مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵/ ۸۰-۷۳

مقاله پژوهشی

شناسایی سروتایپ های سالمونلا در طغیان های غذایی با استفاده از سکانس ناحیه ی ITS ژن 16S-23S rRNA

محمد مهدی سلطان دلال[۱،۲*]، محیا خلیلیان[۲]، حسین معصومی اصل[۱،۳]، روناک بختیاری[۲]، ابوالفضل داوود آبادی[۲]، زهرا رجبی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۲]گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۳]مرکز مدیریت بیماری ها، معاونت بهداشتی و وزارت بهداشت، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۱٤

چکیده:

زمینه و هدف: **بیماری های منتقله از غذا یکی از مشکلات جامعه ی امروزی است. در بسیاری نقاط جهان، بررسی های اپیدمیولوژی نشان داده است که عفونت های ناشی از سروارهای سالمونلا افزایش یافته است. بدین منظور شناسایی سویه های سالمونلا در سطح سروار از اهمیت خاصی برخوردار است. ظهور سویه های مقاوم در این سروارها به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است، بنابراین آگاهی از الگوی مقاومتی در سالمونلاها می تواند به درمان بیماری های منتقله از غذا ناشی از این سروارها کمک کند. هدف از این مطالعه شناسایی سروارهای سالمونلا در طغیان های غذایی با توالی منطقه ای ITS به روش 16S-23SrRNA می باشد.**

روش بررسی: **این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی که طی یک سال ۱۷۳ طغیان غذایی کشوری از استان های مختلف کشور جمع آوری گردید. در مجموع ٦١٤ نمونه اسهال از نظر وجود سالمونلا بررسی شد. جهت جداسازی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها از روش های استاندارد استفاده گردید، همچنین برای تعیین سویه های سالمونلا از روش مولکولی 16SrRNA استفاده گردید.**

یافته ها: **از میان ۱۸ ایزوله سالمونلا جدا شده از طغیان های رخ داده، ١٦ ایزوله سالمونلا انتریتیدیس (۸۸/۹٪) و ۲ ایزوله پاراتیفی A (۱۱/۱٪) بود. همگی این ایزوله ها به آنتی بیوتیک سفتازیدیم حساس بودند. بیش ترین مقاومت نیز به نالیدیکسیک اسید (١٤ نمونه و ۷۷/۸ ٪) بود.**

نتیجه گیری: **شیوع مقاومت آنتی بیوتیک باکتری ها که تهدید عمده ای برای سلامت انسان است، به سرعت در حال افزایش است. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سالمونلا نیز در حال افزایش است، بنابراین آگاهی از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سروارهای سالمونلا، در درمان ناشی از عفونت های این باکتری در مواد غذایی کمک خواهد کرد.**

واژه های کلیدی: **سالمونلا، بیماری های منتقله از غذا، طغیان، اسهال، آنتی بیوگرام.**

مقدمه:

امروزه به دلایل متعدد بیماری های منتقله از آب و غذا و طغیان های ناشی از آن در دنیا رو به گسترش است و همه ساله موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شود، حتی در کشورهای صنعتی هر سال بیش تر از ۳۰٪ مردم به بیماری های منتقله از غذا مبتلا می شوند (۱). پیدایش و ظهور پاتوژن های منتقله از غذا، همراه با مقاومت های آنتی بیوتیکی ناشی از این باکتری ها و اثرات آن ها بر روی سلامت عمومی جامعه یکی از مهم ترین چالش های ایجاد شده در سیستم مراقبت بهداشت

***نویسنده مسئول:** تهران- دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی- تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱،*
E-mail: msoltandallal@gmail.com

