

بررسی الگوی مقاومت دارویی در شیگلاهای توکسین زا و غیر توکسین جدا شده از اسهال کودکان

محمد مهدی سلطان دلال^۱، عبدالعزیز رستگار لاری^۲، مصطفی حسینی^۳، فرزانه امین هراتی^۴

۱. استاد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، (مؤلف مسوول) تلفن ثابت: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱،

soltanirad34@yahoo.com

۲. استاد بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. استاد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴. استاد گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵. کارشناس ارشد بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اسهال یکی از مهمترین علل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. بیماری های روده ای سالانه سبب مرگ بسیاری از کودکان زیر ۵ سال می گردد. این مطالعه با هدف بررسی خاصیت مهاجمی سویه های شیگلا با استفاده از کشت سلولی Hela بوده است.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی، ۸۰ سوش شیگلا شامل ۲۰ سوش ذخیره که سالهای قبل از کودکان مبتلا به اسهال جدا شده بودند و ۶۰ سوش دیگر که از کودکان مبتلا به اسهال از سه مرکز درمانی لقمان و امام خمینی و مرکز طبی کودکان جدا گردیده بودند، از نظر خاصیت مهاجمی به سلول هلا مورد بررسی قرار گرفتند. مجموعه سوشهای مطالعه شده شامل: ۵۴ سوش شیگلا فلکسنری و ۱۴ سوش شیگلا سونتی و ۱۰ سوش شیگلا بوئیدی و ۲ سوش شیگلا دیسانتری بوده است. داده ها با استفاده از آزمون کای دو یا آزمون دقیق فیشر بررسی شد.

یافته ها: نتایج بدست آمده نشان داد که ۹ مورد از ۸۰ سوش، خاصیت سیتوتوکسیسیته دارند (۱۱/۲۵٪). با توجه به آزمون χ^2 اختلاف معنی داری در نتایج حاصل از سوش های ایزوله شده و ذخیره ملاحظه نشد ($P > 0/05$).

میان علائم بالینی درد شکمی و تهوع و چندین مرتبه دفع مدفوع آبکی در روز با خاصیت توکسین زائی رابطه مستقیمی وجود نداشت، اما میان علائم دیگر مثل ایجاد تب و وجود خون در مدفوع با توکسین زائی سوش ها رابطه مستقیمی وجود داشت. همچنین از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تفاوتی میان سوش های توکسین زا و غیر توکسین زا وجود نداشت.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که اختلاف معنی داری میان الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوش های توکسین زا و غیر توکسین زای ایزوله شده از نمونه های کلینیکی وجود نداشت.

نکات کلیدی: شیگلا، سلول هلا، سایتو توکسین، مقاومت آنتی بیوتیکی

وصول مقاله: ۹۱/۸/۷ اصلاحیه نهایی: ۹۲/۲/۱۱ پذیرش: ۹۲/۶/۱۹

مقدمه

مشکلات اجتماعی فراوان می شود تلفات زیادی را بویژه در کشورهای در حال توسعه باعث می گردد. شیگلوزیس به عنوان یک معضل جهانی از طرف سازمان جهانی بهداشت

بیماری های اسهالی بخش عمده ای از عفونت های روده ای بویژه کودکان را در بر می گیرد. این بیماری ها علاوه بر تعداد زیاد مبتلایان که موجب ضررهای اقتصادی و

