Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 18, No. 1, Spring 2018, Pages 52-61

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

Tajoadini M [1], Kheyrkhah B*[2], Amini K[3]

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

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

ردیابی ژن‌های bla_{PER}، bla_{GES} و bla_{VEB} در ایزوله‌های *شیگلا سونئی* جداسازی‌شده از بیماران مبتلا به اسهال و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

مریم تاج‌الدینی[1]، بابک خیرخواه[2]*، کیومرث امینی[3]

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: ۰۹۱۳۳٤٥٤٧٨ فاکس: ۰۲۱ ٤٤٨٥۰۹٥٤ پست الکترونیک: babakkheirkhah@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: گونه های *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 (گونه های *شیگلا*) و بروز مقاومت دارویی، انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان شیگلوزیس را با مشکل مواجه می‌سازد. یکی از عوامل مهم بروز مقاومت در ایزوله های *شیگلا* حضور ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های bla_{PER}، bla_{GES} و bla_{VEB} در ایزوله‌های *شیگلا سونئی* جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال با روش Multiplex-PCR و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها بود.

روش کار: تعداد ۶۰ نمونه ایزوله *شیگلا سونئی* 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_{PER}، bla_{GES} و bla_{VEB} با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها با روش دیسک دیفیوژن و بر اساس موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی انجام شد.

یافته ها: نتایج Multiplex-PCR نشان داد ۳ نمونه دارای ژن bla_{PER} بودند، اما هیچکدام دارای ژن‌های bla_{VEB} یا bla_{GES} 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_{PER} در ایزوله های *شیگلا سونئی* و مقاومت بالای ایزوله ها به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و سفتریاکسون بود. به همین جهت مراقبت‌های دقیق پزشکی و استفاده صحیح و به موقع از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت جلوگیری از شیوع ایزوله های مقاوم ضروری می‌باشد.

واژه های کلیدی: *شیگلا سونئی*، بتالاکتاماز وسیع الطیف، دیسک دیفیوژن، PCR چندگانه

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰ **پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۵/۳۰

مقدمه

شیگلا یک باسیل گرم منفی روده ای و عامل اسهال خونی باکتریایی در کشورهای پیشرفته و درحال توسعه می‌باشد. جنس *شیگلا* دارای ٤ گونه *دیسانتری*[1]، *فلکسنری*[2]، *سونئی*[3]، و *بوییدی*[4] می‌باشد [۱]. از بین گونه‌های *شیگلا*، *سونئی* از رایج ترین گونه‌های عامل اسهال به خصوص در کشورهای پیشرفته می‌باشد [۲].

[1] *S. dysenteriae*

[2] S. *flexneri*
[3] *S. Sonnei*
[4] *S. boydii*

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

بلع تعداد کم باکتری (حدود ۱۰۰ عدد) می‌تواند سبب عفونت شود. این بیماری می‌تواند منجر به باکتریمی 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 آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله نسل سوم سفالوسپورین‌ها مقاوم شده اند و همین امر درمان این بیماری را با مشکل مواجه کرده است [٤]. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز عمده ترین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی به بتالاکتام‌ها می‌باشد. این آنزیم‌ها حلقه آمیدی بتالاکتام‌ها را تخریب می‌کند. بتالاکتامازها بر اساس سکانس آمینو اسیدی به ٤ گروه A تا D تقسیم می‌شوند. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف[1] از بتالاکتامازهای کلاس A بوده و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف با یک زنجیر جانبی اکسی‌مینو[2] را هیدرولیز می‌کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آزترئونام می‌شوند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاولانیک اسید مهار و اولین بار در *اشریشیاکلی*[3] شناسایی شدند [۵]. علاوه بر ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV} و $bla_{CTX\text{-}M}$ ژن‌های دیگری نیز مقاومت به سفالوسپورین‌ها را ایجاد می‌کنند از جمله ژن‌های bla_{VEB}، bla_{PER} و bla_{GES} که در مقایسه به میزان کمتری در ایزوله‌های *انتروباکتریاسه* یافت می‌شوند [۶]. ژن bla_{GES} اولین بار در *کلبسیلاپنومونیه*[4] 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_{PER} اولین بار در *سودوموناس آئروژینوزا*[5] جداسازی شده از یک بیمار ترکیه ای شناسایی شد اما بعدها در ایزوله‌های *سالمونلا* هم جداسازی شد. ژن bla_{VEB} اولین بار در *اشریشیاکلی* در فرانسه شناسایی شد و با سایر ژن‌های ESBL تفاوت زیادی دارد و در ایجادمقاومت به سفالوسپورین‌ها مانند سفتازیدیم 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 سونئی* 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 سونئی* 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 سونئی* جمع‌آوری شده از گروه باکتری‌های تولید کننده ESBL شناسایی شدند [۱۰]. با توجه به گسترش ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع الطیف در ایزوله‌های *شیگلا سونئی* و سرعت تشخیص بالا و دقیق روشهای مولکولی و شناسایی همزمان چندین ژن، در این مطالعه به بررسی حضور این ژن‌ها در جدایه‌های *شیگلا سونئی* 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 سونئی* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال

[1] Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)
[2] Oximino
[3] *Escherichia coli*
[4] *Klebsiella pneumoniae*
[5] *Pseudomonas aeruginosa*

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]
[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

مراجعه کننده به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی خصوصی شهر کرمان در بازه زمانی دی ماه تا اسفند ۱۳۹٤، 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[1] برای شناسایی سویه‌های مقاوم به بتالاکتاماز انجام و بعد از کشت باکتری بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار، دیسک کلاونیک اسید را سمتی از پلیت گذاشته و دیسک Clavulanic EDTA/acid را در گوشه دیگر پلیت قرار داده و ۲٤ ساعت انکوبه گردید. پس از زمان ۲٤ 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 Multiplex- PCR اقدام شد. آزمون PCR بر روی ۶۰ جدایه *شیگلا سونئی* برای ژن‌های bla_{GES}، bla_{PER} و bla_{VEB} انجام گرفت [۱۱] (جدول ۱).

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

ژن	توالی (′۵ به ′۳)	اندازه محصول bp
bla_{veb}	F-CATTTCCCGATGCAAAGCGT R-CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	۶٤۸
bla_{PER}	F-GCTCCGATAATGAAAGCGT R-TTCGGCTTGACTCGGCTGA	۵۲۰
bla_{GES}	F-AGTCGGCTAGACCGGAAAG R-TTTGTCCGTGCTCAGGAT	۳۹۹

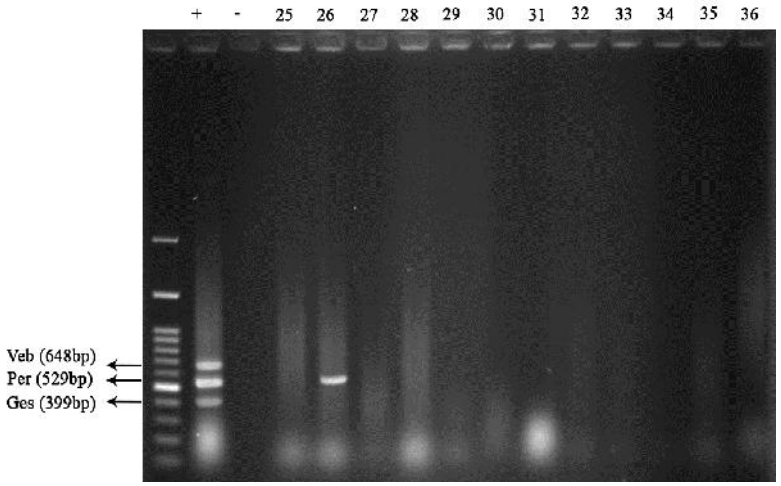
واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR استاندارد در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر PCR Buffer۱۰X، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ۱ mM، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱٤/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase با غلظت unit ۲/۵ و ۵ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۲میکرومول انجام گردید. برنامه حرارتی جهت انجام واکنش‌های PCR عبارت بود از واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند. داده‌های‌آماری با نرم‌افزار SPSS-13 و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حساسیت ایزوله‌های شیگلا سونئی نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفکسیم (µg۵)، سفتریاکسون (µg۳۰)، تتراسایکلین (µg۳۰) کوتریموکسازول (µg۲۵) و کوآموکسی کلاو (µg۳۰) (پادتن طب) به روش دیسک دیفیوژن[2] و مطابق با استانداردهای موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی[3] سنجیده شد [۱۳،۱۲].

