

Tetracycline and Azithromycin Resistance Investigation on *Shigella* spp. Isolated from the Stool of Children with Diarrhea in Tehran, Iran

Shahsavan SH¹, Rastegar Lari A², Bakhshi B³, Owlia P⁴, Nobakht M*^{1,5}

1. Antimicrobial Resistance research center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
5. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author. Tel: +982186704566 Fax: +982188622589 E-mail: nobakht@yahoo.com

Received: Dec 19, 2015

Accepted: Jun 15, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: *Shigella* spp. are gram negative bacteria that can cause shigellosis in human. It is important in young children as well as elderly and immunocompromised people. Threatening complications can occur in severe cases with multidrug resistance species. It has been observed that *Shigella* spp. have become resistant to antibiotics like other bacteria. Investigation of resistance to azithromycin, tetracycline and pattern of resistance are the objectives of this study.

Methods: Fifty isolates of *Shigella* spp. which have been collected from three hospitals in Tehran were studied. Isolates identified and confirmed as *Shigella* spp. by biochemical, serological and molecular methods (*ipaH*, *wbgz*, *rfa* genes). Antimicrobial susceptibility test was performed for ampicillin, azithromycin, ciprofloxacin, doxycycline, levofloxacin, minocycline, nalidixic acid, norfloxacin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline by disc agar diffusion method. Minimal inhibition concentrations were performed for azithromycin and tetracycline.

Results: From a total of 50 *Shigella* spp. isolates, 16% of them were *Shigella flexneri* and 84% *Shigella sonnei*. The majority of isolates were multidrug resistant. The most resistance was seen to doxycycline, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline. Resistance to azithromycin was 6% and all of the isolates were susceptible to norfloxacin and levofloxacin. Nine patterns of resistance were revealed to these isolates.

Conclusion: High resistance to tetracycline was observed and resistance to azithromycin as an alternative treatment choice was also considerable.

Keywords: *Shigella*; Multidrug Resistance; Tetracycline; Azithromycin.

بررسی مقاومت به تتراسایکلین و آزیترومایسین در گونه‌های شیگلا جداشده از مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در تهران، ایران

شادی شاهسوان^۱، عبدالعزیز رستگار لاری^۲، بیتا بخشی^۳، پرویز اولیاء^۴، ملیحه نوبخت^{۱*}

۱. مرکز تحقیقات مقاومت‌های ضد میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران ۲. گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران ۳. گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۴. مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران ۵. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران * نویسنده مسؤل: تلفن: ۰۲۱۸۶۷۰۴۵۶۶ فاکس: ۰۲۱۸۸۶۲۲۶۸۹ پست الکترونیک: nobakht@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: جنس شیگلا باکتری‌های گرم منفی هستند که عامل بیماری شیگلوزیس بوده و در کودکان زیر دو سال، افراد مسن و کسانی که ضعف سیستم ایمنی دارند می‌تواند مشکل ساز شود. آنچه که امروزه درمان بیماری‌های عفونی را پیچیده می‌کند؛ مقاومت همزمان به چند آنتی بیوتیک می‌باشد. گونه‌های شیگلا نیز مانند سایر باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌هایی که به صورت معمول در درمان شیگلوزیس استفاده می‌شود، مقاوم شده‌اند. هدف این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به تتراسایکلین و آزیترومایسین در جدایه‌های شیگلا می‌باشد.

روش کار: ۵۰ جدایه شیگلا از کودکان زیر پنج سال مبتلا به اسهال از سه بیمارستان در شهر تهران جمع‌آوری و وارد مطالعه شدند که شناسایی آنها به روش‌های بیوشیمیایی، آگلوتیناسیون و مولکولی (ژن‌های *ipaH*, *wbgz*, *rfa*) انجام شد. حساسیت ضد میکروبی با روش دیسک آگار دیفیوژن برای آمپی سیلین، آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین، داکسی سایکلین، لووفلوکساسین، ماینوسایکلین، نالیدیکزیک اسید، نورفلوکساسین، استرپتومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول و تتراسایکلین و بررسی حداقل غلظت بازدارندگی برای تتراسایکلین و آزیترومایسین انجام شد.

