

Identification of *Ipa* and *Stx* Genes and Their Antibiotic Resistance Pattern in *Shigella Sonnei* isolated from Clinical Samples using Multiplex-PCR

Ganjipour M¹, Amini K^{2*}, Moradli G²

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

²Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Background: *Shigella* is responsible for shigellosis or bacillary dysentery, which is transmitted by contaminated food. Invasion Plasmid Antigens (*Ipa*) gene leads to intra- or extra-cellular spreading of *Shigella*. The current study aimed to identify *Ipa* and *stx* genes in *Shigella sonnei* isolated from clinical samples by multiplex-PCR and determine their antibiotic resistance profile.

Methods: In this study, 150 stool samples were collected from different treatment centers in Tehran. After culture-based microbiological and biochemical tests, 60 *Shigella sonnei* species were identified. Antibiotic susceptibility tests were performed by disk diffusion method according to CLSI guideline. Then, multiplex-PCR assay was employed to identify *stx* and *ipa* genes.

Results: The results showed that the highest and lowest resistance was related to co-trimoxazole (n=60, 100%) and ceftriaxone (n=10, 16.7%), respectively. Out of the 60 isolates, 57 strains (95%) were positive for *ipaH* gene and other virulence genes were not detected in any of the samples.

Conclusion: *ipaH*, due to presence in the majority of *Shigella* strains, can be a candidate to identify this organism. It seems that indiscriminate use of antibiotics is one of the causes of antibiotic resistance in *Shigella* species.

Keywords: *Ipa* gene, *stx* gene, *Shigella sonnei*, Multiplex-PCR, Antibiotic resistance

Sadra Med Sci J 2016; 4(2): 127-136.

Received: Sep. 19th, 2015

Accepted: Mar. 17th, 2016

* Corresponding Author: **Amini K.** Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, kamini@iau-saveh.ac.ir

مجله علوم پزشکی صدر

دوره ۴، شماره ۲، بهار ۱۳۹۵، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۲۷ تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۸

مقاله پژوهشی

(Original Article)

شناسایی ژن های *stx* و *ipa* در شیگلا سونئی جدا شده از نمونه های بالینی به روش

Multiplex-PCR و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

مریم گنجی پور^۱، کیومرث امینی^{۲*}، غلامعلی مرادلی^۲^۱ دانش آموخته 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

چکیده

مقدمه: شیگلا عامل شیگلوز یا اسهال خونی باسیلی بوده که از طریق مواد غذایی آلوده منتقل می شود. ژن بیماری زای پلاسمید تهاجمی شیگلا (*ipa*) (invasion plasmid antigens) موجب انتشار داخل و بین سلولی شیگلا می شود. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ژن های *ipa* و *stx* در شیگلا سونئی جدا شده از نمونه های بالینی به روش Multiplex-PCR و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها بود.

مواد و روش: در این مطالعه توصیفی، تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی از مراکز درمانی مختلف شهر تهران جمع آوری و بعد از کشت با آزمون های بیوشیمیایی، تعداد ۶۰ نمونه شیگلا سونئی شناسایی شد. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن مطابق CLSI انجام و جهت شناسایی ژن های حدت از آزمون PCR چندگانه ای استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد بیشترین و کمترین مقاومت مربوط به کوتریموکسازول (تمامی ۶۰ ایزوله، ۱۰۰٪) و سفتریاکسون (۱۰ جدایه، ۱۶/۷٪) بود. از میان ۶۰ ایزوله شیگلا سونئی جداسازی شده، تعداد ۵۷ جدایه (۹۵ درصد) برای حضور ژن *ipaH* مثبت بودند و سایر ژن ها در هیچ یک از نمونه ها ردیابی نگردید.

بحث و نتیجه گیری: *ipaH* به دلیل حضور در اکثریت سویه های شیگلا می تواند کاندیدی برای شناسایی این ارگانسیم باشد. به نظر می رسد مصرف بی رویه در آنتی بیوتیک یکی از علل پیدایش مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های شیگلا باشد.

واژگان کلیدی: ژن های *ipa* و *stx*، شیگلا سونئی، Multiplex-PCR مقاومت آنتی بیوتیکی

* نویسنده مسئول: کیومرث امینی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، kamini@iau-saveh.ac.ir

مقدمه

بیماری اسهال عامل مهم مرگ‌ومیر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. تخمین زده می‌شود که سالانه ۴ تا ۶ میلیون کودک بر اثر بیماری‌های اسهال، جان خود را از دست می‌دهند. اگرچه در برخی موارد بیماری اسهال حاد، بدون هیچ‌گونه درمانی خودبه‌خود بهبود می‌یابد، ولی در بسیاری از موارد درمان ضرورت دارد (۱).

