نشانگان ازدیاد عفونت (Hyperinfection) ناشی از استرونژیلوئیدیازیس در استان خوزستان و بررسی ویژگیهای مولکولی ایزوله های جدا شده از بیماران

محمد رضا نیلفروشان[۱]، عشرت بیگم کیا[۲*]، سید حسین میرهندی[۳]، ساسان رضایی[۳]، ایرج موبدی[۴]، شریف مراغی[۵]

۱. دانشجوی دوره دکترای انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. **Ph.D** انگل شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. **Ph.D** انگل شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. **Ph.D** انگل شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵. **Ph.D** انگل شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی اهواز

* نشانی برای مکاتبه: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت-دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن ۰۹۱۲۳۱۶۵۵۷۱ ، eshratkia@yahoo.com
دریافت مقاله: آبان ماه هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: اسفند هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *استرونژیلوئیدس استرکورالیس (Strongyloides stercoralis) نماتد روده‌ای مهم انسان است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از شیوع بالاتری برخوردار است. اگرچه آلودگی به این کرم در بیشتر افراد بدون علامت است اما در بیمارانی که سیستم ایمنی آنها به هر دلیل سرکوب شده است، ممکن به شکل ازدیاد عفونت (hyperinfection) یا عفونت منتشر (disseminated) در آید که اگر به موقع درمان نشود مرگ بیمار را بدنبال دارد. با توجه به افزایش تعداد بیمارانی که با نقص سیستم ایمنی روبرو هستند یا از داروهای ایمنوساپرسیو استفاده می‌کنند، استرونژیلوئیدیازیس به ویژه موارد ازدیاد عفونت آن از مشکلات بهداشتی کشور بحساب می آید. این تحقیق به منظور تعیین ویژگیهای مولکولی ایزوله های جدا شده از بیماران مبتلا به استرونژیلوئیدیازیس در استان خوزستان انجام شد.*

مواد و روش ها : *در این مطالعه توصیفی ۲۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به برخی بیمارستانها وآزمایشگاههای تشخیص طبی استان خوزستان طی سالهای ۸۳- ۸۵ جمع أوری و از نظر آلودگی به استرونژیلوئیدس استرکورالیس بررسی شد. سپس از نمونه های مثبت لاروهای فیلاریفرم جدا گردید. به منظور بررسی مولکولی ایزوله‌ها، DNA لاروها استخراج شد و ناحیهٔ ITS1 مربوط به آنها با روش PCR تقویت شد.*

یافته ها : *۶ بیمار آلوده به استرونژیلوئیدس استرکورالیس بودند و همگی از سندرم ازدیاد عفونت رنج می برند. . محصولات حاصل از فرآیند PCR مربوط به ایزوله های بدست آمده از این بیماران پس از تعیین توالی و مقایسه با توالی‌های ارایه شده به بانک ژن (GenBank) همگی به عنوان استرونژیلوئیدس استرکورالیس شناسایی شدند.*

نتیجه گیری : *یافته‌های این مطالعه علاوه بر تأکید بر اهمیت بهداشتی این نماتد فرصت طلب در استان خوزستان ، کاربرد روشهای مولکولی در شناسایی دقیق کرم و حتی بررسی تفاوتهای درون گونه‌ای این انگل را مورد بررسی قرار می دهد.*

واژگان کلیدی : ***استرونژیلوئیدیازیس، hyperinfection ، PCR ، ITS1، خوزستان***

مقدمه

استرونژیلوئیدس استرکورالیس (Strongyloides stercoralis) نماتد روده‌ای انسانی دارای انتشار جهانی است ولی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شیوع بالاتری دارد. انسان از طریق لارو مرحله سوم یا فیلاریفرم این انگل آلوده می‌شود. کرم بالغ ماده در روده باریک زندگی می‌کند و در بیشتر افراد، بیماری بدون علامت است (۱ و ۲) . عفونت در بیمارانی که سیستم ایمنی آنها بدلیل داشتن بیماریهای اتوایمیون، بدخیمی، لنفوم، هوچکین یا استفاده از کورتیکوستروئیدها سرکوب شده است، ممکن است به شکل ازدیاد عفونت یا عفونت منتشر در آید که اگر درمان نشود، ۸۰٪ مرگ و میر را بدنبال دارد. از اینرو تشخیص دقیق و درمان به موقع این عفونت می‌تواند از مرگ بیمار جلوگیری کند (۵-۳). با توجه به شباهت خصوصیات ریخت شناسی این انگل با تعدادی از کرمها و عدم تشخیص همه موارد آلوده با استفاده ازروشهای رایج انگل شناسی ، اخیراً روشهای مبتنی بر کاربرد DNA در شناسایی، تاکسونومی و فیلوژنتیک این کرم مطرح گردیده است. از جمله قطعات DNA برای این کار، DNA ریبوزومی است. DNA ریبوزومی در هسته موجودات یوکاریوتیک یک مجموعه ژنی بزرگ شامل جفت توالیهای تکرار شونده منظم است که معمولاً به طور گروهی در کروموزوم دیده می‌شوند. هر واحد شامل ژنهای کد کننده (coding) ۵/۸S، ۱۸S و ۲۸S و توالیهای جدا کننده بین نواحی کد کننده موسوم به ITS است (۹-۶).

