مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره اول (پیاپی ۱۸) بهار ۱۳۹۳
صفحات ۵۷-۴۹

Original Article

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و شناسایی ژن *qnr* در سویه های شیگلا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان مفید تهران

مجید مقبلی*[۱]، وحید بهنود[۲]، رضا رنجبر[۳]

[۱] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، [۲] کارشناس ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، [۳] دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

چکیده

سابقه و هدف: فلوروکینولون ها به طور موفقیت آمیزی برای درمان شیگلوزیس و عفونت های ناشی از سویه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک استفاده می گردند. جهش در ژن *gyrA* و حمل ژن *qnr*، از مکانیسم های اصلی ایجاد مقاومت کینولونی در سویه های مقاوم به فلوروکینولون به شمار می رود. این مطالعه با هدف بررسی حضور ژن های پلاسمیدی مقاومت (*qnr*) و نیز ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلای جدا شده از بیماران انجام شده است.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۷۳ نمونه شیگلا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان مفید تهران انجام گردید. در ابتدا جنس و گونه سویه های جداسازی شده با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیک مورد تایید قرار گرفت. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها بر اساس روش کربی بائر انجام شد. در نهایت حضور ژن های *qnr* با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بررسی گردید.

یافته ها: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۹۷/۲٪ از سویه ها حداقل به یکی از ۱۸ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک تری متوپریم+سولفامتوکسازول (۹۴/۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکسازین و سفتی زوکسیم با ۱۰۰٪ حساسیت بود. ۲۳ عدد از شیگلاهای جداسازی شده مقاوم به نالیدیکسیک اسید بودند. از این میان ۴ نمونه دارای ژن *qnrS* بود که مربوط به سروتایپ های شیگلا *فلکسنری* (۲ سویه)، شیگلا *سونئی* (۱ سویه) و شیگلا *بوئیدی* (۱ سویه) بودند. هیچ یک از ژن های *qnrA* و *qnrB* در سویه های مورد بررسی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی مقاومت به نالیدیکسیک اسید و وجود ژن *qnrS* در میان نمونه های شیگلا جدا شده شیوع چشم گیری داشته است.

واژگان کلیدی: شیگلا، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن *qnrS*، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

دریافت مقاله: تیرماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: مهرماه ۹۲

مقدمه

شیگلوزیس به طور شایعی مربوط به کودکان بوده به طوری که اغلب موارد عفونت را کودکان کمتر از پانزده سال تشکیل می دهند (۱). سالانه ۵ میلیون مورد مرگ و میر ناشی از گاستروانتریت در کشورهای در حال توسعه رخ می دهد که حداقل ده درصد این موارد به دلیل دیسانتری ناشی از شیگلا (*Shigella*) می باشد (۲). بیش از ۱۶۵ میلیون مورد بیماری و یک میلیون مرگ مربوط به شیگلا در سال گزارش می شود (۳). ارگانیسم های شیگلا به ندرت به سیستم گردش خون

* آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

حمله می کنند. یکی از مشخصه های بارز دیسانتری باسیلی این است که اختلال تنفسی در سلول به وجود می آید و به دنبال آن نکروز اپیتلیوم کولونیک ایجاد می شود. از علایمی که می تواند توجیه کننده این موضوع باشد می توان به افزایش سطوح پیروات و کاهش لاکتات و ATP اشاره نمود.

علایم دیسانتری باسیلی از یک اسهال آبکی تا یک التهاب شدید روده می تواند باشد. این بیماری با دردهای شدید شکمی، تب، مدفوع حاوی خون و موکوس شناخته می شود. این بیماری به جز در مواردی که بیمار دارای نقص ایمنی باشد یا درمان های اولیه پزشکی در دسترس نباشد، معمولاً خود محدود شونده است (۴). این بیماری در کشورهای در حال توسعه، یک بیماری شایع در بین کودکان می باشد. اما در کشورهای توسعه یافته اکثراً در مهد کودک ها، زندان ها، پادگانها و در نواحی که سرخ پوستان زندگی می کنند وجود دارد (۵). روش های کنترل و پیشگیری شامل تهیه منابع آبی بهداشتی، امکان تهیه غذای بهداشتی و همچنین رعایت بهداشت فردی می باشد (۶).