اسهال حاد طی ۴ سال تعداد ۲۶۰ کشت مدفوع مثبت برای شیگلا گزارش کردند (۱۴/۷٪). الگوی مقاومت بالا برای تری متوپریم- سولفامتوکسازول و آمپی سیلین (۷۳/۸٪) گزارش گردید در حالی که مقاومت آنتی میکروبیال پایین برای سپیروفلوکساسین و سفوناکسیم (۲/۷٪) بدست آمد. شیگلا فلکسنری فراوان ترین سوش (۷۰٪) بود و بعد از آن شیگلا سونئی (۳۰٪) قرار داشت. هیچ موردی از شیگلا بوییدی و شیگلا دیسانتری یافت نگردید (۷). در مطالعه اردلان و همکاران در کرج ۱۶/۸٪ نمونه‌های بیماران مبتلا به اسهال ناشی از شیگلا بود. در میان گونه‌های شیگلا به ترتیب فراوانی شیگلا فلکسنری ۷/۵٪، شیگلا سونئی ۵/۲٪، شیگلا دیسانتری ۲/۶٪ و شیگلا بوییدی ۱/۵٪ قرار داشتند. بیشترین مقاومت با ۷۳/۵٪ به تراسایکلین و تری متوپریم سولفامتوکسازول با ۷۰/۴٪ بود (۸). مطالعات قبلی ما در تهران نشان داد که شیگلا فلکسنری بعد از شیگلا سونئی با ۲/۸٪ فراوانی قرار داشت. از نظر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی تمامی ایزوله‌ها به استرپتومایسین مقاوم بودند. بیش از ۹۶/۴٪ سویه‌ها به تراسایکلین و آموکسی سیلین، ۸۹٪ به کوتریموکسازول، ۷۲/۶٪ به آمپی سیلین و ۳۳/۳٪ به کلرام فنیکل مقاوم بودند (۹). هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های توکسین زا و غیر توکسین زای شیگلا بوده است.

روش کار

این یک مطالعه توصیفی- تحلیلی در علوم پایه بوده که بر روی تعداد ۸۰ سوش بالینی شیگلا که طی سال ۱۳۹۰ انجام شد.

شناخته شده است (۱ و ۲). ارزیابی می‌شود شیگلا سالیانه سبب اسهال ۵۰۰۰۰۰ نفر، بستری ۶۲۳۱ نفر و مرگ ۷۰ نفر در امریکا می‌شود. جنس شیگلا در سال ۲۰۰۴ به عنوان عامل بیماری‌های منتقله از غذا در رنکینگ سیستم کنترل و مراقبت‌های بهداشتی امریکا قرار گرفت (۳). از نظر قدرت بیماریزائی نسبی جنس‌های باکتری‌هائی که عامل اسهال هستند به دو گروه تقسیم می‌شوند: باکتری‌های مهاجم و باکتری‌های توکسین زا. عوامل چسبندگی و تهاجم به سلول‌های میزبان و تولید سم از مواردی هستند که در بیماریزائی باکتری‌ها دخیل می‌باشند (۴). در شیگلوز معمولاً باکتری در سلول‌های اپی تلیال مخاطی نفوذ کرده و در آنجا شروع به رشد و نفوذ در سلول‌های مجاور می‌کند که در نتیجه باعث جراحت و خرابی سلول‌ها می‌شود. اما برخی سویه‌ها قابلیت تولید سم را نیز دارند. لذا اسهال در اینگونه موارد در اثر تکثیر و افزایش باکتری‌ها در روده و یا بر روی سطح سلول‌های اپی تلیال روده کوچک تولید توکسینی می‌کنند که باعث ترشح آب و الکترولیت بوسیله سلول‌های روده می‌شوند (۵ و ۴). شیگلا همواره الگوی مقاومت آنتی بیوتیک رو به افزایش نشان می‌دهد (۶). در میان چهار گونه، *S. dysenteriae* 1 (باسیل شیگا) به طور کلی نسبت به مقاوم شدن به آنتی بیوتیک‌های جدید اولین و بعد از آن گونه‌های دیگر شیگلا قرار می‌گیرند. به ندرت حساسیت مجدد برای سویه‌های مقاوم که در یک منطقه بصورت آندمیک گزارش شده است، پدید می‌آید. به منظور اطمینان از درمان مناسب، نظارت مستمر ملزم به تعیین آنتی بیوتیک‌هایی است که هنوز فعال هستند. این استراتژی "تلاش برای نگه داشتن یک مرحله به پیش" به نقش توسعه مستمر و تست از آنتی بیوتیک‌های جدید که گرانتر هستند، بکار گرفته می‌شود (۶). براری سواد کوهی و همکاران در سال ۱۳۸۶، از ۱۸۵۰ کودک بستری از ۶ ماه تا ۱۲ سال با

تهیه سوش ها:

برای انجام این آزمایش ۶۰ سوش از مرکز طبی کودکان و بیمارستان امام خمینی و بیمارستان امام جمع آوری شد. ۲۰ سوش دیگر که سال‌های قبل از کودکان مبتلا به اسهال جدا شده بود، پس از احیاء شدن در محیط بویون BHI جهت مقایسه برداشت شد. از نظر فراوانی سوش‌ها از ۸۰ سوش ۵۴ تا شیگلا فلکسنری، ۱۰ تا شیگلا بوئیدی و ۱۴ تا شیگلا سونئی و ۲ تا شیگلا دیسانتری بررسی شدند. پس از تأیید وجود شیگلا (۱۰)، به پیشنهاد سازمان (CLSI) Clinical and Laboratory Standard Institute، به منظور تعیین الگوی حساسیت از روش انتشار دیسک (کربی بوئر) استفاده گردید (۱۱).

آنتی بیوگرام به روش دیسک در آگار (کربی بوئر):

تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند و تلقیح با سوآب پنبه‌ای استریل بر روی پلیتی حاوی محیط مولر هینتون آگار، و سپس قرار دادن ۱۲ دیسک آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، سفالوتین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل، کانامایسین، تتراسایکلین، سفیکسیم، سپروفلوکساسین، سفتریاکسون، سفتری‌زوکسیم، توبرامایسین و کوتریموکسازول (شرکت مست) از قرار ۶ دیسک در هر پلیت، طبق روش کربی بوئر انجام گردید.

تهیه توکسین:

مقداری از ارگانیسیم را در لوله آزمایش حاوی ۷ ml از محیط BHI کشت داده، ۲۴ ساعت در بن ماری متحرک با دور ۱۸۰ در دقیقه قرار داده و سپس آنرا با دور ۳۵۰۰ RPM سانتریفوژ نموده مایع رویی را از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ عبور داده و در ویال‌های مخصوص تقسیم نموده تا برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گیرند.

طریقه کشت و زیاد کردن سلول‌ها:

این سلول‌ها را می‌توان در بطری‌های مخصوص کشت سلولی به هر اندازه کشت داد. وقتی که یک لایه سلولی از آن تهیه شد باید سلول‌ها را تریپسینیزه نموده و به منظور

نگهداری در بطری و یا به منظور آزمایش توکسین در Microtiter Plates مجدداً کشت داد.

انجام تست توکسین:

پس از تریپسینیزه کردن و تهیه سوسپانسیون سلولی در ۵ ml از MEM، مقداری از این سوسپانسیون سلولی را در حفره‌های Microtiter Plates ریخته، سپس مقداری MEM حاوی سرم گاوی به آن اضافه می‌شود و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار داده می‌شود. ۲-۴ روز بعد این سلول‌ها برای آزمایش آماده خواهند بود. روز قبل از آزمایش باید محیط کشت سلول‌ها عوض شود. روز بعد محیط کشت سلولی را دور ریخته و به آن ۰/۵ ml از توکسین تهیه شده اضافه نموده، ۱۰-۵ دقیقه سلول‌ها را در مجاورت توکسین در اتو ۳۷ درجه گذاشته، تا توکسین به رسپتورهای خود در سطح سلول بچسبند؛ پس از این مدت توکسین را خالی نموده، با ۱-۱/۵ سی سی P.B.S شسته می‌شود و پس از آن به حفره‌ها مقداری از محیط کشت MEM حاوی FCS اضافه نموده و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار داده می‌شود. روز بعد سلول‌ها در زیر Inverted Microscope بررسی می‌شوند، در صورتیکه سلول‌ها تغییر شکل نیافته باشند تست منفی و در صورتی که سلول‌ها از حالت کشیده به حالت گرد درآمده باشند تست مثبت است. برای تست کنترل هم به یک ردیف از حفره‌های میکروتیتروکسین اضافه نمی‌شود و اجازه داده می‌شود تا سلول‌ها به حالت عادی رشد کنند (۱۳ و ۱۲).

