شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی گونه‌های مختلف *شیگلا* از غذا براساس ژن ***IpaH*** و تعیین الگوی آنتی-بیوتیکی جدایه‌ها

ایما عجم پور، نیما بهادر*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

***نویسنده مسول** : *bahador@iaushiraz.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۳

چکیده

غذا ماده حیاتی است که بدون آن موجود زنده قادر به زیستن نخواهد بود، اما این ماده حیاتی می تواند بعنوان عاملی برای انتقال بیماری به انسان باشد. بنابراین به دلیل اهمیت شیگلا به عنوان ارگانیسمی که باعث دیسانتری در انسان می شود تحقیق حاضر بدنبال جداسازی *شیگلا* از مواد غذایی می‌باشد. بطور کلی صد نمونه مواد غذایی شامل چهل نمونه سبزیجات، ۳۰ نمونه مرغ، ۲۰ نمونه گوشت چرخ‌کرده، ۱۰ نمونه ماهی جمع آوری گردید. نمونه ها به محیط کشت گرم‌نگاتیوبراث منتقل شده و سپس به محیط‌های افتراقی مک‌کانکی و *سالمونلاشیگلا*آگار انتقال یافته است.کلنی‌های مشکوک خالص‌سازی‌شده و به کمک تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند.جدایه‌ها براساس ژن ***ipaH*** بکمک آزمون PCR مورد شناسایی مولکولی قرارگرفتند. پس از آن سروتایپینگ جدایه‌ها و الگوی‌آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از صد نمونه مورد ارزیابی از بین مواد غذایی تنها *شیگلا* از سبزیجات جداسازی گردید. جدایه‌ها (۶ سویه) به کمک آزمون مولکولی تایید شدند و همگی در جنس *شیگلا* قرار دارند. همچنین بر اساس تست اگلوتیناسیون جدایه‌ها متعلق به یک سویه دیسانتری، دو سویه *سونئی*، دو سویه *فلکسنری* و یک سویه غیر قابل شناسایی گزارش گردید. علاوه بر این باکتریها الگوهای متفاوتی در رابطه با آنتی‌بیوتیکها نشان دادند بطوریکه سویه شماره ۱ با ۱۰۰ درصد حساسیت نسبت به تتراسایکلین ارزیابی گردید و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیکها مقاومت نشان دادند.از آنجاییکه غذا ماده‌ایی موثر در انتقال میکروارگانیسمهاست بنابراین مانیتورکردن مواد غذایی در مارکتها و سبزی فروشی‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است .

واژگان کلیدی: مواد غذایی، آزمون ملکولی PCR، *شیگلا*، سروتایپینگ، آنتی‌بیوگرام

مقدمه

شیگلا باسیل گرم منفی، بدون اسپور، بی‌هوازی اختیاری است که از نظر واکنشهای بیوشیمیایی و آنتی ژنی به *اشریشیا کلی* مرتبط می باشد. این ارگانیسم اغلب قادر به تخمیر لاکتوز نمی‌باشد و لیزین را دکربوکسیله نمی‌نماید. علاوه بر این هنگام تخمیر گلوکز قادر به تولید گاز نبوده و تمامی سویه‌ها غیرمتحرک می‌باشند. باکتری باعث بیماری به نام دیسانتری و یا شیگلوز میشود، عفونتی که روده بزرگ را درگیر نموده و با کرمپهای شکمی، اسهال، و تب شناخته می‌شود (Bient et al., 2014). در ابتدا اسهال ممکن است به صورت آبکی باشد که اغلب حاوی موکوس و خون است که گاهی با علائم دیگر مانند استفراغ و سردرد مشاهده می شود که بندرت عفونت بخشهای دیگر بدن را درگیر می نماید. گونه‌های *شیگلا* عموماً از طریق خوردن آب آلوده شده با مدفوع انسانی و یا خوردن مواد غذایی شسته‌شده با آب آلوده منتقل می‌گردند. ارگانیسم به سلولهای مخاطی ناحیه کولون حمله کرده و در آنجا تکثیر می یابد و بدنبال آن سلول را از بین می‌برد که این امر باعث ایجاد علائم می باشد. گرچه گه گاهی ارگانیسم به سطوح اطراف روده نیز حمله می‌نماید حداقل یک گونه آن *شیگلا* دیسانتری همچنین با ترشح سم نقش بارزی در تخریب بافت و ایجاد علائم جدی بیماری بازی می‌نماید. گونه‌های *شیگلا* به عنوان ارگانیسمی که سلامتی را تهدید می‌نماید شناخته شده است بطوریکه سالانه باعث مرگ و میر یک میلیون نفر در سال و ۱۶۴ میلیون نفر دیسانتری در سال می‌گردد که عموما کودکان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Scallan et al., 2011). ارگانیسم با توجه به خصوصیات بیوشیمیایی و