می باشد. گونه های مختلف سالمونلا و شیگلا، کمپیلو باکترژژونی و وروتوکسین های اشریشیاکلی همگی از جمله پاتوژن های مهم و نوظهور جهانی هستند که از طریق انتقال توسط مواد غذایی، طغیان های ناشی از بیماری های منتقله از غذا را روز به روز افزایش داده و این مسئله به عنوان یک مشکل بهداشت جهانی محسوب می گردد (۲). امروزه بسیاری از این پاتوژن های نوظهور مشترک با دام شدیداً به عوامل ضد میکروبی مقاوم شده اند که به دلیل مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها به عنوان مکمل ها در صنعت دامپروری، مقاومت های دارویی بسیار شایع شده است (۳). یکی از مهم ترین عوامل میکروبی بیماری های منتقله از غذا، سالمونلا است که در انسان با علائم بالینی مختلفی تظاهر می کند. گاستروانتریت شایع ترین عفونت سالمونلایی در انسان و یکی از مشکلات و معضلات بهداشتی مهم در سر تا سر جهان می باشد که در اثر مصرف مواد غذایی آلوده با منشاء حیوانی یا غیر حیوانی به وجود می آید (۵،۴). یافته های قبلی ما بیانگر اهمیت طغیان های غذایی در کشور همچون سایر نقاط جهان است (۷-۵). روش های متداول برای شناسایی سالمونلا نیازمند چندین مرحله کشت و انجام تست های افتراقی و سرولوژی است که ۷-۵ روز طول می کشد. تاکنون بیش از ۲۴۰۰ از سرووارهای سالمونلا شناسایی شده است (۸)، بنابراین روشی سریع برای شناسایی تمامی سرووارهای سالمونلا مورد نیاز است. در سال های اخیر، روش های PCR به طور موفقیت آمیزی در شناسایی پاتوژن های منتقله از غذا به ویژه سالمونلا مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱-۹) ژن های rRNA در تمام ارگانیسم ها وجود دارند. اپران های rRNA باکتریایی از ژن های 16SrRNA، tRNA، ژن های 23SrRNA و ژن های 5SrRNA تشکیل شده اند که تعداد کپی های ژن های rRNA در گونه های مختلف باکتری ها فرق می کند. برای مثال در باسیلوس سوبتیلیس ۱۰ عدد و در اشریشیاکلی و سالمونلا ۷ عدد وجود دارد (۱۳،۱۲).

در بین منطقه ی 16S و 23SrDNA مناطق رونویسی شونده ی داخلی (internal transcribed spacer= ITS) قرار گرفته اند. تفاوت در اندازه و توالی در مناطق ITS در گونه های مختلف باکتری ها باعث شده است که این توالی ها برای طراحی ژن های مختلف و یا پروب های اختصاصی DNA و پرایمرها مورد استفاده قرار بگیرند (۱۴)، لذا در این مطالعه برای شناسایی سویه های سالمونلا از ۲ پرایمر اختصاصی ITSF و ITSR استفاده شده است. هنگامی که PCR سویه های سالمونلا با سروتایپ های مختلف با پرایمرهای ITSF/ITSR انجام گرفت، تمامی محصولات PCR باندهایی با وزن حدودی ۳۱۲ bp نشان می دهند. از سوی دیگر هیچ باندی برای ایزوله های غیر سالمونلا مشاهده نمی شود.

همچنین روند استفاده ی نادرست و بی رویه ی آنتی باکتریال ها در حیوانات به دور از ارزیابی دقیق از حساسیت باکتریایی که یا برای پیشگیری از بیماری، یا برای درمان بیماری و یا جهت رشد بیش تر به حیوانات داده می شود، منجر به گسترش مقاومت به داروهای ضد میکروبی و متعاقباً مقاومت دارویی در انسان ها به دلیل اثرات باقی مانده ی دارویی در فرآورده های حیوانی می گردد؛ به طوری که این مسئله باعث پیدایش استرین هایی از سالمونلا انتریکا با مقاومت چند گانه شده است و آن را به یک مشکل بزرگ اپیدمیولوژیک در سراسر جهان تبدیل نموده است که باعث محدودیت در درمان می شود (۱۵)، لذا هدف از این مطالعه ضمن شناسایی سرووارهای سالمونلا در طغیان های غذایی، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها بوده است.

روش بررسی:

در این مطالعه که به صورت توصیفی- مقطعی انجام گرفته، از مهر ماه ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۳، تعداد ۱۷۳ طغیان و ۶۱۴ نمونه اسهال از کل کشور مورد بررسی قرار گرفت. طبق روش استاندارد، نمونه های طغیان،

بر روی محیط انتقالی کری بلر منتقل شده و در آزمایشگاه گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر روی محیط سلنیت F انتقال داده شد و بعد از گذشت ۱۲-۸ ساعت روی هکتون انتریک آگار کشت داده شد. بعد از انکوبه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، کلنی های مشکوک به سالمونلا جداسازی شده و از نظر سایر واکنش ها روی محیط TSI، محیط لیزین دکربوکسیلاز، سیمون سیترات، MRVP، SIM و اوره آگار (مرک آلمان)کشت داده شد (۱۶).

