شناسایی ژن ipaB در شیگلا و کلونینگ این ژن در وکتور pET22b(+)و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلا

مرضیه اقتداردوست[۱]، مجتبی سعادتی[۲*]، شهرام نظریان[۳]، مختار زارع[۳]، فاطمه ملائی[۱]، محمد هئیت [۱]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع)
۲. دانشیار گروه علوم زیستی دانشکده علوم پایه دانشگاه امام حسین(ع)
۳.کارشناس ارشد مرکز تحقیقات علوم زیستی دانشگاه امام حسین(ع)

* نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، تلفن ۷۷۱۰۴۹۳۴، saadati_m@yahoo.com
دریافت مقاله: اردیبهشت هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *شیگلوزیس یکی از پنج بیماری عفونی است که امروزه بشر را تحت فشار قرار داده است.آلودگی با گونه های شیگلا (باکتری گرم منفی) منجر به بیماری اسهال باسیلی، یک بیماری التهابی حاد روده بزرگ ، می‌شود. تلاش های بسیاری جهت تولید واکسن بر علیه این بیماری صورت گرفته و به آنتی ژن های مهاجم پلاسمیدی (IpaB, Ipac) به دلیل القاء مناسب سیستم ایمنی امید زیادی می رود.*

روش کار: *بعد از تائید سویه باکتری شیگلا دیسانتری، ژن ipaB در این باکتری و سایر گونه های شیگلا شناسایی و به وسیله PCR تکثیر یافت. محصول PCR بعد از تائید به وکتور pGEM-T منتقل و سپس درون وکتور PET22b(+) ساب کلون گردید. کلون انجام شده به وسیله برش آنزیمی و nested PCR تائید شد.*

یافته ها: *ژن ipaB در سویه های مختلف شیگلا شناسایی شد و nested PCR و هضم آنزیمی کلون ژن ipaB درون PET22b(+) را تائید کردند.*

نتیجه گیری: *با توجه به شناسایی ژن ipaB در سویه های مختلف شیگلا از پرایمرهای طراحی شده می توان جهت شناسایی گونه های مختلف شیگلا در موارد کلینیکی استفاده نمود؛ و همچنین کلون ژن مورد نظر با موفقیت انجام شد و پلاسمید نوترکیب بدست آمده جهت کاربردهای آتی مانند بیان ژن ipaB و سنجش ایمنی زایی آن در حیوان آزمایشگاهی آماده است که در صورت ایجاد پاسخ ایمنی مناسب می توان آن را به عنوان کاندیدی برای واکسن علیه شیگلوز معرفی نمود.*

واژگان کلیدی: ***شیگلا دیسانتری، ژن ipaB ، PCR، هضم آنزیمی،***

مقدمه

شیگلوزیس یک عفونت روده ای است که علائم آن از یک اسهال آبکی تا یک التهاب شدید گسترده است. این بیماری با دردهای شدید شکمی، تب، مدفوع حاوی خون و موکوس شناخته می شود. این بیماری، جز در مواردی که بیمار دارای نقص ایمنی باشد یا درمان های اولیه پزشکی در دسترس نباشد، معمولا خود محدود شونده است(۱). در کشورهای در حال توسعه سالیانه حدود ۱۶۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می شوند که حدود یک میلیون نفر ازآنها مخصوصا کودکان کمتر از ۵ سال جان خود را از دست می دهند(۲). شیگلا فلکسنری، دیسانتری، بوئیدی و سونئی گونه های مختلف این باکتری می باشد(۲). در میان ۵۰ سروتایپ و ساب تایپ شیگلا، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ به شدت بیماری زا است. شیوع اسهال خونی ناشی از شیگلا دیسانتری تیپ یک در نواحی پر جمعیت و با بهداشت پائین بالاتر است؛ و این باکتری تنها ساب تایپ ایجاد کننده اپیدمی و پاندمی در جهان است(۳). در مورد شیوع شیگلا در ایران آمار رسمی موجود نیست و بنا بر نتایج تحقیقی در تهران شیگلا سونئی گونه غالب جدا شده از بیمارن است(۴).