جنس شیگلا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه و عامل شیگلوز یا اسهال خونی باسیلی است که شباهت ژنتیکی بسیار زیادی به *E. coli* دارد (۲،۳). این جنس دارای ۴ گونه است که شامل: *S. dysenteriae*، *S. flexneri*، *S. sonnei* و *S. boydii* است. تمامی این جنس‌ها قادرند شیگلوز یا همان اسهال خونی باسیلی ایجاد نمایند که با وجود خون و موکوس در مدفوع مشخص می‌شود. دوز عفونی این ارگانیسم بسیار پایین و در حدود ۱۰ سلول است. محل اقامت طبیعی این میکروب محدود به روده انسان و سایر پستانداران است که می‌تواند دیسانتری باسیلی ایجاد کرده که این دیسانتری با علائمی همچون اسهال، شکم‌درد و مدفوع خونی ظاهر می‌شود (۴،۵). این پاتوژن می‌تواند از طریق مواد غذایی مختلف شامل سالادها، سبزی‌های خام، شیر و محصولات لبنی و گوشت منتقل شود. آب آلوده به مدفوع و فعالیت‌های غیربهداشتی تهیه‌کنندگان غذا نیز از متداول‌ترین عوامل آلودگی هستند (۶،۷).

گونه‌های شیگلا دارای یک پلاسمید بیماری‌زای بزرگ و ۲۲۰ کیلو باز بوده که عوامل لازم برای تهاجم به سلول اپی‌تلیال و انتشار باکتری در بافت میزبان را کد می‌کند (۸). ژن بیماری‌زای پلاسمید تهاجمی شیگلا (*invasion plasmid antigens*) (*ipa*) روی پلاسمید بزرگ قرار دارد و انتشار داخل و بین سلولی شیگلا توسط این ژن در دهه ۱۹۹۰ مشخص شده است. ژن *IpaD* در چسبندگی، تهاجم و فرار از وزیکول‌های فاگوسیت دخالت دارد (۸،۹). همچنین ژن‌های *ipaA, B, C, D* پروتئین‌های ترشحی سیستم ترشح III را کد می‌کنند که موجب افزایش قدرت

تهاجم باکتری می‌شوند (۱۰،۱۱،۴). ژن *stx* نیز با استقرار در جایگاه کروموزومی باکتری از عوامل تهاجمی به بافت‌های روده بوده و سم ST توسط ژن *sta* رمزدهی شده و نوعی از آنزیم گوانیلات سیکلاز است که به دو نوع *Sta* و *Stb* دسته‌بندی می‌شود، که هر دو از لحاظ ساختاری و عملکردی با هم تفاوت دارند. سم *Sta* در بیماری‌زایی انسان و سم *Stb* در ایجاد بیماری در حیوانات اهمیت دارد. *Sta* آنزیم گوانیلات سیکلاز یاخته میزبان را فعال نموده و منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده می‌شود، در حالی که *Stb* باعث آزاد شدن سروتونین و پروستاگلاندین E2 از یاخته میزبان و افزایش مقادیر یون‌های کلسیم در سیتوپلاسم شده که در نهایت منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده و ایجاد اسهال می‌گردد (۱۲).

شیگلوز از مشکلات عمده سلامت جهانی بوده و طبق برآوردها، سالانه عامل ۱۶۵ میلیون اسهال خونی و ۱/۱ میلیون مرگ که حدود ۶۱ درصد آن را کودکان تشکیل می‌دهند، در اثر ابتلا به این باکتری رخ می‌دهد. در کودکان زیر ۵ سال به دلیل فقدان آگاهی بهداشتی و کودکانی که دچار سوءتغذیه هستند امکان ابتلا به این بیماری بالاتر از افراد بالغ است (۱۳،۱۴). از طرف دیگرگونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز دائماً در حال افزایش بوده و درمان شیگلوزیس را بسیار سخت می‌کند (۱۵،۱۶). بیش از ۱۵۰ سال است که از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سریع و مؤثر عفونت‌ها استفاده می‌گردد. در طول این مدت، تغییرات زیادی در نوع آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و نیز حساسیت و مقاومت باکتری‌ها نسبت به آن‌ها ایجاد شده است (۱۷). عمده‌ترین راه‌های کسب مقاومت به طریقه ژنتیکی است که خود به دودسته مقاومت کروموزومی و مقاومت پلاسمیدی تقسیم می‌گردد. در واقع مقاومت اکتسابی در نتیجه جهش در ژن‌های کروموزومی و یا در ارتباط با پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، و اینتگرون‌ها است. باکتری‌ها به راحتی می‌توانند به ژن‌های مقاومتی که بر روی عناصر متحرک ژنتیکی (پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها

Laboratory Standards institute) (۲۰۱۴) استفاده شد (۲۰). جهت انجام این مطالعه از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۲ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، از شرکت Himedia Laboratories HIMEDIA (Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید.

استخراج DNA و آزمون Multiplex-PCR

برای استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده شد. مطابق منابع مورداستفاده برنامه آزمون Multiplex-PCR بدین شرح است: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه است. از توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی آغازگرهای اختصاصی مطابق جدول شماره ۱ برای تکثیر ژن‌های هدف استفاده شد (۱۵). مخلوط‌های استفاده‌شده جهت انجام واکنش به این شرح است: آب مقطر ۱۷/۳۵ میکرو لیتر، 1X. PCR buffer به میزان ۲ میکرو لیتر، $MgCl_2$ 1.5mM به میزان ۰/۷ میکرو لیتر، dNTP mix (5Mm) به میزان ۰/۵ میکرو لیتر، پرایمرهای 0.5 μ M مورداستفاده هرکدام ۰/۶ میکرو لیتر، آنزیم *Taq polymerase* 2.5unit به میزان ۰/۲۵ میکرو لیتر، نمونه DNA ۳ میکرو لیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر تهیه گردید (۱۵). آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده‌شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داگ BIORAD مورد بررسی قرار گرفت.

و اینتگرون‌ها) قرار دارند و از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال می‌یابد، دسترسی پیدا کنند (۱۶). شیگلا سونئی گونه شایع شیگلوزیس در برخی از کشورها از جمله آمریکا است و در سال ۱۹۸۰ از ۷۰ درصد بیماران جدا شده در حالی که این رقم در سال ۱۹۶۷ کمتر و حدود ۳۷ درصد بوده است (۱). در ایران این میزان ۴۲٪ گزارش شده است (۱۸). در اپیدمی‌های گسترده از یک روش سریع برای تشخیص به هنگام و دقیق مرتبط با عامل بیماری‌زا استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، جداسازی ژن‌های حدت شیگلا سونئی جدا شده از نمونه‌های بالینی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود.

مواد و روش

نمونه‌برداری و جداسازی

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n = Z^2 P(1 - P) / d^2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۵۰ نمونه اسهالی از بیماران مبتلابه اسهال خونی پذیرش شده در بیمارستان‌های غرب تهران و تعدادی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی در اردیبهشت ۱۳۹۳ تا آبان ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار، سالمونلا-شیگلا آگار انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تأیید حضور باکتری شیگلا، آزمون‌های بیوشیمیایی TSI، IMViC (Triple Sugar Iron Agar) (شرکت مرک، آلمان) جهت تشخیص نهایی گونه شیگلا سونئی انجام شد (۱۹).

آنتی‌بیوگرام

بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chainreaction).

اندازه باند (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر	پرایمر
۴۲۷	<i>ipaH</i>	Forward: GCTGGAAAACTCAGTGCCT Reverse: CCAGTCCGTAAATTCATTCT	Shig-1
۵۰۰	<i>ipa BCD</i>	Forward: GCTATAGCAGTGACATG Reverse: ACGAGTTCGAAGCACTC	ipa
۱۰۰	<i>Stx₁</i>	Forward: CAACACTGGATGATCTCAG Reverse: CCCCCTCAACTGCTAATA	Stx

