بررسی اینتگرون کلاس ۱ و ۲ و ۳ در سویه های سالمونلا انتریتیدیس بالینی با روش PCR

ابوالفضل مقدم[۱]، شهرام نظریان[۲*]

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: گاستروانتریت یکی از شایع ترین عفونت های سالمونلایی در انسان می باشد که توسط سروتیپ های سالمونلا به ویژه سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم ایجاد می گردد. گسترش سویه های سالمونلا با مقاومت چند دارویی یک مشکل حاد جهانی است. کسب اینتگرون، یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در میکروارگانیسم های گرم منفی، به ویژه در باکتری های روده ای در نظر گرفته شده است. هدف این مطالعه بررسی کلاس های ۱،۲ و ۳ اینتگرون به عنوان مهم ترین کلاس های اینتگرون در گونه های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از بیماران با روش Multiplex PCR می باشد.

روش بررسی: در این پژوهش، ۵۶۷ نمونه مدفوع و خون از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان های کرمان با استفاده از روش کشت، آزمون استاندارد بیوشیمیایی و PCR سالمونلاهای انتریتیدس شناسایی شدند. پس از استخراج DNA حضور اینتگرون های کلاس ۱،۲ و ۳ توسط تکنیک Multiplex PCR بررسی شد.

یافته ها: از مجموع ۵۶۷ نمونه، ۴۸ سویه به عنوان سالمونلا انتریتیدیس شناخته شدند. از این ۴۸ سویه، ۴۵ سویه (۹۵درصد) واجد ژن intI، ۷ سویه (۱۴/۵درصد) واجد ژن intII، ۲ سویه (۴ درصد) واجد ژن intIII بودند.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر شیوع بالای کلاس های ۱،۲ و ۳ اینتگرون را نشان داد. غربالگری اینتگرون ها به عنوان نشانه کسب و گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی، می‌تواند به عنوان سازوکاری مهم در مقابله با مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها مدنظر باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، مقاومت داروئی چندگانه، اینتگرون، Multiplex PCR

نویسنده مسئول: شهرام نظریان
آدرس: ایران، تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، مرکز تحقیقات زیست شناسی
ایمیل: nazarian56@gmail.com

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

مقدمه

گونه های سالمونلا، باکتری های گرم منفی و جزء عوامل بیماری زای ایجاد کننده گاستروانتریت و منتقله از راه مواد غذایی هستند. سالمونلوز یکی از مهم ترین بیماری های باکتریایی روده ای است که توسط گونه های سالمونلا ایجاد شده و در سرتاسر جهان میلیون ها انسان و حیوان را درگیر می کند (۱و۲). گاستروانتریت شایع ترین و متداول ترین عفونت سالمونلایی در انسان می باشد که توسط سروتیپ های سالمونلا به ویژه سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم ایجاد می گردد (۳). تقریباً در تمام کشورهای صنعتی جهان، سالمونلوز یکی از شایع ترین بیماری های منتقل شونده از طریق غذا است. استفاده گسترده عوامل ضد میکروبی در تولید مواد غذایی حیوانی، می تواند زمینه افزایش مقاومت باکتری ها را نسبت به آنتی بیوتیک ها و انتقال آن از طریق مصولات غذایی به انسان فراهم کند (۴). هر چند سویه های جدا شده در مناطق مختلف به داروهایی همچون برخی سفالوسپورین‌ها و فلوروکوئینولون‌ها حساسیت نشان داده اند و از آن ها به عنوان داروی مورد نظر برای انتروکولیت ناشی از باکتری استفاده می شود، با این حال مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلفی از جمله نیتروفورانتوئین و نالیدیکسید اسید نیز دیده می شود. مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلا، مشکلات زیادی را در درمان انسان ها و حیوانات در سرتاسر جهان به وجود آورده است (۵). گونه های سالمونلا این توانایی را دارند که از راه های مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی کسب نمایند. این مقاومت ها می توان از طریق موتاسیون های کروموزومی، کاهش قابلیت نفوذ آنتی بیوتیک ها از دیواره سلولی، تغییر جایگاه هدف آنتی بیوتیک، انتقال افقی عناصر ژنتیکی که حاوی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و غیر فعال سازی آنزیماتیک آنتی بیوتیک ها صورت پذیرد (۶).