سرولوژیکی متفاوت سبب شده که به کمک تکنیکهای میکروبیولوژیکی به راحتی شناسایی شوند اما به علت طولانی شدن همواره محققین بدنبال راه جدیدی جهت شناسایی می‌باشند، بطوریکه ژانگ و همکاران بدلیل اهمیت این ارگانیسم در نمونه های غذایی به تکنیک LAMP و IC-LAMP جهت جداسازی شیگلا بدون استخراج DNA ژنومی از نمونه های شیر برای اولین بار اشاره نموده اند (Zhang et al., 2018; Binet et al., 2013). از طرف دیگر ارگانیسم به صورت رقابتی تمایل به دریافت پلاسمیدهای مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک دارد که قبلا به عنوان خطوط درمان اول مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این یافته‌ها علاوه بر اثر کم در ایجاد عفونت و تمایل در ایجاد عوارض بدون توضیح باقی‌مانده است و سبب شده که آزمایشگاههای مختلف بر روی روند بیماری شیگلوز مطالعه نمایند تا بدنبال آن بتوان به رشد و توسعه تولید واکسن در بهبود بیماری کمک نمود. مطالعات کامل بر روی بیماریزایی، اپیدمیولوژی، شاخصهای کلینیکی، جداسازی و تشخیص استرینهای *شیگلا* طی سالهای مختلف انجام شده-است (Fernandez et al., 2003) بر همین اساس تحقیق حاضر بدنبال جداسازی این ارگانیسم از منابع غذایی مختلف شامل: سبزیجات، گوشت، مرغ و ماهی می باشد که جدایه‌ها به کمک تکنیک مولکولی مورد ارزیابی قرار گیرند و نوع ماده غذایی که بیشترین آلودگی را دارد تعیین شود.

مواد و روش کار

در تحقیق حاضر ۱۰۰ نمونه ماده غذایی مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها شامل: ۴۰ نمونه سبزیجات (کاهو، جعفری، مرزه، گشنیز، سالاد)، ۳۰ نمونه مرغ (روده و جگر)، ۲۰ نمونه گوشت چرخ‌کرده و ۱۰ نمونه ماهی (بافت و روده) بود که تمامی از مارکت‌های مختلف سطح شیراز تهیه گردید و از نظر آلودگی به باکتری *شیگلا* مورد آزمایش قرار گرفتند . هت غنی‌سازی از محیط GN Broth استفاده شد، به این ترتیب که هریک از نمونه‌ها به طور جداگانه به اندازه ۲۵ گرم به کمک ترازوی دیجیتالی وزن گردید و به محیط کشت گرم نگاتیو براث اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید و پس از زمان مذکور به محیطهای کشت انتخابی و افتراقی مانند *سالمونلا شیگلا* آگار و مک کانکی آگار منتقل گردید (Mokhtari et al., 2013). جهت ارزیابی جدایه‌ها و توانایی آنها جهت تخمیر قند لاکتوز و نیز ارزیابی کلنی‌های بی‌رنگ شیگلا، یک دهم میلی‌لیتر از نمونه‌های رشد یافته در محیط کشت گرم نگاتیو براث به محیط مک کانکی و سالمونلا شیگلا آگار تلقیح گردید شد و سپس با سوآپ استریل در کل سطح پلیت کشت داده شد، سپس پلیتها در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. بعد از این مدت در صورت مشاهده کلنی‌های شفاف یا بی رنگ جهت جدا و خالص سازی برروی محیط *سالمونلا شیگلا* آگار منتقل گردید و در نهایت سویه ها به کمک آزمونهای بیوشیمایی شامل: واکنش رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، کشت بر روی سیترات، کشت برروی محیط سولفیداینداول‌موتیلیتی، کشت روی محیط تریپل‌شوگرآیرون‌آگار، کشت بر روی محیط اوره براث، کشت بر روی لیزین‌دی‌کربولکسیلاز، کشت بر روی محیط اورنیتین‌دی‌کربوکسیلاز و در نهایت کشت بر روی مانیتول سالت آگار شناسایی گردید (Castillo et al., Kimura et al., 2004; 2006). از آنجاییکه گونه‌های مختلف *شیگلا* فاقد آنتی‌ژنهای فلاژلین و نیز کپسولی می باشد، خصوصیت آنتی‌ژنیک این گونه از ارگانیسم براساس آنتی‌ژن O به کمک روش اسلاید آگلوتیناسیون ارزیابی گردید. بدین منظور با استفاده از کیت پلی کولنال بهارافشان (ایران) ایزوله‌های *شیگلا*، براساس مرکز ملی باکتریهای انتروپاتوژنیک سروتیپ‌بندی گردید و نتایج ثبت شد (Mokhtari et al., 2013). حساسیت باکتریایی به عوامل

ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی مولر- هینتون (MH) آگار (Bio-Rad) مطابق با پیشنهادات از کمیته آنتی‌بیوگرام انجمن میکروبیولوژی فرانسه مورد ارزیابی قرار گرفت. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده شامل : آمپی سیلین[1] (10 ug/ml)، تتراسایکلین[2] (30ug/ml)، آفلوکساسین[3] (5 ug/ml)، کلرامفنیکل[4](30 ug/ml)، کلیسیتین[5] (50 ug/ml)، تریمتوپریم سولفامتوکسازول[6] (1.25/23.7 ug/ml) می‌باشند. کلیه جدایه‌های باکتریایی خالص سازی شده و تایید شده به کمک آزمونهای بیوشیمیایی بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار منتقل گردید سپس دیسکها با فاصله بر روی محیط تلقیح شده به طریق سترون قرارداده شد. پلیتها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس قرار داده شد و نتایج سه تکرار ثبت گردید (Mokhtari et al., 2013).

در این مطالعه جداسازی DNA باکتری از نمونه‌های موردنظر با استفاده ازکیت استخراج DNA یکتا تجهیز به روش ستونی انجام گرفت. سپس آزمون PCR در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۷.۵ میکرولیتر D.W، ۱۲.۵ میکروگرم PCR Master Mix (PCR buffer, $Mgcl_2$, dNTP, Taq)، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (Luscher et al., 1994) و ۳ میکرولیتر DNA صورت گرفت (جدول ۱) و واکنش زنجیره ایی پلی مراز بر اساس جدول ۲ ادامه یافت و پس از PCR محصول آن با انتقال بر روی ژل آگاروز ۲درصد الکتروفورز شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR

ژن	Primers	Sequence (5' to 3')	PCR Product Length
ipaH	F	CCT TTT CCG CGT TCC TTG A	423bp
	R	CGG AAT CCG GAG GTA TTG C	

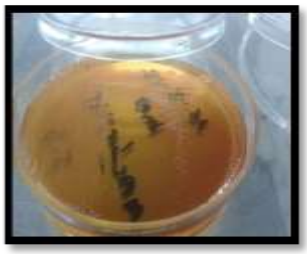
جدول ۲. برنامه دمایی- زمانی PCR

تعداد سیکل	زمان (دقیقه)	دما (c°)	مرحله
۱	۴ دقیقه	۹۵	Primary denaturation
	۲۰ ثانیه	۹۵	Denaturation
۳۰	۱۵ ثانیه	۵۵	Annealing
	۱۵ ثانیه	۷۲	Extension
۱	۲ دقیقه	۷۲	Final extension

[1] Ampicillin
[2] Tetracycline
[3] Ofloxacin
[4] Chloramphenicol
[5] Colistin
[6] Thrimethoprim-sulphamethoxazole

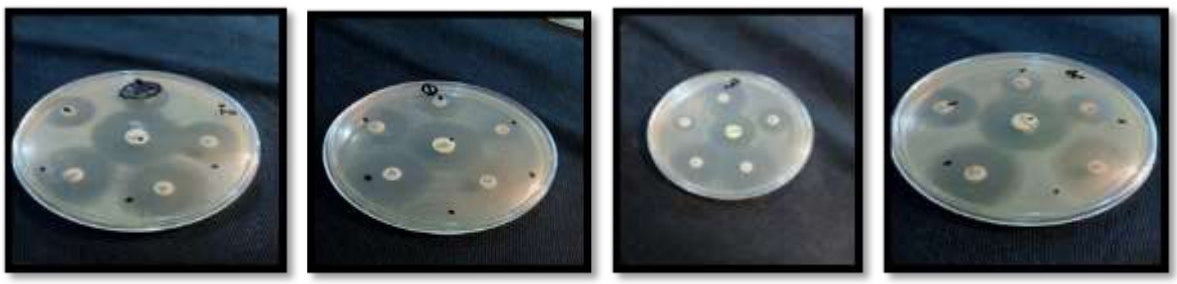
در تحقیق حاضر از ۱۰۰ نمونه تهیه‌شده تنها نمونه سبزیجات حاوی ارگانیسم مدنظر بوده و این در حالیست که همانطور که در شکل ۱ نشان داده‌شده‌است سایر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه رشد نمودند بطوریکه ارگانیمسها متعلق به گروه *سالمونلا* با کلنی‌های سیاه‌رنگ، *اشریشیا*و *سیتروباکتر* بودند. همچنین شکل ۲ نشان‌دهنده کلنی‌های بی‌رنگ *شیگلا* بر روی محیط سالمونلا شیگلا آگار می باشد و کلیه جدایه‌ها به کمک آزمونهای بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند .

شکل۱. رشد کلنی‌های باکتریایی مختلف بر روی میحط کشت *سالمونلا شیگلا* آگار و مک کانکی آگار



شکل ۲ کلنی‌های رشد یافته *شیگلا* بر روی میحط *سالمونلا شیگلا* آگار

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است الگوی آنتی-بیوتیکی *شیگلا*های جداشده از سبزیجات متفاوت می باشد بطوریکه اکثر جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیکهای انتخابی حساس می باشند. جدایه های ۲ و ۴ به صورت ۱۰۰درصد نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین حساس می باشند و این در حالیست که جدایه شماره یک نیز به کلرامفنیکل ۱۰۰ درصد حساس است. همچنین جدول ۳ الگوی آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها همراه با حساسیت و مقاومت هر یک از جدایه‌ها را نشان می‌دهد.



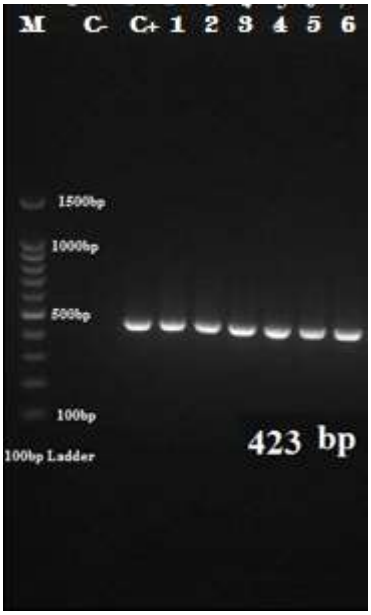
شکل ۳ تعیین الگوی آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

جدول۳. تاثیر آنتی‌بیوتیکهای مختلف بر جدایه‌ها

شماره ایزوله ها	تتراسایکلین	آمپی سیلین	کلرمفنیکل	کلیستین	آفلوکساسین	تریمتوپریم سولفامتوکسازول
۱	25mm(S)	20mm(S)	25mm(S)	12mm	28mm(S)	30mm(S)
۲	---- (S)	20mm(S)	1.8mm(S)	---- (S)	27mm(S)	21mm(S)
۳	27mm(S)	20mm(S)	30mm(S)	14mm	28mm(S)	30mm(S)
۴	---- (S)	20mm(S)	17mm(I)	9mm	25mm(S)	21mm(S)
۵	27mm(S)	22mm(S)	26mm(S)	11mm	30mm(S)	10mm(R)
۶	25mm(S)	20mm(S)	27mm(S)	11mm	27mm(S)	10mm(R)

با توجه به سروتیپ‌بندی انجام‌شده، به کمک اسلاید آگلوتیناسیون، تمامی جدایه‌ها بجز شماره ۴ قابل تایپ بود و آزمون انجام شده نتایج مختلفی را نشان دادند. بطوریکه ۲ جدایه از گونه‌های *شیگلا* با پلی کلونال D واکنش داده که بعنوان *شیگلا سونئی* قابل تشخیص می باشد . ۲ مورد باقیمانده از گونه‌های *شیگلا* آگلوتیناسیون با Poly B واکنش داده که بعنوان *شیگلا فلکسنری* تایید گردیدند و جدایه شماره ۳ با poly A واکنش داده و به عنوان *شیگلا دیسانتری* دسته‌بندی گردید .

همانطور که در شکل 4 نشان داده‌شده‌است کلیه جدایه‌ها حاوی ژن *ipaH* می‌باشند و حضور این ژن به طور مشترک در گونه‌های *شیگلا* می‌تواند به عنوان یک مارکر شناسایی درنظر گرفته‌شود..



شکل ۴: تصویر ژل آگارز جهت شناسایی حضور ژن *ipaH*. چاهک اول: مارک ۱۰۰ جفت بازی، چاهک دوم: کنترل منفی، چاهک سوم: کنترل مثبت ، سایر چاهکها جدایه‌های مورد ارزیابی (۶ جدایه)

بحث

شیگلا باسیل گرم منفی است که چهار گونه آن شناسایی شده است و علائم کلینیکی با توجه به نوع گونه می‌تواند متفاوت باشد. عفونت های *شیگلا* به سرعت قابل انتقال است و تنها بلع ۱۰ ارگانیسم زنده برای بروز عفونت کفایت می-نماید. بنابراین میزان دوز پایین عفونت می‌تواند باعث بروز شیوع وسیع در جامعه شود. شیوع عموماً بدنبال انتقال

شخص به شخص در جمعیتی شلوغ و محیطی غیربهداشتی و با بلع غذا یا آب آلوده صورت می‌گیرد. غذا می‌تواند در طول جابجایی و یا آماده‌سازی توسط شخصی که آن را آماده می‌نماید آلوده شود. آلودگی غذاهای دریایی، زمانی اتفاق می‌افتد که آب از طریق فاضلاب آلوده شده باشد بطوریکه شیوع مبنی بر آلودگی خرچنگهای صیدشده از مناطق صید آلوده شده با فاضلاب گزارش شده است (Binet et al., 2014).

