Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

عزل وتشخيص جرثومة شيكلا من الاطفال في مدينة كركوك ودراسة بعض صفات الضراوة خارج الجسم

سارة صباح غريب[1] ، هاجر علي شريف[2]

[1]كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

[1]Yousif_biology@yahoo.com

[2]كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

[2]Alihajar19@yahoo.com

تاريخ استلام البحث : 21 / 9 / 2014 تاريخ قبول البحث : 8 / 3 / 2015

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم الشيكلا من براز و مسحات المستقيم للأطفال المرضى دون السن الثالثة عشر من الراقدين والمراجعين الى مستشفى ازادي وكركوك العام ومستشفى الأطفال والذين يعانون من حالات اسهال حاد مائي ودموي. وذلك باستخدام الاختبارات الزرعية على الأوساط الاختبارية والتفريقية لعزل بكتريا شيكلا، وفحوصات الكيموحيوية و دعمت نتائج التشخيص بالتشخيص بنظام API20E و الفحص المصلي. وتم الحصول على (3) عزلات من (305) عينة براز ومسحات مستقيم وبنسبة 0.98%، عزلتين منها تعود الى النوع ***Shigella.flexneri*** والعزلة الأخرى الى النوع ***Shigella.sonnei***.

تم دراسة بعض صفات الضراوة في عزلات شيكلا. اذ درست قابليتها للعيش تحت الظروف الحامضية $PH_{2.5}$ والظروف القاعدية $PH_{9.8}$ وأظهرت النتائج ان معدلات البقاء قد تباينت بشكل واسع، فبعد ساعتان من الحضن تراوحت معدلات البقاء تحت الظروف الحامضية بين (16%-79%)، و (4%-22%) تحت الظروف القاعدية كما وأظهرت النتائج حساسية العزلات لمادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ومقاومتها لأملاح الصفراء.

كلمات دالة : شيكلا ، صفات الضراوة ، تشخيص.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

Isolation and identification of *shigella* from children in Kirkuk city and the studying some of the virulence characters invitro

Sarah S. Ghareeb[1] , Hager A. Shareef[2]

[1]College of science /Biology

[1]Yousif_biology@yahoo.com

[2]College of education for pure science

[2]Alihajar19@yahoo.com

Received date : 21 / 9 / 2014 **Accepted date : 8 / 3 / 2015**

ABSTRACT

The study included the isolation and identification of Shigella species from stool and rectal swabs of children less than 13 years suffering acute and bloody diarrhea attended Azadi General and children's hospital in Kirkuk city, using cultural tests on selective and differential media, biochemical test and the results were confirmed by using API20E system and serological tests. Among (305) stool and rectal swabs samples, (3) isolates of Shigella (0.98%) isolated, (2) isolates belonged to Shigella flexneri , the other isolates belonged to Shigella sonnei . The study of some virulence characters were also performed for shigella isolates . The ability to survival under acidic condition in medium at $PH_{2.5}$ and alkaline conditions in medium at $PH_{9.8}$, the result reveal that their survival rate varied widely, after 2-hr from (16-79%) under acidic condition and (4-22%) under alkaline conditions. Also the resistance to H_2O_2 and bile salt were studied and the result showed little varied between Shigella isolated.

Keyword: *shigella , virulence characteristics , diagnosis .*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

1.المقدمة (Introduction)

تعتبر جرثومة الشيكلا من الممرضات المعوية الداخل خلوية المتنقلة بوساطة الغذاء food–borne bacteria والتي تسبب مرض الاسهال الشديد المعروف بداء الشيغلات Shigellosis.[1] و [2]

يشكل داء الشيغلات عبئا صحيا في انحاء العالم ولا سيما في البلدان النامية اذ ان حوالي (165) مليون حالة من الاسهال تحدث سنويا، (163) مليون حالة إصابة منها تحصل في البلدان النامية، ويؤلف الأطفال دون سن الخامسة من العمر نسبة 69% من هذه الحالات، اما (1.5) مليون المتبقي من الحالات فتحدث في البلدان المتقدمة. وتحدث سنويا (1.1) مليون حالة وفاة في انحاء العالم .[3] و [4]

تعتمد امراضية داء الشيغلات على قدرة البكتريا على الغزو و استعمارها القناة المعدية المعوية Gastrointestinal tract و التي تكون الدالة الحامضية فيها اقل من 3 (pH<3) .[5] فضلا عن تحمل الظروف الحامضية ، فان لجرثومة شيكلا القدرة على تحمل الظروف القاعدية والتي تصل الى 9 الناتجة الافرازات القلوية PH_9 او اعلى من ذلك في القناة البنكرياسية في قمة الأمعاء الدقيقة [6] من عوامل الضراوة الاخرى للجرثومة هي مقاومتها للمركبات الاوكسيجينية الفعالة مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والمقاومة لاملاح الصفراء .[7] و [8]

استهدفت الدراسة الحالية الى عزل و تشخيص جراثيم شيكلا من براز الأطفال المصابين بالاسهال باستخدام الصفات المزرعية و الاختبارات الكيموحيوية المختلفة و المصلية ونظام API 20E ومن ثم دراسة صفات الضراوة المتعلقة بإمراضية هذه الجراثيم خارج الجسم مثل مقاومة الحامضية و القاعدية و المقاومة لمركبات الاوكسجين الوسطية الفعالة و المقاومة للأملاح الصفراء .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

2.طرائق العمل (Experimental)

1- جمع العينات Sample collection

جمعت (305)عينة شملت (275)عينة من البراز و(30) مسحة من المستقيم من الاطفال الراقدين والوافدين الى مستشفى اطفال العام ومستشفى ازادي التعليمي في مدينة كركوك و الذين يعانون من اسهال حاد مائي و دموي، وباعمار تراوحت بين (يوم –13) سنة و لكلا الجنسين و للفترة من شهر تشرين الثاني 2012 و لغاية شهر اذار 2013 .جمعت عينات البراز في اوعية بلاستيكية معقمة و وضعت في حاويات مبردة لحين نقلها الى المختبر.