یافته‌ها: از ۵۰ جدایه شیگلا ۱۶ درصد به عنوان شیگلا فلکسنری و ۸۴ درصد به عنوان شیگلا سونئی شناسایی شدند. ۹۸ درصد همزمان به چند دارو مقاوم بودند. بیشترین جدایه‌ها به استرپتومایسین، تری متوپریم سولفا متوکسازول، تتراسایکلین و داکسی سایکلین مقاوم بودند. مقاومت به آزیترومایسین ۶ درصد گزارش شد. تمامی جدایه‌ها به نورفلوکساسین و لووفلوکساسین حساس بودند. در این مطالعه نه الگوی مقاومت برای شیگلا مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مقاومت به تتراسایکلین در این جدایه‌ها بسیار بالا بوده و همچنین مقاومت به آزیترومایسین هم به عنوان آنتی بیوتیکی که در سال‌های اخیر استفاده می‌شود قابل ملاحظه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیگلا، مقاومت دارویی، تتراسایکلین، آزیترومایسین

دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۸

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۶

مقدمه

جنس شیگلا، باکتری‌های گرم منفی هستند که در خانواده انتروباکتریاسه قرار گرفته‌اند و ارتباط بسیار نزدیکی با اشریشیا کلی دارند. گونه‌های شیگلا عامل شیگلوزیس در انسان می‌باشند که یک بیماری عفونی است و عموماً همراه با تب و اسهال (غالباً اسهال خونی) می‌باشد. معمولاً بیماری یک تا دو روز پس از

آلودگی با باکتری شروع می‌شود و پس از پنج تا هفت روز بهبود می‌یابد. عفونت با شیگلا به این علت که تعداد کمی از باکتری می‌تواند باعث عفونت شود، سالانه همه‌گیری‌هایی زیادی را در جهان سبب می‌شود و عامل مرگ و میر افراد زیادی در دنیا می‌باشد. عفونت با این باکتری می‌تواند در کودکان

برای گونه‌هایی از شیگلا که همزمان به چند دارو مقاوم هستند، مطرح می‌باشد. ولی متأسفانه گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت به این دارو نیز وجود دارد [۷].

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند یک خصوصیت ذاتی یا اکتسابی باشد و با روش‌های متفاوتی از جمله کاهش نفوذپذیری سلول برای دارو، کاهش تجمع دارو بواسطه خروج آن توسط افلوکس پمپ‌ها، تولید آنزیم‌هایی که سبب اختلال در عملکرد دارو یا تغییر در مکان هدف دارو ایجاد می‌شود. مقاومت دارویی تحت کنترل ژنتیکی بوده و می‌تواند تغییر نماید [۹]. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت به تتراسایکلین و آزیترومایسین در جدایه‌های شیگلا در ایران می‌باشد تا با آگاهی از میزان مقاومت به این داروها خصوصاً آزیترومایسین بتوان در موارد حاد از آنها استفاده کرد و تمامی راهکارها را جهت پیشگیری از بروز مقاومت جدید به کار گرفت.

روش کار

شناسایی جدایه‌ها

این مطالعه بر روی ۵۰ نمونه شیگلا که از مدفوع کودکان زیر پنج سال مبتلا به اسهال در شهر تهران (۱۳۹۲-۱۳۹۱) جداسازی شده بودند، انجام شد. تمامی نمونه‌ها مجدداً بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شد و آزمایشات بیوشیمیایی مانند اکسیداز، اوره آز، تخمیر قندها، تولید اندل، متیل رد، و گس پروسکور، سترات، حرکت و ارتونیتروفیل بتا گالاکتوزید انجام شد. سپس آگلوتیناسیون بر روی لام با استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی گونه (A, B, C, D) (شرکت بهارافشان، تهران، ایران) مورد بررسی قرار گرفت.

