Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Identification of Broad-Spectrum Beta-lactamase *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, and Ampc-dependent *CMY* Genes in *Shigella sonnei* Isolated from Pediatric Diarrhea Specimens by Multiplex-PCR and Antibiotic Resistance Pattern Determination

Mona Konkori [1], Kumarss Amini [1]*

1. *Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran*

10.30699/ijmm.14.5.491

ABSTRACT

Background: *Shigella* species are one of the most common causes of bacillary dysentery and sometimes death especially in children and immune-compromised individuals. The diversity of disease-causing species and the emergence of drug resistance make it difficult to select the appropriate antibiotic to treat shigellosis. One of the important causes of resistance in *Shigella* isolates is the presence of genes encoding broad-spectrum beta-lactamase enzymes. The aim of this study was to determine the frequency of *Shigella sonnei* strains producing *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, and *CMY* beta-lactamase genes by Multiplex PCR and to investigate their association with antibiotic resistance in *S. sonnei* strains.

Materials & Methods: This descriptive cross-sectional study was conducted in a period of 6 months from the beginning of June to the end of October 2016. A total of 200 diarrhea specimens were collected from the patients with suspected shigellosis from the Children's Medical Center (Tehran). The antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion method on Müller-Hinton agar in accordance with CLSI instructions. After DNA extraction, the presence of *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, and Ampc-dependent *CMY* genes was determined by Multiplex-PCR using specific primers.

Results: From all the samples, 60 (30%) *S. sonnei* strains were obtained using standard microbiological and biochemical tests. Majority of the strains were resistant to erythromycin (26 strains, 43.3%) and cefepime (24 strains, 40%). The molecular test results showed that 40 (66.6%) and 33 (55%) of the strains carried the *CTX-M-8* and *CMY* genes, respectively (P<0.05). The *CTX-M-2* gene was not detected in any of the samples.

Conclusion: The results indicate a high frequency of *CMY* gene among *Shigella sonnei* isolates and higher resistance of these strains was found against erythromycin and cefepime. Therefore, careful medical care and proper and timely use of appropriate antibiotics to prevent the spread of resistant isolates seems inevitable.

Keywords: Broad-spectrum beta-lactamase, Disk diffusion, Multiplex-PCR, *Shigella sonnei*

Received: 2017/08/27; **Accepted**: 2020/08/04; **Published Online:** 2020/09/26

Corresponding Information: **Kumarss Amini,** Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Amini K, Konkori M. Identification of broad-spectrum beta-lactamase CTX-M-2, CTX-M-8, and Ampc-dependent CMY genes in Shigella sonnei isolated from pediatric diarrhea specimens by Multiplex-PCR and antibiotic resistance pattern determination. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :501-511

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Shigella species are members of the *Enterobacteriaceae* family with four groups: group A (*Shigella dysentery*), group B (*Shigella flexneri*), group C (*Shigella boydii*) and group D (*Shigella sonnei*) **(1)**. The infectious dose of *Shigella* is less than 200 bacilli; therefore, shigellosis can spread rapidly among communities with low health standards **(2)**. Bacterial dysentery (Bacillary dysentery or shigellosis) is considered as one of the most important acute gastrointestinal diseases, especially in children and immune-compromised patients which cause high number of fatalities in addition to economic losses and social problems **(3)**. Anorexia, fever, intestinal inflammation, bloody-purulent stools, abdominal pain, tenesmus, and feeling of incomplete bowel emptying with anal pain are the symptoms of this disease **(4)**. It is estimated that 165 million cases of bacillary dysentery and 1.1 million deaths occur annually worldwide, about 60% of which are in children younger than five years old **(5)**.

The appropriate and timely antibiotic treatment shortens the course of the disease and reduces its complications and prevents the transmission of the disease to the healthy people. Today, due to the widespread use of antibiotics, *Shigella* species have become resistant to many antibiotics, including the third generation of cephalosporins. This issue has made the treatment of this disease difficult **(6)**. The most important problem in the treatment of people with shigellosis is the development of multi-drug resistance (MDR) **(7)**. Production of the beta-lactamase enzymes is the main reason for the gram-negative bacteria resistance to beta-lactams **(8)**. These enzymes destroy the amide ring of beta-lactams. Beta-lactamase enzymes are divided into four groups A to D based on the amino acid sequences. Broad-spectrum beta-lactamase enzymes (ESBLs) are from class A beta-lactamases that hydrolyze broad-spectrum cephalosporins with a side chain of Oximino, causing bacterial resistance to penicillins, the first, second and third generations of cephalosporins and aztreonam. They are inhibited by beta-lactamase inhibitors such as clavulanic acid **(9)**.

The *CTX-M* beta-lactamase genes were first reported in 1989 from Japan and spread to the other parts of the world since then **(10)**. Today, these beta-lactamase enzymes are divided into five groups: *CTX-M1* was reported from Germany in 1989 (11), *CTX-M-2* was reported from Japan in 1986, *CTX-M-8* was reported from Brazil in 1996 (12), *CTX-M-9* was reported from Spain in 1994, and the *CTX-M-25* was reported from Canada in 2000 **(10)**. These beta-lactamase genes have little association with the *TEM* and *SHV* beta-lactamase members, and instead there is a high similarity between the chromosomal enzymes *Amp-C*, especially *KLU-1* and *KLU2*, and the *CTX-M* enzymes. There are theories based on the derivation of these enzymes from one species **(13)**.

Broad-spectrum beta-lactamase-producing bacteria are placed in the human and animal intestines which are very difficult to control and eradicate because ESBL genes can be transmitted between different genus, species, and different strains of intestinal bacteria **(7)**. There are some reports of *Shigella sonnei* multiple-resistance to antibiotics, especially cephalosporins third-generation such as cefotaxime and ceftriaxone.

