مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی پلی‌مورفیسم ژنومی *AmpC* شیگلا سونئی جداشده از نمونه‌های بالینی به روش PCR-RFLP

ابوالفضل عباسی، کیومرث امینی*

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: شیگلا (*Shigella*) باسیل گرم منفی روده‌ای است که عفونت‌های ناشی از آن مشکلات جدی را در کشورهای پیشرفته و درحال‌توسعه ایجاد کرده است. وجود ژن‌های بتالاکتامازی مانند *ampC* در گونه‌های شیگلا در یک کشور باعث بروز الگوهای متنوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک شده است که شیوع این ژن‌ها می‌تواند خطرات بسیار جدی برای سلامت جامعه داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن بتالاکتاماز *ampC* در سویه‌های شیگلا *سونئی* و همچنین بررسی شیوع یک جهش نقطه‌ای در این ژن به روش RFLP بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا ۶۰ سویه شیگلا *سونئی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و میکروبی شناسایی شد، سپس با روش PCR تکثیر ژن AmpC در سویه‌ها انجام گردید. در ادامه بررسی جهش نقطه‌ای در این ژن بر روی نمونه‌هایی که ازنظر ژن *ampC* مثبت بودند صورت گرفت. تکنیک RFLP با استفاده از آنزیم Hinf1 انجام شد.

نتایج: از ۶۰ سویه جداشده ۳۰ سویه (۵۰ درصد) دارای ژن بتالاکتاماز *ampC* بودند. از این تعداد ۳۷ درصد از ژن‌های *ampC* دارای جهش نقطه‌ای (G به A) بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعات نشان‌دهنده افزایش شیوع ژن *ampC* و شیوع قابل‌توجهی جهش نقطه‌ای (G به A) در این در سویه‌های حامل این ژن بود که این موتاسیون ممکن است در افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: شیگلا *سونئی*، ژن بتالاکتاماز *ampC*، RFLP-PCR

مقدمه

بیماری اسهال عامل مهم مرگ‌ومیر کودکان در کشورهای درحال‌توسعه است. تخمین زده می‌شود که سالانه ۴ تا ۶ میلیون کودک براثر بیماری‌های اسهال، جان خود را از دست می‌دهند. دیسانتری یک بیماری عفونی التهابی روده است که توسط میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌شود که مخاط روده را موردتهاجم قرار می‌دهند. شیگلا، کوکوباسیل گرم منفی، بی‌حرکت، فاقد اسپور و کپسول و بی‌هوازی اختیاری است (۱). این ارگانیسم در خانواده انتروباکتریاسیه قرار دارد و عامل شیگلوز یا اسهال خونی باسیلی (دیسانتری باسیلی) است که فقط در انسان‌ها رواج دارد و در آن اپی تلیوم روده‌ای موردتهاجم و تخریب التهابی قرار می‌گیرد. جنس شیگلا ۴ زیرگروه دارد شامل: *شیگلا دیسانتری*، *شیگلا فلکسنری*، *شیگلا بوئیدی* و *شیگلا سونئی* که تمامی آن‌ها می‌توانند موجب دیسانتری باسیلی شیگلوز شوند که باوجود خون و موکوس در مدفوع مشخص می‌شود (۲). مشکل اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها ظهور سویه‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug resistance-MDR) است که اغلب منجر به طولانی شدن زمان بستری بیمار، افزایش مورتالیتی و موبیدیتی، بالا رفتن هزینه درمانی در مقایسه با میکروب‌های حساس به آنتی‌بیوتیک و سرانجام شکست درمانی (Drug Therapeutic Failure-DTF) می‌گردد (۳).