پاتولوژی پیچیده سندرم اسهال خونی بازتابی از ترکیبات متنوع ژنتیکی کنترل کننده بیماری زایی این ارگانیسم است. ژنوم کروموزومی و خارج کروموزومی برای به وجود آمدن این فنوتیپ بیماری زا ضروری هستند. یکی از جنبه های این فنوتیپ، تهاجم به سلولهای اپتلیالی کولون است که ترکیب ژنتیکی آن بر روی یک پلاسمید بزرگ ۱۲۰-۱۴۰ مگا دالتونی قرار دارد(۵). این پلاسمید در تمام گونه های شیگلا وجود دارد(۶) واین ژن ها پروتئین های متعددی، از آن جمله آنتی ژن های پلاسمیدی مهاجم (IpaA, IpaB, IpaC, IpaD) که فاکتورهای بیماری زای ضروری هستند، را کد می کند(۶). مطالعات نشان می دهد که قسمت عمده ژن های درگیر در تهاجم در شیگلا دیسانتری و فلکسنری حفاظت Conserved شده اند(۷). نقش مجزای این پروتئین ها از القائ آپپتوز به وسیله IpaB گرفته تا اتصال به سلول های میزبان و پلیمرازسیون اکتین به وسیله IpaC است. نشان داده شده است که کمپلکس IpaB-IpaC به داخل غشای سلول میزبان وارد می شود و برای ورود سایر پروتئین های شیگلا به درون سلول میزبان کانالی را تشکیل می دهد (۸). تاکنون گزارشی مبنی بر وجود ژن ipaB در دیگر باکتری ها منتشر نشده است، تنها Guichon و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در مقاله خود عنوان کرده اند که پروتئین مهاجمB سالمونلا (SipB) و پروتئین خارجی B یرسینیا (YopB) با پروتئین IpaB شیگلا همولوژی دارند(۹). با توجه به وجود ژن ipaB در تمامی گونه های شیگلا وباکتری EIEC و عدم وجود آن در سایر باکتری ها و تفاوت اندک این ژن در بین گونه های شیگلا می توان از این ژن به عنوان یک راه شناسایی بیماری شیگلوز در موارد بالینی و کلینیکی استفاده نمود(۱۰). سویه های باکتری شیگلا به مرور به اغلب آنتی بیوتیک های رایج و ارزان قیمت مقاوم شده اند؛ و درمان های آنتی بیوتیکی را با شکست مواجهه کرده اند(۸). بنابراین تهیه واکسنی برای کنترل بیماری اسهال خونی به نظر ضروری می رسد. تلاش های زیادی برای یافتن یک واکسن موثر و ایمن تاکنون انجام پذیرفته است ولی هیچ یک ازآنها به قدر کافی کارآمد و ایمن نبوده که به عنوان یک واکسن مورد استفاده قرار بگیرد. مطالعات متعدد نشان داده است که سیستم ایمنی در برابر فاکتورهای بیماری زایی مانند IpaB-IpaC_LPS پاسخ بسیار خوبی را ایجاد می کند در نتیجه جهت تولید واکسن به این فاکتورها امید زیادی است(۱۱).این مطالعه با هدف شناسایی ژن ipaB در باکتری شیگلا و کلونینگ این ژن در وکتور pET22b(+)و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلا انجام گرفت. در صورت ایمنی زایی مناسب شاید بتوان آن را به عنوان یک کاندیدای واکسن نوترکیب بر علیه شیگلا دیسانتری معرفی نمود.

روش کار

سویه های مختف باکتری شیگلا از بیمارستان بقیه الله (تهران – ایران) بدست آمد. این باکتری‌ها در محیط LB مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. به محیط کشت هیچ نوع آنتی بیوتیکی افزوده نشده بود. جهت تائید سویه باکتری ها از تست های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده شد. سپس DNA ژنومی باکتری ها به وسیله روش CTAB توصیف شده به وسیله Silvia Yumi Bando با کمی تغییرات استخراج گردید(۱۲).

برای واکنش تکثیر ژن ipaB یک جفت پرایمر زیر براساس توالی ژن ipaB (Gen- Bank accession number NC_007607) و با کمک نرم افزار oligo طراحی گردید.

Forward	5´- AGTGGATCCATGCATAATGTAAGCACCAC-3´	(۲۹جفت باز)
Reverse	5´- GAAAGCTTATTTCAAGCAGTAGTTTGTTGC-3´	(۳۰جفت باز)

برای توالی ژن ipaB به طول ۱۷۴۳ جفت باز، در انتهای ´۵ پرایمر پیشرو ترادف آنزیمBamH1 و در انتهای ´۵ پرایمر معکوس ترادف آنزیم HindIII در نظر گرفته شد(زیر توالی برش در پرایمرها خط کشیده شده است).هر واکنش PCR حاوی 1µg DNA و ۲۰ پیکومول از هر دو نوع پرایمر، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl2)،۰/۵میکرولیتر dNTP، ۰/۵میکرولیتر Taq DNA polymeras ،۵ میکرولیتر 10x PCR buffer (سیناژن-ایران) و حجم نهایی هر واکنش با کمک آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR مطابق جدول ۱ انجام گرفت. ۵ ماکرولیتر از محصول روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

جدول۱. برنامه واکنش PCR

دما (درجه سانتیگراد)	زمان	مراحل	
۹۴	۵ دقیقه	شروع داغ	۳۵ چرخه
۹۴	۴۰ ثانیه	واسرشتی	
۶۲	۵۰ ثانیه	جفت شدن	
۷۲	۶۰ ثانیه	طویل سازی	
۷۲	۱۰ دقیقه	طویل سازی نهائی	

