobacter spp. isolated from Danish broilers. J Med Microbiol 2001; 50: 1087-1094. https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-12-1087 PMid:11761194

[19] Tajbakhsh M, Avini M, Alikhajeh J, Tajeddin E, Rahbar M, Eslami P, et al. Emergence of bla CTX-M-15, bla TEM-169 and bla PER-1 extended-spectrum β-lactamase genes among different Salmonella enterica serovars from human faecal samples. J Infect Dis 2016; 48: 550-556. https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1166260 PMid:27117981

[20] Ganji L, Azimirad M, Farzi N, Alebouyeh M, Shirazi M, Eshraghi S, Mirshafiey A, et al. Comparison of the detection limits of the culture and PCR methods for the detection of clostridium difficile, clostridium perfringens, campylobacter jejuni, and Yersinia enterocolitica in Human Stool. Arch Pediatr Infect Dis 2017; 5. https://doi.org/10.5812/pedinfect.38888

[21] Harb A, Abraham S, Rusdi B, Laird T, O'Dea M, Habib I. Molecular detection and epidemiological features of selected bacterial, viral, and parasitic enteropathogens in stool specimens from children with acute diarrhea in Thi-Qar Governorate, Iraq. Int J Environ 2019; 16: 1573. https://doi.org/10.3390/ijerph16091573 PMid:31064051 PMCid:PMC6539995

[22] Igwaran A, Okoh AI. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. Heliyon 2019; 5: e02814. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814 PMid:31763476 PMCid:PMC6861584

[23] Pavlova M, Alexandrova E, Donkov G, Mitova-Mineva Y, Kantardjiev T, Velev V, et al. Campylobacter infections among Bulgarian children: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. Biotechnol Biotechnol Equip 2020; 34: 1038-1042. https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1817783

[24] Chukwu MO, Abia AL, Ubomba-Jaswa E, Obi L, Dewar J, et al. Characterization and phylogenetic analysis of campylobacter species isolated from paediatric stool and water samples in the Northwest province, South Africa. Int J Environ Res Public Health 2019; 16: 2205. https://doi.org/10.3390/ijerph16122205 PMid:31234440 PMCid:PMC6617328

[25] Wang LP, Han JY, Zhou SX, Yu LJ, Lu QB, Zhang XA, et al. The changing pattern of enteric pathogen infections in China during the COVID-19 pandemic: a nation-wide observational study. Lancet Reg Health West Pac 2021; 16: 100268. https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2021.100268 PMid:34568854 PMCid:PMC8450280

[26] Rao MR, Naficy AB, Savarino SJ, Abu-Elyazeed R, Wierzba TF, Peruski LF, et al. Pathogenicity and convalescent excretion of Campylobacter in rural Egyptian children. Am J Epidemiol 2001; 154: 166-173. https://doi.org/10.1093/aje/154.2.166 PMid:11447051

[27] Saeed A, Abd H, Sandstrom G. Microbial aetiology of acute diarrhoea in children under five years of age in Khartoum, Sudan. J Med Microbiol 2015; 64: 432. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000043 PMid:25713206 PMCid:PMC4635512

[28] da Silva Quetz J, Lima IF, Havt A, de Carvalho EB, Lima NL, Soares AM, et al. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 67: 220-227. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.025 PMid:20542202 PMCid:PMC2886016

[29] Rastyani S, Alikhani MY, Sedighi I, Kazemi S, Kohan H, Arabestani M. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in children with acute diarrhea in health centers of Hamadan, Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect 2015; 2: 29791-29791. https://doi.org/10.17795/ajcmi-29791

[30] Bae JY, Lee DH, Ko KO, Lim JW, Cheon EJ, Song YH, et al. Clinical manifestation of Campylobacter enteritis in children. Korean J Pediatr 2018; 61: 84. https://doi.org/10.3345/kjp.2018.61.3.84 PMid:29628968 PMCid:PMC5876509

