Archive of SID

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 64, No.1 P: 2340-2352
Jun-Mar 2018

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۴، شماره ۱
فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ، صفحه ۲۳۵۲ -۲۳۴۰

مقاله اصلی

بررسی مولکولی ژن های مقاومت تتراسایکلین در باکتری *شیگلا سونئی* جدا شده از نمونه بالینی و اثر عصاره علف چشمه (*Nasturtium officinal*) بر بیان ژن مقاومت به روش Real time- PCR

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۱۲- تاریخ پذیرش:۹۹/۰۳/۳۱

شکوفه احمد زاده [۱]
منصور بیات [۲*]
کیومرث امینی [۳]

[۱]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران،ایران
[۳] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

Email:
dr_mansour_bayat@yahoo.com

خلاصه

مقدمه: شیگلا (*Shigella*) باسیل گرم منفی روده ای که عفونتهای ناشی از آن مشکلات جدی را در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه ایجاد کرده است. شیوع عفونتهای ناشی از شیگلا به دلیل دوز پایین بیماریزایی این باکتری و همچنین انتقال آسان آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده بسیار آسان است. جداسازی شیگلا *سونئی* از مدفوع کودکان, تاثیر و جداسازی عصاره گیاه علف چشمه, جدا سازی مولکولی ژن های تتراسایکلین با روش مالتی پلکس PCR و تاثیر عصاره بر بیان ژن مقاومت تتراسایکلین باروش مالتی پلکس PCR است.

روش کار: از تعداد ۶۰ سوش ***شیگلا سونئی*** جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال پس از ایزولاسیون سویه ها بر روی محیط های افتراقی و محیط کشت MacConkey Agar (MAC) از نظر شکل و رنگ کلنی ها بررسی و ثبت شد. ابتدا DNA ی هر یک از نمونه ها توسط کیت استخراج DNA استخراج شد و پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش PCR اقدام شد. برای بررسی اثر مقاومت آنتی بیوتیکی **گیاه علف چشمه** نسبت به ژن استخراج شده مقاوم به داروی تتراسایکلین، MIC عصاره گیاه بر روی غلظت های مختلف باکتری **شیگلا سونئی** بررسی شد. از سویه هایی که واجد ژن های مقاوم به تتراسیکلین می باشند با در نظر گرفتن MIC، با استفاده دو گروه تیمار و غیر تیمار، پس از انکوباسیون ۱۸ ساعته lag log stationary با استفاده از کیت استخراج RNA x plus استخراج RNA انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه RT-PCR ABI plus میزان بیان ژن *tet A* و *tet B* در دو گروه تیمار و غیرتیمار تحت تاثیر عصاره گیاه **علف چشمه** بصورت کمی (عددی) CT خوانده شد و بیان ژن تحت تاثیر تیمار، تفسیر گردید.

نتایج: نتایج ایزوله ***شیگلا سونئی*** درصد بالایی از بیشترین مقاومت به استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آمپی سیلین و کلرامفنیکل با ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۸۶/۷٪ و ۹۱/۸٪ ٪ و ۵۰ ٪ مشاهده شد. هم چنین بیشترین حساسیت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین با ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ مشاهده شد. نتایج PCR چند گانه نشان داد که، از تمامی ۶۰ ایزوله *شیگلا سونئی* ، ۳ ایزوله فقط دارای ژن *tetB* (۵٪)، ۵۵ ایزوله دارای ژن *tetA* (۹۱٪/۶)، بودند. نتایج حاصل از آزمون فیشر حاکی از آنست که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای *tetA* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته است(p-value <۰/۰۵). نتایج حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای *tetB* با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود نداشته است(p-value = ۰/۰۵). نتایج حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای مثبت و منفی کلیه ژنها با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود نداشته است(p-value <۰/۰۵).

نتیجه گیری: در نتیجه آنکه مقاومت چندگانه در ایزوله های شیگلا به اکثر آنتی بیوتیک ها از جمله تتراسایکلین، کرامفنیکل، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و فلوروکینولون ها و هم چنین سفالوسپورین های نسل سوم در نقاط مختلف جهان رو به افزایش است. پارامتر Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می باشد. میزان Fold Change برای ژن *tetA* برابر ۱/۲۱- که نشان می دهد این ژن در گروه تیمار شده با عصاره گیاه علف چشمه نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۲۱برابر کاهش یافته است.

کلمات کلیدی: درمان پاسخ محور، درمان ذهن خوانی، مهارت اجتماعی، اوتیسم

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتری *شیگلا سونئی* اولین بار توسط میکروب‌شناس ژاپنی به نام کیوشی شیگا در سال ۱۸۹۸ کشف شد. مطالعات فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که شیگلا، زیرگونه‌ای از اشرشیاکلی است. پس از تهاجم به روده، باکتری در سلول‌های روده تکثیر پیدا می‌کند و موجب آسیب به بافت روده می‌شود. شیگلاها، باسیل‌های گرم منفی و غیر متحرکی هستند که قرابت نزدیکی با اشرشیاکلی و سالمونلا دارند (۱). نوزادان و کودکان نوپا ، افراد مسن ، مسافر و افراد بیمار مستعد ابتلا به شدیدترین علائم بیماری S. sonnei هستند. شیگلوزیس معمولاً توسط افراد مبتلا به سندرم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) و مجموعه مرتبط با ایدز و همچنین مردان همجنسگرا غیر ایدز رنج می برد. Shigellosis همچنین می تواند از طریق مبتلایان به HIV که قبلاً دچار شیگلوز شدیدتر و طولانی تر شده اند ، منتقل شود ، از جمله انتشار این عفونت در خون ، که می تواند برای فرد، تهدید کننده زندگی باشد(۲).

مقاومت به تتراسایکلین توسط ژنهای tet کنترل میشود که در جریان فعال دارو ، محافظت از ریبوزوم یا اصلاح داروی آنزیمی نقش دارند. در بین ژنهای مختلف *tet*، *tet (A)*، *tet (B)*، *tet (D)*، *tet (E)* و *tet (G)* در باکتری های گرم منفی گزارش شده است(۳) مقاومت به تتراسایکلین می تواند ناشی از تولید پروتئینی باشد که با ریبوزوم ارتباط برقرار می کند، بطوریکه سنتز پروتئین از حضور آنتی بیوتیک بی تاثیر است. تا به امروز ، شش کلاس از عوامل تعیین کننده Tet که مقاومت به تتراسایکلین را در سطح سنتز پروتئین ارائه می دهند، شناسایی شدند(۴).

پروتئین های Repressor Tet پروتئین هایی هستند که نقش مهمی در ارائه مقاومت آنتی بیوتیکی به دسته های زیادی از گونه های باکتریایی ایفا می کنند. تتراسایکلین (TC) خانواده گسترده ای از آنتی بیوتیک ها است که باکتری ها در برابر آنها مقاوم شده اند. TC معمولاً با اتصال به ریبوزوم باکتری و متوقف کردن سنتز پروتئین ، باکتری ها را از بین می برد. بیان ژنهای مقاومت TC توسط سرکوبگر tetR تنظیم می شود. tetR سرکوب کننده بیان tetA ، پروتئین غشایی است که باعث می شود مواد سمی برای باکتری ها مانند TC ، با اتصال عملگر tetA ، خارج شود(۵).

در باکتریهای مقاوم در برابر TC، tetA قبل از اتصال به ریبوزوم ، ازTC خارج می شود، زیرا عمل سرکوبگر TetR روی TetA با اتصال TC به TetR متوقف می شود. ژن tetA همچنین در وکتور کلونینگ E. coli پرکاربرد pBR322 وجود دارد که در آن اغلب با نام فنوتیپ مقاومت به تتراسایکلین ، tetR مورد استفاده قرار می گیرد تا با TetR اشتباه نشود(۶) پروتئین مقاومت در برابر تتراسایکلین Tet (A) یک پروتئین جریان تتراسایکلین است که به عنوان یک ماده ضد فلزی تتراسایکلین / H + عمل می کند(۸, ۷).

گیاه چشمه آب با نام علمی *Nasturtium officinale* گیاهی از تیره شب‌بوها به ارتفاع ۱۰ تا ۶۰ سانتی‌متر با برگ‌های کوچک به رنگ سبز تیره و گل‌های خوشه‌ای کوچک سفید و ساقه‌های خزنده است که از نقاط مختلف آن ریشه‌های کوچک و سفید خارج می‌شود و معمولاً در کنار جوی‌ها و باتلاق‌ها می‌روید. این گیاه مقدار قابل توجهی آهن، کلسیم و اسید فولیک و کمی هم ویتامین‌های ث و آ دارد. آهن قابل جذب گیاه چشمه آب از اسفناج هم بیشتر است و به همین جهت می‌تواند در بهبود کم‌خونی مؤثر باشد. کلسیم گیاه چشمه آب نیز بیشتر از شیر و ویتامین ث آن از پرتقال بیشتر است(۹).

در قرون ۱۶ و ۱۷ برای علف چشمه اثر مدر و اشتها آور قایل بودند. از اواخر قرن نوزدهم، از علف چشمه به عنوان تصفیه کننده خون، رفع بیماری های ریه، سل، بیماری های معدی، زردی و غیره استفاده به عمل می آمد. گیاه علف چشمه دارای اثر اشتهاآوری است و بعنوان محرک اشتها و تقویت کننده عمل هضم می باشد. افزودن پودر خشک گیاه علف چشمه که حاوی کاروتنوئید لوتئین در حدود ۱۰۷/۱۳۰ میلی گرم و فلاونوئید کوئرستین ۸۲ میلی گرم می باشد، دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است که قادرند دستگاه گوارش را تبدیل به محیطی مناسب برای جذب مواد مغذی هضم شده مورد نیاز

www.SID.ir

Archive of SID

برای رشد کند. کوئرستین سبب بهبود ضریب تبدیل مواد غذایی می گردد(۱۰).

کوئرستین سبب افزایش تحریک ماکروفاژها و لنفوسیتهای B و افزایش بیان اینترفرون گاما می گردد. لوتئین از طریق بهبود عملکرد سلولهای T کمکی نوع ۲ و تولید سایتوکین ها سبب افزایش پاسخ لنفوسیتهای B به تحریک آنتی ژن و تولید آنتی بادی در پاسخ به آنتی ژنهای وابسته به لنفوسیتهای T می شود. بنابراین مصرف پودرخشک علف چشمه به دلیل داشتن آنتی اکسیدانها به خصوص فلاوونوئید کوئرستین و کاروتنوئید لوتئین سبب بهبود پاسخ های ایمنی هومورال می شود. مشخص شده است که کوئرستین بطور معنی داری سبب بیان تولید اینترفرون گامای مشتق شده از T کمکی نوع ۱ و نوع ۲ را تحریک می کند. از طرفی کوئرستین در شرایط آزمایشگاهی تولید اینترلوکین ۲ (IL-2)، فاکتور نکروز کننده تومور – آلفا و اینترلوکین-۱ بتا را در سلولهای تک هسته ای افزایش می‌دهد و در نتیجه سبب افزایش پاسخ به فیتوهماگلوتینین P می‌شود(۱۱).

روش کار

روش تحقیقی مورد استفاده از نوع تحقیق بنیادی بوده و به صورت پژوهشی – تحقیقی ارائه و غیر مروری می باشد. در این مطالعه از تعداد ۶۰ نمونه مورد بررسی *شیگلا سونئی* جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال طی آزمایش و تشخیص پزشک کودکان که اسهال آنها حاوی شیگلا سونئی بود نمونه جمع آوری شد.

استخراج DNA : ابتدا DNA ی هر یک از نمونه ها توسط کیت ستونی استخراج DNA شرکت سینا کلون جداسازی نموده پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش PCR اقدام شد. پس از اطمینان از تکثیر محصول PCR و تشکیل باندهای اختصاصی، نتایج پردازش شد(۱).

آزمون Multiplex PCR و جداسازی هم زمان ژن های مقاومت به تتراسایکلین *tet (A)* و *tet(B)* : برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ژنوم باکتری به روش Boiling استخراج می شود. به منظور تکثیر ژن های *tet(A)* و *tet(B)* در طی فرآیند PCR با استفاده از دو جفت پرایمر یونیورسال، به جهت اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه این پرایمرها از برنامه BLASTدر NCBI استفاده می شود. پرایمر جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد(۱۲).

برنامه دمایی زمانی برای انجام آزمون PCRعبارتند از: دمای دناتوراسیون اولیه: ۹۵ درجه سلسیوس، به مدت ۱۰دقیقه، دمای دناتوراسیون ثانویه، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، و دمای اتصال ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و دمای بازآرایی ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه. این آزمون در۴۵ چرخه انجام شد و هر آزمون ۳ بار تکرار شد(۱۳).

جدول ۲. برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل *PCR*

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۶۰۰	–
واسرشت	۹۵	۳۰	–
اتصال	۶۲	۶۰	–
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۴۵

جدول ۳. پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه (۱۴)

ژن	توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمر ('۳به'۵)	اندازه
tet(A)	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	۲۱۰
tet(B)	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	۱۴۷

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین سوسپانسیون میکروبی *شیگلا سونئی* معادل نیم مک فارلند: هدف از تهیه نیم مک فارلند، جهت استاندارد کردن تلقیح برای آزمایشات میکروبی باید از استاندارد سولفات باریوم برابر با استاندارد نیم مک فارلند استفاده گردد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت ۲۴ ساعته از باکتری ها می باشد. بنابراین ۲۴ قبل از انجام آزمایش از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار آگار مغذی تلقیح می گردد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس سطح محیط کشت با محلول سالین شسته و سوسپانسیون در طول موج ۵۳۰ نانومتر با میزان جذب محلول نیم مک فارلند تهیه گردید. به عبارت دیگر سیوسپانسون تولیدی بایستی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باشد(۱۵).

تهیه گیاه چشمه آب و عصاره گیری: برای این تحقیق برگ و گل علف چشمه در اوایل فصل بهار از مناطق ییلاقی اطراف تهران جمع آوری شد. ابتدا برای خشک شدن در محیط سایه و دمای ۲۵ درجه پهن شده و سپس آسیاب گردیده و با روش خیساندن در حلال یا ماسراسیون مورد عصاره گیری قرار گرفت.

تعیین MIC گیاه چشمه آب و تیمار *شیگلا سونئی* توسط آن : برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده برای عصاره چشمه آب رقت سازی انجام گرفت. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته سویه مورد نظر پنج کلنی توسط آنس استریل در نزدیکی شعله برداشته و به داخل لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل برده و سپس داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت غلظت اولین لوله ای که فاقد کدورت بود به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده منظور می گردد. در ادامه برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گیاه چشمه آب نسبت به ژن استخراج شده مقاوم به داروی تتراسایکلین ، MIC عصاره گیاه نام برده بر روی غلظت های مختلف باکتری *شیگلا سونئی* بررسی می شود(۱۶).

Real-Time PCR

از سویه هایی که واجد ژن های مقاوم به تتراسیکلین بودند با در نظر گرفتن MIC، با استفاده دو گروه تیمار و غیر تیمار، پس از انکوباسیون ۱۸ ساعته stationary lag log با استفاده از کیت استخراج RNA x plus استخراج RNA انجام و سپس با دستگاه اسپکتروفتومتری جذب نوری و گرفتن OD و اطمینان از حضور RNA، در ادامه با استفاده از کیت cDNA طبق پروتکل، DNA مکمل از RNA ساخته می شود .سپس با استفاده از دستگاه RT-PCR ABI plus میزان بیان ژن tet A و tet B در دو گروه تیمار و غیرتیمار تحت تاثیر عصاره گیاه چشمه آب بصورت کمی (عددی) CT خوانده شده، اعداد وارد فرمول و بیان ژن تحت تاثیر تیمار تفسیر می گردد(۱۷).

تجزیه و تحلیل داده ها

اطلاعات در نرم افزار SPSS version ۲۱ وارد شده و جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آماری Mann whitney U test و نیز آنالیز واریانس (ANOVA) با Tukey's multiple comparison test استفاده شد. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف از معیار Mean ± standard deviation (SD) نشان داده شد و سطح معنی داری نیز $P \geq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری ها

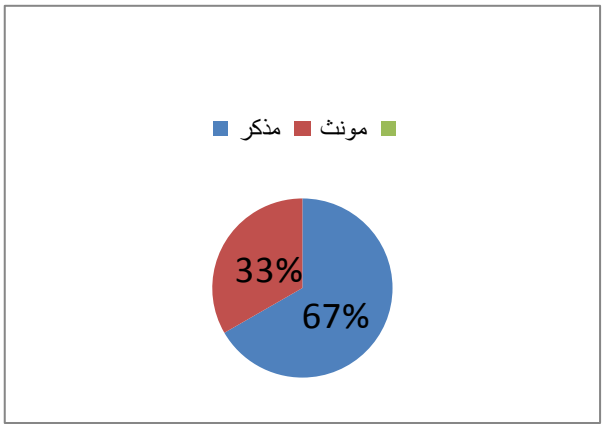
از بین ۳۰۰ نمونه شامل ۱۶۵ نمونه از کودکان پسردارای اسهال (مشکوک به شیگلا ۴۰ ایزوله) و ۱۳۵ نمونه از کودکان دختر دارای اسهال (مشکوک به شیگلا ۲۰ ایزوله) از نمونه های مدفوع اسهالی بستری در بیمارستان مرکز طبی کودکان در

www.SID.ir

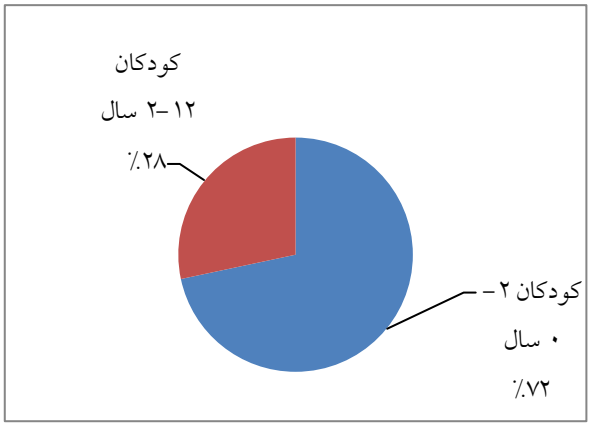
Archive of SID

تهران جمع آوری شدند. به عبارتی شیوع شیگلا از ۶۰ ایزوله طبق مطالعه ما در ایران(بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران) ۵/۱۶ درصد می باشد. ۴۳ ایزوله مربوط به کودکان در محدوده سنی بین یک تا ۲ سال و ۱۷ ایزوله مربوط به کودکان ۲ تا ۱۲ سال بودند.

نمونه ها کشت داده شدند و کلنی های مشکوک با آزمایشات باکتری شناسی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس برای تعیین گونه شیگلا *سونئی* از آنتی سرم های اختصاصی گونه ها استفاده شد. در مجموع ۶۰ ایزوله شیگلا *سونئی* شناسایی شد که در نمودار زیر گزارش گردیده است.



نمودار۱. درصد گونه های مختلف شیگلا *سونئی* جدا شده بر حسب جنسیت



نمودار۲. درصد گونه های مختلف شیگلا *سونئی* جدا شده بر حسب سن کودکان

نتایج تست آنتی بیوگرام

در این تحقیق، تست آنتی بیوگرام (تعیین حساسیت یا مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها) در مورد سویه های جداسازی شده بر اساس روش کربی بائر (Kirby-Bauer) انجام شد. آنتی بیوتیک های مورد بررسی شامل آمپی سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، تتراسایکلین، تری متوپریم – سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و جنتامایسین بود. نتایج آنتی بیوگرام به دست آمده در جدول ۱ گزارش شده است.

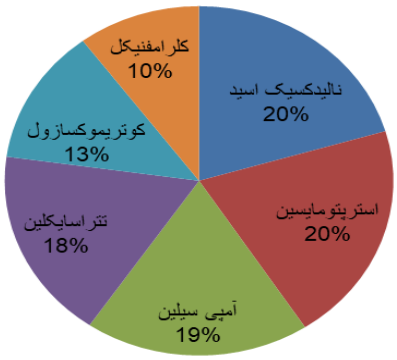
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نتایج به دست آمده آنتی بیوگرام مورد بررسی بر روی دیسکهای آنتی بیوتیکی

نتایج آنتی بیوگرام			
ماده ضد میکروبی	*شیگلا سونئی* (٪)		
	S	I	R
آمپی سیلین	٤ (٦/٦)	۱ (۱/٦)	٥٥ (۹۱/۸)
تتراسیکلین	٦ (۱۰)	۲ (۳/۳)	٥۲ (۸٦/۷)
تریمتوپریم-سولفامتوکسازول	۱۸ (۳۰)	٥ (۸/۳)	۳۷ (٦۱/۷)
استرپتومایسین	۰ (۰)	۰ (۰)	٦۰ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	۱٥ (۲٥)	٥ (۸/۳)	۳۰ (٥۰)
جنتامایسین	٥۱ (۸٥)	۹ (۱٥)	۰ (۰)
سیپروفلوکساسین	٥۲ (۸٦/٦)	۸ (۱۳/٤)	۰ (۰)
نالیدیکسیک اسید	۰	۰	٦۰ (۱۰۰)

همان طوری که در جدول۲مشاهده می شود، در مجموع ۶۰ ایزوله *شیگلا سونئی* درصد بالایی از بیشترین مقاومت به استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و آمپی سیلین و کلرامفنیکل با ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۸۶/۷٪ و ۹۱/۸٪ ٪ و ۵۰ ٪ قابل مشاهده است. هم چنین بیشترین حساسیت مربوط به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین با ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ مشاهده گردید.



نمودار۳. توزیع فراوانی آنتی بیوتیکهای مقاوم در نمونه های شیگلا سونئی جداسازی شده

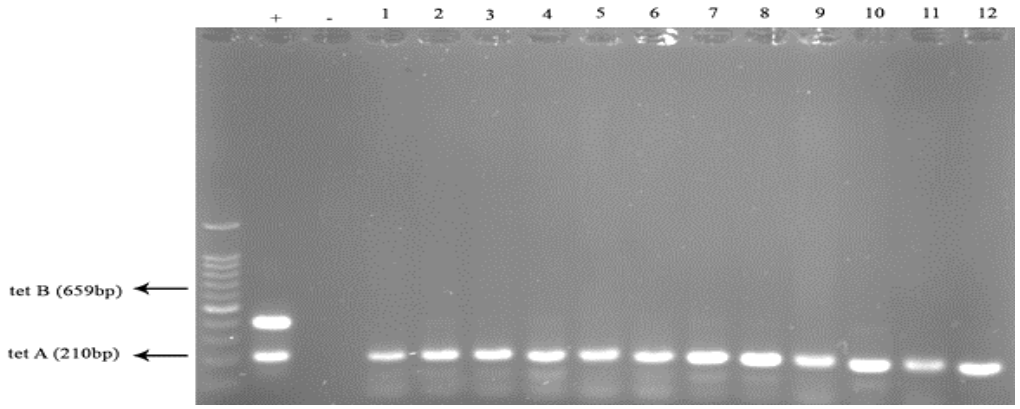
www.SID.ir

Archive of SID

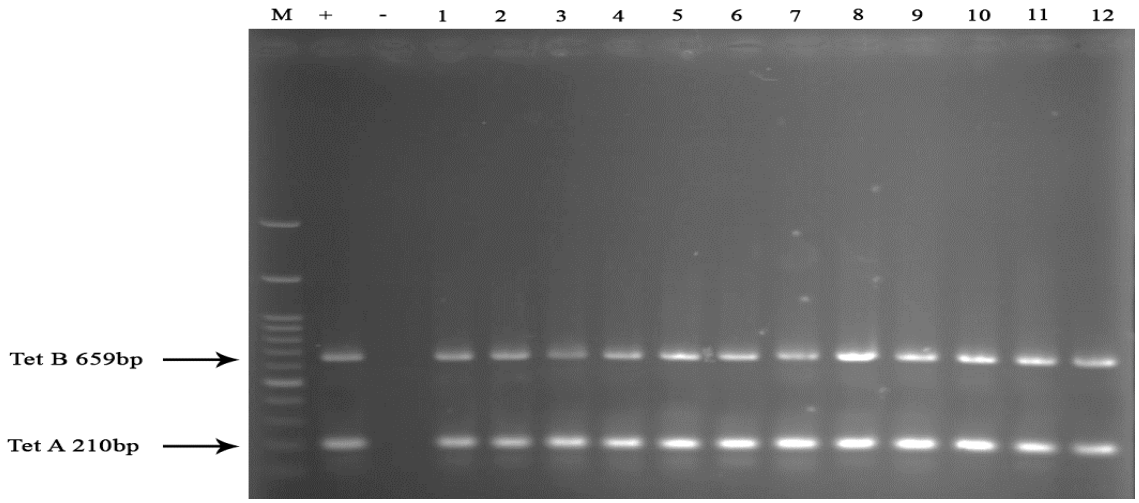
نتایج PCR چند گانه نشان داد که، از تمامی ۶۰ ایزوله *شیگلا سونئی* ، ۳ ایزوله فقط دارای ژن tetB (۵٪)، ۵۵ ایزوله دارای ژن tetA (۹۱٪/۶)، بودند.

جدول ۲. میزان فراوانی ژن‌های *tet* در میان ایزوله‌های *شیگلا سونئی*

ژن مقاومت به تتراسایکلین	تعداد (درصد) ایزوله‌های حاوی ژن	سایز محصول (bp)
tet A	۵۵ (۹۱/۶)	۲۱۰
tet B	۰	۶۵۹



شکل ۱. محصول PCR بر روی ژل آگاروز، به ترتیب از چپ به راست، نشانگر bp ۱۰۰ ، کنترل مثبت، کنترل منفی، کنترل PCR، ۱-۱۲ نمونه‌های *شیگلا سونئی* جداشده از نمونه‌های بالینی، چاهک شماره ۱۲-۱ واجد ژن *tetA* با طول باند bp ۲۱۰



شکل ۲. محصول PCR بر روی ژل آگاروز، به ترتیب از چپ به راست، نشانگر bp ۱۰۰ ، کنترل مثبت، کنترل منفی، کنترل PCR، ۱۳-۲۴ نمونه‌های *شیگلا سونئی* جداشده از نمونه‌های بالینی ، چاهک شماره ۱۳،۱۴، ۱۶-۱۸، ۲۰-۲۴ واجد ژن *tetA* با طول باند bp ۲۱۰ و چاهک شماره ۲۰واجد ژن *tetB*

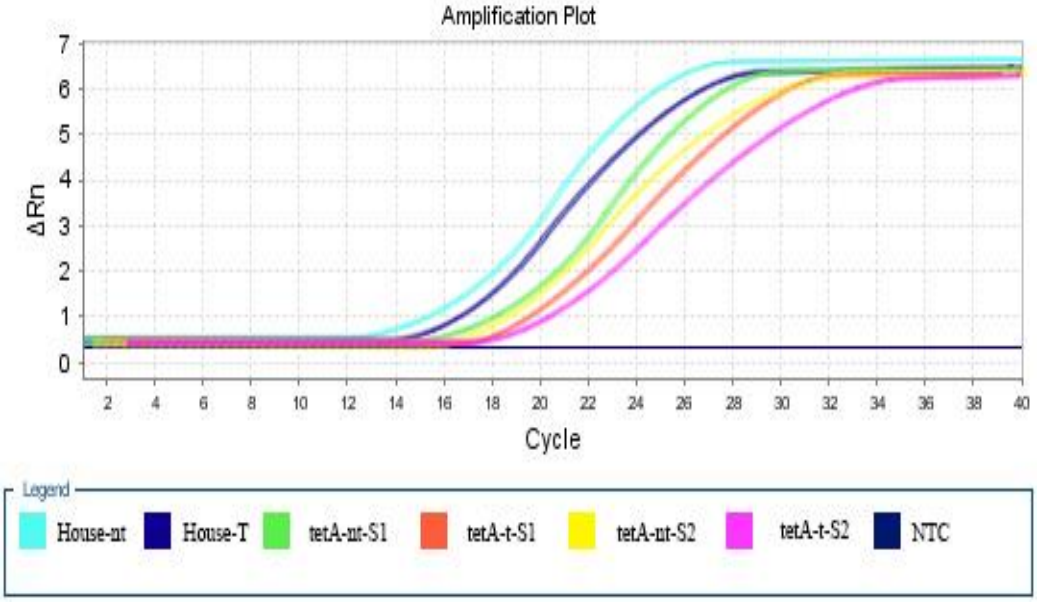
www.SID.ir

Archive of SID

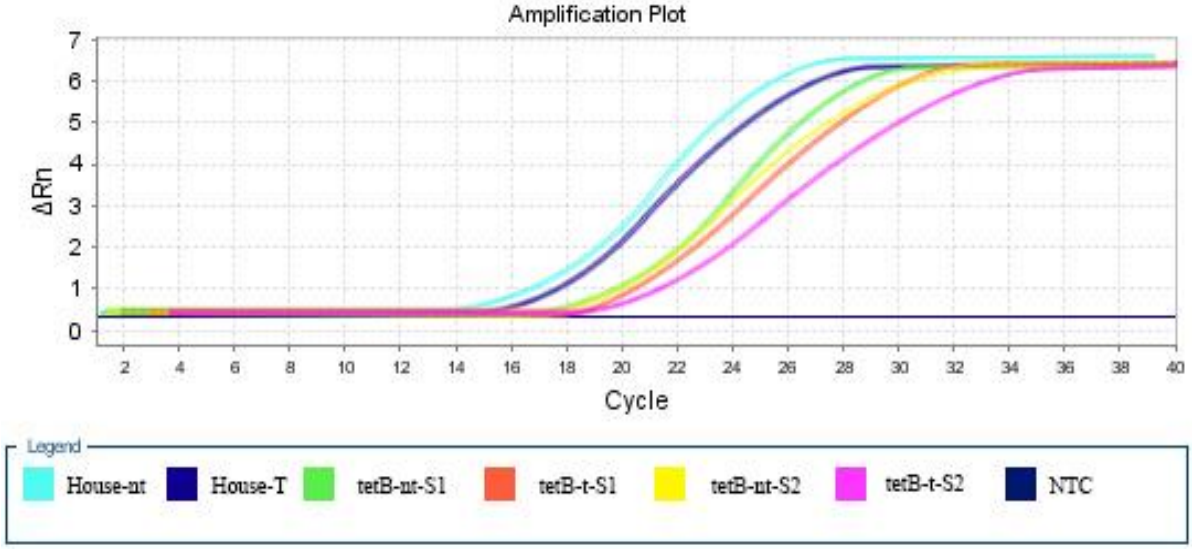
- نتایج حاصل از آزمون دقیق فیشر حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای *tetA* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته است (p-value <۰/۰۵).

- نتایج حاصل از آزمون دقیق فیشر حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای *tetB* با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود نداشته است (p-value =۰/۰۵).

- نتایج حاصل از آزمون دقیق فیشر حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ارتباط معناداری بین ژنهای مثبت و منفی کلیه ژنها با مقاومت به آانتی‌بیوتیک‌ها وجود نداشته است(p-۰/۰۵ value <).



شکل ۳. نتایج منحنی تکثیر Real Time PC ژن مربوط به تتراسایکلین *tetA*



شکل ٤. نتایج منحنی تکثیر Real Time PC ژن مربوط به تتراسایکلین *tetB*

www.SID.ir

Archive of SID

پارامتر Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می باشد. میزان Fold Changeبرای ژن *tetA* برابر ۱/۲۱- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۲۱برابر کاهش یافته است.

بحث

مصارف درمانی علف چشمه را به علت آن که سابقا بر اثر شباهت ظاهری برگ آن با بعضی از گیاهان مانند ترتیزک باتلاقی ها، خاکشیرها و ترتیزک جویباری ها، با آنها اشتباه می شد نمی توان در آثار قدما به طور مشخص پیدا نمود ولی آنچه که مسلم است آن است که سقراط مصرف آن را به عنوان خلط آور توصیه نموده بود و دیوسکوریدس (Dioscoride) در قرن اول میلادی، برای آن اثر مدر قائل بود. استفاده از قسمتهای مختلف گیاه، روش مصرف، موقعیت جغرافیایی محل رویش گیاه، شرایط رشد و زمان برداشت گیاه می تواند موجب تغییر در ترکیبات شیمیایی و فعالیت بیولوژیک آنها شود. نتایج تحقیق نشان داد که مصرف پودر خشک گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinale L*) سبب بهبود پاسخ های ایمنی اولیه و ثانویه هومورال می شود. فلاونوئید کوئرستین و کاروتنوئید لوتئین موجود در علف چشمه دارای اثر تقویت کننده پاسخ های سیستم ایمنی هستند. افزودن ۱٪ از عصاره علف چشمه در جیره غذایی ماهی قزل آلا سبب افزایش غلظت ایمونوگلبولین موجود در پلاسما و افزایش فعالیت سیستم کمپلمان می شود(۱۸).

در مطالعه انجام شده توسط Antoinette B. Hartman و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در خصوص توزیع تعیین کننده مقاومت به تتراسایکلین در جنس *Shigella* ، مجموعه ای از ۵۷۷ ایزوله بالینی از گونه *Shigella* از انواع مکان های جغرافیایی برای شناسایی گونه های مقاوم به تتراسایکلین که غربال شده بودند, به این نتیجه رسیدند که توزیع عوامل تعیین کننده مقاومت به تتراسایکلین و پروفایلهای مقاومت باعث گسترش کلونال و هم انتقال افقی در انتشار عوامل تعیین کننده مقاومت خاص تتراسایکلین در این جمعیت نقش داشته و استفاده از این پارامترها را به عنوان ابزاری اپیدمیولوژیک برای دنبال کردن انتقال نشان داده است(۱۹).

در سال ۲۰۰۷ M.P.A. Penatti و همکارانش پروفایل مقاومت به آنتی بیوتیک و ساختار کلونی ۶۰ گونه شیگلا (۳۰ S. flexneri و ۳۰ S. sonnei) جدا شده از موارد شیگلوز را در شهرهای مختلف در محدوده کلانشهر کامپیناس ، ایالت سائوپائولو ، برزیل را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بسیاری از گونه های S. flexneri و S. sonnei بسیار مقاوم بودند. سویه های S. flexneri در ۸۳,۳٪ موارد ، نسبت به آمپی سیلین مقاوم بودند ، کلرامفنیکل در ۷۰,۰٪ ، استرپتومایسین در ۸۶,۷٪ ، سولفامتوکسازول در ۸۰,۰٪ و تتراسایکلین در ۸۰,۰٪ ، و در عین حال تعداد کمتری از سویه ها به سفالوتین (۳,۳٪) و سولفاتریم (۱۰,۰٪). گونه های S. sonnei به طور عمده در برابر سولفامتوکسازول (۱۰۰,۰)) و تتراسایکلین (۹۶٪/۷) و ، تا حدی کمتر ، به آمپی سیلین (۶,۷٪) و استرپتومایسین (۲۶٪/۷) مقاوم بودند(۲۰).

در سال۲۰۰۹ Joan R. Davies و همکارانش بروز سویه های مقاوم به آنتی بیوتیکی S. Sonnei جدا شده در منطقه لندن را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که سویه ها از نظر قدرت انتقال مقاومت به بیشتر در برابر سولفونامید مقاوم بودند و این مقاومت قابل انتقال بود. اما مقاومت در برابر استرپتومایسین قابل حمل و کمتر متداول بود و اغلب با مقاومت تتراسایکلین همراه بود. نسبت سویه های مقاوم به تتراسایکلین در نوسان بود، اما این مقاومت همیشه منتقل می شود. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های دیگر بسیار نادر بود(۲۱).

در سال ۲۰۱۶ دکتر امینی و همکاران ژنهای مقاومت به تتراسایکلین در شیگلا سونئی جدا شده از کودکان با اسهال باکتریایی حاد با استفاده از روش Multiplex PCR ،شناسایی و الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی آنها را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ژن tetA ممکن است نقشی در فشار مقاومت تتراسایکلین ایفا کند. لذا به طور کلی ، نظارت مستمر برای جلوگیری از شیوع عناصر مقاومت آنتی بیوتیکی ضروری است(۱۴).

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه ای دیگر که در سال ۲۰۱۶ توسط شادی شاهسون و همکارانش روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به تتراسایکلین و آزیترومایسین در جدایه های شیگلا , تحقیق شد و به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت بازدارندگی برای تتراسایکلین و آزیترومایسین ۵۰ جدایه شیگلا ۱۶ درصد به عنوان شیگلا فلکسنری و ۸۴ درصد به عنوان شیگلا سونئی شناسایی شدند(۲۲).

در مطالعه ای مرتبط که در سال ۲۰۱۷ توسط نوبخت و همکارانش در مورد شناسایی مولکولی Shigella flexneri و Shigella sonnei در خصوص حساسیت ضد میکروبی طبق دستورالعمل های انستیتوی بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) در برابر مینوسیکلین ، تتراسایکلین ، داکسی سایکلین و ... انجام شد, نشان داد که مقاومت تتراسایکلین با واسطه جریان به تتراسایکلین در S. flexneri می تواند مربوط به tetB باشد ، اما مقاومت در S. sonnei می تواند با بیان tetA مرتبط باشد(۲۲).

در سال۲۰۱۸María J.Pons و همکارانش، شیوع رایج ترین مکانیسم های مولکولی درگیر در مقاومت به تتراسایکلین و همچنین ارتباط آنها با گروه های ناسازگاری پلاسمید (Inc) در مجموعه ای از گونه های شیگلا است که باعث اسهال مسافرتی می شود را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که شیوع ژنهای tet (A) و tet (B) بین S. Sonnei و S. flexneri متفاوت است. علاوه بر این ، شیوع گروه های پلاسمید دار در S. Flexneri و S. sonnei متفاوت است. با این حال هیچ ارتباطی بین این دو پدیده یافت نشد(۲۳).

نتیجه گیری

در نتیجه امروزه به دلیل گسترش کاست‌های ژنی مقاوم در *شیگلا سونئی* مقاومت به این آنتی‌بیوتیک به شدت افزایش یافته است. با توجه به اینکه ژن های مقاومت چندگانه می توانند بر روی اینتگرون ها قرار گیرند و به سویه های دیگر نیز منتقل شوند بنابراین شناسایی و غربالگری اینتگرون ها برای جلوگیری از به وجود آمدن سویه های دارای مقاومت چندگانه دارویی لازم و ضروری می باشد. با تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و استفاده از آنتی بیوتیک های مناسب در مواقعی که نیاز به درمان باشد نیز می توان از مقاومت آنتی بیوتیکی جلوگیری به عمل آورد و از انتشار سویه های مقاوم در جامعه در بین جمعیت های انسانی ممانعت کرد. جهت درمان قطعی و عدم بروز مقاومت‌های روزافزون در سویه‌ها پاتوژن، تعیین الگوی مقاومتی و حتی MIC آن‌ها برای پیگیری روند مقاومت ضروری است.

گزارشات نشان می دهد شیوع مقاومت به صورت فنوتیپی نسبت به تتراسایکلین در ایزوله های *شیگلا* بیشتر شده است که مطالعه ما نیز همین نتایج را نشان می دهد. هم چنین نتایج مطالعه ما نشان می دهد که مقاومت چندگانه در ایزوله های شیگلا به اکثر آنتی بیوتیک ها از جمله تتراسایکلین، کرامفنیکل، آمپی سیلین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و فلوروکینولون ها و هم چنین سفالوسپورین های نسل سوم در نقاط مختلف جهان رو به افزایش است. پارامتر Fold change نیز بیانگر میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می باشد. میزان Fold Change برای ژن *tetA* برابر ۱/۲۱- که نشان می دهد این ژن در گروه تیمار شده با عصاره گیاه علف چشمه نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۲۱برابر کاهش یافته است.

تشکر و قدردانی

این مقاله که استخراج از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۹۹۱۰۴۳۰۰۶۸۷ بوده حاصل فعالیت آزمایشگاهی میکروبیولوژی و قارچ شناسی است. بدینوسیله از کارشناس ارشد میکروب شناسی آقای مجید صادق پور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Rrahman F, Klementina P, Qenan M, Beqe H, Kemajl B. ANALYSES OF microbiological data indicates from physic-chemcal parameters, in fish species from sitnica, lepenci and lumbardhi i prizrenit rivers (kosova). international journal of ecosystems and ecology science-ijees. 2015;5(2):207-12.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Hallaç B. determination of prevalence and incidence of Salmonella spp. and Shigella spp. in some foods in iraq/sulaymaniyah/qaladze: Siirt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2017.
3. Jones CH, Tuckman M, Murphy E, Bradford PA. Identification and sequence of a tet (M) tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of Escherichia coli. Journal of bacteriology. 2006;188(20):7151-64.
4. Low DE. Nonpneumococcal streptococcal infections, rheumatic fever. Goldman's Cecil Medicine: Elsevier; 2012. p. 1823-9.
5. Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, et al. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiology and molecular biology reviews. 2005;69(2):326-5.۶
6. Allard J, Bertrand K. Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein. TetA-PhoA gene fusions and implications for the mechanism of TetA membrane insertion. Journal of Biological Chemistry. 1992;267(25):17809-19.
7. Sapunaric FM, Levy SB. Substitutions in the interdomain loop of the Tn10 TetA efflux transporter alter tetracycline resistance and substrate specificity. Microbiology. 2005;151(7):2315-22.
8. Parsaei P, Bahmani M, Naghdi N, Asadi-Samani M, Rafieian-Kopaei M, Sepehri-Boroujeni M. Shigellosis phytotherapy: A review of the most important native medicinal plants in Iran effective on Shigella. Der Pharmacia Lettre. 2016;8(2):249-55.
9. Davidson A. The Oxford companion to food: OUP Oxford; 2014.
10. Onyimonyi A, Olabode A, Okeke G. Performance and economic characteristics of broilers fed varying dietary levels of neem leaf meal (Azadirachta indica). International Journal of Poultry Science. 2009;8(3):256-9.
11. Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha KC, Chawda R, Nair H, et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFNγ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2002;1593(1):29-36.
12. Fennell J. Potential for watercress production in Australia. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston ACT, Australia. 2006.
13. KASAI K. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus variable number of tandem repeats (VNTR) locus) pMCT 118) by polymerase chain reaction (PCR) and its amplification. J Forens Sci. 1990;35:1196-200.
14. Dolatshahi Z, Amini K. Survey of tetracycline resistance genes in Shigella sonnei isolated from acute pediatric with bacterial diarrhea using Multiplex PCR method and their antibiotic resistance patterns. Zanko journal of Medical sciences. 2016;17(52):35-44.
15. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, et al. Database resources of the national center for biotechnology information .Nucleic acids research. 2012;40(D1):D13-D25.
16. Ardavan A, Rival O, Morton JJ, Blundell SJ, Tyryshkin AM, Timco GA, et al. Will spin-relaxation times in molecular magnets permit quantum information processing? Physical review letters. 2007;98(5):057201.
17. Croy R. Molecular Genetics II-Genetic Engineering Course (Supplementary notes). Durham University durham ac uk. 1998.
18. Asadi M, Mirvaghefei A, Nematollahi M, Banaee M, Ahmadi K. Effects of Watercress (Nasturtium nasturtium) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Open Veterinary Journal. 2012;2(1):32-9.
19. Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli: characterization and dissemination of tet (A)-1. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(3):1023-32.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Penatti M, Hollanda L, Nakazato G, Campos T, Lancellotti M, Angellini M, et al. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of Shigella flexneri and Shigella sonnei strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2007;40(2):249-58.

21. Davies JR, Farrant W, Tomlinson A. Further studies on the antibiotic resistance of Shigella sonnei: I. Transferable antibiotic resistance. Epidemiology & Infection. 1968;66(3):471-7.

22. Shahsavan S, Owlia P, Lari AR, Bakhshi B, Nobakht M. Investigation of efflux-mediated tetracycline resistance in Shigella isolates using the inhibitor and real time polymerase chain reaction method. Iranian journal of pathology. 2017;12(1):53.

23. Pons MJ, de la Peña AT, Mensa L, Martón P, Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, et al. Differences in tetracycline resistance determinant carriage among Shigella flexneri and Shigella sonnei are not related to different plasmid Inc-type carriage. Journal of global antimicrobial resistance. 2018;13:131-4.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Molecular study of tetracycline resistance genes in *Shigella sonnei* isolated from clinical samples and the effect of spring grass extract on the expression of resistance gene by Real time-PCR method

Received: 02/11/2020 - Accepted: 20/06/2020

Shokoofeh Ahmadzadeh[1]
Mansour Bayat[2*]
Kumarss Amini[3]

[1] Master of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Professor,Department of Pathobiology,Faculty of Veterinary Specialized Sciences,Islamic Azad University,Science and Research Branch,Tehran,Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Email:
dr_mansour_bayat@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Shigella* is a gram-negative intestinal bacillus whose infections have caused serious problems in developed and developing countries. The prevalence of Shigella infections is very low due to the low dose of pathogenicity of this bacterium as well as its easy transmission from one person to another and also the indirect contamination of people through the consumption of contaminated food and water. Objective of isolation of Shigella sonnei from children's feces, Effect and isolation of spring grass extract, Molecular isolation of tetracycline genes by multiplex PCR, Effect of extract on tetracycline gene expression by multiplex PCR.

Methods: Out of 60 *Shigella sonnei* strains isolated from children with diarrhea after isolation of strains on different media and MacConkey Agar (MAC) medium in terms of shape and color of colonies were examined and recorded. First, the DNA of each sample was extracted by a DNA extraction kit, and after extraction, the DNA of the template was amplified by PCR. To investigate the effect of antibiotic resistance of spring grass to the extracted gene resistant to tetracycline, MIC of plant extract on different concentrations of Shigella sonnei was investigated. Strains with tetracycline-resistant genes were treated with MIC, using both treatment and non-treatment groups, and after incubation for 18 hours, stationary lag log was performed using RNA extraction kit x plus RNA extraction. Then, using RT-PCR ABI plus device, the expression of *tet* A and *tet* B genes in the treated and untreated groups under the influence of spring grass extract was read quantitatively (numerically) CT and the expression of the gene under the influence of treatment was interpreted.

Results: Shigella sonnei isolated results showed a high percentage of the highest resistance to streptomycin, Nalidixic acid, tetracycline and ampicillin and chloramphenicol with 100%, 100%, 86.7%, 91.8% and 50%. Also, the highest sensitivity to gentamicin and ciprofloxacin was observed with 85% and 86.6%, respectively. Multiple PCR results showed that out of all 60 Shigella sonnei isolates, 3 isolates had only tetB gene (5%) and 55 isolates had tetA gene (91.6%).

Conclusion: The results of Fisher test indicate that there was a significant relationship between tetA genes and antibiotic resistance at 5% error level (p-value <0.05). The results showed that at the 5% error level there was no significant relationship between tetB genes and antibiotic resistance (p-value = 0.05). The results showed that at the 5% error level, there was no significant relationship between positive and negative genes of all genes with antibiotic resistance (p-value <0.05).

Key words: *Shigella sonnei*, spring grass plant, aqueous extract, tetracycline resistance gene, PCR

www.SID.ir