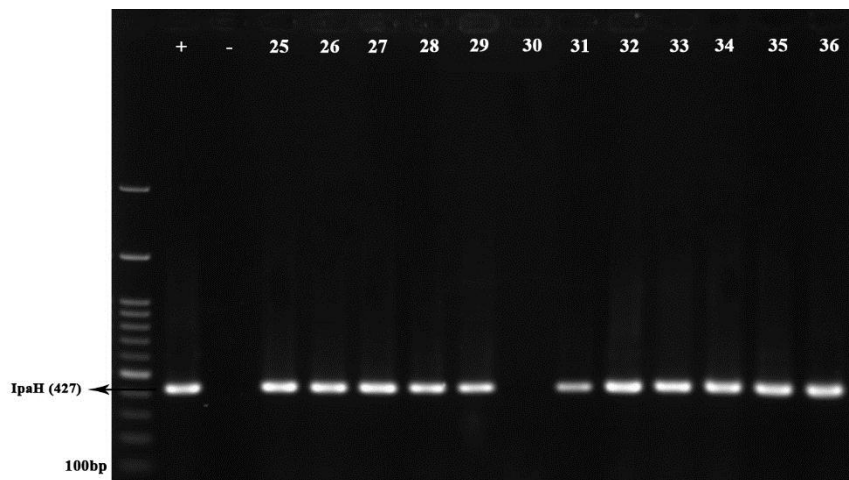
یافته‌ها

همچنین سویه‌ای که به کل داروهای مورد استفاده حساس باشند، در سویه‌های مورد مطالعه این تحقیق یافت نشد. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ژن‌های حدت با استفاده از روش Multiplex PCR نشان داد که در هیچ‌یک از نمونه‌ها، ژن‌های *ipaBCD* و *Stx1* وجود نداشته و ژن *ipaH* در ۵۷ نمونه (۹۵ درصد) ردیابی گردید. (شکل ۱).

در نهایت تعداد ۶۰ نمونه باکتری شناسایی و تایید گردید. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول شماره ۲ ذکر شده است. بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به کوتریموکسازول (۱۰۰٪) و سفتریاکسون (۱۶/۷٪) گزارش شد. همچنین سویه‌ای که به همه داروها مقاوم باشد و

جدول ۲: میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان حساسیت تعداد (%) Sensitive	حساسیت متوسط تعداد (%) Intermediate	میزان مقاومت تعداد (%) Resistance
کوتریموکسازول	-	-	۶۰ (۱۰۰)
تتراسایکلین	۳ (۵)	۲ (۳/۳)	۵۵ (۹۱/۷)
سفکسیم	۷ (۱۱/۷)	۱۲ (۲۰)	۴۱ (۶۸/۳)
نالیدکسیک اسید	۲۶ (۴۳/۴)	۴ (۶/۶)	۳۰ (۵۰)
سفپیم	۲۲ (۳۶/۶)	۱۴ (۲۳/۴)	۲۴ (۴۰)
سفتریاکسون	۴۶ (۷۶/۷)	۴ (۶/۶)	۱۰ (۱۶/۷)



شکل ۱: نتایج M-PCR نمونه‌های DNA استخراج شده بر روی ژل از چپ: مارکر (100 bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های حاوی ژن *IpaH* با طول باند (427 bp) ردیابی گردید.

بحث

کوتریموکسازول بودند. این محققین هیچ سویه مقاومی نسبت به سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به دست نیاوردند (۲۲).

بررسی مولکولی ژن‌های تحت مطالعه نشان داد که ۵۷ سویه (۹۵٪) از نظر وجود ژن *ipaH* مثبت بودند و این در حالی که هیچ سویه‌ای (۰٪) حامل ژن‌های *ipaBCD* و *Stx1* نبودند. ژن *ipaH* از ژن‌های بیماری‌زایی بوده که هم بر روی کروموزوم و هم پلاسمید باکتری قرار دارد و به دلیل اهمیت این ژن مطالعات زیادی روی آن صورت گرفته است و ادعا شده است که این ژن می‌تواند نشانگر مهمی در تشخیص زودهنگام این باکتری از سایر باکتری‌های روده‌ای داشته باشد (۲۲). بنابراین می‌توان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن *ipaH* در روش PCR، خیلی سریع و با اختصاصیت و حساسیت بالا سویه‌های شیگلا را شناسایی نمود. اما به دلیل محدودیت‌های این روش از جمله تنظیم کردن برنامه PCR برای شناسایی ژن مورد نظر، استفاده از کشت در کنار این تکنیک لازم به نظر می‌رسد. در بررسی که در سال (۲۰۱۳) توسط کو و همکاران انجام شد بیماری شیگلا مهم‌ترین علت بیماری اسهالی در جهان به‌ویژه