In recent years, the emergence of the antibiotic resistance phenomenon has raised many concerns in the medical communities due to the failure of the treatment process **(8)**. Due to the development of broad-spectrum beta-lactam antibiotic resistance genes in *Shigella sonnei* strains and the high speed and accurate detection of molecular methods and simultaneous identification of several genes, this study aimed to identify broad-spectrum beta-lactamase genes *CTX-M-2*, *CTX-M* and Ampc-dependent *CMY* gene in *Shigella sonnei* strains isolated from diarrheal specimens by Multiplex-PCR method and the antibiotic resistance pattern of these strains.

Materials and Methods

In this descriptive cross-sectional study, diarrheal stool samples of the patients with suspected shigellosis were randomly collected from the Children's Medical Center (Tehran) over a period of 6 months from the beginning of June to the end of October 2016. A total of 200 diarrhea stool samples were collected in disposable sterile containers specified for stool collection, including 94 male and 106 female samples. The samples were examined macroscopically for the consistency, mucus and blood presence and microscopically for the red and white blood cells. The inclusion criteria included the presence of blood and mucus in diarrheal stool, tenesmus and no antibiotic use and the exclusion criteria were the absence of *Shigella* in the positive culture samples or arbitrary use of antibiotics before referral. The stool samples were transferred to the laboratory in Kerry-Blair (Merck, Germany) medium at the earliest opportunity. The Selenite-F (SF) medium was used to enrich the samples. After incubation at 37°C for 8 hr, the samples were transferred from the SF medium to Salmonella-Shigella agar (SS) and McConkey agar (Merck, Germany) and incubated for 24 to 48 hr at 37°C.

Finally, to differentiate and confirm Shigella species the biochemical tests (oxidase, catalase, SIM, MRVP, citrate consumption, TSI test, urease production, phenylalaninidaminase, lysine decarboxylase, sodium malonate, and decarboxylation of the amino acids ornithine and mannitol) were conducted. The isolates with biochemical properties: lactose negative, gas production negative, immobilized, lysine decarboxylation negative, citrate negative, urea hydrolysis negative and methyl red positive were considered as Shigella isolate. Serotyping tests were performed on the slides of fresh *Shigella* cultures using Baharafshan Co. kits by agglutination method **(1, 2)**.

Disk Diffusion

The antibiotic susceptibility test was performed using disk diffusion method and according to the instructions of the Laboratory and Clinical Standards Institute (14) on Müller-Hinton agar medium (Merck, Germany) for the antibiotics trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg), erythromycin (30 µg), amoxicillin (25 µg), ceftriaxone (30 µg), cefepime (30 µg), amoxiclav (25 µg) (produced by Himedia Co, India).

After bacterial DNA extraction using gram-negative bacterial genomic DNA extraction kit of Iranian Biological Resource Center (Cat no. MBK0041) and confirmation of the extracted DNA purity using biophotometer (Bio-Rad, USA), the genes *CTX-M-2*, *CTX-M-8* and *CMY* were amplified using M-PCR method and specific primer sequences (Table 1) in thermocycler (Eppendorf, Germany) in the final volume of 25 µL including 10.5 µL PCR master mix 5X (Sinaclon, Iran) containing Taq DNA polymerase (0.05 U/µL), MgCl2 (3 mM) and dNTPs (0.4 mM), 0.7 µL of each primer, 1 µL of template DNA (10 ng) and 12.1 µL of double-distilled water for 33 cycles. The primer BLAST was performed on the website https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/.

Thermal cycling included denaturation step at 95°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 30 sec and elongation step at 72°C for 1 min. Finally, the PCR products were run on 1% agarose gel containing ethidium bromide (Figure 1). In the molecular study, *Shigella sonnei* ATCC 25931 and *Escherichia coli* ATCC 25922 (prepared from the Microbial Bank of Pasteur Institute of Iran) were used as negative and positive controls, respectively.

Statistical Analysis

Data were collected and analyzed using SPSS software version 16. The statistical analysis was performed using Pearson-Chi Square test. The P-value<0.05 was considered as significant level.

Table 1. Sequence of the primers

Target gene	Primer sequence (3´ to 5´)	Product length (bp)
CTX-M-2	F: TTAATGATGACTCAGAGCATTC R: GATACCTCGCTCCATTTATTG	901
CTX-M-8	F: CGCTTTGCCATGTGCAGCACC R: GCTCAGTACGATCGAGCC	307
CMY	F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462

Results

From a total of 200 diarrheal fecal samples obtained from children, 60 isolates of *Shigella sonnei* were obtained, of which 28 isolates (46.6%) were from boys and 32 isolates (53.3%) belonged to female fecal samples. All the strains obtained in this study were *Shigella sonnei* confirming by the slide agglutination test. The results of antibiotic susceptibility test showed that all (100%) *Shigella sonnei* isolates were sensitive to cotrimoxazole. Also, only eight isolates (13.4%) were resistant to ceftriaxone (Table 2). In the other words, the highest percentage of resistance among the isolates of this study was related to erythromycin (43.3%) and cefepime (40%). From 60 *Shigella* isolates in this study, 19 (31.6%) strains were resistant to three different classes of antibiotics and were considered as MDR.

Table 2. Antibiotic resistance pattern of the isolates under study

Antibiotic	Sensitive (S) (%)	Intermediate (I) (%)	Resistant (R) (%)
Cotrimoxazole	60 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Erythromycin	30 (50)	4 (6.7)	26 (43.3)
Amoxicillin clavulanic acid	40 (66.6)	8 (13.4)	12 (20)
Cefepime	30 (50)	6 (10)	24 (40)
ceftriaxone	40 (86.6)	0 (0.0)	8 (13.4)

The presence or absence of broad-spectrum beta-lactamase genes was studied on all 60 *Shigella sonnei* isolates of the children's diarrheal stool samples. The frequencies of *CMY* and *CTX-M-8* genes were 66.7% (n=40) and 55% (n=33), respectively (Figure 1). All the strains were negative regarding *CTX-M-2* gene (Figure 2).

