

بررسی مولکولی ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف (SHV.TEM.CTX) ESBL در باکتری شیگلا سوئی جدا شده از نمونه های بالینی به روش PCR

شادی مصدق، غلامعلی مرادلی*

گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۹

چکیده:

زمینه و هدف: شیگلا از عوامل شایع اسهال خونی و مرگ و میر به خصوص در کودکان و افراد دارای نقص ایمنی می باشد و بروز مقاومت دارویی، انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان شیگلوزیس را با مشکل مواجه می سازد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن های *bla_{SHV}* و *bla_{TEM}* *bla_{CTX-M}* در سویه های شیگلا سوئی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (Multiplex-PCR) بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۰ نمونه، شیگلا سوئی از نمونه های اسهال آزمایشگاه های خصوصی و بیمارستان های مناطق شمالی تهران در گروه های سنی مختلف جمع آوری و در محیط های اختصاصی کشت داده و با آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژی تأیید شد. برای شناسایی سویه مقاوم به بتالاکتاماز تست فنوتیپی Combine disk انجام گرفت. حضور ژن های *bla_{SHV}* و *bla_{TEM}* *bla_{CTX-M}* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بیشترین میزان مقاومت به پنی سیلین و اریترومايسين به ترتیب با ۹۶/۶٪ و ۹۵٪ فراوانی و بیشترین میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و ایمپنم با ۷۰٪ فراوانی گزارش شد. در روش Combine disk، ۲۹ سویه (۴۸/۳٪) بتالاکتاماز مثبت یافت شد. از میان ۶۰ نمونه، ۳۹ نمونه (۶۵٪) دارای ژن *bla_{TEM}* ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* و ۱ نمونه (۱/۶۶٪) دارای ژن *bla_{SHV}* بودند.

نتیجه گیری: با توجه به شیوع بالای ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز در سویه های شیگلا سوئی، مراقبت های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به موقع از آنتی بیوتیک های مناسب جهت جلوگیری از شیوع سویه های مقاوم ضروری می باشد.

واژه های کلیدی: بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL)، شیگلا سوئی، واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه (Multiplex-PCR).

مقدمه:

اسهال به خصوص در کشورهای پیشرفته می باشد (۲). بلع تعداد کم باکتری (حدود ۱۰۰ عدد) می تواند سبب عفونت شود. این بیماری می تواند منجر به باکتری می و مرگ و میر در کودکان و بالغین مبتلا به ضعف سیستم ایمنی شود. درمان آنتی بیوتیکی مناسب و به موقع دوره بیماری را کوتاه کرده و سبب کاهش عوارض آن و

شیگلا یک باسیل گرم منفی روده ای و عامل اسهال خونی باکتریایی در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه می باشد. گونه های جنس شیگلا دارای ۴ گونه شامل دیسانتري (*S. dysenteriae*)، فلکسنری (*S. flexneri*)، سوئی (*S. Sonnei*) و بوییدی (*S. boydii*) می باشد (۱). از بین گونه های شیگلا، سوئی از رایج ترین گونه های عامل

*نویسنده مسئول: ساوه- واحد ساوه- دانشگاه آزاد اسلامی- گروه میکروبیولوژی- تلفن: ۰۹۱۲۱۵۵۱۲۱۷، E-mail: moradli.mic@gmail.com

قرار می‌گیرند. *CTX-M* بیش از ۵۰ آنزیم را کد می‌کند و قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک‌هایی مانند سفوتاکسیم و سفتریاکسون می‌باشد (۷).

باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف در روده انسان و دام‌ها جایگزین شده و کنترل و ریشه‌کنی آن‌ها بسیار دشوار می‌باشد، زیرا ژن‌های ESBL می‌توانند در بین جنس، گونه و سویه‌های مختلف باکتری‌های روده‌ای منتقل شوند. گزارشاتی مبنی بر بروز مقاومت چندگانه شیگلا سونتی به آنتی بیوتیک‌ها و علی‌الخصوص نسل سوم سفالوسپورین‌ها مانند سفوتاکسیم و سفتریاکسون وجود دارد (۹،۸). در سال‌های اخیر بروز پدیده مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نگرانی‌های فراوانی را در جوامع پزشکی به دلیل شکست روند درمان پدید آورده است. با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف در سویه‌های شیگلا سونتی و سرعت تشخیص بالا و دقیق روش‌های مولکولی و شناسایی همزمان چندین ژن، در این مطالعه به بررسی حضور این ژن‌ها در جدایه‌های شیگلا سونتی جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال به روش Multiplex-PCR پرداخته شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪، تعداد ۶۰ ایزوله شیگلا سونتی جدا شده از آزمایشگاه‌های بالینی مناطق شمالی سطح شهر تهران و بیماران مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان‌های شمال تهران در مدت ۲ ماه، جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا جدایه‌ها روی محیط‌های مک‌کانکی و سالمونلا-شیگلا آگار کشت داده شدند. سپس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد جهت تشخیص گونه شیگلا استفاده شد. برای

جلوگیری از انتقال بیماری به افراد سالم می‌شود (۳)، اما امروزه با توجه به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها، گونه‌های شیگلا هم به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها از جمله نسل سوم سفالوسپورین‌ها مقاوم شده‌اند و همین امر درمان این بیماری را با مشکل مواجه کرده است (۴).