از میان مواد غذایی، غذاهای دریایی غذاهایی مغذی و بخشی ازرژیم مناسب برای سلامتی است که مصرف غذاهای دریایی برای سلامت انسان شامل: سیستم عصبی در طول دوران نوزادی (Helland et Hibbeln et al., 2007; Daniels et al., ; Fewtrell et al., 2004 al., 2003; 2004) و کاهش بیماریهای قلبی (Mozaffarin et al., 2006 2002 ;Kris-Etherton et al.,) مفید می باشد. گرچه علاوه بر مواد مغذی و مزایایی که از غذاهای دریایی مشتق می شوند ریسک مصرف غذای دریایی آلوده بدلیل مواد شیمیایی، فلزات، سموم دریایی، عوامل عفونی وجود دارد، بطوریکه مواد غذایی دریایی مسئول بخش مهمی از بیماریهای ایجاد شده بوسیله غذا در آمریکا و کل دنیاست (Sobel et al., 2005; Ayers et al., 2008).

برخی از غذاهای دریایی بطور ژنتیکی خطرناک‌تر از سایر مواد غذایی می‌باشند بطوریکه فاکتورهایی مانند طبیعت و محیطی که در آن زندگی می‌کنند، نحوه تغذیه، فصلی که صید می‌شوند و چگونه با آنها غذا تهیه و سرو می‌شود نیز برآنها اثرگذار است. بر همین اساس استراتژیهای کنترل برای جلوگیری از شیگلوز همراه با مواد غذایی دریایی شامل مانیتور نمودن آب مناطق صید برای کلی فرمهای مدفوعی، ممنوع‌نمودن صید بعد از آلودگی با فاضلاب، اجباری‌نمودن کنترل مناطق خروج فاضلابها، و ارائه راهنما برای رستورانهایی که مواد غذایی دریایی را جابجا می نمایند می باشد (Martha et al., 2010).

بنابراین با توجه به اهمیت مواد غذایی تحقیق حاضر به دنبال جداسازی *شیگلا* از مواد غذایی مختلف بوده است که در بین مواد مورد آزمایش ماهی نیز به عنوان یکی از مواد می‌باشد. در تحقیق انجام‌شده توسط اونانگو و همکاران در سال ۲۰۰۹ از بین ۱۲۰ تیلاپیای نیل، ۶۳ (۵۲.۵ درصد) آلوده با خانواده انتروباکتریاسه بودند. از این میان ۲۵ (۳۹.۷درصد) حاوی گونه‌های *شیگلا*، ۹ (۱۴.۳درصد) *سالمونلا تیفی موریوم*، ۷ (۱۱.۱درصد) *سالمونلا تیفی*، ۴ (۶.۳درصد) *سالمونلا انتریتیدیس*، ۱۶ (۲۵.۴درصد) *اشریشیا کلی* و ۱ (۱.۶ درصد) گونه‌های *پروتئوس* و *انتروباکتر آئروجینز* بودند. ۱۰ ماهی جمع‌آوری‌شده از مارکت حاوی ۵۰ درصد *اشریشیا کلی*، ۲۰ درصد *سالمونلا تیفی موریوم* ، ۱۰ درصد *سالمونلا پاراتیفی* و ۲۰ درصد *سالمونلا تیفی* بودند (Martha et al., 2010). این درحالیست که در تحقیق حاضر هیچ سویه‌ایی از ماهی‌های مختلف مورد نمونه‌گیری شامل: شیر، قباد، چنگو، حلوا و لقمه جدا نشده است. همچنین ارگانیسم از نمونه‌های مرغ و گوشت چرخ کرده نیز جدا نگردید. این درحالیست که ۶ جدایه از نمونه‌های سبزیجات جدا شده است. در تحقیقی که توسط بینت و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شده است قادر بودند به کمک تکنیک واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز با استفاده از سه کیت تجاری از سطح گوجه فرنگی، فلفل شیرین، خیار، پیاز سبز، گشنیز و جعفری کمترین تعداد سلولهای *شیگلا* را شناسایی کنند که در تحقیق حاضر نیز این مهم به ثمر رسید (Bient et al., 2014).

سازمان بهداشت جهانی اخیرا" سیپروفلاکساسین برای درمان عفونتهای ناشی از *شیگلا* برای هر دو گروه (یا سایر Fluoroquinolones) را بعنوان داروی انتخابی[1]

