تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه تکنیک PCR وکیت API-20E با روش تست های روتین بیوشیمیایی در تشخیص سالمونلا

محمد مهدی سلطان دلال
استاد میکروب شناسی ،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات میکرب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

عباس رحیمی فروشانی
دانشیار ،گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت, دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

شهنام صدیق معروفی
مربی هوشبری، گروه هوشبری ، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

محمد کاظم شریفی یزدی
استاد میکروب شناسی ، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران و مرکز تحقیقات زئونوز(بیماریهای مشترک بین انسان و دام)

نویسنده مسئول: محمد کاظم شریفی یزدی
تلفن : 021-82944777
پست الکترونیک: mksharifi@tums.ac.ir
آدرس : تهران ،دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

وصول مقاله: 90/8/14
اصلاح نهایی: 90/10/16
پذیرش مقاله:90/10/29

چکیده

زمینه و هدف *: سالمونلا یکی از عوامل مهم عفونت های روده ای و اسهال می باشد و عدم تشخیص صحیح باکتری ممکن است سبب شکست در درمان شود. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه PCR وکیت API-20E با تست های روتین بیوشیمیایی در تشخیص انواع سالمونلا ها می باشد.*

روش بررسی *:در این تحقیق 470 نمونه کودک مبتلا به گاستروآنتریت حاد از 3 بیمارستان دانشگاهی امام، شریعتی و مرکز طبی کودکان در شهر تهران، جهت تشخیص سالمونلا، به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت انتقال یافت. برای ارزیابی نتایج کشت روتین بیمارستانهای فوق، نمونه ها احیا و خالص سازی شد و از کیت API-20E برای شناسائی باکتری استفاده شد ، همچنین بعد از استخراج DNA با روش جوشاندن ، از روش PCR استفاده شد. برای مقایسه نتایج از تست مک نمار استفاده گردید. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تمام ایزوله های سالمونلا به روش دیسک دیفیوژن و طبق دستورالعمل Clinical and laboratory standard institute(CLSI) مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها *: براساس نتایج ارائه شده از مراکز درمانی از 470 نمونه مورد بررسی 65 نمونه (13/8%) دارای سالمونلا بودند، در حالیکه در ارزیابی با روش کشت و کیت API-20E در بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت و روش PCR فراوانی موارد مثبت به ترتیب 37 نمونه (7/9%) و 39 نمونه (8/3%) براورد گردید. تفاوت مشاهده شده در شناسائی سالمونلا با روش های روتین بیمارستانی با نتایج کیت API و PCR از نظر آماری معنی داری می باشد ($P<0.05$).*

نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی روی 37 ایزوله سالمونلا از نمونه های اسهال نشان داده که 73/3% ایزوله ها حداقل به یکی از 16 آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاومت نشان دادند. تمامی ایزوله ها به نیتروفورانتوئین مقاوم بوده و همگی آنها نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم حساسیت نشان دادند.

نتیجه گیری *:نتایج نشان داد اختلاف معنی داری میان یافته های کشت و تعیین هویت در بیمارستان و نتایج تشخیص سالمونلا با روش کیت API-20E و PCR وجود دارد.*

واژه های کلیدی *: سالمونلا، تشخیص،روش سنتی، روش مولکولی، کیت API-20.*

آدرس مقاله:
سلطان دلال م م، رحیمی فروشانی ع، صدیق معروفی ش، شریفی یزدی م ک." مقایسه تکنیک PCR وکیت API-20E با روش تست های روتین بیوشیمیایی در تشخیص سالمونلا". مجله علوم آزمایشگاهی پاییز و زمستان ، 1390دوره پنجم(شماره2) :27-20