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز عمده‌ترین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی به بتالاکتام‌ها می‌باشد. بتالاکتام‌ها دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها بوده که به دلیل ساختمان مرکزی مشترک در یک دسته قرار می‌گیرند، این آنزیم‌ها حلقه آمیدی بتالاکتام‌ها را تخریب می‌کند. بتالاکتام‌ها بر اساس سکانس آمینو اسیدی به ۴ گروه A تا D تقسیم می‌شوند (۵). بتالاکتام‌ها از خانواده آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند که با هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی باعث تبدیل آن‌ها به مشتقات بدون فعالیت ضد باکتریایی می‌شوند، بتالاکتام‌های وسیع الطیف ESBL‌ها از بتالاکتام‌های کلاس A بوده که سفالوسپورین‌های وسیع الطیف با یک زنجیر جانبی اکسی‌مینو (oximino) را هیدرولیز می‌کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آرترونوم به جز سفامایسین‌ها یا کارباپنم می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانیک اسید مهار و در/شریشیاکلی شناسایی شدند (۶). ژن‌های متعددی در تولید بتالاکتام‌ها دخالت دارند از جمله ژن‌های *TEM* و *SHV* که عمدتاً در باکتری‌های روده‌ای مشاهده می‌شود. ژن‌های مسئول بتالاکتام‌ها متنوع می‌باشند و می‌توانند به صورت اولیه بر روی کروموزوم قرار داشته باشند و یا در سطح پلاسمید قرار گیرند. بتالاکتام‌های تیپ *CTX-M* به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای حامل ESBL که فاقد ژن *TEM* و *SHV* می‌باشد منتشر شده و اولین بار در دهه ۱۹۸۰ شناسایی شد. آنزیم‌های *TEM* و *SHV* که پلاسمیدی بوده و انتشار گسترده‌ای دارند، در این گروه

گردید. همچنین آزمون Combine disk برای شناسایی سویه‌های مقاوم شیگلا سونتی به بتالاکتاماز انجام شد. بعد از کشت باکتری بر روی سطح محیط مولر هیتون آگار و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از تلقیح، دیسک سفوتاکسیم را سمتی از پلیت گذاشته و دیسک EDTA/CTX را گوشه دیگر پلیت قرار داده و ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت تفاوت هاله عدم رشد مقایسه گردید. در نمونه متالوبتالاکتاماز مثبت، تفاوت دو هاله عدم رشد باید بیش از ۷ میلی متر باشد (۱۰).

استخراج DNA نمونه‌ها توسط کیت شرکت سینارن و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش Multiplex-PCR اقدام شد. آزمون PCR بر روی ۶۰ جدایه شیگلا سونتی برای ژن‌های *bla_{TEM}* *bla_{CTX-M}* و *bla_{SHV}* انجام گرفت (جدول شماره ۱) (۱۱). واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۴/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۵ میکرولیتر از DNA الگو انجام گردید. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش‌های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هر کدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، امتداد در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و نیز امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستندسازی شدند. داده‌های آماری با نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

افتراق گونه‌ها نیز از آزمون‌های بیوشیمیایی ONPG، بررسی واکنش دکریوکسیلاسیون اورنیتین، آزمون تولید اندول و تخمیر قندهای مانیتول استفاده شد. آزمون سروتایپینگ با استفاده از آنتی سرم‌های شیگلا از کشت‌های تازه شیگلا به روش آگلوتیناسیون روی اسلاید انجام گردید.

جهت انجام آزمون سرولوژی ابتدا یک قطره از آنتی سرم را بر روی یک لام قرار داده و سپس به کمک آنس مقداری از کلونی را برداشت و با آنتی سرم شیگلا (بهار افشان) به حالت سوسپانسیون درآورده و لام را به کمک حرکت دست حرکت دورانی داده تا آگلوتیناسیون مشاهده گردد. بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری شیگلا با آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) انجام گردید (۱۰). تعدادی از کلونی باکتری را به وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید (۱۰). جهت انجام این مطالعه دیسک‌های آنتی بیوتیک سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم (CTX)، اریترومايسين ۱۵ میکروگرم (E)، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (GM)، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم (TE)، کلوتریموکسازول (تری-متوپریم / سولفومتوکسازول) ۳۰ میکروگرم (STX)، آمپی‌سیلین ۳۰ میکروگرم (AM)، ایمی‌پنم ۳۰ میکروگرم (IPM)، آمیکاسین ۳۰ میکروگرم (AN)، سیپروفلوکساسین ۳۰ میکروگرم (CP)، پنی‌سیلین ۳۰ میکروگرم (P) از شرکت HIMEDIA (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) تهیه

