

# بررسی وجود ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در سویه‌های شیگلا سونتی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال حاد باکتریایی با استفاده از روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومتی این سویه‌ها

زهرا دولتشاهی<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

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

(مؤلف مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴، ایمیل: Kamini@iau-saveh.ac.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** در دو دهه گذشته، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های شیگلا به دلیل استفاده بی‌رویه از عوامل ضد میکروبی افزایش یافته است. هدف از مطالعه حاضر؛ بررسی وجود ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در سویه‌های شیگلا سونتی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال حاد باکتریایی با استفاده از روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومتی این سویه‌ها می‌باشد.

**روش بررسی:** در یک مطالعه ۱۰ ماهه از ابتدای اردیبهشت لغایت انتهای بهمن ۱۳۹۴، ۶۰ شیگلا از نمونه‌های مدفوعی اسهالی غیر تکراری بدست آمد. این ایزوله‌ها به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس دستورالعمل CLSI M100-S14 مورد بررسی قرار گرفتند. MPCR به منظور تکثیر ژنهای *tetA*، *tetB* و *tetD* انجام شد.

**یافته‌ها:** از مجموع ۳۰۰ نمونه مدفوع تست شده، ۶۰ (۲۰٪) سویه شیگلا سونتی بدست آمد. تمامی جدایه‌ها (۱۰۰٪) به استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. نتایج تست حساسیت ضد میکروبی نشان داد که درصد مقاومت به تتراسیکلین، کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین به ترتیب برابر با ۸۶/۷٪، ۹۱/۸٪ و ۵۰٪ بود. ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ از سویه‌ها به ترتیب به جنتامایسین و سپروفلوکساسین حساس بودند. نتایج MPCR نشان داد که ۵٪ (۳ سویه از مجموع ۶۰ جدایه) و ۹۱/۶٪ (۵۵ سویه از ۶۰ جدایه) به ترتیب حامل ژنهای *tetC* و *tetA* بودند. ژنهای *tetD* و *tetB* وجود نداشتند.

**نتیجه‌گیری:** ژن *tetA* در سویه‌های مقاوم به تتراسیکلین نقش اساسی بازی می‌کند. در مجموع، نظارت پیوسته جهت ممانعت از گسترش عناصر مقاومت آنتی‌بیوتیکی لازم به نظر می‌رسد.

**واژه‌های کلیدی:** ژنهای مقاومت به تتراسیکلین، شیگلا سونتی، کودکان، اسهال، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

## مقدمه

اسهال (Diarrhea) یکی از عفونت‌های روده‌ای جدی بویژه در کودکان است که علاوه بر ضررهای اقتصادی و مشکلات اجتماعی، تلفات زیادی را بویژه در کشورهای در حال توسعه سبب می‌گردد. شیگلا (*Shigella*)، کوکوباسیل گرم منفی، بی حرکت، فاقد اسپور و کپسول و بی‌هوازی اختیاری است (۱). این ارگانسیم در خانواده انتروباکتریاسیه قرار دارد و عامل شیگلوز یا اسهال خونی باسیلی (دیسانتري باسیلی) می‌باشد که فقط در انسانها رواج دارد و در آن اپی تلوم روده‌ای مورد تهاجم و تخریب التهابی قرار می‌گیرد. جنس شیگلا ۴ زیر گروه دارد شامل: *S. flexneri*، *S. sonnei*، *S. boydii*، *dysanteriae* که تمامی آنها می‌توانند موجب شیگلوز شوند که با وجود خون و موکوس در مدفوع مشخص می‌شود (۲). تخمین زده می‌شود که سالانه ۱۶۵ میلیون مورد اسهال خونی شیگلایی و ۱/۱ میلیون مرگ در جهان رخ می‌دهد که حدود ۶۱٪ آن را کودکان زیر پنج سال تشکیل می‌دهند (۳ و ۴). شیوع عفونت‌های ناشی از شیگلا به دلیل دوز پایین بیماری‌زایی این باکتری و همچنین انتقال آسان آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده بسیار آسان است (۵). علائم مشخص اسهال خونی شامل: کم اشتها، تب، ورم روده، مدفوع خونی-چرکی، دردهای شکمی و احساس تخلیه ناقص روده با درد مقعدی است (۶). مهمترین مشکل در درمان افراد مبتلا به شیگلوز بروز مقاومت آنتی بیوتیکی بواسطه پلاسمید و اینتگرون‌ها می‌باشد. بر حسب تاریخچه این جنس، گونه‌های شیگلا به راحتی در برابر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. در طول چندین دهه گذشته، نژادهای شیگلا به رایج‌ترین و گران‌ترین آنتی-بیوتیک‌های دنیا مقاوم شده و شکست در درمان و