برای تعیین سروتایپ نهایی سوش ها از آنتی سرم های پلی والان و منووالان آنتی ژن های سوماتیک و فلاژله فاز (I) و فاز (II) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Difco ،USA) به روش Slide-agglutination استفاده شد (۱۷).

برای تعیین حساسیت سویه های شناسایی شده نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان از روش استاندارد دیسک دیفیوژن استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده در این پژوهش مربوط به شرکت MAST انگلستان و شامل ۱۰ آنتی بیوتیک آموکسی سیلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول- تری متو پریم (۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و مروپنم (۱۰ میکروگرم) بودند.

برای انجام آنتی بیوگرام از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند و محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت قطر عدم رشد به وسیله ی خط کش اندازه گرفته شد. با استفاده از استاندارد جهانی CLSI به صورت حساس (S)، نیمه حساس (I) و مقاوم (R) تفسیر و ثبت گردید (۱۸). برای تعیین سویه ی سالمونلا از روش 16SrRNA استفاده شد. پرایمر مورد استفاده در این روش در جدول زیر آمده است (۱۹). در ابتدا اختصاصیت پرایمرها با Blast کردن آن ها در سایت NCBI مورد تأیید قرار گرفت و سپس سفارش ساخت پرایمر به شرکت تکاپوزیست (شرکت سازنده پرایمر BIONEER کره) فرستاده شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی
ITSR	(5-tat agc ccc atc gtg tag tca gaa c-3V
ITSF	(5V-tgc ggc tgg atc acc tcc tt-3V)

برای استخراج DNA بعد از کشت باکتری و گذشت ۲۴ ساعت، یک کلنی از آن با ۵۰ ماکرولیتر بافر STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA (STE) Buffer) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد، سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۳۳۰۰ سانتریفیوژ شده و از محلول رویی ۲۰ ماکرولیتر برداشته و داخل یک میکروتیوپ کوچک اضافه شد. محلول رویی حاوی DNA مورد نظر تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۵/۱ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر PCR buffer، ۰/۶ میکرولیتر $Mgcl_2$، ۰/۴ میکرولیتر dNTP، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر ITSF و ۰/۳ میکرولیتر پرایمر ITSR و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Master Taq polymerase بود. حجم Master Mix ۱۹ میکرولیتر است که با افزودن ۱ میکرولیتر از DNA به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر می رسد. شرایط دمایی و زمانی PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است.

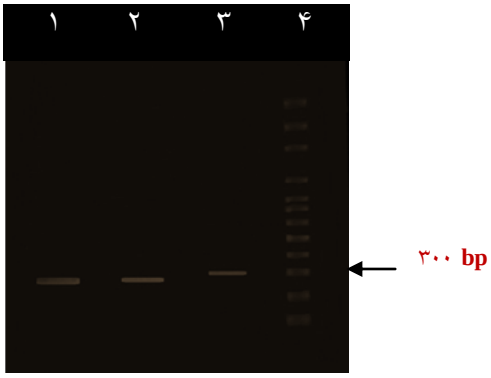
جدول شماره ۲: جدول زمان بندی جهت PCR

دما	زمان	سیکل
۹٤ درجه سیلسیوس	۲ دقیقه	
۹٤ درجه سیلسیوس	۳۰ ثانیه	
۷۱ درجه سیلسیوس	۳۰ ثانیه	۳۵
۷۲ درجه سیلسیوس	۵۰ ثانیه	
۷۲ درجه سیلسیوس	۱۰ دقیقه	
۲۵ درجه سیلسیوس	۱ ساعت و ٤۵ دقیقه	

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ (SinaClon) با ولتاژ ۸۰ ولت و زمان حدود ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در پایان توسط دستگاه Gel documentation از ژل عکس تهیه شد.

