طراحی و ارزیابی واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه به منظور تشخیص سریع و اختصاصی شیگلا فلکسنری ۲a از نمونه های شیگلای جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد باسیلی

مهدی تات[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، سید مصطفی حسینی*[۳]، مهدی کمالی[۴]، امیر همایون کیهان[۵]، محمد حسین عطایی[۶]، حمید کوشکی[۶]، جمال رشیدیانی[۶]، مهدی حصارکی[۱]

۱.کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع) ، تهران
۲.دکتری باکتری شناسی، دانشیار گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع) ، تهران
۳.کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران
۴.دکتری بیوتکنولوژی مولکولی، استادیار مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران
۵.کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران
۶..کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، تلفن تماس: 021-88617711 Geneticman2005@gmail.com

دریافت مقاله: آذر نود پذیرش برای چاپ: دی نود

چکیده

سابقه و هدف: *شیگلوز یا اسهال باسیلی به عنوان علت عمده عفونت در کودکان مبتلا به اسهال در ایران شایع می باشد. شیگلا فلکسنری سروار ۲a به عنوان یک نگرانی قابل توجه در بهداشت همگانی در کشور های در حال توسعه و یا توسعه یافته به جهت نقش این پاتوژن در شیوع اندمیک (endemic) شیگلوز و نیز مرگ و میر ناشی از آن مطرح است. در مطالعه حاضر، یک واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه (mPCR) به منظور تشخیص سریع و اختصاصی شیگلا فلکسنری ۲a از نمونه های شیگلای جدا شده از مدفوع بیماران مبتلا به شیگلوز طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش کار: *در مجموع، ۲۷ جدایه شیگلا فلکسنری از کودکان مبتلا به اسهال حاد باسیلی و گاستروانتریدیس (التهاب سیستم گوارشی) که در فاصله دی ۸۹ تا مرداد ۹۰ به بیمارستان های طالقانی، میلاد و بقیه الله اعظم (عج) در تهران مراجعه نموده بودند جمع آوری گردید. با استفاده از آنالیز های بیوانفورماتیکی که از طریق توالی ژنومی شیگلا اجرا گردید، آغازگر های flex2a-F و flex2a-R که منحصراً ناحیه اختصاصی she را در ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a تکثیر مینمایند طراحی گردید. پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به منظور تشخیص حضور سروار ۲a و تعیین حساسیت و اختصاصیت این روش تشخیصی انجام گرفت.*

یافته ها: *با استفاده از واکنش های بیوشیمیایی و سرم شناسی حضور گونه شیگلا فلکسنری در نمونه های بیمارستانی مورد تایید قرار گرفت. نتایج آنالیز های بیوانفورماتیکی نشان داد که ناحیه ۱۶۹۷ جفت بازی در ژنوم شیگلا فلکسنری سروار ۲a به طور انحصاری نسبت به این سروار اختصاصی است. نتایج ارزیابیها که از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام گرفت، حضور ۴ سروار (۱۹/۰۴٪) متعلق به شیگلا فلکسنری ۲a را در نمونههای بیمارستانی تایید نمود. اختصاصیت واکنش mPCR، ۱۰۰ درصد تعیین گردید. حساسیت این واکنش برابر با ۸۵ cfu (colony-forming unit) تشخیص داده شد.*

نتیجه گیری: *ناحیه she بر روی ژنوم شیگلا به عنوان یک ناحیه ویژه به منظور شناسایی حضور سروار ۲ a در نمونه های بیمارستانی اختصاصی می باشد. به علاوه، این روش به عنوان ابزاری ارزشمند برای انجام مطالعات همه گیر شناسی بسیار مناسب و قابل اتکا است.*

واژگان کلیدی: ***شیگلوز، شیگلا فلکسنری ۲a، PCR چندگانه، بیوانفورماتیک.***

مقدمه

جنس شیگلا باکتری های گرم منفی، بدون اسپور، غیر متحرک و بی هوازی اختیاری بوده و به خانواده انتروباکتریاسه ها تعلق دارد. جنس شیگلا شامل چهار گونه دیسانتری، فلکسنری، سونه ای و بویدی می باشد(۱و۲). شیگلوز با تظاهراتی شامل اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از مخاط و خون، درد، دل پیچه، تب، تهوع، سردرد و گرفتگی عضلات دیده می شود. شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه سویه های اشریشیاکلی است که گاهی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماریزا یاد می شود(۳). شیگلوز در بین کودکان کشورهای در حال توسعه با سطح بهداشتی پایین و منابع آبی غیر بهداشتی از شیوع بیشتری برخوردار است (۴). آلودگی عمدتاً از طریق دست، غذای آلوده و یا تماس فرد با فرد منتقل میگردد (۵). از نظر دوز عفونی، فرو بردن بین ۱۰ تا ۱۰۰ باکتری شیگلا، ایجاد عفونت را در بدن میزبان سبب میگردد (۱). شیگلوز به ویژه در کودکانی که آموزش های کاملی را در استفاده از سرویس های بهداشتی ندیده‌اند بیشتر دیده میشود. ابتلا به عفونت های حاد باسیلی در کودکانی که در شرایط بد تغذیه‌ای قرار دارند، خطر و شدت بالاتری را از خود نشان داده است، به طوری که اعضای خانواده و نیز هم بازی این کودکان از خطر فزاینده‌ای برای ابتلا به عفونت های ناشی از باکتری شیگلا برخوردار می باشند(۸-۶).

