

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، تعیین الگوی پلاسمیدی، پروتئینی و فنوتیپ تهاجمی در بین شیگلا فلکسنری

دکتر جمیله نوروزی^۱، دکتر بهرام کاظمی^۲، دکتر مژده حاکمی والی^۳

۱- استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیشناسی، (مؤلف مسئول) J_nowroosi@yahoo.com

۲- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی

۳- دکترای میکروبیشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

خلاصه

زمینه و هدف: شیگلوزیس نوعی بیماری حاد گوارشی است که توسط گونه‌های مختلف شیگلا (شیگلا دیسانتریه، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونه‌ای و شیگلا بوئیدی) ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی، تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، الگوی پلاسمیدی، پروتئینی (به کمک روش SDS-PAGE) و فنوتیپ تهاجمی در بین شیگلا فلکسنری‌های جدا شده بر اساس آزمون توانایی اتصال به رنگ کنگو رد بوده است.

روش بررسی: باکتری‌های مورد مطالعه بر اساس روش‌های استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. تست تعیین مقاومت دارویی بر اساس روش Kirby-Bauer انجام شد. استخراج پلاسمید، با روش متلاشی شدن قلبایی انجام گرفت. واکنش‌های سرولوژیکی بر اساس آگلوتیناسیون روی لام هم با آنتی‌سرم مونوکلونال و هم با آنتی‌سرم پلی کلونال تعیین شد. سویه‌های مهاجم بر اساس توانایی اتصال به رنگ کنگو رد موجود در محیط TSA مشخص شدند.

یافته‌ها: از ۳۵۰ گونه شیگلای جدا شده، ۱۴۲ مورد (۴۰/۵۷٪) مربوط به شیگلا فلکسنری بود. تعداد افراد مؤنث و مذکر به ترتیب ۴۱ و ۵۹٪ بوده است. از ۱۰۰ باکتری مورد بررسی، ۹۵٪ به تراسایکلین، ۹۱/۳٪ به آمپی‌سیلین، ۸۶٪ به کوتریموکسازول و ۷۰/۳٪ به سفالکسین، مقاوم بودند. همه باکتری‌های مورد آزمایش به سیروفلوکساسین حساسیت نشان دادند. اکثر سویه‌ها دارای نوارهای پلاسمیدی متعدد از ۱ تا ۵ نوار پلاسمیدی بوده‌اند. به طور کلی، ۱۱ الگوی پلاسمیدی در شیگلا فلکسنری‌های جدا شده در این تحقیق مشخص شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سروتیپ ۲، شایعترین سروتیپ شیگلا فلکسنری جدا شده (۳۹٪) بوده است. بر اساس نتایج این مطالعه، ۴۶٪ از سویه‌های شیگلا فلکسنری جدا شده کلنی‌های کنگو رد مثبت داشته و دارای همولیز کامل روی محیط خوندار بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: خصوصیات تهاجمی همه سویه‌های شیگلا فلکسنری یکسان نیست. ضمن رعایت نکات بهداشتی جهت پیشگیری از بیماری اسهال ناشی از باکتری‌ها از جمله شیگلا پیشنهاد می‌گردد که آزمایشگاهها در جداسازی این باکتری توجه بیشتری کنند. در ضمن، برای شناسایی سویه‌های بیماریزا از غیر بیماریزا، از تست کنگو رد که ساده، ارزان و سریع است استفاده شود. انجام آزمایش آنتی بیوگرام به منظور جلوگیری از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: شیگلا فلکسنری، الگوی پلاسمیدی، باندهای پروتئینی، فنوتیپ تهاجمی

وصول مقاله: ۸۴/۱۲/۲۳ اصلاح نهایی: ۸۵/۸/۸ پذیرش مقاله: ۸۵/۸/۹

مقدمه

بیماری شیگلوزیس، نوعی بیماری حاد گوارشی است که در بیشتر موارد به صورت اسهال خونی بروز کرده و توسط هر ۴ گونه شیگلا ایجاد می‌شود (۴-۱). مطالعات انجام شده بر روی داوطلبین نشان داد که ورود تعداد بسیار کمی از این باکتری (۱۰ تا ۱۰۰) به بدن موجب بیماری می‌گردد (۵، ۱). این بیماری در بالغین سالم خود بخود بهبود می‌یابد در حالیکه در نوزادان و کودکان بسیار خطرناک بوده و می‌تواند به مرگ منتهی گردد (۶).

بیماری شیگلوز در جهان اندمی می‌باشد و حدود ۱۶۴/۷ میلیون مورد از این بیماری هر سال در جهان رخ می‌دهد که از این تعداد، ۱۶۳/۲ میلیون مورد مربوط به کشورهای در حال توسعه و ۱/۵ میلیون مورد مربوط به کشورهای صنعتی می‌باشد (۸، ۷). تعداد مرگ سالانه این بیماری در جهان ۶۰۰/۰۰۰ مورد می‌باشد که دو سوم آنها در کودکان کمتر از ۵ سال رخ می‌دهد (۵، ۱). شیگلا فلکسنری سروتپ 2a، گونه غالب شیگلا در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران بوده و شیگلا سونه‌ای، گونه غالب شیگلا در کشورهای صنعتی می‌باشد (۶، ۵).