2- زرع العينات و عزل البكتريا:

زرعت العينات بواسطة عروة معقمة (Loop) في انابيب حاوية على 10مل من الوسط الغذائي السائل (ماء الببتون peptone water) حضنت الانابيب في درجة حرارة (37م°) و لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن نقل ملئ Loop من المزروع البكتيري الى الاوساط MAS,SSA,XLD وزرع بطريقة التخطيط على الطبق ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° و لمدة 24ساعة.[9]

فحصت جميع الاطباق في اليوم التالي و شخصت المستعمرات البكتيرية النامية ثم انتخبت المستعمرات التي ظهرت عديمة اللون وتلك التي ظهرت بلون وردي على وسط Mac و المستعمرات الحمراء على الوسط XLD و المستعمرات الشاحبة عديمة اللون ذات حافات كاملة على وسط SSA و نقلت الى موائل من وسط اكار المغذي و حضنت بدرجة حرارة 37م° و لمدة 24ساعة ثم حفظة بدرجة حرارة 4م° لحين اجراء الاختبارات التشخيصية الاخرى.[9] و [10]

3- الفحص المجهري

حضرت شرائح من النمو الناتج وصبغت بصبغة كرام لملاحظة شكل الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع صبغة كرام.

4- اختبار الحركة Motility test

لقح وسط اختبار الحركة بالعزلة البكتيرية على شكل طعنة (stab) بواسطة ابرة معقمة ثم حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة 24ساعة. ان عدم انتشار النمو وظهوره في مكان الطعن فقط دليل على ان البكتريا غير متحركة.[11] و [12]

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

5-الاختبارات الكيموحيوية

تم اجراء الفحوصات الكيموحيوية للتاكد من تشخيص بكتريا *Shigella* التي شملت :**اختبار النمو على وسط اكار ثلاثي السكر الحديدي ،اختبار اليوريز ،اختبار الاوكسيديز ،اختبار الكتاليز ،اختبار الاندول ،اختبار استهلاك السترات.** [13] و [14].

6- اختبار تخمر الكاربوهيدرات Carbohydrat fermentation test

اجري هذا الاختبار لتحديد قابلية عزلات الشكيلا على تخمير بعض الكاربوهيدرات مثل رايبوز، لاكتوز، كلكوز سوربيتول، مالتوز، مانوز، رافينوز، مانيتول، كالاكتوز، فركتوز، زايلوز و ارابينوز .

اذ لقحت المستعمرات النقية و بعمر 24ساعة في أوساط السكريات ثم حضنت لمدة 24ساعة في درجة 37م° و لوحظت النتائج خلال فترة التحضين بدلالة تغير لون الكاشف في الوسط من الاحمر الى الاصفر.[15]

التشخيص باستخدام نظام Api 20E :_استخدم هذا النظام لتأكيد التشخيص.

التشخيص المصلي لعزلات *Shigella* :

تم تشخيص العزلات مصليا باستخدام المصول المضادة القياسية لتحديد الأنواع المصلية التي تم عزلها إذ أعطت عزلتين منها تفاعلا موجبا مع المصل المناعي القياسي(Anti-shigella flexneri polyvalent (1-6, x,y ، في حين أعطت العزلة الثالثة تفاعلا موجبا مع المصل المناعي Anti-Shigella sonnei polyvalent وذلك من خلال ظهور التلازن عند دمج الامصال المضادة مع المعلق الجرثومي .[14]

7- دراسة صفات الضراوة لجراثيم الشيكلا خارج الجسم الحي In vitro- study of virulence

1-اختبار تحمل الحامضية Survival under acidic condition

لإجراء هذا الاختبار نميت السلالات قيد الدراسة في وسط مرق LB ذي دالة حامضية ($PH=_7$) وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24ساعة لوصول النمو الى طور الثبات Stationary phase ،خففت المزرعة في نفس الوسط وبدالة

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

حامضية ($PH=_{2.5}$) {ضبطت الدالة الحامضية بأضافة HCL بتركيز 1N }وحضنت لفترات زمنية(4,2) ساعات عند درجة حرارة 37م° ثم اجريت سلسلة تخافيف عشرية مناسبة.تم حساب العد الحيوي للخلايا النامية على وسط اكار LB.

تم تحديد نسبة البقاء للخلايا الجرثومية تحت الظروف الحامضية من المعادلة الاتية[6] و [16]:

$$\text{نسبة البقاء للخلايا} = \frac{\text{عدد الخلايا النامية للجرثومة بعد الفترات الزمنية(4,2) ساعة}}{\text{عدد الخلايا الجرثومة للمزرعة المخففة الاصلية قبل الحضن(ساعة صفر)}} \times 100$$

2-اختبار تحمل القاعدية Survival under base condition

اجري الاختبار بتنمية عزلات جرثومة شيكلا في وسط مرق LB ذو الدالة الحامضية ($PH=_8$) لمدة 24ساعة لوصول النمو الى طور الثبات، ثم خففت المزرعة الى تركيز يعادل $10X1^3$ خلية/سم^3 في نفس الوسط بدالة حامضية($PH=_{9.8}$) {والذي ضبطت بأضافة هيدروكسيد الصوديوم NaoH بتركيز 1N)وحضنت لفترات زمنية مختلفة(4,2) ساعات وعند درجة حرارة 37م° .ثم اجريت حساب العد الحيوي للخلايا النامية في وسط اكار LB.

تم تحديد نسبة البقاء للخلايا الجرثومية تحت الظروف القاعدية بأستخدام نفس المعادلة المذكورة في اختبار تحمل الحامضية[6] و [16]

3-حساسية الجرثومة لمركبات الاوكسجينية الوسيطة الفعالة Susceptibility to reactive oxygen intermediate (ROI)

اعتمدت طريقة الباحث [7] لتحديد حساسية العزلات لمركبات(ROI) مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2.اذ لقح 2مل من وسط LB بمستعمرات فتية للجراثيم وحضن بدرجة حرارة 37م° ولمدة 48-24ساعة، نقل 200مايكروليتر من المزرعة الى الوسط الغذائي الادنى M9 minimal medium .ثم حضرت اقراص من ورق الترشيح بقطر(6)ملمتر وشبعت بمادة H_2O_2 بتركيز 3% ، نقلت الاقراص الى مركز الاطباق الملقحة بالجرثومة، وحضن الاطباق لمدة 18-24ساعة بدرجة حرارة 37م° ، وتم قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول القرص.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

4- دراسة مقاومة عزلات جرثومة شيكلا للاملاح الصفراء وتحديد التركيز المثبط الادنى Resistance to bile salt and determination of (MIC)

اتبعت طريقة الباحثان[17] اذ لقح 1ملم من وسط مرق LB بالسلالات قيد الدراسة وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24ساعة لوصول النمو الى طور الثبات ، ثم خففت المزرعة الى تركيز يعادل 5 X 10^3 خلية/سم^3 في نفس الوسط.ثم حضرت سلسلة تخافيف من وسط مرق LB بحجم 100مل في فلاسكات معقمة واضيفت اليها تراكيز مختلفة من الاملاح الصفراء (20,.....,3,2,1) وحضنت الفلاسكات بدرجة حرارة 37م° ولمدة24ساعة.تم تحديد التركيز المثبط الادنى(MIC) بملاحضة ادنى تركيزللمادة يمنع ظهور التعكر.