[1] Ciprofloxacin

بالغین و کودکان پیشنهاد می‌دهد. علاوه بر این سفتریاکسون[1]، پیومسیلینم[2](آمدینوسیلین پیوکسیل[3]) و آزیترومایسین[4] به عنوان داروهای جایگزین برای درمان بیماریهای وابسته به *شیگلا* در نظر گرفته شده اند . هرچند گونه‌هایی از *شیگلا* که به سیپروفلاکساسین[5] مقاوم هستند در آسیا توصیف شده‌اند (Niyogi et al., 2005; Vinh et al., 2009). همچنین، گونه‌هایی از *شیگلا* تولیدکننده بتا-لاکتاماز با طیف وسیع (ESBL) که مقاومت را به نسل سوم سفالسپورین[6]ها می‌دهند، نیز گزارش شده‌اند (Fortineau et al., 2001). همچنین در تحقیق انجام‌شده توسط سایر دانشمندان *شیگلا* فلکسنری بعنوان معمول ترین ایزوله جدا-شده به شمار می‌آمد که درجه بالایی از مقاومت را نسبت به پرکاربردترین داروها از خود مانند: نالیدیکسیک اسید[7] (۹۴.۳درصد)، آمپیسیلین[8] (۹۵.۸درصد)، کوتریماکسازول[9] (۹۴.۵درصد)، تتراسایکلین[10] (۷۹.۴درصد)، سیپروفلاکساسین[11] (۶۰.۲درصد)، کلرامفنیکول[12] (۶۳.۳درصد) نشان داد. در این مطالعه، مقاومت چندداروییی مورد ارزیابی قرار گرفت که یافته‌های مشابهی در مطالعات دیگری از نقاط دیگر مانند اتیوپی و اخیرا" از ویتنام گزارش شده‌اند را دربر داشت (Yismaw et al., 2006; Vinh et al., 2009).

همچنین افزایش نسبی در مقاومت به سیپروفلاکساسین[13](۶۷/۲ درصد) در مطالعه Neogi در تمامی گونه های*Shigella* با سایر مطالعات مقایسه گردید (Fortineau et al., 2001) و نتایج نشان می‌دهد که نیاز شدیدی به کاهش مصرف یکسان ضد میکروبهای قوی مانند سیپروفلاکساسین[14] وجود دارد. در تحقیق حاضر نیز اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیکهای مختلف شامل: آمپی‌سیلین، تتراسیکلین، آفلوکساسین، کلیستین، و تری‌متوپریم سولفامتاکسازول و کلرامفنیکل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر بیانگر آن است که جدایه‌ها الگوی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند بطوریکه جدایه های ۱ و ۴ به تتراسیکلین حساس می‌باشند و به افلوکساسیلین و سفوتاکسیم مقاوم می‌باشند.

در تحقیقح مختاری و همکاران نیز از ۲۲ گونه مختلف شیگلا،۱۲ جدایه مقاوم (۵/۵۴ درصد) به یک یا چند آنتی-بیوتیک بودند.علاوه بر این سطح بالایی از مقاومت در برابر تتراسایکلین و تری متروپریم سولفامتاکسازول (۶/۶۶ درصد) ، کلیستین ۳/۳۳درصد ، آمپی‌سیلین و تیکارسیلین (۲۵درصد) مشاهده گردید و *Sh. Sonnei* به عنوان مقاوم-ترین گونه مشاهده شده از غذا و موارد بالینی معرفی گردید (Fernandez et al., 2003). از طرف دیگر زمان لو و همکاران در سال ۲۰۱۸ ارتباط بین مقاومت دارویی چند گانه بین ایزوله های شیگلا و نیز کلاسهای اینتگرون I و II را مورد آنالیز قرار دارند. داده ها بیانگر آن بود که بیشترین میزان مقاومت مربوط به تری متوپریم سولفامتاکسازول با ۹۳/۷درصد و بدنبال آن آمپی سیلین، استرپتومایسین و تتراسیکلین می باشد و از بین دو گروه از کلاسهای اینتگرونی، کلاس II اینتگرون شایعترین کلاس گزارش گردید (Zamanloul et al., 2018).

در رابطه با سروتیپ بندی جدایه ها، مختاری و همکاران، آگلوتیناسیون را برای تمامی جدایه‌های بدست آمده ارزیابی نموده و قابل تایپ بودن آن را گزارش نمود. وی و همکاران

[1] Ceftriaxone
[2] Pivmecillinam
[3] Amvinocillin Pivoxil
[4] Azithromycin
[5] Ciprofloxacin
[6] Cephalosporins
[7] Nalidixic Acid
[8] Ampicillin
[9] Co-Trimoxazole
[10] Tetracycline
[11] Ciprofloxacin
[12] Chloramphenicol
[13] Ciprofloxacin
[14] Ciprofloxacin