باکتری‌های مهاجم توانائی نفوذ به سلول‌های اپی‌تلیال را هم در شرایط *in vivo* و هم در شرایط *in vitro* دارند (۲). پس از ورود این باکتری‌ها به میزبان، واکنش‌های متعددی شروع می‌شود که استقرار بیماری به آنها بستگی دارد (۹). برای مثال، باکتری باید بتواند با سیستم ایمنی و مکانیسم‌های مختلف آن مبارزه کرده و در برابر باکتری‌های فلور طبیعی مقاومت نماید (۲). از میان باکتری‌های مهاجم، شیگلا فلکسنری مسئول سندرم اسهال خونی در انسان می‌باشد (۱۱، ۱۰). توانایی نفوذ این

باکتری‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال به محصول قطعه ۲۰ کیلو بازی از پلاسمید بزرگ تهاجمی آن (220 kb) بستگی دارد (۴، ۱). وجود چنین خصوصیتی در باکتری‌های بی حرکتی مانند شیگلا فلکسنری، ویژگی قابل توجهی بوده و به وجود پروتئین تهاجمی ۱۲۰ کیلو دالتونی VirG یا IcsA (محصول ژن *icsA*) بستگی دارد (۱). در دهه ۱۹۸۰، تحقیقات گسترده‌ای در تشخیص و تعیین مراحل مختلف زندگی درون سلولی این باکتری‌ها انجام گرفته است، اما در سالهای اخیر با پیشرفت بهداشت در کشورهای توسعه یافته، تاکید کمتری بر جداسازی این باکتری‌ها می‌شود. این در حالی است که در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران و تایوان هنوز کودکان بسیاری در اثر آلودگی به این باکتری‌ها جان خود را از دست می‌دهند (۱۱، ۱۲، ۱۳). هدف از این تحقیق، جداسازی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تعیین الگوی پلاسمیدی، پروتئینی و فنوتیپ تهاجمی به کمک آزمون کنگو رد در شیگلا فلکسنری‌های جدا شده در تهران بوده است.

روش بررسی

در اجرای این مطالعه توصیفی مراحل زیر انجام شد. جداسازی باکتری: سویه‌های شیگلا فلکسنری از مدفوع کودکان مراجعه‌کننده به سه بیمارستان کودکان تهران (مفید، علی اصغر و مرکز طبی کودکان) از دی ماه ۱۳۸۱ تا آذر سال ۸۲ جدا گردید. شناسایی باکتری‌ها با روش‌های استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی انجام گرفت (۱۲) و سپس سویه‌های شیگلا فلکسنری در محیط گلیسرول و پپتون در 70°C جهت انجام آزمایش‌های بعدی ذخیره شدند. سویه‌های استاندارد شیگلا فلکسنری 2a، ۱، ۶ نیوکاسل از مرکز تحقیقات

تعیین فنوتیپ تهاجمی بر اساس توانائی اتصال به رنگ کنگو رد و تولید همولیزین: تعیین فنوتیپ تهاجمی در بین سویه‌های شیگلا فلکسنری به کمک توانائی اتصال به رنگ کنگو رد انجام شد. بدین منظور به محیط (Tryptic Soy Agar) به میزان ۰/۰۰۳٪ رنگ کنگو رد اضافه شد. وجود کلنی‌هایی با پیگمان قرمز، نشانه‌ای از فنوتیپ تهاجمی (کنگو رد مثبت) و بروز کلنی‌های سفید، نشانه‌دهنده فنوتیپ غیر تهاجمی (کنگو رد منفی) بود (۱۵). در ضمن همولیز تمام باکتریهای جدا شده روی محیط خوندار بررسی شد.

استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید در این باکتری‌ها به روش متلاشی شدن قلبی انجام گرفت (۲، ۱۶، ۱۷، ۱۹). در این روش، یک کلنی از باکتری را برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط BHI برات Brain Heart (Infusion broth) کشت داده و به مدت یک شب در گرمخانه °C ۳۷ شیکردار نگهداری شد. سپس سلول‌ها با افزودن SDS و هیدروکسید سدیم (NaOH) متلاشی شدند. پروتئین‌ها با افزودن محلول ۱/۱ فنل/کلروفورم رسوب داده شدند. DNA پلاسمیدی در اتانول مطلق و سپس اتانول ۷۰٪ رسوب داده و در بافر TE حل گردید. به منظور مشاهده نوارهای پلاسمیدی، DNA استخراج شده در ژل آگاروز ۰/۸٪ و در حضور بافر TAE الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۵ μg/ml رنگ شد و در حضور نور UV بررسی گردید. عکسبرداری توسط دستگاه gel document انجام گرفت.

استخراج پروتئین و انجام روش SDS-PAGE: در این فرآیند، یکبار سوسپانسیون باکتریایی در 30mM Tris-HCl (pH 8.1) و یکبار در مخلوط ساکاروز ۲۰٪/30 mM HCl Tris (pH 8.1) و لیزوزیم تهیه شد. سپس

شرکت بهار افشان و آزمایشگاه رفرانس تهران تهیه شدند.

تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی: آزمون تعیین حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش Kirby-Bauer بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت (۱۳). در این تحقیق از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، اسید نالیدیکسیک، جنتامیسین، تری متوپریم-سولفومتوکسازول، سفالوتین، تتراسایکلین، کانامایسین، آمیکاسین، آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین استفاده شد.

تعیین سروتیپ سویه‌های شیگلا فلکسنری جدا شده: تعیین سروتیپ در بین شیگلاهای جدا شده به دو صورت انجام گرفت. در بررسی اول به کمک آنتی سرم پلی کلونال (شرکت بهار افشان)، گونه فلکسنری (گروه B) با روش آگلوتیناسیون روی لام تعیین شد. در بررسی دوم با استفاده از آنتی‌سرم مونوکلونال گروه سرولوژیکی ۲ (II) [شرکت Mast]، تیپ ۲ سرولوژیکی بر اساس آگلوتیناسیون روی لام تعیین گردید.

به منظور انجام بررسی‌های سرولوژیکی، طبق دستور کیت در ابتدا باکتری‌ها روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و بعد از ۱۸ ساعت، آزمون آگلوتیناسیون روی لام انجام گرفت. بر روی هر لام تمیز، در ابتدا ۲ قطره از سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ استریل قرار داده شد. سپس در یکی از قطره‌ها، سوسپانسیون غلیظی از هر سویه تهیه شد. یک قطره از آنتی‌سرم مونووالان و یا پلی‌والان مطابق دستور کارخانه سازنده آن، روی سوسپانسیون باکتریایی ریخته شد و پس از مخلوط کردن آنها در عرض یک دقیقه، وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون در زیر نور غیر مستقیم بررسی گردید.

تعیین الگوی پلاسمیدی: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این باکتریها دارای ۱ الی ۵ نوار پلاسمیدی با وزن مولکولی متفاوت از ۰/۵۶۴ تا ۲۱/۲۲۶ کیلو باز بوده و الگوهای پلاسمیدی متفاوتی را ایجاد کردند. در برخی از سویه‌ها، نوارهای پلاسمیدی با وزن مشابه دیده شد به طوریکه در اکثر سویه‌ها (۸۲٪) نوار پلاسمیدی ۲۱/۲۲۶ کیلو باز وجود داشت. در این مطالعه، ۱۱ الگوی پلاسمیدی با تمرکز بر نوارهای پلاسمیدی واضح شناسایی گردید (شکل ۲ و جدول ۱).

تعیین سروتپ: نتایج حاصل از بررسی‌های بیوشیمیایی با آزمون آگلوتیناسیون روی لام تایید شدند. در این مطالعه، سروتپ‌های مختلفی از شینگلا فلکسنری بدست آمد، اما سروتپ ۲ به دلیل واکنش با آنتی‌سرم مونوکلونال ۲ (Mast ۲ [a, b])، شایعترین سروتپ (۳۹٪) گزارش گردید.

تعیین فنوتیپ تهاجمی با آزمون توانایی اتصال به رنگ کنگو رد: در این مطالعه، ۴۶٪ از شینگلا فلکسنری‌های جدا شده بر روی محیط TSA حاوی ۰/۰۰۳٪ کنگو رد، دارای کلنی‌های کنگو رد مثبت (قرمز رنگ) بوده‌اند (شکل ۳). همولیز کلیه باکتری‌های کنگو رد مثبت (۱۰۰٪) روی محیط خوندار به صورت همولیز کامل (بتا همولیز) بوده است.

SDS-PAGE: از ۱۰۰ باکتری شینگلا فلکسنری مورد آزمایش، در ۴۶ مورد (۴۶٪)، باند ۱۲۰ کیلو دالتونی که احتمالاً مربوط به پروتئین IcsA می‌باشد، جدا گردید. وزن باندهای پروتئینی جدا شده از ۳۰ کیلو دالتون تا ۱۵۰ کیلو دالتون متفاوت بوده است. به طور کلی، ۱۲ الگوی پروتئینی تعیین شد که جزئیات آن در جدول ۲ و شکل ۴ مشخص شده است.

3mM EDTA pH 7.3 به آن اضافه شد و بعد از سانتریفوژ، رسوب در بافر 0.25M و SDS 2ml، و 1×LuG [Tris-HCl (pH: 6.8) 50ml, Glycerol 2g]، β مرکاپتواتانول ۵ ml، ۱٪ برموفنل بلو ۲M، آب مقطر ۱۰۰ml حل گردید (۱۹,۲۰). پس از مراحل آماده سازی، مخلوط پروتئینی در ژل پلی آکریل آمید بیس آکریل آمید، TEMED، آمونیوم پرسولفات الکتروفورز شد. ژل با رنگ کوماسی بلو R 250 رنگ و با مخلوط اتانول و اسید استیک بی‌رنگ گردید. وزن باندهای پروتئینی حاصل و بویژه باند ۱۲۰ کیلو دالتونی که احتمالاً مربوط به پروتئین IcsA می‌باشد، در حضور مارکر پروتئینی (Page Ruler Tm#SM0661, Fermentas) تعیین شدند. در این تحقیق، ۳۵۰ گونه شینگلا جدا شد که از این تعداد ۱۴۲ مورد مربوط به شینگلا فلکسنری بود. ۱۰۰ نمونه شینگلا فلکسنری جدا شده جهت بررسی در این مطالعه به طور تصادفی انتخاب شدند.