با توجه به اینکه استرونژیلوئیدس استرکورالیس از نماتدهای بومی استان خوزستان بوده است و به علت افزایش مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی به ویژه کورتیکوستروئیدها خطر وقوع اشکال خطرناک این بیماری در افراد مبتلا وجود دارد، این مطالعه به منظور بررسی اولیه بروز این موارد در استان خوزستان و بررسی مولکولی ایزوله ها انجام گرفت.

روش کار

در این مطالعه توصیفی ۲۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مراجعه کننده به برخی بیمارستانها و آزمایشگاههای تشخیص طبی استان خوزستان طی سالهای ۸۳- ۸۵ جمع آوری شد. نمونه ها با استفاده از روش گسترش مستقیم ، رسوبی فرمالین اتر و کشت در محیط نوترنیت آگار از نظر آلودگی به استرونژیلوئیدس استرکورالیس مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مدفوع روی پلیت حاوی محیط کشت آگار مغذی (nutrient agar) کشت داده شده و پس از ۷۲ ساعت لاروهای فیلاریفرم رشد یافته از سطح آگار جمع آوری و برای استفاده در مراحل بعد در الکل ٪۷۰ درصد نگهداری شدند.

برای استخراج DNA ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز شامل(Tris-Hcl 10 mM, EDTA 20 mM, Nacl 100 mM) ۲۵ میکرولیتر SDS ٪۱۰ و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به تیوب اپندورف حاوی حدود ۲۵۰ میکرولیتر نمونه لارو جمع آوری شده اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آبی ۵۶^{o}c قرار داده شد. سپس محلول فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل به محلول فوق افزوده شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ ، مایع رویی جداسازی و با کلروفرم شسته شد. آنگاه ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار و یک حجم دو- پروپانل اضافه شد. محصول این مرحله به مدت ۱۰دقیقه در ۲۰ ^{o}c- گذاشته شد و آنگاه در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. دراین مرحله مایع رویی جدا و به رسوب حاصله ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ اضافه شد و پس از سانتریفوژ مجدد الکل ۷۰ جداسازی و به رسوب ۵۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد.

برای تقویت بهینه DNA مورد نظر یعنی ناحیهITS1 در این مطالعه از روش nested-PCR استفاده شد. بدین منظور دو جفت پرایمر با توالی زیر برگزیده شد. برای انجام اولین PCR پرایمرهای رفت -'5: SS-FO ATC CTT CCA ATC GCT GTT GT-3') و برگشت (-SS RO:5'-TTT CGT GAT GGG CTA ATT CC-3') و برای دومین PCR پرایمرهای رفت SS-F1(5'-GTA ACA AGG TTT TCG TAG GTG A-3') و برگشت S-R1(5'-ATT TAG TTT CTT TTC TCT CGC TT-3') مورد استفاده قرار گرفت .

به منظورانجام PCR مرحله اول، ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده به تیوبهای ۰/۲ میلی لیتر حاوی ۲/۵ میلی مولارکلرید منیزیم، ۱۰۰ میکرومولار دینوکلوزید تری فسفات ، 5 میکرولیتر بافر PCR ، 1/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۲۰ پیکو مول از هر کدام از پرایمرها اضافه گردید و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

در PCR اول نمونه ها در ۹۴ ^{o}c به مدت ۵ دقیقه به منظور denaturation اولیه و سپس ۹۴ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ ^{o}c به مدت ۳۰ ثانیه برای anealing و ۷۲ ^{o}c به مدت ۱ دقیقه به منظور extension به تعداد ۳۵ سیکل قرار داده شدند. Extension نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

برایPCR مرحله دوم (nested-PCR) ۱ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول به عنوان الگو استفاده شد و غلظت بقیه مواد مانند مرحله اول بود. نمونه ها در ۹۴ ^{o}c به مدت ۲ دقیقه ، آنگاه در ۹۴ ^{o}c به مدت ۴۵ ثانیه ، در ۶۰ ^{o}c به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ ^{o}c به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده شدند .

