Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۱: از ۸۱-۸۸
بهار ۱۳۹۰

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین ژن *ipa*H در سویه‌های شیگلا جدا شده از استان‌های منتخب کشور

شادی قندیان[۱]، مرتضی ستاری[۲*]، وجیهه‌سادات نیک‌بین[۳]، محمدمهدی اصلانی[٤]**

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۱۰

چکیده

هدف: شیگلوزیس یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر کودکان مبتلا بـه اسـهال در کـشورهای در حـال توسـعه است. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری از اهمیـت زیـادی برخـوردار اسـت. ژن *ipa*H یکـی از ژن‌هـای ویرولانس است که می‌تواند به‌عنوان شناساگر در تشخیص شیگلا بکار رود.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۱۰۰ نمونه شیگلا از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شد. این سویه‌ها بـا آزمـون‌هـای بیوشیمیایی و سرولوژیکی برای ٤ گونه دیسانتری، سونئی، بوییدی و فلکسنری شناسایی شدند. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها به روش انتشار در آگار نسبت به ١٤ آنتی‌بیوتیک مختلف انجام شد. PCR ژن *ipa*H بـا استفاده از PCR اختصاصی برای تمامی سویه‌ها انجام شد.

نتایج: براساس نتایج این مطالعه ٣٦ (۷۳ درصد) سویه شیگلا سونئی، ۹ (۱۸ درصـد) سـویه شـیگلا فلکـسنری، ۳ (۵ درصد) سویه شیگلا بوییدی و ۲ (٤ درصد) سویه شیگلا دیسانتری شناسایی شد. نتایج نشان مـی‌دهـد کـه تقریباً ۵۰ درصد سویه‌ها به تتراسایکلین و کوتریموکسازول مقاوم بودند. میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مـورد مطالعه در سویه‌های شیگلا سونئی بیشتر از سایر گونه‌ها بود. حضور ژن *ipa*H با انجام PCR در تمـام سـویه‌هـا تأیید شد.

نتیجه‌گیری: در این بررسی شیوع سویه‌های شیگلا سونئی نسبت به سایر گونه‌ها بالاتر است. سویه‌های مورد مطالعـه نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و آمینوگلیکوزیدها حساسیت بـالایی را نـشان دادنـد. بررسـی ژن ویـرولانس *ipa*H نشان داد که می‌توان از این ژن به‌عنوان نشانگری برای شناسایی سریع گونه‌های شیگلا استفاده کرد.

کلیدواژگان: شیگلا، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، ژن *ipa*H، ایران

۱- مقدمه

شیگلا (*Shigella*) باسـیل گـرم منفـی روده‌ای اسـت کـه عفونـت‌هـای ناشـی از آن مـشکلات جـدی را در کـشورهای

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروبیولوژی، کدپستی: ١٤١١٧١٣١١٦
Email: sattarim@modares.ac.ir
****نشانی مکاتبه:** تهران، میدان پاستور، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب‌شناسی، کدپستی: ۱۳۱٦۹٤۳۵۵۱
Email: mmaslani@yahoo.com

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

پیشرفته و در حال توسعه ایجاد کرده است. گونه‌های جنس شیگلا به چهار گروه دیسانتری (*S. dysenteriae*)، فلکسنری (*S. flexneri*)، سونئی (*S. sonnei*) و بوییدی (*S. boydii*) تقسیم می‌شوند [۱].

شیوع عفونت‌های ناشی از شیگلا به دلیل دوز پایین بیماری‌زایی این باکتری و همچنین انتقال آسان آن از فردی به فرد دیگر و نیز آلوده شدن غیرمستقیم افراد از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده بسیار آسان است [۱، ۲].

بیماری‌زایی نتیجه هجوم یا نفوذ باکتری به مخاط کلون به همراه تخریب بافت پوششی و ایجاد یک کولیت (Colitis) التهابی حاد در لامینا پروپریا (Lamina Propria) و در نهایت زخم شدن مخاط روده با از دست رفتن خون و آزاد شدن عناصر التهابی و موکوس به درون لومن روده است. باکتری تحت تأثیر این شرایط از جذب آب در کولون ممانعت به‌عمل می‌آورد و حجم مدفوع تغییر می‌کند و در نتیجه بیمار متناوباً دچار اسهال خونی و مخاطی می‌شود [۳، ٤].