جهت تائید اینکه ژن تکثیر یافته دقیقا ژن ipaB است از تست هضم آنزیمی استفاده گردید. در این تست با توجه به داده های نرم افزار DnaSIS v2.6 ، آنزیم HaeIII انتخاب و باتوجه به پروتوکل برش آنزیمی، محصول PCR با این آنزیم برش داده شد. جهت شناسایی ژن ipaB در سویه های مختلف شیگلا، ژنوم باکتری های جدا شده از بیماران که با کمک تست سرولوژیکی تعیین سویه شده بود استخراج گردید. و با پروتوکل مرحله قبل واکنش PCR جهت تکثیر ژن ipaB انجام گرفت. از باکتری سالمونلا به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

محصول PCR بعد از الکتروفورز کردن بر روی ژل Low melting به کمک کیت تخلیص ژن از ژل AccuPrep (Bioneer) خالص گردید. سپس با استفاده از کیت TA clone، نسبت به انتقال ژن ipaB به درون این وکتور اقدام گردید. جهت ترانسفورماسیون ابتدا نسبت به تهیه سلول مستعد از E. Coli DH5a که با روش کلسیم کلراید آماده گردیده بود اقدام شد(۱۳). سپس با روش شوک حرارتی TA clone به درون این سلول میزبان منتقل و سلول روی پلیت LB آگار حاوی ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. بعد از گذشت ۱۸ ساعت، کلنی های رشد یافته بر روی پلیت بطور تصادفی انتخاب و در LB مایع حاوی۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. و برای تائید کلون از روش direct PCR استفاده شد.

برای واکنش الحاق و ترانسفورماسیون ژنipaB به درون وکتور PET22 b(+) بعد از گذشت ۱۸ ساعت، از کلنی های رشد کرده در محیط LB مایع طبق دستور العمل استفاده شده به وسیله Liu وKado پلاسمیدها استخراج گردید.(۱۴) پلاسمیدهای استخراج شده و وکتور PET22b(+) با دو آنزیم BamHI, HindIII برش داده شد.هر دو محصول برش به وسیله ژل low melting و پروتوکل تخلیص ژن از ژل خالص شد. ژن ipaB طی واکنش لیگیشن به درون وکتور PET22b(+) وارد گردید. واکنش لیگیشن به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بعد از گذشت زمان لازم، واکنش با قرار دادن تیوب حاوی محصول لیگیشن در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شد؛ سلول مستعد مناسب که در این مرحله E-coli مهندسی شده TOP10 بود تهیه و واکنش ترانسفورماسیون مانند مرحله قبل انجام گرفت. محصول ترانسفورماسیون بر روی پلیت LB آگار حاوی ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شد. بعد از ۱۸ ساعت کلنی های رشد یافته بطور تصادفی انتخاب و در LB مایع رشد داده شدند.

برای تائید کلون نهایی با روشهای مختلف باکتری های رشد یافته در محیط LB مایع بعد از سانتریفیوژ جدا و پلاسمید آنها با روش توصیف شده در بالا تخلیص گردید. جهت اطمینان از حضور ژن ipaB در این پلاسمید نوترکیب سه تست متفاوت انجام گرفت. ۱- PCR و تکثیر ژن ipaB و ۲- استفاده از nested PCR که از PCR معمولی دقت بیشتری دارد. جهت انجام این تست نیاز به طراحی یک جفت پرایمر جدید بود که این پرایمرها نیز طراحی گردید با این تفاوت که در این جفت پرایمر نیازی به تعبیه جایگاه برش آنزیمی نبود. این پرایمرها به عنوان پرایمر داخلی برای ژن ipaB عمل می نمود.

(۲۵جفت باز)	Forward	5′-ATACTATCCAGGCTGCAAATGATGC-3′
(۲۶جفت باز)	Reverse	5′-GAATTGACAGGGTTTTCTGCTCAATG-3′

Nested PCR با توجه به جدول ۲ انجام شد. در تست سوم از برش آنزیمی استفاده شد و پلاسمیدهای حاصل از کلون نهایی با دو آنزیم BamHI, HindIII برش داده شدند، در صورت وجود ژن ipaB درون این پلاسمید باید به وسیله این دو آنزیم از پلاسمید جدا شود.