توانستند ۱۱ جدایه از گونه‌های شیگلا را متعلق به بیوتایپ f با آنتی‌ژن D تشخیص داده و بعنوان *Sh. sonnei* (۵۰درصد) معرفی نمایند. دو جدایه *شیگلا* (متعلق به نوعBT2) آگلوتیناسیون با آنتی‌ژن Poly C را بعنوان *Shigella boydii* (۹درصد) نشان داد. ۹ مورد باقیمانده از گونه‌های *Shigella* آگلوتیناسیون با آنتی‌ژن Poly B نشان داده و بعنوان *Sh. Flexneri* (۴۰.۹درصد) معرفی شدند. در میان ۶ گونه جدا شده از محیط ۴ مورد بعنوان *Sh. sonnei* و دو مورد بعنوان *Shigella flexneri* شناخته شدند. *Shigella flexneri* فقط از سالاد خام جدا شد در حالیکه*Sh. sonnei* از سالاد خام مرغ و غذای پخته شده نیز جدا گردید. همچنین برای نمونه‌های جداشده از نمونه مدفوع *Sh. flexneri* و *Sh.sonnei* گونه‌های غالب با نسبت یکسان بودند که در ادامه *Shigella boydii* ، قرار داشت. در میان ۱۲ گونه *شیگلا* سویه‌های جداشده از مدفوع آبکی، ۵۰درصد بعنوان *Sh. sonnei*، ۳۳.۳درصد بعنوان *Sh. flexneri* و ۱۶.۶درصد بعنوان *Sh. boydii* شناخته شدند. با اینحال *Sh. flexneri* بارها از مدفوع غیرآبکی و بدنبال آن *Sh. sonnei* جدا گردید. در طی این مطالعه هیچ گونه از سویه‌های *Sh. dysenteriae* جدا نشد و از میان ۹ جدایه از *Sh. flexneri* ، دو سروتایپ *Sh. flexneri* (سروتایپ ۱ و ۲) یافت شدکه سروتایپ ۲ از *Sh. flexneri*در مقایسه با سروتایپ ۱ غالب بود. تمامی استرین‌های *Sh. flexneri* که از غذاها جدا شده بودند متعلق به سروتایپ ۱ از *Sh. flexneri* بودند. با اینحال از نمونه‌های بالینی دو سویه سروتایپ ۱ از *Sh. flexneri* و پنج سویه از سروتایپ ۲ از *Sh. flexneri* شناسایی گردید و تمام سویه‌ها *Sh. boydii* ، متعلق به سروتایپ ۱ بودند. در تحقیق حاضر از آنجاییکه سویه‌های جدا شده از سبزیجات بودند و مورد آنالیز سرولوژیکی نیز قرار گرفتند بیشتر جدایه‌های بدست آمده متعلق به *شیگلا سونئی* و بیوتایپ f و نیز s می‌باشند. در میان سروتیپهای اشاره شده از تحقیقات قبلی یانگ و همکاران به ویژگی جدیدی اشاره نمودند و آن نیز سروتیپ 4s می باشد. آنان بر این باورند که این سروتیپ از نظر منبع تکاملی چندگانه می باشد که با داشتن خصوصیات بیوشیمیایی و ژنومی متنوع و میزان بالای مقاومت دارویی این سروتیپ را مهم می نماید (Yang et al., 2015).

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت این ارگانیسم (*شیگلا*) و نتایج حاصل از تحقیق حاضر و سایر مطالعات انجام شده به نظر می رسد که ارزیابی دوره ایی سبزیجات خصوصاً انواع پخش شده در سبزی مارکتها و یا سوپرهای محلی ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از شورای پژوهشی واحد دانشگاه آزاد اسلامی شیراز به دلیل حمایت از طرح پایان نامه با کد: ۱۶۳۳۰۵۰۷۹۵۲۰۰۳نهایت تشکر و قدردانی را می نمایند.

منابع

1. Binet, D., Deer M., and Uhlfelder, SJ.2014. a Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, College Park, MD 20740, USA Oak Ridge Research Institute for Science and Education, USA, Rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay.
2. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L. 2011. Foodborne illness acquired in the United State major pathogens. Emerg Infect Dis. 17: 7e15.
3. Binet, R., Lampel, K.A., 2013. Shigella species. In: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC, pp. 377e399.

