جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طب‌نظامی
زمستان ۱۳۸٤، شماره۷ (٤)
صفحات: ۳۲۹ -۳۲۱

شناسائی ژن شیگاتوکسین به‌وسیله روش Multiplex PCR

امیر همایون کیهان[۱]*.M.Sc.، مجتبی سعادتی[۲]** .Ph.D، احمد کریمی راهجردی[۳]**.M.Sc. و مهدی کمالی[۴]**.M.Sc.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... «عج»- بیمارستان قلب جماران-تهران-ایران*

** دانشگاه امام حسین (ع) -دانشکده علوم پایه -گروه علوم زیستی-تهران-ایران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۱۰/۱٤ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۲/۳۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۱

خلاصه

مقدمه: زیر گونه‌های STEC (Shiga toxin– producing *E. coli*) و بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری باعث ایجاد اسهال، کولیت هموراژیک و ناهنجاری‌های بدخیم سیستم مجاری ادراری HUS (Hemolytic Uremic Syndrome) در انسان می‌شوند. بسیاری از نشانه‌های کلینیکی این بیماری در اثر تولید شیگا توکسین ۱(Stx /Stx1)، شیگا توکسین ۲ (Stx2) و یا مجموعه‌ای از هر دو نوع توکسین پدید می‌آید. این تحقیق جهت شناسایی ژن این توکسین‌ها به‌وسیله روش ملکولی صورت گرفته است.

مواد و روش کار: برای شناسایی ژن‌های *stx/stx1* و *stx2* تکنیکی براساس Multiplex PCR به همراه ژن مالات دهیدروژناز (*mdh*) موجود در دو باکتری *E. coli* و شیگلا طراحی شده است. مجموعه‌ای از ۶ پرایمر استفاده شده است: SFI وSRI یک قطعه bp ۱۹۹ از ژن *mdh* را تولید می‌کنند که به‌عنوان یک کنترل مثبت (Internal positive control) برای صحت واکنش عمل می‌کند، Ka2Rو Ka2F یک قطعه ۳۸۱pb از ژن *stx2* را تولید و Ka1F و Ka1R یک قطعه ۶۲۲pb از ژن *stx/stx1* را تولید کنند. جهت تایید محصولات واکنش از فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

نتایج: محصولات PCR ژن‌های *stx/stx1* و *stx2* و *mdh* تنها در *E. coli* O157:H7 به‌طور همزمان مشاهده شد و در بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قطعه مربوط به *stx/stx1* و*mdh* مشاهده گردید. در ژنوم تخلیص شده از دیگر باکتری‌های گرم منفی قطعات مربوط به توکسین مشاهده نشد. فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت قطعات تکثیر شده را مورد تایید قرار داد. حساسیت واکنش PCR برای شناسایی ژن شیگا توکسین ۲/۱pg/µl از ژنوم باکتری و معادل ۳۲۰ cfu/µl بود.

بحث: واکنش طراحی شده قادر به شناسایی ژن‌های *stx/stx1*, *stx2* و*mdh* می‌باشد. *E. coli* O157:H7 قادر به تولید هر دو نوع شیگا توکسین و بیوتیپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قادر به تولید نوع ۱ شیگا توکسین می‌باشند. با بررسی‌های انجام شده بر روی قطعات تکثیر شده و مقایسه آن‌ها با بانک ژنوم مشخص شد که قطعه در نظر گرفته شده برای تکثیر *stx2* در تمامی انواع این ژن وجود دارد، در نتیجه جهت شناسایی آن‌ها مناسب می‌باشد. این روش وسیله‌ای مناسب جهت تشخیص انواع شیگا توکسین‌ها می‌باشد چرا که سریع، اختصاصی، حساس و ارزان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیگا توکسین، شیگلادیسانتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندتایی، اسهال

۱- کارشناس ارشد- بیمارستان جماران- نویسنده مسئول
۲- استادیار- دانشگاه امام حسین(ع)
۳- کارشناس ارشد- دانشگاه امام حسین(ع)
۴- کارشناس ارشد- دانشگاه امام حسین(ع)

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

شیگاتوکسین و توکسین‌های شبیه شیگا (وروتوکسین‌ها) متعلق به خانواده بزرگی از توکسین‌های باکتریایی و گیاهی هستند که طی یک روند بیولوژیک باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند. این توکسین‌ها ابتدا از طریق یک رسپتور گلیکولیپیدی به‌نام Gb3 به سطح سلول متصل شده و سپس طی پدیده اندوسیتوز وارد سلول شده و طی یک روند آنزیمی با خارج کردن یک آدنین از 28S r RNA بخش 60S ریبوزوم فرآیند سنتز پروتئین را در سلول مهار کرده و باعث مرگ سلول می‌شوند. [۱۴ و ۲۱] شیگاتوکسین (Stx) توسط شیگلا دیسانتری تولید می‌شود و شدت بیماری حاصل از این باکتری را افزایش می‌دهد، در حالی‌که توکسین‌های شبیه شیگا که تا اندازه‌ای با شیگا توکسین تفاوت دارند توسط نژادهایی از *E. coli* (STEC) ترشح می‌شوند [۱۱]. علاوه بر باکتری *E. coli* که قادر به تولید ورو توکسین‌ها می‌باشد، برخی از انتروباکتریاسه‌ها نیز نظیر انتروباکتر کلوکئی (*Enterobacter cloacae*)، سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundii*)، آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، آئروموناس کاوئی (*Aeromonas caviae*) نیز قادر به تولید این توکسین‌ها هستند[۲۴ و ۲۱]. ژن‌های شیگا توکسین در *E. coli* و نیز در شیگلاسونئی عموماً در فاژهای خاص قرار دارند [۲۴، ۱۹، ۱۷ و ۱۰]. تاکنون انواع مختلفی از این توکسین ازجمله: *stx* , *stx1*, *stx1c*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* و *stx2f* شناسایی شده‌اند [۴، ۶، ۸،۹، ۲۲، ۲۳ ، ۲۵]. باکتری‌های تولید کننده وروتوکسین مهم‌ترین عامل تولید HUS می‌باشند که اغلب در کودکان و افراد مسن مشاهده می‌شوند و حتی در کشورهای توسعه یافته مشکلات حادی را برای سلامت عمومی پدید می‌آورند، بنابراین افزایش اطلاعات پیرامون این توکسین‌ها و واکنش‌های آن‌ها با انواع سلول‌ها می‌تواند در درمان عفونت مؤثر باشد [۱۶]. تاکنون روش‌های متعددی جهت شناسایی شیگاتوکسین و یا ژن مربوط به آن شامل: Tissue culture cytotoxicity assay, PCR, ELISA, Revers passive latex agglutination, Hybridization ارایه شده است [۱۶].

