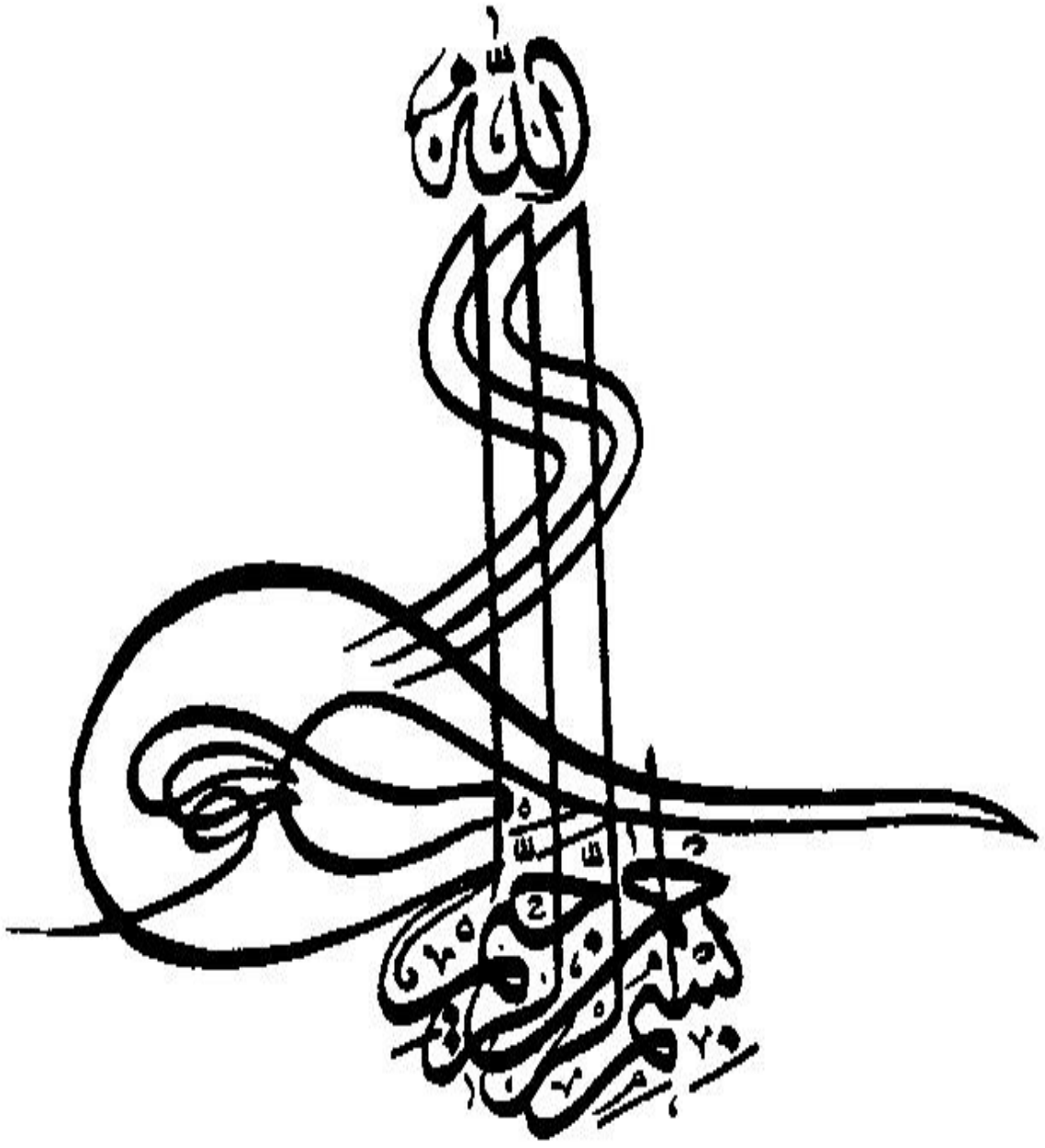

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی

شناسایی گونه های کمپیلوباکتر از مدفوع سگ و گربه های مراجعه کننده به بیمارستان های دام های کوچک تهران، با استفاده از مولتی پلکس PCR

استاد راهنما

دکترمحمدرضا محزونیه

استاد مشاور

دکتر تقی زهرائی صالحی

پژوهشگر

مهوش قربانی

بهمن ماه ۱۳۹۱

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه خانم **مهوش قربانی** جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی با عنوان **شناسایی گونه های کمپیلوباکتر از مدفوع سگ و گربه های مراجعه کننده به بیمارستان های دام های کوچک تهران،** با استفاده از مولتی پلکس PCR در تاریخ **۲۸/ ۱۱ /۹۱** با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه/ نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت

۱. استاد راهنمای پایان نامه

آقای دکتر محمدرضا محزونیه با مرتبه علمی دانشیار **امضاء**

۲. استاد مشاور پایان نامه

آقای دکتر تقی زهرائی صالحی مرتبه علمی استاد **امضاء**

۳. استادان داور پایان نامه

آقای دکتر عزیزاله ابراهیمی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

آقای دکترعزیزاله فلاح مهرجویی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

مسوولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر سعید حبیبیان

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی

رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر:

اکنون که به لطف و عنایت پروردگار، این تحقیق به سرانجام رسید، شایسته است تا از زحمات و مساعدت‌های کلیه عزیزانی که مرا در پیشبرد آن یاری نمودند تشکر نمایم. در ابتدا لازم میدانم تا مراتب سپاسگزاری خود را از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر محمدرضا محزونیه که در طول انجام تحقیق، همواره از راهنمایی های علمی ایشان بهره برده ام، بجای آورم و از درگاه الهی آرزوی تندرستی و توفیق روزافزون ایشان را دارم، باشد که همواره راهنما و هدایتگر دانش پژوهان این مرزو بوم باشند.

همچنین از استاد ارجمند جناب آقای دکتر تقی زهرائی صالحی، مشاور محترم این پایان نامه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از سر کار خانم یکتنه نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از استاتید ارجمند جناب آقای دکتر ابراهیمی، جناب آقای دکتر مشتاقی، جناب آقای دکتر بنیادیان، جناب آقای دکتر کریمی، جناب آقای دکتر نورانی، جناب آقای دکتر صافی، جناب آقای دکتر بهشتی، جناب آقای مهندس خسروی، سر کار خانم لطفعلیان تشکر و قدردانی می کنم که از تجارب همه این عزیزان در نوشتن این پایان نامه بهره جسته ام.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم که همواره همراه من بودند.

خواهران و برادرانم که عاشقانه آنها را دوست دارم.

چکیده

کمپیلوباکتر یکی از عوامل مهم ایجاد گاستروآنتریت درانسان می‌باشد. از آنجا که کمپیلوباکتریوز بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شود، در بعضی موارد منشأ عفونت برای انسان، حیوانات حامل باکتری می‌باشند. سگ و گربه‌های آلوده ممکن است بدون علائم بالینی بوده ولی باکتری را از خود دفع می‌نمایند و گاهی هم علائم بالینی (انتریت، اسهال) در آن‌ها دیده می‌شود. به همین دلیل تشخیص سریع و دقیق حیوانات آلوده مهم است. هدف این تحقیق تعیین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر بوسیله آزمایش PCR در نمونه مدفوع سگ و گربه‌های ارجاعی به بیمارستان‌های دام کوچک شهر تهران، بوده است. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه مدفوع سگ و گربه اهلی در شهر تهران بررسی شد. نمونه‌های مدفوع گرفته شده به آزمایشگاه منتقل و DNA از نمونه‌های مذکور استخراج شد. پرایمرهای مورد استفاده، برای جستجوی توالی‌های اختصاصی در ژن‌های *16s rRNA*، *gly* A، *map*A و *lpx*A کمپیلوباکتر انتخاب شدند. ابتدا با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال موارد مثبت که حاوی توالی نوکلئوتیدی خاص جنس کمپیلو باکتر بود، شناسائی و سپس با روش مولتی پلکس PCR (Multiplex PCR) تعیین هویت گونه‌ها انجام شد. سپس محصول PCR با الکتروفورز در ژل، آنالیز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید باندهای ایجاد شده با دستگاه UV مشاهده شدند. ۳۹ نمونه به عنوان جنس کمپیلوباکتر شناخته شدند.۲نمونه متعلق به گونه *کمپیلوباکتر ژژونی* (*Campylobacter jejuni*) و ۱۱ نمونه *کمپیلوباکتر آپسالانسیس* (*Campylobacter upsaliensis*) بودند. با آنالیز آماری (SPSS) به روش مربع کای، نشان داده شد که ابتلاء به *کمپیلو باکتر آپسالانسیس* در گربه نسبت به سگ بیشتر است ($p\leq0.05$). نتایج بررسی نشان داد که می‌توان از روش PCR به عنوان روش تشخیصی سریع برای شناسایی باکتری‌های جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های متعلق به آن در نمونه مدفوع حیوانات بیمار یا حامل استفاده کرد، بدون اینکه نیازی به کشت میکروبی و استفاده از آنتی‌بادی‌های متعدد و گرانقیمت باشد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر، سگ، گربه، تهران، ایران، *PCR*