[31] Mughini-Gras L, Pinedo LC, Pijnacker R, Van Den Beld M, Wit B, Veldman K, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on human salmonellosis in the Netherlands. Epidemiol Infect 2021; 149: e254. https://doi.org/10.1017/S0950268821002557 PMid:36318161 PMCid:PMC8692841

[32] Mack D, Gohl P, Kolbert M, Schui D, Küsters U, Harzer O, et al. Where have the enteric viruses gone? - Differential effects on frequent causes of infectious diarrhoea by SARS-CoV-2 pandemic lockdown measures. IPIP 2021;

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

and Campylobacter in England: A modelling approach. PloS One 2021; 16: e0256638. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256638 PMid:34432849 PMCid:PMC8386829
.

3: 100184. https://doi.org/10.1016/j.infpip.2021.100184 PMid:34786553 PMCid:PMC8579700
[33] Ondrikova N, Clough H, Douglas A, Iturriza-Gomara M, Larkin L, Vivancos R, et al. Differential impact of the COVID-19 pandemic on laboratory reporting of norovirus

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 24, Issue 5 Sep and Oct 2022, 684 - 690

Molecular investigation of *Campylobacter* spp. and *salmonella* infection in children with community acquired diarrhea

Haniyeh Ahadi (M.Sc)[1], Bahareh Attaran (Ph.D)[1], Roxana Mansour Ghanaie (M.D)[*2], Leila Ganji (Ph.D)[3], Fatemeh Fallah (Ph.D)[2], Abdollah Karimi (Ph.D)[2], Iraj Sedighi (M.D)[4], Marjan Tariverdi (M.D)[5], Alireza Nateghian (M.D)[6], Negin Moghadam (M.D)[7], Masuod Alebouyeh (M.D)[*2]

1- Dept. of microbiology Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2 - Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Pediatric Infection Research Center, Research Institue for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran
4- Dept. of Pediatrics, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences
5- Dept. of Pediatrics, Clinical Research Center of Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
6- Dept. of Pediatrics, Hazrat Ali Asghar Hospital, Tehran Iran
7- Dept. of Pediatrics, School of Medicine, Bouali Hospital, Ardabil University of Medical Sciences

* Corresponding author. +98 9113548284 masoud.alebouyeh@gmail.com-ghanaieroxana@gmail.com Received: 29 Dec 2021; Accepted: 17 Apr 2022

Introduction*:* Acute gastroenteritis is a typical disorder that accounts for 8-12% of pediatric outpatient visits. *Campylobacter* and *Salmonella* infections account for about 8.4% and 11% of global diarrhea cases. Due to the importance of these bacteria in pediatric diseases, the aim of this study was to determine the infectious rate of *Salmonella* and *Campylobacter* species and also the frequency of the gene encoding Cytholethal distending toxin in children with community-acquired diarrhea.

Materials and Methods*:* Stool samples of children under 5 years of age with diarrhea were collected. The samples were related to children referred to hospitals in Hamadan, Ardabil, Bandar Abbas and two hospitals in Tehran. DNA was extracted from the samples using a DNA extraction kit from stool. The presence of *Campylobacter* in the studied samples was detected by polymerase chain reaction using specific primers. A control stool sample was spiked with 10-fold dilution of *C. jejuni* suspension for LOD (detection limit determination) measurement.

Results: In this study, PCR results showed a LOD of 100 CFU per gram in the spiked feces sample. Accordingly, out of 144 fecal samples of children with acute diarrhea, one case was positive for *Campylobacter jejuni*; this sample was also positive for the presence of *cdtB* gene. Presence of *Salmonella* was confirmed in two samples of the patients (1.4%).

Conclusion: Low prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* was detected in symptomatic children under 5 years of age during the Covid-19 pandemic. Examination of these samples for viruses and other microbial agents can clarify the etiology of diarrhea in children referred to the hospitals.

Keywords*:* Diarrhea, Children, Salmonella, Campylobacter, Cytolethal distending toxin

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]