یافته‌ها

در این بررسی ۴۱٪ از بیماران دختر و ۵۹٪ پسر بوده و دامنه سنی آنها از ۶ ماهه تا ۷ ساله متغیر بوده است.

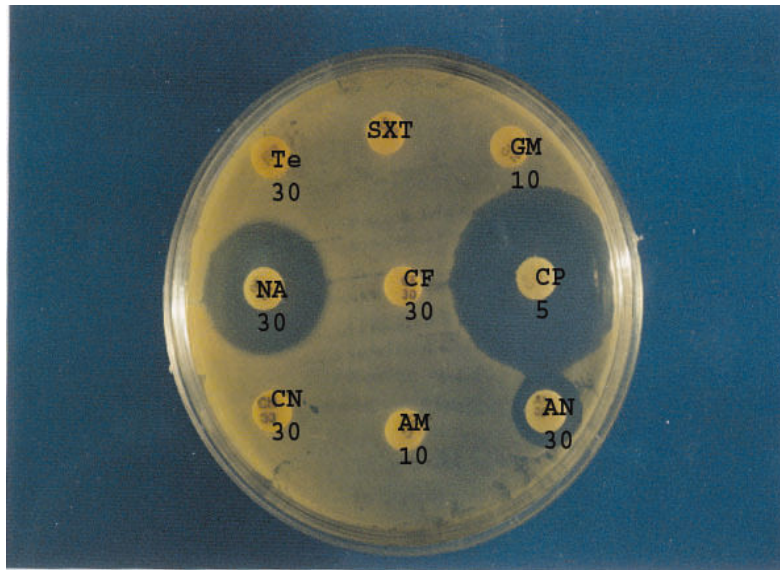
مقاومت داروئی: از ۱۰۰ باکتری شینگلا فلکسنری جدا شده، ۹۵٪ به تتراسایکلین، ۹۱٪ به آمپی‌سیلین، ۸۶٪ به تری متوپریم- سولفا متوکسازول، و ۷۰/۳٪ به سفالکسین مقاوم بوده‌اند. ۵۶/۷٪ از سویه‌ها دارای مقاومت چند داروئی به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، تری متوپریم- سولفو متوکسازول و سفالکسین بوده و همگی به سیپروفلوکساسین حساس بوده‌اند (شکل ۱).

جدول ۱: الگوی پلاسمیدی حاصل از شیگلا فلکسنری های جدا شده از کودکان تهران ۱۳۸۱-۱۳۸۲

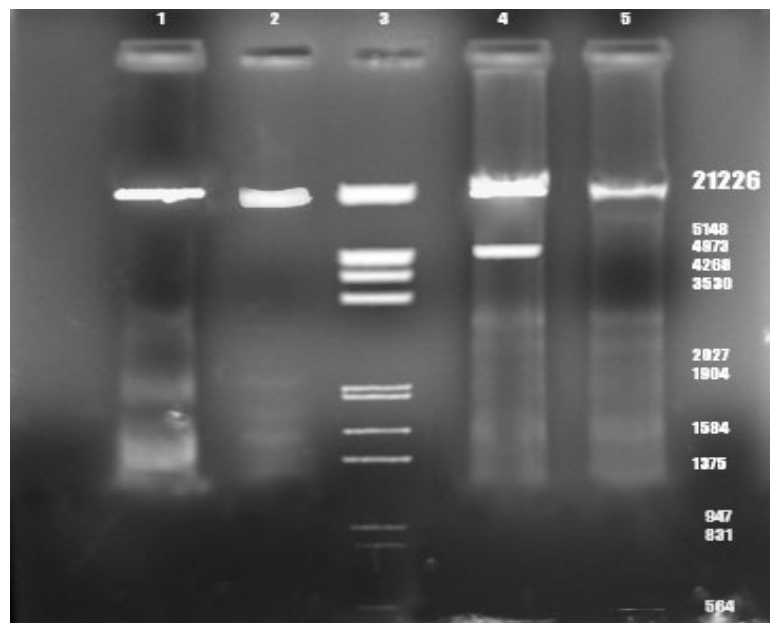
گروههای پلاسمیدی	نوارهای پلاسمیدی (کیلو باز)								
	٪	۰/۵۶۴	۰/۸۳۱	۰/۹۴۷	۱/۳۷۵	۲/۰۲۷	۳/۵۳۰	۵/۱۴۸	۲۱/۲۲۶
I	۳/۵	-	-	+	+	+	+	-	+
II	۱/۷۵	-	-	-	+	-	-	+	+
III	۱/۷۵	-	-	-	-	-	-	+	+
IV	۳/۵	-	-	-	+	+	+	+	+
V	۱/۷۵	-	-	-	+	+	-	+	+
VI	۳/۵	-	-	+	-	+	-	-	+
VII	۱/۷۵	+	-	-	-	+	+	-	+
VIII	۱/۷۵	-	-	-	+	+	+	-	+
IX	۱/۷۵	+	-	-	-	-	-	-	+
X	۶۱/۴۰	-	-	-	-	-	-	-	+
XI	۱۷/۶	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۲: الگوی پروتئینی بدست آمده برای شیگلا فلکسنری های جدا شده از کودکان تهران ۱۳۸۱-۱۳۸۲