عفونت با شیگلا به عنوان یک مشکل بهداشتی عمده در کشورهای در حال توسعه مطرح است. شیگلوز در بزرگ سالان معمولاً بهبود مییابد ولی در کودکان و خردسالان بیماری با شدت بیشتری تظاهر مییابد که حتی در برخی از موارد نیاز به بستری در بیمارستان احساس می گردد (۹). تقریباً ۹۹٪ از عفونت های شیگلا در کشورهای در حال توسعه رخ میدهد و بر اساس گزارش های منتشر شده سالیانه حدود ۱/۱ میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوز به علت عدم درمان مناسب متاسفانه جان خود را از دست می دهند(۱۰).

شیگلا فلکسنری ۲a به عنوان یک سروار غالب در برخی از کشور ها مطرح است(۱۱). در مناطق آسیای جنوب شرقی به استثناء تایلند، سویه شیگلا فلکسنری (۶۸٪) فراوانی بالاتری در مقاسیه با دیگر سروارها دارد(۱۲ و۱۳). سروتیپ های شیگلا فلکسنری از پراکندگی و نرخ شیوع متفاوتی از یک ناحیه به ناحیه دیگر و یا حتی از یک سال به سال دیگر بر خوردار هستند. سروارهای شیگلا فلکسنری شامل ۲a ، ۳a ، ۱a ، ۱b ، ۲b ، ۱c ، ۶ و x مسئول بیش از ۹۰٪ از مجموع موارد آلودگی به شیگلا هستند. در کشور بنگلادش، سروار شیگلا فلکسنری ۲a به تنهایی ۲۷٪ از کل موارد ابتلا به عفونت شیگلا را به خود اختصاص داده است(۱۴).

ژن های آنتیژن پلاسمیدی- تهاجمی (ipaH) به صورت کپیهای متعدد بر روی کروموزوم و پلاسمید تهاجمی گونههای شیگلا و EIEC قرار گرفته اند. این ناحیه ژنی هم چنان به عنوان یک ناحیه هدف جذاب، برای تست های تشخیصی مطرح است. زیرا این ناحیه ژنی حتی در صورت عدم حضور پلاسمید تهاجمی در این گونه ها از طریق روش های تشخیص مولکولی قابل تشخیص است(۱۵). فرشاد و همکاران در سال ۲۰۰۶ با جداسازی ۸۲ سویه شیگلا از ۷۱۹ مدفوع بیمار مرجوعی به سه بیمارستان در شهر شیراز، گزارش نمودند سویه شیگلا سونه ای و شیگلا فلکسنری به ترتیب با فراوانی ۷۴/۳۹٪ و ۱۹/۵۱٪ بیشترین فراوانی را دارا می باشند(۱۶).

بیماری شیگلوز به عنوان یکی از موارد شایع بیماری های عفونی در کودکان ایرانی مطرح است. اما گزارش ها در مورد میزان شیوع سروار غالب و عمده و نیز دیگر خصوصیات آسیب زایی و اپیدمیولوژیکی (همه گیری) محدود و پراکنده می باشد(۲۰-۱۷). تا کنون هیچ گزارشی در مورد فراوانی حضور سروار شیگلا فلکسنری ۲a در ایران گزارش نشده است. با توجه به ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در گونه های شیگلا و نیز هزینه های بالای درمان آنتی بیوتیکی ضرورت درک و شناخت صحیح در مورد درصد فراوانی و پراکندگی سویه های غالب شیگلا به عنوان یک ضرورت اولیه به منظور تهیه واکسن های مناسب و موثر علیه شیگلوز احساس می شود. در مطالعه حاضر، با توجه به ضرورت فوق یک روش mPCR جدید با هدف شناسایی حضور سروار شیگلا فلکسنری ۲a در نمونه های بیمارستانی جمع آوری شده طراحی و نیز ارزیابی های مربوط به اختصاصیت و حساسیت این واکنش تعیین گردید.

روش کار

این مطالعه درآزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان بقیه الله اعظم (عج) در طول سال های ۸۹ تا ۹۰ انجام شد. بیماران شرکت کننده در مطالعه، علائم ظاهری اسهال حاد باسیلی را با درجات مختلفی از شدت بیماری نشان می دادند. در مجموع، تعداد ۲۷ جدایه از بیمارانی که از نظر حضور باکتری شیگلا فلکسنری مثبت در نظر گرفته شده بودند، از بیمارستان های طالقانی، میلاد و بقیه الله اعظم (عج) جمع آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد.

نمونه های بیمارستانی بلافاصله به محیط مک کانکی (Difco, USA) و محیط سالمونلا – شیگلا (SS) آگار (Difco, USA) منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پرگنه هایی (کلونی) که فاقد قدرت تخمیر قند لاکتوز بودند از روی دو محیط مک کانکی و سالمونلا – شیگلا آگار برداشته شده و در ۵ میلی لیتر محیط نوترینت مایع (Oxoid, England) تلقیح و به مدت ۶ ساعت در گرم خانه قرار داده تا به منظور انجام آزمایش های بیوشیمیایی به درجه مناسبی از رشد باکتریایی (OD_{600nm}=0.7) در طول موج ۶۰۰ نانومتر برسند، سپس شناسایی باکتری های شیگلا بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی با هدف تشخیص جنس و گونه شیگلا انجام گردید.