بتالاکتامازها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز هسته مرکزی حلقه بتالاکتام سبب غیرفعال شدن این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. آمبلر این آنزیم‌ها را بر اساس ساختمان اولیه‌شان به ۴ گروه (A-

***نویسنده مسئول: کیومرث امینی**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-6419-3417

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]

D) تقسیم‌بندی نمود که نوع B متالوبتالاکتاماز (MBLs)، نوع C همان سفالوسپورینازها و نوع A همان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) می‌باشند (۴) آنزیم‌های نوع Amp-C در شیگلا سونئی شناسایی‌شده است. ژن کد کننده این آنزیم‌ها بر روی کروموزم یا پلاسمید قرار دارند. باکتری‌های حاوی این آنزیم قادر به هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین، سفازولین، سفوکسیتین، بیشتر پنی‌سیلین‌ها و ترکیبات بتالاکتام‌های ممانعت کننده بتالاکتاماز می‌باشند (۵). در بسیاری از باکتری‌ها، آنزیم‌های AmpC القایی هستند و در اثر موتاسیون در میزان بالا بیان می‌شوند. بیان بسیار بالا، باعث مقاومت باکتری‌ها به سفالوسپورین‌ها شامل سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتریاکسون می‌شوند. در بعضی از باکتری‌ها از قبیل *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیا کلی* و *پروتئوس*، ژن کد کننده این آنزیم‌ها بر روی پلاسمید قرار دارد. مقاومت به‌واسطه این آنزیم‌ها بسیار کمتر از بتالاکتامازهای با طیف وسیع است (۶). امروزه، افزایش شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بواسطهٔ بتالاکتامازهای نوع AmpC در بین سویه‌های *شیگلا سونئی* به یک نگرانی بالینی تبدیل‌شده است. این ارگانیسم‌ها می‌توانند توانایی تولید بتالاکتاماز نوع AmpC را بر روی پلاسمید کسب کنند. علاوه بر آن‌که این‌ها می‌توانند بتالاکتاماز نوع AmpC نوع کروموزومی را به مقدار زیاد تولید کنند درحالی‌که در حالت طبیعی این آنزیم‌ها به مقدار کم تولید می‌شوند (۷، ۸). همان‌طور که گفته شد AmpC در کلاس C گروه بوش بتالاکتامازی قرار می‌گیرد و شامل CMY, LAT, BIL, ACT, MOX, FOX, DHA, ACC هستند که از این میان CMY-2 شایع‌ترین و رایج‌ترین نوع توزیع‌شده جغرافیایی این گروه است. به دلیل تنوع بالای ژنومی AmpC و گسترش این ژن در اعضای انتروباکتریاسه و اهمیت شیگلا در کشورهای درحال‌توسعه، هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی مولکولی پلی‌مورفیسم ژنومی AmpC در سویه‌های *شیگلا سونئی* جداشده از موارد بالینی به روش PCR-RFLP است.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

این مطالعه توصیفی – مقطعی در یک بازه زمانی ۹ ماهه از ابتدای مهر ۱۳۹۶ لغایت انتهای خرداد سال ۱۳۹۷ انجام گردید. این مطالعه بر روی ۶۰ سویه *شیگلا سونئی* که قبلاً در آزمایشگاه پاسارگاد (واقع در تهران) جمع‌آوری‌شده بود انجام گردید. به‌منظور تائید مجدد تمامی نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی سالمونلا-شیگلا آگار (SS)، (شرکت Merck، کشور Germany) کشت داده شدند. پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس از آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر اکسیداز، کاتالاز، SIM، MR-VP، مصرف سیترات، آزمایش TSI، تولید اوره‌آز، فنیل‌آلانین دآمیناز، لیزین‌دکربوکسیلاز، مصرف سدیم‌مالونات، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه اورنیتین و مانیتول، XLD، تولید سولفید هیدروژن (H_2S) جهت شناسایی سویه‌ها استفاده شد (۹، ۱۰).

۲- بررسی حضور ژن بتالاکتاماز ampC و پلی مورفیسم آن با استفاده از تکنیک RFLP-PCR

بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک و سرولوژیک، استخراج DNA باکتری انجام شد. بدین منظور از روش Boiling (جوشاندن) استفاده گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج‌شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. توالی الگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده‌شده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است (جدول ۱)(۱۱).