یافته ها:

بعد از انجام روش مولکولی و انجام الکتروفورز و مشاهده ی ژل در دستگاه Gel documentation، برای تأیید سالمونلا باندهایی در حدود ۳۱۲ bp رویت شد. از طرف دیگر، برای سویه ی غیر سالمونلا هیچ باندی رویت نشد. بعد از تأیید، برای تعیین سویه ی سالمونلا نمونه ها جهت سکانس به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. سکانس تأیید شده سالمونلا ۹۸٪ با سروارهای موجود در بانک اطلاعات ژن (NCBI) شباهت داشته است.



تصویر شماره ۱: اختصاصیت روش PCR برای شناسایی سویه های سالمونلا با استفاده از پرایمرهای ITSF/ITSR

چاهک ۱ تا ۲ سالمونلاهای جدا شده از نمونه های ارسالی، چاهک ۳ کنترل مثبت، چاهک ٤ حاوی Ladder است. برای ایزوله های سالمونلا در حدود ۳۱۲ bp باند مشاهده می شود.

جدول شماره ۳: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای ایزوله از طغیان های غذایی

	حساس	نیمه حساس	مقاوم
آنتی بیوتیک	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
مروپنم (MEM)	۲(٪۱۱/۱)	۱۳(٪۷۲/۲)	۳(٪ ۱٦/۷) ۳
سفوتاکسیم (CTX)	۱٤(٪۷۷/۸)	٤(٪۲۲/۲)	۰(٪۰)
کلرامفنیکل (C)	۱۷(٪۹٤/٤)	۱(٪۵/٦)	۰(٪۰)
کوتریموکسازول (TS)	۱۳(٪۷۲/۲)	۱(٪۵/٦)	٤(٪۲۲/۲)
سیپروفلوکساسین (CIP)	۱٦(٪۸۸/۹)	۲(٪۱۱/۱)	۰(٪۰)
نالیدیکسیک اسید (NA)	۳(٪۱٦/۷)	۱(٪۵/٦)	۱٤(٪۷۷/۷)
آموکسی سیلین (A)	۱۷(٪۹٤/٤)	۰(٪۰)	۱(٪۵/٦)
تتراسایکلین (T)	۱٤(٪۷۷/۸)	۰(٪۰)	٤(٪۲۲/۲)
آمپی سیلین (AP)	۱٤(٪۷۷/۸)	٤(٪۲۲/۲)	۰(٪۰)
سفتازیدیم (CAZ)	۱۸(٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)

در طی این مطالعه، از مجموع ۱۷۳ طغیان و ۶۱۴ نمونه (٪۲/۹) ۱۸ ایزوله ی سالمونلا جدا گردید. شایع ترین سروار سالمونلا انتریتیدیس با فراوانی (٪۸۸/۹) و بعد سالمونلا پاراتیفی A (٪۱۱/۱) بود.

در روش آنتی بیوگرام از ۱۰ آنتی بیوتیک استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده بیش ترین مقاومت به نالیدیکسیک اسید با ۱۴ نمونه (٪۷۷/۸) و بیش ترین حساسیت به سفتازیدیم با ۱۸ نمونه (٪۱۰۰) دیده شد؛ همچنین آموکسی سیلین و کلرامفنیکل با ۱۷ نمونه (٪۹۴/۴) در مرحله ی بعدی حساسیت قرار داشتند (جدول شماره ۳).

بحث:

پیدایش و ظهور پاتوژن های منتقله از غذا، همراه با مقاومت های آنتی بیوتیکی ناشی از این باکتری ها و اثرات آن ها بر روی سلامت عمومی جامعه

یکی از مهم ترین چالش های ایجاد شده در میکروبیولوژی مواد غذایی می باشد (۲۰). در دنیای امروز مقاومت آنتی بیوتیکی به سرعت در حال رشد است و این به دلیل مصرف بیش از حد و یا نادرست از آنتی بیوتیک هاست که باعث ظهور سویه های مقاوم سالمونلاها شده است (۲۲،۲۱). از این رو نظام سلامتی جامعه باید این موارد را در زمینه های دامپروری و کشاورزی نیز مد نظر قرار دهد (۲۳). البته با افزایش آگاهی ها، کشورهای بیش تری کاربرد آنتی بیوتیک ها را ممنوع می کنند، ولی با این حال مقاومت پاتوژن های ایجاد شده تاکنون کاهش پیدا نکرده است و در حال حاضر مهم ترین نگرانی ایمنی غذایی فعالیت های مهارکننده بر علیه این باکتری های مقاوم می باشد (۲).

