شناسایی مولکولی شیگلا با استفاده از روش PCR

داود افشار[۱]، رضا رنجبر[۲]*، علی مهرابی توانا[۳]، علی نجفی[۴]، فاطمه پورعلی[۵]، زهرا سفیری[۶] ، علی کرمی[۷]، جواد علیزاده [۸]

۱. دانشجوی دکترای باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. دانشیار باکتری شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا.. تهران
۳. استاد میکروب شناسی مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران
۴. دانشجوی دکترای بیوانفورماتیک و محقق مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران
۵.کارشناس شیمی مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران
۶. کارشناس ارشد سلولی مولکولی مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران
۷. دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران
۸. کارشناس ارشد میکروب شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** ، میدان ونک، خیابان شیخ بهائی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، ranjbarre@yahoo.com

دریافت مقاله: مرداد نود پذیرش برای چاپ: شهریور نود

چکیده

سابقه و هدف: *گونه های شیگلا از مهمترین پاتوژنهای روده ای انسان محسوب می شوند. این گونه ها بیماری اسهال خونی موسوم به شیگلوز را ایجاد می کنند. دوز عفونی کننده این باکتریها خیلی پایین بوده و سرایت پذیری بالا یی دارند لذا شناسایی سریع این باکتری ها در موارد بروز اسهال خونی بویژه در کودکان بسیار حائز اهمیت است. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی PCR با طراحی پرایمرهای جدید مبتنی بر شناسایی نواحی حفاظت شده کروموزومی داخل جنس شیگلا، جهت شناسایی ایزوله های بالینی این باکتری بود.*

روش کار: *در این مطالعه از یک جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر قسمتی از ناحیه کروموزومی Putative integrase برای شناسایی جنس شیگلا استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در نرم افزار آنلاین پرایمر۳ طراحی گردید. برای ارزیابی روش، ۳۰ سویه باکتری شیگلا جدا شده از نمونه های بالینی مربوط به ۴ گونه شیگلا که به روش های سرولوژی و بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفته بودند، استفاده شد. استخراج ژنوم با استفاده از روش Boiling صورت گرفت و مقدار غلظت DNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ اندازه گیری گردید. عمل PCR با اعمال گرادیانت دمایی در دماهای مختلف انجام شد. جهت رویت باندها از عمل الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید و استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن استفاده گردید. جهت بررسی اختصاصیت روش، از باکتریهای هم خانواده و مرتبط استفاده شد.*

یافته ها: *نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، ایجاد باند تکثیر شده به اندازه مورد نظر را در تمام سویه های مربوط به چهار گونه شیگلا نشان داد. در ارزیابی دمای بهینه واکنش زنجیره ای پلیمراز در گرادیانت های دمایی انجام شده، دمای ۶۲°C بهترین دما برای انجام واکنش بود. هیچ واکنش غیر اختصاصی با باکتری های مشابه از جمله اشریشیا کولی و سالمونلا مشاهده نشد و روش طراحی شده قادر بود همه ۳۰ ایزوله بالینی مربوط به ۴ گونه مختلف جنس شیگلا را شناسایی نماید.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که ژنهای مستقر در نواحی حفاظت شده کروموزومی برای اهداف تشخیصی مناسب هستند و ضرورتی ندارد برای شناسایی شیگلا، همیشه از ژن های شاخص بیماریزایی جهت اهداف تشخیصی استفاده نمود. روش طراحی شده با پرایمرهای جدید بعنوان روش شناسایی حساس،آسان، سریع و مطمئن جهت تشخیص تمام گونه های شیگلا توصیه می شود.*

واژگان کلیدی: شیگلوز، PCR، گونه های شیگلا، تشخیص سریع

مقدمه

شیگلا یکی از عوامل عمده اسهال خونی در کودکان زیر ۵ سال است که هر ساله باعث مرگ و میر زیادی در این رده سنی می گردد(۱). شایعترین عامل شیگلوز در کشورهای توسعه یافته به ترتیب شیگلا سونئی(۷۷٪)، شیگلا فلکسنری(۱۶٪)، شیگلا بوئیدی(۲٪) و شیگلا دیسانتری(۱٪) است(۲). میزان وقوع شیگلوز سالانه تخمین زده شده است که ۱۶۴.۷ میلیون مورد با میزان مرگ ومیر حدود ۶۹ درصد باشد(۳). در ایران نیز شیگلوز به یک مشکل بهداشتی مطرح است(۳و۴). اخیرا معلوم شده است که شایعترین گونه عامل شیگلوز در ایران، شیگلا سونئی می باشد(۵).

