Paramedical Sciences and Military Health
Volume 11, Number 2, Summer 2016

Original Article

Design of Optimized PCR Method for Detection of SHV Type ESBL Genes

Neda Gharaghozloo Hesari[1], Keyvan Majidzade[2], Mohamad Soleimani[1]*

[1] *Department of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University of Qom, Iran*
[2] *Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), the Brest Cancer Center (BCRC), Tehran, Iran*

Abstract

Introduction: ESBL is an important factor in antibiotic resistance. Antibiotic resistance has been proposed as a global problem in recent decades and it causes many deaths all over the world; therefore, rapid and accurate diagnosis can be major step in solving this problem. This study aimed to identify SHV-type gene with PCR method.

Methods and Materials: SHV gene sequences were extracted and aligned from Genbank. Specific PCR primers were designed according to the consensus of the SHV genes. A plasmid containing positive control of the gene was created by using PCR and cloning methods. The assay specificity was evaluated using Brucella genomic DNA and a panel containing genomes of 10 gram-positive and gram-negative organisms. The PCR assay was highly specific and no amplification products were observed from the non-SHV organisms, an other test of the specifity was done by the use of CTX-M and TEM betalactamases.

Results: A band with a the length of 199bp was indicated in the agarose gel electrophoresis of the PCR product in accordance with the desired sequence. Showing the same fragment in PCR confirmed the recombinant plasmid of coloning product containing the SHV gene. When the plasmid was subjected to the SHV-PCR, a ladder-like pattern was visualized on the agarose gel. The pattern has never observed in the case of negative controls.The results of specify assay conveyed that primers were separately for SHV gene.

Discussion and Conclusions: The results of this study indicated that PCR assay is a simple, rapid, sensitive and specific technique for detection of SHV gene that may improve diagnostic potential in clinical laboratories.

Keywords: Betalactamases, SHV, PCR

(*Corresponding author) Mohamad Soleimani, Department of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University of Qom, Iran

مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی
سال یازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۵

مقاله تحقیقاتی

طراحی روش PCR بهینه شده جهت ردیابی ژن بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع SHV

ندا قراگوزلو حصاری[۱]، کیوان مجیدزاده[۲]، محمد سلیمانی[۱*]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
[۲] مرکز دانشگاهی تحصیلات، فرهنگ و تحقیقات، مرکز تحقیقات سرطان پستان، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: بتالاکتامازهای وسیع الطیف یکی از عوامل بسیار مهم مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی محسوب می‌شود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دهه اخیر به‌عنوان معضل جهانی مطرح گردیده است و دارای آمار مرگ و میر و تلفات بسیاری در سطح جهانی می‌باشد. بتالاکتامازهای وسیع الطیف یکی از مهم‌ترین نوع شایع در مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد.لذا تشخیص سریع و دقیق آن می‌تواند به منزله گامی بزرگ در حل این مشکل باشد.در این مطالعه هدف بررسی ژن SHV از بتالاکتامازهای وسیع الطیف با تست PCR است.

مواد و روش‌ها: ژن SHV از بانک ژنی استخراج و تراز وسط قرار داده شد. پرایمرهای اختصاصی PCR باتوجه به اجماع از ژن SHV طراحی شده بودند. یک پلاسمید حاوی کنترل مثبت ژن با استفاده از PCR و روش شبیه سازی ساخته شده است. ویژگی آزمایش با استفاده از DNA بروسلا ژنومی و یک پنل متشکل از ژنوم های موجودات ۱۰ گرم مثبت و ۱۰ گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت. تست PCR با محصولات بسیار خاص و بدون محصولات تقویت کننده از ارگانیسم غیر SHV مشاهده شد. تست های دیگر از این ویژگی نیز با استفاده از CTX-M و بتالاکتاماز TEM مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در الکتروفورز محصول PCR باندی به طول ۱۹۹bp مطابق با طول توالی مد نظر رویت شد. نمایش قطعه مشابه در PCR پلاسمید نوترکیب محصول شبیه سازی شده حاوی ژن SHV را تایید می کند. زمانی که پلاسمید بر PCR–SHV قرار گرفت، یک الگوی نردبانی بر روی ژل آگارز مشاهده شد. الگو هرگز در گروه کنترل مشاهده نشد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که آغازگر به طور جداگانه برای ژن SHV بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشانگر این موضوع بود که تست PCR طراحی شده روشی آسان، سریع و ارزان در بررسی بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع SHV می‌باشد.

