

## Detection of *blaPER*, *blaGES* and *blaVEB* Genes in *Shigella sonnei* Isolates from Patients with Diarrhea and Determination of Antibiotic Susceptibility Pattern

Tajoadini M<sup>1</sup>, Kheyrkhah B\*<sup>2</sup>, Amini K<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
  2. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
  3. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
- \* *Corresponding author.* Tel: +989133454787, Fax: +982144850954, E-mail: babakkheirkhah@yahoo.com

Received: Feb 18, 2017

Accepted: Aug 21, 2017

### ABSTRACT

**Background & objectives:** *Shigella* species are one of the most common causes of dysentery and sometimes death, especially in children and those with immunodeficiency. The variety of causative agents (*Shigella* species) and the development of drug-resistant strains make it difficult to select an appropriate antibiotic for the treatment of shigellosis. One of the most important factors involved in the resistance of *Shigella* isolates is the presence of extended spectrum beta lactamases (ESBLs) genes. The aim of this study was to determine the frequency of *blaPER*, *blaGES* and *blaVEB* genes in *Shigella sonnei* isolated from patients with dysentery using multiplex-PCR method and to determine the antibiotic susceptibility patterns of these isolates.

**Methods:** A total of 60 isolates of *Shigella sonnei* were collected from different hospitals and medical diagnostic laboratories in Kerman province. Specimens from different age groups were cultivated in special media and confirmed by biochemical tests. The presence of *blaPER*, *blaGES* and *blaVEB* genes were investigated using specific primers and multiplex-PCR method. Antibiotic susceptibility test was performed by disc diffusion method based on CLSI standards.

**Results:** Multiplex-PCR results showed three samples had *blaPER* gene, but none of them had *blaVEB* or *blaGES* genes. Also, the results of antibiotic susceptibility test showed the highest resistance for amoxicillin- clavulanic acid (53.3%) antibiotic and the highest sensitivity for tetracycline (85%) antibiotic.

**Conclusions:** The results of the experiments indicated the presence of *blaPER* gene in *Shigella sonnei* isolates. In addition, the results showed high resistance of isolates to amoxicillin clavulanic acid and ceftriaxone antibiotics. Therefore, careful medical care and proper and timely use of appropriate antibiotics are essential to prevent the spread of resistant isolates.

**Keywords:** *Shigella sonnei*; Extended-Spectrum Betalactamase; Disk Diffusion; Multiplex-PCR

## ردیابی ژن‌های *bla<sub>PER</sub>*، *bla<sub>GES</sub>* و *bla<sub>VEB</sub>* در ایزوله‌های شیگلا سونتی جداسازی‌شده از بیماران مبتلا به اسهال و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

مریم تاج‌الدینی<sup>۱</sup>، بابک خیرخواه<sup>۲\*</sup>، کیومرث امینی<sup>۳</sup>

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

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران

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

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۳۳۴۵۴۷۸ فاکس: ۰۲۱ ۴۴۸۵۰۹۵۴ پست الکترونیک: babakkheirkhah@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** گونه‌های شیگلا یکی از عوامل شایع اسهال خونی و گاهی مرگ و میر به خصوص در کودکان و افراد دارای نقص ایمنی می‌باشد. تنوع عوامل ایجاد کننده بیماری (گونه‌های شیگلا) و بروز مقاومت دارویی، انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان شیگلوزیس را با مشکل مواجه می‌سازد. یکی از عوامل مهم بروز مقاومت در ایزوله‌های شیگلا حضور ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های *bla<sub>PER</sub>*، *bla<sub>GES</sub>* و *bla<sub>VEB</sub>* در ایزوله‌های شیگلا سونتی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال با روش Multiplex-PCR و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه‌ها بود.

**روش کار:** تعداد ۶۰ نمونه ایزوله شیگلا سونتی از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کرمان در گروه‌های سنی مختلف جمع آوری و در محیط‌های اختصاصی کشت داده و با آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شد. حضور ژن‌های *bla<sub>PER</sub>* و *bla<sub>GES</sub>* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن و بر اساس موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج Multiplex-PCR نشان داد ۳ نمونه دارای ژن *bla<sub>PER</sub>* بودند، اما هیچکدام دارای ژن‌های *bla<sub>VEB</sub>* یا *bla<sub>GES</sub>* نبودند. همچنین در نتایج آنتی بیوگرام مشخص شد که بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین کلاوونیک اسید (۵۳/۳٪) و بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۸۵٪) بود.

