



بررسی وجود ژن سم شیگا در جدایه‌های کلینیکی گونه‌های شیگلا از گذشته تا حال در بوشهر

غزل نورآبادی (MSc)^{۱*}، مژگان سیاوشی (MSc)^۱، کتایون وحدت (MD)^۲، امید غریبی (BS)^۳،

مهدی محمودپور (MD)^۲، محمدعلی حقیقی (PhD)^۲ و ^۴**

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۲ مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۳ آزمایشگاه مرجع، مرکز بهداشت استان، معاونت امور بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۴ گروه میکروبیولوژی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۹ - پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۲۰)

چکیده

زمینه: سیتوتوکسین شیگا (Stx) عامل بیماری شدید روده‌ای در انسان است. اخیراً ژن *stx* در گونه‌های دیگر غیر از شیگلا دیستری تایپ ۱ یافت شده است. هدف این مطالعه، شناسایی ژن *stx* در جدایه‌های کلینیکی جدا شده از دو شیوع قبلی بیماری شیگلوز در شهر بوشهر واقع در جنوب غربی ایران می باشد.

مواد و روش‌ها: با روش PCR، حضور ژن‌های *stx* و *ipaH* در DNA خالص شده از ۱۴۳ جدایه شیگلا بررسی شد. ترادف‌های تعدادی از محصول‌های PCR، در گونه‌های مختلف شیگلا، با پرایمرهای *evt* مشابه به کار رفته در تکثیر این بخش تعیین گردید.

یافته‌ها: چهارده (۲۲/۳ درصد) از ۶۳ جدایه شیگلا مربوط به شیوع شیگلوز در فاصله ۸۳-۱۳۸۱، دارای پاسخ PCR مثبت با پرایمرهای *evt* بودند. نتایج تعیین ترادف مشخص کرد، محصول PCR ناحیه *evt* بیشترین شباهت (۹۷ درصد) را با زیر واحد A از سم شیگلا دیساتری داشت. نتایج PCR پرایمرهای *stx* و *evt* در کلیه جدایه‌های کلینیکی شیگلای جدا شده در فاصله ۹۴-۱۳۹۲ منفی بودند. نتایج آزمایش PCR نشان داد که ژن *ipaH* در کلیه جدایه‌ها وجود داشت. بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی سرم‌های اختصاصی گونه شیگلا، جدایه‌های حمل کننده ژن *stx* شامل ۹ (۱۴/۳ درصد) *شیگلا فلکسنسری*، ۴ (۶/۴ درصد) *شیگلا سونه‌ای*، ۱ (۱/۶ درصد) *شیگلا بوییدی* بودند.

نتیجه‌گیری: ژن *stx* از قبل در گونه‌های مختلف شیگلای منطقه بوشهر پراکنده شده است. به هر حال نبود این ژن در جدایه‌های کلینیکی آخرین شیوع شیگلوز ممکن است مقطعی باشد. به دلیل اهمیت ژن *stx* در افزایش پتانسیل بیماری‌زایی شیگلا، ضروری است پایش وجود این ژن با روش‌های ملکولی در آینده پیگیری شود.

واژگان کلیدی: شیگلا، شیگا توکسین، ژن *stx* PCR

* بوشهر، گروه میکروبیولوژی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

مقدمه

سم شیگلا (Shiga-toxin) سیتوتوکسینی قوی است که در تشدید کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic colitis) و تشکیل عارضه سندرم همولیتیک اورمیک (Hemolytic uremic syndrome) در انسان بدنال عفونت با باکتری‌های حامل این سم مؤثر می‌باشد (۱ و ۲). شکل کامل (Holotoxin) سم Stx، ساختار دو قسمتی داشته (AB₅) و از ۵ زیر واحد B که به یک زیر واحد فعال آنزیمی A متصل شده تشکیل شده است. گیرنده این سم، ملکول Gb3s (Globotriaosyl ceramides)، بر روی عده خاصی از سلول‌های روده‌ای به نام سلول‌های Paneth و سلول‌های اپیتلیال کلیه در انسان وجود دارد. این گیرنده امکان ورود سم شیگلا را به شکل کامل، بداخل این سلول‌ها فراهم می‌کند. در تمام این سلول‌ها زیر واحد A سنتز پروتیین را مختل کرده و سبب القای نکروز می‌گردد. علاوه بر این، ورود سم Stx آپوپتوزیس را در این سلول‌ها القا می‌کند. عملکرد این سم در سلول‌های روده‌ای فاقد گیرنده Gb3s متفاوت بوده و بر روی این سلول‌ها از سنتز پروتیین جلوگیری نمی‌کند اما با منع تولید کموکاین‌ها از تشکیل التهاب پیشگیری می‌نماید. تشکیل سندروم HUS بیشتر در ارتباط با عملکرد سم Stx₂ می‌باشد (۳).