محصولات استخراج DNA و هر کدام از واکنشهای PCR به ژل آگارز ۱/۳ درصد انتقال و با استفاده از بافر الکتروفورز (شامل ۰/۹۰ مولار تریس ۰/۹۰ مولار اسید بوریک و ۲۰ میلی مولار) در میدان الکتریکی پتانسیل ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. درپایان نمونه ها با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و به دستگاه ترانس ایلومیناتور (UVdoc) منتقل و تصاویر آنها گرفته شد.

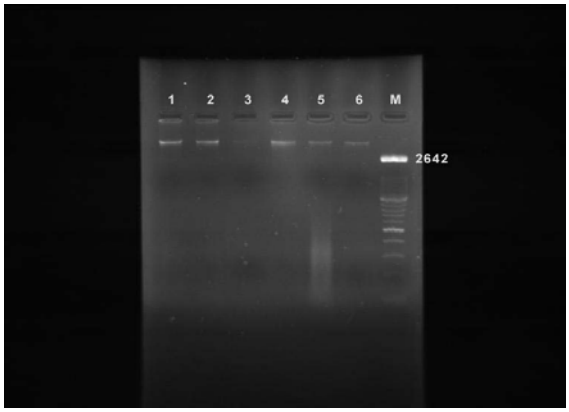
محصولات PCR دوم برای تعیین توالی (Sequencing) نوکلئوتیدی به شرکت SEQLAB در کشور آلمان فرستاده شد. پس از دریافت نتایج ، با استفاده از نرم‌افزار Blast توالی ها با سایر سکانسهای موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۲۰۰ نمونه مدفوع جمع آوری شده از برخی بیمارستانها وآزمایشگاههای تشخیص طبی استان خوزستان طی سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸۳، ۶ نمونه در آزمایش میکروسکوپی آلوده به استرونژیلوئیدس استرکورالیس تشخیص داده شد که با کشت روی آگار، لاروفیلاریفرم کرم جدا و برای مطالعه‌های بعدی نگهداری شد. هر ۶ بیمار مبتلا به سندرم ازدیاد عفونت بودند و در نمونه مدفوع تازه آنها تعداد بسیار زیادی لارو رابتیدیفرم وجود داشت. بعد از کشت روی محیط نوترینت آگار، کرمهای نر و ماده بالغ آزادزی زیادی در محیط حضور داشتند. از ۶ بیمار دچار هیپراینفکشن، ۴ مرد (۳ کشاورز و یک دانش آموز) و ۲ زن (هر دو خانه دار) بودند. دو نفر از بیماران سابقه بستری در بیمارستان داشته و همگی دارای اختلالات گوارشی بودند. علایم تنفسی در دو نفر و پوستی در یک نفر وجود داشت.

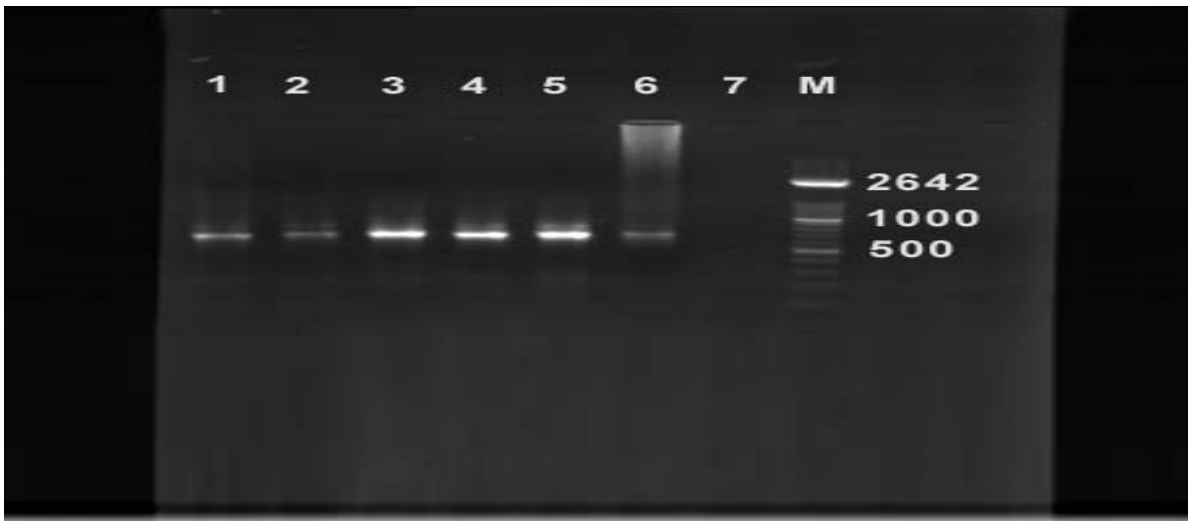
به منظور انجام مطالعات مولکولی بر روی نمونه‌ها، ابتدا استخراج DNA صورت گرفت. در همه نمونه ها یک باند با وزن بالا و در غلظت متفاوت (بسته به نمونه) مشاهده شد. شکل یک الکتروفورز DNA استخراج شده از لاروهای جدا شده از بیماران را نشان می دهد.