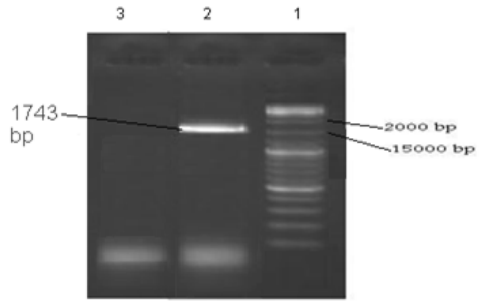
جدول ۲: برنامه واکنش PCR

	مراحل	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
	شروع داغ	۵ دقیقه	۹۴
۳۰ چرخه	واسرشتی	۴۰ ثانیه	۹۴
	جفت شدن	۴۵ ثانیه	۵۷
	طویل سازی	۶۰ ثانیه	۷۲
	طویل سازی نهائی	۵ دقیقه	۷۲

برای تعیین حساسیت سوش های مختلف شیگلا نسبت به آنتی بیوتیک ها ابتدا از سوش های مورد بررسی سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. بدین ترتیب که از قله کلنی های هر سوش مقداری برداشته و درون لوله حاوی سرم فیزیولوژی حل کرده تا کدورتی در حد ۰/۵ مک فارلند پیدا کند. سپس به تعداد سوش ها پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون تهیه شد. بعد از نام گذاری پلیت ها، با فرو کردن سوآپ استریل در سوسپانسیون میکروبی سوش مشخص و کشت یک دست آن بر روی پلیت، باکتری بصورت یکنواخت کشت داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه با پنس استریل دیسک های حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (AM)، نالیدیکسیک اسید (NA)، کانامایسین (K)، تتراسایکلین (Te)، استرپتومایسین(S)، پنی سیلین (P)، جنتامایسین (GM)، کلرامفنیکل (C)، کوتریموکسازول (SXT)، آمیکاسین (AN) در سطح محیط کشت قرار داده شد و بعد از ۱۸ ساعت نگهداری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قطر هاله عدم رشد با خط کش دقیق بر حسب میلی متر اندازه گیری و با استفاده از جدول CLSI (۱۵)، میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک مورد نظر به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شد.

یافته ها

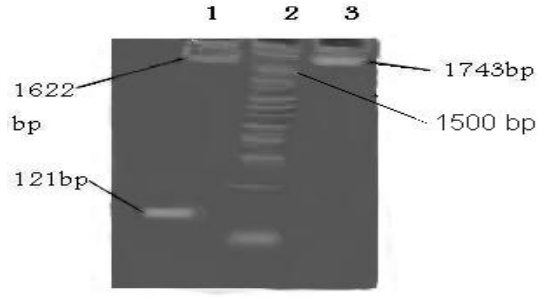
بعد از کشت باکتری شیگلا دیسانتری و استخراج DNA آن، واکنش PCR جهت تکثیر ژن ipaB انجام شد. سایز این ژن 1743bp بود که بعد از PCR مشاهده گردید که باندی در این سایز وجود دارد (**Error! Reference source not found.**).



تصویر ۱. الکتروفورزیز محصول PCR برای ژن ipaB از باکتری Shigella dysenteriae.

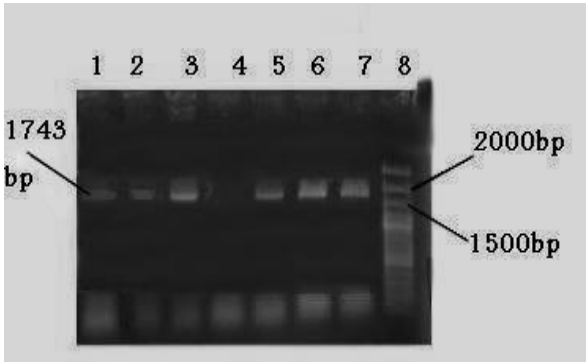
ستون ۱. نشانگر DNA ۳۰۰۰ جفت بازی ، ستون ۲. ژن ipaB (۱۷۴۳ جفت باز)، ستون ۳. کنترل منفی (واکنش PCR بدون نمونه الگو)

محصول PCR ژن ipaB توسط آنزیم HaeIII برش داده شد. با توجه به داده های نرم افزار DnaSIS این آنزیم یک جایگاه برشی در موقعیت 121bp ژن ipaB دارد و در نتیجه دو قطعه 1622bp , 121bp را تولید می نماید. **Error! Reference source not found.** نتیجه برش ژن ipaB توسط آنزیم HaeIII را نشان می دهد.



تصویر ۲. نتیجه برش ژن ipaB توسط آنزیم HaeIII
ستون ۱ .محصول برش با دو قطعه 121,1622bp ، ستون ۲ نشانگر DNA 3000bp ، ستون۳ .ژن ipaB برش نخورده با طول کامل 1743bp.

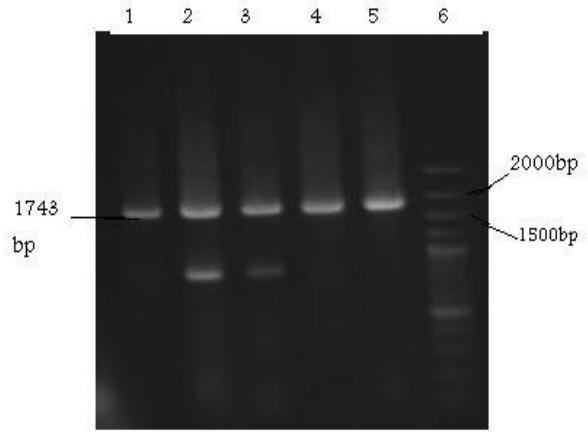
با کمک دو پرایمر طراحی شده وجود ژن ipaB در دیگر سویه های شیگلا بررسی گردید. در **Error! Reference source not found.** الکترفورزیز ۲ میکرولیتر از محصول PCR ژنipaB سویه های مختلف شیگلا نشان داده شده است.