[1] Combine Disk
[2] Disk DIffiusion (Kirby-Bauer)
[3] Clinical Laboratory Standard Institue (CLSI)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]
[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

یافته‌ها

تمامی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی بررسی و مطابق با استانداردهای تشخیصی به عنوان *شیگلا سونئی* تایید گردیدند. بر اساس نتیجه آزمایش مولتی پلکس PCR مشخص گردید ۳ نمونه دارای ژن bla_{PER} بودند، اما هیچکدام دارای ژن bla_{VEB} یا bla_{GES} 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 کلاوونیک اسید (۵۳/۳٪) و آنتی بیوتیک سفتریاکسون (۳۳/۳٪) 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 (۵۳/۳٪) از ایزوله‌ها مقاوم به کلاوونیک اسید بوده که با این روش شناسایی گردید. نتایج ضریب همبستگی بین ژن شناسایی شده و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که حضور ژن PER و آنتی‌بیوتیک‌ها 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 ($p<۰/۰۵$).



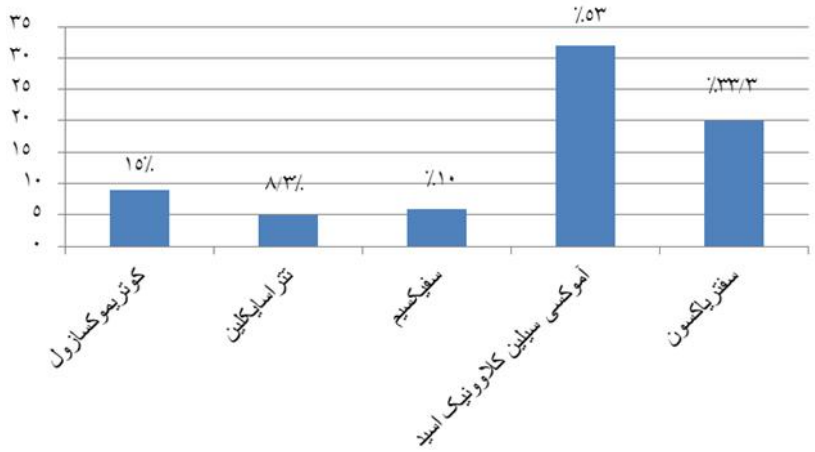
تصویر ۱. نتایج واکنش PCRچندگانه برای شناسایی ژن‌های مورد مطالعه. به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه جداسازی شده ۲۵-۳۶ حاوی ژن bla_{PER} با طول ۵۲۹ bp قابل مشاهده می‌باشد.

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

آنتی بیوتیک	حساس (S)	نیمه حساس (I)	مقاوم (R)
کوتریموکسازول	۴۸/۳	۳۶/۶	۱۵
تتراسایکلین	85	۵	۸/۳
سفیکسیم	۶۶/۶	۲۳/۳	۱۰
آموکسی سیلین کلاوونیک اسید	۳۳/۳	۱۳/۳	۵۳/۳
سفتریاکسون	۶۳/۳	۳/۳	۳۳/۳

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]



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 می تواند 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 عناون 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 آنتی بیوتیکی مناسب، شدت، دوره، علائم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می‌دهد. اولین خط درمانی شیگلوز، آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول هستند، اما با توجه به بروز مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها، فلوروکینولون‌ها و نسل سوم سفالوسپورین‌ها جایگزین اینها شده اند [۱۶]. بتالاکتام‌های وسیع الطیف یکی از مهمترین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در ایران هستند و مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها 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]. ESBL ها اولین بار در کشور آلمان و در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شد. از آن زمان تاکنون تعداد باکتری‌های بیشتری از خانواده *انتروباکتریاسه* در این دسته قرار گرفتند. این آنزیم‌ها درجات مختلفی از حفاظت علیه آنتی بیوتیک‌های سفالوسپورین وسیع الطیف مانند سفوتاکسیم، سفتازیدیم، مونوباکتام‌ها و آزترئونام از خود نشان می‌دهند و توسط کلاوونیک اسید مهار می‌شوند. شایع‌ترین ژن‌های ESBL؛ SHV و TEM هستند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