**نتیجه گیری:** نتایج آزمایشات نشان دهنده حضور ژن *bla<sub>PER</sub>* در ایزوله‌های شیگلا سونتی و مقاومت بالای ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و سفتریاکسون بود. به همین جهت مراقبت‌های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به موقع از آنتی بیوتیک‌های مناسب جهت جلوگیری از شیوع ایزوله‌های مقاوم ضروری می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** شیگلا سونتی، بتالاکتاماز وسیع الطیف، دیسک دیفیوژن، PCR چندگانه

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

### مقدمه

فلکسنری<sup>۲</sup>، سونتی<sup>۳</sup>، و بوییدی<sup>۴</sup> می‌باشد [۱]. از بین گونه‌های شیگلا، سونتی از رایج‌ترین گونه‌های عامل اسهال به خصوص در کشورهای پیشرفته می‌باشد [۲].

شیگلا یک باسیل گرم منفی روده‌ای و عامل اسهال خونی باکتریایی در کشورهای پیشرفته و درحال توسعه می‌باشد. جنس شیگلا دارای ۴ گونه دیساتتری<sup>۱</sup>،

<sup>۲</sup> *S. flexneri*

<sup>۳</sup> *S. Sonnei*

<sup>۴</sup> *S. boydii*

<sup>۱</sup> *S. dysenteriae*

بلغ تعداد کم باکتری (حدود ۱۰۰ عدد) می‌تواند سبب عفونت شود. این بیماری می‌تواند منجر به باکتری می و مرگ و میر در کودکان و بالغین مبتلا به ضعف سیستم ایمنی شود. درمان آنتی بیوتیکی مناسب و به موقع دوره بیماری را کوتاه کرده و سبب کاهش عوارض آن و جلوگیری از انتقال بیماری به افراد سالم می‌شود [۳]. اما امروزه با توجه به استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها، گونه‌های *شیگلا* هم به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها از جمله نسل سوم سفالوسپورین‌ها مقاوم شده اند و همین امر درمان این بیماری را با مشکل مواجه کرده است [۴]. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز عمده ترین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی به بتالاکتام‌ها می‌باشد. این آنزیم‌ها حلقه آمیدی بتالاکتام‌ها را تخریب می‌کند. بتالاکتام‌ها بر اساس سکانس آمینو اسیدی به ۴ گروه A تا D تقسیم می‌شوند. بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف<sup>۱</sup> از بتالاکتام‌های کلاس A بوده و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف با یک زنجیر جانبی اکسی‌مینو<sup>۲</sup> را هیدرولیز می‌کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آرتروئومام می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلوانیک اسید مهار و اولین بار در *اشریشیاکلی*<sup>۳</sup> شناسایی شدند [۵]. علاوه بر ژن‌های *bla<sub>SHV</sub>*، *bla<sub>TEM</sub>* و *bla<sub>CTX-M</sub>* ژن‌های دیگری نیز مقاومت به سفالوسپورین‌ها را ایجاد می‌کنند از جمله ژن‌های *bla<sub>GES</sub>* و *bla<sub>PER</sub>*، *bla<sub>VEB</sub>* کمتری در ایزوله‌های *انتروباکتریاسه* یافت می‌شوند [۶]. ژن *bla<sub>GES</sub>* اولین بار در *کلبسیلا پنومونیه*<sup>۴</sup> جداسازی شده از یک بیمار در فرانسه شناسایی شد. فراوانی این ژن کم اما رو به افزایش است به طوری که در سالهای اخیر در نمونه‌های محیطی هم گزارش شده است. ژن *bla<sub>PER</sub>* اولین بار در *سودوموناس*