در این تحقیق مشخص گردید که ژن *ipaH* بیشترین فراوانی را نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه داشته و با توجه به نقش این ژن در مراحل ابتدایی آلودگی، می‌تواند بر روند بیماری‌زایی شیگلا سونتی تأثیر بسزایی داشته باشد. درمان شیگلوز بسته به شدت عفونت متغیر بوده، ولی باین حال برای موارد شدید، آنتی‌بیوتیک‌ها مدت طولانی به همراه ریه‌درتاسیون برای جبران کاهش آب بدن، به کار می‌روند. متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده: سفتریاکسون، آمپی‌سیلین، سولفامتوکسازول، کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید یا سیپروفلوکساسین می‌باشند (۱۵). در مطالعه فعلی تمامی ایزوله‌ها نسبت به کوتریموکسازول مقاوم بودند. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۴۶ سویه (۷۶/۷ درصد) از مجموع ۶۰ سویه تحت مطالعه دارای حساسیت به سفتریاکسون بودند که با مطالعه خورشیدی و همکاران مغایرت دارد که این می‌تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی (مطالعه خورشیدی در کاشان در مقایسه با مطالعه فعلی در تهران) باشد. همچنین فرشاد و همکاران نشان دادند که از ۸۲ سویه تحت مطالعه، ۴/۸ درصد مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ۹۰/۲ درصد مقاوم به

حتی بیماری‌های روده‌ای ناشی از سایر باکتری‌ها بوده که در اثر انتقال ژنتیکی عوامل مقاومت به باکتری منتقل شده است.

نتیجه‌گیری

ژن *ipaH* به دلیل حضور در اکثریت سویه‌های شیگلا می‌تواند کاندیدی برای شناسایی این ارگانیسم باشد و نقش بسیار حیاتی در تهاجم باکتری دارد. به نظر می‌رسد مصرف بی‌رویه در آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و کوتریموکسازول به‌ویژه در ایران که نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها ارزان‌تر و دسترسی به آن ساده‌تر است یکی از علل پیدایش مقاومت این آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به گونه‌های شیگلا باشد.

تقدیر و تشکر

نگارنده این مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد و کارکنان این گروه مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد.

منابع

1. Lee T-M, Chang L-L, Chang C-Y, Wang J-C, Pan T-M, Wang T-K, et al. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. *J Med Microbiol* 2000;49(4):355-60.
2. Lai V, Wang L, Reeves PR. *Escherichia coli* clone *Sonnei* (*Shigella sonnei*) had a chromosomal O-antigen gene cluster prior to gaining its current plasmid-borne O-antigen genes. *J Bacteriol*. 1998;180(11):2983-6.
3. Niyogi SK. *Shigellosis*. *J Microbiol* (Seoul, Korea) 2005;43(2):133-43.

در کشورهای توسعه‌نیافته و در حال توسعه که دارای استانداردهای بهداشتی سطح پایین و کیفیت آب مصرفی نازل می‌باشد ذکر شده است. شیگلا فلکسنسری مهم‌ترین عامل از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ بوده، در حالی که شیگلا سونئی به‌عنوان مهم‌ترین زیرگروه شایع از سال ۲۰۰۹ جایگزین شیگلا فلکسنسری شده است (۲۱).

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام‌شده و مقایسه آن با دست‌آوردهای این پژوهش میزان ژن *ipaH* در همه جدایه‌ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده و مؤثرترین ژن در ایجاد اسهال خونی مربوط به ژن *ipaH* بود. در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت نسبت به سفتریاکسون ۷۶٪ درصد بود. این یافته با نتایج سایر محققان همخوانی دارد. قندیان و همکاران در سال (۱۳۹۰) بر روی نمونه‌های شیگلا جمع‌آوری‌شده از پنج استان کشور (مازندران، گیلان، اصفهان، ایلام، تهران) طی سال‌های ۱۳۷۵-۱۳۸۰، به بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین ژن *ipaH* پرداخته و در نتایج تحقیقات خود دریافتند که میزان جداسازی شیگلا سونئی ۷۳ درصد، شیگلا فلکسنسری ۱۸ درصد، شیگلا بوییدی ۵ درصد و شیگلا دیسانتری ۲ درصد بود. در بین این نمونه‌ها ۵ درصد مقاومت به تتراسایکلین و کوتریموکسازول بوده، و میزان مقاومت در سویه‌های شیگلا سونئی بیش از سایر گونه‌ها بود. حضور ژن *ipaH* با انجام PCR در تمام سویه‌ها تأیید شد. سویه‌های مورد مطالعه نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و آمینوگلیکوزیدها حساسیت بالایی را نشان دادند. بررسی ژن ویروانس *ipaH* نشان داد که می‌توان از این ژن به‌عنوان نشانگری برای شناسایی سریع گونه‌های شیگلا استفاده کرد (۴). نتایج فوق با نتایج تحقیقات اخیر همخوانی داشته و میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و تتراسایکلین بالاتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بوده که نشان‌دهنده مصرف بالای این فرآورده‌های دارویی جهت درمان بیماری شیگلوزیس و یا