مقدمه

سالمونلوزیس گاستروانتریت ناشی از آلودگی با سروارهای مختلف جنس سالمونلا می باشد. طبق ارزیابی مراکز کنترل و پیشگیری بیماری ها (CDC) و آمار سازمان بهداشت جهانی، سالیانه 1/3 بیلیون گاستروانترویت حاد به دلیل سالمونلوزیس غیر تیفوئیدی گزارش می شود که 3 میلیون آنها منجر به مرگ می شود. در اغلب نقاط جهان، بررسی های اپیدمیولوژیک انجام گرفته، حاکی از افزایش عفونت های ناشی از سروارهای سالمونلا می باشد از نظر بالینی سویه های سالمونلا حائز اهمیت بوده و بطور گسترده در بیماران بستری در بیمارستان ها کلونیزه می شوند و از مقاومت دارویی بسیار بالایی برخوردارند (2 ،1). طبق گزارشات منتشر شده داخلی و خارجی مسئله ای که در چند سال اخیر بروز نموده و به یک معضل بهداشتی مبدل گردیده است، ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و توسعه مقاومت چند دارویی در این سویه ها است که عمدتاً مرتبط با ژن های پلاسمیدی است(5-3). میزان عفونت های سالمونلایی در ماه های تابستان به حداکثر می رسد و از لحاظ سن، گروه سنی زیر 20 سال و بالای 70 سال بیشترین گروه در معرض خطر می باشند. این مسئله در اطفال کمتر از یک سال شدت داشته و نگران کننده می باشد. افراد دارای نقص سیستم ایمنی، سوء تغذیه، مبتلایان به بیماری های نئوپلاستیک، همچنین افرادیکه تحت درمان با آنتی بیوتیک قرار دارند و یا داروهای سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی مصرف می کنند، از حساسیت بیشتری در برابر عفونت برخوردارند (7،6). گاستروانتریت شایع ترین و متداول ترین عفونت سالمونلایی در انسان می باشد که اغلب توسط سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم ایجاد می شود. دوره کمون بیماری معمولا 8 – 24 ساعت می باشد ولی گاهی اوقات بسته به تعداد باکتری وارد شده به بدن این دوره ممکن است کوتاه تر و یا طولانی تر باشد. بیماری با علائم تهوع، استفراغ، سردرد، دل درد تب و لرز شروع می شود. معمولا اسهال آبکی و گاهی خونی نیز وجود دارد. از دست دادن آب و به هم خوردن تعادل الکترولیت ها از عوارض این بیماری در افراد پیر یا جوان می باشد. از نظر آسیب شناسی ضایعات تنها در یاخته های پوششی مخاط ایلئوم و کولون وجود دارد و باکتری کمتر در خون و یا سایر بافت ها یافت می شود. یکی از عوارض نادر آنتروکولیت سالمونلایی التهاب استریل مفاصل است که احتمالا به خاطر واکنش های متقاطع اتفاق می افتد(11-8).
این بیماری یکی از عوامل شایع مرگ و میر در بین اطفال، افراد مسن و بیمارانی از قبیل افراد مبتلا به سرطان و ایدز می باشد .

اپیدمی ها اکثراً در بیمارستان ها، مهد کودک ها، زندان ها، رستوران ها و خانه های بهداشت و معمولا به علت آلودگی مواد غذایی و در موارد کمتر در هنگام جابجایی بوسیله شخص ناقل و یا آلوده اتفاق می افتد (14-12).
یکی از نکات مهم در خصوص جدا سازی سالمونلا ها وجود پدیده شباهت آن با سایر فلورهای میکربی می باشد که جداسازی و تعیین هویت آنرا در شرایط فعلی مشکل می سازد و نتیجتا" بسیاری ازپرسنل آزمایشگاه ها دقت، حوصله و فرصت کافی برای جداسازی این باکتری را ندارند. لذا جهت رفع این مشکل انتخاب روش شناسایی سالمونلا بسیار پر اهمیت می باشد. امروزه محیط های زیادی با قابلیت انتخابی بیشتر و حساس تر جهت شناسایی سالمونلا از نمونه های کلینیکی و غذایی تولید شده است (16-15). از آنجائیکه سالمونلا یک باکتری پاتوژن است ، لذا در پدیده رقابتی با سایر میکرو فلور روده جهت افزایش شانس جداسازی سالمونلا، نیاز به یک مرحله غنی سازی دارد. لذا انتخاب روش مناسب غنی سازی و سپس تلقیح بر محیط کشت مناسب از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است(20-17). مشکلی که در اغلب آزمایشگاه های کشور با آن مواجه می باشند عدم انتخاب متدولوژی مناسب برای دسترسی به نتایج واقعی بوده ودر غالب موارد پزشک با عدم همخوانی پاسخ آزمایشگاه و علائم بالینی بیمار روبرو می باشد. کیت های تشخیصی و روش های مولکولی احتمالا" می توانند جایگزین مناسبی برای روش های وقت گیر و پردردسر رایج آزمایشگاهی شوند و هدف این طرح بررسی و مقایسه بین

روش های بیوشیمیایی با کیت APIو تکنیک PCR جهت تشخیص سالمونلامی باشد.