در سال ۱۹۸۹ H. Karch وT. Meyer از تکنیک PCR جهت شناسایی ژن‌های شیگاتوکسین استفاده کردند. این محققین از یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن‌های مختلف شیگا توکسین یعنی *stx2*, *stx/stx1* استفاده کردند. در ضمن جهت شناسایی محصول PCR از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی DNA با اتیدیوم بروماید استفاده کردند که ساده‌ترین روش شناسایی جهت محصولات PCR می‌باشد. جهت تأئید محصولات PCR نیز از دو پروب الیگونوکلئوتیدی ۲۰bp که مکمل آن‌ها در درون قطعات تکثیر شده قرار دارد بهره بردند. [۱۲]

با توجه به این‌که این توکسین دارای تنوع ژنتیکی است شناسایی آن طی یک واکنش PCR کار مشکلی خواهد بود، به همین دلیل محققین درصدد برآمدند تا با بررسی توالی ژن انواع شیگا توکسین نسبت به طراحی پرایمرهایی که بتوانند به‌وسیله آن‌ها انواع این توکسین را مورد شناسایی قرار دهند، اقدام کنند. از آنجایی که باکتری‌های تولید کننده این توکسین در اغلب موارد دارای فاکتورهای ویرولانس دیگری نیز می‌باشند محققین سعی کردند با طراحی واکنش‌های Multiplex PCR علاوه بر شناسایی شیگاتوکسین، دیگر عوامل حدت زا را نیز مورد شناسایی قرار دهند. [۱۶]

در این مطالعه یک واکنش Multiplex PCR طراحی شده که در آن از دو جفت پرایمر جهت شناسایی انواع ژن شیگاتوکسین جدای از تفاوت‌هایی که از نظر توالی با یکدیگر دارند استفاده شده است. همچنین از یک جفت پرایمر جهت تکثیرقطعه‌ای از ژن مالات دهیدروژناز (*mdh*) که در ارگانیسم‌های مولد این توکسین وجود دارد به عنوان کنترل مثبت داخلی استفاده شده است.

مواد و روش کار

باکتری‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده: باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از:

Shigella dysenteriae (biotype: 1, 4, 7, 8), Shigella *flexneri* (biotype 2a), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*,

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Salmonella paratyphi C, *Vibrio cholerae* (strain: ogava and inaba), *E. coli* (serotype O157:H7) بیوتایپ ۱ شیگلادیسانتری با شناسه بین‌المللی RITCC1875 از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و ۱۰ باکتری دیگر از آزمایشگاه رفرانس ایران تهیه گردید. جهت رشد باکتری‌ها از محیط مایع TSB و گرمادهی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت استفاده شد. جهت شناسایی گونه باکتری‌ها ازروش ارایه شده توسط Collee, J.G. و همکارانش استفاده شد [۵].

پرایمرهای مورد استفاده: سه جفت پرایمر ارایه شده از طرف سایت اینترنتی بنام www.stechome.com جهت تشخیص ژن شیگاتوکسین انتخاب شد. دو جفت پرایمر جهت تکثیر قطعات *stx2, stx1* و یک جفت پرایمر جهت تکثیر قطعه کنترل مثبت داخلی مورد استفاده قرار گرفت که عبارتند از:

(SFI): 5-ĆTA-ACC-CGG-TTA-ACA-CCA-CAG-T-3´

(SRI): 5-ĞGA-AGA-ATG-ACA-CCA-GAG-T-3´

(Ka1F): 5-ĞGG-ATA-GAT-CCA-GAG-GAA-GG-3´

(Ka1R): 5-ĆCG-GAC-ACA-TAG-AAG-GAA-ACT-C-3´

(Ka2F): 5-ĆTG-GCG-TTA-ATG-GAG-TTC-AG-3´

(Ka2R): 5-ĆCT-GTC-GCC-AGT-TAT-CTG-AC-3´

پرایمرهای (SFI) و (SRI) قطعه‌ای به طول ۱۹۹bp را تکثیر خواهند کرد که این قطعه مربوط به ژن آنزیم مالات دهیدروژناز می‌باشد و به عنوان کنترل مثبت داخلی از آن استفاده شده است. پرایمرهای (Ka1R) و(Ka1F) قطعه‌ای به طول ۶۲۲bp را تکثیر نموده که مربوط به ژن *stx/stx1* است وپرایمرهای (Ka2F) و (Ka2R) قطعه‌ای به طول۳۸۱bp را تکثیر نموده که مربوط به ژن *stx2* می‌باشد. برای بررسی خصوصیات این قطعات و پرایمرها از نرم افزارهای مولکولی DNASIS,BLAST,Oligo استفاده شد. پس از بررسی و تأئید خصوصیات، پرایمرها توسط دو شرکت MWG آلمان وDNA Technology AIS دانمارک ساخته شدند.