پس از تایید اولیه سویه های شیگلا به وسیله آزمایش های بیوشیمیایی، در این مرحله به منظور تعیین گونه شیگلا از واکنش سرولوژیکی با استفاده از کیت تجاری پلی کلونال (Mast, England) اختصاصی گونه فلکسنری اقدام گردید. در ابتدا، از سویه های شیگلا بر روی پلیت مک کانکی کشت مجدد و تازه تهیه شد و در ادامه آزمون تایید گونه شیگلا به وسیله واکنش آگلوتیناسیون بر روی شیشه اجرا گردید. تکنیک اجرا شده در این مطالعه براساس روش تالوکدر و همکاران بود (۲۱).

جهت استخراج DNA ژنومیک ابتدا نسبت به کشت سویه های شیگلا در محیط LB مایع اقدام و نمونه ها به مدت ۱۸ ساعت در گرم خانه شیکر دار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی AccuPrep (کره جنوبی، BioNEER) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.

آنزیم Taq DNA polymerase و مارکر 100bp DNA ladder از شرکت Fermentas تهیه شد. مواد Tris-base، dNTP، MgCl2، اتیدیوم بروماید از شرکت سینا کلون و باکتری های سالمونلا تیفی (ATCC 7251)، سالمونلا اینتریدیس (ATCC 13076)، اشرشیا کلی O157:H7، کلبسیلا پنومونی (ATCC 13883)، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و شیگلا سونه ای (ATCC 9290) از بانک میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهیه گردید. در آغاز با استفاده از توالی ژنومی شیگلا فلکسنری ۲a سویه 2457T موجود در بانک ژنی coliBASE و NCBI، یک جفت آغازگر اختصاصی برای ژن ipaH به عنوان شاخصی برای شناسایی انحصاری سویه های شیگلا و EIEC طراحی گردید. سپس، به منظور شناسایی اختصاصی سروار ۲a از گونه شیگلا فلکسنری، آنالیز های بیوانفورماتیکی مقایسه ای با استفاده از نرم افزار های آنلاین موجود در پایگاه داده های ژنومی NCBI و نیز دیگر نرم افزار ها مولکولی (DNASIS، CLC sequence viewer و Oligo) بر روی نواحی ژنومی she، pheV و tRNA اجرا گردید. آنالیز های هم ترازی (Alignment) نشان داد که آغاگز های flex2a-F و flex2a-R قادر به تکثیر یک ناحیه اختصاصی بر روی ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a می باشند که طولی معادل ۱۶۷۶ جفت باز را دارا می باشد. خصوصیات آغازگر ها از نظر وجود لوپ، دمای ذوب (Tm) و دیگر پارامتر های لازم مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید ویژگی های لازم، آغازگرها به منظور سنتز به شرکت سینا کلون (تهران، ایران) سفارش داده شد. توالی آغازگر ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

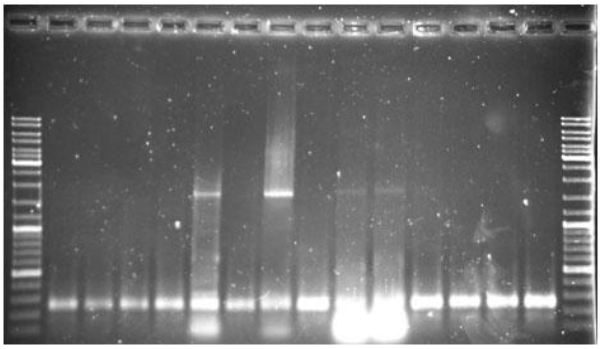
جدول ۱: اطلاعات مربوط به توالی آغازگر های استفاده شده به منظور تکثیر قطعات اختصاصی DNA در ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a.

محصول	ژن	آغازگر	توالی از '۵ به '۳	اندازه	منبع
IpaH	ipaH	ipaH-F ipaH-R	CGGACAACAGAATACACTCC CACTGAGTTTTTCCAGCCAT	۲۳۳	مطالعه حاضر
PAI	shePAI-int	flex2a-F flex2a-R	TCAACATGCTTCCAGCACTC AAACGGGCTGATACCCTTCT	۱۶۷۶	(۳۲)

واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط نوکلئوتید های dATP، dCTP، dGTP، dTTP و ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلی مراز Taq، ۵ میکرولیتر از بافر MgCl2،۱۰X با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA تهیه شده، بود. چرخه های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و دوره سه مرحله ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۳۰ دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود.
بافرTBE ۰/۵ X، را به میزان متناسب با حجم تانک الکتروفورز به آن اضافه نموده و سینی حاوی ژا آگارز با غظت ۱٪ در درون تانک قرار داده شد. سپس به میزان ۲ میکرولیتر از DNA مارکر و در ادامه نمونه های تکثیر شده در چاهک های ژل بارگذاری گردید. جریان و ولتاژ منبع تغذیه بر روی ۴۰ میلی آمپر و ۸۵ ولت تنظیم به ترتیب تنظیم گردید. در انتها، ژل از روی سینی خارج و به مدت ۱۵ دقیقه در رنگ اتیدیوم بروماید (با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر) و سپس به مدت ۷ دقیق در آب مقطر قرار داده شد. تصویر برداری از ژل توسط دستگاه تصویر برداری از ژل (BioRAD، USA) انجام گرفت.
اختصاصی بودن واکنش PCR با استفاده از ژنوم تخلیص شده ۶ باکتری شامل سویه های سالمونلا تیفی ، سالمونلا اینتریدیس، اشرشیا کلی O157:H7، کلبسیلا پنومونی، شیگلا سونه ای و شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و با توجه به دستورالعمل اشاره شده در بخش ۲-۵ انجام گرفت. برای تعیین میزان حساسیت واکنش طراحی شده بر اساس تعداد ابتدا از کشت تازه باکتری در محیط آبگوشت مغذی، باکتری های محیط مورد نظر تا رقت ۹-۱۰ (۱۵ باکتری در میکرولیتر) رقیق و برای تمامی رقت ها واکنش PCR انجام گردید. محاسبه تعداد باکتری ها در هررقت با فرآیند شمارش کلنی باکتری نیز صورت پذیرفت.