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول: مقدمه ۷

فصل دوم: کلیات ۹

۲-۱- تاریخچه ۱۰
۲-۲- مورفولوژی کمپیلوباکترها ۱۰
۲-۳- فیزیولوژی ۱۲
۲-۳-۱- آنتی ژ ن های کمپیلوباکتر ۱۳
۲-۴- طبقه بندی کمپیلوباکترها ۱۳
۲-۵- اکولوژی کمپیلوباکترها ۱۴
۲-۵-۱- *کمپیلوباکتر فتوس* ۱۴
۲-۵-۲- *کمپیلوباکتر ژژونی* ۱۵
۲-۵-۳- *کمپیلوباکتر کولی* ۱۵
۲-۵-۴- *کمپیلوباکتر هیواینتستینالیس* ۱۵
۲-۵-۵- *کمپیلوباکتر اسپاتروم* ۱۵
۲-۵-۶- *کمپیلوباکتر لاری* ۱۵
۲-۵-۷- *کمپیلوباکتر آپسالیانسیس* و *کمپیلوباکتر هلوتیکوس* ۱۶
۲-۵-۸- *کمپیلوباکتر رکتوس*، *کمپیلوباکتر گراسیلیس* و *کمپیلوباکتر شوای* ۱۶
۲-۵-۹- *کمپیلوباکتر کانسیسوس* و *کمپیلوباکتر کاروووس* ۱۶
۲-۵-۱۰- *کمپیلوباکتر هیولی* ۱۶
۲-۵-۱۱- *کمپیلوباکتر سینادی* و *کمپیلوباکتر فنلیا* ۱۶
۲-۶- بیماری زایی گونه های کمپیلوباکتر در انسان ۱۶
۲-۷- شیوع کمپیلوباکترها ۱۷
۲-۸- انواع نمونه های مورد مطالعه ۲۰
۲-۸-۱- نمونه های غذایی ۲۰
۲-۸-۲- نمونه های مدفوعی ۲۰
۲-۸-۳- نمونه های خونی ۲۰
۲-۸-۴- مایعات بدن ۲۰
۲-۸-۵- بیوپسی ۲۱
۲-۸-۶- خاک ۲۱
۲-۸-۷- آب ۲۱
۲-۹- اپیدمیولوژی ۲۱
۲-۹-۱- مخازن باکتری ۲۱
۲-۹-۱-۱- انسان ۲۱
۲-۹-۱-۲- حیوان ۲۱

۲-۹-۱-۳- آب ۲۲
۲-۹-۱-۴- خاک ۲۲
۲-۹-۲- انتقال ۲۲
۲-۱۰- جدا سازی کمپیلوباکتر ۲۲
۲-۱۰-۱- جدا سازی و تشخیص بر اساس روش های سنتی رایج ۲۲
۲-۱۰-۱-۱- انواع محیط کشت جهت غنی سازی در روش های سنتی رایج ۲۲
۲-۱۰-۱-۲- انواع محیط کشت جهت کشت اختصاصی در روش های سنتی رایج ۲۳
۲-۱۰-۲- آزمایشات مختلف جهت شناسایی کمپیلوباکترها در روش های سنتی رایج ۲۴
۲-۱۰-۲-۱- تست کاتالاز ۲۴
۲-۱۰-۲-۲- تست اکسیداز ۲۴
۲-۱۰-۲-۳- تست هیدرولیز هیپورات ۲۴
۲-۱۰-۳- جداسازی توسط فیلتراسیون غشایی ۲۵
۲-۱۰-۴- ایمنوفلوئورسانس ۲۵
۲-۱۰- ۵- روش های مولکولی ۲۶
۲-۱۰-۵-۱- هیبریداسیون DNA-DNA ۲۶
۲-۱۰-۵-۲- تکنیک PCR ۲۶
۲-۱۰- ۵-۳- تکنیک Real time PCR (RT) ۲۶
۲-۱۰- ۵-۴ - تکنیک Multi-plex PCR ۲۶
۲-۱۰- ۵- ۵- PCR و بررسی پروفیل پروتیینی با SDS-PAGE ۲۷
۲-۱۰- ۶- سنجش های بر پایه ایمنی ۲۷
۲-۱۰- ۷- بررسی الگوهای ایزوآنزیمی به روش (MLEE = IEE) ۲۷
۲ - ۱۱- روش نگهداری سویه ها با استفاده از Skim milk ۲۷
۲ - ۱۲- تیپ بندی و تعیین هویت ایزوله های کمپیلوباکتر ۲۷
۲-۱۳- روش های تمایز *کمپیلوباکتر ژژونی* از *کمپیلوباکتر کولی* ۲۷
۲-۱۴- بیماریزایی کمپیلوباکتر ۲۸
۲- ۱۴-۱- فاکتور های ویرولانس کمپیلوباکتر ۲۹
۲- ۱۴-۱-۱- اتصال و تهاجم ۳۰
۲-۱۴-۱-۲- آنتی ژن K ۳۰
۲- ۱۴-۱-۳- آنتی ژن سوماتیک O ۳۰
۲-۱۴-۲- پاتوژنز کمپیلوباکتر ۳۰
۲-۱۴-۳- پاتولوژی کمپیلوباکتر ۳۱
۲- ۱۴-۴- تظاهرات بالینی کمپیلوباکتر ۳۳
۲-۱۵- آنتی بیوتیک ها و مقاومت در برابر آن ها ۳۴
۲- ۱۵-۱- آنتی بیوتیک ها ۳۴
۲- ۱۵-۲- مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها ۳۴
۲- ۱۶- آزمایشات تعیین حساسیت باکتری ۳۵
۲- ۱۶-۱- روش انتشار از طریق دیسک (Disk Diffusion Test) ۳۵