*آئروژینوزا*<sup>۵</sup> جداسازی شده از یک بیمار ترکیه ای شناسایی شد اما بعدها در ایزوله‌های *سالمونلا* هم جداسازی شد. ژن *bla<sub>VEB</sub>* اولین بار در *اشریشیاکلی* در فرانسه شناسایی شد و با سایر ژن‌های ESBL تفاوت زیادی دارد و در ایجاد مقاومت به سفالوسپورین‌ها مانند سفنازیدیم و سفوتاکسیم نقش مهمی دارد [۷]. قندیان و همکاران در مطالعه خود بر روی نمونه‌های *شیگلا* جمع‌آوری شده از پنج استان کشور (مازندران، گیلان، اصفهان، ایلام، تهران) دریافتند که میزان جداسازی *شیگلا سونتی* ۷۳ درصد، *شیگلا فلکسنری* ۱۸ درصد، *شیگلا بوییدی* ۵ درصد و *شیگلا دیسانتری* ۲ درصد می‌باشد [۸]. در مطالعه‌ای که رنجبر و همکاران انجام دادند، از ۵۵ سویه *شیگلای* جداسازی شده، ۳ سویه *شیگلا سونتی* و یک سویه *شیگلا فلکسنری* تشخیص داده و با روش فنوتیپی به عنوان سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز شناسایی گردیدند [۹]. مصدق در نتیجه تحقیق خود در سال ۱۳۹۶ گزارش نمودند که مقاومت به اکثر آنتی-بیوتیک‌ها بالای ۵۰ درصد بوده و ۸۹ درصد از سویه‌های *شیگلا سونتی* جمع‌آوری شده از گروه باکتری‌های تولیدکننده ESBL شناسایی شدند [۱۰]. با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *شیگلا سونتی* و سرعت تشخیص بالا و دقیق روش‌های مولکولی و شناسایی همزمان چندین ژن، در این مطالعه به بررسی حضور این ژن‌ها در جدایه‌های *شیگلا سونتی* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال به روش Multiplex-PCR پرداخته شده است و حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

### روش کار

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۰ ایزوله *شیگلا سونتی* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال

<sup>۵</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

<sup>۱</sup> Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)

<sup>۲</sup> Oximino

<sup>۳</sup> *Escherichia coli*

<sup>۴</sup> *Klebsiella pneumoniae*

روی سطح محیط مولر هینتون آگار، دیسک کلونیک اسید را سمتی از پلیت گذاشته و دیسک Clavulanic EDTA/acid را در گوشه دیگر پلیت قرار داده و ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از زمان ۲۴ ساعت تفاوت هاله عدم رشد مقایسه گردید [۹]. استخراج DNA نمونه‌ها توسط کیت شرکت سیناکلون (PR881613) و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش PCR Multiplex- اقدام شد. آزمون PCR بر روی ۶۰ جدایه شیگلا سوئی برای ژن‌های *bla<sub>VEB</sub>*، *bla<sub>PER</sub>*، *bla<sub>GES</sub>* انجام گرفت [۱۱] (جدول ۱).

مراجعه کننده به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی خصوصی شهر کرمان در بازه زمانی دی ماه تا اسفند ۱۳۹۴، جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا جدایه‌ها روی محیط‌های مک کانکی و سالمونلا- شیگلا آگار کشت داده شدند. سپس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد جهت تشخیص گونه شیگلا استفاده شد. برای افتراق گونه‌ها نیز از آزمون‌های بیوشیمیایی ONPG (شرکت پادتن طب)، بررسی واکنش دکربوکسیلاسیون اورنیتین، آزمون تولید اندول و تخمیر قندهای مانیتول استفاده شد [۹]. آزمون دیسک ترکیبی<sup>۱</sup> برای شناسایی سوبه‌های مقاوم به بتالاکتاماز انجام و بعد از کشت باکتری بر

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه [۱۱]

ژن	توالی (۵ به ۳)	اندازه محصول bp
<i>bla<sub>veb</sub></i>	F-CATTTCCCGATGCAAAGCGT R-CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	۶۴۸
<i>bla<sub>PER</sub></i>	F-GCTCCGATAATGAAAGCGT R-TTCGGCTTGACTCGGCTGA	۵۲۰
<i>bla<sub>GES</sub></i>	F-AGTCGGCTAGACCGGAAAG R-TTTGTCCGTGCTCAGGAT	۳۹۹

PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS-13 و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حساسیت ایزوله‌های شیگلا سوئی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم (۵ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg) کوتریموکسازول (۲۵ μg) و کوآموکسی کلاو (۳۰ μg) (پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن<sup>۲</sup> و مطابق با استانداردهای موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی<sup>۳</sup> سنجیده شد [۱۳، ۱۲].

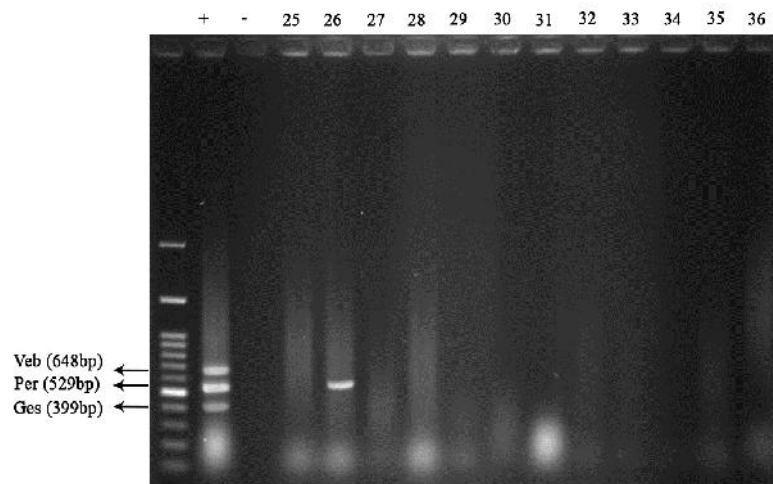
واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر ۱۰X PCR Buffer، ۰/۸ میکرولیتر ۱ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۴/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۲/۵ و ۵ میکرولیتر از الگو با غلظت ۲ میکرومول انجام گردید. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش‌های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هر کدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات

<sup>۱</sup> Combine Disk<sup>۲</sup> Disk Diffusion (Kirby-Bauer)<sup>۳</sup> Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)

**یافته‌ها**

تمامی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی بررسی و مطابق با استانداردهای تشخیصی به عنوان شیگلا سوئی تایید گردیدند. بر اساس نتیجه آزمایش مولتی پلکس PCR مشخص گردید ۳ نمونه دارای ژن *bla<sub>PER</sub>* بودند، اما هیچکدام دارای ژن *bla<sub>VEB</sub>* یا *bla<sub>GES</sub>* نبودند (تصویر ۱-۳). همچنین در نتایج آنتی بیوگرام مشخص شد که بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک‌های سفکسیم و تتراسیکلین به ترتیب ۶۶/۶ و ۸۵ درصد می باشد (جدول ۲). همچنین مطابق نمودار ۱ بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین کلاونیک اسید (۳/۳٪) و آنتی بیوتیک سفتریاکسون (۳/۳٪) بود. در ضمن جهت بررسی کنترل مثبت از سویه سودوموناس آئروژینوزای واجد ژن‌های مذکور که

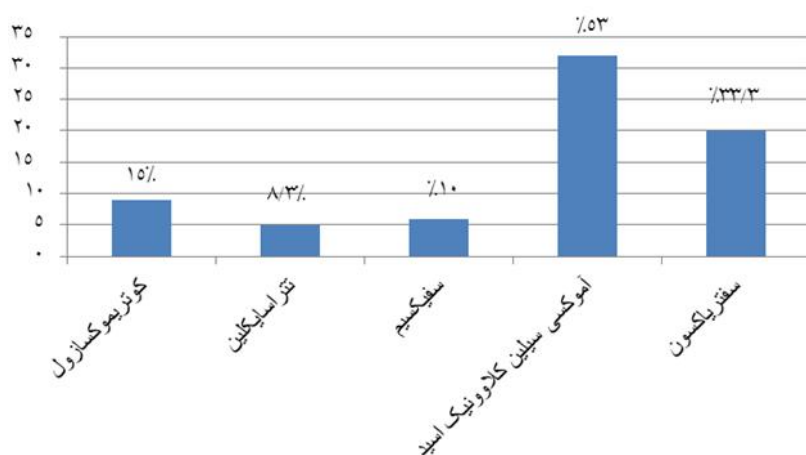
از موسسه پاستور به صورت پلیت تهیه گردیده بود استفاده شد. کنترل منفی از باکتری اشریشیاکلی (PTCC 1395) که فاقد ژن‌های بتالاکتاماز مورد بررسی در این مطالعه است؛ استفاده شد. در سنجش وجود بتالاکتاماز وسیع الطیف به روش فنوتیپی، در روش دیسک ترکیبی، تعداد ۳۲ نمونه (۳/۵۳٪) از ایزوله‌ها مقاوم به کلاونیک اسید بوده که با این روش شناسایی گردید. نتایج ضریب همبستگی بین ژن شناسایی شده و آنتی بیوتیک‌ها نشان داد که حضور ژن *PER* و آنتی بیوتیک‌ها ارتباط معنی‌داری وجود نداشته که با توجه به نتایج آزمون تعیین مقاومت به روش فنوتیپی هر ۳۲ ایزوله شناسایی شده مثبت بوده، ولی در روش مولکولی تنها ۳ ایزوله واجد ژن *PER* بوده‌اند ( $p < 0.05$ ).