جدول ۱- توالی پرایمر مورداستفاده جهت انجام PCR

نام ژن	پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	منبع	PCR fragment size(bp)	Endonuclease used in RFLp analysis	SNP detected (position)
ampC	1160 1428	CCTGACCCAGGACAAGATGC AGGTTGGCATCGACGAAGCGC	(۱۱)	489	*HinfI*	C→T(1060) G→A(1150)

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]

۲-۱ تکنیک PCR

پس از BLAST آغازگرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۷/۵ میکرو لیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، 3 mM ($MgCl_2$) و dNTPs (0.4mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرو لیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۴/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به‌صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت.

۲-۲ تکنیک RFLP

واکنش RFLP توسط آنزیم Hinf1 از شرکت فرمنتاز انجام شد. به‌منظور انجام هضم آنزیم مقادیر طبق جدول ۲ بر روی‌هم ریخته شد و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و درنهایت به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۲). در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم‌بروماید (0.5µg/ml) الکتروفورز گردید. در تمامی مراحل فوق از *شیگلا سونئی* ATCC 9290 به‌عنوان کنترل مثبت و از *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

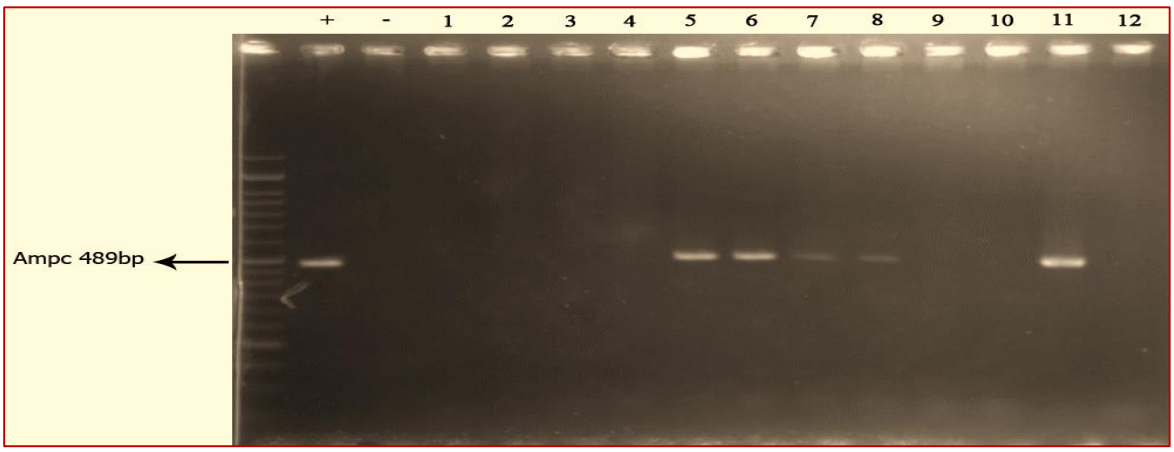
نتایج

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع ۶۰ نمونه شیگلا سونئی، ۳۰ (۵۰٪) سویه دارای ژن ampC بودند (شکل ۱).

پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم شده بر روی ژل آگارز جداسازی شدند. همان‌طور که در آنالیز برش آنزیم Hinf1 مشاهده شد انتظار می‌رود که بعد از برش آنزیمی ۲ قطعه ۳۴۹ بازی و ۱۴۰ بازی مشاهده شود (شکل ۲). درصورتی‌که در اثر