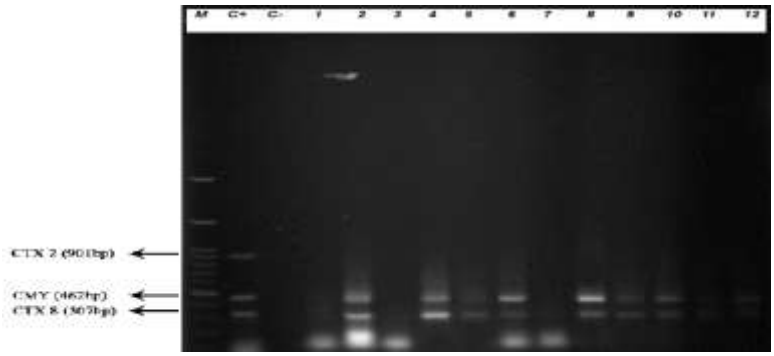
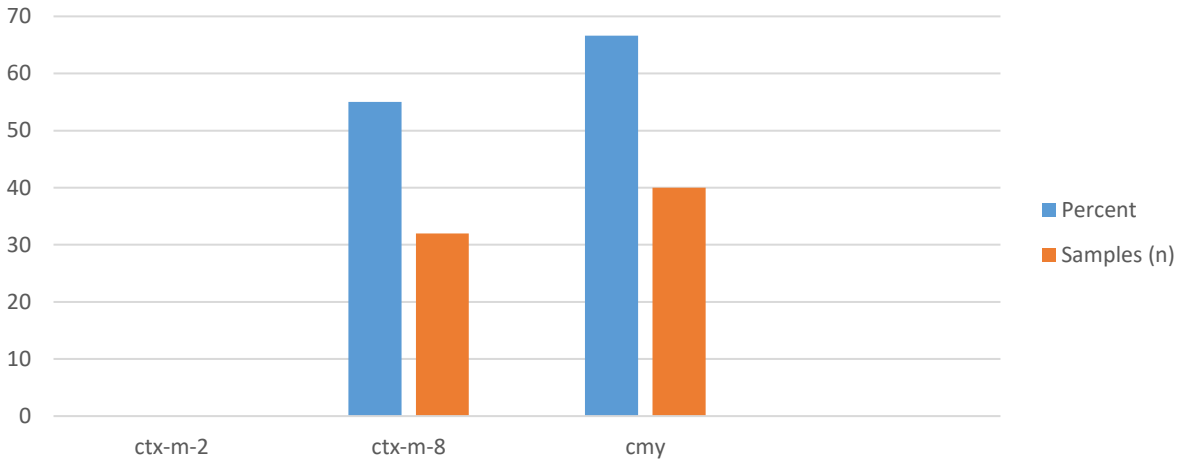


Figure 1. The M-PCR test result on some isolates. C+: Positive control (*E. coli* ATCC 25922), C: Negative control (*Shigella sonnei* ATCC 25931). The numbers 1-12 are clinical strains collected from diarrhea (M: DNA marker: 100 bp, Fermentas).

Figure 2. Number and results of beta-lactamase genes in Sony Shigella samples



Discussion

Shigellosis is endemic worldwide and is the most common cause of bacterial dysentery **(1)**. The disease heals spontaneously in adults, while it is very dangerous in infants and children which can lead to death **(3)**. In developing countries, this disease still remains an important health issue **(4)**.

Due to the increase in antibiotic resistance in intestinal pathogens, it seems that opting a suitable drug to treat these infections has become difficult, thus, determining the drug resistance pattern on a regional and periodic basis seems necessary for this bacterium. In accordance with the present study, Abbaspour *et al.*, **(16)** in 2014 showed that 23.3% and 24.4% of *Shigella sonnei* isolates were resistant to ceftriaxone and cefixime, respectively. In the present study, 31.6% of the strains were MDR and the highest resistance (40%) was related to cefepime. The results showed a significant association (P<0.02) between the presence of ESBL genes and the incidence of resistance to cephalosporins such as cefepime. In a study conducted by Bonnet *et al.*, in 2007 in Brazil, the beta-lactamase genes *CMY-2* and *AmpC* were examined. In line with our study, all the strains with multiple resistance in the Bonnet *et al.*, study contained *CMY* gene **(17)**.

Like our study, Hussain *et al.*, in Pakistan in 2011 showed that the frequencies of *CTX-M* and *CMY* genes were 57.7% and 50%, respectively (18). Contrary to the present study, Mendonça *et al.*, in 2007 in Portugal showed that *blaCTX-M-2* had the highest abundance among other genes in the isolates **(19)**. This difference can be due to differences in the year of the study, geographical distance, variety of strains and sample size. Again, contrary to the present study, the broad-spectrum beta-lactamase gene *CTX-M-2* in cefotaxime-resistant *Shigella sonnei* was detected in Argentina by molecular method in the study conducted by Radice *et al.*, in 2001. The strains containing this gene were reported to be resistant to commonly used cephalosporins **(20)**. This gene was not detected in any of the samples in our study. This difference could be due to the geographical distance and genetics of the strains.

More comprehensive studies are needed to identify different types of beta-lactamase classes and other

resistance genes in *Shigella* strains in the country. Also, by determining the antibiotic resistance pattern and using the appropriate antibiotics when treatment is needed, antibiotic resistance and the spread of resistant strains in the community among human populations can be prevented. One of the salient features of the present study is the simultaneous study of resistance genes using M-PCR method. It is suggested that, the presence of other resistance genes and determining the genetic relationship of these strains should be considered in the future studies.