شکل ۱ : الکتروفورزDNA ژنومی استخراج شده از لاروهای فیلاریفرم جدا شده از محیط کشت آگار ؛ M: مارکرمولکولی ؛ ۶-۱ شماره ایزوله ها.



پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قطعهٔ ITS1 با روش nested-PCR تقویت گردید. شکل ۲ نتیجه الکتروفورز محصول nested-PCR مربوط به ۶ نمونه بیمار را نشان می دهد.چنانچه ملاحظه می شود تمام نمونه ها دارای وزن یکسان برابر bp ۷۰۰ بوده و این وزن با آنچه که پس ار طراحی پرایمرها انتظار می رفت بطور کامل مطابقت داشت.

شکل ۲ : الکتروفورز محصولات nested-PCR بر روی ژل آگارز ۱/3٪ ؛ شماره ۱ تا ۶ :نمونه های بیماران ، شماره ۷ : کنترل منفی ، M : مارکر مولکولی.



در پایان توالی نوکلئوتیدی بدست آمده هر ۶ نمونه DNA محصول PCR با استفاده از نرم‌افزارهای مولکولی (Blast) با سایر سکانسهای موجود در بانک ژن(Gen Bank) مقایسه شد و توالی همه نمونه ها بیشترین همخوانی را با توالی متعلق به ناحیه ITS1 داشت و لذا هر ۶ نمونه به عنوان استرونژیلوئیدس استروکورالیس تعیین هویت گردیدند.

بحث

خوشبختانه شیوع آلودگی به استرونژیلوئیدس استروکورالیس در ایران همانند دیگر کرمهای روده ای در مقایسه با دهه های گذشته کاهش یافته است (۱۰). با این وجود مواردی از نشانگان ازدیاد عفونت ناشی از استرونژیلوئیدیازیس درسالهای اخیر در مبتلایان به ایدز و همچنین مواردی در ساکنین استان مازندران وجود داشته است. افزایش موارد پیچیده استرونژیلوییدیازیس در سایر کشورها نیز مشاهده شده است (۱۱). این مسأله متأسفانه تا حدود زیادی ناشی از ابتلای این افراد به بیماریهای تضعیف کننده ایمنی مانند ایدز، لوسمی، لنفوم و هوچکین است. عدم تشخیص دقیق و درمان به موقع این افراد ممکن است به عفونت منتشر منجر گردد که می تواند مرگ بیمار را بدنبال داشته باشد (۱۲). ازاین رو این مطالعه اولیه با بررسی احتمال بروز اشکال خطرناک ناشی از استرونژیلوئیدس استرکورالیس دراستان خوزستان که از مناطق بومی این انگل بوده است انجام گرفت. بر اساس یافته ها در طی انجام این مطالعه ۶ بیمار آلوده به استرونژیلوئیدس استرکورالیس شناسایی شدندکه متأسفانه همه آنها ازسندرم ازدیاد عفونت رنج می بردند و دو مورد از آنها در بیمارستان بستری بودند. نظر به اینکه عدم کنترل رشد بی رویه این انگل منجر به وقوع عفونت منتشر می گردد، که در این مرحله پاسخ مناسب به درمان وجود ندارد، از این رو اهمیت بالینی و بهداشتی این نماتد در استان خوزستان مورد تأکید قرار می گیرد. با توجه به اینکه در مورد هر ۶ بیمار امکان کشت انگل و جدا سازی لاروهای فیلاریفرم وجود داشت بررسی اولیه ای در مورد ویژگیهای ایزوله های این استان با استفاده از روشهای مولکولی مبتنی بر تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک بخش ITS1 متعلق به ناحیه DNA ریبوزومی (rDNA) بعمل آمد. DNA دارای قطعات مختلفی بوده و با توجه به مطالعه های فراوان قبلی بنظر میرسد که ژن مناسبی برای بررسیهای تاکسونومی و فیلوژنتیک باشد. قطعه هدف در PCR انجام شده در این مطالعه ناحیه ITS1 بود. این قطعه بین ژن S ۱۸و ۵/۸S قرار داشته و در بسیاری ارگانیسمها دارای توالی متغیر در سطح گونه است. در این مطالعه،