3.النتائج (Results)

العزل:

عند التحري عن بكتريا *Shigella* في (305) عينة براز و مسحات مستقيم من أطفال مرضى دون الثالثة عشر من العمر، يعانون من حالات اسهال حادة مائي ودموي، من الراقدين والمراجعين للمستشفى المشمولة بالدراسة، تم الحصول على ثلاث عزلات وبنسبة (0.98%) تعود عزلتين منها الى النوع *Shigella flexneri* وعزلة واحدة للنوع *Shigella sonnei*.

الفحص المجهري و اختبار الحركة:

أظهرت الفحص المجهري للشرائح المحضرة من مستعمرات هذه البكتريا المصبوغة بصبغة كرام بأنها عصوية الشكل الى كروية coccobacilli ذات لون احمر الى وردي (سالبة لصبغة كرام) و بهيئة خلايا مفردة او مزدوجة او ثلاثية، كما في الشكل(1) و أظهرت العزلات الثلاثة عدم قابليتها على الحركة .

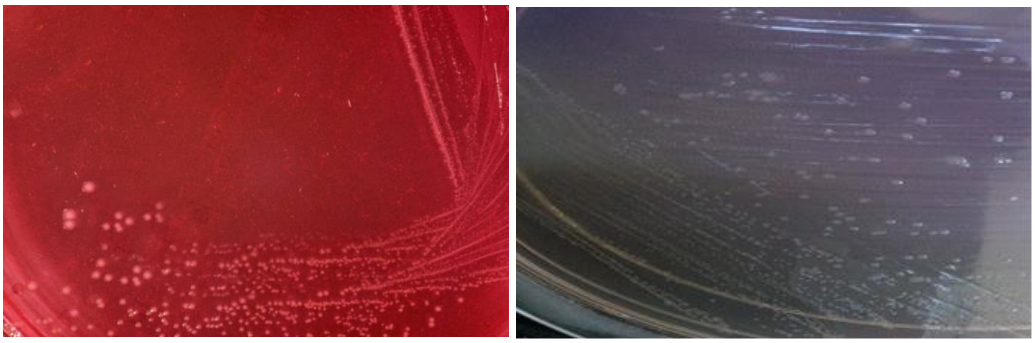
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

التشخيص الكيموحيوي:

بينت نتائج الاختبارات الكيموحيوية الموضحة في الجدول(1) انها تتطابق مع صفات جرثومة شيكلا ، ودعمت نتائج الاختبارات الكيموحيوية بأستخدام نظام API 20E كما مبين في الاشكال(3،2)، وتم تشخيص العزلات مصليا،اذ أعطت عزلتين منها تفاعلا موجبا مع المصل المناعي القياسي(Anti-shigella flexneri polyvalent (1-6, x,y ، في حين أعطت العزلة الثالثة تفاعلا موجبا مع المصل المناعي Anti-Shigella sonnei polyvalent وذلك من خلال ظهور التلازن عند دمج الامصال المضادة مع المعلق الجرثومي. جدول(2)

اختبار تخمر السكريات:

اختبرت قابلية العزلات على تخمر مجموعة من السكريات الأحادية و أعطت العزلة *Sh.flexneri-1* نتيجة موجبة لتخمر المالتوز فقط و سالبة لتخمر بقية السكريات ، في حين العزلة *Sh.flexneri-2* أعطت نتيجة موجبة لتخمر كل من رافينوز و المالتوز و سالبة لتخمر بقية السكريات . اما بالنسبة للعزلة *Sh.sonnei* فقد تمكنت من تخمير جميع السكريات المستخدمة ماعدا الزايلوز . جاءت نتيجة التشخيص الزرعي و المجهري و الكيموحيوي مطابقا للمواصفات التشخيصية المعتمدة في تشخيص بكتريا *Shigella* . يوضح الجدول(1) ملخص نتائج تشخيص هذه البكتريا.



وسط MAC　　وسط XLD

الشكل(1): مستعمرات جرثومة شيكلا على وسط MAC و XLD .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

الشكل(2): الفحص المجهري

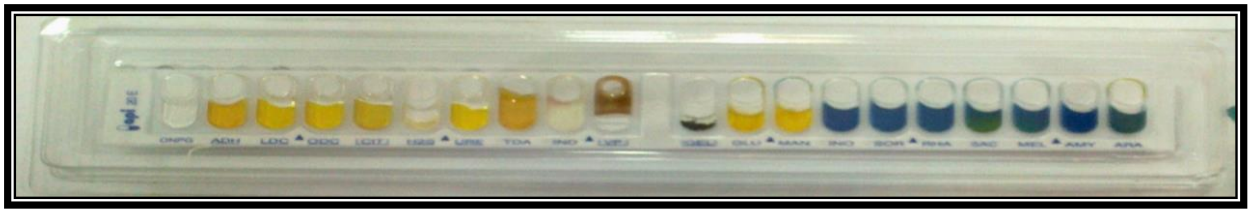
جدول(1): نتائج الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص افراد جنس الشيكلا.