از عوامل بیماری‌زا در این باکتری می‌توان به توکسین‌ها، پروتئازها، عوامل چسبنده باکتری اشاره کرد. ژن‌های بیماری‌زا که مسئول بیماری‌زایی شیگلا هستند در کروموزوم و پلاسمید (inv) قرار دارد [۲].

ژن *ipa*H از ژن‌های بیماری‌زا است که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید باکتری قرار دارد که به دلیل اهمیت آن مطالعات زیادی روی این ژن صورت گرفته است. از آن‌جا که این ژن در میان ژن‌های پلاسمید تهاجمی موجود در شیگلا منحصر به فرد است و از طرفی در کروموزوم باکتری نیز موجود است، بنابراین نسبت به سایر عوامل ژنی در این باکتری از پایداری بیشتری برخوردار است و شناسایی این ژن در سویه‌های مشکوک این باکتری می‌تواند در تشخیص زودتر نمونه‌های مشکوک که از نظر فنوتیپی احتمال تفسیر اشتباه در نتایج نهایی دارد، کمک نماید [۲، ۳، ۵].

در مطالعات نشان داده شده است که شیگلا سومین عامل باکتریایی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال است. این عفونت در تمام نقاط دنیا بومی است. اپیدمی معمولاً در مناطق با جمعیت زیاد و وضعیت بهداشتی ضعیف اتفاق می‌افتد [٦، ۷].

با توجه به اهمیت این باکتری در ایران و کمبود مطالعات صورت گرفته در این زمینه، در مطالعه حاضر ژن *ipa*H و اهمیت آن در تشخیص سریع شیگلاهای جدا شده از افراد بیمار و بدون علایم بالینی با استفاده از روش مولکولی PCR در کنار روش معمول فنوتیپی به‌همراه بررسی سرولوژیکی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ جدایه شیگلا از نمونه‌های بیمارانی که در طرح ملی بررسی عوامل باکتریایی بیماری‌زای روده‌ای در استان‌های ایران شرکت داده شده بودند و به‌عنوان بیماران یا ناقلین سالم شگلوزیس (Shigellosis) شناخته شد از پنج استان کشور (مازندران، گیلان، اصفهان، ایلام، تهران) طی سال‌های ۱۳۸۰-۱۳۷۵ جمع‌آوری و به انستیتو پاستور ایران انتقال یافته بود، بررسی شد.

۲-۲- تهیه کشت خالص از نمونه‌ها

نمونه‌ها ابتدا در محیط کشت SS آگار (Salmonella Shigella Agar) و مولر آگار (Mueller Agar) کشت داده شده و پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در صورت ناخالص بودن کشت، کلونی‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی (Morphology) و رنگیزه مشکوک به شیگلا هستند، برای خالص‌سازی مجدداً به محیط مولر آگار منتقل شد. سپس کلونی‌های حاصل برای تشخیص نمونه‌های مثبت مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۳- شناسایی نمونه‌های شیگلا

تمام آزمایش‌های بیوشیمیایی از روی کشت ٢٤ ساعته

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

باکتری در محیط مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton Agar) انجام شد. جدایه‌ها از نظر واکنش‌ها روی محیط‌های TSI (Triple Sugar Iron)، محیط لیزین، سیترات و اوره کشت شدند. جدایه جدا شده با ویژگی‌های بیوشیمیایی:

لاکتوز منفی، تولید گاز منفی، بدون حرکت، واکنش دکربوکسیلاسیون لیزین منفی، سیترات منفی، هیدرولیز اوره منفی و متیل‌رد مثبت به‌عنوان یک جدایه متعلق به جنس شیگلا در نظر گرفته شد. برای افتراق گونه‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی (بررسی واکنش دکربوکسیلاسیون اورنیتین، آزمون ONPG، تولید اندول، تخمیر قندهای مانیتول) و سروتایپینگ استفاده شد. آزمون‌های سروتایپینگ با استفاده از آنتی‌سرم‌های شیگلا (شرکت Mast، انگلیس) از کشت‌های تازه شیگلا به روش آگلوتیناسیون روی اسلاید انجام شد [۸].