تخلیص ژنوم: برای استخراج و تخلیص DNA ژنومیک از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت باکتری‌های مورد مطالعه به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب (Pellet) حاصل در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris HCl, 10mM EDTA)، ۳۰ میکرولیتر بافر SDS ۱۰٪ و۳ میکرولیتر آنزیم Proteinase K (20 mg/ml) حل شده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به مخلوط حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (۴/۱ گرم NaCl، ۱۰ گرم CTAB و ۸۰ میلی لیتر DDW) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به مخلوط حاصل۷۸۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه و پس از تکان دادن به مدت ۲۵ دقیقه در۲۵۰۰rpmسانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوب دیگری منتقل گردید و هم حجم آن مخلوط فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) اضافه شد و پس از سانتریفوژ ۲۵ دقیقه‌ای در rpm ۲۵۰۰، عمل ترسیب DNA به‌وسیله ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و در نهایتDNA حاصل در۱۰۰میکرولیتر بافر TE (pH=8) و ۳ میکرولیتر آنزیم Rnase A حل شد[۲۰].

اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده: برای این منظور از دستگاه UV spectrophotometer ساخت شرکت Techne استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه DNA ژنومیک ابتدا ژنوم به نسبت $\frac{۴}{۵۰}$ با آب مقطر رقیق شد. پس از تهیه رقت از ژنوم تخلیص شده، میزان جذب نمونه ژنومیک در طول موج۲۶۰nm (طول موج قابل جذب برای DNA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری OD, غلظت DNA از رابطه زیر محاسبه شد:

DNA غلظت = ۵۰ × عکس ضریب رقت × OD

نکته: عدد ۵۰ در رابطه بالا ضریب ثابت می‌باشد و در حقیقت نشان دهنده غلظت یک نمونه DNA بر حسب ng/µl می‌باشد، زمانی‌که میزان جذب آن نمونه در ۲۶۰nm برابر یک باشد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای انجام فرآیند PCR، ۰/۵ میکرولیتر از DNA تخلیص شده باکتری *E. coli* O157:H7 (با غلظت ۲۱۰ng/µl) و ۴ باکتری شیگلا دیسانتری (بیوتایپ‌های ۷، ۴، ۱ و ۸) با ۲۴/۵ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط

شد. این اجزا عبارتند از: ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۵ pmol/µl (در مجموع۶ میکرولیتر)،

۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت ۲/۵ mM، ۳/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۱۰mM، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰X PCR buffer، ۱۰/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل (DDW) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5unit/µl).

برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۰ چرخه تکثیر DNA (۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ زا (Loading buffer) توسط ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد.

تایید محصولات واکنش: برای این منظور هم از هضم آنزیمی محصولات واکنش توسط آنزیم‌های محدود کننده و هم تعیین توالی استفاده شد. پس از بررسی توالی سه قطعه مورد انتظار توسط نرم افزار DNASIS سه آنزیم Hind III برای هضم قطعه *stx/stx1*، Hae III برای هضم قطعه *stx2* و EcoR V برای هضم قطعه کنترل داخلی در نظر گرفته شدند. پس از تکثیر هر یک از قطعات به صورت مجزا، ۶ میکرولیتر از آن‌ها توسط ۱ میکرولیتر از آنزیم مربوطه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد هضم قرار گرفت و محصول هضم آنزیمی توسط ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد.

به‌منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر یک از قطعات تکثیر شده توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت Fermentas تخلیص شد و فرآیند تعیین توالی توسط شرکت MWG آلمان انجام گرفت.

تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از ۱۰ باکتری خانواده انتروباکتریاسه انجام شد. این باکتری‌ها عبارتند از:

Shigella dysenteriae (biotype: 1, 4, 7, 8), *Shigella flexneri* (biotype 2a), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Salmonella paratyphi* C, *Vibrio cholerae* (strain: ogava and inaba).

پس از انجام واکنش محصول با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد.

تعیین میزان حساسیت واکنش PCR: میزان حساسیت واکنش طراحی شده هم براساس میزان ژنوم تخلیص شده و هم براساس تعداد باکتری محاسبه گردید. برای این منظور ژنوم باکتری *E. coli* O157:H7 با غلظت ۲۱۰ng/µl تا رقت $۱۰^{-۹}$ توسط بافر TE (pH=8) رقیق شد و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شده و محصول واکنش توسط ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

برای محاسبه حساسیت واکنش بر اساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری در محیط LB و اندازه‌گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا $۱۰^{-۱۰}$ رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد و جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرآیند شمارش باکتری (Colony count) انجام گرفت[۲۷].