افزایش مرگ را سبب شده‌اند. تنوع ژنتیکی گونه‌های شیگلا در یک کشور باعث بروز الگوهای متنوع مقاومت به آنتی بیوتیک شده است (۷-۹). الگوی متنوع مقاومت به آنتی بیوتیک در نقاط مختلف جغرافیایی همواره انتخاب یک داروی مناسب برای شیگلا را مشکل کرده است. متأسفانه، مقاومت شیگلا به آمپی سیلین و کوتریموکسازول فراگیر شده است. مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید (فلوئورکینولونها)، کوتریموکسازول و آمپی سیلین نیز دیده شده است. متأسفانه مصرف این دارو نیز در مواردی با مقاومت همراه است. سایر داروها مانند فلوروکینولون‌ها و پیومسیلینام یا آمدینوسیلین که هنوز روی بیشتر سوش‌های شیگلا دیسانتری اثر دارند، بسیار گران قیمت هستند و به راحتی تهیه نمی‌شوند (۱۰-۱۲). تتراسایکلین آنتی بیوتیکی وسیع الطیف است که در اتصال آمینواسیل t-RNA به جایگاه گیرنده ریبوزومی دخالت کرده و از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند. این آنتی بیوتیک رشد قسمت اعظمی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار می‌کند. مکانیسم‌های اصلی در مقاومت به تتراسایکلین از طریق کسب ژن شامل: پمپ‌های افلاکس، محافظت ریبوزومی و غیرفعال شدن آنزیمی است. علاوه بر مکانیسم‌های اختصاصی مقاومت به تتراسایکلین که توسط ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (*tet*) کد می‌شود، دیگر مکانیسم‌های مقاومت چندگانه نیز می‌تواند در مقاومت به تتراسایکلین در بعضی از باکتری‌ها موثر باشد. این مکانیسم‌ها شامل جهش، تغییر در نفوذ پذیری و سیستم‌های انتقال چندگانه است (۱۳). لذا هدف از انجام مطالعه پیش رو؛ بررسی وجود ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (*tetA/B/C/D*) در سویه‌های شیگلا سونئی با استفاده از روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه-ها با استفاده از روش انتشار از دیسک در کودکان مبتلا

به اسهال حاد باکتریایی بستری شده در بیمارستان مرکز طبی اطفال، تهران می‌باشد.