۲-٤- بررسی مقاومت ضد میکروبی جدایه‌ها

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش کاربی-باوئر (Kirby-Bauer) و استفاده از محیط کشت مولر هینتون و سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند روی ۱۰۰ جدایه از گونه‌های مختلف شیگلا انجام گرفت. بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک (شرکت Mast، انگلیس) در گروه‌های مختلف زیر صورت گرفت:

آموکسی‌سیلین کلاولونیک اسید (Amoxicillin Clavulanic acid) (۲۰ میکروگرم) و آمپی‌سیلین (Ampicillin) (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (Cefotaxime) (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (Ceftazidime) (۳۰ میکروگرم) و سفالوتین (Cefalotin) (۳۰ میکروگرم)، سفتیزوکسیم (Ceftizoxime) (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (Gentamicin) (۱۰ میکروگرم)، نتلمیسین (Netilmicin) (۳۰ میکروگرم)، ایمیپنم (Imipenem) (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (Tetracyclin) (۳۰ میکروگرم)، سیپروفولوکساسین (Ciprofloxacin) (۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid) (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (Cloranfenicol) (۳۰ میکروگرم) و کوتریموکسازول (Cotrimoxazole) (۳۰ میکروگرم).

۲-۵- استخراج DNA کروموزومی

برای استخراج DNA باکتریایی ابتدا مرحله لیز با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. سپس با روش استفاده از فنل-کلروفرم از محلول لیز باکتریایی، DNA مورد نیاز طی مراحلی که عبارت بود از جدا کردن مواد غیر از DNA، خالص‌سازی DNA و تغلیظ آن جداسازی شد.

۲-٦- آزمون PCR

کلیه مواد استفاده شده در آزمایش‌های PCR این تحقیق از شرکت (MBI-Fermentas, GmbH, Leon-Rot, Fermentas Germany) تهیه شد و برای آزمایش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf استفاده شد.

برای تکثیر ژن *ipa*H از زوج آغازگرهای (Primers) ipaH F [جلویی (Forward)]:

5'-TGGAAAAACTCAGTGCCTCT-3'

و *ipa*H R [برگشتی (Reverse)]:

5'-CCGTCCGTAAATTCATTCT-3' استفاده شد [۹].

همچنین برای تکثیر ژن *ipa*H مخلوط واکنش (PCR Mixture) زیر تهیه و استفاده شد:

آب دو بار تقطیر ۱۱/۹ میکرولیتر، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار) ۳ میکرولیتر، dNTP (۱۰ میلی‌مولار) ۱ میکرولیتر، آغازگر F و R هرکدام (۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر) ۰/۷ میکرولیتر، پلیمراز *Taq* (*Taq* Polymerase) (۵ واحد در هر میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر، DNA ۵ میکرولیتر، حجم نهایی برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر

چرخه‌های حرارتی استفاده شده به‌صورت زیر بود:

واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation): ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه، ۱ بار، واسرشتگی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد،

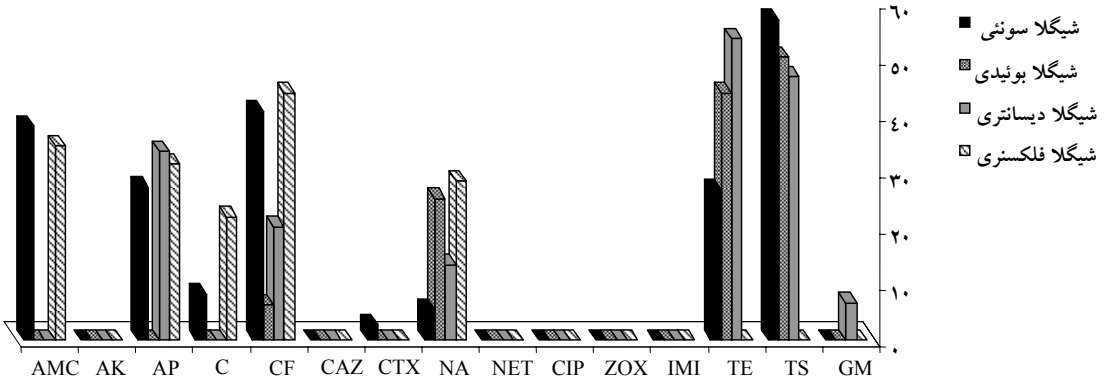
Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

۵۰ ثانیه، اتصال: ۵٦ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، تکثیر: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه (۳۰ بار)، تکثیر نهایی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، ۱ بار.