النوع	صبغة كرام	اختبار الحركة	اختبار الاوكسيديز	اختبار الكتاليز	TSIA				تحلل اليوريا	انتاج الاندول	استهلاك السترات	تخمر السكريات							
					H_2S	انتاج CO_2	Butt	Salt				كلكوز	لاكتوز	رافينوز	مانوز	سوربيتول	رابيوز	مالتوز	زايلوز
Sh.flexneri-1	–	–	–	+	–	–	A	K	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–
Sh.flexneri-2	–	–	–	+	–	–	A	K	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	–
Sh.sonnei	–	–	–	+	–	–	A	K	–	–	–	+	+ ببطئ	+	+	+	+	+	–

(+) موجبة للفحص ، (–) سالبة للفحص ، (K) حامض ، (A) قاعدي

الشكل(3) : يوضح التشخيص جرثومة *Sh. Sonnei* باستخدام نظام Api 20E

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849



الشكل(4) : تشخيص جرثومة *Sh.flexneri* باستخدام نظام Api 20E

جدول(2): التخطيط المصلي لأنواع جنس الـ *Shigella* .

Shigella spp.	المجموعة المصلية	النسبة المئوية
Sh.flexneri	B	%0.65
Sh.sonnei	D	%0.33
المجموع الكلي		% 0.98

دراسة بعض صفات الضراوة في بكتريا الشيكلا خارج الجسم الحي Invitro

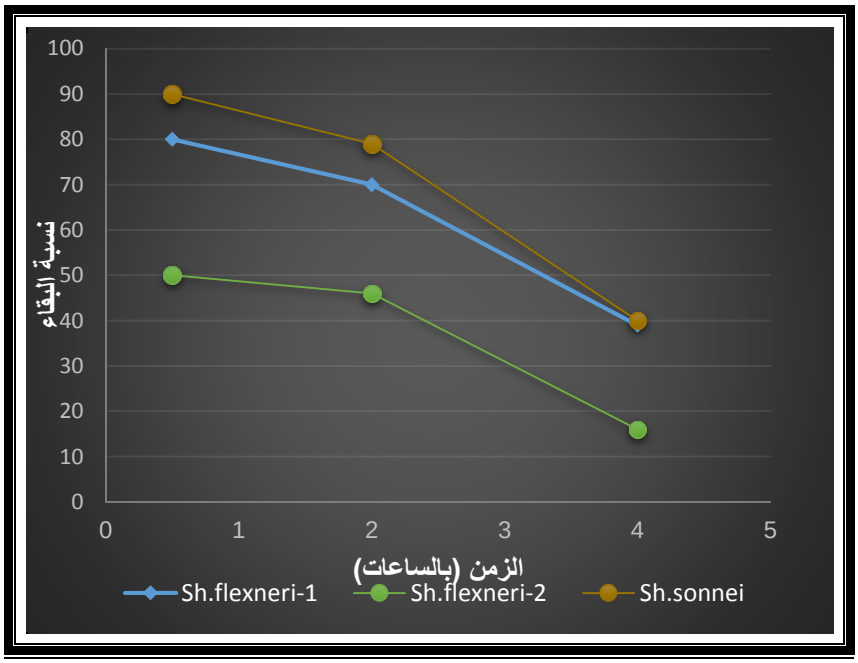
لأجل تقييم مدى الضراوة لجرثومة شيكلا ، اجريت سلسلة اختبارات خارج الجسم In-vitro و التي من الممكن ان تسهم في امراضية بكتريا Shigella داخل الجسم الحي In-vivo ، وشملت هذه الاختبارات:

1-اختبار تحمل الحامضية ($PH_{2.5}$)

اظهرت النتائج كما موضح في الشكل(5) ، ان معدلات البقاء لعزلات *Shigella* قد تباينت بشكل واسع خلال الفترات الزمنية للتحضين في الظروف الحامضية (PH2.5) ، فقد تراوح التباين في معدلات البقاء من (16-79%) ،كما و بينت النتائج ان عزلة *Sh.sonnei* كانت اكثر مقاومة للظروف الحامضية مقارنة مع العزلتين من النوع *Sh.flexneri* اذ بلغت النسبة المئوية لبقائها (79%) بعد ساعتين من الحضن و (40%) بعد اربع ساعات .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

وعند المقارنة بين العزلتين من نوع *Sh.flexneri*، فقد بينت النتائج ان العزلة *Sh.flexneri-1* كانت اكثر مقاومة من العزلة *Sh.flexneri-2* اذ بلغت نسبة مقاومتها (70%) بعد ساعتين من الحضن و(39%) بعد اربعة ساعات من الحضن .اما العزلة *Sh.flexneri-2* فقد بلغت نسبة مقاومتها (46%) بعد ساعتين من الحضن، و(16%) بعد اربع ساعات من الحضن.



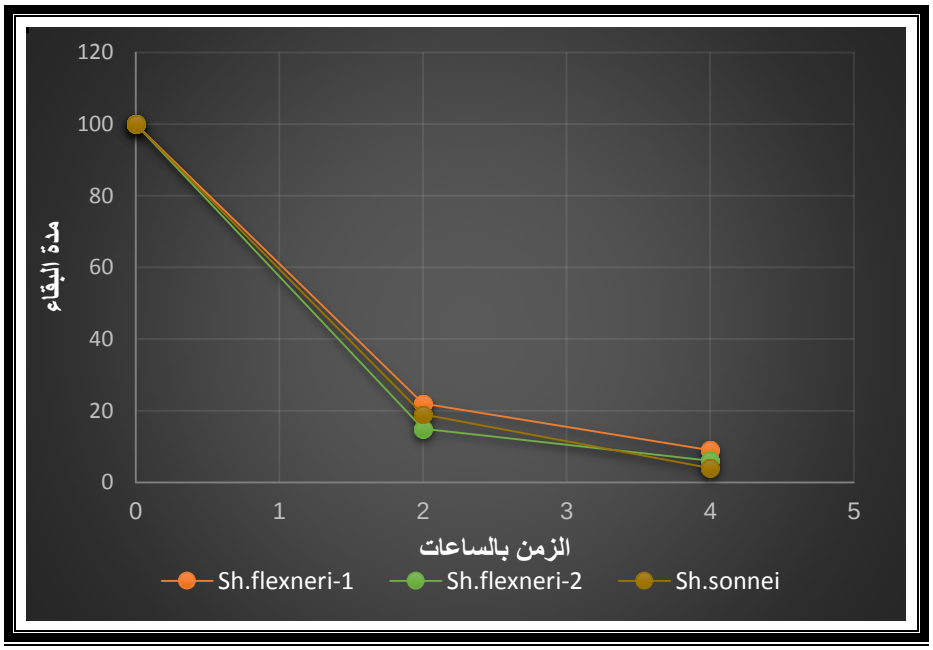
الشكل(5): التباين في معدلات النسب المئوية لأعداد الخلايا الجرثومية لجرثومة شيكلا تحت الظروف الحامضية ($PH_{2.5}$) بعد فترات زمنية (ساعتان وبعد 4ساعات) من الحضن.