حضور ژن *ipaH* توسط PCR^E جهت تایید جنس شیگلا بررسی شد [۱۰]. همچنین جدایه‌ها از نظر حضور ژن *rflC* جهت تایید گونه شیگلا فلکسنری و ژن

زیر دو سال همراه با سندرم سیزر^۱، سندرم ریتز^۲ و سندرم اورمی همولیتیک^۳ باشد. به طور کلی شیگلوزیس می‌تواند در افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند، افراد مسن و کودکان زیر دو سال مشکل ساز شود؛ خصوصاً زمانی که آلودگی با گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته باشد. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در موارد حاد، ضروری است و در موارد دیگر نیز جهت کاهش علایم و کاهش انتقال بیماری در جامعه توصیه می‌گردد [۱،۲]. آنچه که امروزه درمان بیماری‌های عفونی را پیچیده می‌کند، افزایش ظهور گونه‌هایی از باکتری‌ها می‌باشد که همزمان به چند آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند. گونه‌های شیگلا نیز مانند سایر باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت معمول در درمان شیگلوزیس استفاده می‌شده است، مقاوم شده‌اند. مطالعات زیادی در ایران و سایر نقاط جهان تاکید بر ظهور گونه‌های مقاوم شیگلا دارند. اکثریت آنها مقاومت بالا به تری متوپریم سولفا متوکسازول، تتراسایکلین، آمپی سیلین و استرپتومایسین را نشان داده‌اند [۳،۴] و برخی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین و آزیترومایسین را نیز گزارش کرده‌اند [۵-۷]. تتراسایکلین‌ها آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که برطیف وسیعی از میکروارگانیزم‌ها موثر می‌باشند و به عنوان دارویی برای درمان و پیشگیری در انسان و حیوانات استفاده می‌شوند. تتراسایکلین در سال ۱۹۴۰ کشف شد و در سال ۱۹۵۳ اولین گونه شیگلای مقاوم به این دارو گزارش شد. امروزه بسیاری از پاتوژن‌ها به این دارو مقاوم شده‌اند و استفاده از این داروی ارزان قیمت را محدود کرده‌اند [۸].

آزیترومایسین، آنتی‌بیوتیکی از خانواده ماکرولیدها می‌باشد و امروزه به عنوان یک درمان جایگزین

¹ Seizures

² Reiter

³ Haemolytic Uremic Syndrome

⁴ Polymerase Chain Reaction

کنترل استفاده شد [۱۱،۱۲]. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ گزارش شده است.

wbgZ جهت تایید گونه شیگلا سونئی به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سوبه‌های *S. sonnei* ATCC1202 و *S. flexneri* ATCC9290 جهت

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

پرایمرها	توالی پرایمرها (5' to 3')	دمای Annealing (°C)	اندازه محصول (bp)	حضور ژن‌ها درصد	مرجع
<i>ipaH</i> (F)	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	60	620	100	Sethabutr et al, 1993
<i>ipaH</i> (R)	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC				
<i>wbgZ</i> (F)	TCT GAATATGCCCTCTACGCT	60	430	84	Ojhaa et al, 2013
<i>wbgZ</i> (R)	GACAGAGCCCGAAGAACCG				
<i>rfa</i> (F)	TTTATGGCTTCTTTGTCCGG	60	537	16	Toma et al, 2003
<i>rfa</i> (R)	CTGCGTGATCCGACCATG				

تتراسایکلین و $512-25 \mu\text{g}/\text{m}$ برای آزیترومایسین در نظر گرفته شد. اشریشیا کلی (ATCC ۲۵۹۲۲) و استافیلوکوکوس اورئوس (۲۵۹۲۳) (*E. coli*) و *S. aureus* ATCC به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها، استخراج DNA و PCR

پرایمرها با استفاده از توالی‌های ذکر شده در مقالات (Claudia Toma, Ojha) به شرکت TAGC (Tag Copenhagen A/S Kong Georgs Vej 12 DK-Frederiksberg Denmark 2000) سفارش داده شدند.

استخراج DNA با استفاده از کیت (Exgene Cell SV kit Gene All Biotechnology Co. Ltd Korea) انجام شد و DNA استخراج شده در ظروف عاری از DNase و در یخچال نگهداری شد.

جهت انجام PCR در هر میکروتیوب ترکیبی از پرایمر مورد نظر، DNA استخراج شده هر جدایه و محلول ترکیبی شرکت امپلیکون (Ampliqon Taq Polymerase Master Mix Red) استفاده شد (جدول ۲).

