



مقاله اصلی

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

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۶

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 جدا شده 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 از نظر میکروبیشناسی و آزمایشهای بیوشیمیایی و روش مولکولی nested-PCR قرار گرفتند.

نتایج

از ۲۰۰ نفر افراد شرکت کننده در مطالعه ۱۷۱ (۸۵٪) مرد و 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 مرز (nested-PCR) از نظر وجود ژن کیسولی 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 قرار گیرد.

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

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

^۱فاطمه فلاح

^۲حسین گودرزی

^۳فریبا لاهورپور*

^۴مژگان بنده پور

۱-۲- استاد میکروبیشناسی، 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 پیراپزشکی، گروه علوم

آزمایشگاهی، سنندج، ایران

تلفن: ۹۸-۹۱۸۸۷۲۷۶۰۷+

email: lahoorpour@gmail.com

مقدمه

سالمونلا اتریکا سرووار تیفی علت عمده تب روده ای است که همچنان در سراسر جهان به عنوان مشکل بهداشتی است (۱، ۲). تقریباً ۱۶ تا ۲۲ میلیون بیماری و ۲۱۶۰۰ مرگ سالانه 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 ادرار دفع میکنند که این افراد همچنین بعنوان عامل خطر ایجاد سرطان سیستم صفراوی و سنگ کیسه صفرا دارای اهمیت می باشد (۵-۲).

افراد شاغل 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).

تقریباً 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

آسپراسیون 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 از جمله آزمایشهای باکتری شناسی که اکثراً 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 لاتانا^۱ و همکاران از سنجش تیتراژ آنتی بادی بر علیه آنتی

ژن کپسولی سالمونلا تیفی (Vi) استفاده کردند (۱۲). نا^۲ و همکاران هم با استفاده از روش زنجیره ای پلیمرز (nested-PCR) از ژن فلاژلین سالمونلا اتریکا زیر گونه اتریکا 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 پلیمرز (PCR) با استفاده از نمونه های مختلف مانند ادرار، مدفوع و خون سالمونلا تیفی را جستجو کردند (۱۲-۱۴).

سالمونلا تیفی دارای کپسول کربوهیدراتی به نام (Virulent) Vi 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 (۱۵، ۱۶).

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

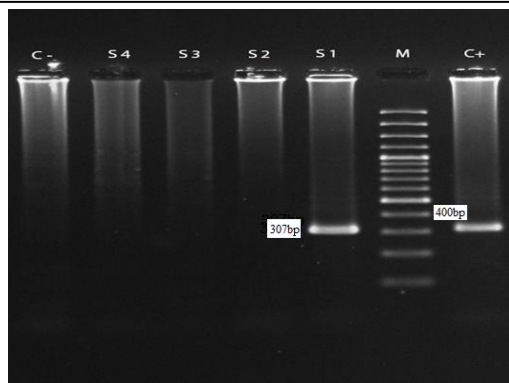
روش کار

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 منظور افزایش رشد سالمونلا تیفی یک لوپ از نمونه مدفوع در ۱۰ میلی لیتر سلیت 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-شیکلا 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،

² Nath¹ Lanata



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

بعد از 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 نشان دهنده رشد فلور نرمال میکروبی بود و نمونه ها از نظر وجود سالمونلا تیفی منفی بودند. از ۲۰۰ نمونه ی DNA در روش nested-PCR به 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 (۹، ۸). از طرفی گزارشهایی که حاکی از غیرفعال شدن ژنهای آنتی ژن Vi در بعضی بیماران

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

DNA 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 BLAST از نظر دمای ذوب، وجود لوپ و سایر خصوصیات پرایمر مورد بررسی قرار گرفت و جهت ساخت پرایمرها به شرکت سینا ژن سفارش داده شد.

R1, R2 به 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'-GTTATTTTCAGCATAAGGAG-3'),
(5'-ACTTGTCCGTGTTTACTC-3'), R2 (5'-
GTGAACCTAAATCGCTACAG-3'), (5'-
CTTCCATAACCACTTTCCG-3')
برنامه nested-PCR شامل 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 PCR با همین شرایط انجام شد فقط دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به جای دمای ۴۹ درجه سانتیگراد تغییر یافت. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از 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 PCR بوسیله 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.

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^۱ و همکاران در اتیوپی و حمزه و همکاران در لبنان که هر دو 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 و همکاران در سندج در سال ۱۳۸۳ به ترتیب ۰٫۹۴٪ و ۰٫۶٪ بوده است که بیانگر شیوع بسیار پایین ناقلین در این افراد میباشد و در هر دو تحقیق فوق از نمونه مدفوع در جمعیت افراد شاغل در تهیه و توزیع مواد غذایی از روشهای 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 از این 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 و در کشورهایی که تیفوئید اندمیک می باشد این میزان توسط نات^۱ و همکاران در هند ۱۳/۱٪ گزارش شده است که نسبت به نتیجه این مطالعه شیوع بالاتری را نشان میدهد (۱۳) در گزارش بیرهانسلای^۲ و همکاران در اتیوپی از ۱۰۷ نمونه کشت مدفوع فقط یک نمونه از نظر ارگانیزم مورد نظر مثبت بود. مطالعه دیگری توسط صفائیان و همکاران 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٪ متغیر 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 آنجا که ناقلین در زنان بیشتر از مردان دیده میشود و در مطالعه حاضر اکثریت افراد شرکت کننده در مطالعه را مردان تشکیل داده بودند میتواند در پایین بودن میزان ناقلین موثر بوده باشد.

پایین بودن شیوع ناقلین در مطالعه حاضر با توجه به دفع متناوب و تعداد کم باکتری در دستگاه روده ای و کیسه صفر 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 قرار گیرد.

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 Birhanesellasi

References:

1. Das A, Hari SS, Shalini u, Ganeshkumar A, Karthikeyan M. Molecular characterization of salmonella enteric serovar typhi isolated from typhoidal 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 community based 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* 2011; 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 Cancer* 2011 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. Typhoid 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.