روش های سنتی شناسایی از جمله کشت باکتری، حساسیت زیادی در تشخیص ندارند(۶). تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز یکی از روش هایی است که به دلیل دارا بودن حساسیت بالا، توانایی شناسایی تعداد کم باکتری و ژنوم آن، ارزش زیادی دارد(۷). با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز می توان توکسین زا بودن شیگلاهای محیطی و بالینی را مورد ارزیابی قرار داد یا به عبارت دیگر پاتوژن بودن آن را اثبات کرد(۸). از سوی دیگر دوز عفونی کننده این باکتریها خیلی پایین بوده و سرایت پذیری بالایی دارند لذا شناسایی سریع این باکتری ها در موارد بروز اسهال خونی به ویژه در کودکان بسیار حائز اهمیت است. برای شناسایی شیگلا، در بیشتر موارد از ژن های بیماری زایی بعنوان اهداف تشخیصی استفاده شده است. در این راستا از ژن ipaH به عنوان ژنی که در اکثر شیگلا های بیماری زا وجود دارد، استفاده فراوان صورت گرفته است(۹و۱۰). در این مطالعه، ما یک واکنش زنجیره ای پلیمراز با طراحی پرایمرهای جدید جهت ردیابی ژنهای مستقر در نواحی حفاظت شده کروموزومی را برای شناسایی شیگلا طراحی ارزیابی نمودیم.

روش کار

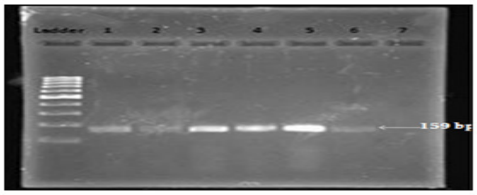
پرایمرهای مورد استفاده در نرم افزار آنلاین پرایمر۳ ((Primer3 (v. 0.4.0 طراحی گردید. پرایمر جلوبرنده دارای توالی 5'-TCCGTCATGCTGGATGAACGATGT-3' و توالی پرایمر برگشت دهنده شامل 5'-ACAGTTCAGGATTGCCCGAGACACA-3' بود. پیش بینی اندازه محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز حاصل برای این پرایمرها ۱۵۹ جفت باز بود. بلاست این پرایمر اختصاصیت بالای آنها را تائید کرد.

نمونه های مورد مطالعه، ۳۰ سویه باکتری شیگلا بودند. این سویه ها مربوط به ۴ گونه شیگلا شامل شیگلا سونئی، شیگلا فلکسنری، شیگلا بوئیدی و شیگلا دیسانتری جداسازی شده از موارد بالینی اسهال در کودکان مربوط به مطالعات قبلی ما می باشند که در محیط نگه دارنده ذخیره شده بودند.

این باکتری ها ابتدا در محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت به منظور تهیه کلنی های تک ، کشت داده شدند. استخراج ژنوم با استفاده از روش Boiling صورت گرفت. در این روش کلنی تک از محیط مولر هینتون به محیط آبگوشت LB تلقیح و ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد . بعد از ۲۴ ساعت، ۵ میکرو لیتر از محیط فوق را برداشته و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول STET اضافه گردید و ۴ دقیقه در آب جوش جوشانده شد. سپس ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ کرده، مایع رویی را به یک میکروتیوب استریل منتقل شد و به آن پروپرانول ۷۰ درصد (هم حجم آن) مخلوط اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. میکروتیوب را از یخچال خارج و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از آن مایع رویی دور ریخته شده و هم حجم رسوب، به آن اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا به طور کامل خشک گردد. بعد از خشک شدن آن در نهایت مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول TE به آن اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت_۱۶-۱۱). مقدار غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ در دستگاه نانودراپ اندازه گیری گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز طبق پروتکل ارائه شده در جدول ۱ انجام شد. جهت بررسی اختصاصیت روش، از باکتریهای هم خانواده و مرتبط شامل اشریشیا کولی و سالمونلا استفاده شد. پنج میکرولیتر از محصول PCR در چاهک ژل ۱ درصد قرار داده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و در نهایت به وسیله دستگاه ژل داکیومنتیشن قطعه تکثیر یافته رویت گردید.