آنالیز آماری

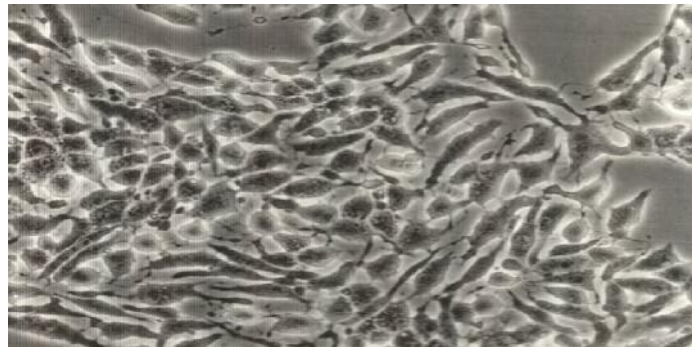
داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. ارتباط متغیرهای کیفی با استفاده از آزمون کای دو یا آزمون دقیق فیشر بررسی شد. *P value* کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

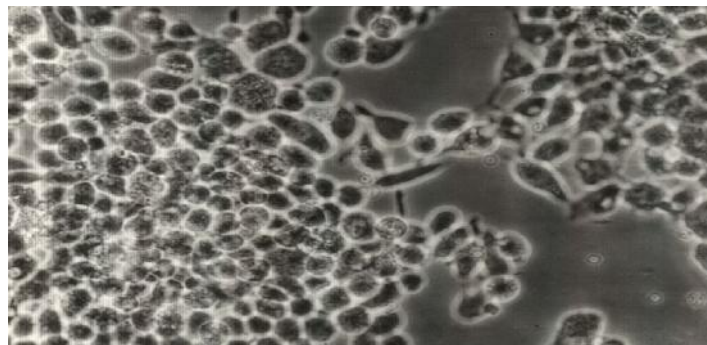
از ۸۰ سوش مورد مطالعه ۹ تا آگروتوکسین پروتئینی حساس به حرارت تولید کردند که سلول‌های لاین سلولی پس از مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره هجدهم / زمستان ۱۳۹۲

توزیع سوش های توکسین زا و غیر توکسین زا در جدول ۱ نشان می دهد از ۲۰ سوش قدیمی ۳ تا و از ۶۰ سوش جدید ۶ تا توکسین زا بودند و توکسین زائی در سوش های قدیمی احیاء شده و سوش های جدید اختلافی را نشان نمی دهد ($p=0/54$)

مجاورت با توکسین باکتری پس از ۲۴ ساعت دچار تغییر دیواره سلولی شده و حدود ۱۱٪ از سلول ها از حالت دوکی بصورت گرد درآمدند که نشانه خاصیت سیتوتوکسیسیته است (تصاویر ۱ و ۲). از سوش های توکسین زا ۴ تا شیگلا سونئی، ۴ تا شیگلا فلکسنری، یکی شیگلا دیساتنری است. سوش های شیگلا بوئیدی خاصیت توکسین زائی نداشتند.



تصویر ۱: سلول های HeLa قبل از مجاورت با توکسین باکتری



تصویر ۲: سلول های HeLa پس از مجاورت با توکسین باکتری

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوش های توکسین زا و غیرتوکسین زای ایزوله شده از نمونه های کلینیکی و ذخیره وجود نداشت. بالاترین میزان مقاومت در هر دو گروه مربوط به آمپی سیلین و تتراسایکلین بوده، و بالعکس به سفتری زوکسیم و سفیکسیم بیشترین حساسیت را داشته اند (جدول ۳).

با بررسی های انجام شده روی سوش های توکسین زا و علائم بالینی بیماران، مشاهده شد که در تمام بیماران آلوده با این نوع میکروب ها حالت تب و وجود خون در مدفوع از علائم اختصاصی آنها می باشد (جدول ۲). نتایج بدست آمده نشان داد که اختلاف معنی داری میان

جدول ۱: توزیع سوش های توکسین زا در میان سوش های ایزوله و ذخیره

P Value*	توکسین مثبت		توکسین منفی		نوع سوش
	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)	
۰/۵۴	۳	(۱۵)	۱۷	(۸۵)	سوش های ذخیره
	۶	(۱۰)	۵۴	(۹۰)	سوش های ایزوله
	۹	(۱۱/۲)	۷۱	(۸۸/۸)	جمع

*آزمون کای دو

جدول ۲: بررسی ارتباط خاصیت تخریب سلولی ایزوله های شیگلا با تب و خون مدفوع

شماره سوش ها	نوع سوش	ایجاد تب	وجود خون در مدفوع	تخریب سلولی
۲۳	شیگلا سوئی	+	+	+
۳۱	شیگلا دیسانتری	+	+	++
۳۳	شیگلا فلکسنری	+	+	+++
۵۶	شیگلا فلکسنری	+	+	+
۷۸	شیگلا فلکسنری	+	+	+
۸۰	شیگلا فلکسنری	+	+	+