روش بررسی

در این مطالعه طی یکسال از آبان1389 الی مهر1390 با هماهنگی های انجام شده با آزمایشگاه 3 بیمارستان دانشگاهی امام، شریعتی و مرکز طبی کودکان شهر تهران، بعد از کشت 470 نمونه اسهال کودکان مبتلا به گاستروآنتریت حاد، بخشی از نمونه جهت تشخیص سالمونلا به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت انتقال و اقدامات زیر برای آنها انجام شد:

مرحله اول: کشت نمونه مدفوع و تعیین هویت سالمونلاها با تست های بیوشیمیائی(3):

1- 5 گرم نمونه مدفوع را با یک سوآب در 10 cc از محیط مایع سلنیت F(SF) قرارداده وسپس در دمای 35-37 درجه سانتیگراد به مدت 18 ساعت نگهداری شد.

2- یک لوپ از محیط فوق را داخل2 نوع از محیط های هکتون انتریک آگار و گزیلوز لایزین دکستروز آگار (XLD-HK) تلقیح نموده و در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24-18 ساعت نگهداری شد.

3- حداقل 3 کلنی مشکوک به سالمونلا از هر کدام از محیطهای فوق را برداشت نموده و با استفاده از تستهای بیوشیمیایی MRVP- LIA– TSI – SIM - اوره – سیمون سیترات -مالونات وONPG شناسائی آن انجام شد(تمامی محیط ها از شرکت مرک –آلمان تهیه شد).

مرحله دوم: شناسائی باکتریهای مشکوک به سالمونلا با کیت API-20E(21):

جهت تشخیص سالمونلا و افتراق از سایر باکتری های گرم منفی مشابه ، از کیت API-20E استفاده گردید. برای این منظور 5 سی سی سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر تهیه نموده و سپس با پی پت پاستور در حفره های کیت که حاوی ترکیبات و قندهای لیوفلیزه شده می باشند وارد نموده و طبق دستورالعمل سازنده (بیومریو- فرانسه) بقیه مراحل انجام گردید.

مرحله سوم: شناسائی باکتریها ی مشکوک به سالمونلا با روش PCR(22):

جهت انجام تست PCR، بایستی DNA باکتری ها را استخراج نمود که برای این کار ایزوله های ذخیره شده در TSB غنی شده، بر روی محیط مک کانکی کشت شدند. سپس از کلنی های رشد کرده بر روی محیط پس از یک شبانه روز در 37درجه سانتی گراد ، سوسپانسیونی در 50 میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شده، به مدت 5 دقیقه جوشانده و به مدت یک دقیقه در g 1000 سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان الگوی DNA برای تست PCR مورد استفاده قرار گرفت. DNA استخراج شده همراه با دو جفت پرایمر در دو سری PCR، مورد بررسی قرار گرفتند. از سویه ATCC 13076 بعنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های هدف سویه های مورد مطالعه در جدول 1 آمده است.

Primer	Length	Oligonucleotide sequence (5'- 3')
ERIC-F	22	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT
ERIC-R	22	TCAC-3'
		5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG
		AGCG-3'
(CTG)5	15	5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'

PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر با استفاده Hotstar Taqplus Master Mix Kit ساخت شرکت کیاژن صورت گرفت. این کیت شامل 2.5 mL Coralload loxt، ERIC-F 20pmol، ERIC-R 20pmol، 3 template DNA mL ، RNase- Free Water 12.5 mL ، Hotstar 12.5 mL Taq Plus Master Mixمی باشد. شرایط دمایی و زمانی PCR در جدول 2 زیر آورده شده است.

جدول1: شرایط دمایی واکنش PCR با استفاده از پرایمر ERIC برای تشخیص سالمونلا

		Temperature	Time (min)
Initial Denaturation		94	5
Loop= 4	Denaturation	94	4
	Annealing	53	4
	Extension	72	4
Loop= 29	Denaturation	94	30"
	Annealing	53	1
	Extension	72	2
Final Extension		72	7

محصولات PCR بر روی ژل آگاروز 1/5% با ولتاژ 70 به مدت 2 ساعت الکتروفورز شدند و در نهایت پس از عکسبرداری از ژل با استفاده از نرم افزار version4.0(Applied Maths,Sint-Matens-Gel Compaire II latem.Belgium) مورد آنالیز قرار گرفتند.