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (۱۱)

نام پرایمر	توالی پرایمر (3' to 5')	ژن هدف	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)
<i>SHV-SE</i>	atgctgtatattcgctgtg	<i>bla_{SHV}</i>	۵۸	۷۴۷
<i>SHV-AS</i>	tgctttgtattcgggcaa	<i>bla_{SHV}</i>	۵۸	۷۴۷
<i>TEM-164.SE</i>	tcgcccatacactattctcagaatga	<i>bla_{TEM}</i>	۵۸	۴۴۵
<i>TEM-165.AS</i>	acgctcaccggctccagatttat	<i>bla_{TEM}</i>	۵۸	۴۴۵
<i>CTX-M-U1</i>	atgtgcagyaccagtaargtkatggc	<i>bla_{CTX-M}</i>	۵۸	۵۹۳
<i>CTX-M-U2</i>	tgggtraartargetsaccagaaycagcgg	<i>bla_{CTX-M}</i>	۵۸	۵۹۳

یافته ها:

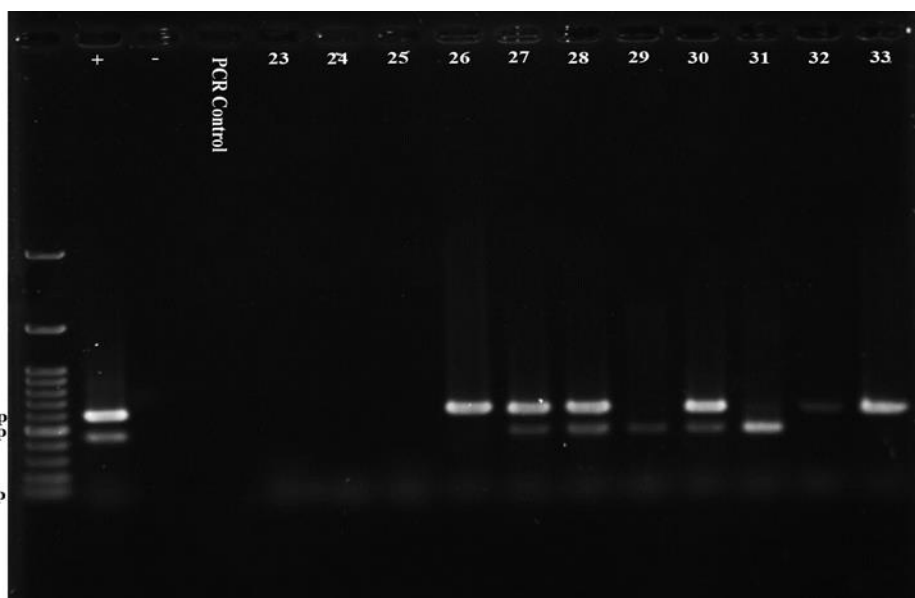
میان ۶۰ نمونه شیگلا سونتی، ۳۹ نمونه (۶۵٪) دارای ژن *bla_{TEM}* ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* و ۱ نمونه (۱/۶٪) دارای ژن *bla_{SHV}* بودند (تصویر شماره ۱). نتایج ضرب همبستگی بین ژن های شناسایی شده و آنتی بیوتیک ها نشان داد که ژن *TEM* و *CTX-M* دارای ارتباط معنی دار با آنتی بیوتیک ها بوده که با توجه به نتایج آزمون تعیین مقاومت به روش فنوتیپی هر ۲۹ سویه شناسایی شده با این روش، واجد این دو ژن *TEM* و *CTX-M* بوده اند. به عبارت دیگر وجود این ژن در نمونه های مورد آزمایش باعث افزایش مقاومت باکتری ها در برابر این آنتی بیوتیک ها شده است. با توجه به اینکه ژن *SHV* در یک نمونه یافت شد؛ بنابراین رابطه منطقی و معنی داری بین آن و آنتی بیوتیک ها مشاهده نگردید.