## روش بررسی

### نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

این مطالعه توصیفی - مقطعی در یک بازه زمانی ده ماهه از ابتدای اردیبهشت لغایت انتهای بهمن سال ۱۳۹۴ انجام گردید. در مجموع تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع اسهالی در ظروف استریل مخصوص و یکبار مصرف شامل ۱۶۵ نمونه از جنس مذکر و ۱۴۵ نمونه از جنس مونث از کودکان بستری در بیمارستان مرکز طبی کودکان در تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نظر وجود قوام، موکوس و خون به صورت ماکروسکوپی و داشتن گلبول سفید و قرمز به صورت میکروسکوپی (گسترش مرطوب) بررسی شدند. تمامی نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی سالمونلا-شیگلا آگار (SS)، مک کانکی آگار، زیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار (XLD) و سلنیت-F (SF) (شرکت Merck، کشور Germany) کشت داده شدند. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۸ ساعت، نمونه‌ها از محیط SF مجدداً بر روی محیط‌های اختصاصی منتقل و برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شدند. در پایان، جهت افتراق و تایید گونه‌های شیگلای از آزمونهای بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، SIM، MRVP، مصرف سترات، آزمایش TSI، تولید اوره آز، فنیل آلانین دامیناز، لیزین دکربوکسیلاز، مصرف سدیم مالونات، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه اورنیتین و مانیتول، XLD، تولید سولفید هیدروژن (H<sub>2</sub>S)) استفاده گردید. جدایه جدا شده با ویژگیهای بیوشیمیایی: لاکتوز منفی، تولید گاز منفی، بدون حرکت، واکنش، دکربوکسیلاسیون لیزین منفی، سترات منفی، هیدرولیز

اوره، منفی و متیل رد مثبت به عنوان یک جدایه متعلق به جنس شیگلا، در نظر گرفته شد. آزمونهای سروتایپینگ با استفاده از کیت‌های شرکت بهارافشان از کشتهای تازه شیگلا به روش آگلوتیناسیون روی اسلاید انجام گردید.

### بررسی مقاومت ضد میکروبی جدایه‌ها

واکنش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کربی بائر و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI) (14) پس از تهیه غلظت نیم مک فارلند و کشت بر روی محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) برای آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، تتراسیکلین، تریمتوپریم/سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، استریتومایسین و کلرامفنیکل (تهیه شده از شرکت Mast، انگلستان) انجام گردید. بدین منظور پس از تهیه کدورتی معادل نیم مک فارلند، کشت چمنی ایزوله‌ها با استفاده از سوآپ استریل پنبه‌ای بر روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انجام شد. بعد از آن قطر هاله عدم رشد با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد و به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) ثبت شد.

### واکنش زنجیره ای پلیمرز

بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی با استفاده از روشهای استاندارد باکتریولوژیک و سرولوژیک، استخراج DNA باکتری انجام شد. بدین منظور از روش Boiling (جوشاندن) استفاده گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad، USA) استفاده گردید. به منظور شناسایی ژن‌های *tetA*، *tetB*، *tetC* و *tetD* از آغازگرهای موجود در جدول

۵/۱۶٪ می‌باشد. ۴۳ ایزوله مربوط به کودکان بین صفر تا ۲ سال و ۱۷ ایزوله مربوط به کودکان ۲ تا ۱۲ سال بود.

#### نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی

نتایج آزمون کربی-بائر نشان داد که تمامی ایزوله‌ها (۱۰۰٪) به استرپتومایسین و نالیدکسیک اسید مقاوم بودند. میزان مقاومت به تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل برابر با ۸۶/۷٪، ۹۱/۸٪ و ۵۰٪ بود. ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ از سویه‌ها نیز به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساس بودند (جدول ۲).

#### نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز

پس از بهینه نمودن روش PCR و تأیید محصولات، آزمون MPCR برای تعیین وجود یا عدم وجود ژنهای مقاومت بر روی هر ۶۰ ایزوله شیگلا جدا شده از نمونه مدفوع اسهالی کودکان انجام شد. نتایج PCR چند گانه نشان داد که، از تمامی ۶۰ ایزوله شیگلا، ۳ ایزوله (۵٪) فقط دارای ژن *tetC*، ۵۵ ایزوله (۹۱/۶٪) دارای ژن *tetA* بودند. ژنهای *tetB* و *tetD* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. نتایج حاصل از الکتروفورز ژنهای مقاومت به تتراسایکلین در تصویر ۱ نمایش داده شده است. به منظور بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی و ژنهای مقاومت از آزمون دقیق فیشر استفاده شد (جدول ۳). نتایج حاصل از آزمون دقیق فیشر حاکی از آن بود که در سطح خطای ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) ارتباط معناداری بین ژنهای *tetA* و مقاومت به آنتی‌بیوتیکها وجود داشته است اما ارتباط معناداری بین ژنهای *tetC* با مقاومت به آنتی‌بیوتیکها وجود نداشته است.