۲-۱۶-۲ تعیین MICبه روش Dilution method ۳۵
فصل سوم: مواد و روش ها ۳۶

۳- ۱- مواد مورد نیاز ۳۶
۳-۱-۱- کیت تخلیصDNA ۳۶
۳-۱-۲- پرایمرها ۳۶
۳-۱-۳- سوش استاندارد ۳۶
۳-۲- نمونه گیری از بیماران ۳۶
۳-۳- کشت کمپیلوباکتر ۳۸
۳- ۴- شناسایی و تایید کمپیلوباکتر ۳۹
۳- ۴-۱- تشخیص کلونی ها ۳۹
۳- ۴-۲- رنگ آمیزی گرم ۳۹
۳- ۵- روش نگهداری سویه ها ۴۰
۳-۶- روش استخراجDNA کمپیلوباکتر از نمونه های مدفوعی ۴۰
۳- ۷- پرایمرها ۴۰
۳- ۸- واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ۴۱
۳- ۹- روش انجام الکتروفورز ۴۳

فصل چهارم: نتایج ۴۴

۴-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۴۴

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۵۹

پیشنهادات ۶۳

منابع ۶۴

شکل ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۲-۱- (gull wing) در کمپیلوباکتر ۱۰
نمودار ۲-۱- شیوع کمپیلوباکتر به طور نسبی در طول سال های ۱۹۷۷تا ۱۹۹۷ میلادی در انگلستان ۱۷
نمودار ۲-۲- میزان شیوع *کمپیلوباکتر یوزیس* و تعداد نفراتی که تا سال ۲۰۰۶ بستری شده اند ۱۸
نمودار ۲-۳- بررسی شیوع عفونت های گوارشی و عوامل ایجاد کننده آن در آمریکا در نوامبر ۲۰۰۷ ۱۸
نمودار ۲-۴- بررسی شیوع عفونت های گوارشی و عوامل ایجاد کننده آن در آمریکا در آپریل ۲۰۰۹ ۱۹
نمودار ۲- ۵- بررسی شیوع عفونت های گوارشی در ایرلند شمالی در سال ۲۰۱۰ بین سال های ۱۹۹۵ و ۲۰۱۰ ۱۹
نمودار ۲- ۶- شیوع کمپیلوباکتر در سنین مختلف ۲۰
شکل ۲-۲- ترکیب نشانگر فلورسانس با سلول های آلوده به کمپیلوباکتر ۲۵
شکل ۲-۳- نکروز ایجاد شده در فرد مبتلا به آپاندیسیت توسط *کمپیلوباکتر ژژونی* ۳۱
شکل ۲- ۴- زخم ایجاد شده در مخاط روده توسط *کمپیلوباکتر ژژونی* ۳۲
شکل ۲- ۵- نفوذ نوتروفیل ها را به منطقه مخاطی و زیر مخاطی ناحیه زخم ایجاد شده توسط *کمپیلوباکتر ژژونی* ۳۲
شکل ۲- ۶- التهاب حاد فراگیری که در کل دیواره روده در اثر تهاجم *کمپیلوباکتر ژژونی* در فرد مذکور ایجاد شده ۳۲
شکل ۳-۱- کمپیلو باکترکشت داده شده توسط موسسه رازی ۳۹
شکل ۴-۱- PCR تشخیصی ژن *16srRNA* کمپیلوباکتر جدا شده از نمونه استاندارد ۴۴
شکل ۴-۲- PCR تشخیصی ژن ۱۶srRNA کمپیلوباکتر جدا شده از نمونه ها ۴۵
شکل ۴-۳- PCR تشخیصی ژن *16srRNA* کمپیلوباکتر جدا شده از نمونه ها ۴۵
شکل ۴-۴- مولتی پلکس PCR تشخیصی ژن *mapA* از *کمپیلوباکتر ژژونی* و ژن *lpxA* از *کمپیلوباکتر آپسالانسیس* ۴۶
۴-۱- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با سن گربه ۴۸
۴-۲- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با سن گربه ۴۸
۴-۳- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با سن گربه ۴۹
۴-۴- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با سن سگ ۴۹
۴-۵- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با سن سگ ۵۰
۴-۶- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با سن سگ ۵۰
۴-۷- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با جنس گربه ۵۱
۴-۸- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با جنس گربه ۵۱
۴-۹- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با جنس گربه ۵۲
۴-۱۰- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با نژاد گربه ۵۲
۴-۱۱- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با نژاد گربه ۵۳
۴-۱۲- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با نژاد گربه ۵۳
۴-۱۳- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با سن سگ ۵۴
۴-۱۴- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با سن سگ ۵۴
۴-۱۵- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با سن سگ ۵۵
۴-۱۶- ارتباط شیوع کمپیلوباکتر با نژاد سگ ۵۵
۴-۱۷- ارتباط شیوع *کمپیلوباکترآپسالانسیس* با نژاد سگ ۵۶