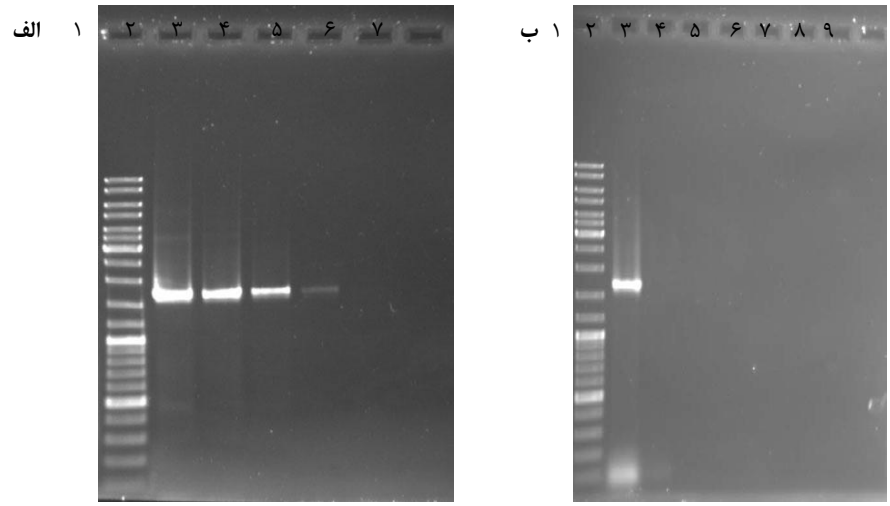
یافته ها

نتایج حاصل ازآنالیز بیوشیمیایی محیط لایزین دکربوکسیلاز و XLD (گزیلوز – لیزین – دکوکسی کولات) نشان داد در اثر عدم رخ داد دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لایزین (موجود در محیط) قلیایی شدن و بالطبع تغییر رنگ (در اثر معرف برموکروزول) صورت نمی گیرد و نتیجه واکنش از این حیث منفی مشاهده گردید. به منظور ارزیابی تخمیر کربوهیدرات های گلوکز و مانیتول از محیط های پایه قندی حاوی قند های گلوکز و مانیتول استفاده شد. واکنش تخمیر قندی در مورد این دو قند (گلوکز و مانیتول) به ترتیب، منفی و مثبت مشاهده شد. با توجه به اینکه اکثر باکتری های روده ای قند گلوکز را از طریق مسیر مخلوط اسیدی (Mixed acid fermentation pathway) تخمیر می نمایند، لذا آزمایش افتراقی MRVP برای تمایز جنس شیگلا انجام و نتیجه حاصل از آن مثبت به دست آمد. در مجموع، نتایج آنالیز محیط های بیوشمیایی حضور گونه شیگلا فلکسنری در نمونه های دریافتی را به طور کامل تایید نمود (اطلاعات نشان داده نشده است). بر اساس نتایج آزمون های سرولوژیکی، ۴ (۱۴/۸۱٪) از سویه های جدا شده به سروار ۲a و مابقی به سروار های غیر ۲a از گونه شیگلا فلکسنری تعلق گرفتند.
کیفیت آغازگر های سفارش داده شده با الکتروفورز بر روی ژل ۱۱ درصد پلی آکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. برای تشخیص شیگلا فلکسنری سروار ۲a با استفاده از واکنش mPCR از دو جفت آغازگر اختصاصی ویژه ژن ipaH و همچنین ناحیه PIA استفاده شد. قطعه ۲۳۲ جفت بازی مربوط به تکثیر بخشی از ژن ipaH که از این طریق نسبت به شناسایی جنس شیگلا و EIEC اقدام گردید (شکل ۱، ستون های ۲-۱۵) و قطعه ۱۶۷۶ جفت بازی نیز مربوط به تکثیر بخشی از ناحیه PIA در ژنوم باکتری شیگلا فلکسنری سروار ۲a می باشد که حضور این سروار را در نمونه های بیمارستانی تایید می نماید. جهت شناسایی همزمان گونه شیگلا و تعیین سروار ۲a از روش mPCR استفاده شد (شکل ۱ ستون ۶، ۸ ، ۱۰ و ۱۱)، که در این مرحله نسبت به شناسایی هم زمان گونه و سروار در یک زمان اقدام گردید. نتایج واکنش mPCR از ژنوم باکتری ها نشان داد که در مجموع ۴ سویه از ۲۷ گونه شیگلا متعلق به سروار ۲a می باشند (شکل۱).



تصویر۱. الکتروفورز محصولات PCR به منظور تشخیص حضور سویه شیگلا فلکسنری ۲a در بین نمونه های بیمارستانی شیگلا فلکسنری. ستون ۱ و ۱۶) نشانگر ۱Kb DNA از شرکت فرمنتاز. ستون ۶، ۸ ، ۱۰ و ۱۱) قطعه ۱۶۷۶ جفت بازی اثبات حضور ناحیه she در ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a. ستون ۲- ۱۵) حضور ژن ipaH در نمونه های شیگلا (قطعه ۲۳۲ جفت بازی).

در واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده ۶ باکتری، به عنوان کنترل منفی، قطعه ۱۶۷۶ جفت بازی تکثیر نیافت که نشان از اختصاصیت واکنش برای سرروار شیگلا فلکسنری ۲a می باشد. همانطور که در تصویر ۲- ب، دیده می شود به علت عدم وجود ناحیه she در ژنوم سایر سویه های باکتریایی هیچ قطعه تکثیر یافته ای مشاهده نگردید. به منظور ارزیابی حساسیت روش طراحی شده با هدف شناسایی مولکولی سروار ۲a از گونه شیگلا فلکسنری، پس از کشت و شمارش رقت های مختلف تهیه شده (≥۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۲۰، ۸۰، ۴۰ و ۲۰ سلول در میکرولیتر) باکتری شیگلا فلکسنری سروار ۲a، واجد ناحیه she تهیه و واکنش PCR انجام گرفت که نتایج آن در شکل ۲، الف نشان داده شده است. همانگونه که در تصویردیده می شود واکنش PCR برای رقت های ۸۰ سلول و بیشتر دارای پاسخ مثبت و محصول واکنش آن بر روی ژل آگارز با رقت ۱٪ ایجاد قطعه ۱۶۷۶ جفت بازی به وضوح قابل مشاهده است. با توجه به نتایج فوق حداقل میزان حساسیت این روش با استفاده از نمونه های مستقیم در حدود ۸۰ سلول تعیین گردید (تصویر۲ الف، ستون ۵).



تصویر۲. تعیین حساسیت و اختصاصیت واکنش پلی مراز چندگانه. پس از تهیه غلظت ۴۰۰۰ باکتری، رقت های زیر از باکتری شیگلا فلکسنری ۲a برای ارزیابی حساسیت واکنش PCR چندگانه مورد استفاده قرار گرفت.

الف) ستون ۱) نشانگر DNA 100 bp از شرکت فرمنتاز، ستون ۲) بیشتر از ۴۰۰۰ باکتری، ستون۳) ۲۰۰۰ باکتری، ستون ۴) ۳۲۰ باکتری، ستون ۵) ۸۰ باکتری، ستون ۶) ۴۰ باکتری، ستون۷) ۲۰ باکتری.

ب) ستون ۱) نشانگر DNA 100 bp از شرکت فرمنتاز، ستون ۲) استفاده از DNA شیگلا فلکسنری سروار ۲a به عنوان الگو در واکنش PCR چندگانه (کنترل مثبت)، ستون های ۳ تا ۹ استفاده از DNA ژنومی سویه های سالمونلا تیفی ، سالمونلا اینتریدیس، اشرشیا کلی O157:H7، کلبسیلا پنومونی، شیگلا سونه ای و شیگلا دیسانتری تیپ ۱ به عنوان الگو در واکنش PCR چندگانه.

بحث

شیگلوز به عنوان یک بیماری عفونی مهم و عامل ابتلا و مرگ و میر در کودکان در کشور های در حال توسعه مطرح می باشد. در مطالعه ای که توسط کاتلاف و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام گرفت مشخص شد که سالانه در حدود ۱۶۵ میلیون مورد از ابتلا به شیگلا در سراسر جهان گزارش می گردد که از این میزان، در حدود ۱۶۳ میلیون مورد آن در کشور های در حال توسعه رخ می دهد. شصت و یک در صد از کل مرگ و میر ناشی از شیگلوز به کودکانی با سن کمتر از ۵ سال نسبت داده می شود باشد(۱و۲). در ایران نیز تا کنون چندین گزارش در زمینه فراوانی ابتلا به بیماری شیگلوز منتشر شده است(۲۶-۲۳). فرشاد و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه بر روی ۷۱۹ بیمار مراجعه کننده به سه بیمارستان اصلی در شهر شیراز در طول ۶ ماه (از آپریل تا اکتبر ۲۰۰۳) گزارش نمودند که درصد شیوع شیگلوز برابر با ۱۱/۴٪ می باشد(۱۶). رنجبر و همکاران نیز، در سال ۲۰۰۷ در بررسی های خود نشان دادند که بیماری شیگلوز به عنوان یکی از دلایل عمده ابتلا کودکان به اسهال باسیلی در تهران مطرح می باشد(۲۴).

اگر چه شیگلوز به عنوان یک بیماری عفونی قابل توجه در کودکان با دامنه سنی از ۶ ماه تا ۱۲ سال را شامل می گردد اما این بیماری در افرادی که در مناطق با سطح بهداشتی پایین ساکن بوده و از نظر دسترسی به آب سالم و بهداشتی دارای محدودیت می باشند از شیوع بالاتری برخوردار است(۴). شناسایی و تشخیص گونه های شیگلا از نمونه های کلینیکی به طور سنتی شامل استفاده از محیط های کشت میکروبی، آنالیز های بیوشمیایی و در پاره ای از موارد از طریق واکنش های سرولوژیکی (سرم شناسی) می باشد. بکارگیری روش های کلاسیک و استفاده از محیط های بیوشمیایی برای تشخیص و شناسایی گونه های شیگلا اگرچه تا حدی اختصاصی است ولی از نظر انجام مراحل متعدد به شدت پر زحمت و وقت گیر می باشد. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) به عنوان یک روش حساس با قابلیت تکرارپذیری بالا، هزینه پایین و امکان اجرای واکنش های سنجشی همزمان در مقیاس وسیع، امروزه کاربرد بسیاری در مطالعات همه گیر شناسی (اپیدمیولوژیک) ونیز آزمایشگاه های تحقیقاتی پیدا کرده است.