نتایج

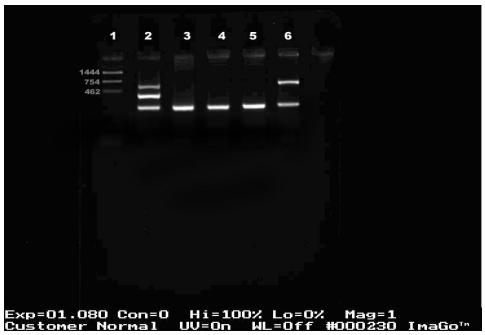
اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده: پس از تخلیص DNA ژنومیک باکتری *E. coli* O157:H7 میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که حاصل آن عدد ۰/۳۳۶ بود و غلظت نهایی نمونه بر حسب ng/µl به‌صورت زیر محاسبه شد:

$$۵۰ \times \frac{۵۰}{۴} \times ۰/۳۳۶ = ۲۱۰ \text{ ng/µl}$$

واکنش PCR با DNA ژنومیک تخلیص شده: پس از اتمام واکنش PCR با محصول ژنومیک ۵ باکتری شیگلا و *E. coli* و الکتروفورز آن‌ها توسط ژل آگارز ۲درصد نتیجه واکنش مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، هر سه قطعه مربوط به Control, *stx2*, *stx/stx1* در مورد *E. coli* O157:H7 تکثیر شده‌اند (ستون ۲) و در مورد گونه شیگلادیسانتری تنها قطعه Control و *stx/stx1* در بیوتایپ ۱ این باکتری تکثیر شده (ستون ۶) و در سه بیوتایپ ۴،۷،۸ تنها قطعه Control تکثیر شده است که تکثیر قطعه کنترل دلیلی بر صحت انجام واکنش می‌باشد

(ستون ۵-۳). اندازه دقیق قطعات مورد نظر در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد که در آن محصول واکنش PCR با ژنوم *E. coli* O157:H7 به همراه مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شده است.



شکل ۱: واکنش PCR با محصول ژنومیک.

۱- Size marker (pUC18-TaqI)، ۲- *E. coli* O157:H7. تولید هر سه قطعه در این باکتری نشان‌دهنده این است که باکتری قادر به تولید هر دونوع شیگا توکسین می‌باشد، ۳- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۴)،۴- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۷)، ۵- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۸)، ۶- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۱)،(تولید قطعه ۶۲۲bp در این باکتری نشان‌دهنده این است که باکتری تنها قادر به تولید Stx/Stx1 می‌باشد).

شکل ۲: واکنش PCR با محصول ژنومیک

۱- Size marker (100bp)، ۲- E.coli 0157:H7. اندازه دقیق هر سه قطعه مورد نظر در این شکل قابل مشاهده می‌باشد.

شکل ۳: برش آنزیمی محصولات PCR

۱-Size marker، ۲- قطعات حاصل از برش آنزیمی Stx1، ۳- قطعات حاصل از برش آنزیمی Stx2، ۴- قطعات حاصل از برش آنزیمی Control. با توجه به نزدیک بودن اندازه‌ها، دو قطعه به صورت یک باند مشاهده می‌شوند.

تایید محصولات PCR: پس از بررسی قطعات تکثیر شده توسط نرم افزار DNASIS ، سه آنزیم Hind III، Hae III و EcoR V جهت هضم این قطعات در نظر گرفته شد که پس از انجام هضم آنزیمی برروی هر یک از قطعات نتایج حاصل از آن در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

شکل ۴: تعیین specificity واکنش PCR

۱- E.coli 0157:H7 (به عنوان مارکر و کنترل مثبت)، ۲- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۴)، ۳- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۷)، ۴- شیگلا دیسانتری (بیوتایپ ۸)، ۵-۰شیگلا فلکسنری (بیوتایپ 2a)، ۶- شیگلا سونئی، ۷- شیگلا بوئیدی، ۸- ویبریوکلرا (سروتیپ اگاوا)، ۹- ویبریو کلرا(سروتیپ اینابا)، ۱۰- سالمونا پاراتیفی C.

در ستون۷-۲ تنها قطعه mdh تولید شده است .این باکتری‌ها قادر به تولید توکسین نمی‌باشند. سه باکتری دیگر نیز علاوه بر عدم تولید توکسین فاقد قطعه mdh می‌باشند. وجود باند اضافی در زیر قطعه ۱۹۹bp مربوط به پرایمرها و dNTP استفاده نشده در واکنش می‌باشد.

آنزیم Hind III قطعه *stx1* را در جایگاه ۳۳۵ مورد برش قرار داده که در نتیجه این فرایند دو قطعه ۲۸۷ bp و ۳۳۵ bp ایجاد شده است (ستون ۲). آنزیم Hae III نیز قطعه *stx2* را در جایگاه ۲۸۸ برش داده که دو قطعه ۹۳ bp و ۲۸۸ bp ایجاد شده است (ستون۳) و آنزیم EcoR V نیز قطعه کنترل را در جایگاه ۹۶ مورد برش قرار داده که دو قطعه ۹۶ bp و ۱۰۳ bp ایجاد شده است و این دو قطعه به دلیل این‌که تقریباً هم اندازه هستند در ژل آگارز به صورت یک باند واحد مشاهده می‌شوند (ستون ۴).