جدول ۳: الگوی مقاومت آنتی بیوتیک در میان سوش های ایزوله و ذخیره

P Value	سوش ذخیره n=20		سوش ایزوله n=60		نوع آنتی بیوتیک
	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)	
>۰/۹**	۰	(۰)	۲(۳/۳)		سفیکسیم
=۰/۴۴**	۱(۵)		۸(۱۳/۳)		سیپروفلوکساسین
=۰/۷۲**	۲(۱۰)		۹(۱۵)		نالیدیکسیک اسید
=۰/۴۹*	۵(۲۵)		۲۰(۳۳/۳)		کانامایسین
=۰/۱۶*	۷(۳۵)		۳۲(۵۳/۳)		کلرام فنیکل
=۰/۱۰**	۱۴(۷۰)		۵۲(۸۶/۷)		آمپی سلین
=۰/۰۰۱*	۷(۳۵)		۴۵(۷۵)		کو تریمو کسازول
=۰/۰۰۱*	۸(۴۰)		۴۸(۸۰)		تتراسایکلین
=۰/۵۹**	۱(۵)		۱۰(۱۶/۷)		سفتریاکسون
>۰/۹**	۱(۵)		۵(۸/۳)		سفالوتین
>۰/۹**	۰	(۰)	۲(۳/۳)		سفتی زوکسیم
>۰/۹**	۱(۵)		۵(۸/۸)		توبرامایسین

*آزمون کای دو

**آزمون فیشر

بحث

انسانی هستند پوشیده نیست با وجود مطالعات زیادی که در

این زمینه صورت گرفته باز هم علل بسیاری از اسهال های

این مسئله که باکتری ها مهم ترین عامل در بروز اسهال های

ناشناخته باقی مانده است. اهمیت نسبی هر دسته از باکتری‌ها در وجود آوردن این عارضه در نقاط مختلف دنیا مهم است، چون جدا کردن میکروب‌های پاتوژن در بین میکروب‌های بیشمار موجود کار ساده‌ای نیست (۱). با توجه به این مسئله که یکی از عوامل عمده مرگ و میر اطفال در کشورهای در حال توسعه و حتی کشورهای پیشرفته را اسهال تشکیل می‌دهد و از طرف دیگر میزان مرگ و میر اطفال یک شاخص مهم بهداشتی است که از روی آن می‌توان بهداشت یک جامعه را ارزیابی نمود. بنابراین برای بهبود بهداشت و کنترل عوامل مولد اسهال برای کاستن میزان مرگ و میر اطفال و حتی بزرگسالان نیاز به مطالعه ارگانیزم‌های مولد اسهال است (۱۳ و ۴). مطالعات انجام شده در ایران نشان داده که با کشت مدفوع در ۳۵٪-۱۹ (بطور متوسط در ۲۵ درصد) از موارد اسهال می‌توان یک میکروب بیماری‌زا را جدا نمود (سالمونلا، شیگلا و پاتوژنیک E.coli) و تقریباً در ۷۵٪ از موارد اسهال نمی‌توان عامل میکروبی برای اسهال پیدا کرد (۱۶ و ۱۵ و ۸). در راستای اهداف بالا در این تحقیق بررسی تولید آگزوتوکسین پروتئینی از سوش‌های شیگلا و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها مورد نظر بوده است. فراوانی سوش‌های جمع آوری شده بدین صورت است:

$S. dysenteriae < S. boydii < S. sonnei < S. flexneri$
 که این نتایج هماهنگی کامل با بررسی‌های انجام شده توسط Murray و همکاران (۱۷) داشت، آنها عنوان کردند که در کشورهای در حال توسعه فراوانی *S. flexneri* و در کشورهای صنعتی فراوانی سوش *S. sonnei* بیشتر است. در مورد تولید آگزوتوکسین و اهمیت آن باید یادآور شویم که تا سال ۱۹۰۳ تصور می‌شد که فقط سوش‌های شیگلا دیسانتری نوع یک تولید آگزوتوکسین می‌کنند که ایجاد فلج عضو می‌کند که این توکسین‌های عمل‌کننده heat-labile هستند و با سولفات آمونیوم رسوب می‌کنند و بدینوسیله از گروه heat-stable جدا می‌شوند