۲-۷- الکتروفورز محصول PCR

بافر ۰/۵ X TBE را به مقدار مورد نیاز در داخل تانک الکتروفورز ریخته و سینی حاوی ژل ۱ درصد در درون تانک قرار داده شد. به کمک سمپلر مقدار ۲/۸ میکرولیتر از نشانگر داخل یکی از چاهک‌های ژل ریخته شد. در این تحقیق برای انجام الکتروفورز از ولتاژ ۹۰ ولت استفاده شد.

بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به‌مدت ۱۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) دارای غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد. ژل را از آب مقطر خارج کرده و توسط در دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel Documentation) تصویربرداری انجام شد.



نمودار ۱ مقایسه درصد مقاومت جدایه‌های شیگلا به تفکیک سروگروه (AMC: آموکسی‌سیلین کلاولونیک اسید، AK: آمیکاسین، AP: آمپی‌سیلین، C: کلرامفنیکل، CF: سفالوتین، CAZ: سفتازیدیم، CTX: سفوتاکسیم، NA: نالیدیکسیک اسید، NET: نتلمیسین، CIP: سیپروفولوکساسین، ZOX: سفتیزوکسیم، IMI: ایمیپنم، TE: تتراسایکلین، TS: کوتریموکسازول، GM: جنتامایسین)

۳- نتایج

۳-۱- فراوانی سویه‌های جمع‌آوری شده در استان‌های مختلف

از مجموع ۱۰۰ سویه شیگلا جمع‌آوری شده به‌صورت تصادفی که با آزمایش‌های بیوشیمیایی به‌عنوان سویه‌های شیگلا تأیید شدند، ۳۱ سویه مربوط به گرگان، ۲۷ سویه مربوط به مازندران، ۸ سویه مربوط به ایلام، ۱۱ سویه مربوط به اصفهان و ۲۳ سویه مربوط به تهران بودند. از کل بیماران تشخیص داده شده، ٤٦ مورد مذکر و ۳۱ مورد مؤنث بودند.

با توجه به این‌که نمونه‌ها به‌صورت تصادفی جمع‌آوری شده بود، بیشترین تعداد سویه‌های شیگلا مورد بررسی جداسازی شده مربوط به فصل تابستان بود.

۳-۲- نتایج سرولوژی

از نظر فراوانی سروگروه‌های جدا شده شیگلا ۳۷ درصد موارد یعنی ۳۷ جدایه متعلق به گونه شیگلا سونئی، ۳۲ درصد موارد یعنی ۳۲ جدایه متعلق به گونه شیگلا فلکسنری، ۱٦ درصد موارد یعنی ۱٦ جدایه متعلق به گونه شیگلا بوئیدی، ۱۵ درصد موارد یعنی ۱۵ جدایه متعلق به گونه شیگلا دیسانتری بود.

مطابق انتظار در فصل تابستان بیشترین موارد آلودگی

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

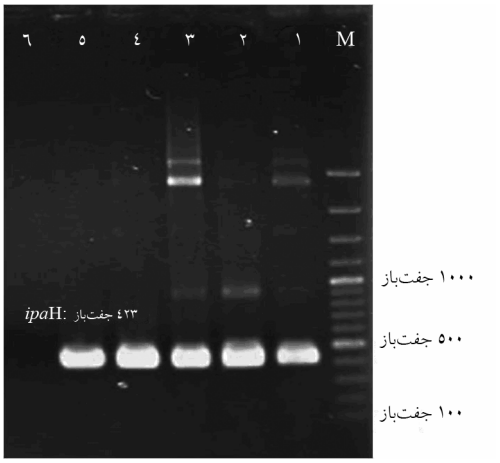
مشاهده شد و سروگروه غالب نیز شیگلا سونئی بود که بیشترین فراوانی را داشت.

