Research Paper

Detection of Streptococcus Gallolithicus in People Undergoing Colonoscopy by Chain Reaction (PCR) and Culture

Haniyeh Bashi zadeh Fakhar[1*], Foroogh Eshaghi kojor[2], Masoud Ghane[3], Javad Shokri[4]

1. Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Islamic Azad University, Chalous Branch, Chalous, Iran
2. Master of Microbiology, Islamic Azad University, Chalous Branch, Chalous, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Nekabon, Iran
4. Associate Professor, Department of Internal Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Received: 2022/05/30 **Accepted:** 2021/11/31

Abstract

Introduction: Streptococcus galloliticus is one of the bacteria associated with colorectal cancer in humans. No studies have been performed to identify this bacterium in the large intestine using PCR test and compare it with microbial culture in patients undergoing colonoscopy in northern Iran.

Materials and Methods: In a descriptive study to diagnose Streptococcus gallolyticus, biopsy specimens were obtained from 55 individuals undergoing colonoscopy referred to Babol and Chalous hospitals. To detect bacteria after DNA extraction, first designed primers (PCO3, PCO4) were used to qualitatively analyze the extracted DNA and then the specific gene of Streptococcus gallolyticus was amplified. In addition to culture, diagnostic tests such as gram staining, catalase test, hydrolase, hydrate hydrolysis and scolin hydrolysis were used.

Results: In this descriptive study, out of 55 biopsy specimens of individuals undergoing colonoscopy, 3 specimens (5.5%) with 95% confidence interval were positive and 52 cases (5.94%) were negative for Streptococcus gallolyticus DNA. There was a significant relationship between the two diagnostic methods of culture and PCR (p.value 0.015).

Conclusion: The simultaneous application of the two methods is recommended in cases where the result is rapid.

***Corresponding Author:** Haniyeh Bashi zadeh Fakhar
Address: Department of Laboratory Sciences, Islamic Azad University, Chalous Branch, Chalous, Iran
Tel: 09120283451
E-mail: Haniyehfakhar@yahoo.com

Keywords: Colonoscopy, Culture, Molecular, Streptococcus gallolithicus,

How to cite this article: Bashi zadeh Fakhar H., Eshaghi kojor F., Ghane M., Shokri J. Detection of Streptococcus gallolithicus in people undergoing colonoscopy by chain reaction (PCR) and culture, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2022; 29(5):655-668.

Copyright © 2022 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

Introduction

The human intestine has the highest number of microbes, so it is normal to predict the role of intestinal microbes on health and disease, especially in colorectal cancer. Bowel cancer is the fourth most common cancer in the world. The incidence of bowel cancer varies from country to country. In the United States and the United Kingdom, colorectal cancer is the second most common cancer after breast cancer in women and prostate cancer in men. In Iran, this type of cancer is increasing and is considered as one of the most important cancers in both sexes. The large intestine is a hollow muscular tube that starts from the end of the small intestine called the ileum and goes to the anus. The colon is the middle part of this intestine. The length of this intestine is 1.5 meters and its largest diameter is at the beginning of the large intestine. Its diameter gradually decreases to reach the rectum. The human intestine is normally exposed to 1014 microorganisms in each milliliter that these bacteria lead to intestinal disease and affect the health of people. Identification of these specific microorganisms allows us to improve our knowledge in the diagnosis, prevention and treatment of these types of cancers. Bacteria associated with colorectal cancer include Streptococcus gallolyticus (S. bovis I biotype) and Helicobacter pylori. Streptococcus gallolyticus subsp. Gallolyticus (sg) formerly known as the Bovis streptococcus 1 biotype is an opportunistic human pathogen that causes bacteremia and endocarditis. This pathogen stimulates cancer cells through the β-catenin signaling pathway and It is naturally present in the gastrointestinal tract of 2.5 to 15% of healthy people. The association between bacteria and colorectal cancer has been studied over four decades using serology. All of these studies have shown that intestinal bacterial infection is associated with an increased risk of colorectal cancer. PCR test is based on DNA detection of Streptococcus gallolyticus in colorectal cancer. Culture of this gram-positive intestinal bacterium is a practical, accurate but slow method in its diagnosis in patients' feces. To date, no study has been performed to identify Streptococcus gallolyticus in the colon using advanced molecular PCR in northern Iran. To be.

Methodology

This study was performed on 55 tissue samples of people undergoing colonoscopy in two spiritual hospitals of Babol and Chalous Social Security Hospital during 8 months from February 2017 to September 2017. The inclusion criteria for the study are all people undergoing colonoscopy. DNA extraction and PCR were performed in a 2 cc microtube containing sterile physiological serum transferred to a molecular laboratory and the other part was transferred to a microbiology laboratory for microbial culture in BHI Broth culture medium.

Microbial culture

First, tissue samples obtained through colonoscopy containing a large content of intestinal microbes were transferred to BHI culture medium and kept in an incubator at 37 ° C for 24 hours. The next day, the color of BHI culture medium changed from light yellow to turbid-muddy and many bacteria were observed in the medium. The passage was then cultured linearly on the new and specific culture medium of KF Streptococcus Agar. After incubation for 24 hours at 37 ° C, very small bacteria of Streptococcus grew in it. In the third stage, a part of the colony was removed, placed on blood agar medium and 4-stage culture was performed to evaluate hemolysis. Then, a part of the colony was transferred to the differential medium of Biecholine Agar and the color change of the medium was examined after 24 hours at 37 ° C. A portion of the colony was removed again on a broth nutrient medium containing 6.5% salt. These three media were incubated for 24 hours at 37 ° C. Catalase testing was performed on a number of grown colonies. After transferring to a tube containing sodium hypurate, some of the colony was placed at 35 ° C for 2 hours. To check the color, a few drops of Ninhydrin reagent were added to the contents of the tube. Finally, after preparation of microbial smear from the grown colonies, hot staining and observation were performed by 100 lens.

PCR

To extract DNA, 25 mg of the tissue of each sample was first placed in a few drops of liquid nitrogen.

DNA extraction from the shredded tissue was performed columnarly according to the instructions of the Favorgene kit made in Taiwan (purchased from Sinaclon) by FATG2 buffers, proteinase K and vatanol. Finally, the Elution Buffer in the kit was used to dissolve the extracted DNA. Extract DNA quantitatively (OD <1.9 <1.6)

and qualitatively used for PCO3 primers: 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC -3 'and (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3') PCO4:, which is a fragment of the gene Reproduces human B-globulin (19), analyzed by PCR.

Through NCBI and Primer3 software, primers 5′-CAATGACAATTCACCATGA-3 ′ and 5′-TTGGTGCTTTTCCTTGTG-3 were designed to amplify the gene of Streptococcus gallolyticus, synthesized by Sinaclon (Sinagen, Iran) and synthesized as final volume. PCR (20 µl) and positive PCR control in vials were amplified in a thermocycler. Different temperature conditions and times were performed for a PCR reaction for the desired genes. Finally, after electrophoresis of the products for 45 minutes. On 2% agarose gel containing 1-5 µg / ml ethidium bromide and PCR products were photographed under UV light.