گروهها	باندهای پروتئینی									درصد باکتری
	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۵	۱۰۰	۱۲۰	۱۵۰	
I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	۲۰/۶
II	+	+	+	-	-	-	-	-	-	۱۶/۳
III	+	+	+	+	+	+	+	-	-	۱۳/۲
IV	+	+	+	+	+	+	-	-	-	۹/۵
V	+	+	+	+	-	-	-	-	-	۴/۴
VI	+	+	+	+	+	+	+	+	-	۱۷
VII	+	+	+	+	+	-	-	-	-	۳/۲
VIII	+	+	-	-	-	-	-	-	-	۷/۴
IX	-	-	-	-	-	-	+	+	-	۳/۷
X	+	+	+	+	-	-	-	+	-	۱/۲
XI	+	+	+	+	+	+	-	+	-	۳/۵
Total										۱۰۰



شکل ۱: نتیجه آنتی‌بیوگرام یک سویه شیگلا فلکسنری جدا شده از کودکان تهران ۱۳۸۱-۱۳۸۲

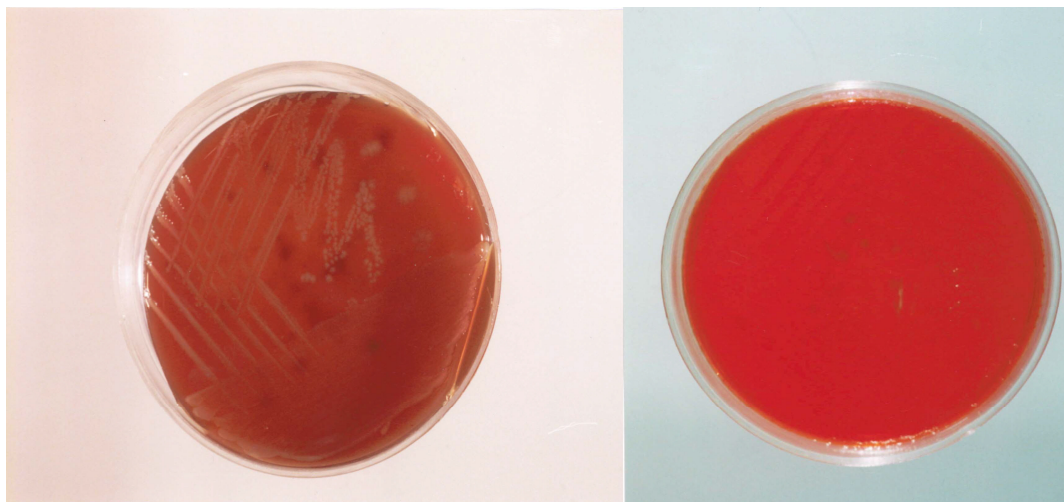


شکل ۲: نوارهای پلاسمیدی مشاهده شده در بعضی از شیگلا فلکسنری‌های جدا شده از کودکان تهران ۱۳۸۱-۱۳۸۲

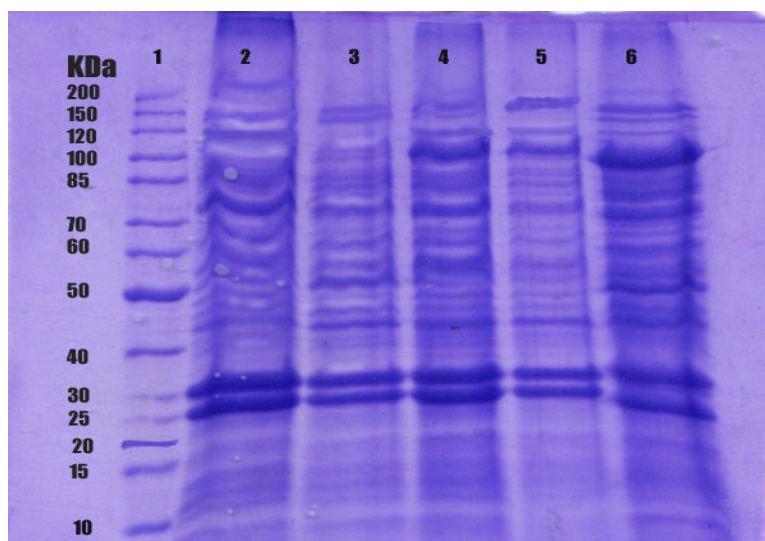
۱ و ۲- شیگلا فلکسنری جدا شده از نمونه کلینیکی

۳- مارکر DNA

۴- شیگلا فلکسنری استاندارد 2a



شکل ۳: کلنی‌های قرمز (الف) و سفید (ب) شیگلا فلکسنری پس از کشت در محیط TSA حاوی 0.003% کنگورد