بررسی حساسیت ضد میکروبی

حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن و بر اساس دستور العمل ۲۰۱۵ CLSI^۱ انجام شد [۱۳،۱۴]. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل آمپی سیلین ($10 \mu\text{g}$)، آزیترومایسین ($15 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($10 \mu\text{g}$)، داکسی سایکلین ($30 \mu\text{g}$)، لووفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}$)، نورفلوکساسین ($10 \mu\text{g}$)، استرپتومایسین ($10 \mu\text{g}$)، تری متوپریم سولفامتو کسازول ($25 \mu\text{g}$) و تتراسایکلین ($30 \mu\text{g}$) می‌باشند. این بررسی دو بار تکرار شد و اشریشیاکلی (*E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲) و استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus* ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آزیترومایسین به روش رقت‌های متوالی^۲ در محیط مایع و بر اساس دستورالعمل ۲۰۱۵ CLSI انجام شد [۱۵]. غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها $10.24-0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ برای

^۱ Clinical and Laboratory Standards Institute

^۲ Micro Broth Dilution Method

جدول ۲. مقادیر و ترکیبات مورد استفاده جهت واکنش PCR

مواد	حجم
Master Mix	12µl
Primer forward (0.5µM)	0.5 µl
Primer reverse (0.5µM)	0.5 µl
DNA template	2 µl
Water	10 µl
حجم نهایی	25 µl

PCR با دمای °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه شروع شد و سپس ۳۰ دوره شامل °C ۹۴ (یک دقیقه)، °C ۶۰ (یک دقیقه)، °C ۷۲ (یک دقیقه) و نهایتاً °C ۷۲ به مدت سه دقیقه برای هر جدایه انجام شد. محصول PCR در کنار نشانگر وزن ملکولی بر روی ژل آگارز الکتروفور گردید و با استفاده از اشعه ماوراء بنفش باندها مشاهده و بررسی شدند.

یافته ها

شناسایی جدایه‌ها

بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی و همچنین PCR ژن *ipaH* پنجاه جدایه به عنوان جنس شیگلا تایید شدند. همچنین بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی، آگلوتیناسیون و PCR ژن‌های *rfc*، *wbgZ* ۱۶٪ جدایه‌ها به عنوان شیگلا فلکسنری و ۸۴٪ به عنوان شیگلا سونتئی شناسایی شدند (جدول ۱).

بررسی حساسیت ضد میکروبی

بر اساس نتایج حساسیت ضد میکروبی ۹۸ درصد جدایه‌ها همزمان به چند دارو مقاوم^۱ بودند. بیشترین مقاومت به استرپتومایسین (۱۰۰٪)، تری متوپریم سولفا متوکسازول (۹۸٪)، تتراسایکلین (۹۶٪) و داکسی سایکلین (۹۴٪) مشاهده شد. مقاومت به آزیترومایسین (۱۲٪) گزارش شد. خوشبختانه تمامی جدایه‌ها به نورفلوکساسین و لووفلوکساسین حساس بودند. نتایج حساسیت ضد میکروبی در جدول ۳

گزارش شده است. در این مطالعه ۹ الگوی مقاومت برای شیگلا مشاهده شد (جدول ۴).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

تمامی جدایه‌ها که به روش دیسک دیفیوژن به تتراسایکلین مقاوم بودند، با این روش نیز به تتراسایکلین مقاوم بودند و همگی MIC مساوی و بیش از ۱۶ µg/ml را نشان دادند، که بر اساس دستورالعمل ۲۰۱۵ CLSI مقاوم می‌باشند.

در بررسی مقاومت به آزیترومایسین به این روش ۶ درصد جدایه‌ها که MIC مساوی و بیش از ۳۲ µg/ml را نشان دادند مقاوم گزارش شدند (جدول ۴).

PCR

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز برای ژن *ipaH* یک باند ۶۲۰ bp را نشان داد و همه جدایه‌ها حامل این ژن بودند.

۱۶ درصد جدایه‌ها حامل ژن *rfc* بودند که با یک باند ۵۳۷ bp بر روی ژل آگارز به عنوان شیگلا فلکسنری شناسایی شدند. ۸۴ درصد جدایه‌ها نیز حامل ژن *wbgZ* بوده و باند ۴۳۰ bp را بر روی ژل آگارز نشان دادند و به عنوان شیگلا سونتئی شناسایی شدند.