فلوروکینولون ها به طور موفقیت آمیزی برای درمان شیگلوزیس، از جمله عفونت های ناشی از سویه های با مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی استفاده می گردند. اما به مرور زمان سویه های مقاوم به آن نیز به وجود آمده است. اهمیّت این موضوع به این دلیل است که مصرف بی رویه و غیر منطقی آنتی بیوتیک بدون توجه به الگوهای مقاومتی می تواند باعث ظهور سویه هایی شود که حتی به درمان های جدید نیز مقاومت داشته باشند. ظهور سویه های جدید مقاوم به نالیدیکسیک اسید روشن کننده این واقعیّت می باشد. بنابراین بررسی مولکولی این نوع مقاومت ها بسیار حائز اهمیّت خواهد بود.

به نظر می رسد تنوع فراوانی الگوهای ژنتیکی موجود در یک گونه شیگلا مانند شیگلا سونئی (*Shigella sonnei*) در یک کشور باعث بروز الگوهای متنوع مقاومت به آنتی بیوتیک شده است. الگوی متنوع مقاومت به آنتی بیوتیک در نقاط مختلف جغرافیایی همواره انتخاب یک داروی مناسب برای شیگلا را مشکل کرده است. به همین دلیل، انجام مطالعات مقاومت دارویی ضروری می باشد. هم اکنون افزایش مقاومت نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های رایج به یک نگرانی بزرگ در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تبدیل شده است. کینولون ها از جمله نالیدیکسیک اسید به عنوان داروی خط اول در درمان عفونت های ناشی از شیگلا مورد استفاده قرار می گیرند. اما متاسفانه در برخی از مطالعات مقاومت به این آنتی بیوتیک نیز گزارش شده است (۴ و ۵).

گونه های شیگلا این توانایی را دارند که از راه های مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی را کسب نمایند و این مسئله مشکلی برای کشورهای در حال توسعه می باشد. بنابراین بررسی مولکولی این نوع مقاومت ها بسیار حائز اهمیت خواهد بود. از دلایل مقاومت میکروارگانیسم ها نسبت به فلولوروکینولون ها می توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- اگر در مناطقی از ژنوم باکتری (مناطق QRDR) که شامل ژن های *gyrA* ، *gyrB* (کد کننده های DNA gyrase) و *parC* و *parE* (کد کننده های توپوایزومراز IV) می باشد، جهش ایجاد گردد (۳). ۲- مقاومتی که در اثر حضور پلاسمیدی به نام *qnr* ایجاد می شود ۳- افزایش نفوذ ناپذیری باکتریایی ۴- بیان بیش از حد پمپ افلوکس (۷).

ژن های مقاومت به کینولون که بر روی پلاسمید حمل می شوند (گاهاً PMQR خوانده می شوند) در ۵ کلاس دسته بندی می شوند که عبارتند از *qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS*. این ژن ها پروتئین هایی را کد می نمایند که باعث جلوگیری از اتصال فلوروکینولون ها به توپوایزومراز II و در نتیجه مهار فلوروکینولون ها می شوند (۸). وجود ژن های مقاومت دیگر بر روی این پلاسمیدها مانند ژن های بتالاکتاماز، ژن های 16S rRNA methylase و اینتگرون ها توجیه کننده ایجاد مقاومت چندگانه در این باکتری ها می باشد (۱۱-۹).