یک استفاده شد (جدول ۱) (15). پس از BLAST آغازگرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر 5X PCR master mix (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/μl)، (MgCl<sub>2</sub> 3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۵/۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانته ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۵ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰,۵ μg/ml) الکتروفورز گردید. در تمامی مراحل فوق از شیگلا سوئی ATCC 9290 به عنوان کنترل مثبت و از اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

#### یافته‌ها

##### نتایج کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری‌ها

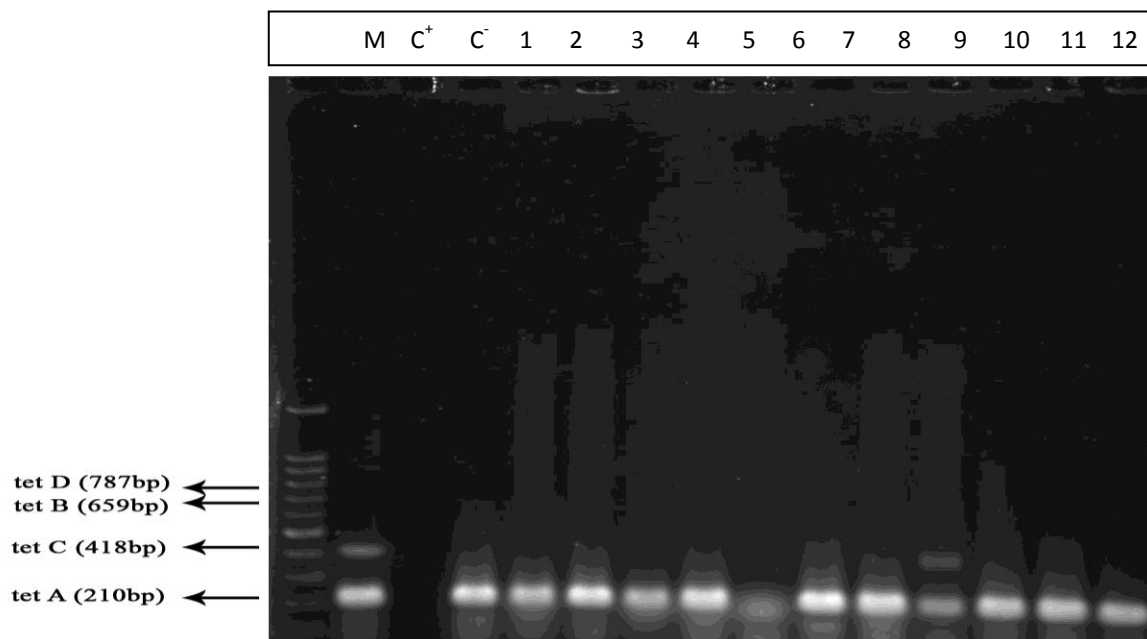
در مطالعه پیش رو از مجموع ۳۰۰ نمونه مدفوع بدست آمده تعداد ۶۰ جدایه شیگلا بدست آمد که ۴۰ جدایه (۶۷٪) از نمونه پسرها و ۲۰ ایزوله (۳۳٪) متعلق به نمونه مدفوع جنس مونث بود. این نتایج نشان داد که شیوع شیگلا در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران

جدول ۳-۵: توالی الیگونوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی پرایمر (5'→3')	اندازه باند (bp)
<i>tetA</i>	F= 5' -GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC-3' R= 5' -CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG-3'	۲۱۰
<i>tetB</i>	F= 5' -TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG-3' R= 5' -GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG-3'	۶۵۹
<i>tetC</i>	F= 5' -CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG-3' R= 5' -ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC-3'	۴۱۸
<i>tetD</i>	F= 5' -AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC-3' R= 5' -GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC-3'	۷۸۷