تصویر۳. ژل الکترفورزیز محصول PCR ژنipaB در سویه های مختلف شیگلا

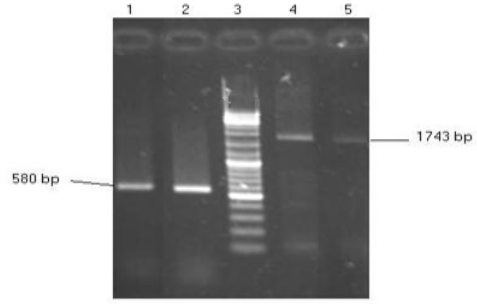
ستون ۱. شیگلا دیسانتری ۱۰۰۴ ، ستون ۲. شیگلا سونئی ۱۰ ، ستون ۳. شیگلا سونئی ۱۶ ، ستون ۴. سالمونلا - کنترل منفی ، ستون ۵. شیگلا فلکسنری ۱۵، ستون ۶.شیگلا فلکسنری NCTC8516 ، ستون ۷. شیگلا دیسانتری sd197 ، ستون ۸. نشانگر 3000bp DNA

بعد از کلون محصول PCR به درون وکتور کلونینگ pGEM-T، چهار کلنی بطور تصادفی انتخاب و برای تکثیر ژن ipaB از روش direct PCR استفاده شد. از کلنی های انتخاب شده ژن ipaB در هر چهار کلنی وجود داشت (**Error! Reference source not found.**ستون ۱ تا ۴).از ژنوم باکتری شیگلا دیسانتری به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (**Error! Reference source not found.**ستون ۵). **Error! Reference source not found.** الکتروفورزیز PCR کلنی های حاصل از TA clone را نشان می دهد.



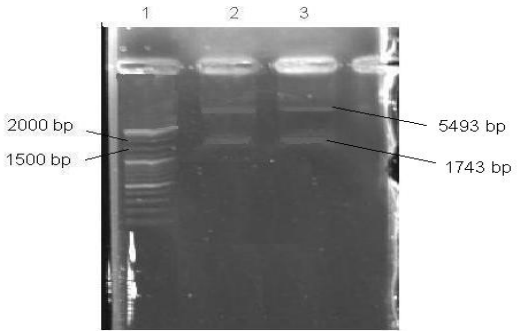
تصویر ۴: الکتروفورزیز Direct PCR کلنی های حاصل از TA clone

ستونهای ۱-۴ محصول Direct PCR ژن ipaB کلنی های حاصل از TA clone
ستون ۵ محصول PCR ژن ipaB باکتری شیگلا دیسانتری به عنوان کنترل مثبت
ستون ۶ نشانگر DNA 3000bp.



تصویر ۵. الکتروفورزیز تائید ساب کلون با دو روش PCR, nested PCR
ستون های۱و۲. نتایج nested PCR دو پلاسمید تخلیص شده ، ستون ۳نشانگر DNA 3000bp ، ستون های ۴و۵: نتایج PCR دو پلاسمید تخلیص شده

جهت تائید ساب کلون از چندین روش استفاده شد. برای این پلاسمیدهای استخراج شده از وکتور نوترکیب واکنش PCR و nested PCR برای تکثیر ژن ipaB گذاشته شد (تصویر **۵**). برای تائید این کلون‌ها، می توان از روش هضم آنزیمی نیز استفاده کرد. هضم آنزیمی روی وکتورهایی که PCR-Colony آنها مثبت بوده است با آنزیم‌های BamHI, HindIII جهت جدا کردن ژن ipaB به طول ۱۷۴۳جفت باز انجام شد و روی ژل آگارز ۱ درصد همراه با نشانگر ۳ کیلوبازی رانده شد،تصویر ۶ نتیجه این هضم آنزیمی را نشان می‌دهد.



تصویر ۶: الکترفورزیز برش آنزیمی پلاسمیدهای حاصل از ساب کلون
ستون۱: نشانگر DNA 3000bp .
ستون های ۲و۳: قطعات حاصل از برش پلاسمید نوترکیب

بعد از گذشت ۱۸ ساعت از کشت یکنواخت باکتری ها همراه با دیسک های آنتی بیوتیکی، قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش دقیق و مخصوص اندازه گیری و نتایج نشان می دهند که سوش های استفاده شده به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، استرپتومایسین و کلرامفنیکل ۵۰ درصد و نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین و کوتریموکسازول۶۰ درصد و به پنی سیلین ۱۰۰ درصد مقاوم اند ولی همین سوش ها به آنتی بیوتیک های کانامایسین و جنتامایسین و کانامایسین۶۰ درصد حساس اند و به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید ۱۰۰ درصد حساس اند.