در مطالعه حاضر و مطالعه قبلی محققین، نشان داده شد که اولاً با توجه به تغییر رویکرد مصرف غذایی در دهه های اخیر، طغیان های غذایی در ایران جایگاه ویژه ای پیدا نموده اند. ثانیاً باکتری هایی مانند سالمونلا و شیگلا نقش پراهمیتی در ایجاد بیماری های منتقله از غذادارند (۷،۶).

در مطالعه ای در ترکیه در بررسی مقاومت های دارویی مربوط به سالمونلاهای غیر تیفوئیدی انجام شد، نشان داد که کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین مخصوصاً در گونه های سالمونلا گروه C وجود دارد که یک مشکل مهم در کشور ترکیه است و با نتایج تحقیق ما کمی متفاوت است، زیرا سروتیپ های جدا سازی شده در این تحقیق همگی به سیپروفلوکساسین حساس می باشند به جز ۲ مورد (۱۱٪) که نیمه حساس بودند (۲۴). در بررسی انجام شده در فلسطین، (۵۳/۳٪) سالمونلاهای غیر تیفوئیدی جدا گردید که بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها در نالیدیکسیک اسید (۷۹٪) دیده شد که با تحقیق ما که میزان مقاومت ۷۷٪ بود، مشابه می باشد (۲۵). در آمریکای مرکزی Mussaret و همکاران در طی یک مطالعه بر روی ۳۹۲ سویه سالمونلای جدا شده در کشور مکزیک نشان دادند که ۲۵/۵٪ ایزوله ها به آمپی سیلین، ۲۳/۴٪ به کلرامفنیکل، ۱۹/۲٪ به کوتریموکسازول و ۴۸/۸٪ به تتراسایکلین مقاوم بودند (۲۶). در مطالعه ی ما ۲۷٪ ایزوله ها (۵ نمونه) به آمپی سیلین و ۵٪ ایزوله ها (۱ نمونه) به کلرامفنیکل تنها نیمه حساس بودند و مقاومتی مشاهده نشد که با مطالعه ی فوق مغایرت دارد. ۲۲٪ ایزوله ها (۴ نمونه) به آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و تتراسایکین مقاوم بودند که با نتایج بالا تنها در مقاومت به کوتریموکسازول مشابهت داشت. به طور کلی دلایل متعددی می تواند در متفاوت بودن نتایج مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در کشورهای مختلف وجود داشته باشد. به طور مثال عدم فرهنگ صحیح مصرف آنتی بیوتیک چه از طرف پزشکان و چه از طرف بیماران، مصرف نامتعارف آنتی بیوتیک ها در مرغداری ها و دامداری ها و انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق مواد غذایی، استاندارد نبودن دیسک های آنتی بیوتیک تولید شده در داخل کشور در مقایسه آنتی بیوتیک های استاندارد.

اگرچه مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا انتریتیدیس در مقایسه با سالمونلا تیفی موریوم به طور قابل ملاحظه ای کم تر است (۲۷)، اما باید توجهات لازم را در مورد مقاومت سالمونلا انتریتیدیس به یک یا چند آنتی بیوتیک را لحاظ نمود؛ چرا که افزایش مقاومت دارویی به این سروتایپ به عنوان مهم ترین عامل سالمونلوزیس در طغیان های منتقله از غذا است (۲۸).

در این مطالعه از روش 16srRNA برای شناسایی سرووارهای سالمونلا استفاده شد. تنها توالی کوتاه bp ۲۵ از منطقه ی ITS سرووارهای سالمونلا مشابه بود که این توالی مشابه حتی در جنس های وابسته به سالمونلا نظیر سیتروباکتر، شیگلا، انتروباکتر یافت نمی شود (۱۹)، بنابراین این مناطق می تواند برای شناسایی سویه های سالمونلا در طغیان های غذایی به کار رود.

بنابراین انتظار این است اطلاعات به دست آمده از این مطالعه بتواند کمکی باشد در تشخیص به موقع

سویه های سالمونلا و شناخت مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها که امید است باعث کاهش هزینه های مصرفی درمانی شده و بتواند در جهت انجام اقدامات لازم برای کنترل و پیشگیری مفید واقع شود.