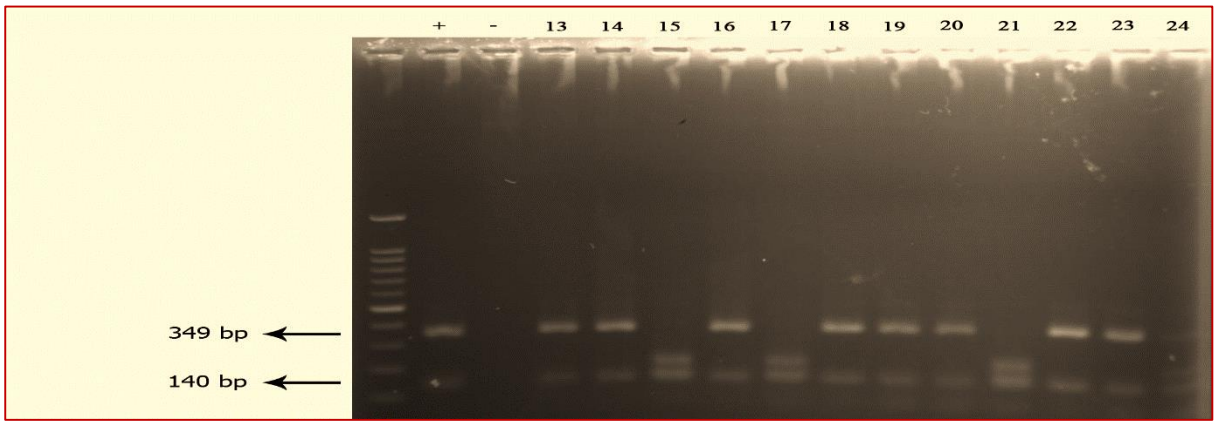
جدول ۲. مقادیر و مواد مورد استفاده در واکنش *RFLP*

ماده	مقدار (میکرولیتر)
بافر R	۳
آب	۱۶
محصول PCR	۱۰
آنزیم Hinf1	۱



شکل ۱- آزمون PCR جهت تکثیر ژن *AmpC* چاهک اول: کنترل مثبت- چاهک دوم: کنترل منفی- نمونه‌های موردبررسی از چاهک شماره ۱ تا شماره ۱۲. سایز مارکر ۵۰bp

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]



شکل ۲- چاهک اول: کنترل مثبت- چاهک دوم: کنترل منفی- نمونه‌های موردبررسی از چاهک سیزدهم تا بیست و چهارم. نتایج آزمون RFLP-PCR و وجود باندهای bp ۱۴۰ و bp ۳۴۹. سایز مارکر 1kb

جهش نوکلئوتید گوانین (G) به آدنین تبدیل شود جایگاه برش آنزیم از بین می‌رود و محصول PCR ما برش نخواهد خورد. از تعداد ۳۰ سویه دارای ژن ampC تعداد ۱۹ سویه (۶۳٪) توسط آنزیم Hinf1 برش خورد و دو قطعه ۱۴۰ بازی و ۳۴۹ بازی تشکیل شد و تعداد ۱۱ سویه (۳۷٪) برش نخوردند که نشان‌دهنده این است که ۱۱ سویه دارای این جهش بودند.

بحث

بیماری‌های اسهالی یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده‌ی سلامت در دنیا بخصوص در کشورهای درحال‌توسعه هستند که در کودکان از اهمیت بالائی برخوردارند. شیگلا نقش مهمی در ایجاد اسهال‌های خونی در بین پاتوژن‌های عامل اسهال دارد. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک به‌عنوان یک واکنش دفاعی به‌وسیله‌ی عوامل عفونت‌زا رخ می‌دهد (۱۳). ظهور سویه‌های مقاومت دارویی متفاوت در نقاط مختلف جهان گزارش‌شده است. با توجه به تحقیقات رنجبر و همکاران توزیع سرگروه‌های شیگلا در ایران به ترتیب اهمیت شامل: *شیگلا سونئی* ۵۸/۹٪، *شیگلا فلکسنری* ۳۶/۴٪، *شیگلا بوئیدی* ۳/۳٪ و *شیگلا دیسانتری* ۱/۳٪ است. به همین علت مطالعه‌ی ما صرفاً بر روی گونه سونئی انجام شد (۱۴). مواد ضد میکروبی بتالاکتام در حال حاضر رایج‌ترین درمان برای عفونت‌های باکتریایی می‌باشند. استفاده بی‌رویه از آن‌ها منجر به بروز مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در سراسر جهان شده است. آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز و غیرفعال می‌کنند. آنزیم‌های AmpC تیپیک که سفالوسپورینازهای مقاوم به اسید کلاولانیک می‌باشند باعث مقاومت در برابر اغلب اکسی امینوسفالوسپورین‌ها می‌گردند. امروزه شاهد جهش‌هایی در ژنAmpC هستیم که منجر به افزایش فعالیت آن‌ها در برابر سفالوسپورین‌های نسل چهارم شده است. چنین جهش‌هایی در انواع کروموزومی جدایی‌ناپذیر AmpCرخ‌داده است، اما آن‌ها می‌توانند به‌صورت همسان از انواع پلاسمیدی AmpC گسترش یابد. با توجه به اهمیت باکتری شیگلا سونئی و مقاومت بالای این باکتری هدف از این مطالعه بررسی مولکولی پلی‌مورفیسم ژنومی AmpC شیگلا سونئی جداشده از نمونه‌های بالینی به روش PCR-RFLP است.

