بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه علوم پزشکی**

**و خدمات بهداشتی درمانی کرمان**

**دانشکده پزشکی افضلی پور**

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی پزشکی

عنوان

# بررسی توزیع ژن‌های بیماری‌زایی و تعیین قرابت ژنتیکی ایزوله‌های شیگلا جداشده از نمونه‌های اسهالي در چند شهر ایران

توسط

**زهرا خلیلی**

استاد راهنما: **دکتر حسین حسینی نوه**

استاد مشاور: **دکتر داود کلانتر نیستانکی**

شماره پایان‌نامه: ۵۹۰ **سال تحصیلی (شهریور۹۹)**

**KERMAN UNIVERSITY**

**OF MEDICAL SCIENCES**

**Faculty of Medicine**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree (MSc)

Title

# Evaluation of virulence genes distribution and genetic relationship of *Shigella* isolates collected from diarrheal samples from some cities of Iran

By

**Zahra Khalili**

Supervisor

**Dr. Hossein Hosseini nave**

Advisor

**Dr. Davood Kalantar Nistanaki**

Thesis No :590 Date: **(September,2020)**

## چکیده

**مقدمه و اهداف:** باکتری شیگلا با سیل گرم منفی روده‌ای ا ست که باعث ایجاد دیسانتری با سیلی یا شیگلوز می‌شود. با توجه به اینکه گزارش‌ها در مورد مشخصه‌های اپیدمیولوژیک این باکتری محدود بوده مطالعه حاضر به بررسی توزیع ژن‌های بیماری‌زایی و تعیین قرابت ژنتیکی ایزوله‌های شیگلا جداشده از نمونه‌های اسهالي در چند شهر ایران انجام گرفت.

**مواد و روش کار:** در پژوهش حا ضر تعداد۲۲۵ ایزوله شیگلا از شهرهای کرمان، اردبیل، اهواز، ارومیه، شهرکرد، مشهد و تبریز جمع‌آوری شد و بر طبق روش‌های استاندارد کشت، تست‌های بیوشیمیایی و با استفاده از آنتی سرم و روش مولکولی PCR موردبررسی قرار گرفتند. فراوانی ژن‌های ویرولانس (*ipaH, ial,* *set1A, set1B, sen, virF, invE, sat, sigA, pic and sepA*) با روش PCR انجام شد. قرابت ژنتیکی ایزوله‌ها با روش MLVA انجام گرفت.

**نتایج:** در پژوهش حاضر تعداد۲۲۵ ایزوله شیگلا از شهرهای کرمان، اردبیل، اهواز، ارومیه، شهرکرد، مشهد و تبریز جمع‌آوری شد. تعداد ایزوله‌های جمع‌آوری‌شده به تفکیک شهر و گونه و ژن‌های ویرولانس موردبررسی قرار گرفت. به‌طورکلی ۱۰۷ ایزوله شیگلا فلکسنری،۸۳ ایزوله شیگلا سونئی، ۳۰ ایزوله شیگلا بوییدی و ۵ ایزوله شیگلا دیسانتریه جداسازی شد. همه ایزوله‌ها ازنظر ژن *ipaH* مثبت بودند. ژن ial در ۸۳/۱ درصد و ژن *virF* در ۶۹/۸ درصد ایزوله‌ها دیده شدند. ژن‌های *set1A, set1B* فقط در ۲۱/۵ درصد ایزوله‌های شیگلا فلک سنری دیده شد. درحالی‌که ۶۹/۸ در صد از ایزوله‌ها متعلق به گروه‌های مختلف، ژن *sen* را حمل کردند. ایزوله‌های شیگلا به ۱۹۶ نوع MLVA تایپ تقسیم شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، مشخص گردید که فراوانی ژن‌های ویرولانس در شهرهای ایران متفاوت است.

**نتیجه‌گیری:** ایزوله‌های شیگلا ازنظر ژن‌های ویرولانس هتروژن بودند. فراوانی ژن‌های ویرولانس در بین ایزوله‌های شیگلا فلکسنری بیشتر از دیگرگونه‌ها بود. بااینکه بر اساس MLVA ایزوله هرگونه از تنوع بالایی برخوردار بودند لیکن الگوی ایزوله‌های مربوط به یک‌گونه در شهرهای مختلف تا حدی شبیه به هم بود.