در سال های اخیر، نقش اینتگرون ها به عنوان عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص شده است. اینتگرون ها عناصری هستند که می توانند در پلاسمیدها، کروموزوم ها و یا ترانسپوزون ها جای گیرند. بنابراین کسب اینتگرون، یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در میکروارگانیسم های گرم منفی، به ویژه در باکتری های روده ای در نظر گرفته شده است (۸و۷). با توجه به این که ژن های مقاومت بر روی اینتگرون ها قرار دارند و می توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن های مقاومتی را ضروری می نماید (۹). اینتگرون ها از عناصر متحرک ژنتیکی هستند که قادرند ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف را حمل نمایند. ژن های مقاومت از قبیل aadA، aadB، sulA، bla و pse توسط اینتگرون ها حمل می شوند. در میان کلاس های مختلف اینتگرون، اینتگرون کلاس I در ایجاد و انتقال مقاومت های آنتی بیوتیکی مهم تر و دارای فراگیری بیشتری می باشد (۹). از نظر ساختاری تمام اینتگرون ها از سه جزء اصلی انتهای ´۵ حفاظت شده، انتهای ´۳ حفاظت شده و یک ناحیه مرکزی متغیر بین ´ ۳ و ´۵ تشکیل شده اند. اجزای ضروری ناحیه ی ´۵ تمام اینتگرون‌ها شامل ژن اینتگراز (IntI) که سایت نوترکیب اختصاصی را کد می‌کند. سایت گیرنده attI که به وسیله اینتگراز شناسایی می‌شود و در مجاورت ژن IntI قرارگرفته است و توالی پروموتور شامل Pc و Pint که به ترتیب برای بیان ژن‌های موجود در کاست ژنی که در اینتگرون ادغام شده و بیان اینتگراز می‌باشد (۱۰). ناحیه ی ´۳ اینتگرون واجد سه ساختار متفاوت است که در کلاس‌های اینتگرون متفاوت می‌باشند. تاکنون بیش از ۹ کلاس از اینتگرون‌ها بر اساس تفاوت‌های موجود در ژن اینتگراز در باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده‌اند. اما تنها ۴ کلاس در ارتباط با ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشد که اینتگرون‌های کلاس I و متعاقب آن اینتگرون‌های کلاس II و III به

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

عنوان شایع ترین کلاس‌ها در ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشند (۱۱و۱۰).

بروز مقاومت های چند دارویی نمونه های بالینی سالمونلا انتریتیدیس، انتخاب درمان مناسب برای عفونت را مشکل می سازد. چندین مطالعه در دنیا الگوی ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های سالمونلای بالینی جدا شده از انسان را مشخص نموده اند. بنابراین هدف این مطالعه بررسی در سطوح مولکولی کلاس های ۱،۲و۳ اینتگرون به عنوان شایع ترین و مهم ترین کلاس های اینتگرون در گونه های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از بیماران با روش Multiplex-PCR می باشد.

روش بررسی

ایزوله های باکتریایی: در یک مطالعه توصیفی از بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا مردادماه سال ۱۳۹۴، ۵۶۷ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه ها برای شناسایی جنس سالمونلا با روش های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (مرک آلمان) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه ها در محیط های انتخابی مانند سالمونلا-شیگلا (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. با تست های بیوشیمیایی و محیط های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی های مشکوک به سالمونلا جدا سازی و پس از انجام آزمون های افتراقی مذکور، آزمون های سروتایپینگ با آنتی سرم های O و H انجام پذیرفت (۱۲). واکنش آگلوتیناسیون به عنوان واکنش مثبت ثبت شد، سپس با استفاده از روش های استاندارد باکتریولوژیک، باکتری ها در محیط LB براث کشت داده شدند.