جدول ۲: نتایج حاصل از آنتی بیوگرام

ماده ضد میکروبی	نتایج آنتی بیوگرام		
	تعداد (%) سویه ها بر اساس تفسیر CLSI		
	S	I	R
آمپی سیلین	۴ (۶/۶)	۱ (۱/۶)	۵۵ (۹۱/۸)
تتراسیکلین	۶ (۱۰)	۲ (۳/۳)	۵۲ (۸۶/۷)
تریمتوپریم-سولفامتاکسازول	۱۸ (۳۰)	۵ (۸/۳)	۳۷ (۶۱/۷)
استرپتومايسين	۰ (۰)	۰ (۰)	۶۰ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	۱۵ (۲۵)	۵ (۸/۳)	۳۰ (۵۰)
جنتامایسین	۵۱ (۸۵)	۹ (۱۵)	۰ (۰)
سیپروفلوکساسین	۵۲ (۸۶/۶)	۸ (۱۳/۴)	۰ (۰)
نالیدیکسیک اسید	۰	۰	۶۰ (۱۰۰)



شکل ۱: محصول PCR-M بر روی ژل آگارز، به ترتیب از چپ به راست، M: نشانگر ۱۰۰ bp (100 bp DNA Ladder)، کنترل مثبت (شیگلا سونئی ATCC 9290)، کنترل منفی (اشریشیا کلی ATCC 25922)، چاهک های ۱-۱۲؛ جدایه های بالینی شیگلا سونئی.

جدول ۳-۴: نتایج حاصل از آزمون فیشر و مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های شیگلا سونئی

تعداد	مقاومت به ۳ آنتی بیوتیک		P-value
	و بیشتر	و کمتر	
۱۴	۱۳ (۹۲/۹)	۱ (۷/۱)	۰/۰۲۵
۲	۰	۲ (۱۰۰)	
۹	۸ (۸۸/۹)	۱ (۱۱/۱)	۰/۵۵
۷	۵ (۷۱/۴)	۲ (۲۸/۶)	
۱۳	۱۲ (۹۲/۳)	۱ (۷/۷)	۰/۰۰۷
۳	۰	۳ (۱۰۰)	

### بحث و نتیجه گیری

در نوزادان و کودکان بسیار خطرناک بوده و می‌تواند به مرگ منتهی شود. در کشورهای در حال توسعه این بیماری همچنان به عنوان یک مسئله‌ی مهم بهداشتی می‌باشد (۸ و ۹). در حالت معمول بیماری از طریق شخص به شخص و یا از طریق مدفوعی - دهانی از

بیماری شیگلوزیس، نوعی بیماری حاد گوارشی است که در بیشتر موارد به صورت اسهال خونی بروز کرده و توسط باکتری شیگلا ایجاد می‌شود. این بیماری در بالغین خود به خود بهبود می‌یابد، در حالیکه

فردی به فرد دیگر انتقال می‌یابد. این باکتری در مدفوع وجود دارد و عفونت بیشتر در مواقعی که میکروبها از مدفوع به انگشتان و سپس به دهان منتقل می‌شوند، اتفاق می‌افتد. عفونت شیگلا می‌تواند با خوردن غذای آلوده یا نوشیدن آب آلوده و یا شنا کردن در آب آلوده ایجاد شود. البته گزارشهایی نیز در مورد انتقال با حشرات وجود دارد. کودکان زیر ۵ سال و افرادی که به مناطق آلوده سفر می‌کنند بیشتر در معرض خطر هستند. به دلیل دوز عفونی کننده پایین باکتری، همه گیرها به ویژه در مکانهای شلوغ با سطح بهداشتی پایین به کرات رخ می‌دهد. دوز عفونی‌کننده‌ی خیلی پایین باکتری، داشتن راه‌های انتقال متعدد، مقاومت دارویی روز افزون و گسترده نسبت به عوارض درمانی، قدرت انتشار بالا و ایجاد عفونتهای ثانویه در جامعه، مرگ و میر نسبتاً بالا در مقایسه با باکتریهای هم خانواده و ایجاد عوارض متعدد و شدید، سبب گردیده‌اند این باکتری به عنوان یک عامل مهم بیولوژیک مد نظر باشد (۱-۳).