The results were entered in SPSS 16 software. Thus, the results of PCR and culture in two stages were considered as the gold standard and compared with microbial and PCR findings separately. Also, using kappa test, coordination of microbial culture with PCR was compared P value less than 0.05 was considered as a significant level.

Results

In this descriptive study, 55 patients with a mean age of 52.7 90 13.90 years were studied. According to Table 1, a significant relationship was observed between the history of familial colorectal cancer (p <0.011) and diabetes (p <0.008) with Streptococcus bovis. Out of 55 biopsy specimens of people with colon disease, 3 samples (5.5%) with 95% confidence interval were positive and 52 cases (94.5%) were negative for Streptococcus galloliticus DNA. Using Kappa test, a statistically significant relationship was observed between the prevalence of Streptococcus gallolyticus and colon diseases (p <0.015). Eleven cases (20%) had a history of familial colorectal cancer and in 5 cases (45.5%) they had the above bacteria (p <0.011). Out of 55 subjects, 20 cases (36.4%) had diabetes and 7 cases (35%) had Streptococcus gallolyticus (p <0.008). Showed that all samples were in good condition in terms of DNA quality. Based on PCR test, 3 patients (5.5%) were positive samples and 52 patients (94.5%) were negative samples. Based on culture test, 9 patients (16.4%) were positive samples and 46 patients (83.6%) were negative samples. The diagnosis of Streptococcus gallolyticus was reported. Based on the diagnostic agreement between the two methods, the ratio of 9 culture positives to 3 PCR positives, 2 (3.6%) were reported both molecularly and culture positive, and 7 (12.7%) out of 9 (16.4%) They were negative in PCR test. Kappa test was used to examine the agreement between culture and PCR methods, which was statistically significant (P <0.015). Table 2 shows the diagnostic indicators of culture versus PCR (gold standard PCR) in the diagnosis of Streptococcus gallolithicus in patients with colon diseases. To evaluate the diagnostic indicators of culture, PCR was considered as the standard method. Sensitivity of culture to diagnosis the bacterium Streptococcus galloliticus was 66.67% compared to PCR, which has a 95% confidence interval for the whole statistical sample of 9.43 and a confidence level of 99.16%. Its 95% confidence interval is 74.66% and its confidence level is 94.52%. Also, the ratio of positive probabilities in the cultivation method is 05.05, with a confidence interval of 1.75 and a confidence level of 14.52%. The ratio of negative probabilities of the culture method was 0.38, with a 95% confidence interval of 0.08 and a confidence level of 1.91. 95%), 1.12) and its confidence level is 14.87%. Analysis of the predicted positive cases of cultivation compared to the standard method of 22.22% and its reliability coefficient of 9.03 and its confidence level of 45.11 % is. Diagnostic indices of PCR compared to culture in the diagnosis of Streptococcus gallolyticus in patients with colon diseases also showed that the sensitivity of PCR in the diagnosis of Streptococcus gallolyticus compared to the standard culture method was 22.22% with a reliability of 2.81% and a level of confidence. 95% was equal to 60.01% and the specificity of PCR method compared to culture method was 97.83% with a reliability coefficient of 88.47% and the confidence level (95%) was equal to 99.94%. In PCR method compared to 10.22 culture with a reliability coefficient of 1.03 and 95% confidence level equal to 101.12% and the ratio of negative probabilities of samples in PCR method to culture with 0.80 with a reliability coefficient of 0.56 And the 95% confidence level is equal to 1.13%

Discussion

In this study, which was obtained using culture and PCR techniques, showed that from 55 biopsy tissue samples (including polyps, colitis, cancer,

intestinal inflammation), in the PCR technique, the presence of Streptococcus gallolyticus was 5.5% and in The culture technique was positive by 16.4% for the presence of the above bacteria. In the study, Sarokhani et al. By PCR technique were able to show the presence of the above bacterial genome in 36% of patients. In the Gilermo study, after examining 568 biopsy specimens in people over the age of 65, they identified 15 cases of Streptococcus gallolyticus (2.6%) . Pui-ying et al.'s study also showed that out of 537 patients, 12 were positive (2.3%) with polymerase chain reaction and 15 (2.8%) were positive. Comparing the culture method and PCR, it should be noted that in terms of sensitivity of the culture method was more in the detection of bacteria and also the specificity of the molecular method in the diagnosis of Streptococcus gallolyticus was higher. Also, in terms of value, the ratio of positive and negative probabilities in terms of the presence of bacteria in PCR method was 10.22% and 0.80%, respectively, and in culture method, positive and negative probabilities were 5.05% and 0.38%, respectively. Molecular technique considers the possibilities for the presence of bacteria more accurately. The next indicator in bacterial diagnosis is positive and negative predictive value which was 22.22% and 97.87% in culture method and 66.67% and 86.54% in PCR method, respectively, so the positive predictive value in diagnosis The bacterium Streptococcus gallolyticus is more in the molecular method and in the culture method the negative predictive value in the diagnosis of bacteria is more than the molecular one. As a result, the culture method is more accurate in detecting bacteria. The agreement between the two methods was obtained by calculating the kappa coefficient of 0.015, which indicates the above agreement between the two methods (confirms each other). In the study of Sarokhani et al., The molecular method indicates a sensitivity of 100%, a specificity of 40.6%, a positive predictive value of 48.6% and a negative predictive value of 100%, and showed an agreement between the two methods of 0.33. In Nafisi et al.'s study of biopsy, 78 were positive for polymerase chain reaction and 48 were positive for culture samples. The culture results were 100% consistent with PCR. Rhoads et al. showed that the majority of bacteria treated with molecularly identified were not detectable by culture. Other studies have shown that PCR is more sensitive to bacterial detection than culture. The study by Yousef Zadeh et al. Showed that the comparison between the two culture methods with PCR in MRSA diagnosis showed 91% agreement between the two methods, PCR sensitivity of 99.2% and PCR specificity of 82.8% in bacterial diagnosis . In our study, 11 cases (20%) had a history of familial colorectal cancer, in 5 cases (45.5%) they had the above bacteria ($p < 0.011$). Based on the study of Farajzadeh et al., The prevalence of Streptococcus gallolyticus was observed in 9% of fecal samples of people with colon cancer and 15.9% of people with positive intestinal inflammation. In a study by Abdulamir et al. using one-frequency molecular techniques, they showed that 48.7% of Streptococcus gallolyticus DNA sequences were present in tissue samples from colorectal cancer, compared with 4% in normal intestinal tissue. Other studies have shown that S. bovis bacteria are associated with the presence of colorectal adenocarcinoma, especially in sick women. The results of our study showed that although culture is still one of the definitive methods for diagnosis of Streptococcus gallolyticus and the specificity of this method is higher than PCR technique, but bacterial culture from biopsy with problems such as preparing a special culture medium, providing conditions Prevention of contamination of culture medium with other microorganisms requires several days and specific conditions for colony emergence. The sensitivity obtained in this study was very high due to the freshness of culture media and rapid delivery of samples for culture and sampling. Most samples were taken from the main area of the polyp and cancerous mass. Molecular techniques have created a specific substrate with high sensitivity in the diagnosis of microbial pathogens. The sensitivity and specificity of PCR test depends on the primer used, but one of the most important Interfering factors in the use of PCR contaminants that can occur during extraction, DNA reaction mixing and amplification .