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد. تک کلنی از باکتری ها انتخاب و به ۵ میلی لیتر از محیط مایع LB منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه تا رسیدن OD کشت سلولی به ۰/۷ نگهداری شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE و۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰ درصد یکنواخت گردید. در ادامه ۳ میکرولیتر از آنزیم Proteinase K به آن اضافه و پس از به هم زدن به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۳).

به نمونه حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl 5M و۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. حذف پروتئین ها با افزودن فنل-کلروفرم-ایزوآمیلالکل به نسبت (۱/۲۴/۲۵) انجام گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه با ۳۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. اسیدنوکلوئیک موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانلو استات سدیم ۳ مولار ترسیب داده شد. رسوب حاوی DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در۲۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. جهت حذف RNA از RNase A با غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد (۱۳).

برای اندازه گیری غلظت نمونه های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. به این منظور ابتدا از آب مقطر و یا بافر TE به عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه نانودراپ استفاده شد (۱۴). یک میکرولیتر از نمونه استخراج شده برابر روی دستگاه قرار داده و غلظت آن را در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت که در صورتی که این نسبت حدود ۱/۸ باشد نشان دهنده خلوص نمونه DNA است.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

واکنش PCR: طبق بررسی های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، یک جفت پرایمر اختصاصی برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس و همچنین سه جفت پرایمر اختصاصی برای سه کلاس اینتگرون به صورت Multiplex انتخاب گردید (جدول ۱).

جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار Oligo برخی ویژگی های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ و جفت شدگی بررسی شد (۱۵). پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

جدول ۱. مشخصات پرایمر های استفاده شده

منبع	دمای اتصال (سانتی گراد)	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر	توالی هدف	هدف
(۲۳)	۵۶	۳۰۴	**F:TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG R:TGAACTACGTTCGTTCTTCTGG**	**Sdf I**	شناسایی سالمونلا انتریتیدیس
(۲۴)	۵۹	۱۶۰	**F:CAGTGGACATAAGCCTGTTC R:CCCGAGGCATAGACTGTA**	**IntegronI**	شناسایی انتگرون کلاس ۱
(۲۴)	۵۹	۷۸۸	**F:CACGGATATGCGACAAAAAGGT R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG**	**IntegronII**	شناسایی انتگرون کلاس ۲
(۲۵)	۵۹	۹۷۹	**F:GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R:ACGGATCTGCCAAACCTGAC**	**IntegronIII**	شناسایی انتگرون کلاس ۳

به منظور اطمینان از صحت عملکرد PCR از سالمونلا انتریتیدیس ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس و از یک نمونه سالمونلا که دارای هر سه کلاس اینتگرون ۲،۱ و ۳ بود به عنوان کنترل مثبت برای Multiplex PCR شناسایی کلاس های اینتگرون استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR با غظت نهایی 1X به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۱/۵میلی مولار، پرایمرها هرکدام ۱۰ پیکومول و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، Mgcl2 ۲ میلی مولار، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل به میزان ۱۰ میکرولیتر راه اندازی گردید.

واکنش PCR به صورت Single PCR به منظور شناسایی سالمونلا انتریتیدیس و به صورت Multiplex به منظور شناسایی سه کلاس اینتگرون با برنامه دمایی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۵ دقیقه با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۵۶ درجه سانتی گراد برای پرایمر شناسایی سالمونلا انتریتیدیس و ۵۹ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای کلاس های اینتگرون و مدت زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۱ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد اعمال گردید.