۴-۱۸- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* با نژاد سگ ۵۶
۴-۱۹- تفاوت شیوع کمپیلوباکتر در سگ و گربه ۵۷
۴-۲۰- تفاوت شیوع *کمپیلوباکترآ پسالانسیس* در سگ و گربه ۵۷
۴-۲۱- ارتباط شیوع *کمپیلوباکتر ژژونی* در سگ و گربه ۵۸

جدول ها

عنوان شماره صفحه

جدول ۲-۱- گونه ها و زیر گونه های کمپیلوباکتر ۱۱
جدول ۲-۲- رده بندی کمپیلوباکتر بر اساس طبقه بندی sebald & veron ۱۴
جدول ۲-۳- بیماری زایی گونه های کمپیلوباکتر در انسان ۱۷
جدول ۲-۴- آزمایش های رایج بیوشیمیایی جهت تشخیص کمپیلوباکتر ۲۵
جدول ۳-۱- سگ و گربه های ارجاعی به بیمارستان حیوانات خانگی شهر تهران ۳۷
جدول ۳-۲- توالی پرایمر های رفت و برگشت *16S rRNA* ۴۰
جدول ۳-۳- توالی پرایمر های رفت و برگشت *glyA* درگونه *کمپیلوباکتر لاری* ۴۱
جدول۳-۴- توالی پرایمر های رفت و برگشت *lpxA* در گونه *کمپیلوباکتر آپسالانسیس* ۴۱
جدول ۳-۵- توالی پرایمر های رفت و برگشت *mapA* در گونه *کمپیلوباکتر* ژژونی ۴۱
جدول۳-۶- مخلوط واکنش PCR ۴۲
جدول۳-۷- شرایط و چگونگی انجام واکنش PCR در ترموسیکلر ۴۲
جدول ۴-۱- بررسی آماری انجام شده به روش مربع کای ۴۷

فصل اول

مقدمه

کمپیلوباکتر (Campylobacter)، باسیل گرم منفی، متحرک، بدون اسپور، شبیه بال مرغ دریایی (Seagullwing)، غیر تخمیر کننده و به استثناء گونه‌ی *کمپیلوباکتر گراسیلیس* (*C.gracilis*) اکسیداز مثبت هستند. بیشتر گونه‌های این جنس میکرو آئروفیلیک بوده و در محیط آگار خوندار تحت شرایط میزان کم اکسیژن به آسانی رشد می‌کنند. کمپیلوباکتر دارای ۱۸ گونه و زیر گونه است. از بین گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر، آپسالانسیس (*C.upsaliensis*)، ژژونی (*C.jejuni*)، کولی (*C.coli*)، هیولی (*C.hyoli*)، لاری (*C.lar*i)، هلوتیکوس (*C.helveticus*) حرارت دوست (Thermophilic) هستند. دوز عفونی این میکروارگانیسم برای حیوانات و انسان پایین می‌باشد. کمپیلوباکتر یک عامل بیماری مشترک بین انسان و حیوان است. این باکتری در طبیعت پراکندگی وسیعی داشته و فلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات اهلی و وحشی می‌باشد [۱،۳]. رایج ترین گونه‌های کمپیلوباکتر در منابع دامی و غذایی *کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کولی، کمپیلوباکتر لاری و کمپیلوباکتر آپسالانسیس* بوده در حالی که ژژونی و کولی شایعترین گونه‌ها در ایجاد گاستروآنتریت در انسان می‌باشند [۴]. این باکتری را می‌توان غالباً از ماکیان، خوک، گاو، شیر خام، مدفوع مبتلایان به آنتریت، خون، دستگاه گوارش و تناسلی، مایع نخاع، انواع آبسه‌ها و عفونت‌های لثه، جفت و جنین‌های سقط شده و اسپرم جدا کرد [۵۱،۱۱۶]. قدرت زیاد تهاجم به بافت، اتصال و کلونیزاسیون، وجود تاژک، LPS، توکسین‌ها (انتروتوکسین و سیتوتوکسین‌ها) و آنتی ژن‌ها، فاکتورهای بیماریزایی کمپیلوباکترها می‌باشند [۱۱۴]. در هر سال حدود ۲ میلیون موارد منتهی به مرگ به علت ابتلا به اسهال اتفاق می‌افتد. *سالمونلا، شیگلا*، کمپیلوباکتر سه عامل شایع اسهال‌های باکتریایی در سراسر جهان هستند. از جمله افراد در معرض خطر، کودکان، افراد سالخورده و افرادی هستند که سیستم ایمنی ضعیفی دارند [۵]. تماس با حیوانات خانگی و سگ‌های اهلی یکی از راه‌های انتقال این میکروارگانیسم است. علاوه برگاستروانتریت، کمپیلوباکتریوز در افرادی که دارایHLA B-27 هستند، احتمالاً منجر به سندرم گیلن باره (Guillain-Barre) می‌گردد. این سندرم به علت واکنش متقاطع بین نوروگانگلیوزیدها (Neurogangliosid) و لیپوپلی ساکارید *کمپیلوباکتر ژژونی تیپ O:19* و گاهی هم *کمپیلوباکتر آپسالانسیس* اتفاق می‌افتد. این