۳-۳- نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

طبق نمودار ۱ بیشترین میزان مقاومت سویه‌های شیگلا دیسانتری، شیگلا بوئیدی و شیگلا سونئی آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول است. در مورد سویه‌های شیگلا فلکسنری میزان مقاومت نسبت به سفالوتین بیشتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌هاست.

۳-٤-آزمون PCR جهت شناسایی ژن *ipa*H

محصول PCR مورد انتظار برای تکثیر ژن *ipa*H ٤٢٣ جفت‌باز است که در مورد همهٔ سویه‌ها (۱۰۰ درصد) قطعاتی دقیقاً با این اندازه‌ها مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱ PCR مربوط به ژن *ipa*H؛ شماره‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ نمونه‌ای از سویه‌های مورد مطالعه است. شماره ۵، کنترل مثبت (سویهٔ استاندارد شیگلا فلکسنری 2a TH 13/000)، M نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی و شماره ٦ کنترل منفی است.

٤- بحث

شیگلوزیس یک گاستروانتریت حاد (Acute Gastroenteritis) است که یکی ازعلت‌های مهم مرگ و میر و ابتلای کودکان به اسهال در کشورهای در حال توسعه است. این بیماری توسط باکتری‌های متعلق به جنس شیگلا اتفاق می‌افتد [۸، ۹].

میزان بروز شیگلوزیس در جهان ١٦٤/٧ میلیون تخمین زده شده که ٦٩ درصد از آن مرگ و میر کودکان کمتر از ۵ سال را شامل می‌شود. اپیدمی‌ها معمولاً در مناطق با جمعیت زیاد و وضعیت بهداشتی ضعیف اتفاق می‌افتد [۸]. مطالعات اخیر در ایران و بررسی این باکتری در نمونه‌های اسهالی، بیانگر این است که شیگلا از عوامل مهم دیسانتری باسیلی در کشور ما، ایران است که به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاومت دارد [۱۰].

در این مطالعه، سروتایپینگ جدایه‌های شناسایی شده نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به شیگلا سونئی است (۳۷ درصد) و شیگلا فلکسنری، بوییدی و دیسانتری به‌ترتیب با فراوانی ٣٤ درصد، ١٦ درصد و ١٥ درصد در مراتب بعدی قرار دارند. لازم به ذکر است که شیگلا سونئی نسبت به سایر گونه‌ها بیماری خفیف‌تری را ایجاد می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط فرشاد و همکارانش روی ۸۲ سویه شیگلا صورت گرفته بود، نتایج مشابهی به‌دست آمد: ٧٤/٣ درصد شیگلا سونئی، ۱۹/۵ درصد شیگلا فلکسنری، ٣/٦ درصد شیگلا بوییدی و ٢/٤ درصد شیگلا دیسانتری [۸]. رنجبر و همکارانش با بررسی ۳۲ سویه به‌ترتیب نتایج ۵۸/۹ درصد شیگلا سونئی، ٣٦/٤ درصد شیگلا فلکسنری، ۳/۳ درصد شیگلا بوییدی و ۱/۳ درصد شیگلا دیسانتری را که مشابه نتایج این مطالعه بود، گزارش کردند [۱۰].

این بررسی‌ها نشان می‌دهد که در سال‌های اخیر تغییری در میزان بروز سروگروه‌های شیگلا در ایران رخ نداده است. با این‌که ایران یک کشور در حال توسعه است، شیوع شیگلا سونئی به‌عنوان سروگروه غالب مشابه کشورهای پیشرفته‌ای چون کانادا و امریکا است و نیز همانند این کشورها عفونت ناشی از شیگلا در کودکان بیشتراز بزرگسالان گزارش شده است [۱۱، ۱۲]. در حالی‌که در تایوان و بنگلادش عفونت‌های این باکتری غالباً ناشی از سروگروه‌های شیگلا فلکسنری گزارش می‌شود [۱۲].