Conclusion

Based on the present study results, it was found that the highest resistance in *Shigella sonnei* strains was against cefepime and the most common broad-spectrum beta-lactamase gene in these strains was *CMY*. There was a statistically significant association between the presence of *CMY* gene and resistance to cefepime (P<0.05). For the high prevalence of beta-lactam antibiotic resistance genes in *Shigella sonnei* strains, careful medical care and proper and timely use of appropriate antibiotics are essential to prevent the spread of resistant strains.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Fereshteh Shahcheraghi for providing positive control strain. We also thank the staff of the Children's Medical Center (Tehran) for the preparation of microbial strains and the management and the staff of the Pasargad Research Laboratory who assisted in carrying out this project.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۵ ـ مهر و آبان ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف CTX-M-2، CTX-M-8 و ژن CMY وابسته به Ampc در *شیگلا سونئی* جداسازی شده از نمونه‌های اسهال کودکان با روش Multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

مونا کنکوری[۱]، کیومرث امینی*[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴

پذیرش:۱۳۹۹/۰۵/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

کیومرث امینی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

ایمیل:

dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: گونه‌های شیگلا به‌عنوان یکی از عوامل شایع دیسانتری باسیلی و گاهی مرگ‌ومیر به‌ویژه در کودکان و افراد دارای نقص ایمنی مطرح هستند. تنوع گونه‌های ایجادکننده بیماری و بروز مقاومت دارویی، انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان شیگلوزیس را با مشکل مواجه می‌سازد. یکی از عوامل مهم بروز مقاومت در ایزوله‌های شیگلا حضور ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد. لذا، هدف از این مطالعه تعیین فراوانی سویه‌های *شیگلا سونئی* تولیدکننده ژن‌های بتالاکتامازهای CTX-M-2 ، CTX-M-8، CMY با روش Multiplex PCR و بررسی ارتباط آن‌ها باوجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *شیگلا سونئی* است.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در یک بازه زمانی ۶ ماهه از ابتدای خرداد لغایت انتهای آبان ۱۳۹۵ انجام گردید. تعداد ۲۰۰ نمونه اسهالی از بیماران مشکوک به شیگلوزیس از بیمارستان مرکز طبی اطفال (تهران) جمع‌آوری گردید. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار و مطابق با دستورالعمل CLSI انجام شد. پس از استخراج DNA، حضور ژن‌های CTX-M-2 ، CTX-M-8، CMY وابسته به Ampc با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط Multiplex-PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های اخذشده، تعداد ۶۰ (۳۰٪) سویه *شیگلا سونئی* با استفاده از آزمون‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی به‌دست آمد. اکثر سویه‌ها به اریترومایسین (۲۶ سویه، ۴۳/۳٪) و سفپیم (۲۴ سویه ۴۰٪) مقاوم بودند. نتایج آزمون مولکولی نشان داد که ۴۰ (۶۶/۶٪) و ۳۳ (۵۵٪) از سویه‌ها به ترتیب حامل ژن‌های CTX-M-8 و CMY بودند. ($P<0.05$) همچنین ژن CTX-M-2در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر فراوانی بالای ژن CMY در میان ایزوله‌های *شیگلا سونئی* و مقاومت بیشتر این سویه‌ها نسبت به اریترومایسین و سفپیم است. به همین جهت مراقبت‌های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به‌موقع از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت جلوگیری از شیوع ایزوله‌های مقاوم امری اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: *شیگلا سونئی*، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، دیسک دیفیوژن، Multiplex-PCR.

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

گونه‌های شیگلا عضوی از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند که دارای چهار گروه شامل گروه A) شیگلا دیسانتریه)، گروه B) شیگلا فلکسنری)، گروه C) شیگلا بوییدی) و گروه D) شیگلا سونئی) هستند (۱). دوز عفونی کننده شیگلا کمتر از ۲۰۰ باسیل می‌باشد؛ لذا بیماری شیگلوزیس می‌تواند به‌سرعت در میان جوامع با استانداردهای بهداشتی پایین، انتشار یابد (۲). در سراسر جهان، اسهال خونی باکتریایی (دیسانتری‌باسیلی و یا شیگلوزیس) یکی از بیماری‌های حاد دستگاه گوارش حائزاهمیت به‌ویژه در کودکان و افراد با نقص سیستم ایمنی محسوب می‌شود که علاوه بر ضررهای اقتصادی و مشکلات اجتماعی، تلفات زیادی را سبب می‌شود (۳). کم‌اشتهایی، تب، ورم روده، مدفوع خونی-چرکی، دردهای شکمی، زورپیچ و احساس تخلیه ناقص روده با درد مقعدی از علائم این بیماری هستند (۴). تخمین

زده می‌شود که سالیانه ۱۶۵ میلیون مورد دیسانتری باسیلی و ۱/۱ میلیون مرگ در سراسر جهان رخ می‌دهد که حدود ۶۰٪ آن در کودکان زیر پنج سال می‌باشد (۵).

درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و به‌موقع دورهٔ بیماری را کوتاه کرده و سبب کاهش عوارض آن و جلوگیری از انتقال بیماری به افراد سالم می‌شود، اما امروزه با توجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، گونه‌های شیگلا هم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله نسل سوم سفالوسپورین‌ها مقاوم شده‌اند و همین امر درمان این بیماری را با مشکل مواجه کرده است (۶). مهم‌ترین مشکل در درمان افراد مبتلابه شیگلوز بروز مقاومت چند دارویی (multi drug resistance-MDR) است (۷). تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز عمده‌ترین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی به بتالاکتام‌ها است (۸). این آنزیم‌ها حلقه آمیدی بتالاکتام‌ها را تخریب می‌کنند. بتالاکتامازها بر اساس سکانس آمینواسیدی به چهار گروه a تا d تقسیم می‌شوند. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) از بتالاکتامازهای کلاس A بوده و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف با یک زنجیر جانبی اکسی مینو را هیدرولیز می‌کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آزترئونام می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (۹). بتالاکتامازهای CTX-M در سال ۱۹۸۹ برای اولین بار از کشور ژاپن گزارش شدند و پس‌ازآن در نقاط مختلف دنیا گسترش یافتند (۱۰). امروزه این آنزیم‌های بتالاکتاماز به ۵ گروه تقسیم می‌شوند: CTX-M1که در سال ۱۹۸۹ از آلمان گزارش شد (۱۱)، CTX-M-2 در سال ۱۹۸۶ از ژاپن گزارش شد، CTX-M-8در سال ۱۹۹۶ از برزیل گزارش شد (۱۲)، CTX-M-9 در سال ۱۹۹۴ از اسپانیا گزارش گردید و CTX-M-25 در سال ۲۰۰۰ از کانادا گزارش شد (۱۰). این بتالاکتامازها ارتباط کمی با اعضا بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند و در عوض همانندی بالایی میان آنزیم کروموزومی Amp-C بویژه KLU-1 و KLU2 با آنزیم‌های CTX-M وجود دارد و نظریاتی مبتنی بر مشتق بودن این آنزیم‌ها از یک‌گونه وجود دارد (۱۳).

باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در روده انسان و دام‌ها جایگزین شده و کنترل و ریشه‌کنی آن‌ها بسیار دشوار می‌باشد، زیرا ژن‌های ESBL می‌توانند در بین جنس، گونه و سویه‌های مختلف باکتری‌های روده‌ای منتقل شوند (۷). گزارش‌هایی مبنی بر بروز مقاومت چندگانه *شیگلا سونئی* به آنتی‌بیوتیک‌ها و علی‌الخصوص نسل سوم سفالوسپورین‌ها مانند سفوتاکسیم و سفتریاکسون وجود دارد. در سال‌های اخیر بروز پدیده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها نگرانی‌های فراوانی را در جوامع پزشکی به دلیل شکست روند درمان پدید آورده است (۸). با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع‌الطیف در سویه‌های *شیگلا سونئی* و سرعت تشخیص بالا و دقیق روش‌های مولکولی و شناسایی هم‌زمان چندین ژن، لذا هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیفCTX-M-2 ، CTX-M-8و ژن CMY وابسته به Ampc در سویه‌های *شیگلا سونئی* جداسازی شده از نمونه‌های اسهالی با روش Multiplex-PCRو الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها است.

روش پژوهش

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، نمونه‌های مدفوع اسهالی بیماران مشکوک به شیگلوزیس به‌صورت تصادفی از بیمارستان مرکز طبی اطفال (تهران) در یک بازه زمانی ۶ ماهه از ابتدای خرداد لغایت انتهای آبان ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. درمجموع تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع اسهالی در ظروف استریل یک‌بارمصرف مخصوص جمع‌آوری مدفوع شامل ۹۴ نمونه از جنس مذکر و ۱۰۶ نمونه از جنس مؤنث جمع‌آوری شد. نمونه‌ها ازنظر وجود قوام، موکوس و خون به‌صورت ماکروسکوپی و داشتن گلبول سفید و قرمز به‌صورت میکروسکوپی بررسی شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل وجود مدفوع اسهالی به همراه خون، بلغم و موکوس، زورپیچ و عدم مصرف آنتی‌بیوتیک بوده و از معیارهای خروج می‌توان به عدم حضور شیگلا در نمونه‌های کشت مثبت و یا مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک قبل از مراجعه نام برد. نمونه‌های مدفوع در محیط کری-بلیر (مرک، آلمان) در اولین فرصت به آزمایشگاه منتقل شدند. از محیط سلنیت (SF) F-به‌منظور غنی‌سازی نمونه‌ها استفاده گردید. پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سیلیسوس به مدت ۸ ساعت، نمونه‌ها از محیط SF بر روی محیط‌های سالمونلا-شیگلا آگار (SS) و مک¬کانکی آگار (شرکتMerck ، کشور Germany)منتقل و برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سیلیسوس انکوبه شدند. در پایان، جهت افتراق و تأیید گونه‌های شیگلای از آزمون‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، SIM، MRVP، مصرف سیترات، آزمایشTSI ، تولید اوره‌آز، فنیل‌آلانین‌دآمیناز، لیزین دکربوکسیلاز، سدیم مالونات، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه اورنیتین و مانیتول) استفاده گردید. جدایه جداشده با ویژگی‌های بیوشیمیایی: لاکتوز منفی، تولید گاز منفی، بدون حرکت، واکنش، دکربوکسیلاسیون لیزین منفی، سیترات منفی، هیدرولیز اوره منفی و متیل رد مثبت به‌عنوان یک جدایه متعلق به جنس شیگلا، در نظر گرفته شد. آزمون‌های سروتایپینگ با استفاده از کیت‌های شرکت بهارافشان از کشت‌های تازه شیگلا به روش آگلوتیناسیون روی اسلاید انجام گردید (۱ ، ۲).

آزمایش انتشار از دیسک (دیسک دیفیوژن)

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (۱۴) بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) برای آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم – سولفامتوکسازول(25 µg) ، اریترومایسین(30 µg) ، آموکسی‌سیلین(25 µg) ، سفتریاکسون (30 µg) ، سفپیم(30 µg) ، آموکسی کلاو(25 µg) ، (تهیه‌شده از شرکتHimedia ، هندوستان) انجام گردید.