2- اختبار تحمل القاعدية ($PH_{9.8}$)

اظهرت النتائج وكما هو موضح في الشكل(6) وجود بعض الاختلافات في معدلات البقاء تحت الظروف القاعدية خلال الفترات الزمنية للتحضين، اذ لوحظ ان العزلة *Sh.flexneri-1* كانت أكثر مقاومة من العزلة *Sh.flexneri-2* والعزلة *Sh.sonnei*، فقد بلغت معدل البقاء لنوع *Sh.flexneri-1* (22%) بعد ساعتين من الحضن، و (9%) بعد اربع ساعات من الحضن، في حين بلغت معدل بقاء النوع *Sh.flexneri-2* (15%) بعد ساعتين من الحضن و (6%)

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

بعد اربع ساعات من الحضن.اما عزلة *Sh.sonnei* فقد كانت معدل بقائها (19%) بعد ساعتين من الحضن و (4%) بعد اربع ساعات من الحضن.



الشكل(6): التباين في معدلات البقاء لعزلات الشيكلا عن الظروف القاعدية (PH 9.8) بعد فترات (ساعتين وأربعة ساعات).

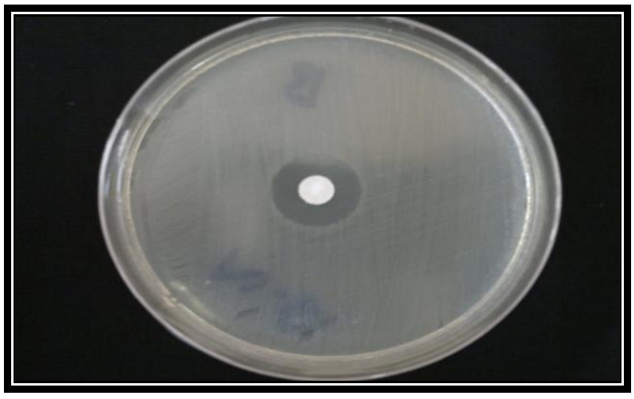
3-مقاومة عزلات الشيكلا للمركبات الاوكسجينية الوسيطة الفعالة لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 :

بينت نتائج الاختبار وكما هو موضح في الجدول(3) ان عزلات الشيكلا اظهرت مقاومة لمادة بيروكسيد الهيدروجين و بدرجات متباينة قليلا . الشكل(4) و (5) ، اذ بلغ معدل قطر التثبيط حول القرص المشبع بمادة H_2O_2 للعزلة *Sh.flexneri-1* و العزلة *Sh.flexneri-2* (18-22) ملم على التوالي ، و بلغ معدل قطر التثبيط للعزلة السونية (16)ملم.

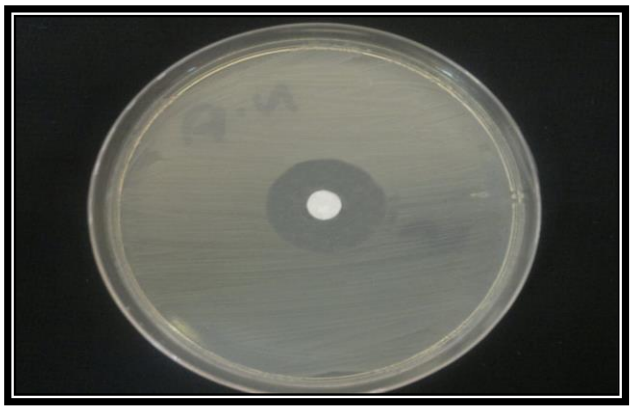
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

الجدول(3):اختبار مقاومة عزلات الشيكلا لمادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% .

النوع	قطر منطقة التثبيط لانواع الشيكلا(بالملم)
	المعدل + الخطاء القياس
Sh.flexneri-1	18+ صفر
Sh.flexneri-2	22 + صفر
Sh.sonnei	16 + صفر



الشكل(7): تأثير بيروكسيد الهيدروجين على العزلة *Sh.flexneri-1*.



الشكل(8): تأثير بيروكسيد الهيدروجين على العزلة *Sh.flexneri-2* .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

4- اختبار المقاومة للأملاح الصفراء و تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لها :

حدد التركيز المثبط الادنى (MIC) للأملاح الصفراء ضد عزلات الشيكلا اذ بلغت التركيز المثبط الادنى للأملاح الصفراء ضد العزلة السونية 12%، في حين بلغت التركيز ضد كل من العزلة *Sh.flexneri-1* و*Sh.flexneri-2* (9%-6%) على التوالي. وكما هو موضح في الجدول(4).

جدول(4): يبين التركيز المثبط الأدنى (MIC) للأملاح الصفراء ضد عزلات الشكيلا.

النوع	التركيز المثبط الأدنى للأملاح الصفراء
Sh.flexneri-1	%9
Sh.flexneri-2	%6
Sh.sonnei	%12

5.المناقشة (Discussion)

العزل و التشخيص:

أوضحت نتائج الفحوصات الكيموحيوية و فحص Api20E ان (3) عزلات بكتيرية أظهرت عائديتها لجنس *Shigella* و بنسبة (0.98%) ، تعد نسبة العزل في الدراسة الحالية منخفضة مقارنة ببعض الدراسات المحلية كدراسة [18] في مناطق مختلفة من بغداد و دراسة [20] في البصرة، اذ عزلوها بنسب (4.26%) و (1.4%) على التوالي . و في بعض الدول العربية كمصر و الاردن و المملكة العربية السعودية بلغت نسبة العزل لجرثومة *Shigella* في الدراسات التي أجريت في مناطق معينة من تلك الدول (17%) و (0.13%) و(44%)على التوالي.[9] و[21] و[22]. ان سبب تباين نسبة العزل ربما يعود الى عدة عوامل منها ازدهار السكان و الوعي الصحي و الحالة الاجتماعية و طبيعة المناخ ، اذ ان تباين حالات الإصابة بالشيكلا و غيرها من الامراض المعدية من سنة الى أخرى و من فصل الى اخر يعزى الى

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

اختلاف التغاير الموسمي على نحو كبير من بلد الى اخر و من سنة الى أخرى. أظهرت نتائج التشخيص المصلي للعزلات الثلاثة عائدية عزلتين منها الى النوع *Sh.flexneri* و الذي يعود الى النمط المصلي (B) و عزلة واحدة الى النوع *Sh.sonnei* و الذي ينتمي الى النمط المصلي (D) .

وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع العديد من الدراسات المحلية في شيوع هذين النوعين [23]، كما واتفقت مع العديد من الدراسات في الدول العربية كاليمن والاردن و مصر وسلطنة عمان.[21] و [24] و [25] و [26].

كما وتتطبق مع العديد من الدراسات العالمية في العديد من البلدان كاندنوسيا والولايات المتحدة الامريكية والبرازيل واليابان ونيبال وإيران والهند.[26] و [27] و [28]. ان سيادة نوع دون الاخر قد يعود الى صفات النمط وقابليتها على مقاومة الظروف البيئية في منطقة معينة.

دراسة بعض صفات الضراوة لجراثيم الشيكلا خارج الجسم الحي:

تمتلك جراثيم شيكلا العديد من الصفات التي تساهم بشكل مباشر او غير مباشر في زيادة فوعتها وإمراضيها [29]

1- صفة المقاومة للحامضية (PH 2.5) و القاعدية (PH 9.8) Acide & base Resistance in Shigella

ان صفة المقاومة للحامضية و القاعدية لها أهمية سريرية كون الجرثومة المعوية تتعرض داخل الجسم الى محتويات المعدة الحامضية القوية (PH_1 الى PH_2) و كذلك تتعرض الى الافرازات القلوية (PH_9 او اكثر) من قناة البنكرياس التي تقع اعلى المعي الصغيرب[6]. أجريت في الدراسة الحالية اختبار مقاومة عزلات شيكلا الثلاثة Sh.sonnei, *Sh.flexneri-2* , *Shflexneri-1* للظروف الحامضية (PH2.5) و الظروف القاعدية (PH9.8) خلال فترات زمنية (2 ساعة ، 4 ساعات) كون هذه الظروف مماثلة للحالة الطبيعية للمعدة ، مستخدما خلايا طور الثبوت Stationary phase cells ، و يمكن تعريف صفة المقاومة للحامضية و القاعدية بانها النسبة المئوية لبقاء الخلايا الجرثومية بعد مرور اكثر من ساعتين من تحضين في وسط زرعي ذو دالة حامضية $PH_{2.5}$ او $PH_{9.8}$ ، بحيث لا تقل النسبة عن 10%. أظهرت النتائج كما موضح في الاشكال(7-2) و(7-3)، وجود تباين في معدلات النسبة المئوية لبقاء الخلايا الجرثومية لعزلات شيكلا بعد مرور ساعتين و اربع ساعات من الحضن في تلك الظروف فقد بلغت النسبة المئوية للبقاء

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

بعد مرور ساعتين من الحضن في $PH_{2.5}$ (%79,%46,%70) للعزلات الثلاثة على التوالي ، الا انه بعد مرور اربع ساعات من الحضن انخفضت نسبة البقاء الى (%40,%16,%39) لكل منهم على التوالي . اما بالنسبة لنسبة البقاء في لظروف القاعدية فقد بلغت (%19,%15,%22) بعد مرور ساعتين و انخفضت الى (%4,%6,%9) بعد مرو 4 ساعات من الحضن لكل من العزلات الثلاثة على التوالي . كما لوحظت من خلال النتائج وجود تباين بين النوع *Sh.sonnei* , *Sh.flexneri* في معدلات البقاء اذ تراوحت معدلات البقاء تحت الظروف الحامضية $PH_{2.5}$ للنوعين من (%16–%79) و تحت الظروف القاعدية $PH_{9.8}$ تراوحت معدلات البقاء بينهم (%4–%22) .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة الباحثان [30] اذ تراوحت معدلات البقاء في دراستهم (%13–%102) بين أنواع شيكلا ، كما و تباينت معدلات البقاء في دراستهم خلال الفترات الزمنية المختلفة ، اذ كان اعلى معدلات البقاء بعد مرور ساعتين من الحضن في $PH_{2.5}$ كما و تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه الباحث [6] وجماعته في دراستهم حول اختبار مقاومة عزلات شيكلا لظروف الحامضية و القاعدية ، اذ وجدوا ان المقاومة تقل بعد مرور اكثر من ساعتان من التعرض ، كما ولاحظوا ان مقاومة عزلات شيكلا لظروف الحامضية كانت اكثر مقارنة بمقاومتها لظروف القاعدية ، وهذا يتفق مع نتائجنا .

ان القدرة العالية التي تمتلكها جرثومة شيكلا لمقاومة الظروف الحامضية يعزى الى امتلاكها لمسارين مختلفين لمقاومة الحموضة مشابهة لتلك الموجودة في جرثومة *E–coli* ،هما :

1– مسار الاكسدة Oxidative pathway

وهي مسار مقاومة الحموضة في طور الثبوت ، المحفز بالحموضة و المثبط بالكلكوز Stationary–phase acid–inducer,glycose–repressed oxidative pathway يلعب عامل سيكما σ التي تشفر له الجين rpos و المستقبل البروتيني للمركب الحلقي Cyclic Amp receptore protein دورا مهما في تنظيم هذا المسار .

2– مسار مقاومة الحموضة في طور الثبوت و المعتمد على الكلوتامين

Stationary–phase, glutamate–dependent acid Resistana (GDAR) pathway.