این مطالعه با هدف بررسی حضور ژن های پلاسمیدی مقاومت (*qnr*) و نیز ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلای جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان مفید تهران انجام شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۷۳ نمونه مدفوع و خون بیمار مشکوک به آلودگی با شیگلا مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان مفید تهران در سال ۱۳۹۱ انجام گردید. در ابتدا تمامی نمونه ها بر روی محیط گزیلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرما گذاری شدند. در ادامه به منظور شناسایی بیشتر، کلنی های مشکوک به شیگلا بر روی محیط های TSI (جهت بررسی تخمیر قند های لاکتوز ،گلوکز و تولید گاز)، لیزین (جهت بررسی واکنش های دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لیزین)، SIM (جهت بررسی حرکت و تولید اندول) و اوره (جهت بررسی هیدرولیزه کردن اوره) کشت داده شدند. به منظور افتراق گونه ها از آزمون سروتایپینگ استفاده گردید. این آزمون با استفاده از آنتی سرم های شیگلا از کشت های تازه شیگلا به روش آگلوتیناسیون بر روی اسلاید انجام گردید (۱).

ب) حساسیت ضد میکروبی: حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های شیگلا با روش انتشار دیسک (کربی- بائر) طبق توصیه مؤسسهٔ استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) نسبت به ۱۸ آنتی بیوتیک شامل آمپی سیلین (۱۰µg)، آموکسی سیلین (۱۰µg)، کلاولونیک اسید (۳۰µg)، تیکارسیلین (۷۵µg)، سفالوتین (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، استرپتومایسین (۱۰µg)، کانامایسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، سیپروفلوکسازین (۵µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg) ، سولفومتاکسازول (۱۰µg) و تری متوپریم (۱۰µg) (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ ℃ به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. در این پژوهش از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC25922 به عنوان کنترل استفاده گردید.

ج) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): در ابتدا DNA باکتریایی با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. به منظور طراحی و سنتز پرایمر ابتدا توالی ژن های مورد نظر از پایگاه NCBI استخراج و سپس یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer3 با آدرس اینترنتی (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) طراحی گردید. در ادامه میزان اختصاصی بودن پرایمر ها با استفاده از Primer-blast با آدرس اینترنتی (http://www.ncbi.nih.gov/tools/primer-blast) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به منظور اطمینان از ساختار ثانویه پرایمرهای طراحی شده از نرم افزار oligo analyzer استفاده شد. پرایمر های مورد استفاده جهت شناسایی ژن *qnr* در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۳-۱۱). در این مطالعه از ژنوم باکتری *اشریشیا کلی* (*E.coli*) واجد ژن *qnr* که از گروه میکروب شناسی دانشگاه پالرمو ایتالیا تهیه شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۶/۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۰/۴ میکرومولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۰/۲ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۱ واحد در ۵۰ میکرولیتر)

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده جهت تکثیر ژن qnr در نمونه های شیگلا

پرایمر	توالی (۳' — ۵')	اندازه باند (bp)
qnrS	F:ACGACATTCGTCAACTGCAA R:TTAATTGGCACCCTGTAGGC	۴۲۸
qnrA	F:ATTTCTCACGCCAGGATTTG R:GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۸۰
qnrB	F:GTTGGCGAAAAAATTGACAGAA R:ACTCCGAATTGGTCAGATCG	۲۶۴

Archive of SID
www.SID.ir

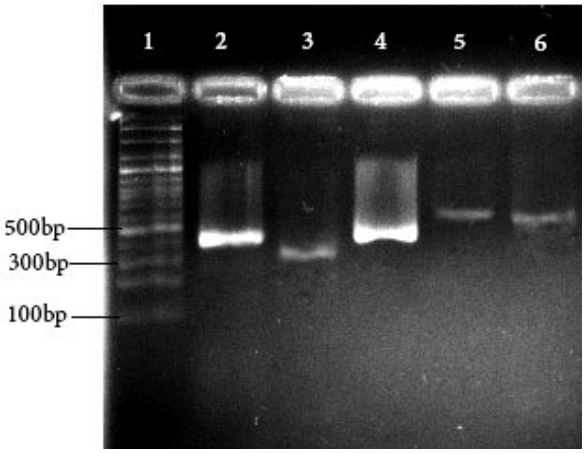
(سیناژن، ایران) انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز یک درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

یافته ها

نتایج مربوط به حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی ۷۳ نمونه بالینی شیگلا نشان داد که ۹۷/۲ درصد از ایزوله ها حداقل به یکی از ۱۸ آنتی بیوتیک مقاومت نشان می دهند. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های تری متوپریم+سولفامتوکسازول (۹۴/۵٪)، استرپتومایسین (۹۳/۲٪) و تتراسایکلین (۹۳/۲٪) بوده است. همچنین کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکسازین و سفتی زوکسیم مشاهده گردید. به طوری که هیچ یک از سویه ها نسبت به این دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان ندادند (جدول ۲).