پس از استخراج DNA باکتریایی با استفاده از کیت استخراج DNAژنومیک باکتریایی گرم منفی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران به شماره (Cat no. MBK0041)و تأیید درجه خلوص DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر(Bio-Rad, USA) ، ژن‌هایCTX-M-2 ، CTX-M-8 و CMY با استفاده از روش M-PCR و با استفاده از توالی‌های پرایمری اختصاصی (جدول ۱) در دستگاه ترمال‌سایکلر (اپندورف، آلمان) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (۰/۰۵ U/µL) Taq DNA polymerase، (۳ mM) MgCl2 و (۰/۴ mM) dNTPs ، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۲/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل برای ۳۳ سیکل ردیابی شدند. صحت پرایمرها (primer BLAST) در پایگاه اینترنتی https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ انجام شد. شرایط دمایی در این مطالعه شامل؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم‌بروماید الکتروفورز گردید (شکل ۱). در مطالعه مولکولی از *شیگلا سونئی* ATCC 25931 به‌عنوان کنترل منفی و *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل مثبت (تهیه‌شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران) استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده

Target gene	Primer sequence (3´ to 5´)	Product length (bp)
CTX-M-2	F: TTAATGATGACTCAGAGCATTC R: GATACCTCGCTCCATTTATTG	901
CTX-M-8	F: CGCTTTGCCATGTGCAGCACC R: GCTCAGTACGATCGAGCC	307
CMY	F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462

تجزیه‌وتحلیل آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، آنالیز آماری با استفاده از آزمون پیرسون کای-دو (Pearson-Chi Square) انجام گردید. سطح معنی‌داری در این مطالعه کمتر از ۰/۰۵ در نظر گفته شد.

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۰ نمونه مدفوع اسهالی به‌دست‌آمده از کودکان تعداد ۶۰ جدایه *شیگلا سونئی* به دست آمد که ۲۸ جدایه (۴۶/۶٪) از پسرها و ۳۲ ایزوله (۵۳/۳٪) متعلق به نمونه مدفوع جنس مؤنث بود. تمامی سویه‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه با استفاده از نتایج آزمون آگلوتیناسیون اسلایدی *شیگلا سونئی* بودند.

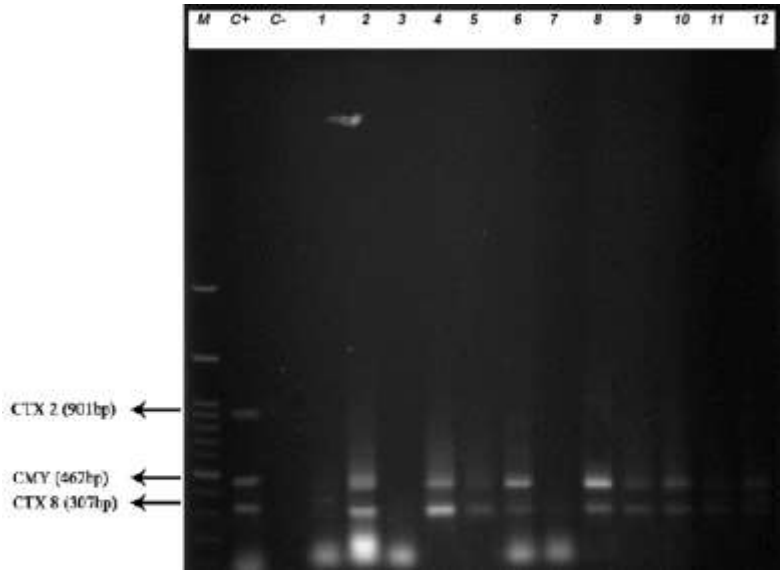
نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمامی (۱۰۰٪) ایزوله‌های *شیگلا سونئی* به کوتریموکسازول حساس بودند. همچنین تنها هشت سویه (۱۳/۴٪) از سویه‌های *شیگلا سونئی* به سفتریاکسون مقاوم بودند (جدول ۲). به‌عبارت‌دیگر، بیشترین درصد مقاومت در بین ایزوله‌های تحت مطالعه مربوط به اریترومایسین (۴۳/۳٪) و سفپیم (۴۰٪) بود. از مجموع ۶۰ جدایه شیگلا در این مطالعه، ۱۹ (۳۱/۶٪) سویه به سه کلاس مختلف آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند و به‌عنوان MDR در نظر گرفته شدند.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تحت مطالعه

