Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۲۰/ آذر و دی ۱۳۹۷/ ۹۰-۸۰

مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی اینتگرون های کلاس ۱، ۲، ۳ در سویه های *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرازی

ابوالفضل مقدم[۱]، شهرام نظریان[۲*]، غلامرضا اولاد[۳]

گروه زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛ [۲]گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛ [۳]گروه بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **حضور اینتگرون های کلاس ۲،۱ و ۳ در جدایه های *سالمونلا تیفی موریوم* با مقاومت چند دارویی، نگرانی‌های فراوانی را در کلینیک ایجاد کرده است. با توجه به اینکه انواع ژن‌های کد کننده مقاومت دارویی بر روی اینتگرون ها قرار گرفته و از طرفی اینتگرون ها قابلیت انتشار سریع دارند، شناسایی جدایه های حاوی اینتگرون ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص میزان و توسعه مقاومت ارائه کند. هدف این مطالعه بررسی مولکولی کلاس های ۲،۱ و ۳ اینتگرون به عنوان مهم‌ترین کلاس های اینتگرون در گونه های *سالمونلا تیفی موریوم* جدا شده از بیماران با روش Multiplex PCR می‌باشد.**

روش بررسی: **در این پژوهش، ۸۹۱ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد گرفته و با استفاده از روش کشت، آزمون استاندارد بیوشیمیایی و PCR سویه های *سالمونلا تیفی موریوم* شناسایی شد. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها بر روی محیط مولر هینتون آگار و بر اساس استاندارد CLSI انجام گرفت. پس از استخراج DNA حضور اینتگرون های کلاس ۲،۱ و ۳ توسط تکنیک Multiplex PCR بررسی شد.**

یافته‌ها: **از مجموع ۸۹۱ نمونه، ٤٨ سویه به عنوان *سالمونلا تیفی موریوم* شناخته شدند. از این ٤٨ سویه، ٤٦ سویه (۹۵/۸٪) واجد ژن *intI*، ۲ سویه (٤/۱٪) واجد ژن *intII*، ۱۸ سویه (۳۷/۵٪) واجد ژن *intIII* بودند. نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین میزان حساسیت به آنتی بیوتیک سفوتاکسیم بود. جدایه های واجد اینتگرون دارای مقاومت به جنتامایسین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، کوآموکسی کلاو و تری متوپریم بودند.**

نتیجه‌گیری: **در مطالعه حاضر شاهد شیوع بالای کلاس های ۲،۱ و ۳ اینتگرون در مقایسه با مطالعات دیگران بودیم که احتمالاً می‌تواند به دلیل تفاوت در رعایت بهداشت و همچنین مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک باشد. اعمال راهکارهای مناسب کنترل عفونت و درمان در مراکز درمانی مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار بیشتر آن ها ضروری به نظر می رسد.**

واژه های کلیدی: ***سالمونلا تیفی موریوم*****، مقاومت دارویی، اینتگرون.**

مقدمه:

*سالمونلا*ها باسیل‌های گرم منفی، متحرک با داشتن فلاژل پیرامونی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور می باشند. سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکترایی روده ای است که توسط گونه های *سالمونلا* ایجاد شده و در سرتاسر جهان میلیون‌ها انسان و حیوان را درگیر می‌کند (۱). در جنس *سالمونلا* بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سروتیپ ها پاتوژن های مهمی برای انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شوند (۲). گاستروانتریت متداول ترین عارضه ایجاد شده توسط *سالمونلا* بوده و سالانه نزدیک به ۹۳ میلیون نفر به آن مبتلا شده و منجر به مرگ ۱۵۵ هزار نفر می‌شود (۲). در این میان، *سالمونلا* انتریکا سروار تایفی

***نویسنده مسئول:** تهران- دانشگاه جامع امام حسین (ع)- گروه زیست شناسی- تلفن: ۷۷۱۰٤۹۳٤-۰۲۱، E-mail: kpnazari@ihu.ac.ir*

www.SID.ir

Archive of SID

موریوم یکی از مهم‌ترین عوامل بروز سالمونلوز غیر حصبه‌ای یا همان گاستروانتریت بوده به گونه ای که در آسیا، آمریکای لاتین و اروپا، پس از انتریتیدیس بیشترین شیوع را دارد (۲). از ویژگی‌های مهم این سروار، توانایی آن در باقی ماندن به شکل غیر قابل تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است (۳) تشکیل بیوفیلم، بیان پورین هایی از قبیل OmpC، OmpF و ProP، تشکیل فیلامنت و تولید پروتئین‌های محافظ اسموزی از ساز و کارهای بقا و دوام طولانی مدت *سالمونلا*ها به شمار می‌رود (۵-۳).

مقاومت آنتی بیوتیکی *سالمونلا*، مشکلات زیادی را در درمان انسان‌ها و حیوانات در سرتاسر جهان به وجود آورده است. شیوع سویه های تیفی موریوم با مقاومت چندگانه از اوایل دهه ۸۰ میلادی از انگلستان آغاز گردید (۶). اولین گزارشات مقاومت‌های چندگانه آنتی بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین و تتراسایکلین بود (۷،۶). میزان شیوع مقاومت چندگانه در *سالمونلا تیفی موریوم* های جداشده از نمونه‌های مختلف بین ۲۲٪ تا ۳۵٪ گزارش شده است (۶).

یکی دیگر از مهم‌ترین موارد قابل ذکر در این خصوص، توسعه مقاومت به جدایه های *سالمونلا* غیر تیفوئیدی، کینولون ها و فلوروکینولوین ها از قبیل نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین بوده است (۹،۸).

گونه های *سالمونلا* این توانایی را دارند که از راه‌های مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی کسب نمایند. این مقاومت‌ها می‌تواند از طریق موتاسیون های ژنی از قبیل بروز موتاسیون در ژن‌های کد کننده جیراز و توپوایزومراز باکتری، کاهش قابلیت نفوذ آنتی بیوتیک ها از دیواره سلولی، تغییر جایگاه هدف آنتی بیوتیک، انتقال افقی عناصر ژنتیکی که حاوی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و تولید آنزیم های تخریب کننده داروها صورت پذیرد (۶). از بین ساز و کارهای فوق، تولید آنزیم های تخریب کننده داروها از مهم‌ترین روش ها برای کسب فاکتور مقاومت است که سبب تخریب داروی فعال می‌شود (۶). تولید آنزیم های بتالاکتاماز که سبب غیر فعال شدن آمپی‌سیلین می‌شود یکی از نمونه‌های قابل ذکر می‌باشد. بخش قابل توجهی از ژن‌های کد کننده این آنزیم ها توسط عناصر متحرک ژنتیکی مانند پلاسمید، ترانسپوزون ها و باکتریوفاژها انتشار می‌یابند. در سال های اخیر انتقال ژن‌های بسیاری از آنزیم های جدید توسط اینتگرون ها، توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده است (۱۰)؛ بنابراین، کسب اینتگرون یکی از عوامل مهم چند مقاومتی در میکروارگانیسم های گرم منفی، به‌ویژه در باکتری های روده ای در نظر گرفته شده است (۱۲،۱۱).

با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون ها قرار دارند و می‌توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل شوند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نماید (۱۳). 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 ناحیه‌ی ´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* قرار گرفته 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 (۱۱).

ناحیه ´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 عنوان شایع ترین کلاس‌ها در ایزوله‌های کلینیکی مطرح می‌باشند (۱۴،۱۱). اینترگون کلاس IV شیوع کمتری داشته و در برخی از گونه های *ویبریو* از جمله

www.SID.ir

Archive of SID

ویبریوکلرا گزارش شده است (۱۴). بروز مقاومت‌های چند دارویی نمونه‌های بالینی *سالمونلا تیفی موریوم*، انتخاب درمان مناسب برای عفونت را مشکل می‌سازد. چندین مطالعه در دنیا الگوی ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه‌های *سالمونلای* بالینی جدا شده از انسان را مشخص نموده اند.

با توجه به اینکه اینتگرون ها از عناصر ژنتیکی متحرک در انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند و منجر به انتقال و انتشار گسترده عوامل مقاومت از یک جدایه به جدایه دیگر می گردد. لذا شناسایی آن‌ها در جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار جدایه های مقاوم از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد

لذا با توجه به اهمیت این موضوع در مطالعه حاضر با استفاده از روش Multiplex PCR به بررسی حضور ژن‌های اینتگرون های کلاس ۲،۱ و ۳ در سویه بالینی *سالمونلا تیفی موریوم* به طور هم‌زمان پرداخته شده است.

روش بررسی:

در یک مطالعه توصیفی (بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا مرداد ماه سال ۱۳۹۴) ۸۹۱ نمونه از بیماران مبتلا به اسهال و استفراغ حاد مراجعه کننده به مراکز درمانی و بیمارستان‌های مختلف کرمان گرفته شد. نمونه‌ها برای شناسایی جنس *سالمونلا* با روش های استاندارد سرولوژی و باکتریولوژی در محیط راپاپورت واسیلیادیس (تمامی محیط‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان می باشد) در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. کشت اولیه و افتراقی بر روی نمونه‌ها در محیط‌های انتخابی مانند *سالمونلا*- شیگلا (SS) آگار، بیسموت سولفیت آگار انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمادهی شدند. با تست های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی مانند TSI، MR-VP، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره (مرک آلمان)، کلنی های مشکوک به *سالمونلا* جداسازی و پس از انجام آزمون‌های افتراقی، سروتایپینگ با آنتی سرم های O و H انجام پذیرفت (۱۵). 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.

سوسپانسیون میکروبی برابر با غلظت نیم مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیکی شامل سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل، سفوتاکسیم، تتراسیکلین، آمپی سیلین، کوآموکسی کلاو، سفتریاکسون، تری متوپریم، ایمی پنم بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) در پلیت مذکور قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمادهی گردید. به منظور مقایسه وجود و عدم وجود اینتگرون در بروز مقاومت دارویی از ۲۵ سویه *سالمونلا تیفی موریوم* که فاقد ژن اینتگرون بودند نیز جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده گردید.

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 سانتیگراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه تا رسیدن جذب نوری کشت سلولی به ۰/۷ نگهداری شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE و ۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰٪ 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 سانتیگراد نگهداری شد.

به نمونه حاصل ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم با غلظت ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد گرمادهی شد. حذف پروتئین‌ها با افزودن فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت (۱/۲۴/۲۵) انجام گرفت. اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. اسید نوکلئیک موجود در نمونه با استفاده از ایزوپروپانل و استات سدیم ۳ مولار

www.SID.ir

Archive of SID

ترسیب داده شد. رسوب حاوی DNA با اتانول ۷۰٪ شستشو و در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. جهت حذف RNA از RNase A با غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت نمونه های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید.

طبق بررسی های به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین، یک جفت پرایمر اختصاصی برای شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* و همچنین سه جفت پرایمر اختصاصی برای سه کلاس اینتگرون به صورت Multiplex انتخاب گردید (جدول شماره ۱). جهت اطمینان از عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار Oligo 5 برخی ویژگی های پرایمرها مانند میزان GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ و جفت‌شدگی بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

به منظور اطمینان از صحت عملکرد PCR از *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC 14028 به عنوان کنترل مثبت برای شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* 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 (از گروه پژوهشی پاسارگاد تهیه شد).

به منظور بهینه سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلف $MgCl_2$، dNTPs و DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای مرحله اتصال پرایمرها مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲ میکرولیتر، ۰/۲میلی مول dNTPs، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، $MgCl_2$ ۲ میلی مولار، DNA الگو ۱۵۰ نانوگرم و آب مقطر استریل ۱۰/۵ میکرولیتر، راه اندازی گردید.

واکنش PCR به صورت Single PCR به منظور شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* و به صورت Multiplex به منظور بررسی سه کلاس اینتگرون با ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد و ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد برای پرایمر شناسایی *سالمونلا تیفی موریوم* و ۵۹ درجه سانتیگراد برای پرایمرهای کلاس های اینتگرون و مدت زمان ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۱ دقیقه انجام شد. در انتها نیز مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال گردید.

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

به منظور بررسی تفاوت بین جدایه های واجد اینتگرون و فاقد اینتگرون از آزمون t-test استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان شاخص معنی دار بودن در نظر گرفته شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات تکثیر شده در این تحقیق

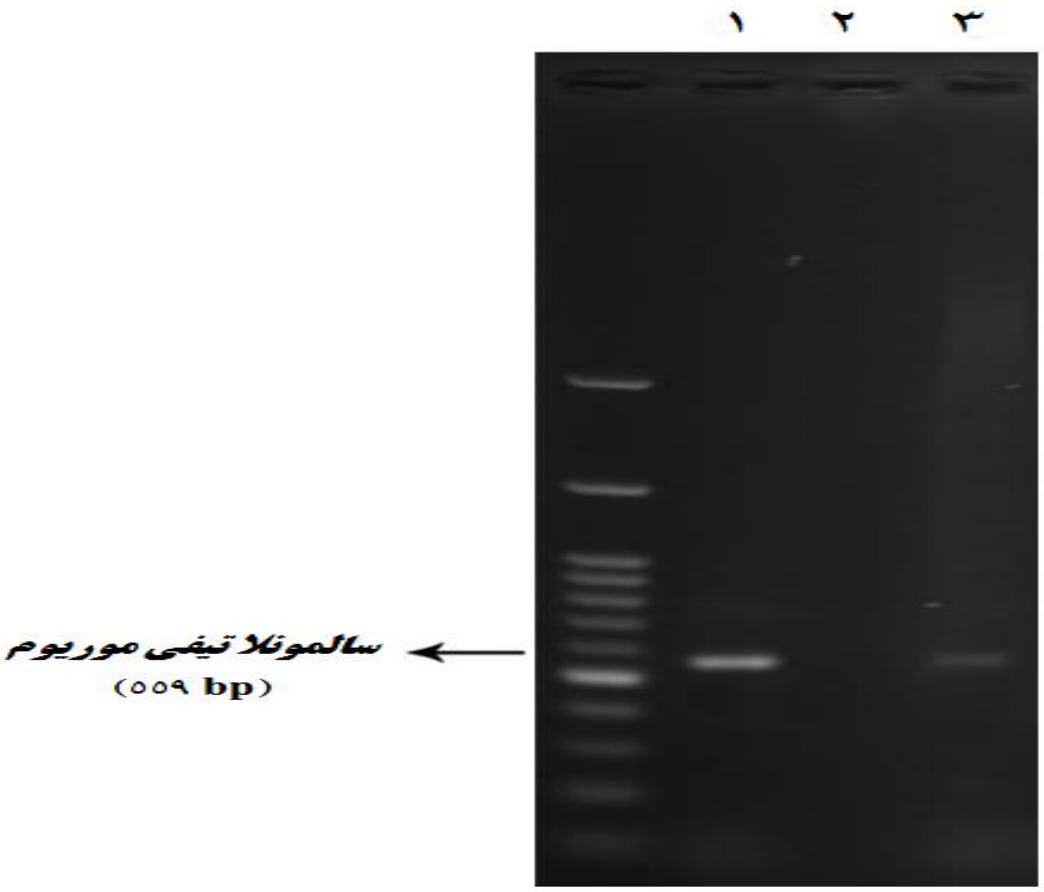
هدف شناسایی	توالی هدف	توالی پرایمر	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (سانتیگراد)	منبع
سالمونلا تیفی موریوم	**Flic**	**F:CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT** **R:ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT**	۵۵۹	۶۰	(۲۸،۲۷)
اینتگرون کلاس ۱	**IntegronI**	**F:CAGTGGACATAAGCCTGTTC** **R:CCCGAGGCATAGACTGTA**	۱۶۰	۵۹	(۲۴)
اینتگرون کلاس ۲	**IntegronII**	**F:CACGGATATGCGACAAAAAGGT** **R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG**	۷۸۸	۵۹	(۲۴)
اینتگرون کلاس ۳	**IntegronIII**	**F:GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG** **R:ACGGATCTGCCAAACCTGAC**	۹۷۹	۵۹	(۲۵)

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها:

آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی بر روی نمونه‌های بالینی جدا شده انجام گرفت. نمونه‌هایی با توانایی تخمیر گلوکز، عدم استفاده از لاکتوز و سوکروز، تولید H_2S، ایندول و VP منفی، MR و سیترات مثبت، لایزین و اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت و توانایی حرکت به عنوان *سالمونلا* شناسایی و برای روش مولکولی و انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۱). از مجموع ۸۹۱ نمونه، ۴۸ سویه به عنوان *سالمونلا تیفی موریوم* شناخته شدند.



تصویر شماره ۱: نتایج حاصل از PCR به منظور تشخیص *سالمونلا تیفی موریوم*

ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۳: جدایه بالینی؛ مارکر مولکولی 100 bp DNA با اندازه قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز استفاده شده است.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده بر اساس جدول CLSI بررسی گردید. اطلاعات مربوط به جدایه های فاقد اینتگرون و جدایه های واجد اینتگرون با یکدیگر مقایسه شد و ارتباط وجود اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی مورد مقایسه قرار گرفت. مقاومت به کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، آمپی‌سیلین، کوآموکسی کلاو و تری متوپریم در جدایه های واجد اینتگرون و فاقد اینتگرون با هم متفاوت بوده و دارای اختلاف معنی داری ($P<۰/۰۵$) می‌باشند (جدول شماره ۲).

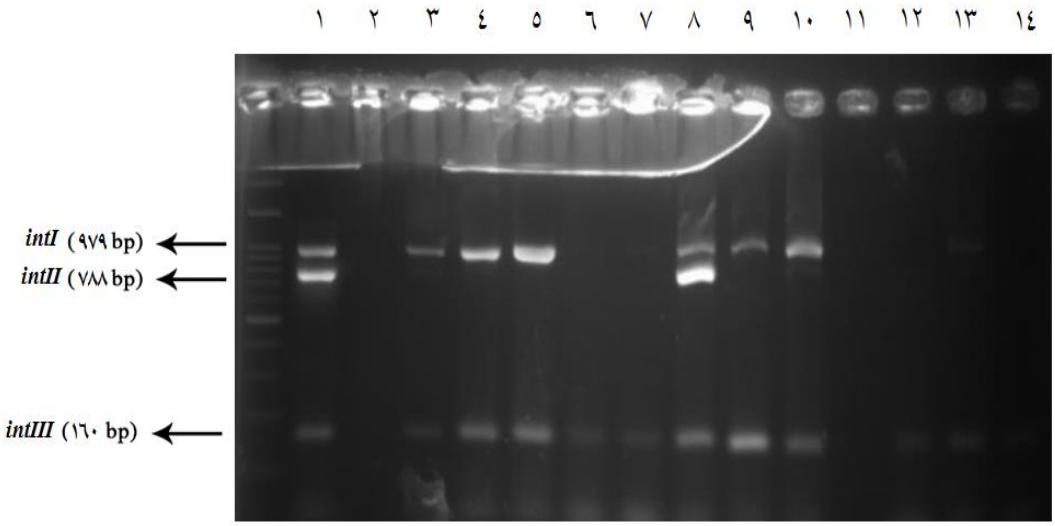
www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های فاقد و واجد اینتگرون

آنتی بیوتیک	جدایه واجد اینتگرون			جدایه فاقد اینتگرون		
	حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم
سیپروفلوکساسین	۹۱/٦	۰	۸/٤	۹۲	۰	۸
جنتامایسین	٦۰/٤۱	۱۸/۷٦	۲۰/۸۳	۷٦	۱۲	۱۲
نالیدیکسیک اسید	۱۸/۷۵	٦/۲۵	۷۵	۹۲	۰	۸
کلرامفنیکل	۷۷/۰۵	۱۰/٤۵	۱۲/۵	۹٦	۰	٤
سفوتاکسیم	۹۳/۷۵	۰	٦/۲۵	۹٦	۰	٤
تتراسیکلین	۲/۰۸	۲/۰۸	۹۵/۸٤	٤٤	۳۲	۲٤
آمپی سیلین	۵٦/۲۵	۸/۳٤	۳۵/٤۱	۹٦	۲	۲
کوآموکسی کلاو	۵۰	۱٤/۵۹	۳۵/٤۱	۸۰	۱٦	٤
سفتریاکسون	۸۵/٤	٤/۱۹	۱۰/٤۱	۸٤	۸	۸
تری متوپریم	۵٦/۲۵	۸/۳٤	۳۵/٤۱	۷۲	۱۰	۸
ایمی پنم	۸۷/۵	۱۰/٤۲	۲/۰۸	۸۸	۸	٤

از ۴۸ سویه، ۴۶ سویه (۹۵/۸٪) برای ژن *intI* که ژن مربوط به اینتگرون کلاس ۱ می‌باشد مثبت بودند، ۲ سویه (۴/۱٪) برای ژن *intII* که ژن مربوط به اینتگرون کلاس ۲ می‌باشد مثبت بودند، ۱۸ سویه (۳۷/۵٪) برای ژن *intIII* که ژن مربوط به اینتگرون کلاس ۳ می‌باشد مثبت بودند (تصویر شماره ۲ و جدول شماره ۳). جزئیات مربوط به شیوع ژن‌های کلاس اینتگرون در جدول شماره ۳ آورده شده است.



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از multiplex PCR به منظور شناسایی کلاس ها اینتگرون

ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۳ الی ۱٤ مربوط به جدایه های بالینی.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳: درصد فراوانی ژن های اینتگرون کلاس ۱،۲ و ۳

باکتری	*سالمونلا تیفی موریوم*
تعداد کل	٤٨
ژن ***intI***	٤٦(٪٩٥/٨)
ژن ***intII***	٢(٪٤/١)
ژن ***intIII***	١٨(٪٣٧/٥)
ژن ***intI+II***	٠(٪٠)
ژن ***intI+II+III***	٢(٪٤/١)
ژن ***intII+III***	٠(٪٠)
ژن ***intI+III***	١٨(٪٣٧/٥)

بحث:

بیماری منتقل شونده از راه غذا که به وسیله *سالمونلا*های غیر تیفوئیدی ایجاد می‌شود، مشکلی عمده در سلامت عمومی در جهان است (۲). ظهور سویه های واجد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت حاصل از این باکتری در انسان و حیوانات شده است (۱۶،۲). افزایش میزان عفونت با *سالمونلای* مقاوم در برابر داروهای ضد میکروبی نیازمند توجه ویژه ای است (۱۷).

با توجه به اینکه اینتگرون ها واجد چندین کاست ژنی مقاومتی هستند و توسط عناصر ژنتیکی متحرک نیز حمل می‌شوند، می‌توانند منجر به انتشار گسترده مقاومت از یک سویه به سویه دیگر شوند.

در پژوهش‌های متعددی از نقش عناصر ژنتیکی مرتبط با حدت و مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در مورد عفونت‌های تهاجمی *سالمونلا*، گزارش شده است (۱۸،۱۴). بسیاری از ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در *سالمونلا* در عناصر یا اجزاء ژنتیکی متحرک به خصوص اینتگرون های کلاس ۱ شناسایی شده است که غالب ترین نوع اینتگرون در بین *سالمونلا*های دارای مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی می باشد (۱۹،۱۴). اینتگرون های کلاس ۱ رایج ترین نوع اینتگرون های یافت شده در جدایه های بالینی *سالمونلا انتریکا* می‌باشند (۲۰). شیوع کلاس های مختلف اینتگرون در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات دیگران تفاوت‌هایی را نشان می دهد. در پژوهشی که سلیمیان و همکاران بر روی نمونه‌های بالینی *سالمونلا* در تهران انجام دادند، از ۱۱۰ سویه ۳۶ (۳۲٪) سویه دارای اینتگرون های کلاس ۱ و یا ۲ بودند و فاقد اینتگرون کلاس ۳ بودند (۲۱). در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران بر روی ۲۳ *سالمونلا* جدا شده از انسان انجام گردید، مشخص شد ۱۷/۳٪ جدایه ها دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۲۲). در مطالعه انجام شده توسط Rodriguez و همکاران بر روی ۸۳۴ *سالمونلای* جدا شده از انسان مشخص گردید که ۱۳٪ از آن ها دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۲۳). در بررسی انجام شده توسط Lindstedt و همکاران از ۹۰ *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از انسان، ۲۲/۲٪ واجد اینتگرون کلاس ۱ بودند (۲۴). در مطالعات دیگر، توسط فیروزه و همکاران، ۴۱/۶٪ 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 چندگانه دارویی را نشان دادند (۲۵،۲۰). 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 زمینه‌های مختلف و گسترش عوامل مقاومت است.تفاوت‌های زیادی در شیوع ژن‌های اینتگرون در مطالعات مختلف مشاهده می‌شود. اصغرپور و همکاران نشان دادند که در ۳۷٪ از سویه های *سالمونلای* جدا شده، اینتگرون ۱ وجود دارد و این سویه ها به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و استرپتومایسین مقاوم بوده اند (۲۶). نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق اصغرپور و همکاران در خصوص آنتی

www.SID.ir

Archive of SID

بیوتیک، نالیدیکسیک اسید و تتراسیکلین مطابقت داشته است. با این حال شیوع اینتگرون ۱ در تحقیق حاضر نسبت به تحقیق ذکر شده نزدیک به ۳ برابر بوده است. در تحقیق انجام شده در کشور ژاپن نیز مشخص گردید که شیوع اینتگرون ۱ در سویه های *سالمونلا* با بروز مقاومت به تتراسایکلین همراه بوده که با نتایج تحقیق حاضر تطابق دارد (۲۷).

از آنجا که مقاومت به کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، آمپی‌سیلین، کوآموکسی کلاو و تری متوپریم در جدایه های واجد اینتگرون و فاقد اینتگرون با هم متفاوت بوده و دارای اختلاف معنی‌داری بود، می توان نتیجه گرفت که احتمالاً وجود اینتگرون و ژن‌های کد شده توسط آن ها با بروز مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها در ارتباط است. رنجبر و همکاران نشان دادند که بروز مقاومت به کانامایسین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، داکسی سیکلین و نئومایسین در جدایه ها با وجود اینتگرون کلاس ۱ می‌تواند مرتبط باشد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج به دست آمده در مطالعه رنجبر و همکاران در خصوص ارتباط اینتگرون و بروز مقاومت آنتی بیوتیکی همخوانی دارد (۲۸).

در مطالعه حاضر شاهد شیوع بالای کلاس های ۱ و ۳ اینتگرون در مقایسه با مطالعات دیگران بودیم که احتمالاً به دلیل تفاوت در رعایت بهداشت و در بین جمعیت‌های انسانی و یا حیوانی در کشورهای مختلف و همچنین مناطق مختلف یک کشور باشد. همچنین احتمالاً می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان استفاده از آنتی بیوتیک در درمان انسان و حیوان در مناطق مختلف باشد.

استفاده از آنتی بیوتیک های خاص به مدت طولانی، ممکن است به انتخاب اینتگرون های حامل عناصر ژنتیکی کمک کند. بالا رفتن شیوع کلاس های مختلف اینتگرون می‌تواند یک زنگ خطر جدی در جامعه بهداشتی ما باشد؛ بنابراین شناسایی و غربالگری اینتگرون ها برای جلوگیری از به وجود آمدن سویه های دارای مقاومت چندگانه دارویی لازم و ضروری می باشد.

نتیجه گیری:

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 می‌باشد و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر آن ها ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) به دلیل حمایت‌های خود در اجرای این طرح سپاسگزاری می گردد.

منابع:

1. 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; 63(6): 417-21.
2. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Front Life Sci. 2015; 8(3): 284-93.
3. Finn S, Condell O, McClure P, Amezquita A, Fanning S. Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. Front Microbiol. 2013; 4: 331.
4. Gruzdev N, McClelland M, Porwollik S, Ofaim S, Pinto R, Saldinger-Sela S. Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(22): 7866-75.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Finn S, Handler K, Condell O, Colgan A, Cooney S, McClure P, et al. ProP is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells on a stainless steel surface. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(14): 4376-84.
6. Crump JA, Sjolund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive salmonella infections. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(4): 901-37.
7. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26(2): 141-8.
8. Dimitrov T, Udo EE, Albaksami O, Kilani AA, Shehab el DM. Ciprofloxacin treatment failure in a case of typhoid fever caused by *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A with reduced susceptibility to ciprofloxacin. J Med Microbiol. 2007; 56(Pt 2): 277-9.
9. Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Angulo FJ. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(1): 195-7.
10. Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. Ann N Y Acad Sci. 2017; 1388(1): 92-107.
11. Gillings MR. Integrons: Past, present, and future. Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78(2): 257-77.
12. 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; 187(2): 251-9.
13. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(4): 272-88.
14. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015; 14: 45.
15. 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; 41(6): 2372–7.
16. Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in Salmonella chromosome and plasmids. Microbes Infect. 2006; 8(7): 1923-30.
17. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev. 2002; 26(2): 141-8.
18. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella? FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 43(1): 1-11.
19. Chuanchuen R, Ajariyakhajorn K, Koowatananukul C, Wannaprasat W, Khemtong S, Samngamnim S. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from dairy cows. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(1): 63-9.
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; 64(2): 237-43.
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; 3(1): 44-9.
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.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Rodriguez I, Rodicio MR, Guerra B, Hopkins KL. Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Emerg Infect Dis. 2012; 18(7): 1173-6.
24. Lindstedt BA, Heir E, Nygard 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; 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; 3(3): 112–7. [Persian]
26. Asgharpour F, Rajabnia R, Ferdosi Shahandashti E, Marashi MA, Khalilian M, Moulana Z. Investigation of class I integron in *Salmonella infantis* and its association with drug resistance. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(5): e10019.
27. Dahshan H, Chuma T, Shahada F, Akiba M, Fujimoto H, Akasaka K, et al. Characterization of antibiotic resistance and the emergence of AmpC-producing *Salmonella Infantis* from pigs. J Vet Med Sci. 2010; 72(11): 1437-42.
28. Nagachinta S, Chen J. Transfer of class 1 integron-mediated antibiotic resistance genes from shiga toxin-producing Escherichia coli to a susceptible E. coli K-12 strain in storm water and bovine feces. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(16): 5063-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(5): 80-90.

Original article

Study of integrons class 1, 2, and 3 frequencies in *Salmonella Typhimurium* isolated from clinical samples using polymerase chain reaction

Moghadam A[1], Nazarian S[2*], Olad GR[3]
[1]Biology Dept., University of Tehran, Tehran, I.R. Iran; [2]Biology Dept., Biology, University of Imam Hossain, Tehran, I.R. Iran; [3]Molecular Biotechnology, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Received: 29/Jan/2017 Accepted: 2/Oct/2017

Background and aims: Presence of integrons class 1, 2, and 3 in *Salmonella typhimurium* with multidrug resistance have been raised concerns about the integrons' frequencies in clinic. Regarding different drug resistant genes are located in integrons and on the other hand, integrons are able to spread rapidly, so that identification of isolates carrying integrons could provide useful information about the degree of resistance. The gaim of this study was the molecular analysis of integrons class 1, 2 and 3 as important integron classes in *Salmonella typhimurium* strains which are isolated from patients by using multiplex PCR.
Methods: In this study, 891 samples are collected from patients with acute gastroenteritis and then *Salmonella typhimurium* strains were detected by using standard biochemical test and PCR in culture method. Antimicrobial susceptibility test was done on Müller-Hinton agar media according to the Clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. After DNA extraction, the presence of integrons class 1, 2, and 3 were analyzed by multiplex PCR.
Results: Out of 891 samples, 48 strains detected as a *Salmonella typhimurium*. Out of these 48 strains, 46 strains (95.8%) had the *intI* gene, 2 strains (4.1%) had the *intII* gene, and 18 strains (37.5%) had the *intIII* gene. Antimicrobial susceptibility test showed that the most antibiotic resistance pattern was observed to cefotaxime. Strians with integrin genes had resistance to Gentamicin, Ampicillin,Tetracycline,Co-amoxiclave and Trimethoprim antibiotics.
Conclusion: In this study, we observed the high incidence of integrons class 1, 2, and 3 in comparison to previous studies which were presumably due to differences in hygiene and also overuse of antibiotics. Carrying out appropriate methods for controlling infection and treatment in studied health centers are essential for preventing the further spread of multi drug resistant *Salmonella typhimurium*.

***Keywords: Salmonella typhimurium*, Drug resistance, Integron.**

Cite this article as: Moghadam A, Nazarian S, Olad GR. Study of integrons class 1, 2, and 3 frequencies in *Salmonella Typhimurium* isolated from clinical samples using polymerase chain reaction. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(5): 80-90.

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept., University of Imam Hossain, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177104934, E-mail: kpnazari@ihu.ac.ir

www.SID.ir