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

Ganjipour M[1], Amini K[2*], Moradli G[2]

[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

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

Archive of SID

[*]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

www.SID.ir

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجـــــله علـــــوم پزشکی صدرا
دوره ۴، شماره ۲، بهار ۱۳۹۵، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۶
تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۲۷ تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۸

شناسایی ژن‌های *ipa* و*stx* در *شیگلا سونئی* جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش Multiplex-PCR و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

مریم گنجی‌پور[۱]، کیومرث امینی[۲*]، غلامعلی مرادلی[۲]

[۱] دانش‌آموخته 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 می‌شود. ژن بیماری‌زای پلاسمید تهاجمی شیگلا (invasion plasmid antigens) (*ipa*) موجب انتشار داخل و بین سلولی شیگلا می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ژن‌های *ipa* و stx در شیگلا سونئی جداشده از نمونه‌های بالینی به روش Multiplex-PCR و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها بود.

مواد و روش: در این مطالعه توصیفی، تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی از مراکز درمانی مختلف شهر تهران جمع‌آوری و بعد از کشت با آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد ۶۰ نمونه *شیگلا سونئی* شناسایی شد. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن مطابق CLSI انجام و جهت شناسایی ژن‌های حدت از آزمون PCR چندگانه‌ای استفاده شد.

یافته‌ها: 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 ژن‌ها در هیچ‌یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری: *ipaH* به دلیل حضور در اکثریت سویه‌های شیگلا می‌تواند کاندیدی برای شناسایی این ارگانیسم باشد. به نظر می‌رسد مصرف بی‌رویه در آنتی‌بیوتیک یکی از علل پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های شیگلا باشد.

واژگان کلیدی: ژن‌های *ipa* و*stx*، *شیگلا سونئی*، Multiplex-PCR مقاومت آنتی‌بیوتیکی

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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری اسهال عامل مهم مرگ‌ومیر کودکان در کشورهای درحال‌توسعه است. تخمین زده می‌شود که سالانه ۴ تا ۶ میلیون کودک براثر 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.flexneri* ، *S.dysanteriae* ، *S.sonnei* ،*S.boydii* است. تمامی این جنس‌ها قادرند شیگلوز یا همان اسهال خونی باسیلی ایجاد نمایند که باوجود 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 مشخص‌شده 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 ازلحاظ ساختاری و عملکردی با هم تفاوت دارند. سم Sta در بیماری‌زایی انسان و سم Stb در ایجاد بیماری در حیوانات اهمیت دارد. Sta آنزیم گووانیلات سیکلاز یاخته میزبان را فعال نموده و منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده می‌شود، درحالی‌که Stb باعث آزاد شدن سروتونین و پروستاگلاندین E2 از یاخته میزبان و افزایش مقادیر یون‌های کلسیم در سیتوپلاسم شده که درنهایت 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 (۱۶,۱۵). 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 ایجادشده است (۱۷). عمده‌ترین راه‌های کسب مقاومت به طریقه ژنتیکی است که خود به دودسته مقاومت کروموزومی و مقاومت پلاسمیدی تقسیم می‌گردد. درواقع مقاومت اکتسابی درنتیجه جهش در ژن‌های کروموزومی و یا در ارتباط با پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، و اینتگرون‌ها است. باکتری‌ها به‌راحتی می‌توانند به ژن‌های مقاومتی که بر روی عناصر متحرک ژنتیکی (پلاسمیدها، ترانسپوزون ها

Archive of SID
www.SID.ir

و اینتگرون ها) قرار دارند و از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال می‌یابد، دسترسی پیدا کنند (۱۶).

شیگلا سونئی گونه شایع شیگلوزیس در برخی از کشورها ازجمله آمریکاست و در سال ۱۹۸۰ از ۷۰ درصد بیماران جداشده درحالی‌که این رقم در سال ۱۹۶۷ کمتر و حدود ۳۷ درصد بوده است (۱). در ایران این میزان ۴۲ ٪ گزارش‌شده 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* جداشده از نمونه-های 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 $n=z2P(1-P)/d2$ و خطای قابل‌قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۵۰ نمونه اسهالی از بیماران مبتلابه اسهال خونی پذیرش‌شده در بیمارستان‌های غرب تهران و تعدادی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی در اردیبهشت ۱۳۹۳تا آبان ماه ۱۳۹۳جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار، سالمونلا-شیگلا آگار انتقال داده‌شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تائید حضور باکتری شیگلا، آزمون‌های بیوشیمیاییIMViC، TSI (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 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 Himedia Laboratories (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 الیگونوکلئوتیدی 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 µM 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 داک BIORAD موردبررسی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت انجام Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chainreaction).