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

در گذشته عقیده بر این بود که نسبت شیگلا فلکسنری و شیگلا سونئی در یک ناحیه جغرافیایی منعکس کننده وضعیت استاندارد بهداشتی آن ناحیه است؛ هنگامی که سطح عمومی بهداشت شخصی و محیطی بالا می‌رود، میزان شیگلا فلکسنری (سروگروه B) کاهش می‌یابد در حالی‌که نسبت بروز شیگلا سونئی (سرو گروه D) بالاتر می‌رود [۱۳]. همچنین تصور می‌شود که از جمله عوامل مهم در شیوع سرو گروه‌های شیگلا در کشورهای مختلف، فاکتورهای مؤثر در انتخاب طبیعی است که از آن جمله می‌توان به عوامل محیطی و فردی اشاره کرد. در مقایسه‌ای که بین سروگروه‌های مختلف در فصول متفاوت انجام شده است، مشاهده می‌شود که بروز شیگلوزیس در فصل تابستان نسبت به فصول دیگر بیشتر است که شاید به دلیل مشکل رعایت بهداشت به دلیل محدودیت منابع آبی باشد و از طرفی دیگر، جمعیت حشرات ناقل که می‌توانند باکتری‌ها را در جامعه منتشر نمایند در این فصل زیاد است.

درمان مناسب آنتی‌بیوتیکی شیگلوزیس، شدت، دوره علایم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می‌دهد. اغلب انتریت‌های شیگلایی به درمان با داروهای ضد میکروبی پاسخ می‌دهند اما از طرفی ظهور سویه‌های مقاوم و از طرف دیگر طبیعت خود محدود شونده بیماری باعث شده که فقط در موارد جدی و کشنده بیماری، درمان اختصاصی صورت پذیرد. ظهور سویه‌هایی با مقاومت دارویی متعدد از نقاط مختلف جهان گزارش شده است [۱٤]. در این مطالعه نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام به این ترتیب بود که: تمام سویه‌ها به آمیکاسین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، نتلمیسین، سیپروفولوکساسین، سفتیزوکسیم، ایمیپنم، جنتامایسین، ۱۰۰ درصد حساس بودند و به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلسن کلاولونیک اسید، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، سفالوتین، نالیدیکسیک اسید حساسیت نسبتاً بالایی را (۹۰ درصد) نشان دادند ولی نسبت به تتراسایکلین و کوتریموکسازول تقریباً ۵۰ درصد مقاومت نشان دادند. در مطالعه فرشاد و همکارانش، بیشترین مقاومت به‌دست آمده ۹۰/۲٤ درصد مربوط به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول است [۸]. مطالعه انجام شده توسط رنجبر نیز مقاومت بالای شیگلا را نسبت به کوتریموکسازول (≤۹٤ درصد) و مقاومت نسبی را نسبت به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، نالیدیکسیک اسید، سفیکسیم و کانامایسین (≥٦ درصد) نشان می‌دهد [۱۰]. در مقایسه با تحقیقات انجام شده در ایران خوشبختانه میزان مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم از جمله سفتازیدیم و سفوتاکسیم و نیز آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون سیپروفلوکساسین همچنان پایین است؛ به‌طوری که در این مطالعه صد درصد سویه‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند و این مطلب بیانگر این است که سویه‌های شیگلا در ایران کمتر در معرض آنتی‌بیوتیک‌هایی چون سفالوسپورین‌ها و کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها قرار می‌گیرند. بنابراین برای جلوگیری از ایجاد مقاومت در این سویه‌ها باید نظارت کافی در تجویز این داروها بدون نسخه پزشک در درمان این‌گونه عفونت‌ها صورت گیرد.

با وجود این‌که میزان مقاومت به‌طور کلی در سویه‌های مورد بررسی قابل توجه نیست، اما ٤۳ سویه به حداقل ۳ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی مقاومت نشان دادند که این موضوع دارای اهمیت است.