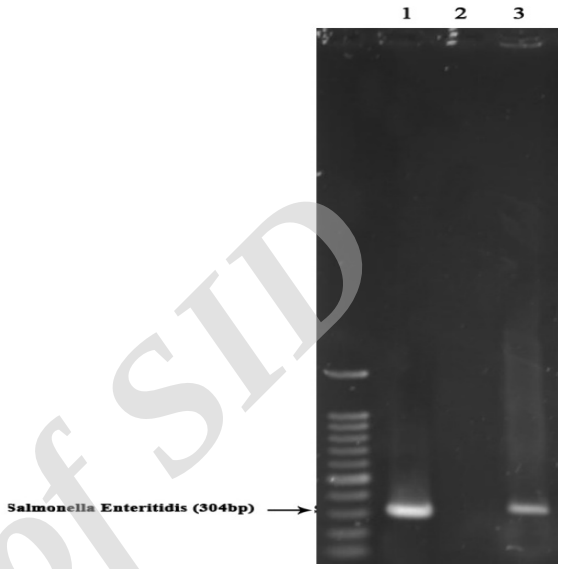
۶ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتربافر نمونه گذاری الکتروفورز (6X) مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد ساخته شده با بافر TAE 1X، به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردید، سپس با رنگ اتیدیوم برماید رنگ آمیزی و در نهایت زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

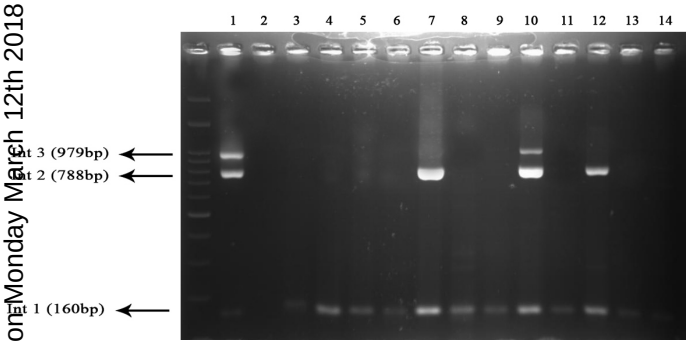
یافته ها

بعد از انجام آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی بر روی نمونه های بالینی جدا شده، از مجموع ۵۶۷ نمونه، ۴۸ سویه به عنوان سالمونلا انتریتیدیس شناخته شدند (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج حاصل از Single PCR به منظور تشخیص سالمونلا انتریتیدیس، ردیف ۱ کنترل مثبت، ردیف ۲ کنترل منفی، ردیف ۳ ایزوله بالینی. نشانگر اندازه ۱۰۰bp

از این ۴۸ سویه، ۴۵ سویه برای ژن intI (ژن مربوط به اینتگرون کلاس I) مثبت بودند، ۷ سویه برای ژن intII (ژن مربوط به اینتگرون کلاس II) مثبت بودند،۲ سویه برای ژن intIII (ژن مربوط به اینتگرون کلاس III) مثبت بودند (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج حاصل از multiplex PCR به منظور شناسایی کلاس های اینتگرون، ردیف ۱ کنترل مثبت، ردیف ۲ کنترل منفی، ردیف ۳ الی ۱۴ مربوط به ایزوله های بالینی. نشانگر اندازه 100 bp

جدول ۲. درصد فراوانی ژن های اینتگرون کلاس I، II و III

باکتری	تعداد کل	ژن intI	ژن intII	ژن intIII	ژن intI+II	ژن intI+II+III	ژن intII+III	ژن intI+III
سالمونلا انتریتیدیس	۴۸	۴۵ (۹۵درصد)	۷ (۱۴/۵درصد)	۲ (۴درصد)	۷ (۱۴/۵درصد)	۱ (۲درصد)	۰ (۰درصد)	۱ (۲درصد)

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

با توجه به نتایج بیشترین درصد مربوط به اینتگرون کلاس I با شیوع ۹۵ درصدی و سپس اینتگرون کلاس II با شیوع ۱۴/۵ درصد و در نهایت مربوط به اینتگرون کلاس III با شیوع ۴ درصد می باشد (جدول ۲).