Conclusions

Considering the disadvantages and advantages and characteristics of both methods, currently none of these two methods can be considered as a comprehensive and standard test ,So we recommended the simultaneous use of the two methods in cases where quick results are considered and or there is a suspicion of contamination of the sample or the presence of slow-growing microorganisms.

Acknowledgment

We would like to thank all the people who cooperated in this research.

Conflict Of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

مقاله پژوهشی

شناسایی باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در افراد تحت کلونوسکوپی به روش‌های واکنش‌های زنجیره‌ای (PCR) و کشت

حانیه باشی‌زاده فخار[1*] فروغ اسحقی کجور[2] مسعود قانع[3]، جواد شکری[4]

۱. استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران
۳. دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۴. دانشیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی بابل ،بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹

* نویسنده مسئول: حانیه باشی‌زاده فخار
نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، خ ۱۷ شهریور- چالوس، ایران
تلفن: ۰۹۱۲۰۲۸۳۴۵۱
رایانامه: haniyehfakhar@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0002-0396-461X
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-0396-461X

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس گالولیتیکوس یکی از باکتری‌های مرتبط با ایجاد سرطان کولورکتال در انسان می‌باشد. هیچ مطالعه‌ای برای شناسایی این باکتری در روده بزرگ با استفاده از آزمون PCR و مقایسه آن با روش کشت میکروبی در افراد تحت کولونوسکوپی در شمال ایران انجام نشده است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی برای تشخیص Streptococcus gallolyticus از ۵۵ فرد تحت کولونوسکوپی مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های بابل و چالوس نمونه بیوپسی اخذ گردید. به‌منظور تشخیص باکتری پس از استخراج DNA ابتدا از پرایمرهای طراحی‌شده (PCO3, PCO4) به‌منظور تحلیل کیفی DNA استخراج‌شده استفاده شد و سپس ژن اختصاصی Streptococcus gallolyticus تکثیر یافت. علاوه بر کشت از آزمون‌های تشخیصی، مثل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، هیدرولاز، هیدرولیز هیپورات و هیدرولیز اسکولین استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه توصیفی از ۵۵ نمونه بیوپسی افراد تحت کولونوسکوپی، ۳ نمونه (۵/۵ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد مثبت و ۵۲ مورد (۵/۹۴ درصد) از نظر وجود DNA Streptococcus gallolyticus منفی گزارش شدند. رابطه معنادار بین دو روش تشخیصی کشت و PCR مشاهده گردید (p.value ۰/۰۱۵). در بررسی‌های انجام‌شده در روش کشت، رابطه معنی‌داری بین سابقه کلورکتال کنسر فامیلی، دیابت و وجود باکتری Streptococcus gallolyticus وجود داشت.

نتیجه‌گیری: کاربرد همزمان دو روش، در مواردی که حصول نتیجه سریع مدنظر است، توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

استرپتوکوکوس گالولیتیکوس، کلونوسکوپی، مولکولی، کشت

۱. مقدمه

روده انسان دارای بیشترین تعداد میکروب‌ها می‌باشد؛ بنابراین پیش‌بینی نقش میکروب‌های روده بر سلامت و بیماری به‌خصوص در ایجاد سرطان‌های کولورکتال امری طبیعی می‌باشد [۲,۱]. سرطان روده چهارمین سرطان شایع در جهان است [۳]. میزان بروز سرطان روده در کشورهای مختلف متفاوت است. در آمریکا و انگلستان سرطان کولورکتال دومین سرطان شایع پس از سرطان پستان در زنان و سرطان پروستات در مردان می‌باشد [۵,۴]. در ایران این نوع سرطان رو به افزایش است و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در هر دو جنس می‌باشد [۶]. روده بزرگ یک لوله عضلانی توخالی است که از قسمت انتهایی روده کوچک که ایلئوم نام دارد، شروع می‌شود و به مقعد ختم می‌گردد که کولون بخش میانی این روده می‌باشد. طول این روده ۱/۵ متر و بزرگ‌ترین قطر آن در ابتدای روده بزرگ است. قطر آن به‌تدریج کاهش می‌یابد تا به ناحیه رکتوم می‌رسد [۷]. روده انسان در حالت طبیعی در معرض ۱۰۱۴ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر قرار دارد [۸] که این باکتری‌ها منجر به بیماری روده و درگیر شدن

Copyright © 2022 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۹، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۴۰۱، ص ۶۶۸-۶۵۵
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

وضعیت سلامتی افراد می‌شوند [۹]. شناسایی این میکروارگانیسم‌های خاص باعث می‌شود که ما دانش خود را در راستای تشخیص، پیشگیری و درمان این نوع سرطان‌ها ارتقا دهیم [۱۲-۱۰]. باکتری‌های مرتبط با ایجاد سرطان کولورکتال شامل: استرپتوکوکوس گالولیتیکوس (بیوتایپ S. bovis I) و هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند [۱۳]. Streptococcus gallolyticus subsp. Gallolyticus(sg) که قبلاً به عنوان بیوتایپ استرپتوکوک 1 Bovis شناخته می‌شد یک پاتوژن انسانی فرصت‌طلب است که باعث ایجاد باکتریمی و اندوکاردیت می‌شود. این پاتوژن سلول‌های سرطانی را از طریق مسیر سیگنالینگ β-catenin تحریک می‌کند [۱۵,۱۴]و به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش ۲/۵ تا ۱۵ درصد افراد سالم وجود دارد [۱۶, ۱۷]. ارتباط بین باکتری و سرطان کولورکتال طی چهار دهه با استفاده از سرولوژی مطالعه شده است. تمام این مطالعات نشان داده‌اند که عفونت باکتریایی روده‌ای با افزایش خطر ابتلا به سرطان کولورکتال در ارتباط است [۱۲]. آزمون PCR مبتنی بر تشخیص DNA باکتری Streptococcus gallolyticus در سرطان کولورکتال است. کشت این باکتری گرم مثبت روده‌ای روشی کاربردی، دقیق اما کند در تشخیص آن در مدفوع بیماران می‌باشد [۱۸]. تاکنون هیچ مطالعه‌ای برای شناسایی باکتری Streptococcus gallolyticus در روده بزرگ با استفاده از آزمایش پیشرفته مولکولی PCR در شمال ایران انجام نشده است. بدین منظور بررسی کنونی در راستای شناسایی مولکولی باکتری Streptococcus gallolyticus و مقایسه آن با روش کشت میکروبی در افراد تحت کولونوسکوپی پیشنهاد می‌گردد.