مرحله چهارم: تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

تمام ایزوله های سالمونلا از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با 16 دیسک آنتی بیوتیک (شرکت Mast) به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک) طبق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند(23).در این روش سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. 15 دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مولر هینتون آگار، دیسک های جنتامایسین (10 µg)، تتراسایکلین (30 µg)، کوتریماکسازول (1/25 µg)، نالیدیکسیک اسید (30 µg)، نیتروفورانتوئین (300 µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg)، سفالکسین(30 µg)، سفوتاکسیم (30 µg)، سفتریآکسون(30 µg)، سفتازیدیم(30 µg)، ایمی پنم (10 µg)، مروپنم (10 µg)،کلی سیتن (10 µg)، آموکسی سیلین (30 µg)، کلرامفنیکل (30 µg) و استرپتومایسین(10 µg) را به فاصله حداقل 2/5 سانتی متر از یکدیگر، بر روی محیط مزبور قرار گرفتند. پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد، با استفاده از خط کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و با استانداردهای جهانی(CLSI) مقایسه شده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، نمونه های مورد نظر را به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش داده شد.

یافته ها

در مجموع بدنبال کشت اولیه 470 نمونه مدفوع از بیماران اسهالی مراجعه کننده به آزمایشگاه های بیمارستان های دانشگاهی تهران در بررسی با روش های روتین بیوشیمیائی 65 نمونه (13/8%) حاوی سالمونلا بودند، در حالیکه نتایج بدست آمده از کشت و تعیین هویت با استفاده از کیت API-20E بیانگر وجود 37 (7/9%) مورد و با استفاده از روش PCR در 39 نمونه (8/3%) سالمونلا شناسائی گردید(جدول3).

جدول3: مقایسه موارد شناسائی سالمونلا با 3 روش تشخیصی

روش تشخیص^ نتیجه	کشت میکروبی بیمارستانی *	تعیین هویت با API-20E	تعیین PCR هویت با
موارد مثبت	(13/8) 65**	(7/9) 37	(8/3) 39
موارد منفی	(68/2) 405	(92/1) 433	(91/7) 431

*کشت و تعیین هویت با روش های روتین بیوشیمیائی مورد استفاده در بیمارستان های امام، شریعتی و مرکز طبی کودکان شهر تهران

**تعداد (درصد)

^بر اساس آزمون مک نمار نتایج کشت میکروبی بیمارستانی با API-20Eو PCR اختلاف معنادار دارد ($P<0.05$) .

مشخص گردید که 40% از مواردی که در روش روتین بیوشیمیائی بعنوان سالمونلا تشخیص داده شده بود ، بعد از بررسی با استفاده از کیت API-20E مربوط به سایر انتروباکتریاسه بویژه سیتروباکتر ، پروتئوس و ادواردسیلا بوده و جزء موارد خطای تشخیص آزمایشگاهی بیمارستان بوده است(جدول3). نتایج بدست آمده نشان داد که محیط XLD آگار 94/9% سویه هایی که با هکتون آگار جدا شده بودند را توانست جداسازی کند و تنها 2 سویه را قادر به شناسایی نبود.

جدول4: موارد خطا در تشخیص سالمونلا به روش کشت در مقایسه با 2 روش دیگر

باکتری	سیتروباکتر	پروتئوس	ادواردسیلا	جمع
تعداد	14	8	4	26

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی روی 37 ایزوله سالمونلا جدا شده از نمونه های اسهالی نشان داد که 73/3% ایزوله ها حداقل به یکی از 16 آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاومت نشان دادند. بیشترین میزان مقاومت به نیتروفورانتوئین با 100% و نالیدیکسیک اسید با 73/3% بود . همچنین هیچ ایزوله ای به سیپروفلوکساسین ، سفالکسین ، سفوتاکسیم ، سفتازیدیم ، سفتریاکسون ، مروپنم ، ایمی پنم و کلیستین سولفات مقاومت نشان ندادند (جدول5).