بحث

شیگلوزیس به وجود آمده به وسیله گونه های شیگلا یک بیماری اسهال مسری می باشد. این باکتری قادر است افراد را به شدت آلوده نمایند این در حالی است که برای آلوده ساختن افراد به کمتر از ۱۰۰ میکروارگانیسم نیاز می باشد(۱۶). تهاجم و سیتوتوکسیسته شیگلا وابسته به یک پلاسمید است که کد کننده فاکتورهای بیماری زا و سیستم ترشحی تیپ III است. از دست دادن این پلاسمید باعث می شود که شیگلا کاملا غیر بیماری زا شود. پروتئین های Ipa(آنتی ژنهای پلاسمیدی مهاجم) در غشای باکتری قرار دارند و در روند اندوسیتوز باکتری نقشی دارند(۱۷).

IpaB یکی از فاکتورهای بیماریزای شیگلاست، وزن مولکولی آن ۵۷ کیلودالتون و اندازه ژن آن ۱۷۴۳ نوکلئوتید حاوی ۵۸۰ اسیدآمینه است(۵). این ژن یک پروتئین ترشحی تولید می کند و در سیتوپلاسم ماکروفاژهای آلوده قرار می گیرد. IpaB جهت القاء آپپتوز در ماکروفاژها کافی است و این کار را با اتصال مستقیم به ترکیب اساسی ماشین مرگ سلولی، آنزیم تبدیل کننده IL-1b، انجام می دهد(۹). درمانهای آنتی بیوتیکی برای درمان شیگلوزیز کافی هستند. اگرچه مقاومت چند دارویی امروزه در آسیا و آفریقا و آمریکای شمالی شایع شده است و یک نگرانی عمده برای S. flexneri , S. dysenteriae 1 در این زمینه وجود دارد. این سوش ها معمولا به اغلب آنتی بیوتیک های رایج مانند آمپی سیلین، تتراسایکلین، سولفونامیدها و نالیدیکسیک اسید و ... مقاوم شده اند که منجر به استفاده از آنتی بیوتیک های جدید و گران قیمت تر مانند فلوروکینولون ها شده است(۲).

علاوه بر درمان آنتی بیوتیکی استفاده از یک واکسن جهت پیشگیری بسیار مطالعه شده است. روش های زیادی برای تولید واکسن بر علیه شیگلا بکار گرفته شده است از آن جمله واکسن های زنده ضعیف شده(۱۸)، واکسن های تمام سلولی کشته شده(۱۹). DNA Vaccine(۲۰) و واکسن Invaplex(۲۱) و تحویل لیپوپلی‌ساکارید شیگلا با حامل هایی مانند پروتئازوم ها(۲۲) می باشد. تمامی این روش های دارای نواقصی است؛ برای مثال، واکسن زنده ضعیف شده، پاتوژنیسته باقی مانده در سوش های واکسنی ضعیف شده استفاده از این روش را با محدودیت روبرو ساخته است(۳). تلاش برای ساخت یک واکسن موثر هنوز ادامه دارد. یک روش تغییر یافته تهیه واکسن بر عیله شیگلا استفاده از کمپلکس IpaB, IpaC, LPS (Invaplex) است و به عنوان یک واکسن تجویزی از راه بینی در مدل های کوچک حیوانی کاربرد دارد (۲۱).رابطه بین IpaB, IpaC, LPS و پاسخ ایمنی در برابر شیگلوزیز به وسیله H. Iijima شرح داده شده است، و شامل آنتی بادی IgG سرمی و IgA محیطی سلول های ترشحی به LPS خاص سرتیپ است. آنتی بادی های دیگر به علاوه ایمنی وابسته به سلول نیز در ایمنی حفاظتی نقش دارند. (۲۳). با توجه به پاسخ مناسبی که سیستم ایمنی به آنتی ژن های IpaB, IpaC, LPS ایجاد می کند و همچنین توانایی این پروتئین ها برای وارد شدن به سلول میزبان، بیشترین امید برای تولید واکسن به این آنتی ژن ها است. برای در دست داشتن هر یک از این آنتی ژن ها یکی از روشها استخراج ژن مربوطه و کلون آنها در وکتور مناسب است که بتوان بعد از بیان آن، پروتئین مورد نظر را بطور خالص در دست داشت که با آزمایش بر روی مدل حیوانی می توان ایمنی زایی آن را نیز آزمایش و در صورت ایمنوژن بودن به عنوان یک جزء برای واکسن های نوترکیب استفاده نمود. در مطالعه حاضر قدم اول از تهیه یک واکسن نو ترکیب برداشته شد و آن جداسازی و کلونینگ ژن ipaB به عنوان یکی از فاکتور های بیماری زای شیگلا می باشد. از مزیت های این مطالعه استفاده از تست nested PCR جهت تائید کلونینگ است که نسبت به روش PCR معمولی ۱۰۰۰ برابر حساس تر است(۲۴).