مطالعات انجام‌شده حاکی از افزایش شیوع این ژن در بین باکتری‌ها است. به‌طوری‌که در مطالعه‌ی که بر روی ۲۰۲ باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در کشور هند انجام شد. ژن‌های بتالاکتاماز ampC و ESBL (بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف) و متالوبتالاکتاماز موردبررسی قرار گرفتند. که ۱۲۰ نمونه دارای AmpC بودند. (۳۰/۳٪) هم‌زمان AmpC و ESBL را دارا بودند و (۴۶/۶٪) ampC و متالوبتالاکتاماز را به‌طور هم‌زمان داشتند (۱۵، ۱۶). در این مطالعه سطح بالایی از MDRها ژن بتالاکتاماز را حمل می‌کردند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع ۶۰ نمونه شیگلا سونئی، ۳۰ (۵۰٪) سویه دارای ژن ampC بودند. نیاکان و همکاران در سال ۱۳۸۷ به بررسی شیوع ژن بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ampC در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* پرداختند. از ۱۶۸ ایزوله بالینی *کلبسیلا پنومونیه* (۷۰/۸٪)۱۱۹ ایزوله در غربالگری اولیه، ازنظر تولید ESBLs مثبت بودند که (۸۳/۲٪)۹۹ ایزوله در آزمون فنوتیپی

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]

تأییدی مثبت شدند و (۸/۴٪)۱۰ ایزوله دارای ژن‌های ampC بودند (۱۷). همچنین در سال ۲۰۰۵ Huang و همکاران ۴۷ سویه *شیگلا سونئی* از کودکان دو مدرسه جداسازی کردند که بررسی پروفایل مقاومتی این سویه‌ها حاکی از مقاومت به سفتریاکسون در ۲۱٪ این سویه‌ها بود که بررسی‌های مولکولی نشان داد که ژن ampC مسئول مقاومت به سفتریاکسون در این سویه‌ها است (۱۸). Mirelis و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی ۷۷ ایزوله کلینیکی *اشرشیا کلی* ازنظر ESBLs به این نتیجه رسیدند که ژن ampC در ۲۴٪ ایزوله‌ها وجود دارد (۱۹). در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر شیوع کمتری از این ژن گزارش شد که دلیل این امر می‌تواند تفاوت قدیمی‌تر بودن مطالعه مطالعات ذکرشده بوده که مقایسه مطالعه ما و آن‌ها نشان‌دهنده سیر افزایشی شیوع این ژن است.