10. Fewtrell, M. S., Aboott, R.A., Kennedey, K., Singhal, A., Morley, R., Caine, E., Jamieson, C., F. Cockburn, and A. Lucas. 2004. Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants. J. Pediatr. 144:471–479.
11. Helland, I. B., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O.D., and Drevon. C.A. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. Pediatrics 111:e39–e44.
12. Hibbeln, J. R., Davis, J. M., Steer, C., Emmett, P., Rogers, I. Williams, C., and Golding. J. 2007. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. Lancet 369:578–585.
13. Kris-Etherton, P. M., Harris, W.S., and Appel. **L.J.** 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease: AHA scientific statement. Circulation 106:2747–2757.
14. Mozaffarian, D., and E. B. Rimm. 2006. Fish intake, contaminants, and human health. JAMA 296:1885–1899.
15. Sobel, J., and Painter. J. 2005. Illnesses caused by marine toxins. Clin Infect Dis. 41:1290–1296.
16. Ayers, T., Iwamoto, M., Swerdlow, D.L., and Williams. I. 2008. Epidemiology of seafood-associated outbreaks in the United States, 1973–2006, abstr. P3-70.Abstr. Int. Assoc. Food Prot. Annu. Meeting, Columbus, OH.
17. Martha, I., Ayers, T., Mahon, B.E., and Swerdlow. D.L., 2010 Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States
18. Niyogi, S.K. 2005. Shigellosis. J. Microbiol.43: 133–143.
4. Zhang, L., Wei, Q., Han, Q., Chen, Q., Tai, W., Zhang, J., Song, Y.,and Xia, X.2018. Detection of Shigella in Milk and Clinical Samples by Magnetic Immunocaptured-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. Frontiers in Micro. 9(94): 1-7
5. Fernandez, M. I., and Sansonetti, P.J. 2003. Shigella interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. Int. J. Med. Microbiol. 293:55-67.
6. Mokhtari, W., Nsaibia, S., Gharbi, A., Aouni, M., 2013. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of Shigella spp. in food and stool samples. Mol. Cell. Probes 27: 53e59. Kimura, AC. Kammay, J. Palumbo, MS., Hopkins, J., Boase, J., Repoter, R., Goldfot, M., Stefonek, K., Farrar, J., Van Gilder, T. and Vugia, D. 2004. Multistate Shigellosis outbreak and commercially prepared food, United States. Emerg Infect Dis. 10(6): 1147–1149.
7. Castillo, A., Villarruel- Lopez, A., Navarro-hidalgo, V., Martiez –Gonza lez, N.E., and Torres-Vitella, M.R. 2006. Salmonella and Shigella in Freshly Squeezed Orange Juice, Fresh Oranges, and Wiping Cloths Collected from Public Markets and Street Booths in Guadalajara, Mexico: Incidence and Comparison of Analytical Routes. J Food Protec. 69; (11), 2595–2599.
8. Luscher, D., and Altwegg, M. 1994. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes. 8(4):285-90.
9. Daniels, J. L., Longnecker, P.P., Rowland, A.S., and Golding. J. 2004. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. J Epidem 15:394–402.

19. Vinh. H., Nhu, NT., Nga,TV., Duy, PT., Campbell, JI., Hoang, NV. 2009.A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. BMC Infect Dis.9:204.
20. Fortineau, N., Naas, T., Gaillot, O., Nordmann, P. 2001. SHV-type extended-spectrum β-lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. J Antimicrob Chemother. 47: 685–8.
21. Yismaw, G., Negeri, C., Kassu, A. 2006.A five-year antimicrobial resistance pattern observed in *Shigella* species isolated from stool samples in Gondar University Hospital, northwest Ethiopia. Ethiop J Health Dev. 20:194–8.
22. Zamanlou1, S., Ahangarzadeh Rezaee, M., Aghazadeh, M., Ghotaslou, R., Hosseini Nave, H and Khalili, Y. 2018.Genotypic Diversity of Multidrug Resistant *Shigella* species from Iran. Infec and Chemo. 50(1): 29-37.
23. Yang, Ch., Li, P., Zhang, X., Ma, Q., Cui, X, Li, H., Liu, H., Wang, J., Xie, J., Wu, F., Sheng, Ch., Du, X., Qi, L., Su, W., Jia, L., Xu, X., Zhao, J., Xia, Sh., Zhou, N., Ma, H., Qiu, Sh., and Song, H.2015. Molecular characterization and analysis of high-level multidrug resistance of *Shigella flexneri* serotype 4s strains from China. Scientific Reports**.** 6:29124

Phenotypic and genotypic characterization of isolated *Shigella* spp. from food based on *IpaH* gene and evaluation of their antibiotic patterns

Ajampour I, Bahador N*

Department of Microbiology, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

***Corresponding author:** *bahador@iaushriaz.ac.ir*

Received: 4 November 2017 Accepted: 2 February 2018

Abstract

Food is a vital substance which is important for human life. Although this vital matter could be a vehicle for transferring the microorganisms to human and *Shigella* is an important microorganism which could be cause of dysentery to human, the present study tried to isolate and characterized isolated *Shigella* from food. In this study 100 food samples including: 40 types of vegetables, 30 chicken, 20 minced meats and 10 fish have been collected. The samples were inoculated to gram negative broth and transferred to differential media such as MacConkey and Salmonella *Shigella* agar. Then the suspected colonies were identified using biochemical tests. Afterward, the isolates were characterized using *ipaH* gene by PCR technique. Furthermore, they were analyzed using serotyping techniques and the antibiotic susceptibility pattern were checked. Out of 100 foodstuffs the bacteria were detected only from vegetables. The isolates (n= 6) were confirmed by molecular techniques and all of them belong to the genus of *Shigella*. In addition, the slide agglutination test showed that the isolates were belong to *sh. dysentriae* (n=1), *Sh. sonnei* (n=2), *Sh. flexneri* (n=2), and one non detectable. Furthermore, they showed different antibiotic pattern, as the isolate No.1 showed 100% sensitivity to the tetracycline and were resistant to the others. Although foodstuffs are so important in transferring the microorganism, the monitoring of foods in market and greengrocery is necessary.

Keywords: Foodstuffs, PCR, *Shigella*, Serotyping, Antibiogram