تعیین توالی قطعات تکثیر شده و مقایسه نتایج حاصل از آن با توالی قطعات که از بانک ژنوم استخراج شده بود صحت قطعات تکثیر شده را تایید کرد.توالی این قطعات به صورت زیر می‌باشد:

stx/stx1 PCR product:(622 bp)

gggatagatccagaggaagggcggtttaataatctacggcttattgttgaa

cgaaataatttatatgtgacaggatttgttaacaggacaaataatgtttttato

gctttgctgatttttcacatgttacctttccaggtacaacagcggttacattgtc
tggtgacagtagctataccacgttacagcgtgttgcagggatoagtcgtac
ggggatgcagataaatcgccattcgttgactacttcttatctggatttaatgte
gcatagtggaacctoactgacgcagtctgtggcaagagcgatgttacggtt
tgttactgtgacagctgaagctttacgttttcggcaaatacagaggggatttc
gtacaacactggatgatctcagtgggcgttcttatgtaatgactgctgaaga
tgttgatottacattgaactggggaaggttgagtagygtcctgcctgactat
catggacaagactctgttegtgtaggaagaatttcttttggaagcattaatgc
aattctgggaagcgtggcattaatactgaattgtoatcateatgcatcgcga
gttgccagaatggcatctgatgagtttccttctatgtgtccgg

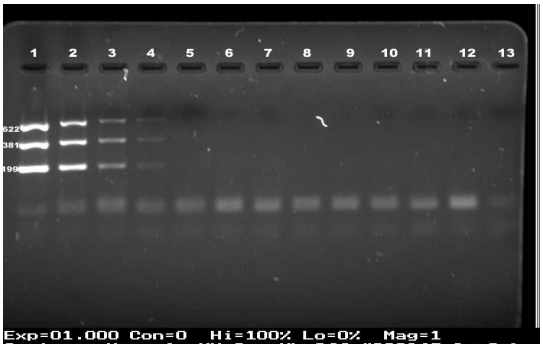
stx2 PCR product:(381bp)

ctggcgttaatggagttcagtggtaatacaatgaccagagatgcatecaga
gcagttctgcgtttgtcactgtcacagcagaagccttacgcttcaggcaga
tacagagagaatttcgteaggcactgtctgaaactgctcctgtgtatacgat
gacgccgggagacgtggacctoactctgaactgggggcgaatcagcaat
gtgcttccggagtatcggggagaggatggtgtcagagtggggagaatatc
ctttaatatatatoagcgatactggggactgtggccgttatactgaattgcc
atcatcagggggcgcgttotgttcgcgccgtgaatgaagagagtcaacca
gaatgtcagataactggcgacagg

mdh (Internal positive control) PCR product: (199 bp)

ctaacccggttaacaccacagttgcgattgctgctgaagtgctgaaaaaag
ccggtgtttatgacaaaaacaaaetgttcggcgttaccacgctggatatcat
tcgttccaacacttttgttgcggaactgaaaggcaaacagccaggcgaagt
tgaagtgccggttattggcggtcactotggtgttaccattotgcc

شکل ۵: تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومیک
۱- مارکر، ۲- رقت $۱۰^{-۱}$، ۳)- رقت $۱۰^{-۲}$، ۴- رقت $۱۰^{-۳}$، ۵- رقت $۱۰^{-۴}$
۶- رقت $۱۰^{-۵}$: غلظت DNA در این رقت ۲/۱pg/µl می‌باشد.
۷- رقت $۱۰^{-۶}$، ۸- رقت $۱۰^{-۷}$، ۹- رقت $۱۰^{-۸}$، ۱۰- رقت $۱۰^{-۹}$



شکل ۶: تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری
۱-مارکر، ۲- رقت $۱۰^{-۱}$، ۳- رقت $۱۰^{-۲}$، ۴- رقت $۱۰^{-۳}$، ۵- رقت $۱۰^{-۴}$: تعداد باکتری در این رقت ۳۲۰cfu/µl می‌باشد، ۶- رقت $۱۰^{-۵}$، ۷- رقت $۱۰^{-۶}$
۸- رقت $۱۰^{-۷}$، ۹- رقت $۱۰^{-۸}$، ۱۰- رقت $۱۰^{-۹}$، ۱۱- رقت $۱۰^{-۱۰}$

میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: نتیجه حاصل از انجام واکنش PCR با ۹ باکتری دیگر از خانواده انتروباکتریاسه در شکل ۴ مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود سه قطعه مورد نظر تنها در *E. coli* 0157:H7 تکثیر شده‌اند (ستون ۱) و در مورد ۹ باکتری‌دیگر، تنها در مورد ۶ نمونه اول که از جنس شیگلا هستند قطعه کنترل تکثیرشده است (ستون ۷-۲) و در مورد سه باکتری دیگر این قطعه نیز تکثیر نشده است (ستون ۱۰-۸).

میزان حساسیت واکنش PCR: پس از تهیه رقت از ژنوم *E. coli* O157:H7 با غلظت ۲۱۰ng/µl و انجام واکنش برای هر یک از رقت‌ها نتیجه حاصل از واکنش در شکل ۵ مشاهده می‌شود.

همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، واکنش تا رقت $۱۰^{-۵}$ از DNA ژنومیک انجام شده است (ستون ۶). با توجه به این‌که غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه ۲۱۰ ng/µl بوده است، حساسیت واکنش برابر با ۲/۱pg/µl خواهد بود .پس از تهیه رقت از کشت باکتری در محیط LB و انجام واکنش برای هر یک از رقت ها نتیجه حاصل از آن در شکل ۶ مشاهده می‌شود.