سندرم و آرتریت دو عارضه مهم و دیررس عفونت کمپیلوباکتر هستند [۶]. کمپیلوباکتر از مهم ترین عوامل گاستروانتریت باکتریایی حاد در کشورهای توسعه یافته و کشورهای در حال توسعه می‌باشد [۵۲،۱۲۹]. کمپیلوباکتر یکی از شایع ترین علل آنتریت باکتریایی انسانی در سراسر دنیا محسوب می‌شود[۸۰ ،۴۸]. با توجه به اهمیت موضوع از نظر اقتصادی و بهداشتی و سلامت جوامع انسانی، تشخیص سریع و دقیق این میکروارگانیسم ضروری می‌باشد. در این تحقیق برای رسیدن به این مقصود از روش مولتی پلکس PCR برای شناسائی حیوانات حامل و بیمار مبتلا به گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر استفاده شد. هدف ما تعیین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر بوسیله تست PCR در نمونه مدفوع سگ و گربه‌های ارجاعی به بیمارستان‌های دام کوچک، شهر تهران، بود. در این بررسی موفق به جداسازی جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر شده و همچنین دریافتیم که میزان شیوع *کمپیلوباکتر آپسالانسیس* در گربه‌های بدون علائم بالینی، بیشتر از سگ‌های بدون علائم بالینی است. از نظر *کمپیلو باکتر لاری* هر دو گونه حیوان منفی بودند.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تاریخچه

در سال۱۸۸۶، Esherich ارگانیسم هایی مشابه کمپیلوباکتر در مدفوع کودکان مبتلا به اسهال مشاهده نمود.
در سال۱۹۱۳، برای نخستین بار در انگلستان توسط Fadyean و Stockman به عنوان عامل سقط جنین در گوسفند معرفی گردید.
در سال۱۹۱۸، در آمریکا ارگانیزم مشابهی که باعث سقط جنین در گاو بود توسط Smitt مشاهده شد که ویبریو فتوس نام گرفت.
در سال ۱۹۵۹، Florent گونه‌ای از *کمپیلوباکتر فتوس (Campylobacter fetus)* را نشان داد که در طی مقاربت از گاو نر به گاو ماده سرایت می‌کرد و آن را واریته ونرالیس (venerealis) نامید.
اسم کمپیلوباکتر برای ویبریوهای میکروائروفیل (Microaerophil) که عامل دوگروه مهم از بیماری‌ها یعنی عفونت جنسی گاو و گوسفند و انتروکولیت (Enterocolitis) انسان بودند، انتخاب شد.
در سال۱۹۲۷، Smitt و Orcsutt توانستند از کبد و طحال گوساله‌های مبتلا به اسهال ویبریوهای میکروآئروفیلیک را جدا کنند.
در سال۱۹۴۴، از کولون خوک‌های مبتلا به دیسانتری (Disantery) باکتری‌های مشابهی جدا شده و *ویبریو کولی* نامیده شد.
در سال۱۹۳۱، Jones و همکاران از گاوهای دچار اختلالات روده ای، باکتری‌های خمیده‌ای جداسازی و به آن‌ها نام *ویبریو ژژونی* اطلاق کردند [۱۱۶].
در سال ۱۹۴۷، Vinzent دریافت که عامل سقط جنین در انسان سپتی سمی (Septicemia) ناشی از *کمپیلوباکتر فتوس* بود [۵۳،۱۳۵].
در سال ۱۹۵۷، King با مطالعه کامل روی ویبریوهای جدا شده از اسهال، دریافت که این باکتری‌ها خواص ویژه خود را دارا هستند و آن‌ها را که در ابتدا به علت ساختمان سلولی خمیده خود کمپیلوباکتر *نامیده بودند*، به عنوان یکی از گونه‌های ویبریو شناختند، و ویبریوهای وابسته نامیدند [۶۷، ۴۷، ۳۰].