۲. مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت توصیفی پس از اخذ کد اخلاق (IR.IAU.SARI.REC.1396.110) بر روی ۵۵ نمونه بافتی از افراد تحت کولونوسکوپی در دو بیمارستان روحانی بابل و بیمارستان تأمین اجتماعی چالوس طی ۸ ماه از بهمن ۱۳۹۶ تا شهریور ۱۳۹۷ صورت گرفت. پیش از نمونه‌گیری، رضایت آگاهانه از بیماران اخذ گردید. حجم نمونه براساس مطالعه محمدوند و همکارانش در سال ۲۰۱۷ [۳۵] طراحی گردید. چک‌لیستی شامل اطلاعات دموگرافیک مانند سن، جنس، مدت زمان بیماری، محل سکونت، سابقه بیماری در خانواده و داشتن علائم بالینی مانند درد شکم، خونریزی رکتوم، ضعف و خستگی، سابقه رکتوهموراژی، سابقه هموروئید، یبوست، دیابت و یافته‌های کولونوسکوپی شامل (اندازه پولیپ، محل، هیستوپاتولوژی) تهیه گردید و سپس اطلاعات، جمع‌آوری شد. معیار ورود به مطالعه، تمام افراد تحت کولونوسکوپی می‌باشد. بیماران با اطلاعات بالینی یا معاینه کولونوسکوپی ناقص، حذف شدند. نمونه‌های بافت از طریق کولونوسکوپی توسط پزشک متخصص اخذ، بخشی از آن با هدف استخراج DNA و انجام PCR در داخل میکروتیوپ ۲ سی‌سی حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه مولکولی انتقال و در دمای ۲۰- نگهداری گردید و بخش دیگر برای کشت میکروبی در محیط کشت BHI Broth به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل گردید. علاوه بر کشت از آزمون‌های تشخیصی، مثل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، هیدرولاز، هیدرولیز هیپورات و هیدرولیز اسکولین استفاده شد.

کشت میکروبی

ابتدا نمونه‌های بافت اخذ شده از طریق کولونوسکوپی که حاوی محتوای زیادی از میکروب‌های روده بود به محیط کشت BHI انتقال یافت و به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور دمای ۳۷ درجه نگهداری گردید. روز بعد تغییر رنگ محیط کشت BHI از زرد روشن به حالت کدر- گل‌آلود و باکتری‌های فراوان در محیط مشاهده گردید. سپس پاساژ به‌صورت کشت خطی بر روی محیط کشت جدید و اختصاصی KF Streptococcus Agar صورت گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری‌های بسیار ریز استرپتوکوکوس‌ها در آن رشد کردند. در مرحله سوم قسمتی از کلونی برداشته، روی محیط بلاد آگار خوندار برده شد و کشت چهار مرحله‌ای برای بررسی همولیز انجام گردید. سپس قسمتی از کلونی به روی محیط افتراقی بایل اسکولین اگار منتقل گردید و تغییر رنگ محیط پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه بررسی شد. مجدداً قسمتی از کلونی را روی محیط کشت نوترینت براث که حاوی ۶/۵ درصد نمک برده شد. این ۳ محیط پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه بررسی گردید. آزمون کاتالاز بر روی تعدادی از کلونی‌های رشدیافته صورت گرفت. مقداری از کلونی پس از انتقال به لوله حاوی هیپورات سدیم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه قرار گرفت که به‌منظور بررسی رنگ به محتویات لوله چند قطره معرف نین هیدرین اضافه گردید. در انتها پس از تهیه اسمیر میکروبی از کلونی‌های رشدیافته، رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده توسط عدسی ۱۰۰ صورت گرفت.

انجام PCR

به‌منظور استخراج DNA ابتدا ۲۵میلی‌گرم از بافت هر نمونه در چند قطره نیتروژن مایع قرار گرفت. استخراج DNA از بافت خرد شده براساس دستورالعمل کیت Favorgene ساخت کشور تایوان (از شرکت سیناکلون خریداری شد)، به‌صورت ستونی و توسط بافرهای FATG2، پروتئیناز K و اتانول انجام شد. در نهایت برای

محلول کردن DNA استخراجی از Elution Buffer موجود در کیت استفاده گردید. DNA استخراجی از نظر کمی (OD <۱/۹ < ۱/۶) و از نظر کیفی با استفاده برای پرایمرهای PCO3: 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC -3' و (5'-PCO4: CAACTTCATCCACGTTCACC-3') که قطعه‌ای از ژن B-globulin انسانی را تکثیر می‌کنند [۱۹]، توسط PCR تحلیل شد.

از طریق NCBI و نرم‌افزار Primer3 پرایمرهای 5′-CAATGACAATTCACCATGA-3′ و 5′-TTGGTGCTTTTCCTTGTG-3 برای تکثیر ژن باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس طراحی، توسط شرکت سیناکلون (سیناژن، ایران) سنتز و به‌صورت لیوفیلیزه دریافت گردید. سپس حجم نهایی هر واکنش PCR (۲۰ میکرولیتر) و کنترل مثبت PCR در ویال‌ها در دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر قرار گرفت. شرایط دمایی و زمان‌های مختلف برای یک واکنش PCR برای ژن‌های موردنظر اجرا گردید. پس از الکتروفورز محصولات به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۱-۵/ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم برمایدسازی و عکس‌برداری محصولات PCR زیر نور UV انجام گرفت (شکل ۱).

تحلیل آماری

نتایج در نرم‌افزار SPSS 16 وارد گردید. بدین ترتیب که نتایج PCRو کشت در دو مرحله به‌عنوان استاندارد طلایی تلقی شدند و جداگانه با یافته‌های میکروبی و PCR مقایسه گردید. همچنین با استفاده از آزمون آماری کاپا هماهنگی کشت میکروبی با PCR مقایسه شدند. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار محسوب گردید.