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 وسیع‌الطیف 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_{PER} در باکتری‌های روده ای مهم تولیدکننده ESBLها و باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیرکننده وجود دارد. از جمله این باکتری‌ها عبارتند از *پروتئوس*، *سالمونلا*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتر* و *پرویدنشیا* [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 وسیع‌الطیف می‌باشد [۲۰]. ایزوله‌های بیان کننده bla_{VEB} نیز به ندرت در باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شده اند. آنالیز ژنتیکی bla_{VEB} و bla_{GES} نشان داد این ژن‌ها توسط اینتگرون کلاس ۱ روی پلاسمید یا کروموزوم قرار می‌گیرد [۱۸]. در مطالعه گیرلیچ[1] 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_{VEB} 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[2] و همکاران، فراوانی ژن‌های ESBL در ایزوله‌های *انتروباکتریاسه* مورد بررسی قرار گرفت، در این مطالعه ۱۶/۱درصد نمونه‌ها دارای ژن bla_{VEB} بودند اما هیچکدام از نمونه‌ها ژن bla_{PER} یا bla_{GES} را نداشتند [۲۱]. کوییتروس[3] 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_{PER} بودند [۲۲]. دالن[4] 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_{VEB} بود [۱۱]. همانگونه که از مطالعات گذشته بر می‌آید، ۳ ژن bla_{PER}، bla_{GES} وbla_{VEB} در ایزوله‌های *شیگلا* وجود نداشته اند اما در مطالعه حاضر این ژن bla_{PER} در ۳ ایزوله *شیگلا سونئی* حضور داشته است. با توجه به اینکه *شیگلا سونئی* 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 کلاونیک 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، ٤ سویه (۷/۳٪)، شامل ۳ سویه شیگلا سونئی و یک سویه شیگلا فلکسنری به روش فنوتیپی به عنوان سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز شناسایی گردیدند [۹].

[1] Girlich
[2] Kiratisin
[3] Quinteros
[4] Dallene

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]
[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

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 *سونئی* (۶۳٪) بود، ۲۳/۳ درصد جدایه‌ها به سفتریاکسون، ۲٤/٤ درصد به سفیکسیم، ۹۲/۲ درصد به کوتریموکسازول و ۶۵/۶ درصد به تتراسایکلین مقاوم بوده اند [۱٤]. در مطالعه ضیائی و همکاران، ایزوله‌های *شیگلای* جداسازی شده از موارد اسهال خونی از لحظ 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، ۹٤/۵ درصد نمونه‌ها به کوتریموکسازول، ۹۳/۲ درصد به تتراسایکلین، ۲۲ درصد به آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و ۶/۸ درصد به سفتریاکسون مقاوم بوده اند [۲٤]. قندیان و همکاران، به بررسی گونه‌ها و مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ نمونه *شیگلای* جداسازی‌شده از موارد اسهال پرداختند. در این مطالعه ۷۳ درصد نمونه‌ها متعلق به گونه *سونئی* بودند. به علاوه ۶۰ درصد ایزوله‌های *شیگلا سونئی* مقاوم به کوتریموکسازول، ۲۸ درصد مقاوم به تتراسایکلین و ٤۰ 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 سونئی* جداسازی شد که در این مطالعه مقاومت به تتراسایکلین و کوتریموکسازول در ۹۰ درصد ایزوله‌های شیگلا سونئی 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 سونئی* 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 سونئی به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین کلاوونیک اسید و سفتریاکسون بود که این امر بسیار نگران‌کننده می‌باشد زیرا گونه سونئی 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 آنتی‌بیوتیک‌ها و پایش حضور ژن‌های دخیل در بروز مقاومت دارویی جهت کاهش انتشار ایزوله‌های *شیگلا سونئی* مقاوم به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف ضروری می‌باشد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد جناب آقای مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد. همچنین این مقاله مستخرج از پایان نامه با کد طرح ۶۲۳۳۰۵۰۷۹٤۱٤ مصوب ۱۳۹٤/۰۳/۳۰ در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می‌باشد.

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 electerophoresis. 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 β-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 β-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 β-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 β-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. 2011Spring; 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 β-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 β-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; 21st 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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]

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 β-Lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok. Thailand J Clin Microbiol. 2001 Jan; 39(1): 175–182.
19-Power P, Di Conza J, Rodrıiguez MM, Ghiglione B, Ayala JA, Casellas JM, et al. Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of bla_{PER-2}. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jul; 51(7): 2359–2365
20-Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum β-lactamases in South America. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;14 (1): 154–8.
21-Kiratisin P, Henprasert A. Genotypic analysis of plasmid-mediated β-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 β-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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-12-25]

[DOI: 10.29252/jarums.18.1.52]