در این مطالعه نظر به قابلبت های این تکنیک و مزایای آن نسبت به روش های سنتی، یک روش PCR چندگانه (mPCR) با هدف شناسایی حضور شیگلا فلکسنری ۲a طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفت. در بین گونه ها و سروار های جنس شیگلا، سروار شیگلا دیسانتری تیپ ۱ و شیگلا فلکسنری ۲a به دلیل وجود سم شیگا توکسین و انتروتوکسین های ShET1 و ShET2 به ترتیب، از اهمیت بیشتری در مقایسه با دیگر سروار ها برخوردار می باشند. آزمون های آزمایشگاهی که اخیراً بر روی سویه های واکسنی تخفیف حدت یافته علیه شیگلوز انجام گرفته است نشان می دهد که هر کدام از انتروتوکسین های ShET1 و یا ShET2 و یا هر دو آنها، در ایجاد علائم بالینی در بیماران موثر بوده و این ناشی از اهمیت این ژن ها به عنوان یک فاکتور بیماری زا در گونه های شیگلا به ویژه سروار ۲a می باشد(۲۷).

بسیاری از واکنش های mPCR به منظور شناسایی گونه های شیگلا و EIEC محدود به شناسایی حضور ژن ipaH است. یکی از محدودیت های عدم طراحی مارکر های ژنتیکی اختصاصی به منظور ایجاد تمایز بین گونه های شیگلا و سویه های EIEC، به دلیل قرابت ژنتیکی سویه های شیگلا با سویه های اشرشیا کلی مهاجم روده ای می باشد. در تحقیق حاضر، با توجه به آنالیز های بیوانفورماتیکی که بر روی ژنوم های گونه های شیگلا و سایر با کتری های گرم منفی انجام گرفت، یک واکنش mPCR جدید با هدف شناسایی ناحیه بیمای زای PIA در ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a طراحی گردید. ناحیه PIA، تقریباً یک محدوده ۴۶ کیلو بازی را بر روی ژنوم شیگلا فلکسنری ۲a شامل می گردد. ارزیابی هایی که با استفاده از نرم افزار های بیوانفورماتیکی اجرا گردید نشان داد که این ناحیه از طریق آغازگر های flex2a-F و flex2a-R به طور تکثیر می یابد.

روی و همکاران در اندمان هند در سال ۲۰۰۶، سویه های بیمارستانی جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال را در طول سال های ۱۱۹۴ تا ۲۰۰۴ مورد آزمایش قرار دادند و با کمک آژمون PCR مشخص نمودند که در ۱۰۰ درصد از سویه های شیگلا فلکسنری (۲a و غیر ۲a) واجد انتروتوکسین ShET1 و در ۴۹/۱٪ درصد از موارد نیز از نظر حضور انتروتوکسین ShET2 مثبت می باشند(۲۷). در مطالعه ای دیگر، وارگاس و همکاران در طول سال های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۸بر روی۵۰۰ نمونه مدفوع گرفته شده از افراد مسافر که علائم اسهال را نشان می دادند حضور و یا عدم حضور انتروتوکسین ها شیگلا را بررسی نمودند. نتایج حاصل از ارزیابی های آنها نشان داد که انتروتوکسین ShET1 تنها در شیگلا فلکسنری حضور دارد و در گونه های دیگر فاقد آن می باشند. نتایج حاصل از مطالعات وارگاس و همکاران نیز نشان داد که ShET1 تنها به طور انحصاری در شیگلا فلکسنری ۲a حضور دارد(۲۸).

در مطالعات متعددی نشان داده شده است که ژن ipaH به عنوان یک مارکر ژنتیکی اختصاصی و مناسب در مقایسه با ژن ial مطرح می باشد. یکی از فرضیه های توجیه پذیری را که می توان برای این موضوع پیشنهاد نمود در واقع به عدم پایداری ژن های بیماری زا باکتری بر می گردد. زمانی که برای اولین بار سویه بیماری زا، از بیمار دارای علائم بالینی جدا می شود در آغاز فرآیند شناسایی از نظر حضور ژن های بیماری زایی که بر روی پلاسمید تهاجمی گونه های شیگلا قرار گرفته اند با توجه به بررسی های ژنوتیپی و فنوتیپی مثبت ارزیابی می گردند اما به طور غیر قابل انتظاری زمانی که این سویه ذخیره (storage) و سپس مجدداً احیا می گردد و یا اینکه از سویه جدا شده، کشت مجدد (subculturing) تهیه می گردد، ممکن است ژن های بیماری زای خود را که بر روی پلاسمید حدت زای شیگلا قرار گرفته اند از دست بدهد. یکی از فرضیه هایی را که می توان به عنوان علت این موضوع مطرح نمود این است که به دلیل فقدان گیرنده های اختصاصی در سیستم خارج از بدن میزبان از یک طرف و نیز نبود شرایط لازم و کافی شامل عدم دمای مناسب یرای رشد و دیگر پارامتر های فیزیکوشیمیایی در محیط در شیشه (In vitro) از طرف دیگر سبب می گردد تا سویه باکتریایی به منظور حفظ حیات و نیز قابلیت تکثیر خود در این شرایط، جریان مصرف انرژی خود را در جهت غیر فعال سازی و یا دفع ژن های حدت به کار گیرد (۱۵). بنابراین، استفاده از مارکر های ژنتیکی که دارای کپی های متعدد ژنومی (پلاسمید و کروموزوم) می باشند به عنوان یک کاندید مناسب و قابل اتکا در شناسایی گونه های پاتوژن از کارکرد منتاسب تری بر خوردارند.