جدول شماره ۱. مقدار مواد به کار برده شده در واکنش زنجیره پلیمراز را نشان می دهد.

Material	1x
D.D. Water	19.5 µl
Buffer	2.5 µl
Mgcl2	0.5 µl
dNTP	0.3 µl
Primer (F)	0.5 µl
Primer (R)	0.5 µl
DNA	1 µl
Taq polymerase	0.2 µl
Total	25 µl

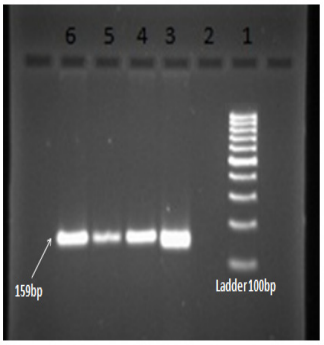


شکل شماره۱. گرادیانت دمایی برای ارزیابی دمای مناسب جهت واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان می دهد. چاهک شماره ۱ دمای۵۸°C، چاهک شماره ۲ دمای۵۹ °C، چاهک شماره ۳ دمای ۶۰ °C، چاهک شماره ٤ دمای۶۱ °C درجه، چاهک شماره ٥ دمای ۶۲ °C، چاهک شماره ٦ دمای ٦٤ °C . چاهک شماره ۷ کنترل منفی از باکتری اشریشیا کلی. همانطور که ملاحظه می شود بهترین دما ۶۲ درجه سانتی گراد می باشد.

یافته ها

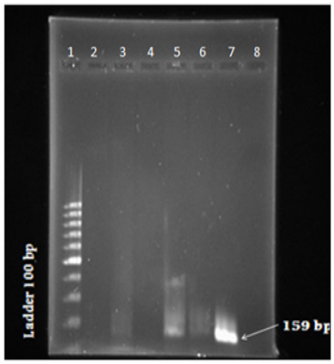
در مرحله استخراج ژنوم با استفاده از روش Boiling غلظت های مناسبی از ژنوم های استخراج شده بدست آمد که غلظت آنها به طور متوسط حدود۲ ng/ µL بود. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، ایجاد باند تکثیر شده به اندازه مورد نظر را در تمام سویه های مربوط به چهار گونه شیگلا بهمراه داشت.

در ارزیابی دمای بهینه واکنش زنجیره ای پلیمراز در گرادیانت های دمایی انجام شده، در دمای۶۲°C واکنش بهتری انجام شد (شکل ۱). نتایج مربوط به گرادیانت MgCl2 در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. هیچ واکنش غیر اختصاصی با باکتری های مشابه از جمله اشریشیا کولی و سالمونلا مشاهده نشد و روش طراحی شده قادر بود همه ۳۰ ایزوله بالینی مربوط به ۴ گونه مختلف جنس شیگلا را شناسایی نماید.



شکل شماره ۳، نتایج PCR را بعد از ایجاد شرایط بهینه دمایی(۶۲ °C) و MgCl2 نشان می دهد.

چاهک شماره ۱= Ladder 100bp
چاهک شماره ۲= کنترل منفی با سالمونلا تایفی
چاهک شماره ۳ شیگلا دیسانتری
چاهک شماره ٤= شیگلا بوئیدی
چاهک شماره ٥= شیگلا سونئی
چاهک شماره ٦= شیگلا فلکسنری



شکل شماره ۲، نتایج مربوط به گرادیانت Mg Cl2 را نشان می دهد

چاهک شماره ۱ = Ladder 100bp
چاهک شماره ۲= کنترل منفی با سالمونلا تایفی
چاهک شماره ۳= ۰/۱ میکرولیتر
چاهک شماره ٤ = ۰/۲ میکرولیتر
چاهک شماره ٥ = ۰/۳ میکرولیتر
چاهک شماره ٦ = ۰/٤ میکرولیتر
چاهک شماره ۷= ۰/٥ میکرولیتر