۳. یافته‌ها

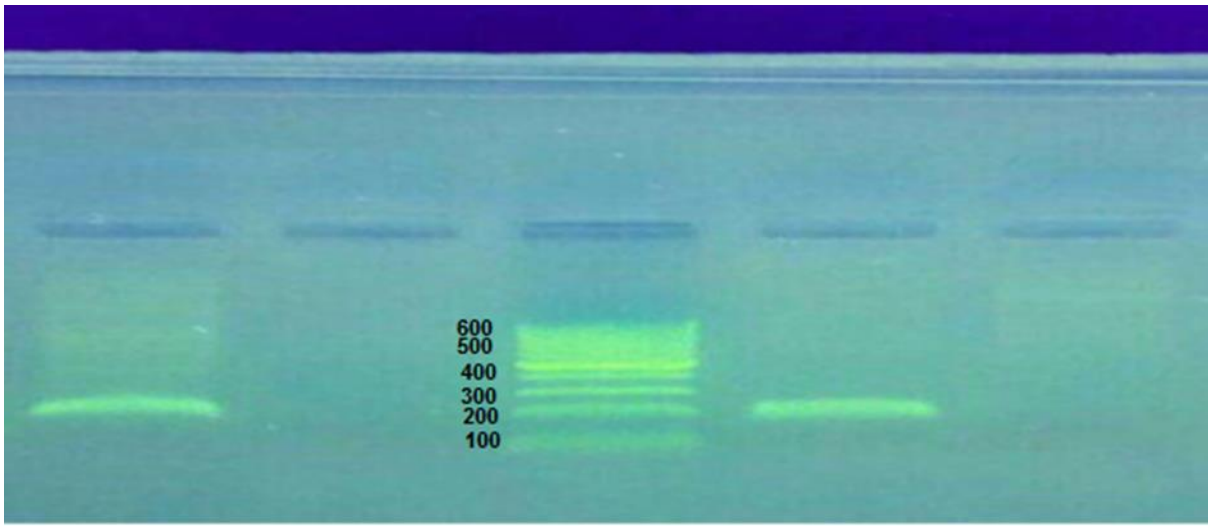
در این مطالعه توصیفی ۵۵ بیمار با میانگین سنی ۱۳/۹۰ ± ۵۲/۷ سال بررسی شدند. مشخصات دموگرافیک و توزیع فراوانی باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در نمونه‌های کشت با توجه به علائم بالینی و ویژگی‌های بیماران در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس جدول ۱ رابطه معنی‌داری بین سابقه سرطان کلورکتال فامیلی (p< ۰/۰۱۱) و دیابت (p< ۰/۰۰۸) با استرپتوکوک بوویس مشاهده گردید.

جدول ۱. خصوصیات جمعیت‌شناختی و توزیع فراوانی باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در نمونه‌های کشت

ویژگی		نمونه (تعداد/درصد)	موارد مثبت	موارد منفی	
سن	زیر ۵۰سال	۲۱ (۳۸/۲)	۳ (۱۴/۳)	۱۸ (۸۵/۷)	P=۰/۹۹۹
	۶۰ تا۵۱ سال	۱۷ (۳۰/۹)	۳ (۱۷/۶)	۱۴ (۸۲/۴)	
	۶۰ به بالا	۱۷ (۳۰/۹)	۳ (۱۷/۶)	۱۴ (۸۲/۴)	
محل سکونت	شهر	۴۶ (۸۶/۶)	۹ (۱۶/۴)	۴۰ (۷۲/۷)	P=۰/۷۰۵
	روستا	۹ (۱۶/۴)	۰ (۰/۰)	۶ (۱۰۰/۰)	
جنسیت	زن	۲۶ (۴۷/۳)	۴ (۱۵/۴)	۲۲ (۸۴/۶)	P=۰/۵۷۲
	مرد	۲۹ (۵۲/۷)	۵ (۱۷/۲)	۲۴ (۸۲/۸)	
درد شکمی	دارد	۳۶ (۶۵/۵)	۷ (۱۹/۴)	۲۹ (۸۰/۶)	P=۰/۳۳۰
	ندارد	۱۹ (۳۴/۵)	۲ (۱۰/۵)	۱۷ (۸۹/۵)	
خونریزی رکتوم	دارد	۲۰ (۳۶/۴)	۳ (۱۵/۰)	۱۷ (۸۵/۰)	P=۰/۵۷۷
	ندارد	۳۵ (۶۳/۶)	۶ (۱۷/۱)	۲۹ (۸۲/۹)	
ضعف و خستگی	دارد	۱۹ (۳۴/۵)	۴ (۲۱/۱)	۱۵ (۷۸/۹)	P=۰/۳۷۳
	ندارد	۳۶ (۶۵/۵)	۵ (۱۳/۹)	۳۱ (۸۶/۱)	
سابقه رکتوهموراژی	دارد	۸ (۱۴/۵)	۲ (۲۵/۰)	۶ (۷۵/۰)	P=۰/۳۹۰
	ندارد	۴۷ (۸۵/۵)	۷ (۱۴/۹)	۴۰ (۸۵/۱)	
سابقه سرطان کلورکتال فامیلی	دارد	۱۱ (۲۰/۰)	۵ (۴۵/۵)	۶ (۵۴/۵)	P=۰/۰۱۱
	ندارد	۴۴ (۸۰/۰)	۴ (۹/۱)	۴۰ (۹۰/۹)	
سابقه هموروئید	دارد	۸ (۱۴/۵)	۰ (۰/۰)	۸ (۱۰۰/۰)	P=۰/۲۱۴
	ندارد	۴۷ (۸۵/۵)	۹ (۱۹/۱)	۳۸ (۸۰/۹)	
سابقه یبوست	دارد	۲۶ (۴۷/۳)	۴ (۱۵/۴)	۲۲ (۸۴/۶)	P=۰/۵۷۲
	ندارد	۲۹ (۵۲/۷)	۵ (۱۷/۲)	۲۴ (۸۲/۸)	

وجود دیابت	دارد	۲۰ (۳۶/۴)	۷ (۳۵/۰)	۱۳ (۶۵/۰)	۰/۰۰۸P=
	ندارد	۳۵ (۶۳/۶)	۲ (۵/۷)	۳۳ (۹۴/۳)	
مدت زمان بیماری	۱ماه و کمتر	۱۰ (۱۸/۲)	۰ (۰/۰)	۱۰ (۱۰۰/۰)	۰/۱۸۶P=
	بیشتر از ۱ماه و کمتر از یک سال	۲۲ (۴۰/۰)	۳ (۱۳/۶)	۱۹ (۸۶/۴)	
	۱سال بیشتر	۲۳ (۴۱/۸)	۶ (۲۶/۱)	۱۷ (۷۳/۹)	

ازه۵۵ نمونه بیوپسی افراد دارای بیماری کولون، ۳ نمونه (۵/۵ درصد) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد مثبت و ۵۲ مورد (۹۴/۵ درصد) از نظر وجود DNA استرپتوکوکوس گالولیتیکوس منفی گزارش شدند. با استفاده از آزمون Kappa رابطه آماری معنی‌دار بین میزان شیوع استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و بیماری‌های کولون دیده شد (p< ۰/۰۱۵). تعداد ۱۱ مورد (۲۰ درصد) سابقه سرطان کلورکتال فامیلی داشتند که در ۵ مورد (۴۵/۵ درصد) آنها باکتری فوق دیده شد (p< ۰/۰۱۱). از ۵۵ فرد موردمطالعه تعداد ۲۰ مورد (۳۶/۴ درصد) مبتلا به دیابت بودند که ۷ مورد (۳۵ درصد) دارای باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس بودند (p< ۰/۰۰۸). درتحلیل ژل‌های PCR وجود باند، پس از اجرای فرایند PCR نشان داد که تمامی نمونه‌ها از نظر کیفیت DNA جدا شده در وضعیت مطلوب بوده‌اند. الکترفورز محصولات PCR بر روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد صورت گرفت که Ladder (۱۰۰ bp) به‌عنوان الگو، شماره‌های ۱ کنترل مثبت، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳ نمایانگر وجود بیماری با عفونت استرپتوکوکوس گالولیتیکوس (باند در ۲۰۰bp) و شماره ۴ نبود ژن باکتری می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR بروی ژل اگاروز