در سال۱۹۶۳، در مطالعه Veron و Sebald روی این باکتری ها، میزان گوانین و سیتوزین بین ۲۹ تا ۳۸ درصد تعیین شد و این باکتری‌ها کمپیلوباکتر نامیده شدند [۱۰۴، ۴۷، ۱۰].

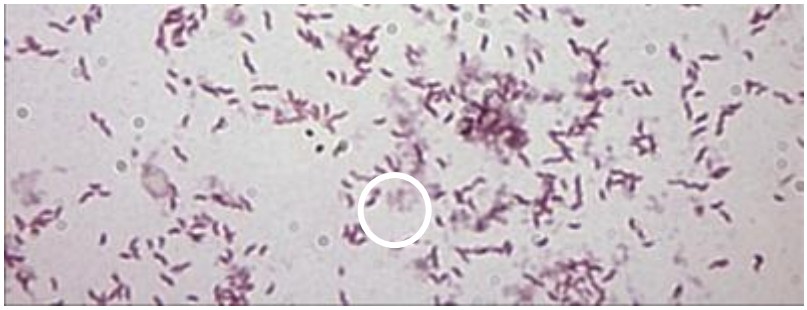
در سال۱۹۶۸، Balseden و در سال ۱۹۷۳ Report این مطالعات را تکمیل نموده و کمپیلوباکتر را به عنوان جنسی با گونه‌های متعدد معرفی نمودند [۱۲۲].

در سال ۱۹۷۲، Dekeyest و همکارانش *کمپیلوباکتر ژژونی* را با استفاده از فیلترهای خاص از مدفوع انسان جدا کردند و به همین علت کمپیلوباکتر که تا بدین جا تنها از نظر میکروبیولوژی دامی اهمیت داشت، از سال‌های (۱۹۷۳ تا ۱۹۷۵) به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت غذایی در انسان شناخته شد [۱۰۳].

از سال ۱۹۷۸ تا ۱۹۹۶، ۱۱۱ هزار مورد کمپیلوباکتریوز به مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری در آمریکا گزارش شد که در نتیجه آن ۹۹۱۳ نفر بیمار بستری شده بودند. مصرف آب غیرکلرینه، شیر خام و گوشت نیم پز علت عمده بیماری ذکر شد [۱۰۳].

۲-۲- مورفولوژی کمپیلوباکترها

واژه "کمپیلو" از کلمه یونانی به معنی باسیل خمیده مشتق شده است، زیرا شکل یک مارپیچ ناقص، یک ویرگول و یا S را دارا می‌باشد. کمپیلوباکترها میکروارگانیزم‌هایی میله‌ای شکل گرم منفی، غیراسپورزا، متحرک (بجز گراسیلیس و هومینیس)، میکروآئروفیل و ترموفیل هستند که به خانوادهٔ کمپیلوباکتریاسه تعلّق دارند که متشکل از ۱۸ گونه و زیر گونه می‌باشد. این باکتری در دستگاه گوارشی طیف وسیعی از موجودات وجود دارند [۲۷، ۱۱۶]. این باکتری به طول (۵- ۰/۵) میکرومتر و عرض (۰/۹- ۰/۲) میکرومتر بوده و می‌تواند به صورت تک تک، دوتایی و دسته‌ای باشد، گاهی به صورت زنجیره‌های کوتاه و گاهی به صورت دسته جمعی به شکل (Gull wing) دیده می‌شود (شکل ۲-۱، جدول ۲-۱).



شکل ۲-۱: شکل (gull wing) **در کمپیلوباکتر** [۶۸]

جدول۲-۱: جنس،گونه‌ها و زیر گونه‌های کمپیلو باکتر [۱۱۶].

خانواده	گونه	زیر گونه	مخازن
Campylobacter	*jejuni*	*Jejuni*	مرغ خانگی، خوک، سگ وگربه، گاو، پرندگان،
		Doylei	راسو، خرگوش، حشرات
			انسان
	Coli		انسان،مرغ خانگی، خوک، گاو و گوسفند،
	upsaliensis		پرندگان
			سگ وگربه ، انسان، گاو
		Venerealis	گاو
	fetus	*fetus*	گاو و گوسفند، انسان
	hyointestinalis	*Hyointestinalis*	خوک، گاو، هامستر، آهو
		Lawsonil	خوک
	concisus		انسان
	sputorum	*sputorum*	انسان
		bubulus	گاو و گوسفند
		fecalis	گاو و گوسفند
	Curvus		انسان
	rectus		انسان
	Showae		انسان
	Gracilis		انسان
	ureolyticus		انسان
	lari		مرغ خانگی، پرندگان خوک آبی، سگ وگربه،
			اسب، میمون
	Hyoli		خوک
	Lanienae		انسان و خوک
	mucosalis		خوک وگراز
	helveticus		سگ و گربه
	hominis		انسان