همان‌گونه که درشکل مشاهده می‌شود تکثیر قطعه مورد نظر تا رقت $۱۰^{-۳}$ از محیط کشت باکتری انجام شده است (ستون ۴) که در این رقت تعداد باکتری برابر ۳۲۰ cfu/µl می‌باشد، که نشان دهنده حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری می‌باشد.

بحث

شیگاتوکسین یکی از عوامل حدت‌زای تولید شده توسط شیگلا و *E. coli* می‌باشد که برای اولین بار در بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری مورد شناسایی قرار گرفت که علاوه بر اثرات مخرب بر دستگاه گوارش خصوصاً روده از طریق خون به سیستم عصبی مرکزی نیز انتقال یافته و اثرات مخربی را بر روی این دستگاه وارد می‌کند [۱۵]. محققین این توکسین‌ها را به دو دسته عمده تقسیم می‌کنند: شیگا توکسین یا Stx که ژن آن *stx* نام دارد و منبع آن بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری می‌باشد و توکسین شبیه شیگا یا Shiga like toxin یا SLT که خود به دو گروه Stx1 وStx2 تقسیم می‌شود و اغلب زیرگونه‌های بیماریزای *E. coli* مانند *E. coli* 0157:H7 آنرا تولید می‌کنند[۱۶].

تاکنون روش‌های متعددی جهت شناسایی شیگاتوکسین و یا ژن مربوط به آن ارایه شده است. در روش تشخیص این توکسین به‌وسیله کشت سلولی از سلول‌هایی که دارای گیرنده اختصاصی برای این توکسین هستند استفاده شده است [۱۶ و ۱۷]. اما این روش علیرغم حساسیت بسیار بالایی که در شناسایی توکسین دارد، دارای معایبی از جمله نیاز به زمان طولانی، صرف هزینه و زمان طولانی جهت فراهم کردن سلول‌های اختصاصی و طولانی بودن مدت زمان دریافت پاسخ آزمایش می‌باشد، ضمن این‌که انجام این آزمایش نیازمند فضای ویژه‌ای است که نمی‌توان آن را در تمامی آزمایشگاه‌ها فراهم کرد. در روش الایزا از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جهت شناسایی توکسین استفاده می‌گردد [۱۶]. این روش نیز دارای حساسیت و سرعت بسیار بالایی است و انجام آن نیز تقریباً در هر آزمایشگاهی امکان‌پذیر می‌باشد، اما دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم تفکیک بین انواع شیگاتوکسین و نیاز به آنتی‌بادی مونوکلونال ضدتوکسین می‌باشد، که تهیه و استفاده از آن به عنوان کیت آزمایشگاهی نیاز به صرف هزینه و زمان زیادی دارد. در روش RPLA نیز از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به ذرات لاتکس استفاده می‌شود [۱۶]. این روش نیز از حساسیت بالایی در شناسایی توکسین و یا عامل مولد آن برخوردار است اما نیاز به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و زمان طولانی جهت تشخیص، آن را محدود می‌کند. روش دورگه سازی یک تکنیک مولکولی موثر و بسیار حساس در شناسایی دقیق و اختصاصی عوامل بیولوژیک بر پایه ساختار ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. این تکنیک به‌طور موثری در شناسایی ژن انواع شیگاتوکسین استفاده شده است [۲، ۱۱ و ۱۶] و هنوز نیز از آن به‌عنوان یک عامل مکمل در روش‌های مولکولی جهت تایید محصولاتPCR استفاده می‌شود، اما این روش نیز علیرغم حساسیت و دقت فراوان دارای محدودیت‌هایی از جمله، خطرات ناشی از پروب‌های رادیواکتیو مورد استفاده در روش‌های اولیه آن، پیچیدگی، نیاز به زمان طولانی و عدم کارآیی آن در مورد تعداد زیاد نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌باشد. اگرچه در حال حاضر با استفاده از پروب‌های نشان‌دار شده با DIG خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو کاهش یافته است [۱۱].

تکنیک PCR که امروزه از آن به‌طور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود یک روش بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسایی انواع ژن‌ها و عوامل بیولوژیک می‌باشد. این تکنیک ضمن سادگی، محدودیت‌های روش‌های فوق‌الذکر را ندارد و می‌توان از آن به‌طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جهت شناسایی عوامل بیماری‌زا استفاده نمود. از این تکنیک اولین بار در سال ۱۹۸۹ جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شد [۱۲]. در این مطالعه از یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شد. روش ارایه شده در آن سال دارای معایبی بود که شامل پایین بودن Tm و عدم کارآیی آن در شناسایی انواع شیگاتوکسین بود زیرا پس از سال ۱۹۸۹ چند نوع ژن شیگاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفت که از نظر توالی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. با توجه به مواردی که ذکر شد جهت شناسایی انواع شیگاتوکسین طراحی یک واکنش Multiplex PCR که در آن حداقل از دو جفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شود مد نظر قرار گرفت.