تصویر ۱. نتایج واکنش PCR چندگانه برای شناسایی ژن‌های مورد مطالعه. به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه جداسازی شده ۲۵-۳۶ حاوی ژن *bla<sub>PER</sub>* با طول ۵۲۹ bp قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۲. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های شیگلا سوئی بر حسب درصد

مقاوم (R)	نیمه حساس (I)	حساس (S)	آنتی بیوتیک
۱۵	۳۶/۶	۴۸/۳	کوتریموکسازول
۸/۳	۵	۸۵	تتراسایکلین
۱۰	۲۳/۳	۶۶/۶	سفیکسیم
۵۳/۳	۱۳/۳	۳۳/۳	آموکسی سیلین کلاونیک اسید
۳۳/۳	۳/۳	۶۳/۳	سفتریاکسون



شکل ۱. توزیع فراوانی میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بر حسب درصد و تعداد

### بحث

شیگلوز در تمام جهان اندمیک بوده و شایع‌ترین عامل ایجاد اسهال خونی باکتریایی می‌باشد. طبق گزارش WHO سالانه ۱/۱ میلیون نفر در جهان در اثر این عفونت می‌میرند. این بیماری معمولاً در مناطق با جمعیت زیاد و وضعیت بهداشتی ضعیف اتفاق می‌افتد [۱۴]. تمامی گونه‌های مختلف شیگلا قادر به ایجاد اسهال خونی هستند اما به نظر می‌رسد گونه سونئی در سالهای اخیر از فراوانی بالایی برخوردار بوده است [۲]. از آنجائی که میزان ابتلاء به شیگلا سونئی در بین گروه‌های سنی مختلف می‌تواند به عنوان یک شاخص بهداشتی در ارزیابی کیفیت بهداشت یک جامعه مورد توجه باشد [۱۵] در این مطالعه به بررسی این گونه پرداختیم. از مشکلات موجود در این تحقیق هماهنگی جهت جمع آوری نمونه‌های مورد نیاز با توجه به شیوع کم این گونه از شیگلا بوده است که خود می‌تواند از نکات مهم در بررسی این گونه در مطالعات سایر محققین باشد. در این تحقیق در مدت دو ماه از مراکز زیادی نمونه‌های مشکوک به شیگلا و یا تایید شده را جمع آوری نموده و به آزمایشگاه منتقل و تست‌های تاییدی بر روی نمونه‌های مشکوک انجام شد. در این مطالعه ما حدود ۴۰۰ نمونه از آزمایشگاه‌های مختلف اخذ و در پایان تعدادی نمونه به عنوان گونه شیگلا سونئی تایید و باقی جدایه‌های

مورد نیاز این تحقیق از بانک سویه‌های موسسه تحقیقاتی پاسارگاد که قبلاً جمع‌آوری شده بود؛ دریافت گردید. درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب، شدت، دوره، علائم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می‌دهد. اولین خط درمانی شیگلوز، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول هستند، اما با توجه به بروز مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها، فلوروکینولون‌ها و نسل سوم سفالوسپورین‌ها جایگزین اینها شده‌اند [۱۶]. بتالاکتام‌های وسیع الطیف یکی از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در ایران هستند و مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به فراوانی در باکتری‌های گوناگون گزارش می‌شود. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف به واسطه عوامل ژنتیکی متعددی است که باعث تولید بیش از ۳۴۰ نوع متفاوت آنزیم بتالاکتاماز می‌شود [۱۷]. ESBL‌ها اولین بار در کشور آلمان و در باکتری *کلیسیلا پنومونیه* شناسایی شد. از آن زمان تاکنون تعداد باکتری‌های بیشتری از خانواده *نتروباکتریاسه* در این دسته قرار گرفتند. این آنزیم‌ها درجات مختلفی از حفاظت علیه آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین و وسیع الطیف مانند سفوتاکسیم، سفتازیدیم، مونوباکتام‌ها و آزرترئونام از خود نشان می‌دهند و توسط کلارونیک اسید مهار می‌شوند. شایع‌ترین ژن‌های ESBL؛ SHV و TEM هستند.