بحث

در این بررسی، یک واکنش زنجیره پلیمراز با طراحی پرایمر جدید جهت شناسایی شیگلا در نمونه های بالینی ارزیابی شد. کارایی روش ارائه شده ممکن است با فاکتورهای متعددی در ارتباط باشد. یکی از عوامل مهم، طراحی اختصاصی پرایمرهای مورد استفاده است. پرایمرهای مورد استفاده ما به قسمتی از کروموزم شیگلا متصل می گردیدند که اختصاصی شیگلا بوده و در نتیجه، علاوه بر داشتن توانائی شناسایی تمام گونه های شیگلا، هیچ واکنش غیر اختصاصی نیز با باکتری های مشابه شامل اشریشیا کولی و سالمونلا مشاهده نگردید.

تاکنون طراحی های مختلفی از تکنیک PCR برای شناسایی سریع شیگلا ارائه گردیده است. بر خلاف مطالعه Thong و همکاران که از ژن ipaH برای شناسایی جنس شیگلا استفاده شده بود(۱۷)، در مطالعه ما از ناحیه کروموزومی Putative integrase برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد که بر خلاف ژن ipaH که بر روی پلاسمید قرار دارد، کروموزومی بوده و هم پایداری و هم در مرحله استخراج ژنوم، جداسازی آن آسان تر می باشد. از طرفی دیگر این ناحیه ویژه گونه های شیگلا است به همین دلیل اختصاصیت بالایی در تشخیص دارد.

لازم به توضیح است که در ابتدای تحقیق از پرایمر مربوط ژن virA استفاده شد که توسط Keith از این ژن برای طراحی پرایمر توصیه شده بود ولی نتیجه واکنش زنجیره پلیمراز برای این توالی منفی شد که شاید به علت پلاسمیدی بودن این ژن می باشد که استخراج آن نیازمند دقت زیادی است(۱۸).

همچنین بر خلاف مطالعه Farfan و همکاران که از ژنهای ویرولانسShET-1 and ShET-2 enterotoxin genes برای شناسایی شیگلا سونئی و شیگلا فلکسنری استفاده کرده اند(۱۹)، ناحیه مورد نظر در روش ما برای تکثیر طوری طراحی شده است که تمام گونه های شیگلا را قابل شناسایی می کند.

نتیجه گیری

در این مطالعه ما نتیجه گرفتیم که ژنها و یا نواحی حفاظت شده کروموزومی برای اهداف تشخیصی مناسب هستند لذا ضرورتی ندارد همیشه برای شناسایی باکتریها از ژن های شاخص بیماری زایی جهت اهداف تشخیصی استفاده نمود. روش طراحی شده با پرایمرهای جدید بعنوان روش شناسایی حساس،آسان، سریع و مطمئن جهت تشخیص تمام گونه های شیگلا توصیه می شود.

REFERENCES

1. Hien, B. T.; Scheutz, F ;.Cam, P. D.; Serichantalergs, O.; Huong, T. T.; Thu, T. M.; Dalsgaard, A. Diarrheagenic Escherichia Coli and Shigella Strains Isolated From Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. J. Clin. Microbiol. 2008**,** 46, 996-1004.

2. Hsu, W. B ;.Wang, J. H.; Chen, P. C.; Lu, Y. S.; Chen, J. H. Detecting Low Concentrations of Shigella Sonnei in Environmental Water Samples by PCR. FEMS Microbiol. Lett. 2007**,** 270, 291-298.

3. Ranjbar, R.; Soltan Dallal, M. M.; Pourshafie, M. R. Epidemiology of Shigellosis With Special Reference to Hospital Distribution of Shigella Strains in Tehran. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases 2008**,** 3.

4. Ranjbar, R.; Hosseini, M. J.; Kaffashian, A. R.; Farshad, S. An Outbreak of Shigellosis Due to Shigella Flexneri Serotype 3a in a Prison in Iran. Arch. Iran Med. 2010**,** 13, 413-416.