براساس آزمایش PCR ۳ نفر (۵/۵ درصد) نمونه مثبت و ۵۲ نفر (۹۴/۵ درصد) نمونه منفی بودند و براساس آزمایش کشت ۹ نفر (۱۶/۴ درصد) نمونه مثبت و ۴۶ نفر (۸۳/۶ درصد) نمونه منفی از نظر تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس گزارش شدند. براساس توافق تشخیصی بین دو روش نسبت ۹ نفر مثبت کشت از ۳ نفر مثبت PCR ۲ نفر (۳/۶ درصد) هم از لحاظ مولکولی و هم از لحاظ کشت مثبت گزارش شدند و ۷ نفر (۱۲/۷ درصد) از مجموع ۹ نفر (۱۶/۴ درصد) در آزمون PCR منفی بودند. برای بررسی توافق بین دو روش کشت و PCR از آزمون Kappa استفاده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱۵). جدول ۲ شاخص‌های تشخیصی کشت نسبت به PCR (PCR استاندارد طلایی) در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در بیماران دارای بیماری‌های کولون را نشان می‌دهد. برای بررسی شاخص های تشخیصی کشت PCR به‌عنوان روش استاندارد در نظر گرفته شد. حساسیت روش کشت در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس نسبت به PCR (۶۶/۶۷ درصد) بود که ضریب اطمینان ۹۵ درصد برای کل نمونه آماری برابر ۹.۴۳ و سطح اطمینان آن ۹۹/۱۶ درصد می‌باشد. ویژگی روش کشت نسبت به PCR (۸۶/۷۹ درصد) می‌باشد که ضریب اطمینان ۹۵ درصد

آن برابر ۷۴/۶۶ درصد و سطح اطمینان ان ۹۴/۵۲ درصد است، همچنین نسبت احتمالات مثبت در روش کشت ۵/۰۵ می‌باشد که ضریب اطمینان آن ۱/۷۵ و سطح اطمینان آن برابر با ۱۴/۵۲ درصد می‌باشد. نسبت احتمالات منفی روش کشت ۰/۳۸ بود که ضریب اطمینان ۹۵ درصد آن ۰/۰۸ و سطح اطمینان آن برابر ۱/۹۱ درصد می‌باشد. شیوع بیماری در روش کشت نسبت به PCR ارزش آن ۵/۳۶ درصد با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (۱/۱۲) و سطح اطمینان آن ۱۴/۸۷ درصد می‌باشد. تجزیه و تحلیل موارد مثبت پیش‌بینی‌شده کشت نسبت به روش استاندارد ۲۲/۲۲ درصد و ضریب اطمینان آن ۹/۰۳ و سطح اطمینان آن ۴۵/۱۱ درصد می‌باشد.

جدول ۲. شاخص‌های تشخیصی کشت نسبت به PCR ((PCR=GOLD STANDARD در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در بیماران دارای بیماری‌های کولون

آمار	ارزش (درصد)	سطح اطمینان ۹۵ درصد
حساسیت	۶۶/۶۷	۹۹/۱۶ و ۹/۴۳
اختصاصیت	۸۶/۷۹	۹۴/۵۲ و۷۴/۶۶
نسبت احتمالات مثبت	۵/۰۵	۱۴/۵۲ و ۱/۷۵
نسبت احتمالات منفی	۰/۳۸	۱/۹۱ و ۰/۰۸
شیوع بیماری	۵/۳۶(*)	۱۴/۸۷ و ۱/۱۲
پیش‌بینی مثبت	۲۲/۲۲(*)	۴۵/۱۱ و۹/۰۳
پیش‌بینی منفی	۹۷/۸۷(*)	۹۹/۵۶ و ۹۰/۲۵
دقت	۸۵/۷۱	۹۳/۶۲ و۷۳/۷۸

شاخص‌های تشخیصی PCR نسبت به کشت در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در بیماران مبتلا به بیماری‌های کولون نیز نشان داد که حساسیت روش PCR در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس نسبت به روش استاندارد کشت ۲۲/۲۲ درصد با ضریب اطمینان ۲/۸۱ درصد و سطح اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۶۰/۰۱ درصد بود و اختصاصیت روش PCR نسبت به روش کشت نیز ۹۷/۸۳ درصد با ضریب اطمینان ۸۸/۴۷ درصد و سطح اطمینان(۹۵ درصد) برابر با ۹۹/۹۴ درصد می‌باشد. نسبت احتمالات مثبت بودن نمونه‌ها در روش PCR نسبت به کشت ۱۰/۲۲ با ضریب اطمینان ۱/۰۳ و سطح اطمینان ۹۵ درصد برابر ۱۰۱/۱۲ می‌باشد و نسبت احتمالات منفی بودن نمونه‌ها در روش PCR نسبت به کشت ۰/۸۰ با ضریب اطمینان ۰/۵۶ و سطح اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۱/۱۳ درصد می باشد (جدول ۳).

جدول ۳. شاخص‌های تشخیصی PCR نسبت به کشت (کشت :GOLD STANDARD=کشت) در تشخیص باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در بیماران مبتلا به بیماری‌های کولون

آمار	ارزش	سطح اطمینان ۹۵ درصد
حساسیت	۲۲/۲۲	۶۰/۰۱ و ۲/۸۱
اختصاصیت	۹۷/۸۳	۹۹/۹۴ و۸۸/۴۷
نسبت احتمالات مثبت	۱۰/۲۲	۱۰۱/۱۲ و ۱/۰۳
نسبت احتمالات منفی	۰/۸۰	۱/۱۳ و ۰/۵۶
شیوع بیماری	۱۶/۳۶ (*)	۲۸/۸۰ و۷/۷۷
پیش‌بینی مثبت	۶۶/۶۷ (*)	۹۵/۱۹ و ۱۶/۸۲
پیش‌بینی منفی	۸۶/۵۴ (*)	۹۰/۱۴ و ۸۱/۸۹
دقت	۸۵/۴۵ (*)	۹۳/۵۰ و ۷۳/۳۴