**کلیدواژه:** شیگلا، ژن‌های ویرولانس، PCR، MLVA و ایران

**Abstract**

**Introduction & Objectives:** *Shigella* is a gram-negative intestinal bacterium that causes bacilli dysentery or *shigellosis*. Due to the limited reports on the epidemiological characteristics of this bacterium, the present study was performed to investigate the distribution of pathogenic genes and to determine the genetic affinity of *Shigella* isolates isolated from diarrheal samples in several cities of Iran.

**Materials & Methods:** In the present study, 225 *Shigella* isolates were collected from Kerman, Ardabil, Ahvaz, Urmia, Shahrekord, Mashhad and Tabriz. *Shigella* isolates were examined according to standard culture methods, biochemical tests, antiserum and PCR. Distribution of virulence genes (*ipaH, ial, set1A, set1B, sen, virF, invE, sat, sigA, pic* and *sepA*) was determined by PCR. The genetic diversity of the isolates was determined by MLVA method.

**Results:** Totally, 107 *Shigella flexneri*, 83 *Shigella sonnei*, and 30 *Shigella boydii* and 5 *Shigella dysenteriae*, were collected. *All isolates were positive for ipaH gene. The other genes include ial, invE, virF, sat, pic and sepA* were found in 83.1%, 51.1%, 69.8%, 23.6%, 24.4%, and 27.1% of the isolates, respectively. Both *set1A and set1B* were detected in 21.5% of *S. flexneri* isolates, whereas 69.8% of the isolates belonging to different serogroup carried sen gene. The *Shigella* isolates were divided into 196 MLVA types.

**Conclusion**: Based on the results of this study, it was found that the distribution of virulence genes in Iranian cities is different. Despite the extensive heterogeneity found for

the shigella isolates from geographically different regions, it was possible to discriminate the shigella species based on the MLVA method.

**Keywords***: Shigella*, virulence genes, PCR, MLVA and Iran

**عنوان** **فهرست مندرجات** **صفحه**

فهرست جداول.....ح

فهرست تصاویر.....ط

فهرست پیوست ها.....ی

فهرست کوتاه نوشته‌ها.....ک

چکیده.....

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱ بیان مسئله و اهمیت موضوع : ..... ۱