پرایمرهای ارایه شده توسط T. A. Cebula و همکاران [۳] جهت شناسایی هر دو نوع ژن مناسب می‌باشند. ضمن این‌که وجود یک قطعه کنترل مثبت داخلی می‌تواند به افزایش دقت و صحت انجام واکنش کمک فراوانی کند. اما این پرایمرها تنها قادر به شناسایی ژن توکسین در*E. coli* O157:H7 می‌باشند. پرایمرهای ارایه شده توسط A. W. Paton و همکارش [۱۵] نیز جهت شناسایی هر دو نوع توکسین مناسب می‌باشند، اما اندازه قطعات تولید شده کوچک بوده و جهت تفکیک آن‌ها برروی ژل آگارز باید مدت زمان زیادی صرف کرد. ضمن این‌که جهت تعیین گونه باکتری باید از واکنش دیگری استفاده نمود، چرا که اندازه

قطعه کنترل مربوط بـه *E. coli* O157:H7 تنهـا ۴bp بـا قطعـه *stx2* تفاوت دارد و نمی‌توان محصولات واکنش را از هم تفکیـک نمود. پرایمرهای ارایه شده توسط M. A. Pass و همکـاران [۱۳] نیز قادر به شناسایی دو نوع توکسین می‌باشند اما قطعـات حاصـل به‌راحتی روی ژل آگارز از هم تفکیک نمی‌شوند و جهت شناسـایی *stx2e* نیز باید از یک جفت پرایمر دیگر استفاده نمود. پرایمرهـای ارایه شده توسـط S. D. Belanger و همکـاران [۱] نیـز توانـایی تفکیک دو نوع توکسین را دارا هستند اما به‌علت ایـن‌کـه قطعـات تکثیر شده از نظـر انـدازه بـه یکـدیگر نزدیـک هسـتند در نتیجـه تفکیک آن‌ها برروی ژل آگارز مشکل خواهد بود. یک جفت پرایمر ارایه شده توسط D. Philpot و همکاران [۱۶] نیز برای جستجوی شیگاتوکسین در یک نمونه مناسب می‌باشد اما توانایی تفکیک بین انواع آن را دارا نمی‌باشند.

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه تقریبا شـرایط لازم جهـت شناسایی دو نوع توکسین را دارا می‌باشند چرا که بـا بررسـی‌هـای انجام شده و اطلاعات موجود در بانک ژنوم مشخص شد کـه ایـن پرایمرها قادر به تکثیر انواع ژن شیگاتوکسـین مـی‌باشـند، ضـمن این‌کـه انـدازه قطعـات جهـت تفکیـک و هضـم آنزیمـی مناسـب می‌باشند. در ضمن وجود قطعه کنترل مثبت داخلی که مربـوط بـه ژن مالات دهیدرژناز (*mdh*) می‌باشد نیز می‌تواند در اثبات صـحت نتیجه آزمایش بسیار موثر باشد. با انجام واکـنش PCR مشـخص شد که ژن شیگاتوکسین علاوه‌بر *E. coli* در چهار گونه شیگلا نیز موجود می‌باشد و از این نظر وجود این قطعه مـی‌توانـد دلیلـی بـر وجود باکتری *E. coli* و شیگلا در یک نمونه باشد.

همـان‌طـور کـه مـی‌دانـیم بـاکتری‌هـای گـرم منفـی و خصوصـاً انتروباکتریاسه‌ها دارای دیواره سلولی با ساختمان بسیار پیچیـده‌ای می‌باشند که ترکیبی از انواع لیپیدها، هیدرات‌های کربن و پـروتئین می‌باشد. وجود چنین موادی در واکنش PCR می‌توانـد بـه‌عنـوان مهار کننده واکنش عمل نماید و موجب کاهش حساسیت واکـنش گردد. جهت حذف چنین موادی باید DNA موجود در باکتری قبل از استفاده در واکنش تخلیص گـردد. D. R. Pollard و همکـاران [۱۸]، M. P. Jackson و همکـــاران [۱۱] و G. Wang و همکـــاران [۲۶] از SDS-lysozyme، Tris، گلـــوکز و EDTA جهت تخلیص DNA باکتری استفاده کرده‌اند و حساسیت واکنش انجام شده ۱۰۰pg/µl می باشـد. S. M. Frank و همکـاران [۷] نیز از حرارت دادن باکتری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گـراد جهـت تخلیص ژنوم استفاده کرده‌اند که با این روش نیـز مهـار کننـدگان واکنش حذف نخواهند شـد. در تحقیـق ارایـه شـده بـا اسـتفاده از ماده‌ای به نام CTAB بـه همـراه NaCl غلـیظ (۵M) ایـن مهـار کننده‌ها به‌طور مؤثرتری از DNA جدا شـده‌انـد کـه حاصـل ایـن فرآیند افزایش حساسیت واکنش تا حد ۲/۱pg/µl از ژنوم تخلیص شـده مـی‌باشـد. حساسـیت واکـنش بـر حسـب تعـداد بـاکتری ۳۲۰cfu/µl می‌باشد که حدود سه برابـر حساسـیت واکـنش ارایـه شده توسط A. Paton و همکارش ۱۰۰۰cfu/µl می‌باشد. [۱۵]

واکنش PCR اولیه با DNA ژنومیـک اسـتخراج شـده از شـیگلا دیسانتری (بیوتایـپ ۱) و *E. coli* O157:H7 بـا موفقیـت انجـام گرفت. در مورد *E. coli* هر دو باند *stx2, stx1* مشاهده شدند کـه این مسأله نشان دهنده این است که باکتری قادر است هر دو نـوع توکسین را تولید نماید. در مورد بیوتایپ ۱ شـیگلا دیسـانتری نیـز تنها قطعه ۶۲۲bp تکثیر شده که این مسأله نیز با مقدماتی کـه در مورد باکتری بیان شد مطابقت دارد ضـمن ایـن کـه وجـود قطعـه کنترل داخلی دلیل قاطعی بر صحت انجام واکنش و نـوع بـاکتری مورد استفاده می‌باشد.