جدول 5- نتایج آنتی بیوگرام سویه های سالمونلا ایزوله شده از نمونه های بالینی

نوع آنتی بیوتیک	نتیجه آنتی بیوگرام (تعداد 37 مورد)			کل
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	
سفالکسین	35(%94/6)	2(%5/4)	0(%0/0)	37(100)
سفتریاکسون	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)
سفتازیدیم	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)
نالیدیکسیک اسید	6(%16/2)	5(%13/5)	26(%70/3)	37(100)
سفوتاکسیم	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)
آموکسی سیلین	28(75/7)	5(%13/5)	4(%10/8)	37(100)
استرپتومایسین	29(78/4)	5(%13/5)	3(%8/1)	37(100)
تتراسیکلین	23(%62/2)	5(%13/5)	9(%24/3)	37(100)
کلرامفنیل	34(91/9)	2(%5/4)	1(%2/7)	37(100)
سیپروفلوکساسین	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)
جنتامایسین	35(%94/6)	0(%0/0)	2(%5/4)	37(100)
تری متوپریم + سولفومتوکسازول	33(%89/2)	0(%0/0)	4(10/8)	37(100)
نیتروفوانتوئین	0(%0/0)	0(%0/0)	37(%100)	37(100)
ایمی پنم	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)
مروپنم	34(%91/9)	3(%8/1)	0(%0/0)	37(100)
کلستین سولفات	37(%100)	0(%0/0)	0(%0/0)	37(100)

بحث

از 470 بیمار مبتلا به اسهال که به بیمارستان مراجعه نموده بودند، آزمایشگاه بیمارستان65 یا 13/8% ازنمونه ها را سالمونلا تشخیص دادند. در حالیکه بررسی های همزمان با 2 روش در دانشکده نشان داد که حداکثر 39 نمونه یا 8/3% از آنها سالمونلا هستند و بقیه آنها سوش هایی از سایر جنس های مشابه مانند پروتئوس، سیتروباکتر و ادواردسیلا بودند، به عبارت دیگر 26 باکتری دیگر دارای وجه تشابه تشخیصی با سالمونلا هستند که اگر گالری کاملی در آزمایشگاه های تشخیص طبی نباشد احتمال خطا در تشخیص سالمونلا وجود دارد. البته چنانچه گالری کاملی تشکیل شود میزان خطا کاهش می یابد. نتایج ما نشان داد که استفاده از کیتAPI-20E خطای تشخیصی را به میزان 94/9% کاهش می دهد. Smith با استفاده از کیت API-20E نشان داد که قابلیت تشخیص 96/4% است که با نتایج ما همخوانی دارد (21). با توجه به تست کلیدی تشخیصی سالمونلا که تولید SH_2 است ، لذا تشخیص سالمونلا با استفاده از چند تست بیوشیمیایی نظیر TSI, SIM Simon Citrate, ، احتمال خطا هم افزایش می یابد زیرا باکتری های نزدیک به سالمونلا مانند پروتئوس، سیتروباکتر ، ادواردسیلا و آریزونا همگی قادر به تولید SH_2 هستند. لذا بایستی از یک گالری کامل از تست های بیوشیمیایی شامل Malonat, ONPG, LDC,TSI, SIM, Oxidas, Urea, MRVP, Simon Citrate, استفاده نمود. با توجه به تعدد تست های بیوشیمیایی و هزینه و زمانیکه برای ساخت و انجام آزمون صرف می شود، جایگزین نمودن کیت API-20E به دلائل زیر مقرون به صرفه است.

1- از نظر هزینه تمام شده (محیط کشت، شیشه آلات، تجهیزات ،پرسنل) مقرون به صرفه است.

2- مدت زمان آزمون کاهش می یابد.

3- بعلت کاهش عملیات آماده سازی (manipulation)و پرسنل میزان خطا کاهش می یابد.

4-با کیت API-20E قابلیت تشخیص گونه های مختلف وجود دارد.

همچنین پیشنهاد میگردد در صورت امکان با توجه به نتایج خوب محیط XLD آگار از این محیط بعنوان مکمل محیط هکتون آگار و از محیط های غنی کننده جهت افزایش شانس جداسازی سالمونلا در نمونه های افراد مبتلا به اسهال استفاده شود. همچنین برخی محققین پیش از این نشان داده اند که محیط هایی نظیر کروم آگار و رامباخ آگار جدا از قیمت گرانتر، از قابلیت بیشتر و ساده تری برای جداسازی سالمونلا برخوردار هستند(15-20).