۱-۲ هدف کلی: ..... ٤

۱-۳ اهداف اختصاصي یا ویژه طرح: ..... ٤

۱-۴ اهداف کاربردي پژوهش: ..... ٥

۱-۵ فرضیات یا سؤالات پژوهش: ..... ٥

فصل دوم : بررسی متون

۲-۱ اسهال: ..... ۷

۲-۲ بیماری شیگلوزیس: ..... ۷

۲-۳ تاریخچه: ..... ۸

۲-۴ ویژگی‌های بیوشیمیایی و صفات کشت جنس شیگلا: ..... ۹

۲-۵ طبقه‌بندی جنس شیگلا: ..... ۱۰

۲-۶ سیر تکامل شیگلا: ..... ۱۰

۲-۷ مکانیسم بیماریزایی شیگلا: ..... ۱۱

۲-۸ اپیدمیولوژی شیگلوزیس: ..... ۱٤

۲-۹ آنالیز چند لوکوسی تکرارهای پُشت سَرِهم (MLVA): ..... ۱۵

۲-۱۰ اصول و مبانی روش MLVA: ..... ۱٦

۲-۱۱ اصطلاحات و واژه‌ها در MLVA: ..... ۱۸

۲-۱۲ مزایای MLVA نسبت به سایر روش‌های ژنوتیپ بندی: ..... ۲۰

فصل سوم: مواد و روش

۳-۱ متغیرها: ..... ۲۵

۳-۲ نوع مطالعه: ..... ۲٦

۳-۳ جمعیت موردمطالعه: ..... ۲٦

۳-۳-۱ تعریف جمعیت موردمطالعه: ..... ۲٦

۳-۴ مواد و دستگاه‌های موردنیاز: ..... ۲۷

۳-۵ محیط کشت‌های مورد مطالعه: ..... ۲۹

۳-۵-۱ محیط XLD (Xylose Lysine Desoxycholate Agar): ..... ۲۹

۳-۵-۲ محیط SS (Salmonella Shigella agar): ..... ۳۰

۳-۵-۳ محیط سیمون سیترات (Simmons Citrate agar): ..... ۳۰

۳-۵-۴ محیط لیزین دکربوکسیلاز (Lysine decarboxylase broth): ..... ۳۰

۳-۵-۵محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar): ..... ۳۱

۳-۵-۶محیط MR/ VP (Methyl red-Vegesproskaure broth): ..... ۳۱

۳-۵-۷محیط : SIM (Sulfide Indol Motility) ..... ۳۲

۳-۵-۸محیط : TSB (Trypticase Soy Broth) ..... ۳۲

۳-۶محلول‌های موردمطالعه: ..... ۳۳

۳-۶-۱ بافر : TBE ..... ۳۳

۳-۷ جمع‌آوری نمونه و تست‌های تشخیص میکروبی: ..... ۳۳

۳-۸ تهیه و آماده‌سازی پرایمرها: ..... ۳٤

۳-۹ استخراج ژنوم باکتریایی: ..... ۳٤

۳-۱۰ انجام PCR برای تشخیص ژن‌های ویرولانس: ..... ۳۵

۳-۱۱ ژنوتیپ بندی ایزوله‌های شیگلا با استفاده از روش : MLVA ..... ۳۷

۳-۱۱-۱ انتخاب لوکوس‌های VNTR و انجام : MLVA ..... ۳۷

۳-۱۱-۲محاسبه اندازه و تعداد تکرارهای : VNTR ..... ۳۹

۳-۱۱-۳تجزیه‌وتحلیل داده‌های : VNTR ..... ۳۹

۳-۱۲ آنالیز آماری داده‌ها: ..... ٤۰

فصل چهارم : یافته‌ها

۴-۱ فراوانی شیگلا در ایجاد اسهال در شهرهای کرمان، اردبیل، تبریز، اهواز، شهرکرد، مشهد و ارومیه: ... ٤۲

۴-۲ نتایج حاصل از شیوع ژن‌های ویرولانس: ..... ٤٤

۴-۳ نتایج آنالیز قرابت ژنتیکی با روش : MLVA ..... ۵۰

فصل پنجم : بحث

۵-۱ بحث: ..... ۵۹

۲-۵ پیشنهادها:..... ۷۰

منابع ..... ..... ..... ..... ٦٨

پیوست ها ..... ..... ..... ..... ۸۰

| عنوان | فهرست جداول | صفحه |
|---|---|---|


**جدول ۱-۳:**متغیرها ..... ۲۵

**جدول ۲-۳:**دستگاه های مورد استفاده ..... ۲۷

**جدول ۳-۳:** مواد مورد استفاده ..... ۲۸

**جدول ۴-۳:**مشخصات محیط های کشت مورد استفاده ..... ۲۹

**جدول ۵-۳:**مشخصات بیوشیمیایی شیگلا ..... ۳٤

**جدول ۶-۳:** پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین گونه شیگلا ..... ۳۵

**جدول ۷-۳:** پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین ژن های ویرولانس ایزوله های شیگلا ..... ۳۶

**جدول ۸-۳:** نام لوکوس،پرایمرهای اختصاصی و اندازه تکرار هر لوکوس VNTR ..... ۳۸

**جدول ۱-۴:**تعداد گونه های شیگلا به تفکیک شهر ..... ۴۲

**جدول ۲-۴:** فراوانی نسبی ژن های ویرولانس در گونه های مختلف شیگلا به تفکیک شهر ..... ۴۷


| عنوان | فهرست تصاویر و نمودارها | صفحه |
|---|---|---|


**شکل ۱-۲:**تصویری از توالی های تکرار شونده VNTR..... ۱۷

**شکل ۲-۲:** تصویر شماتیک از تفاوت پروفایل اللی در دو سویه باکتریایی ..... ۱۸

**شکل ۱-۴ :**تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCRژن ipaH در ایزوله های شیگلا جدا شده از نمونه های اسهالی ..... ۴۵