کلمات کلیدی: بتالاکتاماز وسیع الطیف، SHV، PCR

مقدمه

یکی از راه‌های مقابله با بیماری‌ها آنتی‌بیوتیک تراپی می‌باشد، ولی متأسفانه در سال‌های اخیر شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مانع پیشروی این روند درمانی شده است. این روند به‌طور چشمگیری در حال افزایش است و عاملی تهدید کننده در توانایی‌های جوامع پزشکی در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی کشنده محسوب می‌شود (۱و۲و۳). مقاومت باکتری‌ها منجر به نقص روند درمانی بسیاری از بیماری‌های شایع و خطرناک شده است. طبق پیش بینی‌های انجام شده، در سال‌های آتی، تقریباً هیچ آنتی‌بیوتیک مؤثری در درمان باکتری‌های مقاوم نخواهیم داشت (۴، ۵و۶). یا میزان آنتی‌بیوتیکهای مؤثر بسیار محدود و در نتیجه گران‌تر خواهد بود. این موضوع نه تنها در درمان عفونت‌های باکتریایی مؤثر است، بلکه در صورت عدم وجود آنتی‌بیوتیکهای مناسب خیلی از عمل‌های جراحی و شیمی درمانی و پیوند اعضا عملاً امکان پذیر نخواهد بود. هم

* (نویسنده مسئول) محمد سلیمانی، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

چنین به علت گرانی دارو شاهد تأثیرات منفی این معضل در روند اقتصادی کشور نیز خواهیم بود و بیشتر کشورهای در حال توسعه از جمله ایران متحمل بیشترین خسارات جانی و مالی خواهند شد. طبق گزارشات سازمان جهانی بهداشت میزان مرگ و میر ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهان ۷۰۰۰۰۰ نفر به‌طور سالانه تخمین زده شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی منجر به اختلال در روند درمانی چهار بیماری عفونی از جمله: بیماری‌های مزمن تنفسی، اسهال، مالاریا و سل شده است (۴ و ۷-۱۲). لازم به ذکر است که معضل مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌طور جهانی و گسترده است و حتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه نیز وجود دارد. اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی به حدی برای انسان‌ها حیاتی و مهم است که بسیاری از سازمان‌های بین‌المللی از جمله سازمان جهانی بهداشت (WHO)، مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC)، سازمان غذا و کشاورزی امریکا (FAO) و سازمان جهانی سلامت حیوانات (OIE) در سال ۲۰۱۳، تصمیم به همکاری و مشارکت در تحقیق در مورد این معضل جهانی بر آمدند (۱۳، ۱۴و۵). از جمله عواملی که در شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند، مدت زمان طولانی بستری در بیمارستان‌ها، انتقال عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی از مراکز درمانی، تماس افراد با نمونه‌های عفونی، مصرف بیش از حد و بدون تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود بیماران دیالیزی و سفر به کشورهای درگیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که در مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشند که شامل انواع مختلفی از جمله TEM, CTXM, SHV, VEB ,... هستند. ژن کد کننده نوع SHV دارای توالی‌های متعددی می‌باشد که روز به روز در حال گسترش است، نکته جالب توجه در خصوص توالی‌های SHV این می‌باشد که این توالی‌ها مشتق از SHV۱ با یک تا هفت جهش نقطه‌ای می‌باشد. بتالاکتامازهای SHV مربوط به گروه A از طبقه بندی AMBLER می‌باشند و در قسمت فعال خود دارای سرین هستند. پروتئین نابالغ این آنزیم دارای ۲۸۶ اسید آمینه می‌باشد، که ۲۱ اسید آمینه اول آن در سمت N-terminus توالی Signal را تشکیل می‌دهند و برداشتن این توالی منجر به تولید آنزیم کامل می‌شود. ژن‌های کد کننده نوع SHV روی کروموزوم و یا پلاسمید باکتری قرار دارند و به شدت در حال جهش و گونه زایی و تکثیر سریع در سراسر دنیا می‌باشند. روش‌های تشخیصی متفاوتی جهت بررسی و تشخیص نوع SHV مورد بررسی قرار گرفته است، روش‌های فنوتیپی مورد استفاده شامل تست دو دیسکه سینرژیسم، دیسک دیفیوژن و تست‌های سه بعدی می‌باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده اکثر روش‌های فنوتیپی زمان‌بر، با دقت و حساسیت پایین می‌باشند. لذا استفاده از روشی مناسب با دقت و حساسیت بالاتر و سریع‌تر می‌تواند گام مؤثری در کمک به کنترل مقاومت آنتی‌بیوتیکی نوع SHV باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و طراحی پرایمر: در این مطالعه از یک نمونه Klebsiella.penomoniae که قبلاً با استفاده از تست‌های ژنوتیپی و فنوتیپی از نظر وجود ژن بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع SHV تأیید شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین از ژنوم باکتری‌های جدول ۱ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. با استفاده از ترادف‌های موجود در بانک ژن NCBI و پایگاه‌های اطلاعاتی www.lahey.org/studies و www.SHVED.com تعداد ۱۳۱ ترادف ثبت شده از ژن SHV استخراج و با استفاده از نرم افزار CLC sequence viewer هم ردیف سازی و بررسی گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner V ۴.۰.۹.۴ بر روی توالی consensus حاصل پرایمرهای PCR طراحی گردید. به منظور کسب اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده از سرویس BLAST پایگاه اینترنتی NCBI استفاده شد. ساخت پرایمرها توسط شرکت سینا ژن انجام شد (جدول ۱).