در این مطالعه 100% سویه‌ها به سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون ، کولستین سولفات ، ایمی پنم حساس بودند. بیشترین مقاومت مربوط به نیتروفورانتوئین بود که 100% سویه‌ها به آن مقاوم بودند. با وجود مقاومت بالا به نالیدیکسیک اسید، 100% سویه‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند که نشان‌دهنده مناسب بودن کوئینولون‌ها در درمان همراه با خانواده سفالوسپورین‌ها می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Saly meakins در سال 2008 میلادی شایع‌ترین سروار، سالمونلا انتریتیدیس بود و افزایش مقاومت به نالیدیکسیک اسید از 10% به 26% و افزایش مقاومت به سیپروفلوکساسین از 0/2% به 0/9% دیده شد(24). در مطالعه انجام شده توسط Iris Spiliopoulo در سال 2007 در یونان شایع‌ترین سروار، انتریتیدیس (68%) گزارش شد و تمام ایزوله‌ها به سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین حساس بودند که با مطالعه ما تطابق دارد(25).

در این چند سال اخیر روش های مولکولی جایگزین بسیار مناسبی برای روش های سنتی معرفی شده است. تحقیقات متعددی توسط محققان بر روی نمونه های مختلف بالینی، غذایی و .... صورت گرفته است که سالمونلا ها را بطور بسیار واضح و کامل نشان می دهد. بررسی های ما نشان دهنده توانایی کامل شناسایی سالمونلا را در مقایسه با روش های دیگر دارد(3). تکنیک PCR نه تنها قابلیت شناسایی سروتایپ های سالمونلا را دارد، بلکه این امکان را می دهد که منشاء آلودگی را بتوان ردیابی نمود(27، 26 ،22). تکنیک PCR به دلیل حساسیت و ویژگی بالا در مقایسه با روش های دیگر از امتیاز خاصی برخوردار هستند. در کنار این امتیازات باید اذعان داشت که این تکنیک معایبی هم دارد ، از جمله نیروی

متخصص، تفسیر نتایج، وابستگی به مواد و وسائل،آلودگی ، همچنین با توجه به استفاده DNA در تکنیکPCR امکان دارد که باکتری کشته شده شناسایی شود . لذا مشاهده می شود در برخی مواقع علائم کلینیکی با داده های آزمایشگاه همخوانی ندارد و پزشک دچار سردرگمی در درمان بیمار می گردد.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده و تست آماری مک نمار نشان می دهد که اختلاف معنی داری میان نتایج ما و نتایج حاصله از بیمارستان ها وجود دارد($P<0.05$) ، ولی میان کیت API-20E و تکنیکPCR اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. یکی از مهمترین دستاوردهای این تحقیق،این است که نشان می دهد که متاسفانه خیلی به صحت پاسخ آزمایشگاه بیمارستان ها نمی توان امیدوار بود(خطای تشخیص40%). با توجه به مشکلات بیان شده در ارتباط با تکنیک های مولکولی، توصیه می شود از کیت API-20E که نتایج مشابهی با PCR داشته ، و در همه جا قابل دسترسی و انجام است، استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد 10855مورخ 89/11/16 می باشد .

References

1-Baron EJ. Feingold SM. *Methods for identification of etiologic agents of infectious diseases, Baily and Scott's Diagnostic Microbiology***,** 8 Edition, Mosby Company, Pub. USA, Chap 27. 1990pp. 363-81.

2-The Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Salmonella typhi Outbreak Information***.** 2005

3- Eshraghi S, Soltan Dalall MM, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B et al. *Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea***.** Tehran University Medical Journal;2010. 67, 12: 876-882.

4-Baumler AJ, Hargie BM, and Tsolis RM. *Tracing the origins of Salmonella outbreaks* Science.2000; 287: 50 – 52.

5-Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV**,** Cohen ML. *Origins and consequences of antimicrobial – resistant non typhoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animal***.** Microbiol Drug Resist. 2000;(6): 77 – 83.

6-Yang YJ, Huang MC, Wang SM, Wu JJ, Cheng CP, Liu CC.et al. *Analysis of risk factors for bacteremia in children with non typhoidal Salmonella gastroenteritis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 290 – 293.

7-Enwere G, Biney E, Cheung YB, Zaman SM, Okoko B, Oluwalana C, et al. *Epidemiological and clinical characteristics of community acquired invasive invasive bacterial infections in children aged 2–29 month in the Gambia*. Pediator Infect Dis .2006 ; 25(8):700 –705.

8-Misho B, Koehler J, Rodrigue D, Lee LA, Brenne FH, Blake P et al. *Outbreaks of Salmonella enteritidis infections in the united states 1985 – 1991*. J Infect Dis. 1994; 169: 547 –52.