در این مطالعه شناسایی ژن ipaB در دیگر سویه های باکتری شیگلا نیز مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی سوش هایی که با روشهای بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی به عنوان شیگلا شناخته شده بودند ژن ipaB تکثیر یافت. این کار دو نتیجه داشت. اول اینکه این آزمایش تائیدی بود بر صحت پرایمرها، زیرا موجب شناسایی ژن ipaB در باکتری های دارای این ژن شده بود؛ دوم اینکه تائید دیگری بود بر شیگلا بودن باکتری های استفاده شده. با توجه به وجود ژن ipaB در تمامی گونه های شیگلا و در باکتری EIEC و عدم وجود آن در سایر باکتری ها می توان از این ژن به عنوان یک راه شناسایی بیماری شیگلوز در موارد بالینی و کلینیکی استفاده نمود. از این رو در برخی مطالعات جهت شناسایی شیگلا از تکثیر ژن ipaB استفاده نموده اند؛ از آن جمله در سال ۱۹۸۸ Venkatesan و همکارانش ژن های ipaB/C/D را از شیگلا فلکسنری جدا و به عنوان پروب DNA جهت تست تشخیصی برای اسهال خونی استفاده نمودند. و مشاهده کردند که هر سه توالی با پلاسمید بیماری زا در باکتری شیگلا و EIECهیبرید می شد. اما با باکتری دارای موتانت در این ناحیه و هیچ یک از ۳۰۰ نمونه باکتری روده ای و غیر روده ای گرم منفی شامل سالمونلا، یرسینیا، کمپیلوباکتر،کلبسیلا، سویه های متعدد E.coli پاتوژنیک هیبرید نشدند(۲۵). همچنین فرشاد و همکارانش در مطالعه خود ۸۲ نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال خونی را جهت تعیین سوش بیماری زا مورد بررسی قرار داده اند و مشاهده کرده اند که نتایج حاصل از تست های تشخیصی سرولوژیکی تعیین سوش شیگلا با نتایج حاصل از تکثیر ژنهای ipaBCD و ipaH بیماران مشابه است، و با توجه به دقت و سهولت انجام تستPCR ، این تست جهت مطالعات اپیدمیولوژیک نسب به روش های متداول سرولوژیکی ارجحیت دارد(۲۶). در نهایت می توان نتیجه گرفت که از این دو پرایمر می توان جهت شناسایی تمامی سویه های شیگلا در موارد کلینیکی استفاده نمود. که با توجه به دقت و حساسیت تست PCR این روش می توان جایگزین مناسبی برای تستهای تشخیصی رایج کنونی باشد.

در این مطالعه بطور جنبی پروفایل آنتی بیوگرام سوش های شیگلای استفاده شده با کمک تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار از دیسک تهیه شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط رنجبر و همکارانش بر روی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی شیگلا در تهران انجام دادند و نشان دادند که از مجموع ۱۴۱ ایزوله جمع آوری شده بیشترین مقاومت نسبت به استرپتومایسین (۹۷٪)، کوتریموکسازول (۹۳/۵٪) و تتراسایکلین (۹۳٪) بوده ولی هیچکدام از ایزوله ها به آنتی بیوتیک های سفالکسین، سفتریاکسون، سفتی زوکسیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین، سفالوتین و سفوتاکسیم مقاومتی ندارند(۲۷) هم خوانی دارد و نشان دهنده این موضوع است که باکتری های شیگلا به آنتی بیوتیک های رایج در حال مقاوم شدن هستند و جهت استفاده از آنتی بیوتیک تراپی مجبور به استفاده از نسل های جدید آنتی بیوتیک ها که گران قیمت ترند؛ هستیم. از این رو تهیه یک واکسن ایمن که علاوه بر حفاظت بخشی جامعه نسبت به این بیماری از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه تر است حقیقتی انکار ناپذیر است

در مطالعات دیگری در پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع) بر روی سایر فاکتورهای بیماری زای شیگلا مانند IpaC, IpaD تحقیقات مشابه ای در حال اجراست تا بتوان از نتیجه این تحقیقات برای تهیه یک واکسن نوترکیب و ایمن بر علیه شیگلوز استفاده نمود.

