جهت تهیه فایل WORD 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

مقاله تحقیقی

ارزیابی قدرت تهاجمی سویه ضعیف شده *شیگلا دیسانتری* تیپ۱ به عنوان کاندید تولید واکسن

احمدرضا صالحی چالشتری[۱،۲]، مجتبی سعادتی[۱*]، یاسر احسنی آرانی[۱]، عباس بهادر[۳]، مصطفی حسینی[۱]، مهدی حصارکی[۱]، محمد درودیان[٤]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

٤. دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان، واحد تهران مرکزی، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۹۱

چکیده

هدف: شناسایی نسخه پلازمیدی ژن *ipaD* در باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ و ارزیابی قدرت تهاجمی سویه زنده ضعیف شده حاصل از حذف نسخه پلاسمیدی ژن *ipaD* در خوکچه هندی هدف مطالعه حاضر است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، آنتی‌بادی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، گونه و سروتیپ شیگلای جدا شده از بیمار مشخص و نسخه پلازمیدی ژن ipa*D* شناسایی شد. سویه شیگلای تخفیف حدت یافته از طریق حذف نسخه پلاسمیدی ژن *ipaD* تولید و از طریق آزمون‌های اشاره شده تأیید شد. عدم حضور ژن *ipaD* به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مقایسه با سویه وحشی مورد آزمایش قرار گرفت. رقت‌های مختلف از باکتری کشت شده ایجاد و تعداد کلونی‌ها برای هرکدام شمارش شد. رقت خاصی از کشت که برای آزمون ورم ملتحمه چشم مناسب است تولید شد. از ۶ خوکچه هندی استفاده شد که به دوگروه کنترل و آزمایش تقسیم‌بندی شدند. ارزیابی توانایی تهاجمی سویه تولید شده به‌وسیله آزمایش ایجاد ورم ملتحمه بروی خوکچه هندی بررسی شد.

یافته‌ها: سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ۱ حاصل به‌وسیله آزمایش سرولوژیکی و PCR تأیید شد. عدم حضور ژن *ipaD* در سویه یاد شده نیز به تأیید رسید. نتایج آزمایش ایجاد ورم ملتحمه نشان داد که این سویه قدرت تهاجم به سلول‌های میزبان را از دست داده است.

نتیجه‌گیری: نسخه پلاسمیدی ژن*ipaD* نقش مهمی در تهاجم باکتری شیگلا دارد و حذف ژن مذکور قدرت تهاجمی باکتری را کاهش می‌دهد. *شیگلا دیسانتری* تخفیف حدت یافته زنده که ژن *ipaD* آن حذف شده باشد، می‌تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن علیه شیگلوزیس باشد.

کلیدواژه‌ها: *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱، تخفیف حدت یافته، ورم ملتحمه چشم، خوکچه هندی، کاندید واکسن

مقدمه

شیگلا دیسانتری تیپ۱ باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، بدون اسپور و جزء خانواده انتروباکتریاسه است [۱]. *شیگلا دیسانتری* یکی از عوامل بیماری شیگلوزیس است. شیگلوزیس یک بیماری عفونی است که در شرایط بحران‌های اجتماعی و مناطق گرمسیری به سرعت همه‌گیر می‌شود. این همه‌گیری ناشی از پایین آمدن سطح بهداشت عمومی جامعه و عدم دسترسی به آب و غذای سالم است [۲]. این بیماری بخشی ازروده کوچک را تحت تأثیر قرار می‌دهد و علایمی از قبیل اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از خون و مخاط، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی را بروز می‌دهد [۳و۴]. در بین گونه‌های شیگلا، *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ علاوه بر علایم فوق، باعث تشنج، ناهنجاری سیستم اعصاب مرکزی و بیماری سندرم همولیتیک اورمیک (Hemolytic HUS:Uremic Syndrom) نیز می‌شود [۱]. شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه اشریشیاکلی بوده و گاهی حتی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماری‌زا یاد می‌کنند [۵]، تقریباً ۹۹٪

* **آدرس مکاتبه:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
E-mail: saadati_m@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD 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

عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می‌دهد و سالانه حدود ۱/۱ میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوزیس می‌میرند که ۶۰٪ آن‌ها را کودکان زیر ۵ سال تشکیل می‌دهند [۶و۷].