**شکل۲-۴:**تصویر ژل الکتروفورز Multiplex ژن های satpic,sigA,sepa ایزوله های شیگلا. ..... ۴۵ **Error! Bookmark not defined.**

**شکل ۳-۴ :**تصویری از ژل الکتروفورز محصولات مختلفVNTR مربوط به لوکوس ms06. ..... ۵۲

**شکل ۴-۴:** تصویری از ژل الکتروفورز محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوس ms32. ..... ۵۲

**شکل۵-۴:** تصویری از ژل الکتروفورز محصولات مختلف VNTRمربوط به لوکوس ms21. ..... ۵۳

**نمودار ۱-۴:** مقایسه شهر با فراوانی گونه های شیگلا..... ۴۳

**نمودار ۲-۴:** درصد شیوع گونه های مختلف شیگلا در پژوهش حاضر. ..... ۴۳

**نمودار ۳-۴** : فراوانی نسبی ژن های ویرولانس در گونه های مختلف شیگلا. ..... ۴۶

**نمودار ۴-۴** : فراوانی نسبی ژن های ویرولانس به تفکیک هر شهر. ..... ۵۲

**نمودار ۵-۴:** بررسی میزان شباهت ایزوله های شیگلا بوییدی با استفاده از UPGMA و پروفایل ژن های ویرولانس ..... ۵۴

**نمودار ۶-۴:** بررسی میزان شباهت ایزوله های شیگلا سونئی با استفاده از UPGMAو پروفایل ژن های ویرولانس. ..... ۵۵

**نمودار ۷-۴:** بررسی میزان شباهت ایزوله های شیگلا فلکسنری با استفاده از UPGMA و پروفایل ژن های ویرولانس. ..... ۵۶

**نمودار ۸-۴:** آنالیز Minimum spanning tree (MST) تمامی ایزوله‌های شیگلا..... ۵۷

**عنوان** **فهرست پیوست ها** **صفحه**

فرم MSDS..... ۸۱

# منابع

## منابع


1. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Sasakawa C. Shigella infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. In: Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut. Springer; 2009. p. 231-55.

2. Peng J, Yang J, Jin Q. The molecular evolutionary history of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. Infect Genet Evol. 2009;9(1):147-52.

3. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ. 1999;77(8):651.

4. Paula CMD de, Geimba MP, Amaral PH do, Tondo EC. Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of Shigella responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. Brazilian J Microbiol. 2010;41(4):966-77.

5. Vargas M, Gascon J, Jimenez De Anta MT, Vila J. Prevalence of Shigella enterotoxins 1 and 2 among Shigella strains isolated from patients with traveler's diarrhea. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3608-11.

6. Hosseini Nave H, Mansouri S, Emaneini M, Moradi M. Distribution of genes encoding virulence factors and molecular analysis of Shigella spp. isolated from patients with diarrhea in Kerman, Iran. Microb Pathog. 2016;92.

7. Yaghoubi S, Ranjbar R, Mehdi M, Dallal S, Yasliani S. Profiling of Virulence-associated Factors in Shigella Species Isolated from Acute Pediatric Diarrheal Samples in Tehran, Iran. 2017;8(3):220-6.

8. Hosseini-Nave H, Salavati MS, Lashkari M, alsadat Ravari M, Hashemizadeh Z, Marghaki FS, et al. Distribution of genes encoding virulence factors and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of entero-aggregative Escherichia coli (EAEC) isolated in Iran from patients with diarrhoea. J Med Microbiol. 2018;67(9):1334-9.

9. Ângela Bernardes Sousa M, Mendes EN, Collares GB, Amedé e Pé ret-Filho L, José Penna F, Prazeres Magalhães P. Shigella in Brazilian children with acute diarrhoea: Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1):30-5.