- Shigella protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *The EMBO J* 1999;18(21):5853-62.
12. Aranda K, Fagundes-Neto U, Scaletsky I. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clinl Microbiol* 2004;42(12):5849-53.
 13. Girard MP, Steele D, Chaignat C-L, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 2006;24(15):2732-50.
 14. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991;13(4): 319-24.
 15. Sharma A, Singh SK, Bajpai D. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. with reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. *Microbiol Res* 2010;165(1):33-42.
 16. Khorshidi A, Akbari H, Salehi A. prevalence of shigellosis, serotypes, antibiotic resistance pattern in the diarrhogenic patients referred to kashan central laboratory in 2000-2001. *Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences*. 2006; 10(4): 65-70 (Persian).
 17. Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):421-3.
 18. Ranjbar R, Aleo A, Giammanco GM, Dionisi AM, Sadeghifard N, Mammina C. Genetic relatedness among isolates of *Shigella sonnei* carrying class 2
 4. 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: Pathobiol* 2011;14(1):81-8. (Persian).
 5. Dutta S, Ghosh A, Ghosh K, Dutta D, Bhattacharya SK, Nair GB, et al. Newly emerged multiple-antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains in and around Kolkata, India, are clonal. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5833-4.
 6. Nguyen TV, Van Le P, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob Agents chemother* 2005;49(2):816-9.
 7. Obi C, Bessong P, Momba M, Potgieter N, Samie A, Igumbor E. Profiles of antibiotic susceptibilities of bacterial isolates and physico-chemical quality of water supply in rural Venda communities, South Africa. *Water SA* 2004;30(4):515-9.
 8. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya S. Shigellosis: challenges & management issues. *Indian J Med Res* 2004;120(5):454.
 9. Thapa B, Ventkateswarlu K, Malik A, Panigrahi D. Shigellosis in children from north India: a clinicopathological study. *J Trop pediatrics* 1995;41(5):303-7.
 10. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85(23):9317-21.
 11. Bourdet-Sicard R, Rüdiger M, Jockusch BM, Gounon P, Sansonetti PJ, Van Nhieu GT. Binding of the

23. Salehi Chaleshtori A, Saadati M, Ahsani Arani Y, Bahador A, Hosseini M, Hesaraki M, et al. [Evaluation of Live Attenuated *Shigella dysenteriae* Type 1 Strain as a Candidate Vaccine]. *Police Medicine* 2012;1(1):27-35. (Persian).
24. MoezArdalan K, Zali MR, Dallal MMS, 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, Population and Nutrition* 2003;96-102 (Persian).
25. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 2012;50(9):2951-63.
26. Lindsay B, Ochieng JB, Ikumapayi UN, Toure A, Ahmed D, Li S, et al. Quantitative PCR for detection of *Shigella* improves ascertainment of *Shigella* burden in children with moderate-to-severe diarrhea in low-income countries. *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1740-6.
- integrons in Tehran, Iran, 2002–2003. *BMC Infect Dis* 2007;7(1):62.
19. Faruque SM, Khan R, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Ahmad QS, Azim T, et al. Isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(8):3908-13.
20. Wayne P. Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards 2012:1-37.
21. Qu M, Zhang X, Liu G, Huang Y, Jia L, Liang W, et al. An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. *J Infect in Dev Countries* 2014;8(07):904-8.
22. Farshad S, Ranjbar R, Hosseini M. Molecular Genotyping of *Shigella sonnei* Strains Isolated From Children With Bloody Diarrhea Using Pulsed Field Gel Electrophoresis on the Total Genome and PCR-RFLP of *IpaH* and *IpaBCD* Genes. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(1).

Cite this article as:

Ganjipour M, Amini K, Moradli G. Identification of *Ipa* and *Stx* Genes and Their Antibiotic Resistance Pattern in *Shigella Sonnei* isolated from Clinical Samples using Multiplex-PCR. *Sadra Med Sci J* 2016; 4(2): 127-136.