در پژوهش حاضر ۲۳ (۳۱/۶٪) سویه شیگلا نسبت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید مقاومت نشان دادند. از این میان ۴ نمونه دارای ژن *qnrS* بود که مربوط به سروتایپ های شیگلا *فلکسنری* (۲ سویه)، شیگلا *سونئی* (۱ سویه) و شیگلا *بوئیدی* (۱ سویه) بودند. در این مطالعه هیچ یک از ژن های *qnrA* و *qnrB* در سویه های مورد بررسی مشاهده نگردید (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن های مقاومت با روش PCR. ستون ۱) سایز مارکر bp ۱۰۰، ستون ۲) کنترل مثبت (*اشریشیا کلی* واجد ژن *qnr*)، ستون های ۳ تا ۶) نمونه های دارای ژن (*qnrS* حدود ۴۰۰ جفت باز).

جدول ۲: نتایج ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه های شیگلا جداسازی شده

نوع آنتی بیوتیک	نتایج حساسیت نمونه های بالینی شیگلا		
	حساس تعداد (٪)	نیمه حساس تعداد (٪)	مقاوم تعداد (٪)
تریمتوپریم+ سولفامتوکسازول	۳(۴/۱٪)	۱(۱/۴٪)	۶۹(۹۴/۵٪)
استرپتومایسین	۲(۲/۷٪)	۳(۴/۱٪)	۶۸(۹۳/۲٪)
ترا سایکلین	۳(۴/۱٪)	۲(۲/۷٪)	۶۸(۹۳/۲٪)
آمپی سیلین	۲۸(۳۸/۳٪)	۱۰(۱۳/۷٪)	۳۵(۴۸٪)
نالیدیکسیک اسید	۵۰(۶۸/۴٪)	۰	۲۳(۳۱/۶٪)
آموکسی سیلین+ کلاولونیک اسید	۴۱(۵۶٪)	۱۶(۲۲٪)	۱۶(۲۲٪)
کلرامفنیکل	۶۲(۸۴/۹٪)	۱(۱/۴٪)	۱۰(۱۳/۷٪)
سفالوتین	۵۷(۷۸/۱٪)	۷(۹/۶٪)	۹(۱۲/۳٪)
توبرامایسین	۶۴(۸۷/۶٪)	۱(۱/۴٪)	۸(۱۱٪)
تیکارسیلین	۶۷(۹۱/۸٪)	۰	۶(۸/۲٪)
آمیکاسین	۵۴(۷۴٪)	۱۴(۱۹/۲٪)	۵(۶/۸٪)
سفتریاکسون	۶۴(۸۷/۷٪)	۴(۵/۵٪)	۵(۶/۸٪)
سفو تاکسیم	۶۵(۸۹/۱٪)	۳(۴/۱٪)	۵(۶/۸٪)
سفتازیدیم	۶۸(۹۳/۱٪)	۱(۱/۴٪)	۴(۵/۵٪)
کانامایسین	۳۲(۴۳/۹٪)	۳۸(۵۲٪)	۳(۴/۱٪)
جنتامایسین	۷۰(۹۶٪)	۲(۲/۶٪)	۱(۱/۴٪)
سیپروفلوکسازین	۷۳(۱۰۰٪)	۰	۰
سفتی زوکسیم	۷۳(۱۰۰٪)	۰	۰

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز مشخص گردید که ۴ نمونه دارای ژن *qnrS* بودند و از طرفی هیچ یک از ژن های *qnrA* و *qnrB* در سویه های مورد بررسی مشاهده نگردید. همچنین نتایج این مطالعه برای اولین بار به صورت جامع، مکانیسم مولکولی مقاومت به نالیدیکسیک اسید را در سویه های شیگلا در تهران مشخص نمود.