در تعدادی از ایزوله‌های حامل ژن از باکتری‌های دارای ژن ampC، شاهد شیوع ۳۷ درصدی جهش نقطه‌ای در این ژن دیده می‌شود. مطالعه‌ی Corvec و همکاران نیز نشان داد که موتاسیون در ناحیه ۱۱- از پروموتور این ژن در *اشرشیا کلی* باعث افزایش بیان این ژن می‌شود (۲۰). همچنین مطالعه Flury و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ۲۴ ایزوله *انتروباکتر کلوآکه* که مقاومت سطح بالا به کارباپنم‌ها و سفالوسپورین‌ها داشتند، نشان داد که در هرکدام از این ۲۴ ایزوله ۲۱-۳ موتاسیون نقطه‌ای وجود دارد که این موتاسیون‌ها باعث افزایش بیان ampC شده بودند که توجیه‌کننده مقاومت مشاهده‌شده در برابر سفالوسپورین‌ها بود (۲۱). درواقع جهش‌های نقطه‌ای می‌توانند دلیلی برای تغییر ساختار این بتالاکتاماز در طول تکامل باشند که منجر به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است؛ بنابراین مـی‌توانند به‌عنوان خطری جـدی جـامعه را تهدید کند (۱۷). به همین دلیل پایش شیوع و همچنین جهش‌های موجود در ژن‌های بتالاکتاماز در جوامع مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه و مطالعات قبلی انجام‌شده حاکی از روند رو به افزایش شیوع ژن ampC است؛ که این امر باعث افزایش مقاومت به سفالوسپورین‌ها که آنتی‌بیوتیک‌های کلیدی در درمان عفونت‌ها بوده شده و درمان عفونت باکتری‌ها را مشکل می‌کند. از طرفی با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات شاهد موتاسیون‌هایی در این ژن هستیم که می‌تواند دال بر تغییر ساختار این بتالاکتاماز در طول تکامل است که به دلیل جهش‌های نقطه‌ای ممکن است مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را افزاش دهند بنابراین می‌توانند به‌عنوان خطری جدی جامعه را تهدید کند لذا بررسی فعالیت این آنزیم در سویه‌های دارای موتاسیون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ و همچنین باید به این سویه‌های دارای موتاسیون توجه ویژه شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر از پروژه پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۶۵۴ ثبت‌شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه است. نویسندگان مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد (تهران) که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

در بین نویسندگان هیچ‌گونه تضاد و تعارضی وجود ندارد.

References

1. Nüesch-Inderbinen M, Heini N, Zurfluh K, Althaus D, Hächler H, Stephan R. Shigella antimicrobial drug resistance mechanisms, 2004–2014. Emerging Infectious Diseases. 2016;22(6):1083.
2. Rheingans RD, Constenla D, Antil L, Innis BL, Breuer T. Economic and health burden of rotavirus gastroenteritis for the 2003 birth cohort in eight Latin American and Caribbean countries. Revista Panamericana de Salud Pública. 2007;21:192-204.
3. Bhattacharya D, Sugunan A, Bhattacharjee H, Thamizhmani R, Sayi D, Thanasekaran K, et al. Antimicrobial resistance in Shigella-rapid increase & widening of spectrum in Andaman Islands, India. The Indian Journal of Medical Research. 2012;135(3):365.
4. Nath R, Saikia L, Choudhury G, Sharma D. Drug resistant Shigella flexneri in & around Dibrugarh, north-east India. The Indian Journal of Medical Research. 2013;137(1):183.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]