10. Roy S, Thanasekaran K, Dutta Roy AR, Sehgal SC. Distribution of Shigella enterotoxin genes and secreted autotransporter toxin gene among diverse species and serotypes of shigella isolated from Andaman Islands, India. Trop Med Int Heal. 2006;

11. Ruiz J, Navia MM, Vila J, Gascón J. Prevalence of the sat gene among clinical isolates of Shigella spp. causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. J Clin Microbiol. 2002;40(4):1565-6.

12. Gorgé O, Lopez S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse V, Vergnaud G. Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing Shigella spp. J Clin Microbiol. 2008;46(3):1026-36.

13. Lindstedt BA, Brandal LT, Aas L, Vardund T, Kapperud G. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic Escherichia coli and Shigella isolates for use in a genotyping assay. J Microbiol Methods. 2007;69(1):197-205.

14. Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Sheng KT, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of Shigella sonnei. J Clin Microbiol. 2007;45(11):3574-80.

15. Wang Y-W, Watanabe H, Phung DC, Tung SK, Lee Y-S, Terajima J, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of Shigella flexneri. BMC Microbiol. 2009;9(1):278.

16. Navaneethan U, Giannella RA. Mechanisms of infectious diarrhea. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008;5(11):637-47.

17. Mukhopadhyay S, Ganguli S, Chakrabarti S. Shigella pathogenesis: molecular and computational insights. AIMS Mol Sci. 2020;7(2):99.

18. Rogawski McQuade ET, Shaheen F, Kabir F, Rizvi A, Platts-Mills JA, Aziz F, et al. Epidemiology of Shigella infections and diarrhea in the first two years of life using culture-independent diagnostics in 8 low-resource settings. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(8):e0008536.

19. Ranjbar R, Mammina C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic Shigella boydii strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. BMC Res Notes. 2008;1(1):74.

20. Keddy KH. The light of hope: focusing on shigella and ETEC infections. Lancet Glob Heal. 2020;8(1):e14-5.

21. Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, et al. Genome dynamics and diversity of Shigella species, the etiologic agents of bacillary dysentery. Nucleic Acids Res.

2005;33(19):6445-58.

22. Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of Shigella effectors. Nat Rev Microbiol. 2008;6(1):11-6.

23. Van den Beld MJC, Reubsaet FAG. Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(6):899-904.

24. Lan R, Reeves PR. Escherichia coli in disguise: molecular origins of Shigella. Microbes Infect. 2002;4(11):1125-32.

25. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008;21(1):134-56.

26. Keir LS, Marks SD, Kim JJ. Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies. Drug Des Devel Ther. 2012;6:195.

27. Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO. Thermoregulation of Shigella and Escherichia coli EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. EMBO J. 1998;17(23):7033-43.

28. Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative Escherichia coli. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(2):294-301.

29. Miller MA, Sentz J, Rabaa MA, Mintz ED. Global epidemiology of infections due to

Shigella, Salmonella serotype Typhi, and enterotoxigenic Escherichia coli. Epidemiol Infect. 2008;136(4):433-5.

30. Ranjbar R, Aleo A, Giammanco GM, Dionisi AM, Sadeghifard N, Mammina C. Genetic relatedness among isolates of Shigella sonnei carrying class 2 integrons in Tehran, Iran, 2002-2003. BMC Infect Dis. 2007;7(1):62.

31. Ruekit S, Wangchuk S, Dorji T, Tshering KP, Pootong P, Nobthai P, et al. Molecular characterization and PCR-based replicon typing of multidrug resistant Shigella sonnei isolates from an outbreak in Thimphu, Bhutan. BMC Res Notes. 2014;7(1):95.

32. Cao Y, Wei D. Multi-locus sequence typing (MLST) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (REP-PCR), characterization of Shigella spp. over two decades in Tianjin China. Int J Mol Epidemiol Genet. 2012;3(4):321.

33. Kosek M, Yori PP, Gilman RH, Vela H, Olortegui MP, Chavez CB, et al. Facilitated molecular typing of Shigella isolates using ERIC-PCR. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(6):1018-25.