REFERENCES

1. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev. Infect. Dis; 1991 13; S319-324

2. Niyogi SK. Shigellosis. The Journal of Microbiology; 2005 43; 133-143

3. McKenzie R, Venkatesan MM, M KW, Islamd D, Graheka SM, Jonesa A, et al. Safety and immunogenicity of WRSd1, a live attenuated Shigella dysenteriae type 1 vaccine candidate. Vaccine; 2008 26; 3291-3296

۴. رنجبر رضا. بررسی باکتری شیگلا به عناون یک عامل بیولوژیک. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش; ۱۳۸۳ ۴; ۵۶۲-۴۵۷

5. Buysse JM, Stover CK, Oaks EV, Venkatesan M and Kopecko JD. Molecular Cloning of Invasion Plasmid Antigen (ipa) Genes from Shigella flexneri: Analysis of ipa Gene Products and Genetic Mapping. JOURNAL OF BACTERIOLOGY; 1987 June 2561-2569

6. Kopecko DJ, Holcombe J and ormal SBF. Molecular characterization of plasmids from virulent and spontaneously occurring avirulent colonial variants of Shigellaflexneri. Infect. Immun; 1979 24; 580-582

7. Yao R and Palchaudhuri S. Nucleotide sequence of the ipaBCD structural genes of shigella dysenteriae Molecular Microbiology; 1991 5; 2217-2221

8. Phalipon A and Sansonetti P. Shigellosis: Innate Mechanisms Of Inflammatory Destruction Of The Intestinal Epithelium, Adaptive Immune Response, And Vaccine Development. Critical Reviews In Immunology; 2003 23; 371-401

9. Guichon A, Hersh D, Smith MR and Zychlinsky AS. Structure-Function Analysis of the Shigella Virulence Factor IpaB. JOURNAL OF BACTERIOLOGY; 2001 183; 1269-1276

10. Venkatesan M, Buysse J, Vandendrie E and Kopecko D. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. J Clin Microbiol; 1988 26; 261-6

11. Oaks EV and Turbyfill KR. Development and evaluation of a Shigella flexneri 2a andS .sonnei bivalent invasin complex (Invaplex) vaccine. Vaccine; 2006 24; 2290-2301

12. Bando SY, Valle GR, Luiz MM, Trabulsi R and Moreira-Filho CA. characterization of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains by RAPD analysis. FEMS Microbiology Letters; 1998 165; 159-165

13. ambrook J and Russell D. ”MolecularCloning”, A Laboratory Manual. The Hanahan Method for preparation and Transformation of competent E.coli high-efficiency Transfomation. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001 ;

14. Kado CI and Liu ST. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. JOURNAL OF BACTERIOLOGY; 1981 145; 1365-1373

15. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM and Hecht DW. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing(CLSI). Sixteenth Informational Supplement Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2006; 52-56

16. Trabulsi R, HILBI H, CHEN Y, THIRUMALAI K and ZYCHLINSKY A. The Interleukin 1b-Converting Enzyme, Caspase 1, Is Activated during Shigella flexneri-Induced Apoptosis in Human Monocyte-Derived Macrophages. INFECTION AND IMMUNITY; 1997 Dec 65; 5165-5170

17. Islamd D, THIRUMALAI K, KIM K-S and ZYCHLINSKY A. IpaB, a Shigella flexneri Invasin, Colocalizes with Interleukin۱-b- Converting Enzyme in the Cytoplasm of Macrophages. INFECTION AND IMMUNITY; 1997 Feb 65; 787-793

18. Phalipon A and Sansonetti PJ. Live Attenuated Shiglla flexneri Mutants as Vaccine Candidates Against Shigellosis and Vectors for Antigen Delivery. Biologicals; 1995 23; 125-134

19. Walker RI. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. Vaccine; 2005 23; 3369-3385

20. Schoen C, Stritzker J, Goebel W and Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. International Journal of Medical Microbiology; (2004 294; 319-335

21. Turbyfill KR, Kaminski RW and Oaks EV. Immunogenicity and efficacy of highly purified invasin complex vaccine from Shigella flexneri 2a. Vaccine; 2008 26; 1353-1364

22. Orr N, Robin G, Cohen D, Arnon R and Lowell GH. Immunogenicity and Efficacy of Oral or Intranasal Shigella flexneri 2a and Shigella sonnei Proteosome- Lipopolysaccharide Vaccines in Animal Models. Infection and Immunity; 1993 June 61; 2390-2395

23. Iijima H, Takahashi I and Kiyono H. Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. Rev. Med. Virol; 2001 11; 117-133

24. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F and Giacca M. Nested Polymerase Chain Reaction for High-Sensitivity Detection of Enteroviral RNA in Biological Samples JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY ۱۹۹۳May 31; 1345-1349

25. Venkatesan M, Buysse J, Vandendries E and D Kopecko. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. J Clin Microbiol; 1988 26; 261-6

26. Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E and Alborzi A. Characterization of Shigella Strains in Iran by Plasmid Profile Analysis and PCR Amplification of ipa Genes JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY; 2006 44; 2879-2883

27. Ranjbar R, Dallal MMS-, Pourshafie MR, Mammina. C. Antibiotic resistance among Shigella serogroups isolated in Tehran, Iran (2002-2004). J Infect Dev Ctries2009; 3:647-648.