با توجه به مواردی که ذکر شد می‌توان نتیجه گرفـت کـه واکـنش طراحی شده چه از نظر حساسیت و چـه از نظـر اختصاصـی بـودن قابلیت شناسایی انواع ژن شیگاتوکسین را با موفقیـت دارا اسـت و مـی‌تـوان از ایـن واکـنش در شناسـایی عوامـل تولیـد کننـده شیگاتوکسین در نمونه‌های بالینی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید، همکاران و دوسـتان در دانشـگاه امـام حسـین(ع)، دانشگاه علوم پزشکی بقیـه‌ا...الاعظـم«عج» و آزمایشـگاه رفـرانس ایران که در به نتیجه رسیدن این تحقیـق تـلاش فـراوان کردنـد، کمال تشکر را می‌نماییم.

منابع

1- Belanger SD, Boissinot M, Menard C, Picard FJ, Bergeron GM. Rapid detection of shiga toxin-Producing acteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. J Clin Microb 2002;40:1436-1440.

2- Brown JE, Sethabutr O, Jackson MP, Lolekha S, Echeverria P. Hybridization of Escherichia coli producing Shiga–like toxin I, Shiga-like toxin II, and a variant of Shiga-like toxin II with synthetic oligonucleotide probes. Infect Immun 1989;57:2811-2814.

3- Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of Escherichia coli serotype 0157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J Clin Microb 1995;33: 248-250.

4- Gobius KS, Higgs GM, Desmarchelier PM. Presence of activable shiga toxin genotype (Stx2d) in shigtoxigenic Escherichia coli from livestock sources. J Clin Micob 2003;41:3777-3783.

5- Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP. Practical Medical Microbiology. 13nd ed. London: Churchill Livingstone; 1989.p.100-320.

6- DE Grandis S, Ginsberg J, Toone M, Climie S, Friesen J, Brunton J. Nucleotide sequence and promoter mapping of The Escherichia coli shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. J Bacteriol 1987;169:4313- 4319.

7- Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves. J Clin Microb 1998;36:1795-1797.

8- Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H, Karch H. Shiga toxin 1c-producing Escherichia coli strains: Phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J Clin Microb 2003;41:2448-2453.

9- Gannon VPJ, Teerling C, Masri SA, Gyles CL. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the Escherichia coli shiga-like toxin II family. J Gen Microb 1990;136:1125-1135.

10- Huang A, Friesen J, Brunton JL. Characterization of bacteriophage that carries the genes for production of shiga-like toxin 1 in Escherichia coli. J Bacteriol 1987;169:4308-4312.

11- Jackson MP. Detection of shiga toxin-producing Shigella dysenteriae type 1 and Escherichia coli by using polymerase chain reaction with incorporation of Digoxigenin-11-dUTP. J Clin Microb 1991;29:1910-1914.

12- Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. J Clin Microb 1989;27:2751-2757.

13- Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCR for identification of Escherichia coli virulence genes. J Clin Microb 2000;38:2001-2004.

14- Paton AW, Paton JC. Pathogenesis and diagnosis of shiga-Toxin-producing Escherichia coli infection. Clin Microb Rev 1998;1: 450-479.

15- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shigatoxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae A, enterohemorrhagic Escherichia coli hly A, rfb 0111, and rfb 0157. J Clin Microb 1998;36:598,602.

16- Philpot D, Ebel F. E.coli, Shiga toxin Methods and protocols. New Jersey: Humona Press; 2003.p.1-150.

17- Plunkett III G, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. Sequence of shiga toxin 2 phage 933W form Escherichia coli 0157:H7: shiga toxin as a phage Late-gene product. J Bacter 1999;181:1767-1778.

18- Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in Escherichia coli by the polymerase chain reaction. J Clin Microb 1990;28:540-545.

19- Rietra PJGM, Willshaw GA, Smith HR, Field AM, Scotland SM, Rowe B. Comparison of vero-cytotoxin-encoding phages from Escherichia coli of human and bovin origin. J Gen Microb 1989;135:2307-2318.

20- Sambrook J, Russell DW. Moleculor Cloning, A laboratory Manual. 3rd ed. New York: Coldspring Harbor Laboratory Press; 2001.p.6.61-6.62.

21- Sandvig K. Shiga toxins. Toxicon 2001;39:1629- 1635.

22- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Kawch H. A new shiga toxin 2 variant (stx2f) from Escherichia coli isolated from pigeons. Appl Environ Microb 2000;66:1205-1208.

23- Schmitt CK, Mckee ML, O'Brien AD. Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic Escherichia coli strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the 0157:H- strain E32511. Infect Immun 1991;59:1065-1073.

24- Strauch E, Lurz R, Beutin L. Characterization of a shiga toxin-encoding temprate bacteriophag of Shigella sonnei. Infect Immun 2001;69:7588-7595.

25- Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RH, O'Brien AD. Cloning and sequencing of the genes for shiga toxin from Shigella dysenteriae type1. J Bacter 1988;170:1116-1122.

26- Wang G, Clark GC, Rodgers FG. Detection in Escherichia coli of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the 0157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. J Clin Microb 2002;40:3913-3619.

۲۷- امیر همایون کیهان. شناسایی ژن شیگاتوکسین به وسیله روش Multiplex PCR. [پایان نامه کارشناسی ارشد] تهران: دانشکده علوم پایه دانشگاه امام حسین(ع)؛ ۱۳۸۳.