بحث و نتیجه گیری

بیماری منتقل شونده از راه غذا که به وسیله سالمونلاهای غیر تیفوئیدی ایجاد می شود یک مشکل عمده سلامت عمومی در جهان است (۱۷و۱۶). سالمونلا انتریتیدیس که از انواع غیر تیفوئیدی سالمونلا ها می باشد با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در سال های اخیر افزایش روز افزونی داشته و مشکلات فراوانی نیز در کنترل عفونت ایجاد کرده است (۱۸). افزایش میزان عفونت با سالمونلای مقاوم در برابر داروهای ضد میکروبی نیازمند توجه ویژه ای است. مطالعات زیادی گویای ظهور سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس دارای مقاومت چندگانه است (۴). در پژوهش های متعددی از نقش عناصر ژنتیکی مرتبط با حدت و مقاومت های آنتی بیوتیکی در مورد عفونت های تهاجمی سالمونلا، گزارش شده است (۱۹). نقش اینتگرون ها در به وجود آوردن مقاومت های چندگانه آنتی بیوتیکی نیز ثابت شده است. از طرفی، سالمونلا انتریتیدیس از عوامل مهم عفونت های گوارشی و مقاومت های دارویی می باشد (۵). اینتگرون های کلاس Iرایج ترین نوع اینتگرون های یافت شده در جدایه های بالینی سالمونلا انتریکا می باشد (۲۰). شیوع کلاس های مختلف اینتگرون در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات دیگران تفاوت هایی را نشان می دهد. در پژوهشی که سلیمیان و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی نمونه های بالینی سالمونلا در تهران انجام دادند از ۱۱۰ سویه ۳۶ سویه (۳۲ درصد) دارای اینتگرون های کلاس I و یا II بودند و فاقد اینتگرون کلاس III بودند (۲۱). این در حالی است که در مطالعه حاضر، ۴ درصد از سویه های جداسازی شده واجد اینتگرون کلاس III بودند. در مطالعه ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور چین بر روی ۲۳ سالمونلا جداشده از انسان انجام گردید، مشخص شد ۱۷/۳ درصد جدایه ها دارای اینتگرون کلاس I بودند (۲۲). در مطالعه انجام شده توسط Jin و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور هنگ کنگ بر روی ۸۳۴ سالمونلای جدا شده از انسان مشخص گردید که ۱۳ درصد از آن ها دارای اینتگرن کلاس I بودند (۲۳). در بررسی انجام شده توسط Lindested و همکاران در نروژ از ۹۰ سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از انسان، ۲۲/۲ درصد واجد اینتگرون کلاس I بودند (۲۴). در تحقیق حاضر فراوانی سویه های دارای اینتگرون کلاس I، ۹۵ درصد بود که بسیار بیشتر از مطالعات Zhnag، Jin و Lindested می باشد. در مطالعات دیگر در ایران، توسط فیروزه و همکاران، ۴۱/۶ درصد از سویه های سالمونلای انسانی حامل کلاس اینتگرون ۱ بودند. همچنین، مطالعات ناغونی و همکاران شیوع بالای اینتگرون در بین سویه های سالمونلا با مقاومت چند گانه دارویی را نشان دادند (۲۵و۲). در مطالعه ای که توسط امینی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در کشور چین بر روی ۲۴ سالمونلا جداشده انجام گردید مشخص شد ۱۵/۳ درصد جدایه ها دارای اینتگرون کلاس I بودند (۲۶). این درحالی است که در تحقیق حاضر سویه هایی که واجد اینتگرون های کلاس IIو III بودند نیز جداسازی گردید. حضور شایع این عناصر ژنتیکی در میان سویه های سالمونلا، گویای ارتباط کاهش حساسیت به داروهای انتخابی و استفاده نامناسب از داروهای ضد میکروبی جایگزین در زمینه های مختلف و گسترش عوامل مقاومت است. همان طور که مشاهده شد تفاوت های زیادی در شیوع ژن های اینتگرون در مطالعات مختلف مشاهده می شود. در مطالعه حاضر شاهد شیوع بالای کلاس های ۱،۲ و ۳ اینتگرون در مقایسه با مطالعات دیگران بودیم که احتمالاً به دلیل تفاوت در رعایت بهداشت و در بین جمعیت های انسانی و یا حیوانی در کشورهای مختلف و همچنین مناطق مختلف یک کشور باشد. همچنین احتمالاً می تواند به دلیل تفاوت در میزان استفاده از آنتی بیوتیک در درمان انسان و حیوان

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

در مناطق مختلف باشد. استفاده از آنتی بیوتیک های خاص به مدت طولانی، ممکن است به انتخاب اینتگرون های حامل عناصر ژنتیکی کمک کند.