نتیجه گیری:

شیوع مقاومت آنتی بیوتیک باکتری ها که تهدید عمده ای برای سلامت انسان است، به سرعت در حال افزایش است. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سالمونلا نیز در حال افزایش است، بنابراین آگاهی از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سرووارهای سالمونلا، در درمان ناشی از عفونت های این باکتری در مواد غذایی کمک خواهد کرد.

در پایان پیشنهاد می گردد که برقراری ارتباط بیش تر دانشگاه ها و مراکز بهداشتی استان ها با آزمایشگاه مرجع دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران؛ آموزش کارشناسان و مسئولین مراکز بهداشت استان ها جهت گزارش دهی به موقع طغیان ها؛ بررسی و پیگیری مستمر طغیان های منتقله از غذا به صورت یک برنامه سالانه؛ استفاده از اطلاعات به دست آمده از این مطالعات در معاونت درمان وزارت بهداشت در جهت پیشگیری و مهار طغیان های منتقله از غذا در سال های آینده با هدف کاهش هزینه های درمانی.

تشکر و قدردانی:

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۲۳۱۱۵ مورخ ۱۳۹۳/۴/۸ است که بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه جهت تأمین هزینه های طرح، تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

1. Marino DD. Water and food safety in the developing world: global implications for health and nutrition of infants and young children. J Am Diet Assoc. 2007; 107(11): 1930-4.
2. Koluman A, Dikici A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends. Crit Rev Microbiol. 2013; 39(1): 57-69.
3. El Allaoui A, Rhazi Filali F, Essahale A, Bouchrif B, Karraouan B, Ameur N. Characterization of antimicrobial susceptibility, virulence genes and identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Salmonella* serovars isolated from turkey meat in Meknes, Morocco. Inter J Microbiol Immun Res. 2013; 1(7): 68-79.
4. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella* enteritidis: a new pandemic? Epidemiol Infect. 1990; 105(1): 21-7.
5. Gomez TM, Motarjemi Y, Miyagawa S, Kaferstein FK, Stohr K. Foodborne salmonellosis. World Health Stat Q. 1997; 50(1-2): 81-9.
6. Soltan Dallal MM, Motalebi S, Masoomi Asl H, Rahimi Foroushani A, Sharifi Yazdi MK, Aghili N. Investigation of the frequency of *Salmonella Spp*. in foodborne disease outbreaks in Iran and determination of their antibiotic resistance. Pajouhandeh 2015; 19(6):341-47.
7. Soltan Dallal MM, Motalebi SM, Masoumi Asl H, Rahimi Forushani A, Sharifi Yazdi MK, Rajabi Z, et al. Analysis of epidemiological data of foodborne outbreak reported in Iran. Tehran Univ Med J. 2015; 72(11): 780-8.
8. Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000; 38(7): 2465-7.
9. Oliveira S, Santos L, Schuch D, Silva A, Salle C, Canal C. Detection and identification of *salmonellas* from poultry-related samples by PCR. Vet Microbiol. 2002; 87(1): 25-35.
10. Way JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadegan M, Gerba CP, Pepper IL. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(5): 1473-9.

11. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. Vet Microbiol. 2002; 89(1): 53-60.
12. Carrasco B, Fernandez S, Asai K, Ogasawara N, Alonso JC. Effect of the recU suppressors sms and subA on DNA repair and homologous recombination in Bacillus subtilis. Mol Genet Genomics. 2002; 266(5): 899-906.
13. Asai T, Zaporojets D, Squires C, Squires CL. An Escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(5): 1971-6.
14. Zhou SM, Fan Y, Zhu XQ, Xie MQ, Li AX. Rapid identification of Streptococcus iniae by specific PCR assay utilizing genetic markers in ITS rDNA. J Fish Dis. 2011; 34(4): 265-71.
15. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: Problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26(2): 141-8.
16. Dallal MMS, Taremi M, Gachkar L, Modarressi S, Sanaei M. Characterization of antibiotic resistant patterns of *Salmonella* serotypes isolated from beef and chicken samples in Tehran. Jundishapur J Microbiol. 2009; 2(4): 124-31.
17. Popoff MY and L. LeMinor. Antigenic formulase of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Center for Refrence and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, France. 1997. Available from: http://www.serotest-thailand.com/upload/news/download/9-8310-0.pdf.
18. Clinical and laboratory standard institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, PA, M100S16, 26.NO.3. 2006. Available from: http://microbiolab-bg.com/wp-content/uploads/2015/05/CLSI. pdf.
19. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. Int J Food Microbiol. 2005; 97(3): 259-65.
20. Greig JD, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int J Food Microbiol. 2009; 130(2): 77-87.
21. Gousia P, Economou V, Sakkas H, Leveidiotou S, Papadopoulou C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. Foodborne Pathog Dis. 2011; 8(1): 27-38.
22. Koluman A, Dikici A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends. Crit Rev Microbiol. 2013; 39(1): 57-69.
23. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, et al. A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. Public Health Rep. 2004; 119(4): 427-34.
24. Erdem B, Ercis S, Hascelik G, Gur D, Aysev AD. Antimicrobial resistance of *Salmonella* enterica group C strains isolated from humans in Turkey, 2000-2002. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26(1): 33-7.
25. Weinberger M, Solnik-Isaac H, Shachar D, Reisfeld A, Valinsky L, Andorn N, et al. *Salmonella* enterica serotype Virchow: epidemiology, resistance patterns and molecular characterisation of an invasive *Salmonella* serotype in Israel. Clin Microbiol Infect. 2006; 12(10): 999-1005.
26. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, et al. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerg Infect Dis. 2008; 14(3): 429-35.
27. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Vet Microbiol. 2002; 86(4): 295-301.
28. Geimba MP, Tondo EC, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999–2000. J Food Safe. 2005; 25(3): 173-82.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016; 18(1): 73-80. **Original article**

Identification of *Salmonella* serotypes in foodborne outbreaks by sequencing of ITS region of 16S-23SrRNA

Soltan Dallal MM[1,2*], Khalilian M[2], Masoumi Asl H[1,3], Bakhtiari R[2], Davoodabadi A[2], Rajabi Z[1]

[1]Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; [2]Pathobiology Dept., Tehran University Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; [3]Center for Communicable Disease Control, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, I.R. Iran.

Received: 6/Apr/2015 Accepted: 6/Oct/2015

Background and aim: Foodborne diseases are a major problem of modern society. The epidemiological investigations in many parts of the world had been shown that infections caused by *Salmonella* serovars are increasing. Therefore, the identification of *Salmonella* species to serovars level is in specific importance. In addition, the emergence of drug resistance among these serovars also has become a major global concern. So, the knowledge of the resistance patterns of *Salmonella* could be very useful for the treatment of such foodborne diseases. The aim of this study was to determine *Salmonella* serotypes in foodborne outbreaks by sequencing of ITS region of 16S-23SrRNA gene.

Methods: This was a cross- sectional study, in total, 173 outbreaks in different provinces of Iran during one year were selected. In total, 614 diarrheal specimens from patients in outbreaks were tested for the isolation of *Salmonella*. Identification of *Salmonella* was carried out by 16SrRNA method and antibiotic susceptibility was performed by standard methods.

Results: Of 18 *Salmonella* isolated from happened outbreaks, 16 cases (88.9%) were *Salmonella* enteridis and 2 cases (11.1%) *Salmonella paratyphi A*, respectively. All isolates were sensitive to ceftazidime, and high resistance to tested antibiotics was seen with nalidixic acid (77.8%) in 14 samples.

Conclusion: Prevalence of antibiotics resistance bacteria which is major threat for human health is increasing rapidly. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains also are increasing. Therefore, knowledge of antibiotic resistance pattern to *Salmonella* serovars will help in treatment of foodborne due to *Salmonella* infections.

***Key words: Salmonella*, Foodborne diseases, Outbreak, Diarrhea, Antibiotic susceptibility.**

Cite this article as: Soltan Dallal MM, Khalilian M, Masoumi Asl H, Bakhtiari R, Davoodabadi A, Rajabi Z. Identification of *Salmonella* serotypes in foodborne outbreaks by sequencing of ITS region of 16S-23SrRNA. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(1): 73-80.

[*]**Corresponding author:**
Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982188992971, E-mail: msoltandallal@gmail.com