مطالعات انجام شده در نقاط مختلف ایران و جهان نشان می دهد که مقاومت باکتری شیگلا نسبت به آنتی بیوتیک ها از جمله نالیدیکسیک اسید قابل توجه بوده و در حال افزایش نیز می باشد. در مطالعه ولایتی (Velayati) در بین جدایه های شیگلا مقاومت به نالیدیکسیک گزارش نشده است (۱۴). در مطالعه حسینی (Hosseini) و همکاران کمتر از ۳۰ درصد، در مطالعه افضلی (Afzali) و همکاران ۲۶ درصد و در مطالعه اردلان (Ardalan) و همکاران ۱ درصد سویه ها مقاوم به نالیدیکسیک بوده اند (۱۵).

نکته جالب توجه در این مطالعات اختلاف برخی گونه ها در حساسیت یا مقاومت به یک آنتی بیوتیک خاص بوده است. به عنوان مثال مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید تنها در ۹ ایزوله (۸/۱ درصد) شیگلا *سونئی* و در ۱ ایزوله شیگلا *بوییدی* مشاهده شد. اما هیچ کدام از ایزوله های شیگلا *فلکسنری* و *دیسانتری* نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت نشان ندادند. از طرفی با وجود اینکه اکثر ایزوله ها به ویژه در سروگروه شیگلا *فلکسنری* (۹۵/۲ درصد) نسبت به آموکسی سیلین مقاوم بودند اما هیچ کدام از ایزوله های شیگلا *سونئی* نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت کامل نشان ندادند (۱۶).

جمشیدی (Jamshidi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ای با بررسی ۶۸۲ نمونه جدا شده از بیماران دچار اسهال، ۱۳۴ (۱۹/۶ درصد) مورد شیگلا جداسازی نمودند. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها بیانگر آن بود که بیشترین مقاومت به آمپی سیلین (۱۰۰ درصد) و بالاترین حساسیت مربوط به سیپروفلوکسازین (۸۸/۸ درصد) بوده است. در مطالعه ای که در کشور موزامبیک واقع در جنوب آفریقا انجام گرفت، مندوماندو (Mandomando) و همکاران در سال ۲۰۰۹ مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۹ ایزوله شیگلا را در کودکان کمتر از ۵ سال بررسی نمودند. نتایج نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفینیکل ۵۲ درصد، آمپی سیلین ۵۶ درصد، تتراسایکلین ۶۶ درصد و تری متوپریم- سولفامتاکسازول ۸۴ درصد بوده است. در این بررسی ایزوله های شیگلا *سونئی* نسبت به ایزوله های شیگلا *فلکسنری* مقاومت بیشتری نسبت به تتراسایکلین و ایزوله های شیگلا *فلکسنری* نسبت به ایزوله های شیگلا *سونئی* مقاومت بیشتری به آمپی سیلین و کلرامفنیکل نشان دادند. نتایج نشان داد که ایزوله های شیگلا بیشتر به آنتی بیوتیک های در دسترس و ارزان مقاوم شده اند.

پانتورا (Panhotra) و همکاران در سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۳ در عربستان میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید را در سویه های شیگلا *سونئی* مورد بررسی قرار دادند. یافته های آن ها نشان داد که هیچ گونه مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید از سال ۱۹۹۹ تا سال ۲۰۰۲ در این کشور نبوده و مقاومت در این باکتری نسبت به نالیدیک سیک اسید در ۲۰۰۳ ظهور یافته است (۱۷).

در سال های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۶ در مطالعه ای در مرکز طبی کودکان تهران، از مجموع ۷۲۰۰ نمونه مدفوع در ۳۲۲ مورد شیگلا جداسازی گردید. نتایج نشان داد که در سال های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۳ درصد بوده و این میزان در سال های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ به ۲۵ درصد افزایش یافته است. در پژوهش حاضر نشان داده شد که بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های تری متوپریم سولفامتوکسازول (۹۴/۵ درصد)، استرپتومایسین (۹۳/۲ درصد) و تتراسایکلین (۹۳/۲ درصد) بوده است. مقایسه این نتایج با تحقیق انجام گرفته قبلی، نشان دهنده روند صعودی افزایش مقاومت در سویه های شیگلا در تهران می باشد.

