www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 58, No. 2, P: 258-262
Apr 2015

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۸، شماره۵
مرداد ۹٤ ، صفحه ۲۵۸-۲٦۲

مقاله اصلی

جستجوی ناقلین بدون علامت سالمونلا تیفی با استفاده از مشخصات فنوتیپیک و مولکولی ارگانیسم

تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۷- تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۱٦

.

[1]فاطمه فلاح
[2]حسین گودرزی
[3]فریبا لاهورپور*
[4]مژگان بنده پور

۱،۲-استاد میکروبشناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، تهران، ایران
۳-استادیار گروه علوم آزمایشگاهی ، دانشکده پیراپزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴-استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، تهران، ایران

*کردستان-دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پیرا پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، سنندج، ایران
تلفن:۹۱۸۸۷۲۷۶۰۷-۹۸+
email: lahoorpour@gmail.com

خلاصه

مقدمه

تیفوئید یکی از وسیع ترین بیماریهای باکتریایی در جهان است. ناقلین بدون علامت مخزن اصلی انتشار تیفوئید محسوب می شوند. هدف از مطالعه حاضر غربالگری و شناسایی سالمونلا تیفی های جداشده در ناقلین بدون علامت می باشد.

روش کار

این مطالعه توصیفی از سال ۱۳۹۲-۱۳۹۳ در تهران انجام شد. ۲۰۰ نمونه مدفوع از افراد دخیل در تهیه و توزیع کنندگان مواد غذایی جمع آوری و ازنظر میکروبشناسی و آزمایشهای بیوشیمیایی و روش مولکولی nested-PCR قرار گرفتند.

نتایج

از ۲۰۰ نفر افراد شرکت کننده در مطالعه ۱۷۱(۸۵٪) مردو ۲۹ نفر (۱۵٪) زن بودند. نتایج کشت مدفوع نشان دهنده رشد فلور نرمال روده بودند و رشد از نظر سالمونلا تیفی مشاهده نشد و یک نمونه در روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (nested-PCR)از نظر وجود ژن کپسولی سالمونلا تیفی (Vi) مثبت بود.

نتیجه گیری

با توجه به بهبود شرایط بهداشتی جامعه و شیوع بسیار پایین ناقلین تیفوئید پیشنهاد میشود سایر مسایل بهداشتی مورد توجه قرارگیرد.

کلمات کلیدی : سالمونلا تیفی، ناقلین ، واکنش زنجیره ای پلیمراز

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه

سالمونلاانتریکا سرووار تیفی علت عمده تب روده ای است که همچنان در سراسر جهان به عنوان مشکل بهداشتی است (۱، ۲). تقریبا ۱۶ تا ۲۲ میلیون بیماری و ۲۱۶۰۰ مرگ سالیانه بدلیل تیفوئید اتفاق می افتد که اکثر این موارد از آسیا گزارش شده است (۳) .بیماری تیفوئید از راه دهانی – مدفوعی از فردی که مبتلا به تیفوئید (حاد یا مزمن) باشد انتقال می یابد.

ناقلین مخزن اصلی عفونت و عامل پایداری تیفوئید شمار می آیند.ناقلین مزمن سالمونلا تیفی را از طریق ادراردفع میکنند که این افراد همچنین بعنوان عامل خطر ایجاد سرطان سیستم صفراوی و سنگ کیسه صفرا دارای اهمیت می باشد (۵-۲).

افرادشاغل در واحدهای تهیه و توزیع مواد غذایی هستند می توانند بعنوان مخزن بالقوه عفونت ها و ارگانیزم های بیماریزا مانند سالمونلا تیفی باشد و به این دلیل شناسایی ناقلین به منظور پیشگیری از بیماری و شیوع آن در جامعه مهم می باشد(۶-۸). تقریبا ۱-۴ ٪ از بیماران مبتلا به تیفوئید، سالمونلا تیفی را در دستگاه روده ای و کیسه صفرا به مدت ماهها یا سالها حمل می کند که این افراد به عنوان ناقلین بدون علامت خوانده می شوند (۸). استاندارد طلایی جهت شناسایی ناقلین سالمونلا تیفی آسپیراسیون کیسه صفرا یا ترشحات عثنی عشر می باشد ، اما این روشهای تهاجمی اند و از نظر عملی نیز انجام پذیر نیستند.روشهای باکتری شناسی هم مستلزم چندین نوبت کشت مدفوع یا کشت از صفرا یا مایع عثنی عشر می باشد (۲). با توجه به اینکه ناقلین کیسه صفرا اغلب به صورت متناوب ارگانیزم را دفع میکنند و یا تعداد سالمونلای دفع شده کم می باشد ، جهت رسیدن به یک تشخیص معتبر ، چندین آزمایش ازجمله آزمایشهای باکتری شناسی که اکثرا هم وقت گیر و هزینه بردار می باشند، ضروری است (۸-۱۱).