جدول ۳. درصد حساسیت و مقاومت جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌ها

درصد جدایه‌ها %		
حساس	مقاوم	آنتی بیوتیک‌ها
76	24	آمپی سیلین
88	12	آزیترومایسین
98	2	سپروفلوکساسین
6	94	داکسی سایکلین
100	0	لووفلوکساسین
98	2	ماینوسایکلین
82	18	نالیدیکزیک اسید
100	0	نورفلوکساسین
0	100	استرپتومایسین
4	96	تتراسایکلین
2	98	تری متوپریم
		سولفامتوکسازول

¹ Multi Drug Resistance

جدول ۴. الگوی مقاومت جدایه های شیگلا و میزان مقاومت به آزیترومایسین و تتراسایکلین در آنها

جدایه ها	گونه	مقاومت به تتراسایکلین	حداقل غلظت		الگوی مقاومت براساس روش دیسک دیفیوژن		الگو در جدایه ها درصد
			بازدارندگی تتراسایکلین $\mu\text{g/ml}$	مقاومت به آزیترومایسین	بازدارندگی آزیترومایسین $\mu\text{g/ml}$		
1	S.sonnei	R	512	R	32	T,Dx,SXT,S, ATH	12
2	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S,AM	16
3	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S,AM	
4	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S,AM	
5	S.sonnei	R	256	S	8	T, Dx ,SXT,S,NA	14
6	S.sonnei	R	256	S	8	T, Dx ,SXT,S	48
7	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
8	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
9	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
10	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
11	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
12	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
13	S.sonnei	R	256	S	16	T, Dx ,SXT,S	
14	S.sonnei	R	256	R	256	T, Dx ,SXT,S, ATH	
15	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
16	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
17	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
18	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
19	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
20	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
21	S.sonnei	R	256	S	4	T,Dx,SXT,S,AM	
22	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,AM	
23	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
24	S.sonnei	R	256	R	8	T,Dx,SXT,S,ATH	
25	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
26	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
27	S.sonnei	R	256	S	8	T,Dx,SXT,S	
28	S.sonnei	R	256	S	4	T,Dx,SXT,S	
29	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
30	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
31	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,AM	
32	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
33	S.sonnei	R	128	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
34	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
35	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
36	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S,NA	
37	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
38	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
39	S.sonnei	R	256	S	16	T,Dx,SXT,S	
40	S.sonnei	R	256	R	16	T,Dx,SXT,S,ATH	
41	S.sonnei	R	256	R	16	T,Dx,SXT,S,ATH	
42	S.sonnei	R	128	S	16	T,Dx,SXT,S	
43	S.flexneri	R	128	S	16	T,Dx,MIN,SXT,S,AM	2
44	S.flexneri	R	128	S	4	T,Dx,SXT,S,AM	
45	S.flexneri	R	128	S	16	T,Dx,SXT,S,AM	
46	S.flexneri	R	128	S	16	T,Dx,S,AM	2
47	S.flexneri	R	128	R	32	T,Dx,SXT,S, ATH	
48	S.flexneri	R	128	S	16	T,SXT,S	2
49	S.flexneri	S	4	S	16	SXT,S,NA	2
50	S.flexneri	S	4	S	8	SXT,S,AM,NA,CIP	2
Date of Isolation	Number of diarrheal stool samples		No. of <i>Shigella</i> spp. isolated		Number of <i>Shigella</i> spp. Selected for MLST analysis		
November/2012	959		30		7		
December/2012	693		18		4		

January/2013	292	0	0
February/2013	312	2	1
March/2013	333	0	0
April/2013	356	0	0
May/2013	415	0	0
June/2013	403	1	1
July/2013	353	2	1
August/2013	385	4	2
September/2013	414	5	2
October/2013	357	8	2
Total	5291	70	20

B: شیگلا فلکسنری D: شیگلا سونئی R: مقاوم S: حساس

حداقل غلظت بازدارندگی برای مقاومت به آزیترومایسین (MIC 32 µg/mL) حداقل غلظت بازدارندگی برای مقاومت به تتراسایکلین (MIC 16 µg/mL) AM: آمپی سیلین ATH: آزیترومایسین CIP: سیپروفلوکساسین Dx: داکسی سایکلین NA: نالیدیگزیک اسید S: استرپتومایسین SXT: تریمتوپریم سولفامتو کسازول T: تتراسایکلین

بحث

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلات جامعه کنونی می‌باشد. شیگلا نیز مانند سایر باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که قبلاً برای درمان شیگلوزیس استفاده می‌شده، مقاوم شده است و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جدید را لازم نموده است. این باکتری مشابه سایر باکتری‌های بیماری‌زای روده ای تمایل زیادی به مقاومت همزمان به چند دارو دارد [۱۶].