(۱۹ و ۱۸ و ۱۱). Gyles توضیحاتی درباره ترشحات مایع توکسینی (۲۰) و تغییرات التهابی در روده خرگوش دارند (۲۱). سرانجام با خالص سازی شیگلا توکسین (۲۴-۲۲) و نقش این توکسین پروتئینی در تظاهرات بالینی بیماری مشخص شد و این واقعیت که آگزوتوکسین در واقع می‌تواند مسئول شدت بیماری شود پذیرفته شد (۲۵). در ادامه تحقیقات مشاهده شد که سوش‌های غیرشیگلا (غیر دیسانتری) شیگلا تولید توکسینی مشابه توکسین تولید شده توسط *S. dysenteriae* می‌کنند (۲۶ و ۲۷). در این مطالعه مشخص شد که شدت توکسین زائی و قدرت توکسین‌ها در سوش‌های مختلف متفاوت است و البته این نتیجه وقتی بیشتر مشخص شد که بطور همزمان سوش‌های توکسین‌زا را در لاین سلولی ایجاد شده در حفره‌های میکروتیتر تست شد و مشاهده شد که درصد تخریب سلول‌ها در شرایط یکسان یکی نیست و بیشترین میزان تخریب مربوط به سوش شماره ۳۳ یعنی شیگلا فلکسنری بود. در مورد استفاده از میکروتیتر نیز در انجام آزمایشات توکسین زائی نسبت به لوله حاوی لاین سلولی (۲۹ و ۲۸) نیز مزایای از جمله ایجاد شرایط همزمان و یکسان و سهولت کار مطرح است. موضوع قابل توجه دیگر این است که نتایج در مورد قدرت توکسین زائی در سوش‌های قدیمی احیاء شده و سوش‌های جدید و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا، اختلافی را نشان نداد ($P > 0.05$) و مشخص شد که بین دو فاکتور توکسین زائی سوش‌های ایزوله و ذخیره اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نتیجه اینکه سوش‌ها پس از احیاء در محیط بویون BHI خاصیت بیماری‌زائی و توکسین زائی و مقاومت خود را حفظ می‌کنند. Koh و همکاران در مالزی نشان دادند تمامی سوش‌های شیگلا به کانامایسین، سفتریاکسون و سپروفلوکساسین حساس بودند، در حالیکه سویه‌های ایزوله در تحقیق ما به این سه آنتی‌بیوتیک بترتیب ۳۳/۳٪، ۱۶/۷٪ و ۱۳/۳٪ مقاومت نشان دادند (۳۰).

یوکاریوت باعث تخریب سلول و نهایتاً گرد شدن سلول‌های دوکی شکل می‌شوند و با شمارش نسبی سلول‌های تخریب شده میزان تأثیر سیتوتوکسین‌ها بررسی می‌شود. همچنین توکسین‌ها را بدون و یا بدون سوش‌های شیگلا، تأثیری بر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها ندارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۲۹۴۱ مورخ ۹۰/۲/۱۳ می‌باشد.

همچنین بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین با ۶۷/۵٪، تتراسایکلین با ۴۰٪ و کوتریموکسازول با ۳۷/۵٪ بدست آمد. در حالیکه نتایج بالاترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین با ۸۰٪ و کوتریموکسازول با ۷۵٪ نشان داد. بعلاوه مشاهده شد که تفاوتی میان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های ایزوله و سوش‌های ذخیره وجود ندارد.