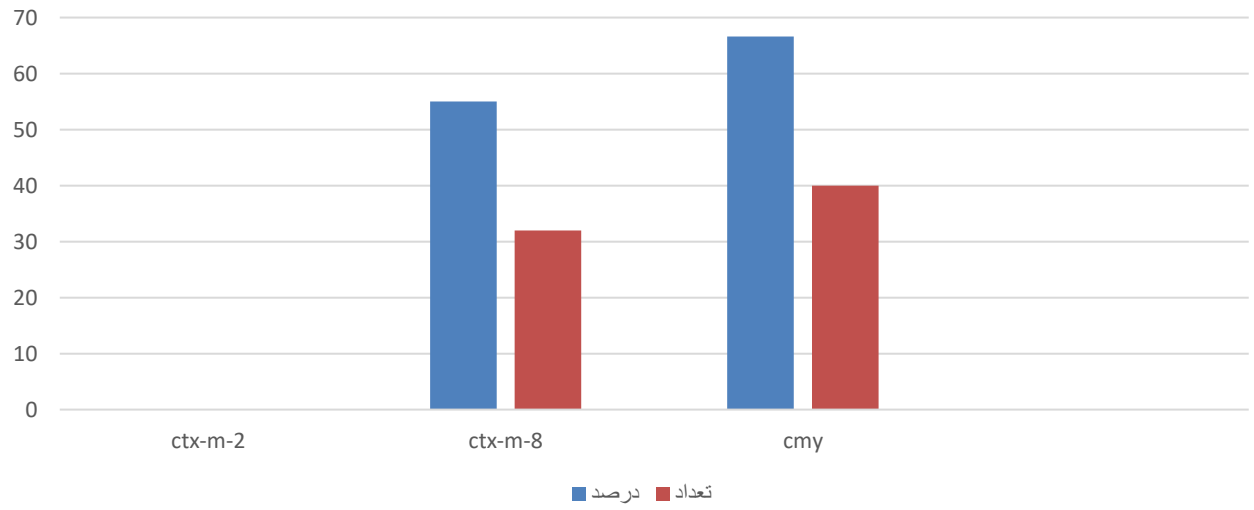
Antibiotic	Sensitive (S) (%)	Intermediate (I) (%)	Resistant (R) (%)
Cotrimoxazole	60 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Erythromycin	30 (50)	4 (6.7)	26 (43.3)

Amoxicillin clavulanic acid	40 (66.6)	8 (13.4)	12 (20)
Cefepime	30 (50)	6 (10)	24 (40)
ceftriaxone	40 (86.6)	0 (0.0)	8 (13.4)

وجود یا عدم وجود ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بر روی تمامی ۶۰ ایزوله *شیگلا سونئی* جداشده از نمونه مدفوع اسهالی کودکان انجام شد. فراوانی ژن‌های CMY و CTX-M-8به ترتیب برابر ۶۶/۷٪ (n=۴۰) و ۵۵٪ (n=۳۳) بود (شکل ۱). تمامی سویه‌ها ازنظر وجود ژن CTX-M-2 منفی بودند (شکل ۲).



شکل ۱. نتیجه آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از جدایه‌ها :C+ .کنترل مثبت (*اشریشیا کلی* ATCC 25922)، :Cکنترل منفی (*شیگلا سونئی* ATCC 25931)، نمونه‌های ۱۲-۱ سویه‌های بالینی جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های اسهالی و.M (DNA size marker 100 bp, Fermentas)



شکل ۲. فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز در نمونه‌های *شیگلا سونئی*

بحث

شیگلوزیس در تمام جهان اندمیک بوده و شایع‌ترین عامل ایجاد اسهال خونی باکتریایی است (۱). این بیماری در بالغین خودبه‌خود بهبود می‌یابد، درحالی‌که در نوزادان و کودکان بسیار خطرناک بوده و می‌تواند به مرگ منتهی شود (۳). در کشورهای درحال‌توسعه این بیماری همچنان به‌عنوان یک مسئلهٔ مهم بهداشتی می‌باشد (۴).

نظر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های روده‌ای، به نظر می‌رسد اتخاذ یک داروی مناسب جهت درمان این عفونت‌ها با مشکل مواجه شده است، لذا تعیین الگوی مقاومت دارویی به‌صورت منطقه‌ای و دوره‌ای برای این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. مطابق بامطالعه حاضر، Abbaspour و همکاران (۱۶) در سال ۱۳۹۳ نشان دادند که ۲۳/۳٪ از جدایه‌های *شیگلا سونئی* به سفتریاکسون و ۲۴/۴٪ به سفیکسیم، مقاوم بوده‌اند. در مطالعه پیش رو ۳۱/۶٪ از سویه‌ها MDR بودند و بیشترین میزان مقاومت (۴۰٪) سویه‌ها مربوط به سفپیم بود. نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری ($P<۰/۰۲$) بین حضور ژن‌های ESBLs و بروز مقاومت به سفالوسپورین ها نظیر سفپیم وجود دارد. در مطالعه‌ای که Bonnet و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور برزیل انجام دادند، ژن بتالاکتاماز CMY-2 و AmpC بررسی شدند. مطابق بامطالعه پیش رو، تمامی سویه‌های دارای مقاومت چندگانه در مطالعهٔ Bonnet و همکاران دارای ژن CMY بودند (۱۷). همانند مطالعه حاضر، Hussain و همکاران در تحقیقات خود در سال ۲۰۱۱ در پاکستان نشان دادند که فراوانی ژن CTX-M و CMY به ترتیب برابر ۵۷/۷٪ و ۵۰٪ بود (۱۸). مغایر بامطالعه پیش رو، Mendonça و همکاران در سال ۲۰۰۷ در پرتقال نشان دادندکه blaCTX-M-2 دارای بیشترین فراوانی در بین سایر ژن‌ها در میان ایزوله‌های جداسازی شده بودند (۱۹). این اختلاف می‌تواند درنتیجه اختلاف در سال انجام مطالعه، فاصله جغرافیایی، تنوع سویه‌ها و حجم نمونه باشد. در تضاد بامطالعه پیش رو، ژن بتالاکتاماز وسیع‌الطیف CTX-M-2 در باکتری *شیگلا سونئی* مقاوم به سفوتاکسیم در کشور آرژانتین توسط Radice و همکاران در سال ۲۰۰۱ با روش مولکولی ردیابی شد. گزارش شد که سویه‌های واجد این ژن نسبت به سفالوسپورین‌های مصرف‌شده رایج، مقاومت داشتند (۲۰). درصورتی‌که این ژن در هیچ‌یک از نمونه‌های مطالعه ما شناسایی نگردید و این اختلاف می‌تواند به دلیل فاصله جغرافیایی و ژنتیک سویه‌ها باشد.