با توجه به این که انتقال افقی اینتگرون ها یکی از کاراترین روش های انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی و پیدایش گونه های چند مقاومتی مطرح می باشد و با در نظر گرفتن این که ژن های مقاومت چند گانه می تواند بر روی اینتگرون ها قرار گرفته و از سویه ای به سویه دیگر جابجا شوند (۲۷و۲۶)، لذا بالا رفتن شیوع کلاس های مختلف اینتگرون می تواند یک زنگ خطر جدی در جامعه بهداشتی باشد. بنابراین شناسایی و غربالگری اینتگرون ها برای جلوگیری از به وجود آمدن سویه های دارای مقاومت چندگانه دارویی لازم و ضروری می باشد. با توجه به این که اینتگرون ها از عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و منجر به انتقال و انتشار گسترده عوامل مقاومت از یک جدایه به جدایه دیگر می گردد، لذا شناسایی آن ها در جهت اجرای برنامه های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار جدایه های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می باشد و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راه کارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر آن ها ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) به دلیل حمایت های خود سپاسگزاری می گردد. این مقاله حاصل نتایج طرحی پژوهشی با همکاری گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد و شناسه ۹۴۳۱۰۷ بوده و در آن گروه انجام شده است. از زحمات پرسنل آزمایشگاهی مراکز درمانی و بیمارستانی شهر کرمان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

Refrences

1. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pakistan J Biol Sci PJBS. 2007 Apr 1;10(7):1138–40.(persian)

2. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis. 2010 Nov;63(6):417–21.(persian)

3. Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: A study on 1950 children with diarrhea. Tehran Univ Med J. 2010;67(12):876–82.(persian)

4. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev. 2002 Jun;26(2):141–8.

5. Vo ATT, van Duijkeren E, Fluit AC, Wannet WJB, Verbruggen AJ, Maas HME, et al. Antibiotic resistance, integrons and Salmonella genomic island 1 among non-typhoidal Salmonella serovars in The Netherlands. Int J Antimicrob Agents. 2006 Sep;28(3):172–9.

6. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal Salmonella enterica isolates. Emerg Infect Dis. 2009 Mar;15(3):388–96.

7. Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol. 2002 Jul;292(2):115–25.

8. Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. J Infect Dis. 2003 Jan 15;187(2):251–9.

9. Fluit AC, Schmitz F-J. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect. 2004 Apr;10(4):272–88.

10. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 2006 Aug;4(8):608–20.

11. Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years. FEMS Microbiol Lett. 2006 Jan;254(1):75–80.

12. Chaitram JM, Jevitt LA, Lary S, Tenover FC. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program Has Improved the Accuracy of Antimicrobial Susceptibility Testing and Reporting among Participating Laboratories Using NCCLS Methods. J Clin Microbiol. 2003 Jun 1;41(6):2372–7.

13. Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. Genet Mol Res 2011;10(1):519–25.

14. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. J Vis Exp. 2010 Nov 22;(45). pii: 2565.

15. Wojciech Rychlik. "OLIGO 7 Primer Analysis Software". Methods Mol. Biol.2007; 402: 35–60.

16. Ranjbar R, Mortazavi SM, Mehrabi Tavana A, Sarshar M, Najafi A, Soruri Zanjani R.Simultaneous Molecular Detection of Salmonella enterica Sero-vars Typhi, Enteritidis, Infantis, and Typhimurium. Iranian J Public Health 2017. 46(1):103-11.