شکل ۴: SDS-PAGE انجام شده بر روی شیگلا فلکسنری های جدا شده از کودکان تهران ۱۳۸۱-۱۳۸۲

۱- مارکر پروتئینی

۲، ۳، ۴، ۵، ۶- شیگلا فلکسنری های دارای باند ۱۲۰ کیلو دالتونی جدا شده از نمونه های کلینیکی

بحث

شد. فراوانی گونه‌های آن به ترتیب شامل: شیگلا فلکسنری (۷/۵٪) شیگلا سونه‌ای (۵/۲٪)، شیگلا دیسانتری (۲/۶٪) و شیگلا بوئیدی (۱/۵٪) بودند (۱۸).

مطالعه‌ای که در منطقه کرج- تهران توسط معز اردلان و همکاران انجام گرفت، از ۷۳۴ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال حاد، ۱۲۳ شیگلا (۱۶/۸٪) جدا

بوده‌اند (۶). بین میزان مقاومت شیگلا فلکسنری به تتراسایکلین، آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین و اسید نالیدیکسیک در این مطالعه با مطالعات Sang-kee تشابه وجود دارد. اگرچه در میزان مقاومت به SXT در این دو بررسی، تفاوت مشاهده می‌شود که این امر ممکن است به علت تفاوت منطقه جغرافیایی و یا مقدار مصرف این دارو باشد.

Kaisar و همکارانش در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۱ انجام گرفت، نشان دادند که ۴۲٪ از شیگلا فلکسنری‌های جدا شده به سه آنتی‌بیوتیک رایج یعنی آمپی سیلین، تتراسایکلین و تری متوپریم-سولفومتوکسازول مقاوم بوده‌اند (۲). در مطالعه پیش رو ۵۶/۷٪ از سویه‌ها دارای مقاومت همزمان به سه آنتی‌بیوتیک رایج بوده که با نتایج این محققین شباهت دارد.

Sang-kee و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند، در ۳۳ مورد شیگلا فلکسنری جدا شده، ۱۱ الگوی پلاسمیدی وجود داشت (۶). به علاوه شیگلا فلکسنری ATCC9403 دارای ۲ بانده پلاسمیدی ۱۸ و ۱/۷ کیلو بازی بود. این یافته نیز با نتایج حاصل از این تحقیق مشابه می‌باشد به طوری که، ۱۱ الگوی پلاسمیدی در شیگلا فلکسنری‌های جدا شده در تهران مشاهده شد. به علاوه، شیگلا فلکسنری ۲a استاندارد که از آزمایشگاه رفرانس تهران و شرکت بهار افشان تهیه شدند نیز دارای ۲ نوار پلاسمیدی ۵/۱۴۸ و ۲۱/۲۲۶ کیلو بازی بودند که تفاوت وزن نوارهای پلاسمیدی، مربوط به تفاوت در سویه‌های استاندارد مورد بررسی می‌باشد. بعلاوه بین دامنه وزنی پلاسمیدهای جدا شده در این مطالعه (از ۰/۵۶۴ تا ۲۱/۲۲۶ کیلو باز) و مطالعه Sang-kee (از ۰/۸ تا ۲۳ کیلو باز) شباهت وجود داشته و نوار

از ۸۱۰ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال خونی مراجعه‌کننده به بیمارستان آموزشی دانشگاه Jos، باکتری شیگلا فلکسنری، بیشترین گروه سرولوژیکی جدا شده (۴۸٪) را تشکیل داد (۱۷). یافته‌های مطالعه حاضر به همراه نتایج حاصل از مطالعات مورد اشاره نشان می‌دهد که شیگلا فلکسنری، شایعترین گونه در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است و با توجه به اهمیت آن در این تحقیق شیگلا فلکسنری مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت. بعلاوه در مطالعه حاضر تعداد پسران ۵۹٪ و تعداد دختران ۴۱٪ و نسبت مردان به زنان (۱،۴/۱) بوده است. در مطالعه دانشگاه Jos نیز نسبت مردان به زنان (۱،۳/۱) گزارش شده که با نتیجه حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. در ضمن، در دانشگاه Jos، از ۳۳ شیگلا فلکسنری جدا شده بجز یک سویه که نسبت به همه آنتی‌بیوتیکها حساس بود، سایر سویه‌ها حداقل نسبت به ۶ دارو مقاوم بوده و حتی بنظر رسید که دارای مقاومت چند دارویی بوده‌اند (۱۷). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت به آمپی سیلین (۹۱/۳٪) و به SXT (۸۶٪) گزارش شد که با نتایج آنها (مقاومت به آمپی سیلین ۹۶٪ و SXT ۸۸٪) شباهت دارد. تفاوت در مقاومت به Te (۹۵٪) در این مطالعه نسبت به ۷۵٪ در مطالعه فوق، ممکن است مربوط به تفاوت در الگوی مصرف این دارو در بین دو کشور باشد.