پرایمر	توالی پرایمر	ژن هدف	اندازه باند(bp)
Shig-1	Forward: GCTGGAAAAACTCAGTGCCT Reverse: CCAGTCCGTAAATTCATTCT	*ipaH*	۴۲۷
ipa	Forward: GCTATAGCAGTGACATG Reverse: ACGAGTTCGAAGCACTC	*ipa BCD*	۵۰۰
Stx	Forward: CAACACTGGATGATCTCAG Reverse: CCCCCTCAACTGCTAATA	Stx_1	۱۰۰

یافته‌ها

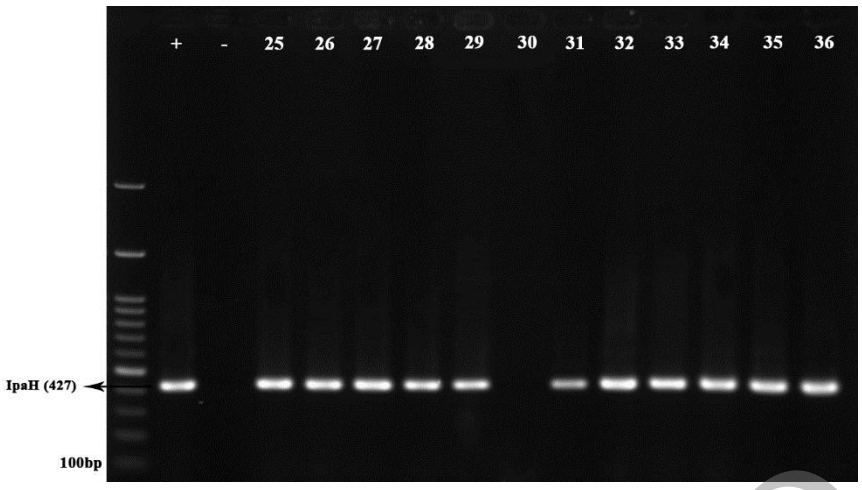
درنهایت تعداد ۶۰ نمونه باکتری شناسایی و تائید گردید. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده در جدول شماره ۲ ذکرشده است. بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به کوتریموکسازول (۱۰۰٪) و سفتریاکسون (۱۶/۷٪) گزارش شد. همچنین سویه‌ای که به همه داروها مقاوم باشد و همچنین سویه‌ای که به‌کل داروهای مورداستفاده حساس باشند، در سویه‌های موردمطالعه 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. (شکل۱).

جدول۲: 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)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: نتایج M-PCR نمونه‌های DNA استخراج‌شده بر روی ژل از چپ: مارکر (۱۰۰ bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های حاوی ژن *IpaH* با طول باند (۴۲۷ bp)ردیابی گردید.

بحث

در این تحقیق مشخص گردید که ژن *ipaH* بیشترین فراوانی را نسبت به سایر ژن‌های موردمطالعه داشته و با توجه به نقش این ژن در مراحل ابتدایی آلودگی، می‌تواند بر روند بیماری‌زایی *شیگلا سونئی* تأثیر بسزایی داشته باشد. درمان شیگلوز بسته به‌شدت عفونت متغیر بوده، ولی بااین‌حال برای موارد شدید، آنتی‌بیوتیک‌ها مدت طولانی به همراه رهیدرتاسیون برای جبران کاهش آب بدن، به کار می‌روند. متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده: 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 درنتیجه 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 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٪) ازنظر وجود ژن *ipaH* مثبت بودند و این درحالی‌که 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 ادعاشده 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 ازجمله تنظیم کردن برنامه PCR برای شناسایی ژن موردنظر، 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

Archive of SID
www.SID.ir

درکشورهای توسعه‌نیافته و درحال‌توسعه که دارای استانداردهای بهداشتی سطح پایین و کیفیت آب مصرفی نازل می‌باشد ذکرشده است. *شیگلا فلکسنری* مهم‌ترین عامل از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ بوده، درحالی‌که *شیگلا سونئی* به‌عنوان مهم‌ترین زیرگروه شایع از سال ۲۰۰۹ جایگزین *شیگلا فلکسنری* شده است (۲۱).

به‌طورکلی 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 ۷۶/۷ 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 فلکسنری* ۱۸ درصد، *شیگلا بوییدی* ۵ درصد و *شیگلا دیسانتری* ۲ درصد بود. در بین این نمونه‌ها ۵ درصد مقاوم 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 تائید شد. سویه‌های موردمطالعه نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و آمینوگلیکوزیدها حساسیت بالایی را نشان دادند. بررسی ژن ویرولانس *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 داروی جهت درمان بیماری شیگلوزیس و یا حتی بیماری‌های روده‌ای ناشی از سایر باکتری‌ها بوده که در اثر انتقال ژنتیکی عوامل مقاومت به باکتری منتقل‌شده 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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 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 shigllosis, serotypes, antibiotic resistance pattern in the diarhogenic 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

Archive of SID

www.SID.ir

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).

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.

Archive of SID

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.

www.SID.ir