پس از جداسازی لاروهای فیلاریفرم کرم از محیط کشت، DNA نمونه‌های بیماران استخراج و قطعه ITS1 با روش PCR مورد تقویت قرار گرفت. در همهٔ نمونه‌ها یک قطعه 700 bp بدست آمد که پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی آنها و مقایسه با سکانسهای موجود در بانک ژن، استرونژیلوئیدس استرکورالیس تشخیص داده شدند (۱۳). در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است با راه اندازی موفق روشهای استخراج DNA و PCR ویژگی های مولکولی ایزوله های استرونژیلوئیدس استرکورالیس بررسی شدند. براساس یافته‌های بدست آمده، می‌توان چنین نتیجه گرفت که گوناگونی مرفولوژیک و ژنتیکی چندانی در ایزوله های جدا شده از استان خوزستان وجود ندارد و همه ایزوله ها کم وبیش مشابه یکدیگر هستند، اگر چه برای قضاوت بهتر نیاز به نمونه بیشتر و بررسیهای مولکولی دقیق تری می باشد که چنین مطالعه ای توسط نگارندگان در حال انجام است. اطلاعات حاصل از این تحقیق بر روی ایزوله های بیشترکمکی است در بدست آوردن داده‌های ژنومی بیشتر در مورد این انگل فرصت طلب و می‌تواند سبب افزایش دانش ما در مورد ماهیت این انگل به منظور اتخاذ راهکارهای مناسب در درمان ، پیشگیری و کنترل آن گردد.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر معمار، آقای غلامی، سرکارخانم ذهبیون ازگروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، سرکارخانم جلالی از مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان، رئیس و کارمندان مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اهواز، مسؤولین و کارمندان دانشگاه علوم پزشکی اهواز که در این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. UdayC G, George A, Ujjala G, Shweta T, Narendra K. Strongyloides stercoralis infestation in a patient with severe ulcerative colitis. Ind J Med Sci. 2006 ;60(3):106-110.

2. Keiser PB, Nutman TB. Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population. Clin Mic Rev. 2004;208-217.

3. Vadlamudi R, S Chi D, Krishnaswamy G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. Clin Mol Allergy. 2006; 4: 8.

4. Reddy IS, Swarnalata G. Fatal disseminated strongyloidiasis in patients on immunosuppressive therapy: Report of two cases. Indian J Dermatol venereol leprol. 2005;71:38-40.

5. Km J, Joo HS, Kim DH, Lim H, Kang YH, Kim MS. A case of gastric strongyloidiasis in a Korean patient. The Korean Journal of Parasitology. 2003; 41(1): 63-67.

6. Sato H, Suzuki K, Kamiya H, Furuoka H. Identification and characterization of the threadworm, Strongyloides procyonis, from feral raccoons (Procyon lotor) in Japan. J Parasitol. 2006; 92(1): 63-68.

7. Gasser RB . Molecular taxonomic, diagnosis and genetic studies of parasitic helminthes. Int J Parasitol. 2001; 31: 860-864.

8. Mccarter J, Bird D, Clifton SW, Waterston Rh. Nematode gene sequences, update for june 2002. J Nematology. 2002; 34:71-74.

9. Dorris M, Blaxter M. The small subunit ribosomal RNA sequence of Strongyloides stercoralis. Int J Parasitol. 2000; 30 (8): 939-941.

10. Kia EB, Hooshyar H, Mobedi I. Study of reports on intestinal parasites of human in half past of century in Iran. The Second National Congress of Parasitic Diseases, 19-22, Oct 1997,Tehran, Iran.

11. Kia EB, Meamar AR, Mahmoudi M, Mohraz M , Jafari-Mehr A, Rezaian M, Zali MR. Strongyloides stercoralis hyperinfection syndrome in HIV/AIDS patients and in immunocompetent hosts in Iran. Poroceedings of IX European Multicolloquium of Parasitology , 18-23, July 2004,Valencia, Spain .

12. Safdar A, Malathum K, Rodrigues SJ, Husni R, Rolston K . Strongyloidiasis in patients at comprehensive cancer center in the United States. A retrospective study covering the years 1971-2003. Cancer.2004; 100: 1531-6.

13. Massey HC, Ball CC, Lok JB. PCR amplification of putative gpa-2 and gpa-3 orthologs from the (A+C)-rich genome of Strongyloides stercoralis. Int J Parasitol. 2003; 31:377-383.