PCR: واکنش PCR پرایمرهای SHVF,SHVR برای ۳۵ سیکل دمای ۹۴c به مدت ۴دقیقه، دناتوراسیون ۹۴c به مدت ۱دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۴۵c به مدت ۴۵s و چرخه دمایی تکثیر ۷۲c به مدت ۴۵s انجام شد.

آزمایش در دو نمونه ۲۵ ماکرولیتری با شرایط ذکر شده و در یک نمونه از آب دیونیزه به جای ژنوم SHV استفاده شد. نتایج حاصل

جدول ۱- پرایمرهای طراحی و ساخته شده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول
SHV-F	CGGCGACAACGTCACC	۱۹۹bp
SHV-R	TCAACGGTCCGGCGAC	۱۹۹bp

از تست PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل اگاروز ۱٪ در بافر TBE x ۵٪ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت رؤیت نتایج و باندهای حاصل از الکتروفورز از رنگ اتیدیوم بروماید و دستگاه ژل داک استفاده شد.

تعیین ویژگی: جهت بررسی میزان اختصاصی بودن پرایمرها از تست ویژگی، واکنش PCR طبق شرایط ذکر شده بر روی ژنوم چندین گونه باکتری دیگر و چندین ژنوم از سایر بتالاکتامازهای وسیع الطیف انجام شد.به دلیل کسب اطمینان از نتایج حاصله و بررسی تکرارپذیری آزمایش مذکور ۳ بار تکرار شد.

کلونینگ: جهت دستیابی به نمونه کنترل مثبت از روش کلونینگ محصولات PCR در وکتور Ptz۵VR/T استفاده شد.جهت وصول به این امر بر روی تعدادی نمونه کنترل مثبت در PCR با ژن SHV طبق شرایط مذکور انجام شد. برای استخراج محصولات حاصل PCR از Bioneer (AccuPrep® PCR Purification Kit) استفاده شد.جهت اتصال محصولات و وکتور از کیت (InsTAclone TM PCR Cloning Kit) Fermentase استفاده شد. E. coli top ۱۰ F´ به‌عنوان سلول ترانسفورم انتخاب شد، که بر روی محیط Luria-Bertani agar که حاوی xgal (fermentase) با غلظت ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر، ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوزیداز با غلظت ۳/۵میکروگرم در میلی لیتر، آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰میکرو گرم در میلی لیتر و تتراسایکین با غلظت ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر استفاده شد. ارزیابی نتایج حاصله با استفاده از غربالگری سفید –آبی (بررسی میزان کلونی‌های نو ترکیب بر روی محیط از نظر کمی) و همچنین واکنش colony PCR طبق شرایط ذکر شده در مرحله PCR انجام شد.

یافته‌ها

نتایج PCR: الکتروفورز محصول PCR پرایمرهای طراحی شده برای ژن SHV باند ۱۹۹ bp جفت بازی را که مطابق طول ژن مد نظر بود را نشان داد.

نتایج تعیین ویژگی: واکنش PCR مربوط به ژن SHV در هیچ یک از باکتری‌های کنترل منفی نتیجه‌ای نداشت، که این امر بیانگر ویژگی بالای پرایمرهای طراحی شده برای ژن SHV داشت. نتایج Blast پرایمرها حاکی از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده تنها در خصوص ژن SHV داشت. در الکتروفورز پس از PCR نیز یک باند ۱۹۹bp که حاوی ژن SHV بود رؤیت گردید.

نتایج کلونینگ و تهیه کنترل مثبت: واکنش PCR بر روی پلاسمید دریافت کننده اینسرت (کنترل مثبت) در مورد ژن SHV مطابق انتظار یک باند با طول ۱۹۹ جفت باز در ژل آگارز ایجاد نمود.