این باکتری دارای فلاژل قطبی در یک یا دو انتها بوده که منجر به حرکت سریع مارپیچی و دارتی شکل آن می‌شود، طول فلاژل ۲ تا ۳ برابر باکتری بوده و عرض آن حدود ۱۸ نانومتر می‌باشد [۴۷، ۱۰]. *کمپیلوباکتر شوای* دارای چند تاژک قطبی و *کمپلوباکتر گراسیلیس* فاقد تاژک است [۱۱۶].
تاکنون بیش از ۵۰ سروتیپ از این باکتری براساس وجود آنتی ژن‌های کپسولی و یا آنتی ژن‌های تاژکی ناپایدار در برابر حرارت شناسایی شده اند [۱۵، ۹۵،۱۳۵].

۲-۳-فیزیولوژی

ویژگی قابل توجه کمپیلوباکتر وجود چند خمیدگی یا حالت اسپرال (Spiral) بودنش هست که این امکان را فراهم می‌آورد تا بتواند به راحتی در محیط موکوس حرکت کند. *کمپیلوباکترِ ژژونی، کمپیلوباکتر کولی، کمپیلوباکتر لاری و کمپیلوباکتر آپسالانسیس* ترموفیل بوده و دمای بهینه رشد برای این باکتری‌ها ۴۲°C می‌باشد و دارای کلنی شبیه قطره هستند. دمای مناسب رشد *کمپیلوباکتر فتوس* و بقیه کمپیلوباکترها ۳۷°C می‌باشد و دارای کلنی پهن، گرد و مقعر هستند. این باکتری میکروآئروفیل بوده و شرایط اتمسفری مناسب رشد آن محتوی ۵ درصد اکسیژن، ۱۰ درصد دی اکسید کربن و ۸۵ درصد نیتروژن می‌باشد [۲۴، ۸۵،۱۱۶، ۱۵].
خانواده کمپیلوباکتریاسه در مقایسه با خانواده انتروباکتریاسه نسبت به خشکی، انجماد، pH اسیدی، پاستوریزاسیون، پرتوتابی حساس تر بوده و عدم رشد در حضور ۳/۵ درصد نمک در اغلب موارد مشاهده می‌شود [۱۵،۲۲، ۶۵، ۸۵].
انجماد و ذوب کردن نمونه‌ها از تعداد باکتری فعال کم می‌کند. در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد این باکتری زنده می‌ماند. درحرارت اتاق *کمپیلوباکتر ژژونی* ۵-۳ روز در حضور ۴/۵ درصد نمک، زنده می‌ماند اما تعداد آن کم می‌شود و چند هفته در دمای ۴°C زنده می‌ماند. اسیدآسکوربیک آن را از بین می‌برد. کمپیلو باکترها ساکارولیتیک (Sacarolitic) نیستند [۱۱۶].
این باکتری نسبت به حضور اکسیژن بسیار حساس است. مشتقات سمی اکسیژن نظیر آنیون‌های سوپر اکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل، اکسیژن تک اتمی و هیدروکسید اکسیژن که در نتیجهٔ احیاء اکسیژن در طی متابولیسم سلولی و اتواکسیداسیون (Autoxidation) تولید می‌شوند، برای رشد *کمپیلوباکتر* مضر می‌باشند. تصور می‌شود افزودن برخی ترکیبات نظیر خون، سدیم متا بی سولفات، فروس سولفات، سدیم پیروات و ذغال به محیط‌های کشت با از بین بردن مشتقات سمی اکسیژن موجب تسهیل در رشد این باکتری می‌شود. به طور مثال آهن موجود در خون، با جذب اکسیژن آزاد محیط، شرایط مناسب را جهت رشد فراهم می‌کند [۸۰].
پس از گذشت ۷۲ ساعت از جداسازی اولیه، باکتری به حالت زنده ولی غیر قابل کشت می‌باشد. در آزمایش‌های بیوشیمیایی، این باکتری به طور طبیعی کاتالاز و اکسیداز مثبت (بجز گراسیلیس) بوده، به سفالوتین مقاوم و نسبت به نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid) حساس می‌باشد، البته در سال‌های اخیر در نتیجهٔ استفاده غیرعلمی آنتی بیوتیک‌ها در انسان و دام، با ایجاد مقاومت اکتسابی، این نتایج تغییر کرده و حتی در مواردی بر عکس شده است که نمونه آن مقاومت به نالیدیکسیک اسید در برخی سویه‌ها می‌باشد. از