محققان به منظور شناسایی ناقلین سالمونلا تیفی کشت از نمونه های مختلف از قبیل ادرار ، مدفوع یا روشهای ترکیبی با روشهای متفاوت را جهت غربالگری آنتی ژن یا آنتی بادی به کار برده اند، از جمله لانتانا[1] و همکاران از سنجش تیتر آنتی بادی بر علیه آنتی ژن کپسولی سالمونلا تیفی (Vi) استفاده کردند(۱۲). ناث[2] و همکاران هم با استفاده از روش زنجیر ه ای پلیمرازه (nested-PCR) از ژن فلاژلین سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروتایپ تیفی بمنظور جستجوی ناقلین استفاده کردند (۱۳).

در دیگر مطالعات از آنتی ژن خالص شده کپسولی سالمونلا تیفی ، یا ژن مربوط به فلاژل با روشهای سرولوژیک و واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاد ه از نمونه های مختلف مانند ادرار، مدفوع و خون سالمونلا تیفی را جستجو کردند(۱۲-۱۴).

سالمونلا تیفی دارای کپسول کربوهیدراتی به نام Vi (Virulent) می باشد که توسط ناحیه ViaB کد می شود و به دلیل مقاومت در برابر کمپلمان و کشتار فاگوسیتی ، باعث بیماری های منتشره می شود (۱۶،۱۵).

از آنجا که روش های مولکولی خصوصا" PCR دارای حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روش های کشت و سرولوژی دارد و از طرفی تمامی سروارهای بیماریزای سالمونلاتیفی دارای ژن کپسولی vi می باشند، ما هم در این مطالعه از روش فنوتیپیک و nested-PCR به منظور بررسی ناقلین سالمونلاتیفی استفاده کردیم (۱۴،۱۳،۱).

روش کار

در این مطالعه توصیفی که شامل ۲۰۰ نفر افراد دست اندر کار تهیه و توزیع کنندگان مواد غذایی در شهر تهران (دارای کارت بهداشتی) مراجعه کننده به درمانگاه شمیرانات واحد آزمایشگاه ، از آبان ۱۳۹۲ تا دی ماه ۱۳۹۳ بود، همین تعداد نمونه مدفوع از افراد فوق جمع آوری گردید.

به منظورافزایش رشدسالمونلا تیفی یک لوپ از نمونه مدفوع در ۱۰ میلی لیتر سلنیت اف تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

بعداز مشاهده رشد از مایع فوق در محیطهای کشت مک کانگی آگار و سالمونلا –شیگلا آگار کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. تمامی کلنی های بیرنگ با مرکز سیاه از نظر آزمایشهای تخمیر قندها و IMVIC (اندول،

[1] Lanata

[2] Nath

متیل رد ، وگس پروسکوئه و سیترات) و اوره آز مورد بررسی قرار گرفتند.

DNAی نمونه های مدفوع با استفاده از کیت (BIONEER . KOREA) استخراج و تا زمان انجام nested-PCR در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲ جفت پرایمر (R1,R2) مورد نیاز در دور اول و دور دوم PCR از بانک ژنی با مشخصات D14156 طراحی و سپس بوسیله نرم افزارهای مولکولی BLASTاز نظر دمای ذوب، وجود لوپ و سایر خصوصیات پرایمر مورد بررسی قرارگرفت و جهت ساخت پرایمرها به شرکت سینا ژن سفارش داده شد.