پژانی (Pazhani) و همکاران به بررسی خصوصیات مولکولی شیگلا های مقاوم به چند داروی جدا شده از موارد بومی شیگلوز در هند پرداختند. یافته های آن ها نشان داد که در کشور های در حال توسعه ای مانند هند مقاومت باکتری ها در

Archive of SID
www.SID.ir

برابر عوامل ضد میکروبی رو به افزایش می باشد و سویه های مقاوم به فلوروکینولون *شیگلا دیسانتری* تیپ یک و *شیگلا فلکسنری* نوع A۲ در هند در طول سال های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ ظهور یافته است. ۶۰ سویه *شیگلا* از نقاط مختلف هند برای بررسی میزان حساسیت ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه حضور ژن *qnr* در مناطق جهش یافته و همچنین جهش در ژن *gyrA* و *parC* در سویه های مقاوم در برابر فلوروکینولون اثبات گردید (۱۸).

ژائو (Xiao) و همکاران در مطالعه ای خصوصیات مولکولی *شیگلا فلکسنری* مقاوم به فلوروکینولون را در منطقه هانگزو چین در سال ۲۰۰۹ مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که از مجموع ۲۰۲ گونه *شیگلا* (۷۹ *شیگلا سونئی* و ۱۲۳ *شیگلا فلکسنری*) جدا شده در طی سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۷، تمامی گونه های *شیگلا سونئی* حساس به فلوروکینولون ها و ۱۵ نمونه از ۱۲۳ نمونه *شیگلا فلکسنری* به فلوروکینولون ها مقاومت داشتند. تمام نمونه های مقاوم بر روی ژن های *gyrA*، *parC* جهش نشان دادند. از طرفی پنج نمونه دارای ژن *qnr* بودند. جهش های شایع در موقعیت ۸۳ *gyrA* و موقعیت ۸۰ *parC* گزارش گردید (۱۹).

از ۱۲۵ نمونه *شیگلا فلکسنری* که از ۶ بیمارستان در چین در سال های ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۰ جداسازی شد، ۱۲ نمونه (۹/۶٪) حداقل دارای یکی از ژن های PMQR بودند. در این تحقیق مشخص گردید که آلل *qnr* با Aac(6')-Ib بر روی یک پلاسمید می باشند و با هم بیان می گردند. *qnr*S از بین ژن های *qnr* دارای راندمان بالاتری (۴/۱۲۵) بود.

در حالی که در سال ۲۰۱۰ در بین نمونه های *شیگلا* جدا شده در چین مشخص گردید که مهم ترین آلل *qnr* در بین *شیگلا فلکسنری* آلل *qnrA* می باشد. پنج نمونه (۴۱/۷٪) از نمونه های PMQR مثبت با مقاومت بالا به سپروفلوکساسین دارای دو جهش در ژن *gyrA* و ژن *parC* بودند (۹).

لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۷ یک مورد *شیگلا فلکسنری* مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید را از یک بیمار زن ۲۳ ساله با سابقه سفر به هند جداسازی نمودند. در مطالعات مولکولی بر روی این سویه هیچ گونه ژن *qnr* وجود نداشت. اما دو جهش (248C→T, 259G→A) در ژن *gyrA* و یک جهش (239G→T) در ژن *parC* مشاهده گردید (۲۰).

در سال ۱۹۹۸، مقاومت پلاسمیدی کینولونی برای اولین بار در یک سویه از *کلبسیلا پنومونیه* در ایالات متحده آمریکا توسط مارتینز (Martinez) و همکاران توصیف گردید. این پلاسمید (pMG252) که حاوی ژن *qnr* بوده، دارای وزن مولکولی ۵۶ kb بوده و دامنه میزبانی گسترده ای که شامل دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسه است، را دارا می باشد.