ژن *ipa*H از ژن‌های بیماری‌زا است که هم روی کروموزوم و هم پلاسمید باکتری قرار دارد که به دلیل اهمیت این ژن مطالعات زیادی روی آن صورت گرفته است و ادعا شده است که این ژن می‌تواند نشانگر مهمی در تشخیص زود هنگام این باکتری از سایر باکتری‌های روده‌ای باشد [۱۵]. با توجه به اهمیت این باکتری در ایران، در تحقیق حاضر، ژن ipaH، ژن شایع بیماری‌زا، در سویه‌های شیگلا جدا شده از افراد بیمار و بدون علایم بالینی با استفاده از PCR بررسی شد تا شیوع این ژن در این افراد بررسی و مقایسه‌ای بین حضور این ژن در افراد بیمار و بدون علایم بالینی شیگلوزیس صورت گیرد. در این مطالعه در ۱۰۰ درصد نمونه‌های باکتریایی شیگلا حضور این ژن تأیید شد. طی مطالعات فرشاد و همکاران روی ۸۲ سویه شیگلا نیز نتیجه مشابهی به‌دست آمد و ژن *ipa*H در تمام سویه‌ها گزارش شد [۸]. در مطالعه تانگ (Thong) نیز

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019

تمام سویه‌های شیگلای مورد بررسی نیز حاوی ژن *ipa*H بودند [۱٦]. با توجه به محدودیت نمونه‌های آزمایش شده در این تحقیق به‌نظر می‌رسد که با بالا بردن تعداد جدایه‌ها نتایج دقیق‌تری در این زمینه به‌دست آید.

براساس این یافته رابطه معنی‌داری بین حضور این ژن در افراد ناقل و بیمار مشاهده نشد. نتیجه‌ای که می‌توان از این بررسی‌ها گرفت این است که از آن‌جایی که ژن *ipa*H هم کروموزومی و هم پلاسمیدی است، بیش از یک کپی روی ژنوم داشته و در تمامی سویه‌های شیگلا وجود دارد و نیز به علت این‌که ناقلین فاقد علایم بالینی هستند، بنابراین می‌توان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ipa*H از روش PCR به‌عنوان یک روش خیلی سریع با اختصاصیت و حساسیت بالا برای شناسایی سویه‌های شیگلا استفاده کرد. 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 به‌نظر می‌رسد.

۵- تشکر و قدردانی

از کلیه پرسنل بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران به‌خصوص از جناب آقای شفیعی و سرکار خانم شورج که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

٦- منابع

[1] Niyogi SK. Shigellosis. J Microbiol 2005; 43(2): 133-43.

[2] Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis: challenges & management issues. Indian J Med Res 2004; 120(5): 454-62.

[3] Dutta S, Ghosh A, Ghosh K, Dutta D, Bhattacharya SK, Nair GB, Yoshida SI. 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.

[4] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999; 77(8): 651-66.

[5] Thapa BR, Ventkateswarlu K, Malik AK, Panigrahi D. Shigellosis in children from north India: a clinicopathological study. J Trop Pediatr 1995; 41(5): 303-7.

[6] Vila J, Gascon J, Abdalla S, Gomez J, Marco F, Moreno A, Corachan M, Jimenez de Anta T. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhea. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(11): 2668-70.

[7] Shears P. *Shigella* infections. Ann Trop Med Parasitol 1996; 90(2): 105-14.

[8] 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.

[9] Lee TM, Chang LL, Chang CY, Wang JC, Pan TM, Wang TK, Chang SF. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. J Med Microbiol 2000; 49(4); 355-60.

[10] Ranjbar R, Soltan Dallal MM, 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): 426-30.

[11] Ashkenazi S, Levy I, Kazaronovski V, Samra Z. Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. J Antimicrob Chemother 2003; 51(2): 427-9.

[12] Faruque SM, Khan R, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Ahmad QS, Azim T, Nair GB, Takeda Y, Sack DA. 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.

[13] Sivapalasingam S, Nelson JM, Joyce K, Hoekstra M, Angulo FJ, Mintz ED. High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 49-54.

[14] Bennish ML, Salam MA, Hossain MA, Myaux J, Khan EH, Chakraborty J, Henry F, Ronsmans C. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983-1990: increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nalidixic acid. Clin Infect Dis 1992; 14(5): 1055-60.

[15] Dutta S, Chatterjee A, Dutta P, Rajendran K, Roy S, Pramanik KC, Bhattacharya SK. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. J Med Microbiol 2001; 50(8): 667-74.

[16] Thong KL, Hoe SL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. BMC Infect Dis 2005; 5(1): 8.

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 8:23 IRDT on Thursday June 20th 2019