٤. بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های آزمایشگاهی در این پژوهش که با استفاده از روش‌های کشت و PCR به‌دست آمد نشان داد از ۵۵ نمونه بافت بیوپسی که شامل پولیپ، کولیت، سرطان، التهاب روده) بودند، در روش PCR از نظر وجود باکتری Streptococcus gallolyticus ۵/۵ درصد و در روش کشت از نظر وجود باکتری فوق ۱۶/۴ درصد مثبت بودند. در مطالعه Sarokhani و همکاران با روش PCR توانستند وجود ژنوم باکتری فوق را در ۳۶ درصد بیماران نشان دهد[۲۰]. در مطالعه Gilermo پس از بررسی بر روی ۵۶۸ نمونه بیوپسی در افراد با گروه سنی بالای ۶۵ سال، ۱۵مورد از باکتری Streptococcus gallolyticus (۲/۶ درصد) را شناسایی کردند [۲۱]. مطالعه pui-ying و همکاران نیز نشان داد که از مجموع ۵۳۷ بیمار،۱۲ نمونه مثبت (۲/۳ درصد) با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و ۱۵ (۲/۸ درصد) مورد از نمونه‌های کشت مثبت شدند [۲۲]. در مقایسه روش کشت و PCR باید بیان کرد که از لحاظ حساسیت روش کشت در تشخیص باکتری بیشتر بود همچنین اختصاصیت روش مولکولی در تشخیص باکتری Streptococcus gallolyticus بیشتر بود. همچنین از لحاظ ارزش نسبت احتمالات مثبت و منفی از نظر وجود باکتری در روش PCR به‌ترتیب ۱۰/۲۲ درصد و ۰/۸۰درصد بود و در روش کشت احتمالات مثبت و منفی به ترتیب ۵/۰۵ درصد و ۰/۳۸درصد بود؛ در نتیجه روش مولکولی احتمالات را برای وجود باکتری دقیق‌تر در نظر می‌گیرد. شاخص بعدی در تشخیص باکتری ارزش پیشگویی مثبت و منفی می‌باشد که در روش کشت به‌ترتیب ۲۲/۲۲ درصد و ۹۷/۸۷ درصد و در روش PCR به ترتیب ۶۶/۶۷ درصد و ۸۶/۵۴ درصد بود در نتیجه ارزش پیشگویی مثبت در تشخیص باکتری Streptococcus gallolyticus در روش مولکولی بیشتر می‌باشد و در روش کشت ارزش پیشگویی منفی در تشخیص باکتری بیشتر از مولکولی است. از لحاظ دقت نیز در تشخیص باکتری Streptococcus gallolyticus روش کشت ۸۵/۷۱ درصد و روش PCR ۸۵/۴۵ درصد می‌باشد که در نتیجه روش کشت دقت بیشتری در تشخیص باکتری دارد. میزان توافق دو روش با استفاده از محاسبه نرم‌افزاری ضریب کاپا ۰/۰۱۵ حاصل شد که نشان‌گر توافق بالای دو روش با هم می‌باشد (هریک دیگری را تأیید می‌کند). در مطالعه Sarokhani و همکاران نیز روش مولکولی بیانگر حساسیت ۱۰۰ درصد ویژگی ۴۰/۶ درصد ارزش پیشگویی مثبت ۴۸/۶ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۱۰۰ درصد می‌باشد و توافق بین دو روش را برابر ۰/۳۳ نشان دادند (۲۰). در مطالعه Nafisi و همکاران از بیوپسی انجام شده ۷۸ مورد مثبت با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و ۴۸ مورد از نمونه‌های کشت مثبت شدند که نتایج کشت ۱۰۰ درصد با PCR همخوانی داشت [۲۳]. مطالعه Rhoads و همکاران نشان داد که بیشتر باکتری‌هایی که با روش مولکولی شناخته شدند با روش کشت قابل شناسایی نبودند [۲۴]. مطالعات دیگر نیز نشان داد که روش PCR در مقایسه با کشت حساسیت بالاتری در تشخیص باکتری دارد [۲۶,۲۵]. مطالعه Yousef zadeh و همکاران نشان داد که مقایسه بین دو روش کشت با PCR در تشخیص MRSA بیانگر توافق ۹۱ درصد بین دو روش، حساسیت PCR ۹۹/۲ درصد و ویژگی PCR ۸۲/۸ درصد در تشخیص باکتری بود [۲۷].

در مطالعه ما تعداد ۱۱ مورد (۲۰ درصد) دارای سابقه سرطان کلورکتال فامیلی بودند که در ۵ مورد (۴۵/۵ درصد) آنها باکتری فوق دیده شد ($p< ۰/۰۱۱$). براساس مطالعه فرجزاده و همکارانش میزان شیوع Streptococcus gallolyticus در ۹ درصد نمونه مدفوع افراد مبتلا به سرطان کلون و ۱۵/۹ درصد افراد دارای التهاب روده مثبت گزارش مشاهده شد [۲۸]. در مطالعه Abdulamir و همکاران با استفاده از روش‌های مولکولی یک فرکانس نشان دادند که ۴۸/۷ درصد برای توالی‌های Streptococcus gallolyticus DNA در نمونه‌های بافت مبتلایان به سرطان کولورکتال، در مقابل ۴ درصد نفر از بافت نرمال روده وجود داشت [۲۹]. مطالعات دیگر نشان دادند که باکتری‌های S. bovis با حضور آدنوکارسینوم کولورکتال، به‌ویژه در زنان بیمار در ارتباط هستند[۳۰] با توجه به مطالعات فوق، ارتباط بین استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و سرطان کولورکتال بحث‌برانگیز است. این اختلافات می‌تواند از زمینه‌های ژنتیکی و همچنین تفاوت‌های جغرافیایی موارد موردمطالعه از مناطق مختلف ایجاد شود [۳۳]. از سویی دیگر از ۵۵ فرد موردمطالعه ۲۰نفر (۳۶/۴ درصد) مبتلا به دیابت بودند که در ۷ نفر (۳۵ درصد) از آنها باکتری Streptococcus gallolyticus دیده شد ($p< ۰/۰۰۸$). در مطالعه Zammit در سال ۲۰۱۳ بر روی بیماران مبتلا به بیماری‌های کولون نشان داده شد که ۲۶ درصد از افراد موردمطالعه دارای دیابت و آلوده به باکتری Streptococcus gallolyticus بودند [۳۱]. Ellezin در یک مطالعه مورد شاهدی وجود Streptococcus gallolyticus را در فرد دیابتی مبتلا به سرطان کولون گزارش کرد [۳۲].

نتایج مطالعه ما نشان داد که اگرچه هنوز کشت به‌عنوان یکی از روش‌های قطعی برای تشخیص Streptococcus gallolyticus می‌باشد و ویژگی این روش از روش PCR بالاتر

می‌باشد اما کشت باکتری از بیوپسی با مشکلات مانند آماده ساختن محیط کشت مخصوص، فراهم کردن شرایط و جلوگیری از آلودگی محیط کشت با سایر میکروارگانیسم‌ها نیاز به چندین روز زمان و شرایط اختصاصی برای ظهور کلونی دارد. حساسیت به‌دست‌آمده در این مطالعه بسیار بالا بود که علت آن تازه بودن محیط‌های کشت و رساندن سریع نمونه‌ها برای کشت و تبحر نمونه‌گیر که بیشتر نمونه‌ها را از ناحیه اصلی پولیپ و توده سرطانی نمونه‌گیری می‌کرد. روش‌های مولکولی، یک بستر اختصاصی با حساسیت بالا در تشخیص پاتوژن‌های میکروبی ایجاد کرده است. حساسیت و ویژگی آزمون PCR وابسته به پرایمری است که به‌کار برده می‌شود اما از مهم‌ترین عوامل مداخله گر در استفاده از PCR آلودگی‌هاست که می‌تواند در جریان استخراج DNA تهیه مخلوط واکنش و مرحله تکثیری رخ دهد [۳۴]. البته با توجه به معایب و مزایا و خصوصیات هر دو روش، در حال حاضر نمی‌توان هیچ‌یک از این دو روش‌ها را به‌عنوان آزمون جامع و استاندارد در نظر گرفت و بر کاربرد همزمان دو روش، در مواردی که حصول نتیجه سریع مدنظر است یا ظن به آلودگی نمونه، حضور میکروارگانیسم‌های دیررشد وجود دارد، توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس که این پژوهش را حمایت اجرایی کردند کمال تشکر را داریم. شایان ذکر است که این مطالعه مربوط به پایان‌نامه ارشد خانم فروغ اسحاقی کجور می‌باشد و تمام هزینه‌های مالی آن توسط ایشان پرداخت شده است.