علاوه بر اینها ژن‌های دیگری با تفاوت ساختاری با این دو ژن مانند CTX-M، PER و VEB هم در نقاط مختلف جهان شناسایی شده اند [۱۸]. دلیل بررسی فراوانی ژن‌های ناشایع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در این مطالعه توجه به حضور سایر ژن‌های بتالاکتاماز بوده است که آیا عوامل ناشایع بتالاکتامازها وسیع الطیف در ایران وجود دارد یا خیر، و وضعیت شیوع این ژن‌ها در باکتری شیگلا به چه صورت می‌باشد. نتایج گویای این نکته بوده است که حضور ژن‌های ناشایع بتالاکتامازها حتی به تعداد کم، از نوع ژن‌های PER زنگ خطر جدی برای درمان بیماران به شمار می‌رود. ژن *bla<sub>PER</sub>* در باکتری‌های روده ای مهم تولیدکننده ESBLها و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده وجود دارد. از جمله این باکتری‌ها عبارتند از پروتئوس، سالمونلا، سودوموناس آئروژینوزا، آسینتوباکتر و پرویدنسیا [۱۹]. مطالعات نشان می‌دهد شیوع این ژن محدود به آمریکای جنوبی، اروپا و آسیا می‌باشد. آنزیم‌های تولید شده توسط این ژن از کارآمدترین بتالاکتامازها علیه سفالوسپورین‌های وسیع الطیف می‌باشد [۲۰]. ایزوله‌های بیان کننده *bla<sub>VEB</sub>* نیز به ندرت در باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده اند. آنالیز ژنتیکی *bla<sub>VEB</sub>* و *bla<sub>GES</sub>* نشان داد این ژن‌ها توسط اینتگرون کلاس ۱ روی پلاسمید یا کروموزوم قرار می‌گیرد [۱۸]. در مطالعه گیرلیچ<sup>۱</sup> و همکاران، ۳۷ نمونه باکتری‌های روده ای مقاوم به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف جداسازی شده از موارد بالینی در کشور تایلند، از لحاظ حضور ژن *bla<sub>VEB</sub>* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۶ نمونه (۴۳/۲٪) که شامل گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه هستند، دارای این ژن بودند [۱۸]. در مطالعه کیراتیسین<sup>۲</sup> و همکاران، فراوانی ژن‌های ESBL در

ایزوله‌های انتروباکتریاسه مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۶/۱ درصد نمونه‌ها دارای ژن *bla<sub>VEB</sub>* بودند اما هیچکدام از نمونه‌ها ژن *bla<sub>PER</sub>* یا *bla<sub>GES</sub>* را نداشتند [۲۱]. کوپینتروس<sup>۳</sup> و همکاران، به بررسی حضور ژن‌های ESBL در ایزوله‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف در باکتری‌های روده‌ای جداسازی شده از موارد بالینی پرداختند. در این مطالعه ۲۳ درصد نمونه‌ها دارای ژن *bla<sub>PER</sub>* بودند [۲۲]. دالن<sup>۴</sup> و همکاران، به بررسی حضور ژن‌های ESBL در ایزوله‌های انتروباکتریاسه جداسازی شده از نمونه‌های بالینی پرداختند. در این مطالعه تنها یک نمونه دارای ژن *bla<sub>VEB</sub>* بود [۱۱]. همانگونه که از مطالعات گذشته بر می‌آید، ۳ ژن *bla<sub>PER</sub>*، *bla<sub>GES</sub>* و *bla<sub>VEB</sub>* در ایزوله‌های شیگلا وجود نداشته اند اما در مطالعه حاضر این ژن *bla<sub>PER</sub>* در ۳ ایزوله شیگلا سونتئی حضور داشته است. با توجه به اینکه شیگلا سونتئی یک باکتری روده ای بیماری‌زای مهم می‌باشد، حضور این ژن‌ها هر چند با میزان فراوانی کم، می‌تواند هشدار جدی باشد زیرا درمان عفونت‌های شیگلایی را دچار مشکل می‌سازد.

آزمایش دیسک ترکیبی بر روی ۳۲ نمونه مقاوم به کلونیک اسید انجام گرفت و نتیجه مشخص نمود که ۳۲ ایزوله دارای مقاومت فنوتیپی بوده که در روش ملکولی نیز مشخص گردید که این ایزوله‌ها واجد تنها ژن PER بوده که مقایسه این نتایج با نتایج آزمون ملکولی نشان دهنده وجود ژن‌های بتالاکتامازی در برخی از ایزوله‌های مورد بررسی و نقش این ژن‌ها در بروز مقاومت است. در مطالعه‌ای که توسط رنجبر و همکاران انجام شد از ۵۵ سویه شیگلای جداسازی شده، ۴ سویه (۷/۳٪)، شامل ۳ سویه شیگلا سونتئی و یک سویه شیگلا فلکسنری به روش فنوتیپی به عنوان سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز شناسایی گردیدند [۹].