بحث و نتیجه‌گیری

در دهه اخیر میزان شیوع ژن‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی روز به روز در حال افزایش است و منجر به اختلالاتی در روند درمانی می‌شود. همچنین مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک و افزایش قیمت آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، تأثیر منفی بر اقتصاد جامعه خواهد داشت. مطالعات زیادی در راستای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مشکلات ناشی از آن انجام شده است، آقای معدنی و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی باکتری‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در E.coli ایزوله جدا شده از نمونه‌های ادراری پرداختند. در سال ۲۰۱۲ آقای اصلانی و همکاران به بررسی باکتری‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ایزوله‌های E.coli و بررسی معضلات و مشکلات مقاومت آنتی‌بیوتیکی پرداختند (۲، ۷، ۱۵و ۱۶).

در این مطالعه ۱۳۱توالی از ژن SHV از پایگاه اینترنتی Gene bank استخراج شدند و جهت طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفتند. در سال ۲۰۰۰ آقای Jungmin Kim و همکاران به بررسی توالی‌های SHV-۱, SHV-۲, SHV-۲a, SHV-۳, SHV-۴, SHV-۵ با استفاده از روش LCR پرداختند. در سال ۲۰۰۲ AM Hujer و همکاران به بررسی توالی SHV-۱ با استفاده از روش ELISA پرداختند. در سال ۲۰۱۰ T. Naas و همکاران به بررسی توالی SHV-۱ با استفاده از روش DNA micro array پرداختند. در سال ۲۰۱۰ Alexandra O'Keefe و همکاران به بررسی توالی SHV-۱۲ با استفاده از روش فنوتیپی تست دو دیسکه پرداختند (۴و۹–۱۲).

در این مطالعه پرایمرهای طراحی شده نه تنها دارای اختصاصی بودن بسیار بالایی در خصوص ژن SHV بودند بلکه قابلیت بررسی و تشخیص طیف وسیعی از توالی‌های ژن SHV را دارا می‌باشند. در سال ۱۹۹۶ آقای EFTHIMIOS E و همکاران به بررسی توالی SHV۱۰ پرداختند. در سال ۱۹۹۸ خانم Fatima Hannachi M'Zali و همکاران به بررسی توالی SHV۷ پرداختند. در سال ۲۰۰۱ آقای JOSE´CHAVES و همکاران به بررسی و تشخیص SHV۱ پرداختند.

در سال ۲۰۱۴ آقای Tapan majumdar و همکاران به بررسی توالی SHV۱۱۸ پرداختند (۱۲و۱۷). همان‌طور که مشاهده شد در اکثر مطالعات به بررسی تعداد محدودی از توالی‌های SHV پرداخته شده است اما در این مطالعه ۱۳۱ توالی بررسی شد. نتایج حاصل از تست ویژگی نیز نشانگر بالا بودن اختصاصی بودن پرایمرها در خصوص ژن SHV می‌باشد.

با توجه به شیوع روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین عدم وجود دقت بالا در تشخیص و بررسی ژن‌های مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش‌های فنوتیپی، روش PCR می‌تواند روشی مناسب با اختصاصی بودن بسیار بالا و زمان کوتاه نسبت به روش‌های فنوتیپی در خصوص بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نوع SHV باشد. و با استفاده از این روش در خصوص سایر ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز می‌توان به بررسی دقیق آن‌ها و در نتیجه کمک به حل مشکل جهانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کرد.

References

1- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet infectious diseases. 2010;10 (9): 597-602.
2- McGowan JE. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. Review of Infectious Diseases. 1983;5 (6): 1033-48.
3- Cars O, Högberg LD, Murray M, Nordberg O, Sivaraman S, Lundborg CS, et al. Meeting the challenge of antibiotic resistance. Bmj. 2008;337.
4- O›Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. American journal of infection control. 2011;39 (4): S1-S34.
5- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet. 2001;358 (9276): 135-8.
6- McGowan Jr JE. Economic impact of antimicrobial resistance. Emerging infectious diseases. 2001;7 (2): 286.
7- Sieradzki K, Leski T, Dick J, Borio L, Tomasz A. Evolution of a vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain in vivo: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant S. aureus under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. Journal of clinical microbiology. 2003;41 (4): 1687-93.
8- Harbarth S, Samore MH, Lichtenberg D, Carmeli Y. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance. Circulation. 2000;101 (25): 2916-21.
9- DeRiso AJ, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. CHEST Journal. 1996;109 (6): 1556-61.
10- Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. New England Journal of Medicine. 2009;360 (5): 439-43.
11- Tello A, Austin B, Telfer T. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. 2012.
12- Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al. Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. New England Journal of Medicine. 1999;340 (7): 493-501.
13- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, Group EP. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. The Lancet. 2005;365 (9459): 579-87.
14- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991;35 (9): 1697.
15- Yu WL, Chuang Y-C, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi. 2006;39 (4): 264-77.
16- Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. Scientific American. 1998;278 (3): 32-9.
17- Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins and Proteomics. 2009;1794 (5): 808-16.