تمامی نمونه های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی بررسی و مطابق با استانداردهای تشخیصی به عنوان شیگلا سونتی تأیید گردیدند. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین و اریترومايسين به ترتیب با ۹۶/۶٪ و ۹۵٪ فراوانی و بیشترین میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و ایمی پنم با ۷۰٪ فراوانی گزارش شده است. نتیجه آزمون آنتی بیوگرام و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه ها در جدول شماره ۲ ذکر شده است. در سنجش بتالاکتاماز به روش فنوتیپی، در روش Combine disk، تعداد ۲۹ نمونه (۴۸/۳٪) از سویه ها مقاوم به سفوتاکسیم بوده که با این روش شناسایی گردید. بر اساس آزمون Multiplex-PCR، از

جدول شماره ۲: میزان حساسیت سویه های جداسازی شده به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع آنتی بیوتیک	میزان حساسیت	حساسیت متوسط	میزان مقاومت
سفوتاکسیم	۷(۱۱/۷)	۴(۶/۶)	۴۹(۸۱/۷)
اریترومايسين	-	۳(۵)	۵۷(۹۵)
آمیکاسین	۴(۶/۶)	۵۲(۸۶/۸)	۴(۶/۶)
تتراسایکلین	۱۳(۲۱/۶)	۴(۶/۶)	۴۳(۷۱/۸)
کو تریموکسازول	۹(۱۵/۱)	۷(۱۱/۶)	۴۴(۷۳/۳)
آمپی سیلین	-	۷(۱۱/۶)	۵۳(۸۸/۴)
سیپروفلوکساسین	۴۲(۷۰)	۲(۳/۴)	۱۶(۲۶/۶)
ایمی پنم	۴۲(۷۰)	۴(۶/۶)	۱۴(۲۳/۲)
پنی سیلین	-	۲(۳/۴)	۵۸(۹۶/۶)
جنتامایسین	-	۲۵(۴۱/۷)	۳۵(۵۸/۳)

داده ها به صورت تعداد (درصد) بیان شده اند.



تصویر شماره ۱: نتایج واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های مورد مطالعه

به ترتیب از چپ به راست مارکر bp ۱۰۰، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه های شماره ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۱ واجد ژن bp ۴۴۵ : *TEM*، نمونه های شماره ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۰ و ۳۳ واجد ژن bp ۵۹۳ *CTX-M* قابل مشاهده می باشد.

بحث:

مختلف شیگلا قادر به ایجاد اسهال خونی هستند، اما به نظر می رسد گونه سوئی در سال های اخیر اهمیت ویژه ای پیدا کرده است (۲). از آنجایی که میزان ابتلاء به شیگلا سوئی در بین گروه های سنی مختلف می تواند به عنوان یک شاخص بهداشتی در ارزیابی کیفیت بهداشت یک جامعه مورد توجه باشد (۱۳). در این مطالعه به بررسی این گونه پرداختیم. درمان آنتی بیوتیکی مناسب، شدت، دوره، علائم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می دهد. اولین خط درمانی شیگلوز، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و کوتریموکسازول هستند، اما با توجه به بروز مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها، فلوروکینولون ها و نسل سوم سفالوسپورین ها جایگزین این ها شده اند (۱۴). بتالاکتام های وسیع الطیف یکی از مهم ترین آنتی بیوتیک های مورد استفاده در ایران هستند و مقاومت به این آنتی بیوتیک ها به کرات در باکتری های گوناگون گزارش می شود (۱۵). با توجه به اینکه بسیاری از این ژن ها بین باکتری های روده ای قابل انتقال می باشند حضور این ژن ها نه تنها درمان

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق مقاومت به پنی سیلین، سفوتاکسیم، جنتامایسن، اریترومایسن، تراسایکلین، کوتریموکسازول و آمپی سیلین بالای ۵۰٪ است. موضوع بروز و شیوع مقاومت های میکروبی به خصوص مقاومت باکتری های گرم منفی یکی از موانع اساسی بر سر راه درمان قطعی بیماری های عفونی محسوب می شود. باکتری های تولیدکننده بتالاکتامزهای وسیع الطیف به واسطه هیدرولیز بسیاری از آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها معضلات عدیده ای را در درمان عفونت های خطرناک ناشی از این باکتری ها به وجود آورده اند، بنابراین تأثیرپذیری داروها بر روی باکتری ها به خصوص شیگلا رو به کاهش گذاشته است. شیگلوزیس در تمام جهان اندمیک بوده و شایع ترین عامل ایجاد اسهال خونی باکتریایی می باشد. طبق گزارش WHO سالانه ۱/۱ میلیون نفر در جهان در اثر این عفونت می میرند. این بیماری معمولاً در مناطق با جمعیت زیاد و وضعیت بهداشتی ضعیف اتفاق می افتد (۱۲). تمامی گونه های

بیماری را به تعویق می اندازد بلکه انتقال این ژن ها به سایر باکتری های روده ای از جمله اشریشیاکلی بسیار مخاطره آمیز می باشد. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می باشد. در مقاومت ذاتی سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی بیوتیک ها بوده، در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و سویه های حساس به مقاوم ناشی می شود (۱۶). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت چند دارویی به ۵ دارو و بیشتر حدود ۶۰٪ گزارش شده است. مقاومت به سیروفلوکساسین مشاهده شده در این مطالعه می تواند به عنوان یک هشدار برای گسترش مقاومت به این آنتی بیوتیک به شمار آید. مقاومت به ایمپنم در این مطالعه ۳۰٪ به دست آمد. در حالی که مقاومتی نسبت به این آنتی بیوتیک در اکثر کشورها گزارش نشده است.