نتیجه گیری

در کل تکنیک کشت سلولی روشی مناسب و تأیید شده برای اندازه‌گیری آگروتوکسین‌های سیتوتوکسیک می‌باشد. این سیتوتوکسین‌ها با مهار سنتز پروتئین‌های سلول‌های

References

1. www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004.
2. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, and et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999; 77:651-66.
3. Center for Disease Control and Prevention. National antimicrobial resistance monitoring system for enteric bacteria: Human isolates final report 2004. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention (US), Department of Health and Human Services; 2007.
4. Soltan Dallal MM. Bacterial diarrheal infections and mechanisms of their pathogenicity. Nabz 1995;5:48-52.
5. Gunnar N Schroeder, Hubert Hilbi. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microb 2008; 21: 134-156.
6. Sack DA, Lyke C, McLaughlin C, Suwanvanichkij V. Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. WHO/CDS/CSR/DRS/ 2001;8:21-30.
7. Barari Savadkoochi R, Kachu Ahmadpur M. Prevalence of shigella strains and microbial resistance patterns in pediatric hospitals generally Amir Cola - Northern Iran. Iran J Pediatr 2007; 17:118-122.
8. Moezardalan K, Zali MR, Soltan- Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of shigella species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2003; 21:96-102.
9. Soltan Dallal MM, Ranjbar R, Pourshafie MR. The study of antimicrobial resistance among shigella flexneri strains isolated in Tehran, Iran. J Pediatr Infec Dis 2011; 6:125-129.
10. Baron EJ, Feingold SM. 1990, Methods for identification of etiologic agents of infectious diseases In: Baily and Scott's diagnostic microbiology. 8th ed. Mosby Company: USA, 1990. p. 363-81.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Fifteen Information Supplement. 2005; 25: 15-100.
12. Donta TA. Detection of heat labile E coli enterotoxin with the use of adrenal cell in tissue culture. Science 1976; 183: 334-336.

13. Prado D, Cleary TG, Pickering LK, Ericsson CD, Bartlett AV, Dupom H L and et al. The relationship between production of cytotoxin and clinical features in Shigellosis. *The Journal of Infection Disease* 1986; 154:149-154.
14. Gizachew Y, Challa N, Afework K. A five-year antimicrobial resistance pattern observed in shigella species isolated from stool samples in Gondar University Hospital, northwest Ethiopia. *Ethiop J Health Dev* 2006;20:194-198.
15. Soltan Dallal MM, Khorramizadeh MR, Moezardalan K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2006 ;12:792-797.
16. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. *Jpn J Infect Dis* 2008;61: 269-273.
17. Murray PR, Rosenthal KR, Pfaller MA. Enterobacteriaceae In: *Medical microbiology*. 6th ed. 2009.P.301-316.
18. Niyogi SK, Vargas M, Vila J. Prevalence of the sat, set and sen genes among diverse serotypes of shigella flexneri strains isolated from patients with acute diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:574-576.
19. 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;37:3608-3611.
20. Gyles CL. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *J Anim Sci* 2007;85:E45-62.
21. Kadaoui KA, Corthésy B. Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J Immunol* 2007; 179:7751-7757.
22. Kozlov YV, Chernaiia MM, Fraser ME, James MN. Purification and crystallization of Shiga toxin from Shigella dysenteriae. *J Mol Biol* 1993 20;232:704-706.
23. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of Shigella dysenteriae type 1 like cytotoxin by E coli. *J Infect Dis* 1982, 146: 763-769.
24. Olsnes S, Eiklid K. Isolation and characterization of Shigella Shigae Cytotoxin. *J Biol Chem* 1980; 225: 284-9.
25. Cimolai N, Trombley C. Low frequency of high level Shiga-like toxin production in enteropathogenic Escherichia coli O serogroups. *Eur J Pediatr* 1992;151:147.
26. Niyogi SK, Vargas M, Vila J. Prevalence of the sat, set and sen genes among diverse serotypes of Shigella flexneri strains isolated from patients with acute diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:574-576.
27. Farfán MJ, Garay TA, Prado CA, Filliol I, Ulloa MT, Toro CS. A new multiplex PCR for differential identification of Shigella flexneri and Shigella sonnei and detection of Shigella virulence determinants. *Epidemiol Infect* 2010;138:525-33.
28. Gentry MK, Dalrymple JM. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *Journal of Clinical Microbiology* 1980; 12: 361-366.
29. Bouzari S, Varghese A. Cytolethal distending toxin (CLDT) production by enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *FEMS Microbiol Lett* 1990;59:193-198.
30. Koh XP, Chiou CS, Ajam N, Watanabe H, Ahmad N, Thong KL. Characterization of Shigella sonnei in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. *BMC Infect Dis* 2012;12:122.