34. Chiou C-S, Watanabe H, Wang Y-W, Wang W-L, Terajima J, Thong K-L, et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of Shigella sonnei. J Clin Microbiol. 2009;47(4):1149-54.

35. Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A. Characterization of Shigella strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2879-83.

36. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Nielsen EM, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and

application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2013;18(35):20565.

37. Van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;49(1):22-7.

38. Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol. 1987;4(3):203-21.

39. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Harmsen D, Niemann S. Online tools for polyphasic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex genotyping data: now and next. Infect Genet Evol. 2012;12(4):748-54.

40. Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol. 2008;62:53-70.

41. Ranjbar R, Memariani M. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for genotyping of Shigella sonnei strains isolated from pediatric patients. Gastroenterol Hepatol from bed to bench. 2015;8(3):225.

42. Ranjbar R, Afshar D, Tavana AM, Najafi A, Pourali F, Safiri Z, et al. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of three pathogenic Shigella species. Iran J Public Health. 2014;43(12):1657.

43. Ojha SC, Yean Yean C, Ismail A, Banga Singh K-K. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of Shigella species. Biomed Res Int. 2013;2013.

44. Antikainen J, Tarkka E, Haukka K, Siitonen A, Vaara M, Kirveskari J. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic Escherichia coli directly from stool samples.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(8):899-908.

45. Cruz CBN da, Souza MCS de, Serra PT, Santos I, Balieiro A, Pieri FA, et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. Biomed Res Int. 2014;2014.

46. Restieri C, Garriss G, Locas M-C, Dozois CM. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains. Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1553-62.

47. Ranjbar R, Dallal MMS, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. J Health Popul Nutr. 2008;26(4):426.

48. Tajbakhsh M, García Migura L, Rahbar M, Svendsen CA, Mohammadzadeh M, Zali MR, et al. Antimicrobial-resistant Shigella infections from Iran: an overlooked problem? J Antimicrob Chemother. 2012;67(5):1128-33.

49. Vinh H, Nhu NTK, Nga TVT, Duy PT, Campbell JI, Hoang NVM, et al. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. BMC Infect Dis. 2009;9(1):204.

50. Casabonne C, González A, Aquili V, Balagué C. Prevalence and virulence genes of Shigella spp. isolated from patients with diarrhea in Rosario, Argentina. Jpn J Infect Dis. 2016;69(6):477-81.

51. BARARI SKR, AHMADPOUR KM. Prevalence of Shigella species and their antimicrobial resistance patterns at Amirkola Children's Hospital, North of Iran. 2007;

52. Jomezadeh N, Babamoradi S, Kalantar E, Javaherizadeh H. Isolation and antibiotic susceptibility of Shigella species from stool samples among hospitalized children in Abadan, Iran. Gastroenterol Hepatol from bed to bench. 2014;7(4):218.

53. SH Mansori. Bacterial causes of diarrhoea in Kermanian children under five years old. J Kerman Univ Med Sci. 1994;1(3):108-13.

54. Barak M, Arzanlou M, Babapour B, Ghorbani L. Antibiotic resistance pattern of bacterial enteritis among hospitalized children in ardabil: a single center experience. Int J Adv Med. 2016;3:989-93.

55. Moosavian M, Seyed-Mohammadi S, Sheikh AF, Khoshnood S, Dezfuli AA, Saki M, et al. Prevalence of enterotoxin-encoding genes among diverse Shigella strains isolated from patients with diarrhea, southwest Iran. Acta Microbiol Immunol Hung. 2019;66(1):91-101.

56. Nikfar R, Shamsizadeh A, Darbor M, Khaghani S, Moghaddam M. A Study of prevalence of Shigella species and antimicrobial resistance patterns in paediatric medical center, Ahvaz, Iran. Iran J Microbiol. 2017;9(5):277.

57. Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, et al. A multicentre study of Shigella diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLoS Med. 2006;3(9):e353.

58. Peirano G, Souza F dos S, Rodrigues D dos P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in Shigella spp. from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(3):245-50.

59. Zhang W, Luo Y, Li J, Lin L, Ma Y, Hu C, et al. Wide dissemination of multidrug-resistant

Shigella isolates in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66(11):2527-35.