در تحقیق حاضر نیز با توجه به نتایج بدست آمده، ناحیه ژنی PIA به عنوان مارکر ژنتیکی با هدف شناسایی سروار شیگلا فلکسنری استفاده شد. حساسیت بدست آمده در تحقیق حاضر برابر با میزان ۸۵ سلول در هر میلی لیتر به دست آمد که این مقدار با نتایج مطالعات دیگر تقریباً مشابه می باشد. در مطالعه ای که توسط هونگ و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام گردید مقدار ۱۰۴ × ۷/۴ (cfu) در هر میلی لیتر به دست آمد. با توجه به اینکه تنها حضور ۱۰۰ باکتری شیگلا در بیماران سبب ایجاد شیگلوز در افراد می گردد اما با این وجود، درصد بالایی از بیماران مبتلا به شیگلوز حضور حداقل ۱۰۴ میکروارگانسیم زنده را در نمونه های مدفوع خود نشان داده اند. یکی از دیگر از تکنیک های بسیار حساسی که به منظور شناسایی سروار های شیگلا توسط لی و همکاران در سال ۲۰۰۹ به کار گرفته شد بر پایه تشخیص تنوع ژنتیکی بین ژن های رمز کننده زنجیره های پلی ساکاریدی آنتی ژن O گونه های شیگلا استوار بود. انها توانستند ۳۴ سروار شیگلا را بر اساس نتایج حاصل از تکنیک Microarray تمایز ایجاد نمایند(۲۹). اگر چه این تکنیک از اختصاصیت، حساسیت و قابلیت تکرارپذیری برخوردار می باشد اما از استفاده از این روش در مطالعات اپیدمیولوژیک و آزمایشگاه های تشخیصی با توجه به هزینه های بالا، ضرورت ابزارها و کارشناسان متخصص استفاده از این روش را مشکل نموده است.

در این تحقیق از ۲۷ نمونه شیگلا که مورد آزمایش قرار گرفت، ۴ سویه به عنوان سروار ۲a از گونه شیگلا فلکسنری مورد شناسایی قرار گرفت. در مجموع تمام سویه های شیگلا از نظر حضور ژن ipaH (۱۰۰٪) مثبت تشخیص داده شدند. فارفان و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه بر روی ۳۸۳ سویه شیگلا که از مناطق جغرافیایی مختلفی جمع آوری شده بود گزارش نمودند که ۱۰۳ سویه متعلق به سروار شیگلا فلکسنری ۲a و ۱۱۰ سویه (۲۸/۷۲٪) متعلق به گونه فلکسنری ولی سروار غیر از ۲a می باشند. مشاهدات ما در مطالعه حاضر، نتایج به دست آمده توسط فارفان و همکاران را تایید می نماید. آنها در مطالعات خود نشان دادند که ناحیه PIA به طور انحصاری در شیگلا فلکسنری ۲a حضور دارد. در این مطالعه نیز، از مجموع ۴ سویه شیگلا جدا شده (۲۷/۴ سویه) به سرروار ۲a تعلق گرفتند، بنابراین موید گزارشات پیشین در مورد حضور اختصاصی این ناحیه نی در این سروار می باشد(۲۹). تکنیک معرفی شده در مطالعه حاضر، یک روش جدید را بر پایه شناسایی گونه شیگلا و تعیین سرروار ۲a را به منظور کاربرد درراستای مطالعات اپیدمیولوژیک و ارزیابی های بالینی با هدف شناسایی و بررسی تنوع و شیوع سروار غالب در نمونه های بیمارستانی و غیره را تامین می کند.

نتیجه گیری

واکنش زنجیره ای پلی مراز که در مقاله حاضر معرفی شده است، در واقع می تواند به عنوان یک روش جدید به منظور شناسایی سروار های مختلف در مطالعات همه گیر شناسی و نیز بیمارستانی از جایگاه ویژه ای بر خوردار باشد. با توجه به اینکه در روش های پیشین معرفی شده در مورد تشخیص سویه های شیگلا، اساس واکنش سنجشی بر پایه تشخیص حضور ژن های حدت زای سویه شیگلا بر روی پلاسمید تهاجمی این باکتری استوار بود اما روش معرفی شده در مقاله حاضر قادر است به طور انحصاری سویه های شیگلا فلکسنری را از سایر سویه های نزدیک به این سویه شامل شیگلا سونه ای و نیز سویه های اشرشیا کلی های مهاجم روده ای (EIEC) تمایز دهد لذا این تکنیک می تواند به عنوان روشی جایگزین در مقایسه با روش های سرم شناسی مطرح گردد. به علاوه، از آنجایی که در حال حاضر بیشترین توجه محققین بر روی ساخت سویه های زنده تخفیف حدت یافته بر اساس شیوع نوع سویه های غالب در مناطق جغرافیایی می باشد؛ بنابراین، این تکنیک می تواند به عنوان یک ابزار ارزشمند در مطالعات همه گیر شناسی به منظور تعیین سروار غالب نیز مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

ازآقایان رشیدیانی، عطایی، غفاری و هیئت در آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و مهندس زند، اکبری و براتی در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع) و همچنین از کارکنان بخش بیماری های عفونی بیمارستان های طالقانی، میلاد و بقیه الله اعظم (عج که ما را در انجام این تحقیق صمیمانه یاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES

1. Jennison AV, Verma NK. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiol Rev. 2004 Feb;28(1):43-58.

2. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ. 1999;77(8):651-66.

3. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5080-8.