R1 , R2به ترتیب قطعات ۵۹۹ جفت باز(نوکلئوتید ۷۴۵ تا ۱۳۴۳) و قطعه ۳۰۷ جفت باز در دور دوم (نوکلئوتید ۸۷۷ تا ۱۱۸۳) را تکثیر می کرد که قطعه ۳۰۷ جفت باز مربوط به بخشی از ژن Vi aB نشان دهنده وجود این ژن در باکتری سالمونلا تیفی بود.مشخصات پرایمرها به ترتیب زیر می باشد:

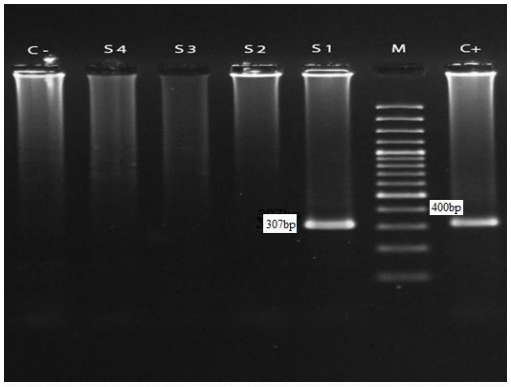
R1 (5´-GTTATTTCAGCATAAGGAG-3´) ,(5´-ACTTGTCCGTGTTTTACTC-3´) , R2 (5´-GTGAACCTAAATCGCTACAG-3´),(5´-CTTCCATACCACTTTCCG-3´)

برنامه nested- PCRشامل یک مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه ، ۳۰ چرخه تکثیر DNA ، ۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه ، ۴۹ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و یک مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود.

دور دوم PCRبا همین شرایط انجام شد فقط دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به جای دمای ۴۹ درجه سانتیگراد تغییر یافت .پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر ا ز محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ زا (loading buffer) توسط ژل آگارز ۲٪ به مدت ۲۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. سپس محصولات PCRبوسیله ژل داک مورد بررسی قرار گرفت .

نتایج

از ۲۰۰ نفر شرکت کننده در این مطالعه ۱۷۱ نفر مرد (۸۵٪) و ۲۹ نفر زن (۱۵٪) بودند.



شکل ۱- تشخیص ژن کپسولی سالمونلا تیفی (ViaB) باروش زنجیره ای پلیمراز (NESTED-PCR)

بعداز زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رشد در سلنیت اف قابل مشاهده بود و تمامی کلنی های بیرنگ با مرکز سیاه از نظر وجود سالمونلا تیفی مورد بررسی قرار گرفتند. کشت مدفوع نشاندهنده رشد فلور نرمال میکروبی بود و نمونه ها از نظر وجود سالمونلا تیفی منفی بودند.از ۲۰۰ نمونه ی DNA در روش nested-PCRبه منظور تکثیر ژن کپسولی Vi،یک نمونه اندازه مورد نظر ۳۰۷ جفت باز را دارا بود.(تصویر ۱)

C+ :کنترل مثبت (*S. enterica serovar* Typhi ATCC 19430).

M :مارکر ۱۰۰ bp

S1 :نمونه مثبت

S2-s4 :نمونه ها

-C : کنترل منفی

و بنابراین شیوع ناقلین در مطالعه ما ۰,۵٪ بدست آمد.

بحث

ناقلین تیفوئید به عنوان مخزن بیماری محسوب می شوند که میزان ناقلین مخصوصا در افرادی که دخیل در تهیه و توزیع مواد غذایی هستند بیشتر مورد توجه می باشد و زنان در این میان نسبت قابل توجه تری را به خود اختصاص داده اند(نسبت ۳:۱) (۸، ۱۷). در این مطالعه در تهران در افراد فوق نتایج کشت مدفوع از نظر سالمونلا تیفی منفی بود که این نتیجه گیری با توجه به دفع کم و متناوب بودن دفع دور از انتظار نبود (۸،۹).از طرفی گزارشهایی که حاکی از غیرفعال شدن ژنهای آنتی ژن Vi دربعضی بیماران

و از دست رفتن آنتی ژن Vi به دلیل ساب کالچرهای متوالی و ذخیره سازی در آزمایشگاه موجود می باشد که می تواند دلیل منفی شدن نتایج باشد و همانطور که میدانیم بیان ژن Vi تحت کنترل تنظیم کننده ها می باشد که اسمولاریته و شرایط محیط های کشت از جمله غلظت Nacl موجود در ترکیبات محیط کشت روی بیان ژن تاثیر دارند که در خور توجه می باشند (۱۸).
نتیجه تحقیق حاضر با شیوع ۰,۵٪ با نتایج آندرجی[1] و همکاران در اتیوپی و حمزه و همکاران در لبنان که هردو کشور جزو مناطق اندمیک بشمار می آیند همخوانی بسیار نزدیکی دارد (۷، ۱۹) .