Sang-kee و همکاران نشان دادند که مقاومت باکتری شیگلا به کربنی سیلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، آمپی سیلین و تیکارسیلین (۱۰۰٪)، به کوتریموکسازول (۳۹/۳٪) و به اسید نالیدیکسیک (۶٪) بوده است. به علاوه کلیه سویه‌ها به سفالوتین، کلی ستین، کانامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین و سفوتاکسیم حساس

رد بوده‌اند. Maurelli در مطالعه خود، ارتباطی را بین خصوصیات تهاجمی شیگلا فلکسنری ۲a و توانایی آنها در اتصال به رنگ کنگو رد نشان داد (۱۳).

از ۲۱ شیگلا فلکسنری سروتیپ ۴ جدا شده در Dhaka بنگلادش، همگی دارای پلاسمید تهاجمی MDa ۱۴۰ بوده و توانایی اتصال به رنگ کنگو رد را داشتند و کلنی‌های قرمز رنگی را ایجاد کردند. از طرف دیگر، تست سرنی در همگی آنها مثبت بوده است (۱۷). در نتایج SDS-PAGE حاصل از این بررسی، در ۴۶ مورد (۴۶٪)، باند پروتئینی ۱۲۰ کیلو دالتونی مشاهده شد. در ضمن، شیگلا فلکسنری ۲a استاندارد و تمام باکتریهای جدا شده از بیماران که دارای این باند پروتئینی بودند همگی فنوتیپ کنگو رد مثبت را از خود نشان دادند که با نتایج بدست آمده از بنگلادش مطابقت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که هر ۴۶٪ از سویه های کنگو رد مثبت شیگلا فلکسنری دارای همولیز کامل در محیط بلادآگار بودند و از طرف دیگر در همین سویه‌ها نوار پروتئینی ۱۲۰ کیلو دالتونی نیز مشاهده شد، پس می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً خصوصیات بیماری‌زایی همه سویه‌های شیگلا فلکسنری یکسان نمی‌باشد. اگرچه نتیجه‌گیری قطعی نیازمند مطالعات بعدی از جمله استفاده از کشت سلولی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که در کشور ما، مرگ به علت گونه‌های مختلف شیگلا بویژه شیگلا فلکسنری رخ می‌دهد (۱۱)، بنابراین، ضمن رعایت نکات بهداشتی جهت جلوگیری از بیماری اسهال ناشی از باکتریها از جمله شیگلا توصیه می‌گردد که در جداسازی این باکتریها، علاوه بر آزمایشگاههای بیمارستانهای دولتی کودکان بلکه

پلاسمیدی ۲۱/۲۲۶ در این تحقیق در مقایسه با نوار پلاسمیدی ۱۸ کیلو بازی مطالعه فوق در بین همه الگوهای پلاسمیدی مشترک بوده است.

در ۴۵ شیگلا فلکسنری جدا شده در مطالعه Chien-shun chiou، سه باند کوچک با وزن مولکولی ۳/۲ کیلو باز تا ۷ کیلو باز مشاهده شد. پلاسمید ۳/۲ کیلو باز در بین هر ۵ الگوی پلاسمیدی مشترک بوده است (۱). در مطالعه دیگری، ۷ گروه پلاسمیدی در شیگلا فلکسنری‌های جدا شده گزارش شد و ۲ الی ۵ باند پلاسمیدی در هر گروه وجود داشت که وزن مولکولی آنها از ۱/۵ تا ۷ کیلو باز متفاوت بوده است (۱۹,۲۰). باند پلاسمیدی ۱/۴ کیلو بازی در ۴۰ مورد (۵۴٪) و باند پلاسمیدی ۳/۲ کیلو بازی در ۵۷ مورد (۷۷٪) مشاهده شد. در ۱۷ مورد از شیگلا فلکسنری‌های جدا شده هیچگونه باند پلاسمیدی مشاهده نشد (۲۰). در این مطالعه نیز در ۱۸ مورد (۱۸٪) هیچگونه باند پلاسمیدی مشاهده نشد که با نتیجه حاصل از تحقیق Chien-shun chiou منطبق می‌باشد. بعلاوه نوار پلاسمیدی ۲۱/۲۲۶ در مقایسه با باند ۳/۲ کیلو بازی در ۸۲٪ از نمونه‌ها وجود داشت. در بررسی‌های سرولوژیکی نیز، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شیگلا فلکسنری سروتیپ ۲، بیشترین سروتیپ (۳۹٪) جدا شده می‌باشد. این نتایج با مطالعات Chien-chiou و Vasilev که سروتیپ ۲a شیگلا فلکسنری را بیشترین سروتیپ جدا شده گزارش کردند مطابقت دارد (۲۱, ۱).