در مطالعه جمشیدی روی بیماران مبتلا به اسهال حاد در مرکز آموزشی شهید دکتر بهشتی زنجان از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ از مجموع ۶۸۲ مورد نمونه مدفوع اسهالی ۱۳۴ مورد (۱۹/۶٪) شیگلا ایزوله شد (۱۷). در تست آنتی بیوگرام بالاترین حساسیت به سیروفلوکساسین (۸۸/۸٪) و بالاترین مقاومت به آمپی سیلین (۱۰۰٪) مشاهده شد. این نتایج با مطالعه پیش رو مطابقت دارد، زیرا بیشترین مقاومت به استرپتومایسین، تتراسایکلین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل با ۱۰۰٪، ۸۶/۷٪، ۹۱/۸٪ و ۵۰٪ و بیشترین حساسیت به جنتامایسین و سیروفلوکساسین با ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ بود و به نظر می رسد تشابه در مقاومت به آمپی سیلین سروتا پ غالب شیگلا سونه ای است که مقاومت بیشتری نسبت به آمپی سیلین دارند؛ در حالی که در مطالعه جمشیدی سروتا پ غالب شیگلا فلکسنری بوده که مقاومت بالایی به آمپی سیلین را در سال های اخیر نشان می دهند. محققین بر روی نمونه های شیگلا جمع آوری شده از ۵ استان کشور (مازندران، گیلان، اصفهان، ایلام، تهران) طی سال های ۱۳۸۰-۱۳۷۵، به بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی پرداخته و در نتایج تحقیقات خود دریافتند که میزان جداسازی شیگلا

سونتی ۷۳٪، شیگلا فلکسنری ۱۸٪، شیگلا بوئیدی ۵٪ و شیگلا دیسانتری ۲٪ می باشد (۱۸). در بین این نمونه ها ۵٪ مقاوم به تتراسایکلین و کوتریموکسازول بوده و میزان مقاومت در سویه های شیگلا سونتی بیش از سایر گونه ها بوده است. مقایسه این نتایج با مطالعه ما موید همین نکته می باشد که میزان مقاومت به تتراسایکلین و کوتریموکسازول به ترتیب ۷۱/۸٪ و ۷۳/۳٪ بعد از پنی سیلین و اریترومایسین در رتبه های بعدی قرار می گیرد. در مطالعه حاضر ۸۹٪ از سویه های شیگلا از گروه باکتری های تولید کننده ESBL شناسایی شدند. فرشاد و همکاران جهت بررسی سویه های شیگلا با تست سرولوژیکی، ۶۱ نمونه شیگلا سونتی، ۱۶ نمونه شیگلا فلکسنری، ۳ نمونه شیگلا بوئیدی، ۲ نمونه شیگلا دیسانتری تشخیص داده شد. تمام سویه ها به نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفالوتین، آمیکاسین حساسیت داشته و حدود ۹۰/۲۴٪ از سویه های به کوتریموکسازول مقاومت داشته اند (۱۹). تناقض و اختلاف در نتایج سایر مطالعات با مطالعه حاضر می تواند به نوع نمونه ها و زمان نمونه برداری و حتی روش های نمونه برداری و انتقال به آزمایشگاه و یا حتی سابقه مصرف آنتی بیوتیک مرتبط باشد. Mandomando و همکاران مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۹ ایزوله شیگلا را در کودکان کمتر از ۵ سال بررسی نمودند. نتایج نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل ۵۲٪، آمپی سیلین ۵۶٪، تتراسایکلین ۶۶٪ و تری متوپریم - سولفامتاکسازول ۸۴٪ بوده است (۲۰). نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر تشابه داشته است. این تشابه می تواند ناشی از منبع نمونه، محل نمونه برداری و یا میزان مواجهه با آنتی بیوتیک باشد. ریسک فاکتورهای مختلفی در افزایش میزان باکتری های تولید کننده ESBL دخالت دارد که طولانی بودن مدت زمان بستری در بیمارستان، مصرف بیش از اندازه آنتی بیوتیک ها (از جمله سفالوسپورین های نسل سوم)، استفاده از کاتترهای عروقی و ادراری، نگهداری طولانی در ICU، سابقه جراحی و کاربرد غیر منطقی و

سونتی، ۳۹ نمونه (۶۵٪) دارای ژن *bla_{TEM}* ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}* و ۱ نمونه (۱/۶٪) دارای ژن *bla_{SHV}* بودند که نشان دهنده درصد بالای حضور این ژن ها در نمونه های شیگلا سونتی می باشد.