شیگلا پس از ورود به بدن میزبان، راست روده و کولون در دستگاه گوارش را مورد تهاجم قرار می‌دهد و حتی قادر است این تهاجم را به سلول‌های پوششی غیر فاگوسیتی نیز گسترش دهد؛ این فرایند از طریق پروتئین‌هایی انجام می‌گیرد که در تمام سویه‌های بیماری‌زا به شدت حفاظت شده است. این پروتئین‌ها توسط یک پلاسمید بزرگ ۱۸۶ کیلوبازی کد می‌شود و به‌عنوان پلاسمید تهاجمی یا پلاسمید بیماری‌زا شناخته می‌شود [۸ و۹]. پس از ورود باکتری به بدن میزبان، در تماس با سلول‌های اپی‌تلیال روده قرار می‌گیرند و از طریق سیستم ترشحی نوع سوم (TTSS: Type three secretion system) شروع به ترشح فاکتورهای تهاجمی می‌کنند. از جمله فاکتورهای تهاجمی تولید شده می‌توان به پروتئین‌های IpaA,B,C,D اشاره کرد. IpaA در دپلیمریزاسیون اکتین در سلول میزبان نقش دارد [۱۰]. IpaB یک پروتئین ۶۲کیلودالتونی را کد می‌کند که پس از القا شدن به‌وسیله IpaD به سطح سلول فراخوانی می‌شود و بعد از تشکیل کمپلکس با IpaC یک منفذ را در غشای سلول میزبان ایجاد می‌کند. IpaC یک پروتئین ۴۳ کیلودالتونی را کد می‌کند که در مجموع با پروتئین‌های IpaB و IpaA به شکل یک کمپلکس با غشای سلول میزبان برهمکنش نموده و سیگنال‌های سلولی را به صورت cascade (آبشاری) به منظور ورود باکتری از طریق اندوزوم تحریک می‌کند. IpaD یک پروتئین ۳۷ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین با عملکرد خود موجب به‌کارگیری IpaB روی سطح باکتری و آغاز فرآیند تهاجم می‌شود. به‌علاوه IpaD نقش خود چاپرونی نیز دارد [۱۱]. هر باکتری درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده می‌شود و موجب پاره شدن واکوئل و در نتیجه رها شدن باکتری درون سیتوپلاسم سلول پوششی می‌شود. باکتری در سیتوپلاسم سلول پوششی تکثیر می‌شود و شروع به مهاجرت سلول به سلول و تخریب جدار روده می‌کند و در نهایت منجر به اسهال خونی می‌شود [۱۰ و۱۱].

جلوگیری از شیگلوزیس با استفاده از رعایت نکات بهداشتی امکان‌پذیر است. در مناطقی که سطح بهداشت عمومی پایین است یا در شرایط خاص و بحران‌های اجتماعی [۳] (سیل، زلزله، سونامی و...) که ایجاد شرایط بهداشتی مطلوب امکان‌پذیر نیست [۱۲و ۱۳] ، این بیماری به سرعت گسترش یافته و همه‌گیر می‌شود [۱۴و ۱۵]. کنترل اسهال خونی شیگلایی اغلب از طریق درمان‌های آنتی‌بیوتیکی صورت می‌گیرد که مورد توصیه سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیست؛ قیمت بالای آنتی‌بیوتیک‌ها ، در دسترس نبودن آن‌ها در کشورهای کمتر توسعه یافته و ظهور سویه‌های شیگلای مقاوم به یوتیک از دلایل اصلی این امر است. به همین دلایل توصیه سازمان بهداشت جهانی، اتخاذ راهبردهای غیر آنتی‌بیوتیکی علیه شیگلوزیس است [۱۶]. یکی از این راهبردها تولید واکسن علیه شیگلوزیس است که به علت نداشتن مشکلات مربوط به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار مورد توجه است [۶]. واکسن‌ها اغلب مبتنی بر سویه باکتریایی است و به علت متفاوت بودن همه‌گیری سویه‌های مختلف در کشورهای متفاوت تولید واکسن‌های بومی برای هر منطقه توصیه می‌شود. *شیگلا سونئی*، *شیگلا فلکسنری* و *شیگلا دیسانتری* به ترتیب شایع‌ترین سویه‌های ایران هستند [۱۷]. بنابراین سویه‌های یاد شده در الویت تولید واکسن هستند. راهکارهای متفاوتی برای تولید واکسن وجود دارد، اما در بین این راهکارها تولید واکسن‌های تخفیف حدت یافته از نظر ایمنی‌زایی و قدرت پاسخ‌های ایمنی تولید شده سودمندتر از بقیه است [۱۸].

از جمله روش‌هایی که اولین بار برای ایجاد تخفیف حدت در باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفت، پاساژهای متوالی و جهش‌زایی با مواد شمیایی بود. روش‌های اولیه فاقد اختصاصیت بود و به همین دلیل توسط روش‌های پیشرفته‌تر مهندسی ژنتیک و نوترکیبی هومولوگ که اساس آن‌ها حذف هدفمند ژن‌های بیماری‌زا است، جایگزین شد [۱۹]. این روش‌ها امکان تولید سویه‌های ضعیف شده به شکل کاملاً هدفمند را فراهم می‌کند [۲۰ و۲۱].

در مطالعه حاضر از سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ که با استفاده از روش Red recombineering λ نسخه پلازمیدی ژن *ipaD* آن حذف شده بود استفاده شد. این انتخاب با توجه به اهمیت ژن *ipaD* در تهاجم شیگلا به سلول‌های روده انجام شد. برای ارزیابی قدرت تهاجم سویه زنده ضعیف شده تولید شده از روش بررسی ایجاد ورم ملتحمه چشم در چشم خوکچه هندی استفاده شد. این روش یکی از روش‌های سریع و مناسب برای ارزیابی قدرت تهاجم باکتری‌ها است و روش

جهت تهیه فایل WORD 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

بسیار پر کاربردی است که در مطالعات مختلف استفاده می‌شود [۲۲].

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت

کشت سلول‌ها روی محیط کشت مک کانکی و محیط کشت TSB مایع انجام گرفت. سویه شیگلای موجود به‌وسیله آزمایش‌های آنتی‌بادی پلی‌کلونال(شرکت بهار افشان) تأیید شد و با استفاده از کشت در محیط سالمونلا – شیگلا آگار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و به مدت ۱۶ ساعت گرمادهی شدند. سپس باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی مک‌کانکی ، هکتوئن، زایلوز لایزین دکربوکسیلاز ، اورنیتین دکربوکسیلاز، آزمون تخمیر قند آرابینوز، TSI، ONPG و تولید اندول شناسایی شد.

حذف ژن و انجام آزمون‌های آنتی‌بیوتیکی

با استفاده از روش lambda red recombineering اقدام به حذف نسخه پلازمیدی ژن *ipaD* از سویه *شیگلا دیسانتری* موجود شد که در منابع دیگر [۱۹] تشریح شده است. پس از انجام حذف ژن اقدام به انجام آزمون‌های آنتی‌بیوتیکی شد. با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کلرامفنیکل، آمپی سیلین، کانامایسین و تترا سیکلین میزان حساسیت سویه هدف و شاهد بررسی شد. این آزمون برای تأیید درستی مراحل حذف ژن نیز کاربرد دارد.

طراحی آغازگر

به‌منظور شناسایی سروتیپ شیگلا سویه وحشی و شیگلای تخفیف حدت یافته، با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی، پرایمر اختصاصی برای ژن *stxA* طراحی شد که محصول حاصل از تکثیر به‌وسیله این پرایمرها ۶۲۲ جفت باز است. این ژن تنها در *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ حضور دارد. برای تأیید عدم حضور نسخه پلاسمیدی ژن *ipaD* پرایمر اختصاصی برای ژن مذکور طراحی شد. محصول حاصل از تکثیر به‌وسیله این پرایمرها ۳۴۴ جفت باز است. (جدول ۱)

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

کاربری	توالی	نام پرایمر
شناسایی ژن *stxA*	5' CTCGACTGCAAAGACGTATG 3' 5' TCAGGCAGGACACTACTCAA 3'	stxF stxR
شناسایی نسخه پلازمیدی از ژن *ipaD*	5́TCATGAATTCAGAACAACAAATCAG 3́ 5́TCTTAAGCTTTTAAGTATATGAACTAACG 3́	IpaDF IpaDR

آماده‌سازی DNA باکتری و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ وحشی و نمونه تخفیف حدت یافته، در محیط TSB مایع کشت داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در گرم خانه شیکر دار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی AccuPrep (کره جنوبی، BioNEER) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد، DNA حاصل به‌عنوان الگو در واکنش PCR، برای هر دو ژن *stxA* و *ipaD* استفاده شد. سپس توسط PCR وجود ژن زیر واحد A شیگا توکسین و عدم حضور ژن *ipaD* در نمونه تخفیف حدت یافته، تأیید شد (شکل ۱). برنامه تکثیر ژن در جدول ۳ آمده است.

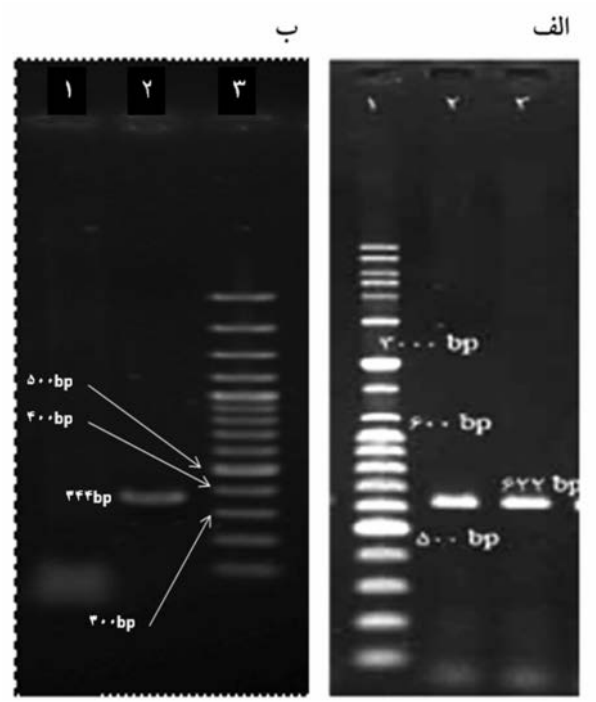
جدول ۲. نتایج آزمون‌های حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی

باکتری / آنتی‌بیوتیک	آمپی‌سیلین	کلرامفنیکل	تتراسیکلین	کانامایسین
سویه وحشی	S	S	R	R
سویه تخفیف حدت یافته	S	S	R	R

R: مقاوم به آنتی بیوتیک، S: حساس به آنتی‌بیوتیک

جدول ۳. برنامه PCR مورد استفاده برای تکثیر ژن *stxA* و ژن *ipaD*

برنامه تکثیر ژن stxA			برنامه تکثیر ژن ipaD		
۹۵°C	۵ دقیقه	۱ مرتبه	۹۵°C	۵ دقیقه	۱ مرتبه
۹۴°C	۱ دقیقه		۹۴°C	۱ دقیقه	
۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۰ مرتبه	۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۲ مرتبه
۷۲°C	۴۰ ثانیه		۷۲°C	۲۵ ثانیه	
۷۲°C	۵ دقیقه	۱ مرتبه	۷۲°C	۳ دقیقه	۱ مرتبه
۴°C	۴ دقیقه	۱ مرتبه	۴°C	۵ دقیقه	۱ مرتبه



شکل ۱. محصولات تکثیر (PCR) ژن‌های *ipaD* و *stxA* روی ژل آگارز ۱,۵ درصد

الف- چاهک ۱: نشانگر DNA، چاهک ۲: حضور ژن *stxA* در سویه وحشی، چاهک ۳: حضور ژن *stxA* در سویه تخفیف حدت یافته که نشان‌دهنده سروتیپ ۱ از *شیگلا دیسانتری* است.

ب- چاهک ۱: عدم حضور نسخه پلاسمیدی ژن *ipaD* در سویه تخفیف حدت یافته، چاهک ۲: حضور ژن *ipaD* در سویه وحشی گرفته شده از بیمار، چاهک ۳: نشانگر DNA

انجام آزمون سرنی در خوکچه هندی

برای ارزیابی قدرت تهاجمی سویه تولید شده از چالش با خوکچه و آزمون ورم ملتحمه چشم استفاده شد. تعداد ۶ سرخوکچه هندی برای این مرحله از مطالعات در نظر گرفته شدند. ۳ عدد در گروه کنترل و ۳ عدد در گروه آزمایش قرار گرفتند. برای انجام چالش، آزمون کیفی سرنی در نظر گرفته شد و لازم بود که سوش شیگلایی وحشی که در فاز تهاجمی قرار دارد از بیمار تهیه و برای تست سرنی استفاده شود. سوش وحشی و سویه ضعیف شده هر کدام، در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع کشت داده شدند، با رسیدن OD مناسب (OD600= 0.5)، به‌منظور محاسبه مقدار CFU باکتری، مقدار ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها (با رعایت تمامی نکات استریل) برداشته شد و در ۹ میلی‌لیتر محیط کشت استریل ریخته و خوب ورتکس شدند (نسبت ۱/۱۰). از نمونه‌های حاصل ۱ میلی‌لیتر برداشته و در لوله‌های دیگر که حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت LB استریل بودند ریخته و مجدد ورتکس شدند. این فرآیند تا ۵ بار دیگر تکرار شد. در انتها از هر ۷ لوله ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در ۷ محیط کشت جامد LB با رعایت نکات استریل کشت داده شد و هر پلیت با شماره‌گذاری کامل مشخص شد.(برای سویه وحشی و سویه ضعیف شده این مراحل عیناً انجام شد) پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با شمارش تعداد کلونی‌های رشد کرده روی محیط‌های جامد و محاسبه ضریب رقیق سازی باکتری، مقدار CFU مورد نیاز محاسبه شد. برای انجام آزمون سرنی مقدار CFU ۶×۱۰^{۸} از باکتری شیگلا در نظر گرفته شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع استریل تهیه و *شیگلا دیسانتری* وحشی (جداسازی شده از بیمار) در آن تلقیح شد. برای سویه ضعیف شده نیز همین عمل تکرار شد. با رسیدن مقدار جذب نوری (۶۰۰nm) به ۰/۵، غلظتی از باکتری‌ها تهیه شد که هر ۲۵ میکرولیتر آن حاوی CFU ۶×۱۰^{۸} باکتری باشد. در انتها در چشم هر ۳ خوکچه هندی گروه آزمایش ۲۵ میکرولیتر از نمونه باکتری ضعیف شده (با غلظت مشخص) و در چشم هر ۳ خوکچه گروه کنترل هم ۲۵ میکرولیتر از سویه وحشی ریخته شد و سپس حیوانات به مدت ۴۸ ساعت کنترل شدند و تغییرات ایجاد شده در آن‌ها ثبت شد.

یافته‌ها

سویه سلول‌های دریافت شده به‌وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شد. برای اطمینان از زیرگروه باکتری نیاز به تأیید از طریق انجام PCR برای ژن *stxA* است. حضور ژن زیر واحد A *شیگا توکسین*(*stxA*) با انجام روش PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشخص شد. حضور باند۶۲۲ جفت بازی نشان‌دهنده این موضوع است (شکل ۱ الف)؛ این ژن تنها در *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ حضور دارد و حضور آن تأکید بیشتری بر نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی است. سپس حضور ژن*ipaD* در سویه وحشی مهاجم و عدم حضور آن در سویه تخفیف حدت یافته بررسی شد. نتایج انجام PCR برای نسخه پلازمیدی ژن*ipaD* نشان دهنده درستی حذف ژن مذکور در سویه تخفیف حدت یافته موجود بود به نحوی که نتایج تکثیر ژن *ipaD* در سویه وحشی مثبت و در سویه تخفیف حدت یافته منفی بود (شکل ۱ب). نتایج آزمون‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان‌دهنده مقاومت بیشتر سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های متداول بود و اثبات شد که سویه تخفیف حدت

یافتـه موجـود نـسبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آمپـی سـیلین و کلرامفنیکل حساس است (این امر نشان‌دهنده کامل بودن مراحل حذف ژن *ipaD* است) که در جدول ۲ آمده است.

برای ارزیابی قدرت تهاجمی سویه تخفیف حدت یافتـه تولیـد شده، آزمون سرنی در خوکچه هندی انجام شد. خوکچه‌هـایی کـه در چشم آن‌ها باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ وحشی (بر گرفتـه از نمونه‌های بالینی) ریخته شده بود، همگی ورم ملتحمه چـشم را بروز دادند و خوکچه‌هایی که تحت اثر سویه تخفیف حـدت یافتـه (تولید شده به‌واسـطه حـذف نـسخه پلاسـمیدی ژن *ipaD*) قـرار گرفتند ورم ملتحمه چشم را بروز ندادند. این امـر نـشان‌دهنـده از دست دادن قدرت تهـاجم در *شـیگلا دیـسانتری* تخفیـف حـدت یافته اسـت. ایـن در حـالی اسـت کـه نمونـه‌هـای کنتـرل کـه از نمونه‌های بالینی به‌دست آمـده‌انـد، هنـوز قـدرت تهـاجم خـود را حفظ کرده و بیماری‌زا هستند (شکل ۲).

شکل۲. بررسی قدرت تهاجم سویه زنده ضعیف شده تولید شده در نتیجه حذف نسخه پلازمیدی ژن *ipaD* از باکتری شیگلا
الف- نمونه‌ای از خوکچه‌هایی که به‌وسیله سویه وحشی آزمون شده بودند که بروز ورم ملتحمه چشم را نشان می‌دهند.
ب- نمونه‌ای از خوکچه‌هایی که به‌وسیله سویه زنده ضعیف شده آزمون شده بودند که ورم ملتحمه چشم را بروز نداده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نرخ بروز نسبتاً بالای شیگلوزیس در مناطق گرمـسیری کـشورهای در حـال توسـعه و همـه‌گیـری سـریع آن در شـرایط بحران‌های اجتماعی نیاز به مقابله با این بیماری بسیار جدی است [۱۵]. باکتری شیگلا حتی در دوزهای بـسیار پـایین نیـز قابلیـت ایجاد اسهال خونی را داراسـت [۲۳]. بـروز سـویه‌هـای شـیگلای مقاوم به آنتی بیوتیک نیز عاملی است تا مقابلـه بـا ایـن بیمـاری‌را دشوارتر از پیش به‌نظر برسـد. در ایـران شـیگلا سـونئی و *شـیگلا دیسانتری* سویه‌هایی از شیگلا هستندکه مقاومت دارویی بـالایی را از خود نشان می‌دهند. بیش از ۹۰٪ سویه‌های شـیگلایی موجـود در ایران به یک یا بـیش از یـک آنتـی بیوتیـک مقـاوم هـستند و حدود ۸۷٪ نیز به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند [۲۴]؛ این امـر دلیلی بر ضرورت تغییر در راهکار مقابله با ایـن بیمـاری و کـاهش استفاده از آنتی بیوتیک ها برای مقابله با این بیمـاری و تـلاش در راستای تولید واکسن برای مقابله با شیگلوزیس در ایران اسـت. تـا کنون تلاش‌های بسیار زیادی برای تولید یک واکسن ایمن و مـؤثر علیه عامل بیماری اسهال خونی شیگلایی در جهان صورت گرفتـه است که به نتیجه نهایی و دلخواه منتهی نـشده‌اسـت. دلایـل ایـن امر عبارتست از عدم تحریک مناسب ایمنی مخاطی، ایمن نبـودن در کودکان، پیچیده بودن روند تولید واکسن و گران بـودن بعـضی از واکسن‌های تولید شده و عـدم صـدور مجـوز بـرای اسـتفاده در حجم وسیع و عمومی. موارد یـاد شـده گـاهی منجـر بـه محـدود شدن این واکسن‌ها به یک کشور خاص و یک گروه سـنی خاصـی مـی‌شـود. یکـی از مهمتـرین راهکارهـای تولیـد واکـسن علیـه شیگلوزیس تولید واکسن‌های زنده مهاجم و تخفیف حـدت یافتـه است زیرا این واکسن‌ها علاوه بر داشتن مصرف خـوراکی، توانـایی بالایی در تحریک سیستم ایمنـی مخـاطی و فعـال کـردن شـدید سیستم ایمنی دارد [۲۵].

محققان در سال ۱۹۸۴ سویه جهش یافتـه *T32-Istrati* را بـا استفاده از روش پاساژ متوالی در *شیگلا فلکسنری 2a* ایجاد نمودنـد. این کاندیـد واکـسنی بعـد از ۳۲ مرتبـه کـشت متـوالی در محـیط نوترینـت آگـار جداسـازی و از نظـر ایجـاد ورم ملتحمـه در چـشم خوکچه هندی (آزمون سرنی) منفی گزارش شـد [۲۶]. ایـن سـویه در سال ۱۹۹۰ از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیـابی شـد. ارزیـابی‌هـا نشانگر حذف سـه لکـوس (*mxiA* (*invA* و*IpaABCD*، *virG* در پلاسمید تهاجمی شیگلا بود [۲۷ و۲۸]. همچنین کاندیـد واکـسنی *شیگلا فلکسنری* 2a وابسته به استرپتومایسین (SmD) نیز با روشـی مشابه ساخت *T32-Istrati* در سال ۱۹۷۲ ایجاد شـد. روش پاسـاژ متوالی معایبی همچون عدم اختصاصیت، برگـشت پـذیری بـه نـوع وحشی و ناپایـداری ژنتیکـی را دارد؛ بنـابراین روش مناسـبی بـرای ایجاد جهش اختصاصی و هدفمند در باکتری نیست [۲۶].

امروزه با پیشرفت روش‌هـای مهندسـی ژنتیـک از روش‌هـای گوناگونی به منظور ایجاد جهـش و گسـستگی در ژن‌هـا اسـتفاده می‌شود که اغلب بر مبنای غیر فعال کردن ژن‌ها از طریـق دخـول کاست ژنی یـا حـذف ژن اسـت [۲۹]. یوشـیکاوا (Yoshikawa) و همکاران در سال ۱۹۹۵ بـا ایجـاد دو جهـش در ژن‌هـای *virG* و *thyA* توانستند سویه تخفیف حدت یافته *شیگلا فلکـسنری* 2a را

با استفاده از ترانسپوزون *Tn10* و فاژP1 ایجاد کنند[۳۰] که عدم ایجاد التهاب و حفاظت در برابر شیگلا از نتایج آن در مدل حیوانی خوکچه هندی بود [۳۱]. نتایج بالینی سویه واکسنی CVD1203 (Δ*virG*, Δ*aroA*) هم که توسط نورجیا و همکاران(Noriega) در سال ۱۹۹۴ ساخته شده بود، در خوکچه هندی و انسان در دوز متوسط (در حدود 10^6 CFU) نشان از تحمل‌پذیری بالای آن داشت؛ اما در دوزهای بالاتر (در حدود 10^8CFU تا 10^9) بخشی از دریافت کنندگان به سویه واکسنی واکنش منفی نشان دادند [۲۵]. همچنین نتایج بالینی سویه‌های تولید شده نظیر CVD1204 (Δ*guaBA*)، CVD1205 (*virG*, Δ*guaBA*)، CVD 1207 (Δ*set*, Δ*sen*, Δ*guaBA*, Δ*virG*) و CVD1208 (Δ*set*, Δ*sen*, Δ*guaBA*) نشان داد که حذف و غیر فعال نمودن ژن‌های متابولیکی و توکسینی منجر به تحمل‌پذیری و ایمنی‌زایی بالایی در انسان می‌شود [۲۵]. لونای و همکاران (Launay) در سال ۲۰۰۸ سویه کاندید واکسنی SC599 را از سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ حامل جهش حذفی در ژن‌های *virG*، *entF* (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، *fepA* (گیرنده دریافت‌کننده انتروکلین) و *fes*(مسئول رها سازی Fe^{3+}) و *stx* ساختند. نتایج بالینی این سویه در داوطلبان انسانی ایمنی محافظتی مناسبی را از خود نشان داد [۳۲].

در سال ۲۰۰۶ توسط رنلو و همکاران(Ranallo) سویه‌های جهش یافته‌ای در ژن‌های *asd*، *set1A*، *sen*، msbB2، *msbB1*، *T uhP* و *ipa H9/8* در *شیگلا فلکسنری 2a* (*WRSf2*) [۱۹]، ژن‌های *virG* و *stxAB* در *شیگلا دیسانتری* تیپ۱ (*WRSd1*) و جهش‌هایی در ژن‌های *virG*، *sen* و *ipaB* در *شیگلا سونئی* (*WRSs*) ایجاد کردند. روش به کار گرفته شده به منظور ایجاد این سویه‌ها روش نوترکیبی لامبدا رد (λ-Red Recombineering) بود، که روش بسیار کارآمدی است [۳۵-۳۳]. نتایج این تحقیق کارایی این روش را در باکتری شیگلا نشان داد. بررسی‌های ایمنی‌زایی مربوط به سویه‌های تولید شده نیز مناسب بودن سویه‌های تولید شده با این روش را برای تولید واکسن تأیید می‌کند[۱۹ و۳۵].

با توجه به نتایج بالینی سویه‌های واکسنی تولید شده به‌نظر می‌رسد علاوه بر ژن *virG* که نقش مهمی در تهاجم شیگلا دارد [۳۶]، ژن *ipaD* هم کاندید مناسبی برای حذف و تولید واکسن زنده ضعیف شده باشد، چرا که حذف این ژن تهاجم و گسترش بین سلولی باکتری شیگلا را به شدت کاهش می‌دهد. علاوه بر این؛ شناسایی پروتئین IpaD توسط آنتی‌بادی‌ها تهاجم شیگلا را سرکوب می‌نماید[۳۵]. این پروتئین در نوک ساختار سوزن مانند مسئول تهاجم شیگلا است [۳۷ و۳۸] و نقش بسیار مهمی در شکل‌گیری ماشین تهاجمی شیگلا دارد [۳۹] و اجازه به‌کارگیری سایر پروتئین‌ها روی غشای سلول هدف را فراهم می‌کند [۳۹ و ۴۰]؛ بنابراین بررسی خصوصیات تهاجمی سویه‌ای از شیگلا که فاقد ژن یاد شده باشد، می‌تواند بسیار امیدوارکننده باشد.

نسخه پلاسمیدی ژن *ipaD* به دلیل بیان همزمان با ژن‌های دیگر مسئول در تهاجم شیگلا که روی پلاسمید تهاجمی حضور دارند، نقش بسیار حیاتی در تهاجم باکتری دارد. نتایج ارزیابی قدرت تهاجمی سویه زنده ضعیف شده حاصل از حذف این ژن نیز تأییدکننده این مطلب است. سویه مورد بررسی در مطالعه حاضر به دلیل نداشتن قدرت تهاجمی و عدم توانایی در تولید ورم ملتحمه چشم در خوکچه هندی می‌تواند انتخاب مناسبی برای تولید واکسن علیه شیگلوزیس باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت کامل مادی و معنوی دانشگاه جامع امام حسین(ع) انجام گرفته است. از دکتر رضا رئوفیان و دکتر مجتبی صفاری نیز به خاطر کمک‌های بی دریغشان سپاسگذاریم.

References

1. 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: 651-66.
2. Bhimma R, Rollins NC, Coovadia HM, Adhikari M. Post-dysenteric hemolytic uremic syndrome in children during an epidemic of Shigella dysentery in Kwazulu/Natal. Pediatr Nephrol 1997; 11: 560-4.
3. Cook GC. Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. J R Soc Med 1992; 85: 688-91.
4. Banish LD, Sims R, Sack D, Montali RJ, Phillips L Jr, Bush M. Prevalence of shigellosis and other enteric

pathogens in a zoologic collection of primates. J Am Vet Med Assoc 1993; 203: 126-32.

5. Lai V, Wang L, Reeves PR. Escherichia coli clone Sonnei (Shigella sonnei) had a chromosomal O-antigen gene cluster prior to gaining its current plasmid-borne O-antigen genes. J Bacteriol 1998; 180: 2983-6.

6. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine 2006; 24: 2732-50.

7. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev Infect Dis 1991; 13: S319-24.

8. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from Shigella flexneri. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 9317-21.

9. Venkatesan MM,Goldberg MB, Rose DJ, Grotbeck EJ, Burland V, Blattner FR. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri. Infect Immun 2001; 69: 3271-85.

10. Bourdet-Sicard R, Rüdiger M, Jockusch BM, Gounon P, Sansonetti PJ, Nhieu GT. Binding of the Shigella protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. EMBO J 1999; 18: 5853-62.

11. Espina M, Olive AJ, Kenjale R, Moore DS, Ausar SF, Kaminski RW, et al. IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of Shigella flexneri. Infect Immun 2006; 74: 4391-400.

12. Robbins ML, Parr LW, Hann WD. Coliform-Shigella antagonism in fecal cultures among isolates from residents of two egyptian villages. Am J Epidemiol 1958; 68: 6-12.

13. Scrimshaw NS, Guzmán MA, Kevany JJ, Ascoli W. Bruch HA, Gordon JE. Studies of diarrheal disease in Central America: IV. Demographic distributions of acute diarrheal disease in two rural populations of the Guatemalan highlands. Am J Trop Med Hygiene 1962; 11: 401-9.

14. Chung JSH, Shek KC, Yau HH, CW Kam. Emergency physicians in tsunami relief: a discussion of tsunami-related health conditions and necessary preparations. Hong Kong J Eemerg Med 2005; 12: 252-60.

15. Greenberg JH, Schmidt EA, Bell FS Jr. A common source epidemic of shigellosis. Public Health Rep 1966; 81: 1019-24.

16. Oaks EV, Turbyfill KR. Development and evaluation of a Shigella flexneri 2a and S. sonnei bivalent invasin complex (Invaplex) vaccine. Vaccine 2006; **24**: 2290-301.

17. 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.

18. Lindberg AA, Kärnell A, Stocker BA, Katakura S, Sweiha H, Reinholt FP. Development of an auxotrophic oral live Shigella flexneri vaccine. Vaccine 1988; 6: 146-50.

19. Ranallo RT, Barnoy S, Thakkar S, Urick T, Venkatesan MM. Developing live Shigella vaccines using Red recombineering. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 462-9.

20. Murphy KC. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. J Bacteriol 1998; 180: 2063-71.

21. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat Genet 1998; 20: 123-8.

22. Mackel DC, Langlet LF, Venice LA. The use of the guinea-pig conjtjnctiave as an experimental as an model for the study of virulence of shigella organisms. Am J Epidemiol 1961; 73: 219-23.

23. Freter R., Experimental enteric Shigella and Vibrio infections in mice and guinea pigs. J Exp Med 1956; 104: 411.

24. 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; 21: 96-102.

25. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, et al. Deletion in the Shigella enterotoxin genes further attenuates Shigella flexneri 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. J Infect Dis 2004; 190: 1745-54.

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

27. Venkatesan MM, Hartman AB, Newland JW, Ivanova VS, Hale TL, McDonough M, et al. Construction, characterization, and animal testing of WRSd1, a Shigella dysenteriae 1 vaccine. Infect Immun 2002; 70: 2950-8.

28. Venkatesan M, Fernandez-Prada C, Buysse JM, Formal SB, Hale TL. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI Shigella flexneri 2a vaccine strain. Vaccine1991; 9: 358-63.

29. Lesic B, Rahme LG. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in Pseudomonas aeruginosa. BMC Mol Biol 2008; 9: 20.

30. Yoshikawa M, Sasakawa C, Okada N, Takasaka M, Nakayama M, Yoshikawa Y, et al. Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of Shigella flexneri 2a as a candidate live-attenuated oral vaccine. Vaccine 1995; 13: 1436-40.

31. Hartman AB, Venkatesan MM. Construction of a stable attenuated Shigella sonnei Delta virG vaccine strain, WRSS1, and protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. Infect Immun1998; 66: 4572-6.

32. Launay O, Sadorge C, Jolly N, Poirier B, Béchet S, van der Vliet D,et al. Safety and immunogenicity of SC599, an oral live attenuated Shigella dysenteriae type-1 vaccine in healthy volunteers: results of a Phase 2, randomized, double-blind placebo-controlled trial. Vaccine 2009; 27: 1184-91.

33. Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. BMC Mol Biol 2006; 7: 31.

34. Noriega FR, Wang JY, Losonsky G, Maneval DR, Hone DM, Levine MM. Construction and characterization of attenuated delta aroA delta virG Shigella flexneri 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. Infect Immun 1994; 62: 5168-72.

35. Germani Y, Philippe J. Sansonetti. Live-Attenuated Shigella Vaccines. Is Encouraging Good Enough?. Replicating Vaccines 2011: 99-117.

36. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti PJ. Construction and evaluation of live attenuated vaccine strains of Shigella flexneri and Shigella dysenteriae 1. Res Microbiol 1990; 141: 907-12.

37. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol 2006; 4: 811-25.

38. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P, et al. CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell Microbiol 2000; 2: 19-33.

39. Picking WL, Nishioka H, Hearn PD, Baxter MA, Harrington AT, Blocker A, et al. IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. Infect Immun 2005; 73: 1432-40.

40. Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, et al. Structure and composition of the Shigella flexneri 'needle complex', a part of its type III secreton. Mol Microbiol 2001; 39: 652-63.