نظر به افزایش مقاومت سویه‌های بیماریزای روده‌ای به آنتی‌بیوتیک‌های پر کاربرد و ارزان شامل آمپی‌سیلین، نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول، تتراسایکلین و کرامفنیکل به نظر می‌رسد انجام یک درمان آنتی‌بیوتیکی موثر در حال سخت‌تر شدن می‌باشد (۱۶-۱۸). تعیین الگوی مقاومت دارویی به صورت منطقه‌ای و دوره‌ای برای این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. وجود تعداد بالای مبتلایان در ماههای تابستان خود بیانگر شیوع و طبعاً دقت در افزایش کنترل راههای انتقال شیگلا در ماههای گرم سال می‌باشد. شیوع شیگلا در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد به گونه‌ای که یآوری و همکاران (۱۹) در مطالعه‌ای بر روی بیماران بستری در بیمارستان آیت‌الله کاشانی شهر کرد درصد ابتلا به شیگلوز را ۷/۸٪، خورشیدی و

همکاران (۲۰) در مطالعه‌ای در آزمایشگاه مرکزی کاشان ۷/۶٪ و تاج‌الدینی و همکاران (۲۱) در بررسی روی کودکان مبتلا به بیماریهای اسهالی در بیمارستان گلستان اهواز ۱۴/۱٪ گزارش نمودند. Ruslan و همکاران (۲۲) به بررسی الگوهای مقاومت آنتی-بیوتیکی در ایزوله‌های شیگلا فلکسنری و شیگلا سونئی در ازبکستان پرداختند. این محققین دریافتند که بیشترین مقاومت مربوط به استرپتومایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین با ۱۰۰٪، ۹۳/۵٪، ۹۰/۴٪ و ۹۰/۴٪ بودند. در مطالعه جمشیدی و همکاران (۲۳) روی بیماران مبتلا به اسهال حاد در مرکز آموزشی شهید دکتر بهشتی زنجان از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ از مجموع ۶۸۲ مورد نمونه مدفوع اسهالی ۱۳۴ مورد (۱۹/۶٪) شیگلا ایزوله شد. در تست آنتی‌بیوگرام بالاترین حساسیت به سیپروفلوکساسین (۸۸/۸٪) و بالاترین مقاومت به آمپی‌سیلین (۱۰۰٪) مشاهده شد. این نتایج با مطالعه پیش رو مطابقت دارد، زیرا بیشترین مقاومت به استرپتومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل با ۱۰۰٪، ۸۶/۷٪، ۹۱/۸٪ و ۵۰٪ و بیشترین حساسیت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین با ۸۵٪ و ۸۶/۶٪ بود و به نظر می‌رسد اختلاف در مقاومت به آمپی‌سیلین مربوط به تفاوت در سروتایپ غالب بوده به این صورت که در مطالعه ما سروتایپ غالب شیگلا سونه‌ای است که مقاومت کمتری نسبت به آمپی‌سیلین دارند در حالی که در مطالع جمشیدی و همکاران (۲۳) سروتایپ غالب شیگلا فلکسنری بوده که مقاومت بالایی به آمپی‌سیلین را در سالهای اخیر نشان می‌دهند. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که ۳ ایزوله (۵٪) فقط دارای ژن *tetC* 55 جدایه (۹۱/۶٪) دارای ژن *tetA* بودند. دو ژن *tetD tetB*، در هیچکدام از نمونه‌ها ردیابی نشدند. Aarestrup و همکاران (۲۰) در برزیل نشان دادند که از ۶۲ جدایه شیگلا تحت بررسی (۴۷)