رنجبر و همکاران به بررسی حضور ژن های ESBL در گونه های شیگلای جداسازی شده از کودکان مبتلا به اسهال پرداختند. در این مطالعه که ۵۵ جدایه مورد بررسی قرار گرفت، ژن های *bla_{TEM}* و *bla_{CTX-M}* در دو جدایه شیگلا سونتی یافت شدند (۲). علت بیشتر این تشابهات می تواند به منابع و منشاء این باکتری مرتبط باشد. در مطالعه Acikgoz و همکاران در نمونه های شیگلا از لحاظ وجود ژن های ESBL مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۴٪ سویه های شیگلا سونتی دارای ژن *bla_{CTX-M}* بودند، ولی هیچکدام از سویه ها ژن *bla_{SHV}* را نداشتند (۱۴). در مطالعه Kacmaz و همکاران، ۴۳ نمونه شیگلا سونتی جداسازی شده از کشور ترکیه از جهت حضور ژن های ESBL مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۱/۶٪ نمونه ها واجد ژن های *bla_{SHV}*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{TEM}* بودند (۲۲). Navia و همکاران، به بررسی فراوانی ژن های ESBL در گونه های شیگلای جداسازی شده از موارد بالینی در کشور اسپانیا پرداختند. در این مطالعه ژن *bla_{TEM}* در ۲۸٪ نمونه های شیگلا سونتی قابل شناسایی بود، ولی هیچکدام ژن *bla_{SHV}* را نشان ندادند (۲۳).

همچنین در بررسی Sturod و همکاران، بر روی نمونه های شیگلا سونتی جداسازی شده از کشور نروژ، ۹۴٪ نمونه ها واجد ژن *bla_{CTX-M}* بودند، اما هیچکدام ژن های *bla_{SHV}* و *bla_{TEM}* را نشان ندادند (۲۴). در مطالعه Li و همکاران، جدایه های شیگلا از لحاظ وجود ژن های ESBL مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۱۳٪ سویه های شیگلا سونتی دارای ژن *bla_{CTX-M}* بودند (۴). همچنین در مطالعه Kim و همکاران، در کشور کره جنوبی بر روی بیش از ۵۰۰۰ نمونه شیگلا سونتی، بیشترین ژن تولید کننده ESBL، گروه TEM شناخته شد (۲۵). Sabra و همکاران، ۶۱ نمونه شیگلا

ناکافی درمان های ضد میکروبی از جمله این موارد می باشد. آزمایش Combine Disk بر روی ۴۹ نمونه مقاوم به سفوتاکسیم انجام گرفت و نتیجه مشخص نمود که ۲۹ سویه دارای مقاومت فنوتیپی بوده که در روش مولکولی نیز مشخص گردید که این نمونه ها واجد هر دو ژن *TEM* و *CTX-M* به طور همزمان بوده که مقایسه این نتایج با نتایج آزمون مولکولی نشان دهنده وجود ژن های بتالاکتامازی در سویه های مورد بررسی و نقش این ژن ها در بروز مقاومت دارد.

در مطالعه ای که توسط رنجبر و همکاران انجام شد از ۵۵ سویه شیگلای جداسازی شده، ۴ سویه (۷/۳٪)، شامل ۳ سویه شیگلا سونتی و یک سویه شیگلا فلکستری به روش فنوتیپی به عنوان سویه های تولید کننده بتالاکتاماز شناسایی گردید (۲).

Cho و همکاران، انتقال ژن *bla_{CTX-M}* را از سویه های شیگلا سونتی به باکتری های کمנסال روده ای بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد، انتقال این ژن ESBL به باکتری های روده صورت می پذیرد (۲۱). تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) به واسطه عوامل ژنتیکی متعددی تولید می شود که باعث تولید بالغ بر ۳۴۰ نوع متفاوت آنزیم بتالاکتامازی می شود. این آنزیم ها را بر اساس منشاء شناسایی و تشابه ژنتیکی به کلاس های مختلف طبقه بندی می کنند که اصلی ترین آن ها شامل آنزیم های *SHV*، *TEM*، *CTX-M* و OXA، Amp-C می باشد.