تتحفز هذا المسار بنمو الخلايا في PH5 و في ظروف تخمر و هي نظام كربلة الحامض الاميني الكلوتامين ،على الرغم

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

من اختلاف هذه الأنظمة او المسارات الا انها جميعها تشترك فيها في إعطاء جراثيم شيكلا اقصى مقاومة للحموضة و القاعدة.[31] و [32]

2-مقاومة بكتريا شيكلا لمركبات الأوكسجينية الوسطية الفعالة (بيروكسيد الهايدروجين H_2O_2) و الاملاح الصفراء Bile salts

تم اختبار قابلية عزلات بكتريا الشيكلا على مقاومة مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 . بينت نتائج الاختبار ان عزلات شيكلا الثلاثة قد أظهرت مقاومة لمادة بيروكسيد الهيدروجين و لكن بدرجات متباينة قليلا. اذ كانت العزلة *Sh.sonnei* اكثر مقاومة لمادة H_2O_2 مقارنة مع عزلتي النوع *Sh.flexneri* .الاشكال(7و8)

و تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث [33] في دراستهم على تحمل *Sh.flexneri* و *Sh.sonnei* للحموضة و الضغوط التأكسدية وجد الباحث ان كلا نوعي من الشيكلا أظهرت مقاومة للاستجابة التحملية التاكسدية Oxidatire tolenace response (GTR) الا ان تحمل النوع *Sh.sonnei* لتلك الضغوط كانت اعلى مقارنة مع النوع *Sh.flexneri* . كما وتتفق مع الدراسة المحلية للباحثة [34] التي اشارت الى وجود تباينات قليلة معنوية في مقاومة عزلات السالمونيلا لمادة H_2O_2 .

واشارت العديد من الدراسات الى ان جرثومة الشيكلا تتعرض الى العديد من البيئات المختلفة داخل سايتوسول الخلايا الظهارية و البلعمات الكبيرة Macrophage اذ تحتوي هذه البيئات على مستويات عالية من المركبات المؤكسدة مثل Superoxide و H_2O_2 و البيروكسيدات العضوية ، فضلا عن ما تنتجه من الفلورة الطبيعية الموجودة في القولون من هذه المركبات الاوكسجينية الفعالة و الاملاح و التي تسبب ضغوط تاكسدية Oxidative stress تسبب في تحطيم العديد من المركبات الحيوية داخل الخلايا و بالتالي تتعطل العمليات الخلوية [32] و أظهرت تحليلات DNA microarray ان سبب مقاومة الجراثيم لهذه الضغوطات يعزى الى ان العديد من الجينات التي تتضمنها أنظمة الدفاع التأكسدية Oxidative defense system التي تمتلكها الجراثيم المعوية و منها جرثومة شيكلا سوف تتحفز عند تعرض هذه الجراثيم المعوية للمركبات الاوكسجينية و النتروجينية الوسطية الفعالة و منها:

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

1- الجينات التي تشفر لمنظمات ضغط خاصة Specific stress regulators .

2- الجينات التي تشفر لإنتاج الانزيمات المضادة لسموم هذه المركبات مثل Super oxide dismutase detoxifyiny.

3- الجين التي تشفر لأنزيم الكتاليز Catalase الذي يحمي الجرثومة من تاثيرات بيروكسيد الهيدروجين .

4- الجينات التي تشفر لإنتاج مركبات كاسحة Scavengers مثل Homocystine , Gluthions .

5- الجينات الخاصة بانظمة تصليح DNA .[35] و [36]

حددت التركيز المثبط الأدنى MIC للاملاح الصفراء ضد عزلات الشيكلا الثلاثة و أظهرت النتائج وجود اختلاف في MIC بين العزلات ، اذ بلغت التركيز المثبط الأدنى للاملاح الصفراء ضد العزلة *Sh.sonnei* (12%) في حين و صلت MIC ضد العزلتين *Sh.flexneri-1* و *Sh.flexneri-2* (6,9%) على التوالي ، الجدول(4) .

واشارت عدد من الدراسات الى ان مقاومة عزلات الشيكلا للاملاح الصفراء يعود الى امتلاك هذه الجراثيم للبروتين IpaD التي تقع على قمة النظام الافرازي الثالث Type III secretion system و في جراثيم سالمونيلا يعزى الى امتلاكها للنظام الانزيمي PhoP-PhoQ فضلا عن هذه الأنظمة فان الجراثيم المعوية تحتوي على (ELA) Enterobacterial common antigenالذي هو عبارة عن ليبيدات سكرية يوجد في الغشاء الخارجي في كل افراد العائلة المعوية . جميع هذه الأنظمة تلعب دورا مهما في مقاومة الجراثيم للاملاح الصفراء، و في ضراوتهم في الفئران [8] و [37].

المصادر (References)

[1] C. Grodin, P. Imbert, C. Ficko, A. Merens, F. Dutasta, C. Bigaillon, et al (2012). ***Shigella flexneri bacteremia in two immune-competent adult travelers***. J Travel Med. 19(4):258-60.

[2] T. Noda , S. Kageyama, N. Fujita, T. Yoshimori (2012). ***Three-axis model for Atg recruitment in autophagy against Salmonella***. Int. J. Cell. Biol, 389562.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

[3] , A. Phalipon; and ,P.J. Sansonetti (2007) ***Shigella s ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system*** :a tool box for survival ?Immunaol cell Biol 85,119-129.

[4] J. Mardaneh.; S.A. Poor; P. A Frugh (2013). ***Prevalence of Shigella species and Antimicrobial Resistance of patterns of Isolated strains from Infected Pediatrics in Tahran***. Int J Enteropathog.1:28-31.

[5] R. A. Gianella; S. A Brotman.; and, N. Zamcheck (1972). ***Gastric acid barrier to ngested microorganisms in man***: studies in vivo and in vitro. Gut. 13, 251-256.

[6] P. Small; D. Blankenhorn; D. Welty; E. Zinser; & J. L. Slonczewski, (1994).***Acid and base resistance in Escherichia coli and Shigella flexneri***: role of rpoS and growth pH. J Bacteriol 176, 1729–1737.

[7] A.C .Allan.; M .Lapidot.; J.N Culver.; R. Fluhr (2001) *An early tobacco oxidative burst in tobacco indicates extracell-ular perception of the virus coat protein*. PlantPhysiol.126:97-108.

[8] A.M. Prouty, J.C. Van Velkinburgh; and J.S. Gunn; (2002) ***Salmonella entcrica*** **serovar*Typhymarium*** resistance to bilei identification and characterization of the tol QRA cluster.J Bacteriol 184:1270-1276.

[9] M. O .Ahmed; P. D. Clegg; N. J. Williams; K. E. Baptiste; and M. Bennett, .(2010). ***Antimicrobial resistance in equine faecal Escherichia coliisolates from North West England***. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.9:12.