مقاومت چندگانه دارویی لازم و ضروری می‌باشد. همچنین با تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در مواقعی که نیاز به درمان باشد می‌توان از مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری به عمل آورد و از انتشار سویه‌های مقاوم در جامعه در بین جمعیت‌های انسانی ممانعت کرد. جهت درمان قطعی و عدم بروز مقاومت‌های روزافزون در سویه‌ها پاتوژن، تعیین الگوی مقاومتی و حتی MIC آن‌ها برای پیگیری روند مقاومت ضروری است.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله تمامی نویسندگان مقاله از کلیه پرسنل محترم بخش میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

سویه شیگلا فلکسنری و ۱۵ جدایه شیگلا سونئی) ۵۵ جدایه دارای فنوتیپ مقاومت به تتراسیکلین بودند و همه آنها (۱۰۰٪) دارای ژن *tetB* بودند. دو سویه (۳/۶٪) به طور همزمان ژنهای *tetA* و *tetB* را حمل می‌کردند. همچنین تمامی سویه‌ها از نظر وجود ژنهای *tetC* و *tetD* منفی بودند. در مطالعه ما نیز ژن *tetD* یافت نشد. علت اختلاف بین شیوع ژنهای *tet* در مطالعه پیش رو در مقایسه با مطالعه Aarestrup و همکاران می‌تواند به دلیل اختلاف جغرافیایی و سال انجام مطالعه باشد. Hartman و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که ژن *tetB* غالبترین ژن مقاوم به تتراسیکلین در بین جدایه‌ها می‌باشد.

با توجه به اینکه ژنهای مقاومت چندگانه می‌توانند بر روی اینتگرونها قرار گیرند و به سویه‌های دیگر نیز منتقل شوند بنابراین شناسایی و غربالگری اینتگرونها برای جلوگیری از به وجود آمدن سویه‌های دارای

### References

1. Niyogi SK. Shigellosis. Journal of microbiology (Seoul, Korea). 2005; 43(2):133-43.
2. Ke X, Gu B, Pan S, Tong M. Epidemiology and molecular mechanism of integron-mediated antibiotic resistance in *Shigella*. Archives of microbiology. 2011; 193(11):767-74.
3. Ye C, Lan R, Xia S, Zhang J, Sun Q, Zhang S, et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. Journal of clinical microbiology. 2010; 48(2):419-26.
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection. 2012; 18(3):268-81.
5. Ahmed AM, Furuta K, Shimomura K, Kasama Y, Shimamoto T. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. Journal of medical microbiology. 2006; 55(12):1685-91.
6. Ahmed AM, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin. International Journal of Food Microbiology. 2015; 194:78-82.
7. Gunnar N Schroeder, Hubert Hilbi. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microb 2008; 21: 134–156.
8. Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 55(3):301-5.



9. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK, Sen B, Taneja N, Kundu M, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India. *Journal of medical microbiology*. 2008; 57(7):856-63.
10. Zhu JY, Duan GC, Yang HY, Fan QT, Xi YL. Atypical class 1 integron coexists with class 1 and class 2 integrons in multi-drug resistant *Shigella flexneri* isolates from China. *Current microbiology*. 2011; 62(3):802-6.
11. Shen Y, Qian H, Gong J, Deng F, Dong C, Zhou L, et al. High prevalence of antibiotic resistance and molecular characterization of integrons among *Shigella* isolates in Eastern China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(3):1549-51.
12. Faramarz Derakhshan M, FACS MRZM. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2009; 20(3):e56.
13. Marily R. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*. 1996; 19(1):1-24.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2014.
15. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81(16): 5560- 5566.
16. Barari Savadkoobi R, Kachu Ahmadpur M. Prevalence of *Shigella* strains and microbial resistance patterns in pediatric hospitals generally Amir Cola - Northern Iran. *Iran J Pediatr*. ۱۷ ; ۲۰۰۷ . ۱۲۲-۱۱۸
17. Moezardalan K, Zali MR, Soltan- Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of *Shigella* species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr*. 2003; 21:96-102.
18. Soltan Dallal MM, Ranjbar R, Pourshafie MR. The study of antimicrobial resistance among *Shigella flexneri* strains isolated in Tehran, Iran. *J Pediatr Infec Dis*. 2011; 6:125-129.
19. Yavari A, Alavi Dehkordi SMR, Zamanzad B. The clinical and bacteriological study of invasive diarrhea in inpatients, Kashani Hospital, Shahrekord, Iran. *Shahrekord UMS J*. 2002; 4(2): 58-62. [In Persian]
20. Khorshidi A, Akbari H, Salehi A. Shigellosis frequency, serotyping & antibiogram resistance pattern in Kashan, Iran (2000-01). *Feyz J*. 2006; 40: 5-70. [In Persian]
21. Tajaddini S, Kajbaf MJ. The survey of antibiotic resistance of enteropathogenic *E.coli* and *Shigella* in infants with diarrhea. *Uremia UMS J*. 1997; 8(3): 177-184. [In Persian]
22. Ruslan S.M, Amir M.B, Gulnara A, Gulnara K.A, Aybek V.Kh, Ladaporn B, Orntipa S, Carl J.M. Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. *Gut Pathogens*. 2010; 2(18), 1-6.
23. Jamshidi A. Prevalence of *Shigella* spp and antibiotic resistance pattern in patients with acute diarrhea in Shahid Beheshti Education Center, Sampad Zanzan from 2003 to 2007. *Journal of Zanzan University of Medical Sciences*. 2008; 62: 84-77.
24. Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55: 301-305.
25. Hartman, A. B., Essiet, I. I., Isenbarger, D. W. et al. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of tet(A)-1. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41, 1023-32.

## Survey of tetracycline resistance genes in *Shigella sonnei* isolated from acute pediatric with bacterial diarrhea using Multiplex PCR method and their antibiotic resistance patterns

Dolatshahi Z<sup>1</sup>, Amini K<sup>2</sup>

1- Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (Corresponding author). Tel: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴, Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

### Abstract

**Background and Aim:** Antibiotic resistance in *Shigella* spp., is considered in the past two decades has increased due to indiscriminate use of antimicrobial agents. The aim of this current study was the survey of tetracycline resistance genes in *Shigella sonnei* isolated from acute pediatric with bacterial diarrhea using Multiplex PCR method and their antibiotic resistance patterns.

**Materials and Methods:** In a period of 10 months from April- January 2015, ۶۰ *Shigella* spp. were isolated from non-duplicative diarrheal stool specimens. The isolates were analyzed for their antibiotic susceptibility using the CLSI guidelines M100-S14. MPCR was performed for amplification of the *tetA*, *tetB*, *tetC* and *tetD* genes.

**Results:** Out of 300 tested stool samples, 60 (20%) *S. sonnei* were isolated. All strains (100%) were resistance to Streptomycin and Nalidixic acid. The results of antimicrobial susceptibility test showed that the percentage of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin were 86.7%, 91.8% and 50% respectively. Eighty-five percent and 86.6% of isolates were susceptible to gentamicin and ciprofloxacin. The MPCR results revealed that 5% (3/60), 91.6% (55/60) of *Shigella* isolates carried *tetC* and *tetA* genes. No *tetB* and *tetD* genes were detected.

**Conclusion:** The *tetA* gene may play a role in the tetracycline resistance strain. Overall, Continuous monitoring is necessary to prevention of the spread of antibiotic resistance elements.

**Keywords:** Tetracycline resistance genes, *S. sonnei*, pediatric, diarrhea antibiotic resistance