5. Paetzold S, Lourido S, Raupach B, Zychlinsky A. Shigella flexneri phagosomal escape is independent of invasion. Infection and Immunity. 2007;75(10):4826-30.
6. Jennison AV, Verma NK. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiology Reviews. 2004;28(1):43-58.
7. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(1):134-56.
8. Arevalillo JM, Sztein MB, Kotloff KL, Levine MM, Simon JK. Identification of immune correlates of protection in Shigella infection by application of machine learning. Journal of Biomedical Informatics. 2017;74:1-9.
9. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(2):718-21.
10. Khan S, Singh P, Ansari M, Asthana A. Isolation of Shigella species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014;4(1):30-4.
11. Altuntaş M, Durmuş SY, Öz N, Akışoğlu HÖA, Kaman A, Teke TA, et al. A Case of Encephalopathy Caused by Ceftriaxone Resistant Shigella flexneri. Cocuk Enfeksiyon Dergisi. 2018;12(3):E118-E20.
12. Doern CD, Dunne WM, Burnham C-AD. Detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) production in non-Klebsiella pneumoniae Enterobacteriaceae isolates by use of the Phoenix, Vitek 2, and disk diffusion methods. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(3):1143-7.
13. Holt KE, Baker S, Weill F-X, Holmes EC, Kitchen A, Yu J, et al. Shigella sonnei genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. Nature Genetics. 2012;44(9):1056.
14. Ud-Din AI, Wahid SU, Latif HA, Shahnaij M, Akter M, Azmi IJ, et al. Changing trends in the prevalence of Shigella species: emergence of multi-drug resistant Shigella sonnei biotype g in Bangladesh. PloS One. 2013;8(12):e82601.
15. Cunningham SA, Noorie T, Meunier D, Woodford N, Patel R. Rapid and simultaneous detection of genes encoding Klebsiella pneumoniae carbapenemase (bla KPC) and New Delhi metallo-β-lactamase (bla NDM) in Gram-negative bacilli. Journal of Clinical Microbiology. 2013;51(4):1269-71.
16. Mulu W, Abera B, Yimer M, Hailu T, Ayele H, Abate D. Bacterial agents and antibiotic resistance profiles of infections from different sites that occurred among patients at Debre Markos Referral Hospital, Ethiopia: a cross-sectional study. BMC Research Notes. 2017;10(1):254.
17. Bonomo RA. New Delhi metallo-β-lactamase and multidrug resistance: a global SOS? Clinical Infectious Diseases. 2011;52(4):485-7.
18. Huang IF, Chiu CH, Wang MH, Wu CY, Hsieh KS, Chiou CC. Outbreak of dysentery associated with ceftriaxone-resistant Shigella sonnei: first report of plasmid-mediated CMY-2-type AmpC β-lactamase resistance in S. sonnei. Journal of clinical microbiology. 2005 Jun 1;43(6):2608-12.
19. Miller M, Sentz J, Rabaa M, Mintz E. Global epidemiology of infections due to Shigella, Salmonella serotype Typhi, and enterotoxigenic Escherichia coli. Epidemiology & Infection. 2008;136(4):433-5.
20. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Marraillac J, Reynaud A. − 11 mutation in the ampC promoter increasing resistance to β-lactams in a clinical Escherichia coli strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002;46(10):3265-7.
21. Flury BB, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Loy R, et al. Association of novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in ampD with cephalosporin resistance and phylogenetic variations in ampC, ampR, ompF, and ompC in Enterobacter cloacae isolates that are highly resistant to carbapenems. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016;60(4):2383-90.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]

Original Article

Molecular Analysis of AmpC Genomic Polymorphism in Shigella Sonnei Isolated from CLinical Specimens by PCR-RFLP Method

Abassi A, Amini K*

Department of Microbiolog, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 13 Jan 2020 Accepted: 01 May 2020

Abstract

Background & Objective: *Shigella* is a gram-negative bacillus that has caused serious infection problems in developed and developing countries. The existence of beta-lactamase genes such as AmpC in *Shigella* species in one country has led to a variety of antibiotic resistance patterns, which can have very serious health risks for the community. The aim of this study was to investigate the prevalence of AmpC β-lactamase gene in *S. sonnei* strains and determine the prevalence of a spot mutation in this gene by RFLP method.

Materials & methods: Sixty strains of *S. sonei* were detected using biochemical and microbiological tests. Subsequently, the amplification of *ampC* gene was performed by PCR method. Then, a point mutation analysis on this gene was performed on *ampC* gene positive strains. RFLP technique was performed using Hinf1 enzyme.

Results: Among 60 isolates, 30 (50%) isolates were positive for *ampC* beta-lactamase gene. Furthermore, A to G point mutation was detected in 11 (37%) *ampC* gene carrying isolates.

Conclusion: The results of this study showed an increasing rate in the prevalence of *ampC* gene and noticeable prevalence of A to G point mutation in the strains carrying this gene. This mutation may help increase resistance to cephalosporins.

Keywords: *Shigella sonnei*, *ampC* beta-lactamase gene, RFLP-PCR

***Corresponding Author: Amini Kumarss,** Department of Microbiolog, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-6419-3417

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2025-08-01]

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2348-2354

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.2.3.5]