در این مطالعه ۹۸ درصد جدایه‌های شیگلا MDR بودند که این رقم بسیا ربالایی می‌باشد. سایر مطالعات در ایران و دیگر نقاط جهان نیز این نتیجه را تایید می‌کنند. به طوری که در مطالعه جعفری و همکاران ۹۱ درصد جدایه‌های شیگلا و در مطالعه دلال و همکاران ۹۶ درصد جدایه‌ها MDR گزارش شدند [۱۷،۱۸] و همچنین بررسی‌هایی در نپال و چین نیز این نتایج را تایید نمودند [۱۹،۲۰].

در این مطالعه جدایه غالب شیگلا سونئی بود، در حالی که در سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۱ میلادی جدایه غالب شیگلا فلکسنری بوده است [۲۱]. افزایش سازگاری شیگلا سونئی در محیط و ارتقا سطح بهداشت اجتماع می‌تواند دلایلی برای افزایش

جداسازی این گونه نسبت به سایر گونه‌های این

باکتری باشد [۲۴-۲۲].

نتایج حساسیت ضد میکروبی مقاومت بالایی را نسبت به تری متوپریم سولفا متوکسازول (۹۸٪) نشان داد. در سایر مطالعات در ایران مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ۹۴-۹۲٪ درصد گزارش شده است [۳،۲۳]. همچنین در سایر نقاط جهان مانند نپال (۸۱/۵۴٪)، اسپانیا (۸۱/۸٪) و ایالت متحده آمریکا (۶۶٪) نیز مقاومت بالایی به این آنتی‌بیوتیک گزارش شده است [۱۹،۲۵،۲۶].

تری متوپریم سولفا متوکسازول یکی از داروهای توصیه شده برای جدایه‌های مدفوعی می‌باشد که با توجه به مقاومت بالایی که امروزه گزارش شده است مصرف این دارو را محدود می‌کند [۲۷]. در این مطالعه مقاومت بالایی نسبت به تتراسایکلین (۹۶٪) مشاهده شد. این نتیجه توسط سایر مطالعات در ایران و سایر نقاط جهان تایید شد [۲۸،۳]. مقاومت به داکسی سایکلین (۹۴٪) نیز بسیار بالا بود. براساس CLSI جدایه‌هایی که به داکسی سایکلین مقاوم هستند به تتراسایکلین هم مقاوم می‌باشند و نتایج این تحقیق نیز موید این نکته است.

مقاومت به ماینوسایکلین (۲٪) بسیار پایین بوده که

ممکن است به دلیل مصرف کم آن در جامعه به نسبت تتراسایکلین و داکسی سایکلین باشد. این نکته قابل توجه است که نتایج روش یسک دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی برای تتراسایکلین یکسان بوده و در بررسی حساسیت به این دارو شاید بتوان به روش دیسک دیفیوژن که آسان تر می باشد اکتفا کرد.

آزیترومایسین آنتی بیوتیکی از خانواده ماکرولیدها می باشد که امروزه به عنوان یک درمان آلترناتیو برای جدایه های شینگلا MDR در برخی کشورها مانند کانادا و آمریکا استفاده می شود که متاسفانه مقاومت شینگلا به این دارو نیز گزارش شده است [۲۹،۷]. آزیترومایسین به چند دلیل داروی مناسبی برای درمان شینگلا می باشد. در شرایط آزمایشگاهی در مقابل گونه های متفاوت شینگلا فعال است یک دوز در روز از این دارو برای درمان کافی است. غلظت بالای این دارو در سلول و همچنین $2-8 \mu\text{g/ml}$ MIC از این دارو رشد گونه های شینگلا در کولون را ممانعت می کند [۳۰]. در مطالعه حاضر مقاومت به این دارو به روش دیسک دیفیوژن ۱۲ درصد و به روش حداقل بازدارندگی ۶ درصد مشاهده شد. در بررسی دیگری در ایران که در سال ۲۰۱۳ میلادی در اصفهان انجام شده است، مقاومت بالایی به آزیترومایسین (۷۰٪) برای جدایه های شینگلا گزارش شد [۳۱]. میزان مقاومت شینگلا به آزیترومایسین در سایر کشورها نیز متفاوت گزارش شده است، در بنگلادش ۱۶ درصد، در هند ۳۴/۴ درصد و در بوتان تمام جدایه های شینگلا به این دارو حساس بودند [۳۰،۳۲،۳۳]. این تفاوتها ممکن است به این علت باشد که تا سال ۲۰۱۵، CLSI اطلاعات کاملی برای

انتروباکتریاسهها ذکر نکرده بود.