References

[1]. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. Biochemical Journal. 2017;474(11):1823-36.

[2]. Jahani-Sherafat S, Alebouyeh M, Moghim S, Amoli HA, Ghasemian-Safaei H. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer; a review article. Gastroenterology and Hepatology from bed to bench. 2018;11(2):101.

[3]. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. Anticancer research. 2009;29(7):2727-37.

[4]. Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. The American journal of gastroenterology. 2008;103(6):1541.

[5]. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 2005;55(2):74-108.

[6]. Azadeh S, Moghimi-Dehkordi B, Fatem S, Pourhoseingholi M, Ghiasi S, Zali M. Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2008;9(1):123-6.

[7]. Hnatyszyn A, Hryhorowicz S, Kaczmarek-Ryś M, Lis E, Słomski R, Scott RJ et al. Colorectal carcinoma in the course of inflammatory bowel diseases. Hered Cancer Clin Pract.2019;5(3): 17:18.

[8]. Boleij A, Tjalsma H. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. Biological Reviews. 2012;87(3):701-30.

[9]. Gill S.R., Pop M., DeBoy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 312.2006;1355–1359 .

[10]. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell host & microbe. 2013;14(2):195-206.

[11]. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. Immunity. 2015;42(2):344-55.

[12]. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. The lancet oncology. 2011;12(5):504-12.

[13]. Mantzaris G. Helicobacter pylori and colorectal cancer: Is there any link? Annals of Gastroenterology. 2004.

[14]. Kumar R, Herold JL, Taylor J, Xu J, Xu Y. Variations among Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus strains in connection with colorectal cancer. Scientific reports. 2018;8(1):1514.

[15]. Kumar R, Herold JL, Schady D, Davis J, Kopetz S ,Martinez-Moczygemba M, et al. Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus promotes colorectal tumor development. PLoS pathogens. 2017;13(7):e1006440.

[16]. Isenring J, Köhler J, Nakata M, Frank M, Jans C, Renault P, et al. Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus endocarditis isolate interferes with coagulation and activates the contact system. Virulence. 2018;9(1):248-61.

[17]. Pasquereau-Kotula E, Martins M, Aymeric L, Dramsi S. Significance of Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus association with colorectal cancer. Frontiers in microbiology. 2018;9:614.

[18]. Porgostaran R ea. Gwntic Terminology Book. 2013:424.

[19]. Gharedaghi L, Sadeghi M, Moradi-Shahrebaba H. Study of Polymorphism of β-Lactoglobulin Genein Exon 7 and its Association with Milk Production Traits in Mahabadi Goats Using PCR-SSCP. Research on Animal Production .2015:6(11);120-125.

[20]. Saroukhani et al. Comparison of two diagnostic methods of culture and proliferation of 16srDNA in identification of cerebrospinal fluid bacteria in suspected patients with bacterial meningitis in Qazvin. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences .2009.19(69);14-21.

[21]. Muñoz Zurita Guillermo NH, Alejandra. Association of bacteremias of Streptococcus gallolyticus with the development of colorectal cancer in people 65 years of age. MOJ Gerontol Ger. 2018;3.351-354.

[22]. Tam P-YI, Hernandez-Alvarado N, Schleiss MR, Hassan-Hanga F, Onuchukwu C, Umoru D, et al. Molecular detection of Streptococcus pneumoniae on dried blood spots from febrile Nigerian children compared to culture. PloS one. 2016;11(3):e0152253.

[23]. Nafisi MR, Shadbad MA, Rahimian GA, Karimi A. Comparison Three Methods, PCR Method, Cultyre and Rapid Urease Test to Detect Helicobacter pylori in the Gastric Biopsy Tissue Samples. Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i

Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz. 2016;38(5):70.

[24]. Rhoads et al. Comparison of Culture and Molecular Identification of Bacteria in Chronic Wounds. Int J Mol Sci. 2012;13:2535-50.

[25]. Pear Pongsachareonnont WHaTC. Comparison of methods for identifying causative bacterial microorganisms in presumed acute endophthalmitis:conventional culture, blood culture, and PCR. Pongsachareonnont et al BMC Infectious Diseases. 2017;17:2-9.

[26]. Tashakkori MM, RK, Mahin Safara, ZA. Molecular Identification of Corynebacterium minutissimum in Skin Lesions Suspicious for Erythrasma by the PCR method. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2014;17(9):83-91.

[27]. Yosefzadeh Chabok Sh ea. Assessment of Screening Tests for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Patients Undergoing Surgery by Molecular (PCR) and Culturing Methods. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2011;81:45-52.

[28]. Farajzadeh A,Masjedi A,Saki M,et al. Detection of Streptococcus gallolyticus in colorectal cancer and inflammatory bowel disease patients compared to control group in southwest of Iran Molcolar Biology report.2020;47:8361-8365.

[29]. Abdulamir AS, Hafidh RR, Bakar FA. Molecular detection, quantification, and isolation of Streptococcus gallolyticus bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. Molecular cancer. 2010;9(1):249.

[30]. Franch MA, Galiana A, Sánchez HV, et al. Streptococcus gallolyticus infection in colorectal cancer and association with biological and clinical factors. Int J Cancer. 2016;1;138(7):1670–1679.

[31]. Zammit SC, Azzopardi N, Ellul P. Streptococcus gallolyticus bacteraemia in hepatobiliary–pancreatic and colonic pathologies. QJM: An International Journal of Medicine. 2013;107(5):355-61.

[32]. Elzein FE, Akhtar MY, Khairallah H, Albenmousa A. Streptococcus bovis prosthetic valve endocarditis associated with silent colonic carcinoma. Case Reports. 2017;2017:bcr-2017-219488.

[33]. Mahmoudvand sh, Zamani KH , Safaei A. No Detection of Streptococcus gallolyticus and Helicobacter pylori in Colorectal Cancer Tissue Samples in Shiraz, Iran.Iran J Cancer Prev. 2017 January; 10(1):e6337.

[34]. A.A K, IB. Frequency of Colonic Extension by Colonoscopy in Ulcerative Colitis Patients in Kermanshah Province in the Years 2002-2005. journal of kermanshah university of medical sciences. 2007;4(11):441-50.