[10] Y. Germani.; P.J. Sansonetti, (2006). The genus Shigella. In: M, Dworkin

, E. Rosenberg, KH. Schleifer and E. Stackebrandt (eds). ***The Prokaryotes. Ahandbook of the biology of bacteria New York***: Springer Science + Business Media Inc. p. 99-116.

[11] J.A. Morello;,P.A Granato; H.E Mizer.(2003). ***Labratory manual and workbook in microbiology***.7th ed.spiral Bound/comb/304pages.

[12] S. Kiro(2003).Gram-negative enteric rods. ***Pharmacy 11-Microbiology***-[13]CJA211.

[13] D.R. Kumar(2007). ***Diagnostic microbiology*** (forDMLTstudent),J.P.Medical publishers(p), LTD,new Delhi.

[14] J.F MacFaddin.(1985). Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria,: 1st ed., vol. 1, pp. 263, 535, 540, 564, 620. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.

[15]S. Lu;A.R. Manges;Y. Xu;F.S. Fang andL.W. Riley (1999). ***analysis of virulence of clinical isolates of Salmonella entertidis in vivo and in vitro***.Infect.Immun.67(11):5651-5657.

[16]J. C. Van Velkinburgh; J. S. Gunn, (1999). PhoP–PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in ***Salmonella*** spp. Infect Immun 67: 1614–1622

[17] نظمية حمود حسين السليم، (2006). ***دراسة تأثير عملية الالتصاق على ألية الخمج لبكتريا Shigella flexneri***. رسالة ماجستير . كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.

[18]M.F. Ibraheem; Z.A. Ali.; D.H Saeed .(2010). *Shigella* gastrointestinal in children with acute diarrhea in children welfare teaching hospital.The Iraq postgraduate Medical Journal.Vol 9.lecture:4. Abed Elkader, E.(2010).Diagnostic microbiology Enterobacteriaceae

[19] F Hayder.mohammed.(2001). *campylobacter jejuni gastroenteritis in children in basrah*.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

athesis submitted to the Iraqi commission for medical specialization in partial fulfillment of the requirement for the degree of fellowship of the Iraqi commission for medical specialization inpediatrics.1-36.

[20] A.F. Kagalwalla; S.N. Khan; Y.A. Kagalwalla; S. Alola; H.V. Yaish, (1992). Childhood shigellosis in Saudi Arabia Pediatr Infect Dis J. 11:215-219.

[21] M.N. Battikhi (2004) Bloody diarrhea cases caused by Shigella and amoeba l- Jordan.Microbiol;27(1):37-47.22, M. A. Mohammed; J.J. Deeks,; A. Girling.; G .Rudge.; M. Carmalt ; A. J.Stevens; R. J. Lilford, (2009).Evidence of methodological bias in hospital standardized mortality ratios: retrospective database study of English hospitals.338:b780.

[23]S.M. Banajeh;N.H.. Ba-Oum; and,R.M.. Al-Sanabani (2001) Bacteria aetiolo-gy and antimicrobial resistance to childhood diarrhea in Yemen.J.Trop.Rediatr,47:301-303.

[24]R.Remon,.; F. Thomas;W. Wierzba,Robert; Framck.(2004). epidemiology of *Shigella* associated diarrhea in rural Egyptian children.am.J.trop.med.hyg.71:367-70.

[25] S. Patel; S. M. Peacock; R. K. McKinley; D. Clark-Carter; & P. J. Watson(2008). GPs' experience of managing chronic pain in a South Asian community: A qualitative, study of theconsultation process. Family practice. 77-71,25.

[26] D. Bhattacharya; G. Rajinder, (2005). ***Nanotechnology and potential of microorganisms***. Crit Rev Biotechnol. 25: 199-204.

[27] SN1 Ghaemi; W.S. Gilmer; J.F. Goldberg; B. Zablotsky; D.E. Kemp; (2007). M.E. Kelley; A.D. Bauer; J. Fleck; M.M. Filkowski, , V.A. Stan; R.T. DunnDivalproex in the treatment of acute bipolar depression: a preliminary double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study.J Clin psychiatry.68(12):1840-4

[28] D. Bhattacharya; A.P. Sugunan; R. Haimanti Bhattachar Jee; and other aur thors . (2012) .Antimicro bial resistance in *shigella rapid* increaseand widening of spectrum in Andaman Island , India .J Med Res.135:365-370.

[29] I. Ofek; H.S. Courtney; D.M Schifferti; and E.H. Beachey, (1986). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for adherence of bacteria to animal cells. J. Clin. Microbiol.pp.55-516:24.

[30] P. Gorden; and P.L. Small, (1993). Acid resistance in enteric bacteria Infection and Immunity.61(1): 364-367.

[31] H. Weber; T. Polen‹; J. Heuveling; V. F.; Wendisch, & R. Hengge(2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: ss-dependent genes, promoters and sigma factor selectivity. J Bacteriol 187, 1591-1603.

[32]A. Jennison; & N.K. Verma (2007), 'The acid resistance pathways of Shigella flexneri 2457T', Microbiology (UK), vol. 153, pp. 2593-2602.

[33] A.A. Aziz (2006).Induceible tolerance to acid and oxidative stresses and crossprotectionresponses in ***Shigella sonnei*** and ***Shigella flexneri*** university technology mara.

[34] هاجر علي شريف ، (2006). ***دراسة بعض عوامل الضراوة لجراثيم سالمونيلا المعزولة من المرضى في مدينة كركوك ومقاومتها مع بعض السلالات القياسية***. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم/ جامعة الموصل.

[35] A. Daugherty; A.E. Suvarnapunya; and L. Runyen-Janecky(2012) ***The flexneri. Microbiol*** Res.167(4):238-245.Role of OxyR and SoxRS in oxidative stress survival in *Shigella*

[36] J.A. Imlay (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 2, June 2015 , p.p(129-151)
ISSN 1992 – 0849

Annu Rev Biochem.;77:755–776

[37]A.R., Moss, J.P. Jouany and J. Newbold, 2000. ***Methane production by ruminants:*** Its contribution to global warming. Ann. Zootech.,49: 231-253.

المؤلف

سارة صباح غريب : خريجة كلية العلوم _ قسم علوم الحياة، سنة التخرج 2010 ، حاصلة على شهادة الماجستير سنة 2015 في مجال الاحياء المجهرية ، وحاليا محاضرة في كلية التربية للعلوم الصرفة.