ژن *qnr* یک پروتئین ۲۱۸ اسیدآمینه ای با واحد های تکراری پنتا پپتیدی به نام Qnr را کد می کند که مسئول محافظت آنزیم DNA گیراز در برابر اثرات مهاری داروهای کینولونی می باشد (۲۱). کاهش حساسیت به کینولون ها به دلیل وجود ژن *qnr* در سه قاره گزارش شده است (۲۲). در سال ۲۰۰۵ دانشمندان ژاپنی ژن *qnr* دیگری به نام *qnrS* را در یک پلاسمید از سویه *شیگلا فلکسنری* ۲b کشف نمودند (۶ و ۷). در پژوهش حاضر از میان ۲۳ سویه *شیگلا* مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ۴ نمونه واجد ژن *qnrS* بوده که مربوط به سروتایپ های *شیگلا فلکسنری* (۲ سویه)، *شیگلا سونئی* (۱ سویه) و *شیگلا بوئیدی* (۱ سویه) می شدند.

نتیجه گیری

در مطالعات مختلف مقاومت به نالیدیکسیک اسید در سویه های مختلف *شیگلا* گزارش شده است. مقایسه نتایج این تحقیق با مطالعات پیشین، نشان دهنده روند صعودی افزایش مقاومت در سویه های *شیگلا* در تهران می باشد. ایجاد این مقاومت می تواند به دلیل انتقال پلاسمید حامل ژن *qnrS* باشد. اهمیت این موضوع از این جهت است که امروزه فلوروکینولون ها از جمله نالیدیکسیک اسید به عنوان داروی خط اول در درمان عفونت های ناشی از *شیگلا* مورد استفاده قرار می گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات

Archive of SID
www.SID.ir

بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله و در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.
دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان به دلیل همکاری صمیمانه

References

1. 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; 26: 426-430.

2. Keusch GT, Bennish ML, Evans AS, Philip S. Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and control, 3rd edition. New York, Plenum Publishing Corp; 1998: 631-656.

3. Pu XY, Zhang Q, Pan JC, Shen Z, Zhang W. Spontaneous mutation frequency and molecular mechanisms of *Shigella flexneri* fluoroquinolone resistance under antibiotic selective stress. World J Microbiol Biotchnol. 2013; 29: 365-371.

4. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev Infect Dis. 1991; 13(4): 319-324.

5. Bennish ML, Salam MA. Rethinking options for the treatment of shigellosis. J Antimicrob Chemother. 1992; 30: 243-247.

6. Dipika S, Ramamurthy T, Jacqueline D, Bhattacharya SK. Shigellosis: challenges & management issues. Indian J Med Res. 2004; 454-462

7. Turbyfill KR, Kaminski RW, Oaks EV. Immunogenicity and efficacy of highly purified invasion complex vaccine from *Shigella flexneri* 2a. Vaccine. 2008; 26: 1353-1364.

8. Boulund F, Johnning A, Pereira MB, Larsson DGJ, Kristiansson D. A novel method to discover fluoroquinolone antibiotic resistance (*qnr*) genes in fragmented nucleotide sequences. BMC Genomic. 2012; 13: 695-702

9. Yanyan Liu Y, Hu L, Pan Y, Cheng J, Zhu Y,Ye Y, Li J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in association with b-lactamases, 16S rRNA methylase genes and integrons amongst clinical isolates of *Shigella flexneri*. J Med Microbiol. 2012; 61: 1174-1176

10. Luo YP, Yang JY, Zhang YJ, Ye LY, Wang LL, Guo L. Prevalence of b-lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37: 352-355.

11. Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid mediated class 1 integron. Int J Antimicrob Agent. 2011; 37: 230-234.

12. Xiong Z, Li J, Li T, Shen J, Hu F, Wang M. Prevalence of plasmid-mediated quinolone -resistance determinants in *Shigella flexneri* isolates from Anhui Province, China. J Antibiotic. 2010; 63: 187-189.

Archive of SID

www.SID.ir

13. 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 b-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 490-495.