<sup>3</sup> Quinteros

<sup>4</sup> Dallene

<sup>1</sup> Girlich

<sup>2</sup> Kiratisin

در مطالعه حاضر ۵۳/۳ درصد نمونه‌ها به آموکسی سیلین- کلاوونیک اسید، ۳۳/۳ درصد به سفتریاکسون، ۱۵ درصد به کوتریموکسازول، ۱۰ درصد به سفیکسیم و ۸/۳ درصد به تتراسایکلین مقاوم بودند. در مطالعه عباس پور و همکاران، ایزوله‌های شیگلا از لحاظ مقاومت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه که شایع‌ترین گونه جداسازی شده سوئتی (۶۳٪) بود، ۲۳/۳ درصد جدایه‌ها به سفتریاکسون، ۲۴/۴ درصد به سفیکسیم، ۹۲/۲ درصد به کوتریموکسازول و ۶۵/۶ درصد به تتراسایکلین مقاوم بوده‌اند [۱۴]. در مطالعه ضیائی و همکاران، ایزوله‌های شیگلای جداسازی شده از موارد اسهال خونی از لحاظ مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۸۰ درصد نمونه‌ها به کوتریموکسازول و ۱۵ درصد نمونه‌ها به سفیکسیم مقاوم بودند [۲۳]. مقبلی و همکاران، ۷۳ نمونه شیگلای جداسازی شده از مدفوع و خون بیماران مبتلا به اسهال را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، ۹۴/۵ درصد نمونه‌ها به کوتریموکسازول، ۹۳/۲ درصد به تتراسایکلین، ۲۲ درصد به آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و ۶/۸ درصد به سفتریاکسون مقاوم بوده‌اند [۲۴]. قندیان و همکاران، به بررسی گونه‌ها و مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ نمونه شیگلای جداسازی شده از موارد اسهال پرداختند. در این مطالعه ۷۳ درصد نمونه‌ها متعلق به گونه سوئتی بودند. به علاوه ۶۰ درصد ایزوله‌های شیگلا سوئتی مقاوم به کوتریموکسازول، ۲۸ درصد مقاوم به تتراسایکلین و ۴۰ درصد مقاوم به کوآموکسی کلاو بودند [۱۵]. در مطالعه سلطان دلال و همکاران بر روی ۸۰ نمونه شیگلای جداسازی شده از موارد بالینی، ۸۰ درصد نمونه‌ها به تتراسایکلین، ۷۵ درصد به کوتریموکسازول ۱۶/۷ درصد به سفتریاکسون و ۳/۳ درصد به سفیکسیم مقاوم بودند [۲۵]. در بررسی اقتداردوست و همکاران بر روی ایزوله‌های مختلف شیگلای جداسازی شده از بیمارستان بقیه الله، ۶۰

درصد نمونه‌ها به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند [۲۶]. همچنین در مطالعه افشاری و همکاران بر روی نمونه‌های مدفوع کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان‌های میلاد و امام خمینی، ۵۰ ایزوله شیگلا سوئتی جداسازی شد که در این مطالعه مقاومت به تتراسایکلین و کوتریموکسازول در ۹۰ درصد ایزوله‌های شیگلا سوئتی مشاهده شد [۲۷]. از مسائل مهم در این تحقیق هماهنگی جهت اخذ نمونه‌های لازم از مراکز درمانی بود که از مشکلات مهم در مطالعات تحقیقی به شمار می‌رود.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده حضور ژن  $bla_{PER}$  به تعداد کم در ایزوله‌های شیگلا سوئتی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال خونی بود اما با این حال در مورد حضور ژن‌های ESBL نوع VEB، PER و GES در ایزوله‌های شیگلا در ایران مطالعه ای وجود ندارد و نیاز به بررسی بیشتری جهت شناسایی ژن‌های مذکور در ایزوله‌های شیگلا جداسازی شده از موارد بالینی می‌باشد. به علاوه نتایج نشان دهنده مقاومت ایزوله‌های شیگلا سوئتی به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و سفتریاکسون بود که این امر بسیار نگران کننده می‌باشد زیرا گونه سوئتی در حال حاضر رایج‌ترین گونه شیگلا در ایران می‌باشد و مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها کنترل و درمان این بیماری را مشکل می‌سازد. از این رو مراقبت دقیق و دائمی بروز مقاومت دارویی، تجویز مناسب آنتی بیوتیک‌ها و پایش حضور ژن‌های دخیل در بروز مقاومت دارویی جهت کاهش انتشار ایزوله‌های شیگلا سوئتی مقاوم به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف ضروری می‌باشد.



**تشکر و قدردانی**

عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد. همچنین این مقاله مستخرج از پایان نامه با کد طرح ۶۲۳۳۰۵۰۷۹۴۱۴ مصوب ۱۳۹۴/۰۳/۳۰ در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می‌باشد.