مطالعات وسیع‌تر و جامع‌تری جهت شناسایی انواع کلاس‌های بتالاکتاماز و سایر ژن‌های مقاومتی در سوی های شیگلا در کشور نیاز می‌باشد. همچنین با تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در مواقعی که نیاز به درمان باشد می‌توان از مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری به عمل آورد و از انتشار سویه‌های مقاوم در جامعه در بین جمعیت‌های انسانی ممانعت کرد. از ویژگی‌های برجسته مطالعه حاضر بررسی هم‌زمان ژن‌های مقاومتی با استفاده از روش M-PCR می‌باشد. از سوی دیگر پیشنهاد می‌گردد در بررسی‌های آتی وجود سایر ژن‌های مقاومتی و تعیین ارتباط ژنتیکی این سویه‌ها مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که بیشترین مقاومت در سویه‌های *شیگلا سونئی* نسبت به سفپیم می‌باشد و شایع‌ترین ژن بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در این سویه‌ها CMY می‌باشد. ازنظر آماری بین حضور ژن‌های CMY و مقاومت به سفپیم ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). پیشنهاد می‌گردد با توجه به شیوع بالای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در سویه‌های *شیگلا سونئی*، مراقبت‌های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به‌موقع از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر فرشته شاه‌چراغی به خاطر تهیه سویه کنترل مثبت تشکر و قدردانی می‌کنند. همچنین، تمامی نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از کارکنان بیمارستان مرکز طبی اطفال برای تهیه سویه‌های میکروبی و از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام و اجرای این پروژه یاری رساندند کمال تشکر راداریم.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Jafari M, Ghasemi Kia L, Mohsen M, Alimadadi H, Abbasi A, Pournajaf A, et al . Plasmid-mediated quinolone resistance in Shigella sonnei and Shigella flexneri isolated from pediatric diarrheal. JMJ. 2019; 17 (1): 8-14.
2. Tajoadini M, Kheyrkhah B, Amini K. Detection of blaPER, blaGES and blaVEB Genes in Shigella sonnei Isolates from Patients with Diarrhea and Determination of Antibiotic Susceptibility Pattern. J Ardabil Univ Med Sci. 2018; 18 (1): 52-61. [DOI:10.29252/jarums.18.1.52]
3. Mosadegh S, Moradli G . Molecular analysis of genes of ESBL SHV.TEM.CTX in Shigella Sonnei isolated from clinical samples by PCR. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19 (2):98-108.
4. Goldberg M, Calderwood SB, Edwards MS, Bloom A. Shigella infection: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Recuperado el, 2013. p. 14:4-130.
5. Ranjbar R, Dallal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. Journal of health, population, and nutrition, 2008. 26(4): p.426-432. [DOI:10.3329/jhpn.v26i4.1884] [PMID] [PMCID]
6. Dallal MM, Eghbal M, Sharafianpour A, Zolfaghari MR, Yazdi MK. Prevalence and multiple drug resistance of Shigella sonnei isolated from diarrheal stool of children. Journal of Medical Bacteriology, 2015. 4(3-4): p. 24-9.
7. Abbasi E, Abtahi H, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Multidrug-resistant Shigella infection in pediatric patients with diarrhea from central Iran. Infect Drug Resist. 2019: 7; 12:1535-1544. [DOI:10.2147/IDR.S203654] [PMID] [PMCID]
8. Li J, Li B, Ni Y, Sun J. Molecular characterization of the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Shigella spp. in Shanghai. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(3):447- 51. [DOI:10.1007/s10096-014-2244-2] [PMID]
9. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen, JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J. 1991; 276: 269-270. [DOI:10.1042/bj2760269] [PMID] [PMCID]
10. Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β-lactamase in clinical isolates of Shigella sonnei, Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae in Korea. J Clin Microbiol. 2001; 39(10):3747-9. [DOI:10.1128/JCM.39.10.3747-3749.2001] [PMID] [PMCID]
11. Cheddie P, Dziva F, Akpaka PE. Detection of a CTX-M group 2 beta-lactamase gene in a Klebsiella pneumoniae isolate from a tertiary care hospital, Trinidad and Tobago. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017 May 8; 16(1):33. [DOI:10.1186/s12941-017-0209-x] [PMID] [PMCID]
12. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012 Apr 2; 3:110. [DOI:10.3389/fmicb.2012.00110] [PMID] [PMCID]
13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-686. [DOI:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005] [PMID] [PMCID]
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement. Wayne, PA 2017. M100-S27.
15. Dominguez JE, Redondo LM, Figueroa Espinosa RA, Cejas D, Gutkind GO, Chacana PA, Di Conza JA, Fernández Miyakawa ME. Simultaneous Carriage of mcr-1 and Other Antimicrobial Resistance Determinants in Escherichia coli From Poultry. Front Microbiol. 2018 Jul 25; 9:1679. [DOI:10.3389/fmicb.2018.01679] [PMID] [PMCID]
16. Abbaspour S, Mardaneh J, Ahmadi K. The survey of shigellosis frequency and determination of antibiotic resistance profile of isolated strains from infected children in Tehran. Iran South Med J. 2014 Apr; 17(1): 42-48.
17. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 2004: 48:1-14. [DOI:10.1128/AAC.48.1.1-14.2004] [PMID] [PMCID]
18. Hussain M, Hasan F, Shah AA, et al. Prevalence of class A and AmpC β-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. Jpn J Infect Dis. 2011;64(3):249-252.
19. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing escherichia coli clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jun;51(6):1946-55. [DOI:10.1128/AAC.01412-06] [PMID] [PMCID]
20. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Feb;46(2):602-4. [DOI:10.1128/AAC.46.2.602-604.2002] [PMID] [PMCID]