5. Ranjbar, R.; Soltan Dallal, M. M.; Talebi, M.; Pourshafie, M. R. Increased Isolation and Characterization of Shigella Sonnei Obtained From Hospitalized Children in Tehran, Iran. J. Health Popul. Nutr. 2008**,** 26, 426-430.

6. 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, 2879-2883.

7. Vu, D. T.; Sethabutr, O.; Von, S. L.; Tran, V. T.; Do, G. C.; Bui, T. C.; Le, H. T.; Lee, H.; Houng, H. S.; Hale, T. L.; Clemens, J. D.; Mason, C.; Dang, D. T. Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the IpaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. J. Clin. Microbiol. 2004**,** 42, 2031-2035.

8. Islam, M. S.; Hossain, M. S.; Hasan, M. K.; Rahman, M. M.; Fuchs, G.; Mahalanabis, D.; Baqui, A. H.; Albert, M. J. Detection of Shigellae From Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques. J. Diarrhoeal Dis. Res. 1998**,** 16, 248-251.

9. Faruque, S. M.; Khan, R.; Kamruzzaman, M.; Yamasaki, S.; Ahmad, Q. S.; Azim, T.; Nair, G. B.; Takeda ,Y.; Sack, D. A. 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, 3908-3913.

10. Gaudio, P. A.; Sethabutr, O.; Echeverria, P.; Hoge, C. W. Utility of a Polymerase Chain Reaction Diagnostic System in a Study of the Epidemiology of Shigellosis Among Dysentery Patients, Family Contacts, and Well Controls Living in a Shigellosis-Endemic Area. J. Infect. Dis. 1997**,** 176, 1013-1018.

11. Dutta, S.; Chatterjee, A.; Dutta, P.; Rajendran, K.; Roy, S.; Pramanik, K. C.; Bhattacharya, S. K. 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, 667-674.

12. Wang, L.; Li, Y.; Mustaphai, A. Rapid and Simultaneous Quantitation of Escherichia Coli 0157:H7, Salmonella, and Shigella in Ground Beef by Multiplex Real-Time PCR and Immunomagnetic Separation. J. Food Prot. 2007**,** 70, 1366-1372.

13. Mirmomeni, M. H.; Kiani, S.; Sisakhtnezhad, S. Rapid Detection of Salmonella Dublin by PCR Amplification of the SopE Gene and Its Cloning. Pak. J. Biol. Sci. 2008**,** 11, 1497-1501.

14. Harada, K.; Uchiyama, M.; Hoshi, T.; Takahashi, T. Comparison of Three DNA Extraction Methods for Detection of Erysipelothrix Rhusiopathiae in Chicken Blood by Polymerase Chain Reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 2009**,** 21, 354-358.

15. Qu, F. F.; Cai, C.; Zheng, X. J.; Zhang, D. B. [Rapid Identification of Riemerella Anatipestifer on the Basis of Specific PCR Amplifying 16S RDNA]. Wei Sheng Wu Xue. Bao. 2006, 46, 13-17.

16. Sung, K.; Khan, S. A.; Nawaz, M. S.; Khan, A. A. A Simple and Efficient Triton X-100 Boiling and Chloroform Extraction Method of RNA Isolation From Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 2003**,** 229, 97-101.

17. Thong, K. L.; Hoe, S. L.; Puthucheary, S. D.; Yasin, R. M. Detection of Virulence Genes in Malaysian Shigella Species by Multiplex PCR Assay. BMC. Infect. Dis. 2005**,** 5:8., 8.

18. Lampel, K. A.; Jagow, J. A.; Trucksess, M.; Hill, W. E. Polymerase Chain Reaction for Detection of Invasive Shigella Flexneri in Food. Appl. Environ. Microbiol. 1990**,** 56, 1536-1540.

19. Farfan, M. J.; Garay, T. A.; Prado, C. A.; Filliol, I.; Ulloa, M. T.; Toro, C. S. A New Multiplex PCR for Differential Identification of Shigella Flexneri and Shigella Sonnei and Detection of Shigella Virulence Determinants. Epidemiol. Infect. 2010**,** 138, 525-533.