توانایی گونه‌های مختلف شیگلا در اتصال به رنگ کنگو رد موجود در محیط، معمولاً با خصوصیات تهاجمی آنها وابسته می‌باشد. در این مطالعه، ۴۶٪ از شیگلا فلکسنری‌های جدا شده دارای کلنی‌های کنگو رد مثبت روی محیط TSA حاوی ۰/۰۰۳٪ رنگ کنگو

بهداشت- دانشگاه تهران که در تهیه سویه‌های میکروبی کمک بسیاری نمودند، تشکر گردد. همچنین از خانم‌ها نرگس نفیسی و خانم عابدینی و کیانا میرسعیدی مسئولین بخش میکروبیشناسی بیمارستان مفید، طبی کودکان و علی اصغر نیز که در تهیه نمونه‌های میکروبی همکاری بیدریغ نمودند تشکر می‌گردد. به علاوه، این تحقیق قسمتی از پایان نامه خانم مژده حاکمی والا دانشجوی Ph.D. باکتری شناسی بوده که در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده و بدین وسیله از مسئولین محترم این مرکز نیز بویژه آقای دکتر نورمحمدی و دکتر کرباسیان و خانم بخشایش کمال تشکر را داریم.

آزمایشگاهی خصوصی تاکید بیشتری شود. به علاوه، چون آزمون اتصال به رنگ کنگو رد، ارزان، راحت و سریع است، استفاده از آن در تعیین سویه‌های مهاجم از غیر مهاجم پیشنهاد می‌گردد. به منظور جلوگیری از بروز مقاومت دارویی در بین گونه‌های شینگلا باید قبل از تجویز دارو، تست تعیین حساسیت و یا مقاومت (آنتی‌بیوگرام) انجام گیرد و تجویز آنها نیز با احتیاط صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

در خاتمه برخورد لازم می‌دانیم که از همکاری آقای رضا رنجبر، دانشجوی Ph.D. باکتری شناسی دانشکده

References

1. Chien-Shun C, Wen BH, Hsiao-lun W. Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainsous township in Taiwan, Republic of china. JCM 2001; 39(1): 1048-1056.
2. Kaiser A, Zhahirul Islam T, Islam MA. Phenotypic & genotypic characterization of provisional serotype *S. flexneri* 1C and clonal relationship with 1b strains isolated in Bangladesh. JCM 2003; 41(1): 110-117.
3. Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in shigella spp and enteroinvasive *E. coli*: characterization and dissemination of tet (A). JCM 2003; 4(3): 1023-1032.
4. Turner SA, Luck SN, Sakellaris H. Molecular epidemiology of SRL pathogenecity Island. Antimicrobial agents and chemotherapy 2003; 147(2): 727-734.
5. عزیزی ف، جانفربانی م، حاتمی ه. اپیدمیولوژی و کنترل بیماری‌های شایع در ایران. مرکز غدد درون ریز و متابولیسم. دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی ۱۳۸۳. مؤسسه انتشاراتی خسروی، چاپ دوم، صفحات: ۳۷۳-۳۶۲.
6. Sang-kee, Eun-hee P, Mi-Hee K. Molecular epidemiological characteristics of *S. flexneri* strains isolated in Busan during the period 1998 to 2002: Antibioqram, plasmid profile and serotype correlation. Health & Environ 2002; 12: 38-47.
7. W.H.O/UNAIDS. Initiative for vaccine research (IVR), 2002-2003 WHO/IVB/04/15. Available from www.google.com.
8. Hale TL, Keusch GT. Medical Microbiology, Eds Tompson, 2000, Shigella.
9. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal peyer's and caecal patches. Histochem J 1994; 26: 271-280.
10. Chen JH, Chiou CS, Chen PC, Liao TL, Liao TL, Li JM, And et al. Molecular epidemiology of shigella in a Taiwan during 1996 to 2000. J of Clinical Microbiol, 2003; 41(7): 3078-3088.
11. Ranjbar R, Soltan Dalal MM, Pourshafie MR, Aslani MM, Majdzadeh R, Khoramzade MR. Serogroup distribution of shigella in Tehran. Iranian J Publ Health 2004; 33: 32-35.
12. Murray PR, Jorgnson JH, Yolken RH, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology, 8 th ed, Mosby, 2003.
13. Villanova PA. National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed, 1990. Approved standard M2-A5.

14. Cee WS, Puthucheary SD. Species distribution and antibiotic resistance of shigella isolates in an urban community in Malaysia. *Med J Malaysia* 2003; 58 (2): 262-267.
15. Payne SM, Richard A, Elstein F. Detection and differentiation of Iron-responsive avirulent mutants on congo red agar. *Infect & Immunity* 1977; 18(1): 94-98.
16. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
17. Tacket CO, Shahid N, Huq MI. Usefulness of plasmid profiles for differentiation of shigella isolates in Bangladesh. *J Clinical Microbiol* 1984; 20: 300-301.
18. Moes Ardalan K, Zali MR, Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabis. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of shigella species among patients with acute diarrhea in Karaj, Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr* 2003; 21(2): 96-102.
19. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning*. Third edition, 2001; Vol 1, 31-34. Cold Spring Harbor laboratory Press (CSHL press), New York, USA.
20. Litwin CM, Storm AL, Ryam KJ. Molecular epidemiology of shigella infections: plasmid profiles, serotype correlation and restriction endonuclease analysis. *J. clinical Microbiol* 1991; 29(1): 104-108.
21. Vasilev V, Andron N, Agmon JR. Variability of *S. flexneri* serotypes in Israel during a period of two years: 2000 & 2001. *Epidemiol Infect* 2004; 132 (1): 51-56.