60. Sangeetha A V, Parija SC, Mandal J, Krishnamurthy S. Clinical and microbiological profiles of shigellosis in children. J Health Popul Nutr. 2014;32(4):580.

61. Bin Kingombe CI, Cerqueira-Campos M-L, Farber JM. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. J Food Prot. 2005;68(2):239-45.

62. Lü scher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes. 1994;8(4):285-90.

63. Thong KL, Hoe SLL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. BMC Infect Dis. 2005;5:8.

64. Das A, Mandal J. Extensive inter-strain diversity among clinical isolates of Shigella flexneri with reference to its serotype, virulence traits and plasmid incompatibility types, a study from south India over a 6-year period. Gut Pathog. 2019;11(1):33.

65. Zhu Z, Cao M, Wang W, Liu G, Zhou X, Li B, et al. Virulence factors and molecular characteristics of Shigella flexneri isolated from calves with diarrhea. Res Sq. 2020;

66. Fan W, Qian H, Shang W, Ying C, Zhang X, Cheng S, et al. Low distribution of genes encoding virulence factors in Shigella flexneri serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. Gut Pathog. 2017;9(1):1-9.

67. Al-Hasani K, Navarro-Garcia F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. The immunogenic SigA enterotoxin of Shigella flexneri 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution

in intoxicated epithelial cells. PLoS One. 2009;4(12):e8223.

68. Sethuvel DPM, Anandan S, Michael JS, Murugan D, Neeravi A, Verghese VP, et al. Virulence gene profiles of Shigella species isolated from stool specimens in India: its association with clinical manifestation and antimicrobial resistance. Pathog Glob Health. 2019;113(4):173-9.

69. Moosavian M, Ghaderiyan GH, Shahin M, Navidifar T. First investigation of the presence of SPATE genes in Shigella species isolated from children with diarrhea infection in Ahvaz, southwest Iran. Infect Drug Resist. 2019;12:795-804.

70. Lluque A, Mosquito S, Gomes C, Riveros M, Durand D, Tilley DH, et al. Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in Shigella strains from periurban areas of Lima (Peru). Int J Med Microbiol. 2015;305(4-5):480-90.

71. Izumiya H, Tada Y, Ito K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J, et al. Characterization of Shigella sonnei isolates from travel-associated cases in Japan. J Med Microbiol. 2009;58(11):1486-91.

72. Bakhshi B, Bayat B, Lari AR. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of Shigella sonnei isolates of 2012 outbreak IR Iran. Microb Pathog. 2017;102:69-73.

73. Basset P, Nü bel U, Witte W, Blanc DS. Evaluation of adding a second marker to overcome Staphylococcus aureus spa typing homoplasies. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1475-7.

بسمه تعالی

تاریخ ۹۹/۶/۲۵

شماره ۵۹۰

کد اخلاق ۹۷۰۰۰۷۲۲۷

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

## صورتجلسه دفاع از پایان نامه

جلسه دفاعیه پایان نامه **خانم زهرا خلیلی** کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " **بررسی توزیع ژن های بیماری زایی و تعیین قرابت ژنتیکی ایزوله های شیگلا جدا شده از نمونه های اسهالی در چند شهر ایران** در **ساعت ۱۰ روز شنبه** مورخ ۹۹/۶/۲۵ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

| سمت | نام و نام خانوادگی | امضا |
|---|---|---|
| الف:استاد راهنما (اول) | **جناب آقای دکتر حسین حسینی نوه** | |
| ب: استاد راهنما(دوم) | ــــــــــ | |
| ج: استاد مشاور | **جناب آقای دکتر داود کلانتر** | |
| د: استاد مشاور (دوم) | ــــــــــ | |
| د :عضو هیات داوران (داخلی) | **سرکار خانم دکتر فرشته صفاری** | |
| ذ: عضو هیات داوران (خارجی) | **سرکار خانم دکتر زهرا بابایی** | |
| ر: نماینده تحصیلات تکمیلی | **سرکار خانم دکتر فرشته صفاری** | |

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹/۱ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی افضلی پور