در ایران گزارشهای حاصل از ناقلین تیفوئید از همدان توسط مشعوف و همکاران در سال ۱۳۸۲ و لاهورپور وهمکاران در سنندج در سال ۱۳۸۳ به ترتیب ۰/۹۴٪ و۰/۶٪ بوده است که بیانگر شیوع بسیار پایین ناقلین در این افراد میباشد ودرهر دو تحقیق فوق ازنمونه مدفوع در جمعیت افراد شاغل در تهیه و توزیع مواد غذایی ازروشهای کشت و سرولوژی استفاده کرده بودند (۲۰، ۲۱).

در سالهای اخیر در تشخیص سریع ناقلین تیفوئید ، استفاده از روشهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفته از آنجا که تمامی سرووارهای سالمونلا تیفی آنتی ژن ازاین ژن برای جستجوی ناقلین استفاده شد که تنها را دارند در این مطالعه Vi یک نمونه دارای این ژن بود که نشاندهنده شیوع بسیار پایین ناقلین بود ودرکشورهایی که تیفوئید اندمیک می باشد این میزان توسط نات [1] وهمکاران در هند ۱۳/۱٪ گزارش شده است که نسبت به نتیجه این مطالعه شیوع بالاتری را نشان میدهد (۱۳) در گزارش بیرهانسلاسی[2] و همکاران در اتیوپی از ۱۰۷ نمونه کشت مدفوع فقط یک نمونه از نظر ارگانیزم مورد نظر مثبت بود. مطالعه دیگری توسط صفائیان وهمکاران در چین (شانگهای) که باز از مناطق اندمیک تیفوئید بشمار میاید، این میزان ۰/۰۲٪ گزارش شده است (۵). شیوع ناقلین در بعضی مناطق اندمیک مانند هند این میزان و از ۱۷/۴٪، که اکثریت ناقلین را زنان تشکیل داده، تا ۷۹٪ متغییر بوده است (۲۴ ،۲۳). در اتیوپی از دیگر مناطق اندمیک شیوع ۱/۶٪ بوده است که زنان اکثریت (۷۸٪)را به خود اختصاص داده بودند (۲۵).
در این مطالعه هم یک نمونه مثبت ناقل مرد بود و از انجا که ناقلین در زنان بیشتر ازمردان دیده میشود ودر مطالعه حاضر اکثریت افراد شرکت کننده در مطالعه را مردان تشکیل داده بودند میتواند در پایین بودن میزان ناقلین موثربوده باشد .
پایین بودن شیوع ناقلین در مطالعه حاضر با توجه به دفع متناوب و تعداد کم باکتری در دستگاه روده ای و کیسه صفرا از طرف دیگر باشد که غالب بودن چشمگیر تعداد مردان (۸۵٪) به تعداد زنان (۱۵٪) و همچنین غیر فعال شدن ژن کپسولی میتواند مزید بر علت منفی شدن نتایج باشد.

نتیجه گیری

با توجه به به شرایط بهداشتی جامعه و شیوع بسیار پایین ناقلین تیفوئید پیشنهاد میشود سایر مسایل بهداشتی مورد توجه قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مراکز تحقیقات عفونی گرمسیری و ژنتیک سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که حمایت مالی از این تحقیق را به عهده داشتند، همچنین از کارکنان آزمایشگاه درمانگاه شمیرانات و بیتا پورکاوه از مرکز تحقیقات عفونی گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بدلیل همکاری در طول تحقیق فوق سپاسگزاریم.

[1] Andargie
[1] Nath
[2] Birhanesellasie

References:

1. Das A, Hari SS, Shalini u, Ganeshkumar A, Karthikeyan M. Molecular characterization of salmonella enteric serovar typhi isolated from typhoidial humans. Malays J Microbiol 2012; 8(3): 148-155.
2. Baker S, Favorov M, Dougan G. Searching for the elusive typhoid diagnostic. BMC Infect Dis 2010 Mar 5;10:45.
3. Gupta A, My Thanh NT, Olsen SJ, Sivapalasingam S, My Trinh TT, Phuong Lan NT, et al.Evaluation of communitybased serologic screening for identification of chronic Salmonella Typhi carriers in Vietnam. Int J Infect Dis 2006 ; 10(4): 309-314.
4. GonzalezEscobedo G, Marshall JM, Gunn JS. Chronic and acute infection of the gall bladder by Salmonella Typhi: understanding the carrier state. Nat Rev Microbiol 201 1; 9(1): 91-94.
5. Safaeian M, Gao YT, Sakoda LC, Quraishi SM, Rashid A, Wang BS, et al. Chronic typhoid infection and the risk of biliary tract cancer and stones in Shanghai, China. Infect Agents Cancer2011 May 2;6:6.
6. Saeed HA, Hamid HH. Bacteriological and parasitological assessment of food handlers in the Omdurman area of Sudan. J Microbiol Immunol Infect 2010; 43(1):70-73.
7. Andargie G, Kassu A, Moges F, Tiruneh M, Huruy K. Prevalence of Bacteria and Intestinal Parasites among Foodhandlers in Gondar Town, Northwest Ethiopia. J Health popul Nutr 2008; 26(4) :451-455.
8. Chandrasekaran B, Balakrishnan S. Screening, phylogenetic analysis and antibiotic sensitivity pattern of Salmonella enterica serovar Typhi isolates from typhoid asymptomatic carriers. Asian Pac J Trop Med 2011 Oct;4(10):769-772.
9. Ismail A. New advances in the diagnosis of Typhoid and detection of typhoid carriers. Malays J Med Sci 2000; 7(2): 3-8.
10. Malickbasha M, Arunachalam R, Senthilkumar B, Rajasekarapandian M, Annadurai G.Effect of ompR gene mutation in expression of ompC and ompF of Salmonella typhi.Interdiscip Sci 2010 ; 2(2): 157-162.
11. Singh S. yphoid fever: Pathogenesis and Laboratory Diagnosis. J Indian Acad Clin Med 2001; 2:1720.
12. Lanata CF, Levine MM, Ristori C, Black RE, Jimenez L, Salcedo M, et al. Vi serology in detection of chronic Salmonella typhi carriers in an endemic area. Lancet 1983; 2(8347): 441-443.
13. Nath G, Manuryal P, Gulati AK, Singh TB, Srivastava R, Kumar K, et al. Comparison of Vi serology and nested PCR in diagnosis of chronic carriers in two different study population in typhoid endemic area of India. Southeast Asian J Trop Med Public health 2010; 41(3): 636-640.
14. Hatta M, Smits H. Detection of salmonella Typhi by nested polymerase chain reaction in blood , urine, and stool samples. Am J Trop Med Hyg 2007; 76(1): 139-14343.
15.Sharma KB , Arya SC. Detection of Salmonella typhi by nested PCR based on the ViaB sequence. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3361.
16. Eed E M, Gafar M, Mansour H. Detection and characterization of chronic Salmonella carrier among food handlers in Kuwait. Menoufiya Med J 2011:24 (1):147-150.
17.Valli A, Selvan N, Sudha A, Dhananjeyan V, Iyappan P. Curr Res in Bacteriol 2010;3(4);238-244.
18.Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. Trends Microbiol 2014; 22(11):648-655.
19.Hamze M1, Naja M, Mallat H. Biological analysis of worker in the food sector in north Lebanon. Mediterr Health J 2008;14(6);1425-1434.
20. Mashouf RY, Ranjbar M. Prevalence of Salmonella carriers among food handlers in Hamadan, western Iran. Clin Microbiol Infect 2005;11(Suppl 2) .
21.Lahoorpour F, Jasemi N, Ashrafi S. Salmonella Typhi holder inspection in foodstuff producers and distributors in Sanandaj. Bishkek,Kyrgyzstan :International congress of central Asia Infectious diseases;2006.
22. Birhaneselassie M, Williams D. A Study of Salmonella Carriage among Asymptomatic Food-Handlers in Southern Ethiopia. Int J Nutr Food Sci 2013: 2(5); 243-245.
۲۳. Senthilkumar B, Prabakaran G. Multidrug resistant Salmonella typhi in Asymptomatic Typhoid Carriers among Food Handlers in Namakkal District Tamil Nadu. Indian J Med Microbiol 2005;23(2):92-94.
۲٤. Francis SP , Nagarajan P, Upagade A. Prevalence of Salmonella in finger swabs and nail cuts of hotel workers. J Microbiol Infect Dis 2012;2(1);1-4.
۲٥. Abera B, Biadegelgen F, Bazabih B. Prevalence of Salmonella typhi and intestinal parasites among food handlers in Bahir Dar Town,Northwest Ethiopia. Ethiop J Health Dev 2010;24(1);46-50.