4. Sansonetti PJ. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. FEMS Microbiol Rev. 2001 Jan;25(1):3-14.

5. Arvelo W, Hinkle CJ, Nguyen TA, Weiser T, Steinmuller N, Khan F, et al. Transmission risk factors and treatment of pediatric shigellosis during a large daycare center-associated outbreak of multidrug resistant Shigella sonnei: implications for the management of shigellosis outbreaks among children. Pediatr Infect Dis J. 2009 Nov;28(11):976-80.

6. Bennish ML, Khan WA, Begum M, Bridges EA, Ahmed S, Saha D, et al. Low risk of hemolytic uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for Shigella dysenteriae type 1 infection in Bangladesh. Clin Infect Dis. 2006 Feb 1;42(3):356-62.

7. Emch M, Ali M, Yunus M. Risk areas and neighborhood-level risk factors for Shigella dysenteriae 1 and Shigella flexneri. Health Place. 2008 Mar;14(1):96-105.

8. Shane AL, Tucker NA, Crump JA, Mintz ED, Painter JA. Sharing Shigella: risk factors for a multicommunity outbreak of shigellosis. Arch Pediatr Adolesc Med. 2003 Jun;157(6):601-3.

9. Nhieu GT, Sansonetti PJ. Mechanism of Shigella entry into epithelial cells. Curr Opin Microbiol. 1999 Feb;2(1):51-5.

10. Rahman KM, Arifeen SE, Zaman K, Rahman M, Raqib R, Yunus M, et al. Safety, dose, immunogenicity, and transmissibility of an oral live attenuated Shigella flexneri 2a vaccine candidate (SC602) among healthy adults and school children in Matlab, Bangladesh. Vaccine. 2011 Feb 1;29(6):1347-54.

11. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, et al. Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157. Nucleic Acids Res. 2002 Oct 15;30(20):4432-41.

12. Bangtrakulnonth A, Vieira AR, Lo Fo Wong DM, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawanpanyalert P, et al. Shigella from humans in Thailand during 1993 to 2006: spatial-time trends in species and serotype distribution. Foodborne Pathog Dis. 2008 Dec;5(6):773-84.

13. Na-Ubol M, Samosornsuk S, Von Seidlein L, Tapchaisri P, Ali M, Clemens JD, et al. Molecular characteristics of Shigella spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. Epidemiol Infect. 2006 Oct;134(5):997-1003.

14. Zaman K, Yunus M, Baqui AH, Hossain KM. Surveillance of shigellosis in rural Bangladesh: a 10 years review. J Pak Med Assoc. 1991 Apr;41(4):75-8.

15. Thong KL, Hoe SL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. BMC Infect Dis. 2005 Feb 14;5:8.

16. 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 Aug;44(8):2879-83.

17. Ranjbar R, Hosseini MJ, Kaffashian AR, Farshad S. An outbreak of shigellosis due to Shigella flexneri serotype 3a in a prison in Iran. Arch Iran Med. 2010 Sep;13(5):413-6.

18. Ranjbar R, Mammina C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic Shigella boydii strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. BMC Res Notes. 2008;1:74.

19. 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 Dec;26(4):426-30.

20. Ranjbar R, Soltan-Dallal MM, Pourshafie MR, Mammina C. Antibiotic resistance among Shigella serogroups isolated in Tehran, Iran (2002-2004). J Infect Dev Ctries. 2009;3(8):647-8.

21. Talukder KA, Islam Z, Dutta DK, Islam MA, Khajanchi BK, Azmi IJ, et al. Antibiotic resistance and genetic diversity of Shigella sonnei isolated from patients with diarrhoea between 1999 and 2003 in Bangladesh. J Med Microbiol. 2006 Sep;55(Pt 9):1257-63.

22. Farfan MJ, Garay TA, Prado CA, Filliol I, Ulloa MT, Toro CS. A new multiplex PCR for differential identification of Shigella flexneri and Shigella sonnei and detection of Shigella virulence determinants. Epidemiol Infect. 2010 Apr;138(4):525-33.

23. Hosseini MJ, Ranjbar R, Ghasemi H, Jalalian HR. The prevalence and antibiotic resistance of Shigella sp. recovered from patients admitted to Bouali Hospital, Tehran, Iran during 1999-2001. Pak J Biol Sci. 2007 Aug 15;10(16):2778-80.

24. Ranjbar R, Aleo A, Giammanco GM, Dionisi AM, Sadeghifard N, Mammina C. Genetic relatedness among isolates of Shigella sonnei carrying class 2 integrons in Tehran, Iran, 2002-2003. BMC Infect Dis. 2007;7:62.

25. MoezArdalan K, Zali MR, Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of Shigella species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. J Health Popul Nutr. 2003 Jun;21(2):96-102.

26. Nikkah J, Mehr-Movahead A. Antibiotic resistance among Shigella species isolated in Tehran, Iran. Ann Trop Med Parasitol. 1988 Oct;82(5):481-3.

27 Roy S, Thanasekaran K, Dutta Roy AR, Sehgal SC. Distribution of Shigella enterotoxin genes and secreted autotransporter toxin gene among diverse species and serotypes of shigella isolated from Andaman Islands, India. Trop Med Int Health. 2006 Nov;11(11):1694-8.

28. Vargas M, Gascon J ,Jimenez De Anta MT, Vila J. Prevalence of Shigella enterotoxins 1 and 2 among Shigella strains isolated from patients with traveler's diarrhea. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3608-11.

29. Li Y, Cao B, Liu B, Liu D, Gao Q, Peng X, et al. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of Shigella. J Med Microbiol. 2009 Jan;58(Pt 1):69-81.