در سال های اخیر آنزیم *CTX-M* به عنوان شایع ترین نوع بتالاکتاماز وسیع الطیف بالانحص در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است و انواع تایپ های متفاوت این آنزیم شناسائی و معرفی شده است (۷). تاکنون مطالعات زیادی در کشور ما در جهت شناسایی ژن های ESBL در باکتری های روده ای به خصوص *E. coli* صورت گرفته است، اما در مورد جنس شیگلا مطالعات بسیار اندکی وجود دارد. لذا در مطالعه حاضر به بررسی حضور ژن های *bla_{TEM}*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{SHV}* پرداخته شد. در مطالعه حاضر از میان ۶۰ نمونه شیگلا

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای ژن های ESBL خصوصاً *bla_{TEM}* و *bla_{CTX-M}* در سویه های شیگلا سونتی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال خونی بود که این امر بسیار نگران کننده می باشد، زیرا گونه سونتی در حال حاضر رایج ترین گونه شیگلا در ایران می باشد و مقاومت به این آنتی بیوتیک ها کنترل و درمان این بیماری را مشکل می سازد. از این رو مراقبت دقیق و دائمی بر بروز مقاومت دارویی، تجویز مناسب آنتی بیوتیک ها و پایش حضور ژن های دخیل در بروز مقاومت دارویی جهت کاهش انتشار سویه های شیگلا سونتی مقاوم به بتالاکتام های وسیع الطیف ضروری می باشد.

تشکر و قدردانی:

نگارنده کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می دارد. همچنین این مقاله مستخرج از پایان نامه با کد طرح ۶۲۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۱۲ مصوب ۱۳۹۴/۰۳/۳۰ در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی ساوه می باشد.

سونتی جدا شده از موارد اسهال در کشور لبنان را از لحاظ وجود ژن های ESBL مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۶٪ نمونه ها داری ژن *bla_{CTX-M}* بودند (۲۶).

در مطالعه Cao و همکاران، ۲۰٪ سویه های شیگلا سونتی دارای ژن *bla_{CTX-M}* بودند، اما هیچکدام ژن *bla_{SHV}* را نداشتند (۲۷). همان طور که از نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات بر می آید، ژن های *bla_{CTX-M}* و *bla_{TEM}* بیشترین فراوانی را در بین سویه های شیگلا سونتی داشته و فراوانی ژن *bla_{SHV}* بسیار کم یا اصلاً وجود نداشته است، اما به نظر می رسد ژن *bla_{CTX-M}* با توجه به تنوع بالای آنزیم های تولیدی مهم ترین ژن دخیل در بروز مقاومت ایزوله های شیگلا سونتی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف باشد و اثبات این امر نیازمند مطالعات بیشتری می باشد.

در تحقیق حاضر ژن های *bla_{TEM}*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{SHV}* توسط روش Multiplex-PCR شناسایی شد. در این تحقیق نیز همانند تعداد زیادی از تحقیقات انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان ثابت شد، تعیین هویت مولکولی با روش Multiplex-PCR از سرعت، دقت و اعتماد بالاتری نسبت به سایر روش های دیگر برخوردار می باشد و امکان شناسایی چندین ژن را به طور همزمان می دهد.

منابع:

1. Saran B, Erdem B, Tekeli FA, Sahin F, Aysev AD. Characterization of *Shigella* strains isolated in ankara, Turkey by antimicrobial resistance models, plasmid profile analysis and pulsed-field gel electrophoresis]. Mikrobiyol Bul. 2013; 47(1): 35-48.
2. Ranjbar R, Ghazi FM, Farshad S, Giammanco GM, Aleo A, Owlia P, et al. The occurrence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Shigella* spp. in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 2013; 5(2): 108-12.
3. Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Zhang J, Chen GX, Nasu M, et al. Serotypes and extended-spectrum beta-lactamase types of clinical isolates of *Shigella* spp. from the Zhejiang province of China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 69(1): 98-104.
4. Li J, Li B, Ni Y, Sun J. Molecular characterization of the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Shigella* spp. in Shanghai. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(3): 447-51.
5. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J. 1991; 276(1): 269-70.
6. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 161-82.

7. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1): 1-14.
8. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resist Updat.* 2013; 16(1-2): 22-45.
9. Kim JS, Kim J, Jeon SE, Kim SJ, Kim NO, Hong S, et al. Complete nucleotide sequence of the IncII plasmid pSH4469 encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a clinical isolate of *Shigella sonnei* from an outbreak in the Republic of Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 44(6): 533-7.
10. Cockerill FRC, NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2012.
11. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2007; 115(12): 1400-8.
12. Abbaspour S, Mardaneh J, Ahmadi K. The survey of shigellosis frequency and determination of antibiotic resistance profile of isolated strains from infected children in Tehran. *Iran South Med J.* 2014; 17(1): 42-8.
13. Ghadage DP, Bal AM. Antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* worthington isolated from neonates--a retrospective study. *Jpn J Infect Dis.* 2002; 55(2): 45-6.
14. Acikgoz ZC, Eser OK, Kocagoz S. CTX-M-3 type beta-lactamase producing *Shigella sonnei* isolates from pediatric bacillary dysentery cases. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61(2): 135-7.
15. Mohammadi-Mehr M, Feizabadi M. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. *Iran J Microbiol.* 2011; 3(1): 26-30.
16. Mobasher ANM, Pornoor M, Sadeghi G. Molecular analysis of genes in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* SHV type beta-lactamase wide variety of clinical specimens from 4 hospital Tabriz. *J Med Microbiol.* 2008; 3(2): 17-9.
17. Jamshidi A. Prevalence of *Shigella* spp and antibiotic resistance pattern in patients with acute diarrhea in Shahid Beheshti Education Center, Sampad Zanzan from 2003 to 2007. *J Zanzan Uni Med Sci.* 2008; 62: 84-77.
18. Ghadage DP, Bal AM. Antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* worthington isolated from neonates: A retrospective study. *Jpn J Infect Dis.* 2002; 55(2): 45-6.
19. Farshad S, Ranjbar R, Hosseini M. Molecular genotyping of *Shigella sonnei* strains isolated from children with bloody diarrhea using pulsed field gel electrophoresis on the total genome and PCR-RFLP of IpaH and IpaBCD genes. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(1): e14004.
20. Mandomando I, Jaintilal D, Pons MJ, Vallès X, Espasa M, Mensa L, et al. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in *Shigella* and *Salmonella* isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6): 2450-4.
21. Cho SH, Han SY, Kang YH. Possibility of CTX-M-14 Gene Transfer from *Shigella sonnei* to a Commensal *Escherichia coli* Strain of the Gastroenteritis Microbiome. *Osong Public Health Res Perspect.* 2014; 5(3): 156-60.
22. Kacmaz B, Unaldi O, Sultan N, Durmaz R. Drug resistance profiles and clonality of sporadic *Shigella sonnei* isolates in Ankara, Turkey. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(3): 845-9.
23. Navia M, Gascon J, Vila J. Analysis of the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents in *Shigella* spp. causing travellers' diarrhoea. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(12): 1044-7.

24. Sturod K, Dahle UR, Berg ES, Steinbakk M, Wester AL. Evaluation of the ability of four ESBL-screening media to detect ESBL-producing *Salmonella* and *Shigella*. BMC Microbiol. 2014; 14: 217.
25. Kim S, Kim J, Kang Y, Park Y, Lee B. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea. J Clin Microbiol. 2004; 42(11): 5264-9.
26. Sabra AH, Araj GF, Kattar MM, Abi-Rached RY, Khairallah MT, Klena JD, et al. Molecular characterization of ESBL-producing *Shigella sonnei* isolates from patients with bacillary dysentery in Lebanon. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(4): 300-5.
27. Cao J, Zhang X, Zhou T, Lu Y, Hou J, Guo M, et al. Prevalence and characterisation of extended spectrum beta-lactamases genes in *Shigella* isolates, in Wenzhou, Southern China. Indian J Med Microbiol. 2014; 32(1): 95-6.

Molecular analysis of genes of ESBL (*SHV.TEM.CTX*) in *Shigella* *Sonnei* isolated from clinical samples by PCR

Mosadegh Sh, Moradli Gh*

Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. Iran.

Received: 29/May/2016 Accepted: 10/Oct/2016

Background and aims: *Shigella* is one of the most common causes of dysentery and sometimes mortality specially in children and immunocopromised patients and the occurrence of drug resistance, makes it difficult the choice of appropriate antibiotics to treat shigellosis. The aim of this study was to define the prevalence of *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* in *Shigella Sonnei* isolated from patients with diarrhea by Multiplex-PCR.

Methods: In this cross-sectional study, a total of 60 *Shigella Sonnei* isolates of private laboratories and hospitals in Northern Tehran different ages from diarrhea samples were collected and cultured in specific environments and with biochemical and serological confirmation. To identify resistant strains to beta test was conducted phenotypic combine disk. The presence of *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* genes was evaluated by specific primers and Multiplex-PCR.

Results: The highest frequency resistance to the antibiotics penicillin and erythromycin was 96.6% and 95%, respectively, and prevalence maximum sensitivity has been reported to ciprofloxacin and imipenem with 70%. In the Combine disk method, 29 strains (48.3%) were found positive to beta-lactamase. Among 60 isolates, 39 samples (65%) had the *bla_{TEM}* gene, 28 samples (46.6%) had the *bla_{CTX-M}* gene and 1 sample (1.66%) had the *bla_{SHV}* gene.

Conclusion: Given the high prevalence of beta-lactam antibiotics resistance genes in strains of *Shigella Sonnei*, careful medical care and proper use of antibiotics appropriate is essential and timely to prevent the spread of resistant strains is necessary.

Keywords: ESBL, *Shigella Sonnei*, Multiplex-PCR.

Cite this article as: Shadi M, Moradli G. Molecular analysis of genes of ESBL (*SHV.TEM.CTX*) in *Shigella Sonnei* isolated from clinical samples by PCR. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(2): 98-108.

***Corresponding author:**

Microbiology Dept., Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. Tel:00989121551217,
Email: moradli.mic@gmail.com