نتایج بررسی مقاومت به این آنتی بیوتیک در این مطالعه در دو روش دیسک دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی متفاوت بود و چون روش MIC، روش دقیق تری می باشد می توان گفت میزان مقاومت به آزیترومایسین برای جدایه های شینگلا در این مطالعه ۶ درصد می باشد. میزان پایین مقاومت به این دارو در کشور می تواند حاکی از مصرف کم یا صحیح این دارو برای این جدایه ها باشد.

نتیجه گیری

بر اساس بررسی انجام شده مقاومت بالای جدایه های شینگلا در ایران نسبت به تری متوپریم سولفامتو کسازول و تتراسایکلین مشابه سایر کشورها بوده و استفاده این دو دارو را محدود می سازد، در مقابل خوشبختانه این جدایه ها نسبت به نورفلوکساسین، لوفلوکساسین، سپیروفلوکساسین و ماینوسایکلین حساسیت بالایی نشان داده اند که می توانند انتخاب مناسبی برای درمان باشند. مقاومت به آزیترومایسین نیز به عنوان داروی خط دوم نسبت به برخی دیگر کشورها پایین می باشد و باید پیشگیری از ظهور مقاومت به داروهای جدید را جدی تر پیگیری کرد و به این نکته توجه کرد که در بررسی حساسیت این دارو جهت دستیابی به نتیجه دقیق تر باید از روش MIC استفاده کرد. همچنین جهت پیشگیری از مقاومت دارویی و شکست درمانی، آزمایش حساسیت ضد میکروبی برای تمامی عوامل عفونی به روش دقیق انجام و از مصرف بی رویه آنتی بیوتیکها جلوگیری شود.

References

- 1- Todar K. Structure and Function of Bacterial Cells. In: Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology, 1st ed. Wisconsin: 2005;1:441-443.
- 2- Von Seidlein L, Kim DR, Lee H, Wang X, Ali M, Thiem VD, et al. A multicentre study of Shigella diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLoS Med. 2006 sep;3(9):1556-1569.