14. Velaiati AK, Study of isolated *shigella* from client to Tehran university of medical sciences, Faculty of health in 10 years. J Zanjan Uni Med Sci. 1993; 2: 12-16 [In Persian].

15. Afzali H, Study of sensitivity of isolated *Shigella*, *Salmonella* and *Vibrio chlorea* from stool to antibiotic. Feiz. 2001; 47-58.

16. Ranjbar R. 2006. Molecular epidemiology study of isolated *Shigella soneie* from clinical samples in Tehran between 2003-2004. PhD thesis. Tehran university of medical sciences.

17. Panhotra BR, Desai B, Sharma PL. Nalidixic acid resistant *Shigella dysenteniae* type. Lancet. 2003; 3: 45-46.

18. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK, Sen B, Taneja N, Kundu M, Yamasaki S, Ramamurth TA. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India. J Med Microbiol. 2008; 57: 856-863.

19. Xiang XY, Pan JP, Wang HQ, Zhang H, Huang ZC, Gu YM. Characterization of fluoroquinolone-resistant *Shigella flexneri* in Hangzhou area of China. Adv Access. 2009; 5: 125-131

20. Li-Fen Hu. Mutations in the GyrA subunit of DNA Gyrase and the ParC subunit of Topoisomerase IV in clinical strains of fluoroquinolone-resistant *Shigella* in Anhui, China J Microbiol. 2007; 3: 601-608.

21. Brown SD, Farrell DJ. Antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric and adult patients as part of the protect US study in 2001–2002. J Antimicrob Chemother. 2004; 54: 23-29.

22. Jeong YS, Lee JC, Kang HY, Yu HS, Lee EY, Choi CH. Epidemiology of nalidixic acid resistance and TEM- 1 and TEM-52-mediated ampicillin resistance of *Shigella sonnei* isolates obtained in Korea between 1980 and 2000. Antimicrob Agent Chemother. 2003; 4: 211-217

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 1, April 2014

Original Article

A study to determine antibiotic resistance and recognition *qnr* genes in *Shigella* strains isolated from patients admitted to Mofid's Children Medical Center, Tehran

Majid Moghbeli[1], Vahid Behnood[2], Reza Ranjbar[3]

[1]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[2] MS.c., Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[3] Associate Professor, Molecular Biology Center. Baghiatallah University, Tehran, Iran.

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives: Fluoroquinolones are successfully being used for treatment of the infections caused by *Shigella* and multiple antimicrobiaol resistant strains, as well. Mutations in *gyr* A and carrying *qnr* are the main mechanisms of resistance to quinolone in microbial strains. This study was aimed to investigate the presence of *qnr* resistant genes and to evaluate the antibiotic resistant profile in *Shigella* strains isolated from patients.

Methods and Materials: This study was carried out on 73 *Shigella* strains isolated from the patients admitted to Mofid's children medical center, First, the bacteria and strains isolated from the patients were identified based on biochemical and serological tests. The antibiotic resistance profile was determined based on Kirby– Bauer test. The presence of *qnr* gene was finally determined using PCR reaction.

Results: The antibiotic resistance profile showed that 97.2% of the isolates were resistant to at least one antibiotic among 18 antimicrobial agents. The most antibiotic resistance ability belonged to trimetoprim+ sulfametoxasol (94.5%) while the lowest antibiotic resistance were seen in the case of treatment with Ciprofloxacin and ceftizoxime (with 100% sensitivity ratio). Totally, 23 *Shigella* isolates showed resistance against nalidixic acid. Of these, four samples, belonging to *S. flexeneri* (2 strains), *S. Soneie* (1 strain) and *S. Boiedie* (1 strain) carried *qnrS* gene. None of *qnrA* and *qnrB* genes were detected in the isolated strains.

Conclusion: Based on the data, the nalidixic resistance frequency and presence of *qnrS* gene was significant in these *Shigella* isolates.

Keywords: *Shigella,* Antibiotic resistant, *qnrS* gene, PCR.

Correspondence to: Majid Moghbeli

Tel: +989122218612

E-mail: moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2014, 7(1): 49-57.

www.SID.ir