9-Hedberg CW, White KE, Johnson JA, Edmonson LM, Soler JT, Korlath JA, etal. *An outbreak of Salmonella enteritidis infection at a fast-food restaurant: implications for foodhandler-associated transmission*. J Infect Dis. 1991; 164(6): 1135-1140.

10- Dyda A, Hundy R, Moffatt CR, Cameron S. *Outbreak of Salmonella Typhimurium 44 related to egg consumption***.** Commun Dis Intell. 2009; 33(4):414-418.

11- Graham S. *Salmonellosis in children in developing and developed Countries and populations*. Curr Opin Infect Dis. 2002; 15:507–12.

12- Cheng-Hsun Chiu, Lin-Hui Su, Ching-Chi Hung , Kuo-Lung Chen, Chishih Chu. prevalence and antimicrobial susceptibility of serogroup D nontyphoidal Salmonella in university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol.2004; 42(1):415-417.*

13- Black PH, Kunz LJ, Swortz MN. *Salmonellosis – A review of some unusual aspects***.** N Engl J Med. 1960. 262: 811.

14- Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. *Non – typhoial Salmonellosis: emerging problems.* Microbes and infection. 2001; 3(3): 237 – 247.

١٥- Maddocks S, Olma T, Chen S. *Comparison of CHROM agar Salmonella medium and Xylose-Lysine-Desoxycholote agar and Salmonella-Shigella agar, for isolation of Salmonella strains from stool samples.* J Clin Microbiol. 2002; 40, 2999-3003.

16- Perez JM., Cavalli P., Roure C. Renac R, Gille Y, Freydiere AM. *Comparison of four Chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of Salmonella strains in human stools.* J Food Microbiol. 2003;41(3): 1130-1134

17-Dusch H, Altwegg M. *Comparison of Rambach agar, SM ID medium, and Hektoen enteric agar, for primary isolation of non-typhi Salmonellae from stool samples.* J Clin Microbiol. 1993; 31(2): 410-412.

18- Gaillot O, Camillo D, Berche P, Courcol R, Savage C. *Comparison of CHROMagar Salmonella medium and Hektoen enteric agar for isolation of Salmonellae from stool sample*.J.Clin.Microbiol. 1999; 37(3): 762-65.

19- Blivet D, Salvat G, Humbert F, Colin P. *Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of Salmonella spp. from poultry products***.** Intern J Food Microbiol. 1997; 38(2-3): 211-216.

20- June GA, Sherrod PS, Hammack TS, Amaguana RM, Andrews WH. *Relative effectiveness of Selenite Cystine broth, Tetrathinate broth and Rappaport – Vassiliadis medium for recovery of Salmonella spp. From raw flesh highly contaminated food and poultry feed, collaborative study*. J AOAC Intern. 1996; 79(6):1307-1323.

21- Smith PB, Tomfohrde KM, Rhoden DL, Balows A. *API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae.* Applied Microbiology. 1972; 24(3): 449-452.

22- *Rasschaert* G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt *K*, De Zutter L, Heyndrickx M. *Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of Salmonella enterica Isolates***.** J Clin Microbiol**..** 2005; 43(8):3615–3623.

23- Clinical and laboratory standard institute**.** *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* NCCLS documents M100 – SIS, 940 West Valley Road. Wayne, PA, 19087 USA, 2005.

24- Meakin S , Fisher ST, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M et al. *Antimicrobial drug resistance in human non typhoidal Salmonella isolates in europe 2000 – 2004.* Microbial Drug resistance.2008; 14(1): 31- 35.

25- Spiliopoulou I, Zografu S, Goula A, Dimitrafopoulos G, Christofidou M. *Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of Salmonella enterica from southwestern Greece.* Chemotherapy. 2007; 53 (6): 392 –396.

26- Suh DK, Song JC. *Analysis of Salmonell enterica serotype enteritidis isolated from human and chikens by repetitive sequence- PCR Fingerprinting , antibiotic resistance and plasmid profiles*. J Vet Sci. 2006; 7(1): 37-41.

27- Albufera U, Bhugaloo- Vial P, Issack MI, Jaufeerally-Fakin Y. *Molecular characterization of Salmonella by REP-PCR and RAPD analysis.* Infect Gene Evolu. 2009; 9(3): 322-327.