- 3- Pourakbari B, Mamishi S, Mashoori N, Mahbobi N, Ashtiani MH, Afsharpaiman S, et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Shigella* species isolated in Children Medical Center Hospital, Tehran, Iran, 2001-2006. *Braz J Infect Dis*. 2010 Mar-Apr;14(2):153-7.
- 4- Zhang CL, Liu QZ, Wang J, Chu X, Shen LM, Guo YY. Epidemic and virulence characteristic of *Shigella* spp. with extended-spectrum cephalosporin resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China. *BMC Infect Dis*. 2014 May15;14(1):1.
- 5- Jeon Y La, Nam Y, Lim G, Cho S, Kim Y, Jang J, et al. Quinolone-resistant *Shigella flexneri* isolated in a patient who travelled to India. *Ann Lab Med*. 2012 Sep;32(5):366-9.
- 6- Gharibi O, Zangene S, Mohammadi N, Mirzaei K, Gharibi A, Khajehian A. Increasing antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the Bushehr, Iran. *Pak J Biol Sci*. 2012 Feb;15(3):156-9.
- 7- Gaudreau C, Barkati S, Leduc JM, Pilon PA, Favreau J, Bekal S. *Shigella* spp. with reduced azithromycin susceptibility, Quebec, Canada, 2012-2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 May;20(5):854-856.
- 8- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun;65(2):232-60.
- 9- Epstein FH, Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med*. 1991 Feb;324(9):601-612.
- 10- Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect Dis*. 1993 Feb;167(2):458-461.
- 11- Ojha SC, Yean Yean C, Ismail A, Banga Singh KK. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. *Biomed Res Int*. 2013 Feb;2013:1-9.
- 12- Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Rivas M, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2669-2671.
- 13- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty fifth informational supplement (M100S25). Pennsylvania: Wayne, 2015 Jan.
- 14- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard twelfth edition (M02A12). Pennsylvania: Wayne, 2015 Jan.
- 15- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard tenth edition (M07A10). Pennsylvania: Wayne, 2015 Jan.
- 16- Patwari AK. Multidrug resistant *Shigella* infections in children. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1994 Sep;12(3):182-186.
- 17- Jafari F, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Bolfion M, Kharazia P, Yaghoobi M, et al. Molecular diagnosis and antimicrobial resistance pattern of *Shigella* spp. isolated from patients with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol from bed to bench*. 2008 Jan;1(1):11-17.
- 18- Soltan Dallal MM, Ranjbar R, Pourshafie MR. The study of antimicrobial resistance among *Shigella flexneri* strains isolated in Tehran, Iran. *J Pediatr Infect Dis*. 2011 Mar;6(2):125-129.
- 19- Khan S, Singh P, Asthana A, Ansari M. Magnitude of drug resistant shigellosis in Nepalese patients. *Iran J Microbiol*. 2013 Dec;5(4):334-8.
- 20- Zhu J, Duan G, Yang H, Fan Q, Xi Y. Multi-drug resistance and characteristic of integrons in *Shigella* spp. isolated from China. *Biomed Environ Sci*. 2011 Feb;24(1):56-61.
- 21- Eftekhari N, Bakhshi B, Pourshafie MR, Zarbakhsh B, Rahbar M, Hajia M. Genetic diversity of *Shigella* spp. and their integron content. *Foodborne Pathog Dis*. 2013 Mar;10(3):237-242.
- 22- Balbi KJ, Rocha EPC, Feil EJ. The temporal dynamics of slightly deleterious mutations in *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Mol Biol Evol*. 2009 Feb;26(2):345-355.
- 23- Mardaneh J, Poor SA, Afrugh P. Prevalence of *Shigella* species and antimicrobial resistance patterns of isolated strains from infected pediatrics in Tehran. *Int J Entric Pathog*. 2013 Aug;1(1):28-31.
- 24- Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of *Shigella sonnei* obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr*. 2008 Dec;26(4):426-30.

- 25- Toro C, Arroyo A, Sarria A, Iqlesias N, Enriquez A, Baquero M, et al. Shigellosis in Subjects with Traveler's Diarrhea Versus Domestically Acquired Diarrhea: Implications for Antimicrobial Therapy and Human Immunodeficiency Virus Surveillance. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Sep;93(3):491-6.
- 26- Wong MR, Reddy V, Hanson H, Johnson KM, Tsoi B, Cokes C, et al. Antimicrobial resistance trends of *Shigella* serotypes in New York City, 2006-2009. *Microb Drug Resist.* 2010 Jun;16(2):155-61.
- 27- Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 2001 Jun;32(11):1608-1614.
- 28- Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front Microbiol.* 2013 Jun;4:1-10.
- 29- Sjolund Karlsson MS, Bowen A, Reporter R, Folster J, Grass J, Howie R, et al. Outbreak of infections caused by *Shigella sonnei* with reduced susceptibility to azithromycin in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar;57(3):1559-60.
- 30- Boumghar-Bourtchai L, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Duhlluin A, Ifrane SA, et al. Macrolide-resistant *Shigella sonnei*. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1297-9.
- 31- Sadeghabadi AF, Ajami A, Fadaei R, Zandieh M, Heidari E, Sadeghi M, et al. Widespread antibiotic resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species. *J Res Med Sci.* 2014 Mar;19(Suppl 1):S51-5.
- 32- Ghosh S, Pazhani GP, Chowdhury G, Guin S, Rajendran K, Bhattacharya MK, et al. Genetic characteristics and changing antimicrobial resistance among *Shigella* spp. isolated from hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. *J Med Microbiol.* 2011 Oct;60(Pt 10):1460-6
- 33- Ruekit S, Wangchuk S, Dorji T, Tshering KP, Pootong P, Nobthai P, et al. Molecular characterization and PCR-based replicon typing of multidrug resistant *Shigella sonnei* isolates from an outbreak in Thimphu, Bhutan. *BMC Res Notes.* 2014 Feb;7:95.