17. Firoozeh F, Shahcheraghi F, Zahraei Salehi T, Karimi V, Aslani MM. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrongs among Salmonella enterica serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran . Iran J Microbiol. 2011 Sep;3(3):112–7.(persian)

18. 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 Univ Med J TUMS Publ. 2010 Mar 15 [cited 2017 Jan 1];67(12):876–82.(persian)

19. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella? FEMS

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

Immunol Med Microbiol. 2005 Jan 1;43(1):1–11.

20. Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F, Karimi V, Aslani MM. Characterization of class I integrons among Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from humans and poultry. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Mar;64(2):237–43.(persian)

21. Salimian Rizi K, Najar-Peerayeh S, Bakhshi B, Rahbar M. Prevalence of ESBLs and Integrons in Clinical Isolates of Salmonella spp. From Four Hospitals of Tehran. Int J Enteric Pathog. 2015 Feb 20;3(1).

22. Zhang H, Shi L, Li L, Guo S, Zhang X, Yamasaki S, et al. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among Salmonella strains isolated from healthy humans in China. Microbiol Immunol. 2004;48(9):639–45.

23. Rodríguez I, Rodicio MR, Guerra B, Hopkins KL. Potential International Spread of Multidrug-Resistant Invasive Salmonella enterica Serovar Enteritidis. Emerg Infect Dis. 2012 Jul;18(7):1173–6.

24. Lindstedt B-A, Heir E, Nygård I, Kapperud G. Characterization of class I integrons in clinical strains of Salmonella enterica subsp. enterica serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. J Med Microbiol. 2003 Feb;52(Pt 2):141–9.

25. Firoozeh F, Shahcheraghi F, Zahraei Salehi T, Karimi V, Aslani MM. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrongs among Salmonella enterica serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 2011 Sep;3(3):112–7. (persian)

26. Amini K.Prevalence of antibiotic resistance genes in *Salmonella enteritidis* isolated from animal and human and determining their antibiotic resistance patterns.J Comparative Pathobiol.2016;12(4): 1733-40. (persian)

27. Fiett J, Baraniak A, Mrówka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk Ł, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Mar;50(3):880–6.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of class 1, 2 and 3 integrons in clinical Salmonella enteritidis strains by PCR method

Abolfazl Moghadam[1], Shahram Nazarian[2]*

1. M.Sc. of Cellular and Molecular Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Downloaded from goums.ac.ir at 16:32 +0330 on Monday March 12th 2018

Abstract

Background & Objective: Gastroenteritis is one of the most common Salmonella infections in human which is caused by Salmonella serotypes especially S.enteritidis and S.typhimurium. The spread of multi-drug resistant (MDR) Salmonella strains is a serious global issue. Obtaining integrons is considered as one of the most important factors in multi-drug resistance among gram-negative microorganisms, particularly in intestinal bacteria. The aim of this study was to investigate the molecular level of class 1, 2 and 3 integrons which are the most important integrons in Salmonella enteritidis isolated from patients using Multiplex PCR.

Methods: In this study, 567 stool and blood samples were collected from patients with acute gastroenteritis and *Salmonella enteritidis* were detected using culture method, standard biochemical test, and PCR. After DNA extraction, the presence of class 1, 2, and 3 of integrons was analyzed by multiplex PCR.

Results: From 567 samples, 48 strains were identified as *Salmonella enteritidis*. Of all 48 strains, 45 strains (95%) had the *intI* gene, 7 strains (14.5%) had the *intII* gene, and 2 strains (4%) had the *intIII* gene.

Conclusion: In this study, high incidence of class 1, 2 and 3 integrons was detected. Screening integrons as a sign of obtaining and expansion of antibiotic resistance could be considered as an important mechanism to deal with antibiotic resistance in microorganisms.

Key words: Salmonella enteritidis, class 1 integrons, class 2 integrons, class 3 integrons, Multiplex PCR

Corresponding Author: Shahram Nazarian
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
E-mail: nazarian56@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir