

شناسایی ژن های bla SHV، bla TEM و bla CTX-M در سویه های سالمونلای جداسده از کودکان مبتلا به اسهال و تعیین الگوی مقاومتی آنها

شیما جهان تیغی (MSc)^۱، کیومرث امینی (PhD)^{۲*}

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۶/۲/۲۴، اصلاح: ۹۶/۳/۲۰، پذیرش: ۹۶/۵/۲۸

خلاصه

سابقه و هدف: درمان گاستروانتریت ناشی از سالمونلا در کودکان و افراد با ضعف سیستم ایمنی اهمیت دارد. هدف از انجام مطالعه، بررسی وجود ژنهای *bla TEM*، *bla CTX-M* مقاومت به آنتی بیوتیکها در سویه های سالمونلای جداسده از کودکان مبتلا به اسهال حاد باکتریایی و تعیین الگوی مقاومتی آنها می باشد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی، تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع از کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی اطفال تهران جمع آوری گردید. تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر طبق دستورالعمل CLSI انجام شد. سپس M-PCR با استفاده از توالی های الیگونوکلئوتیدی به منظور تعیین ژنهای بتالاکتامازی انجام گردید. **یافته ها:** از ۳۰۰ نمونه مدفوعی جمع آوری شده، ۱۸ نمونه (۶٪) سالمونلا شناسایی شد که ۱۱ مورد (۶۱/۱٪) آن سالمونلا تیغی، ۵ مورد (۲۷/۷٪) آن سالمونلا انتریتیدیس و ۲ مورد (۱۱/۱٪) آن سالمونلا تایفی موریوم بود. بررسی مقاومت ایزوله ها نشان داد که بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به ایمی پنم، سفتریاکسون (۱۰۰٪) و افلوکساسین (۵۴/۵٪) بود. نتایج آنالیز مولکولی مشخص نمود که ۷ سویه (۳۸/۸٪) و ۸ ایزوله (۴۴/۴٪) به ترتیب دارای ژنهای CTX-M و TEM بودند، در حالیکه ۲ سویه (۱۱/۱٪) حامل ژن SHV بودند.

نتیجه گیری: تشخیص دقیق و شناسایی سریع سویه های سالمونلای مولد ESBLs از منابع انتقال نظیر؛ مواد غذایی، حیوانات و انسانها که به عنوان حامل مزمن مطرح هستند حائز اهمیت می باشد. لذا ارزیابی مستمر می تواند از انتشار مقاومت به دیگر سویه ها جلوگیری می کند.

واژه های کلیدی: ژن های بتالاکتامازی، سالمونلا، اسهال، مقاومتی آنتی بیوتیکی.

مقدمه

سالمونلاها، عضوی از خانواده انتروباکتریاسیه که به صورت باسیل های گرم منفی، بی هوازی اختیاری غیر اسیدفست و بدون اسپور و متحرک می باشند (۱). این ارگانیسم های روده ای دارای بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ مختلف هستند که در سه گونه مجزا: سالمونلا تیغی، سالمونلا کلراسویس و سالمونلا انتریکا تقسیم می شوند (۲). سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروتیپ انتریتیدیس به اختصار سالمونلا انتریتیدیس، مهمترین عامل در ابتلا به سالمونلوزیس است. این بیماری یکی از مهم ترین بیماری های عفونی بین انسان و حیوانات بوده که بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت، ماکیان، تخم مرغ و شیر است (۳). بنابراین این باکتری یک پاتوژن منتقله از طریق غذا (Food-borne pathogen) است. سالمونلوز می تواند به یکی از اشکال تب تیفوئید (حصبه)، سپتی سمی و عفونت های گوارشی (گاستروانتریت) بروز کند. از میان سروتیپ های شایع دخیل در گاستروانتریت سالمونلایی، سالمونلا تیغی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس فراوان ترین می باشند (۴). شروع این علایم ناگهانی از ۱۲ ساعت تا یک هفته متغیر است و بسیاری از افراد بدون نیاز به آنتی بیوتیک بهبود می یابند (۵). از مهم ترین آنتی بیوتیک هایی که امروزه در درمان مورد استفاده قرار می گیرند، آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام

می باشند، اما به دلیل افزودن آنتی بیوتیک به جیره غذایی دامها، استفاده نادرست، بیش از حد و خودسرانه آنتی بیوتیک ها و عدم نظارت دقیق در تجویز دارو سبب بروز سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک شده است (۶). مشکل اساسی در درمان عفونت های ناشی از این ارگانیسمها ظهور سویه هایی با مقاومت چند گانه Multidrug resistance-MDR می باشد که اغلب منجر به طولانی شدن زمان بستری بیمار و بالا رفتن هزینه درمانی در مقایسه با میکروبیهای حساس به آنتی بیوتیک و سرانجام شکست درمانی (Drug Therapeutic Failure-DTF) می گردد (۷و۸). بتالاکتامازها آنزیمهایی هستند که با هیدرولیز هسته مرکزی حلقه بتالاکتام سبب غیرفعال شدن این آنتی بیوتیک ها می شوند. Ambler این آنزیمها را بر اساس ساختمان اولیه شان به ۴ گروه (A-D) تقسیم بندی نمود که نوع B متالوبتالاکتاماز (MBLs)، نوع C همان سفالوسپوریناز و نوع A همان بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) می باشند (۹). در گروه A بتالاکتامازی Ambler و کلاس be2 و b2 از طبقه بندی بوش بتالاکتامازهایی مانند TEM (Temoneira) و SHV (sulfhydryl variable) قرار دارند و سرشته آنزیم های ESBLs می باشند و از تغییر در

این مقاله حاصل پایان نامه شیما جهان تیغی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان می باشد

*مسئول مقاله: دکتر کیومرث امینی

آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۸۶-۴۲۲۴۱۵۱۱

E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com

Slide agglutination انجام گردید. از سویه استاندارد سالمونلا انترتیدیس ۱۳۰۷۶ ATCC و سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 استفاده گردید. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با استفاده از روش انتشار از دیسک و بر روی محیط مولر هیتون آگار (MHA) (ساخت شرکت مرک، کشور آلمان) و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) (۱۴) و برای دیسک‌های سفنازیدیم (۳۰ µg)، آزترونام (۳۰ µg)، ایمپنم (۱۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، افلوکساسین (۵ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg) و تتراسایکلین (۳۰ µg) (تهیه شده از شرکت هایمدی-هندوستان) انجام شد. برای غربالگری سویه‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) از روش دیسک ترکیبی (Combined disk test-CDT) صورت گرفت.

پس از تهیه محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان)، و سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند، کشت میکروبی به صورت چینی انجام گردید. سپس دیسک‌های سفنازیدیم (۳۰ µg)، سفنازیدیم-کلاولانیک اسید (۱۰/۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (۱۰/۳۰ µg) (Himedia, India) را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی متر از هم بر روی محیط قرار داده و گرمخانه‌گذاری به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سلسیوس انجام گردید. با در نظر گرفتن اصول CLSI، هرگاه هاله عدم رشد اطراف دیسک سفنازیدیم-کلاولانات ≤ 5 mm نسبت به سفنازیدیم به تنهایی باشد و یا اینکه هاله عدم رشد سفوتاکسیم-کلاولانات ≤ 3 mm نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد، آن جدایه مولد ESBLs در نظر گرفته خواهد شد.

DNA سلولی با استفاده از کیت DNA سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج گردید. تست M-PCR برای شناسایی ژنهای بتالاکتامازی *bla* SHV (۱۵)، *bla* TEM و *bla* CTX-M (۱۶) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می باشد. واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس (دنتوراسیون اولیه) سپس ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و مرحله طولیل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس.

محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25923 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS ۱۷ و از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

توالی یک یا چند اسید آمینه در دو آنزیم فوق، دیگر آنزیم‌ها حاصل می شوند (۷). فراوانترین نوع ESBLs در نمونه‌های بالینی تایپ SHV بوده که ژن کد کننده آن بر روی یک پلاسمید قابل انتقال مستقر است و به راحتی در میان سویه‌های باکتریایی منتشر می شود (۱۰). بتالاکتام‌های SHV توسط کلاولانیک اسید مهار اما توسط EDTA مهار نمی شود. TEM-1 به عنوان اولین بتالاکتاماز وسیع‌الطیف کد شده بوسیله پلاسمید در اتروباکتریاسه‌ها بود که سایر باکتری‌ها از قبیل پseudomonas آئروژینوزا نیز قادر به تولید آن هستند (۱۱). ESBLs‌هایی که به خانواده TEM و یا SHV متعلق نبوده تحت عنوان ۱-CTX-M دسته بندی می شوند. این ژن نیز پلاسمیدی بوده و بر روی سفوتاکسیم موثر است. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها را داشته و توسط کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می شوند (۱۲). در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) و مقاومت باکتریایی و به دنبال آن شکست باکتریایی در میان باکتری‌های با منشأ دامی و انسانی به ویژه سالمونلا رواج یافته و این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت می‌باشد. Boisrame-Gastrin و همکاران در تحقیقی بر روی سالمونلاهای جداسازی شده از کودکان گزارش نمودند که تمامی ایزوله‌های شناسایی شده مولد ESBL حاوی ژن *bla*TEM-1 بودند (۱۳).

با توجه به شیوع بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در بین جمعیت هدف از مطالعه ردیابی ژنهای مقاومت بتالاکتامازی (*bla* SHV، *bla* TEM و *bla* CTX-M) در سویه‌های مختلف سالمونلای جداسازی شده از نمونه‌های بالینی و تعیین الگوی مقاومتی این سویه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی که در طی یک بازه زمانی ۹ ماهه (از ابتدای تیر لغایت انتهای اسفند) ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا که دارای اسهال حاد بوده و به بیمارستان مرکز طبی اطفال تهران مراجعه کرده بودند در ظروف پلاستیکی و در یخ‌ساز جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل به محیط آزمایشگاه منتقل و به منظور غنی سازی به محیط کشت سلنیت F (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. نمونه‌های مدفوع کشت داده شده در محیط سلنیت در مرحله بعد بر روی محیط XLD آگار و SS آگار (مرک، آلمان) کشت داده و در ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. کلنی‌های رشد کرده و مشکوک به با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی مانند: MR-VP، SIM، TSI، سیمون سیترات، فیل آلانین دامیناز، اوره آز، تولید H_2S ، تست تخمیر قندها و احیای نیترات مورد شناسایی قرار گرفت. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی سرم‌های مونو والان (MAST) به روش

جدول ۱. توالی الیگونیوکلوئیدی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

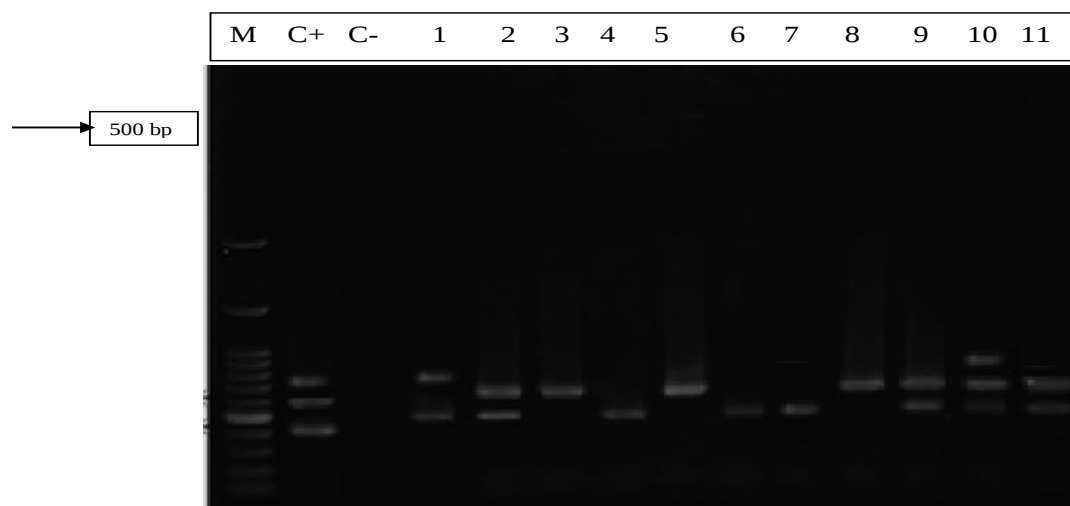
توالی پرایمرها	توالی الیگونیوکلوئیدی (۵'→۳')	طول قطعه (bp)
<i>bla</i> SHV	F=5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' R=5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3'	۷۴۷
<i>bla</i> TEM	F=5'-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3' R=5'-ACGCTCACC GGCTCCAGATTTAT-3'	۴۴۵
<i>bla</i> CTX-M	F=5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3' R=5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGGG-3'	۵۹۳

یافته ها

آمیگاسین و تتراسایکلین (۱۰۰٪) و بالاترین میزان حساسیت به ایمی پنم (۱۰۰٪) مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان بروز مقاومت در سالمونلا تیغی موریوم به مراتب بیشتر از دو سویه دیگر می باشد. نتایج مقاومت همزمان سویه ها (فنوتیپ MDR) نشان داد که از ۱۸ سویه سالمونلای جداسازی شده، ۵ جدایه به ۴ نوع آنتی بیوتیک و ۳ ایزوله نیز به ۳ نوع آنتی بیوتیک مختلف مقاوم بودند. نتایج آزمون دیسک ترکیبی نیز نشان داد که از مجموع ۱۸ سالمونلای بدست آمده، ۸ جدایه (۴۴/۴٪) از لحاظ فنوتیپ مولد ESBLs بودند.

نتایج آنالیز مولکولی برای تمامی جدایه سالمونلا نشان داد که ۷ سویه (۳۸/۸٪) دارای ژن *CTX-M* و ۸ ایزوله (۴۴/۴٪) واجد ژن *TEM* بودند، در حالیکه تنها ۲ سویه (۱۱/۱٪) حامل ژن *SHV* تشخیص داده شدند. (شکل ۱) (جدول ۲). با بررسی حضور ژنهای مورد مطالعه در نمونه ها مشخص گردید که تنها یک نمونه (۹/۱٪) از ایزوله های شناسایی شده سالمونلا تیغی همزمان واجد هر سه ژن مقاومت به بتالاکتاماز بوده است.

در مجموع از ۳۰۰ نمونه مدفوعی جمع آوری شده تعداد ۱۸ نمونه (۶٪) از مجموع نمونه های جمع آوری شده باکتری سالمونلا تشخیص داده شد و بعد از انجام آزمون های بیوشیمیایی و سروتایپینگ بر روی ۱۸ نمونه شناسایی شده، ۱۱ مورد (۶۱/۱٪) آن سالمونلا تیغی، ۵ مورد (۲۷/۷٪) سالمونلا انتریتیدیس و ۲ مورد (۱۱/۱٪) آن سالمونلا تایفی موریوم شناسایی گردید. بررسی میزان مقاومت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار از دیسک نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در بین ایزوله های سالمونلا تیغی مربوط به آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۹۰/۹٪) و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی-بیوتیک های ایمی پنم و سفتریاکسون (۱۰۰٪) مشاهده شد. در میان ایزوله های سالمونلا انتریتیدیس بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم و آزترئونام (۸۰٪) و بیشترین حساسیت به ایمی پنم، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪) گزارش گردید. در حالیکه در ایزوله های سالمونلا تایفی موریوم بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم،



شکل ۱. نتایج آزمون M-PCR از چپ به راست: M؛ (شرکت سیناژن، ایران) Ladder ۱۰۰ bp، کنترل مثبت (سالمونلا انتریتیدیس ۱۳۰۷۶ ATCC)، کنترل منفی (شریشیا کلی ۲۸۹۱۳ ATCC)، *bla SHV* (۴۳۷bp)، *bla TEM* (۴۵۵bp) و *bla CTX-M* (۵۹۳bp)، ۱-۱۱؛ سویه های بالینی سالمونلا.

جدول ۲. توزیع ژن های تحت مطالعه در سویه های سالمونلای مختلف در مطالعه

جدایه میکروبی	سالمونلا تیغی (N=۱۱)			سالمونلا انتریتیدیس (N=۵)			سالمونلا تایفی موریوم (N=۲)		
	تعداد(درصد)			تعداد(درصد)			تعداد(درصد)		
ژن هدف	<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>
	۴(۳۶/۴)	۴(۳۶/۴)	۱(۹)	۱(۲۰)	۲(۴۰)	۳(۶۰)	۱(۵۰)	۱(۵۰)	۰

بحث و نتیجه گیری

سالمونلا یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بطور فراوانی گزارش می گردد، لذا اطلاعات نظارتی در مورد مقاومت ضدآنتی میکروبی باید به روز شده و در مدیریت بالینی و دستورالعمل های درمانی مورد استفاده قرار گیرند (۵ و ۱۷). در مطالعه حاضر، از مجموع ۳۰۰ نمونه مدفوع بدست آمده از کودکان مبتلا به اسهال حاد باکتریایی که به بیمارستان مرکز طبی اطفال مراجعه کرده بودند، تعداد ۱۸ (۶٪) سویه

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بروز مقاومت در ایزوله های سالمونلا تیغی موریوم از دو سویه تایفی و انتریتیدیس بیشتر بوده و از ۱۸ سویه سالمونلای جداسازی شده، ۵ جدایه به ۴ نوع آنتی بیوتیک و ۳ ایزوله نیز به ۳ نوع آنتی بیوتیک مختلف مقاوم بودند. در نتایج مولکولی مشخص گردید که (۳۸/۸٪) دارای ژن *CTX-M* و (۴۴/۴٪) واجد ژن *TEM* بوده در حالیکه (۱۱/۱٪) حامل ژن *SHV* تشخیص داده شدند. بیماری های اسهالی ایجاد شده توسط سویه های

مقاومتی به سرعت در بین سویه های سالمونلا در حال انتشار هستند و این می تواند به عنوان یک هشدار جدی برای سیستم سلامت در آینده باشد. نتایج حاصل از شیوع ژن *TEM* در بین سویه های اشریشیاکلی در مطالعه Shahcheraghi و همکاران (۲۸) همخوانی دارد اما شیوع پایین تر ژن *SHV* (۶٪) در مقایسه با مطالعه کنونی (۱۱/۱٪) می تواند به دلیل اختلاف در نوع جدایه میکروبی (اشریشیاکلی در مقایسه با سالمونلا) باشد. در مطالعه Abdollahi و همکاران (۲۹) نیز از ۶۰ مورد سالمونلا انتریکا، ۴۵ جدایه دارای فنوتیپ MDR بودند که ۵ ایزوله دارای مقاومت به سفوتاکسیم (فنوتیپ ESBLs) و ۲ ایزوله نیز واجد قطعه ژنی *bla-CTX-M-type* بود. این اختلاف می تواند در نتیجه تفاوت در نوع جدایه میکروبی و محل انجام نمونه گیری باشد. نتایج آزمون انتشار دیسک برای آنتی بیوتیک های ایمی پنم و سیپروفلوکساسین در مطالعه این پژوهشگران با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه Yang و همکاران، ۲ ایزوله از ۳ جدایه سالمونلا اینترتیدیس حاوی ژن *blaTEM* بودند (۳۰).

نتایج مطالعه Boismere-Gastrin و همکاران نشان داد که تمامی ایزوله های مولد ESBL حاوی ژن *blaTEM-1* بودند و ۲۱ جدایه حاوی ژن *blaSHV* و ۵ ایزوله حاوی ژن *blaCTX-M* هستند (۱۳). انتقال مقاومت ها در داخل و بین گونه های مختلف باکتری ها و در نهایت آلوده شدن انسان به باکتری واجد مقاومت بسیار حائز اهمیت است. درمان موارد عفونت های ناشی از سالمونلاهای مقاوم نه تنها مخاطرات بهداشتی فراوانی را در پی دارد بلکه زیانهای اقتصادی شدیدی را نیز به دنبال خواهد داشت، زیرا استفاده مکرر و مداوم از آنتی بیوتیک های معمولی که مواردی از مقاومت در آنها دیده شده باعث انتخاب ارگانیزم مقاوم و گسترش این ارگانیزم در جوامع می گردد. تشخیص دقیق و شناسایی سریع سویه های سالمونلای مولد ESBLs از منابع انتقال نظیر؛ مواد غذایی (بویره تخم مرغ)، حیوانات و محصولات آنها (مانند؛ ماکیان و محصولات گوشتی) و انسانهایی که به عنوان حامل مزمن مطرح هستند و سالمونلا را از طریق مدفوع به محیط منتشر می کنند، بسیار پراهمیت می باشد. لذا ارزیابی مداوم و مستمر این مقاومت ها به خصوص در سطح کشوری و منطقه ای امری بدیهی است که می تواند از انتشار مقاومت به دیگر سویه ها، کاهش هزینه درمان، کاهش تلفات در دامپزشکی و کاهش آلودگی منابع غذایی جلوگیری نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، بخش میکروب شناسی بیمارستان مرکز طبی اطفال و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در اجرای این پروژه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می گردد.

سالمونلا بدست آمد که این تعداد با مطالعه Dallal و همکاران (۱۸) مطابقت دارد اما با مطالعه Rezaee و همکاران (۲٪) (۱۹) و Amiri و همکاران (۱۱/۱٪) (۲۰) همخوانی ندارد. این تضاد می تواند در نتیجه تعداد نمونه ها و زمان نمونه برداری و سال اجرای مطالعه باشد. نتایج آزمون سروتیپی (MAST Monovalent anti sera test) بر اساس روش آگلوتیناسیون روی لام نشان داد که ۱۱ (۶۱/۱٪) مورد آن سالمونلا تیفی، ۵ مورد (۲۷/۷٪) آن سالمونلا انتریتیدیس و ۲ (۱۱/۱٪) مورد سالمونلا تایفی موریوم بود. اندک اختلاف مشاهده شده در شیوع سروتیپ های تعیین شده با مطالعه Dallal و همکاران (۱۸) و Rezaee و سایرین (۱۹) می تواند در نتیجه توزیع سروتیپ ها در مراکز مختلف درمانی باشد.

نتایج تست کربی-باثر نشان داد که تمامی سویه ها (۱۰۰٪) به ایمی پنم و سفتریاکسون حساس و ۶ سویه (۵۴/۵٪) از تمامی سالمونلای ایزوله شده دارای بیشترین مقاومت به افلوکساسین بودند. این یافته ها، نتایج حاکی از مطالعه Eshraghi و همکاران (۲۱) را تایید می نماید. در مطالعه این محققین ۲۶ سویه سالمونلا از ۱۹۵۰ نمونه مدفوع بدست آمد که تمامی آنها به سیپروفلوکساسین و ایمی پنم حساس بودند.

این محققین نشان دادند که کویینولون ها در درمان همراه با خانواده سفالوسپورین ها مناسب است. این نتایج با مطالعات انجام گرفته در عربستان (۲۲)، آمریکا (۲۳) و انگلستان (۲۴) همخوانی دارد. Spiliopoulou و همکاران در یونان (۲۵) نشان دادند که تمام ایزوله ها به سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین حساس بودند که با مطالعه حاضر تطابق دارد. اما تنها یک ایزوله دارای الگوی مقاومت چندگانه بود و این در حالی که در مطالعه ما ۶ ایزوله دارای الگوی مقاومت چندگانه به حداقل ۵ نوع مختلف آنتی بیوتیک بودند در مطالعه Amiri و همکاران نیز ۶۰ جدایه سالمونلا تیفی موریوم بدست آمده از ۲۸۳۰۰ نمونه مدفوع به سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ حساسیت نشان دادند (۲۰). نتایج مقاومت به ایمی پنم در مطالعه پیش رو با مطالعه White و همکاران (۲۶)، Eshraghi و همکاران (۲۱)، Diniz-Santos و سایرین (۲۷) و Shahcheraghi و همکاران (۲۸) همخوانی دارد.

نتایج آنالیز مولکولی برای تمامی جدایه سالمونلا نشان داد که ۷ سویه (۳۸/۸٪) و ۸ ایزوله (۴۴/۴٪) به ترتیب دارای ژنهای *CTX-M* و *TEM* بودند، در حالیکه ۲ سویه (۱۱/۱٪) حامل ژن *SHV* بودند. این نتایج با مطالعه Abdollahi و همکاران (۲۹) مغایرت دارد. در مطالعه این محققین تمامی ۱۷۴ سالمونلا از نظر حضور ژنهای *TEM*، *CTX-M* و *SHV* منفی بودند که می تواند به دلیل سال اجرای پژوهش و فاصله زمانی، مکانیزم های رایج مقاومت در این دسته از باکتری ها مانند افلاکس پمپ، پمپ های پورینی و وجود همزمان چند مکانیزم مقاومتی باشد. به هر حال، این نتیجه پیشنهاد می کند، ژنهای

Detection of *bla TEM*, *bla CTX-M* and *bla SHV* in *Salmonella* Species Isolated from Children with Acute Infectious Diarrhea by Multiplex-PCR and Their Antibiotic Resistance Profile

Sh. Jahantighi (MSc)¹, K. Amini (PhD)^{*2}

1.Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, I.R.Iran

2.Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(11); Nov 2017; PP: 28-34

Received: Apr 24th 2017, Revised: Jun 10th 2017, Accepted: Aug 19th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Treatment for *Salmonella* gastroenteritis is important in children and people with immune system weakness. The aim of this study was to investigate the presence of *bla SHV*, *bla TEM* and *bla CTX-M* genes in antibiotic resistance to isolated *Salmonella* strains from children with acute bacterial diarrhea and to determine their resistance pattern.

METHODS: In this descriptive cross-sectional study, 300 stool specimens from children with diarrhea referred to the Tehran Medical Center Hospital were collected. The antibiotic susceptibility test was determined using the disk diffusion method agreeing with CLSI guideline. Then, M-PCR was achieved for determination of β -lactamase genes by specific oligonucleotides primers. Data were analyzed by SPSS software version 17 and descriptive statistics.

FINDINGS: Of the 300 stool samples collected, 18 (6%) of *Salmonella* were identified, of which 11 (61.1%) were *Salmonella typhi*, 5 (27.7%) were *Salmonella enteritidis* and 2 (11.1%) *Salmonella typhimorium* cases. Resistance to isolates showed that the highest and lowest resistance was related to imipenem, ceftriaxone (100%) and onloxacin (54.5%) respectively. The results of the molecular analysis indicated that 7 strains (38.8%) *CTX-M* and 8 isolates (44.4%) had *TEM* genes respectively, while 2 strains (11.1%) contained the *SHV* gene.

CONCLUSION: accurate detection and fast identification of *Salmonella* producing ESBLs is important from the source of infection such as, foods, animals and its products and carriers.

KEY WORDS: β -Lactamase Genes, *Salmonella*, Diarrhea, Antibiotic Resistance

Please cite this article as follows:

Jahantighi Sh, Amini Sh. Detection of *bla TEM*, *bla CTX-M* and *bla SHV* in *Salmonella* Species Isolated from Children with Acute Infectious Diarrhea by Multiplex-PCR and Their Antibiotic Resistance Profile. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):28-34.

* Corresponding author: K. Amini (PhD)

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

Tel: +98 86 42241511.

E-mail: dr_kumarss_aminia@yahoo.com

References

1. You D, Wardlaw T, Salama P, Jones G. Levels and trends in under-5 mortality, 1990–2008. *The Lancet*. 2010;375(9709):100-3.
2. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The lancet*. 2010;375(9730):1969-87.
3. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agent Chemother*. 2002;46(9):2977-81.
4. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi J, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. *Pakistan J Biolog Sciences*. 2007;10(7):1138-40.
5. Su L-H, Wu T-L, Chia J-H, Chu C, Kuo A-J, Chiu C-H. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):846-52.
6. Parry CM. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(5):467-72.
7. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657-86.
8. Teethaisong Y, Eumkeb G, Chumnarnsilpa S, Autarkool N, Hobson J, Nakouti I, et al. Phenotypic detection of AmpC β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae using a resazurin microtitre assay with inhibitor-based methods. *J Med Microb*. 2016;65(10):1079-87.
9. Poirel L, Fernández J, Nordmann P. Comparison of three biochemical tests for rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):423-7.
10. Ferro G, Guarino F, Cicatelli A, Rizzo L. β -lactams resistance gene quantification in an antibiotic resistant *Escherichia coli* water suspension treated by advanced oxidation with UV/H₂O₂. *J Hazardous Material*. 2017;323:426-33.
11. Hijazi SM, Fawzi MA, Ali FM, El Galil KHA. Multidrug-resistant ESBL-producing Enterobacteriaceae and associated risk factors in community infants in Lebanon. *J Infec Dev Count*. 2016;10(09):947-55.
12. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opin Pharmacol*. 2007;7(5):459-69.
13. Boismaré-Gastrin S, Tandé D, Münck M-R, Gouriou S, Nordmann P, Naas T. *Salmonella* carriage in adopted children from Mali: 2001–08. *J Antimicrob Chemothera*. 2011;66(10):2271-6.
14. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Perform Standard Antimicrob Susceptibilit Test. 2007;17.
15. MONSTEIN HJ, Östholm-Balkhed Å, Nilsson M, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson L. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *Apmis*. 2007;115(12):1400-8.
16. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in intensive care units of a referral hospital in Shiraz, Iran. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(9):703-8.
17. Ercis S, Gulay Z, Gur D, Erdem B, Hascelik G, Tunger A, et al. Types of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella* spp and decreased susceptibility to fluoroquinolones. *Clin Microbiol Inf*. 2006;12.
18. Dallal M, Lari AR, Yazdi M. Pattern of serotyping and antibiotic resistance of *Salmonella* in children with diarrhea. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2014;16(1):100-5. [In Persian].
19. Rezaee MA, Abdinia B, Abri R, Kafil HS. Comparison of the antibiotic resistance patterns among *Shigella* species isolated from pediatric hospital between 1995-1999 and 2009-2013 in North-West of Iran. *J Anal Res Clin Med*. 2014;2(3):118-122.

20. Amiri S, Moradi G. Molecular identification of virulence genes (agfA and mgtC) in salmonella typhimurium strains isolated from children with gastroenteritis using multiplex PCR method and determination of their antibiotic susceptibility pattern. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(10):40-5. [In Persian].
21. Eshraghi S, Dalall S, Mehdi M, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. Teh Univ Med J Pub. 2010;67(12):876-82. [In Persian].
22. Ramadan F, Unni A, Hablas R, Rizk M. Salmonella-induced enteritis. clinical, serotypes and treatment. J Egyp Pub Health Associat. 1992;67(3-4):357-67.
23. Travers K, Michael B. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. Clin Inf Dis. 2002;34(3):131-4.
24. Meakins S, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, et al. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal salmonella isolates in Europe 2000–2004: a report from the Enter-net international surveillance network. Microb Drug Resis. 2008;14(1):31-5.
25. Spiliopoulou I, Zografou S, Goula A, Dimitracopoulos G, Christofidou M. Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of salmonella enterica from southwestern Greece. Chemotherapy. 2007;53(6):392-6.
26. White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, et al. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. New Eng J Med. 2001;345(16):1147-54.
27. Diniz-Santos DR, Santana JS, Barretto JR, Andrade MGM, Silva LR. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. Brazil J Infec Dis. 2005;9(1):77-83.
28. Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of bla TEM and bla SHV genes among clinical isolates of E. coli from Tehran hospitals. Iran J Med Microbiol. 2007;1(3):1-8. [In Persian].
29. Abdollahi A, Mohammadi A, Fasihi M, Shayan R, Radmanesh R. Emergence of Bla-ctx-m-type Gene in Salmonella Enterica Serotypes Isolated from Patients Stool. J Isfahan Med School. 2011;28(116):1.
30. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Vet Microbiol. 2002;86(4):295-301.