نگارندگان مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد جناب آقای مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل

**References**

- 1-Saran B, Erdem B, Tekeli FA, Sahin F, Aysey AD. Characterization of *Shigella* Strains isolated in Ankara, Turkey by antimicrobial resistance models, plasmid profile analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Mikrobiyol Bul.* 2013 Jan;47(1):35-48. [Full text in Turkish]
- 2-Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3747-9.
- 3-Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Zhang J, Chen GX, Nasu M, et al. Serotypes and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase types of clinical isolates of *Shigella* spp. from the Zhejiang province of China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Jan; 69(1): 98-104.
- 4-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 Mar; 34(3):447–51.
- 5-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 May; 276: 269–270.
- 6-Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutierrez B, Gonzalez-Zorn B. Association of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase *armA* in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56(9): 4985–4987.
- 7-Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012 Jul; 12(5): 883–893.
- 8-Ghandian S, Sattari M, Nikbin VS, Aslani MM. Study of antibiotic susceptibility pattern and presence of *ipaH* gene among *shigella* strains isolated from selected provinces in Iran. *Modares J Med Sci.* 2011 Spring; 14(1): 81-8. [Full text in Persian]
- 9-Ranjbar R, Mirsaeed Ghazi F, Farshad S, Giammanco GM, Aleo A, Owlia P, et al. The occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Shigella* spp in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2013 Jun;5(2):108-12.
- 10-Shadi M, 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 Jun-Jul; 19(2): 93-103. [Full text in Persian]
- 11-Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Mar;65(3):490-5.
- 12-Bauer A, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American J Clin Pathol.* 1996 Apr; 45: 493-496.
- 13-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; 21<sup>st</sup> Informational Supplement. 2014; M100-S24. Wayne, PA: CLSI.
- 14-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.
- 15-Lamba K, Nelson JA, Kimura AC, Poe A, Collins J, Kao AS, et al. Shiga Toxin 1-Producing *Shigella sonnei* Infections, California, United States, 2014–2015. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):679-86.
- 16-Acikgoz ZC, Eser OK, Kocagoz S. CTX-M-3 type beta-lactamase producing *Shigella sonnei* isolates from pediatric bacillary dysentery. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Mar; 61: 135-37.

- 17-Mohammadi-Mehr M, Feizabadi MM. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. *Iran J Microbiol*. 2011 Mar; 3: 26-30.
- 18-Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok. *Thailand J Clin Microbiol*. 2001 Jan; 39(1): 175–182.
- 19-Power P, Di Conza J, Rodriguez MM, Ghiglione B, Ayala JA, Casellas JM, et al. Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of *bla<sub>PER-2</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul; 51(7): 2359–2365
- 20-Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan; 14 (1): 154–8.
- 21-Kiratisin P, Henprasert A. Genotypic analysis of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases amongst *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to a broad-spectrum cephalosporin. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Oct; 36: 343–347.
- 22-Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Sep; 47(9): 2864–2867.
- 23-Ziyaei M, Azarkar G, Saadatjou SA, Namaei MH. Study of *Shigella* genera and their drug resistance in dysenteric patients referring to Nehbandan health -care centers and health houses. *J Birjand Univ Med Sci*. 2007 Jun; 14(2): 30-36. [Full text in Persian]
- 24-Moghbeli M, Behnood V, Ranjbar R. A study to determine antibiotic resistance and recognition *qnr* genes in *Shigella* strains isolated from patients admitted to Mofid's children medical center, Tehran. *J Microbial World*. 2014 Apr; 7(1): 49-57. [Full text in Persian]
- 25-Soltan Dallal MM, Rastegar Lari A, Hosseini M, Aminharati F. The trend of drug resistance in toxin and non-toxin producing *Shigella* Spp. isolated from stool of children with diarrhea. *J Kurd Univ Med Sci* 2013; 18(70) 51–58. [Full text in Persian]
- 26-Eghtedardoost M, Saadati M, Nazarian SH, Mokhtar Zare, Malaii F, Heiat M. Identification of *ipaB* in *Shigella* and cloning of this gene pET22b(+) vector and antibiotic Susceptibility of *Shigella* strains. *Iranian J Infect Dis*. 2010; 15(49): 55-61. [Full text in Persian]
- 27-Afshari N, Bakhshi B, Mahmoudi aznaveh A, Fallah F, Rahbar M, Rafiei Tabatabaei S. Investigation of prevalence of *Shigella sonnei* isolates among children with diarrhea admitted in to two hospital in Tehran in 1391 with Antimicrobial susceptibility of isolates. *Iran J Med Microbiol*. 2016 Jul; 10 (2): 16-22.