هر چند تمامی گونه‌های شیگلا توان ایجاد اسهال خونی دیسانتری را دارند اما توان بیماری‌زایی شیگلا دیسانتری تایپ ۱ بیشتر است. اعتقاد بر این است وجود سم Stx که اولین بار در این سویه شناسایی شده عامل افزایش بیماری‌زایی این سویه نسبت به سایر سویه‌های شیگلا دیسانتری و گونه‌های دیگر شیگلا باشد (۱).
ژن کد کننده این سم در اثر پدیده انتقال افقی ژن (Horizontal transfer of genes) علاوه بر شیگلا دیسانتری در سایر باکتری‌های بیماری‌زا (۴) و به‌ویژه در

سویه‌های باکتری اشرشیا کلی STEC (Shiga toxin-producing Escherichia coli) مشاهده شده است (۵). دو نوع سم Stx در اشرشیا کلی‌ها شناسایی شده است: Stx₁ که تنها در یک اسید آمینه با سم مشابه در شیگلا دیسانتری تایپ ۱ تفاوت دارد و Stx₂ که ساختاری متفاوت داشته و ۵۶ درصد در ردیف اسید آمینه با Stx₁ شباهت دارد (۱ و ۶). ژن سازنده این سم زیر واحدهای StxA و StxB را کد می‌کند و در محلی از کروموزوم شیگلا دیسانتری تایپ ۱ قرار گرفته که ترادف آن DNA شبیه به فاژ لامبدا است. البته این ترادف ناقص بوده و قادر به ساخت فاژ کامل نیست. به نظر می‌رسد ترادف جایگزین کننده (Insertion sequence) حامل این سم در ضمن جایگزینی در فاژ لامبدا باعث ناقص شدن این فاژ شده باشد. برخلاف این ساختار در شیگلا دیسانتری تایپ ۱، ژن سم Stx در باکتری‌های اشرشیا کلی STEC توسط ساختار کامل ژنی فاژ لامبدا احاطه و در روی کروموزوم این باکتری‌ها قرار گرفته است به طوری که فاژ حامل ژن سم از محیط کشت این باکتری‌ها قابل جداسازی است (۵ و ۶). ژن کد کننده سم Stx بطور وسیعی در بین باکتری‌های دیگر نظیر انتروباکتر، سیتروباکتر، اسیتوباکتر، کمپیلوباکتر، همیلتونلا و ویبریوها منتقل شده است (۷). اخیراً ژن کد کننده سم Stx در سایر سویه‌ها و گونه‌های جنس شیگلا، گزارش شده است (۸).

بیماری شیگلوز از بیماری‌های شایع روده‌ای در منطقه گرمسیری بوشهر است. گونه‌های مختلف شیگلا در این منطقه پراکنده شده و گزارشی از شیوع ژن stx در سویه‌های بیماری‌زا از گذشته تاکنون در این شهر وجود ندارد با توجه به اهمیت این ژن در ارتقای توان بیماری‌زایی گونه‌های شیگلا، هدف از این مطالعه شناسایی و شیوع ژن

محیط کشت افتراقی T.S.I، بررسی تحرک، تولید ایندول، احیای گوگرد، هیدرولیز اوره، مصرف سیترات، دامینه کردن فنیل آلانین، و آزمایش‌های ONPG، MR-VP (کلیه مواد و محیط‌های کشت از شرکت Merck) و همچنین آنتی سرم‌های تجاری (شرکت بهار افشان) اختصاصی گونه‌های شیگلا استفاده شد.

استخراج آنزیمی DNA ژنومی

کشت شبانه از کلنی‌های مجزای کلیه جدایه‌های کلینیکی و سویه استاندارد باکتری شیگلا بر روی محیط نوترینت مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه (Round per minute) تهیه شد. ژنوم باکتری‌ها، از سوسپانسیون میکروبی به‌دست آمده در فاز رشد لگاریتمی، بر اساس دستورالعمل کیت کره‌ای استخراج ژنوم باکتریایی شرکت Gene All استخراج گردید.

آگارز ژل الکتروفورزیس

آزمایش الکتروفورزیس برای بررسی بازدهی تخلیص آنزیمی DNA و محصولات PCR (Polymerase Chain Reaction) در هر جدایه استفاده شد. مراحل الکتروفورزیس در ژل آگارز (Ultra-pure agarose gel از شرکت Invitrogen)، با غلظت‌های متفاوت (۱ الی ۲/۵ درصد) و با استفاده از بافر TAE، رنگ ایمن فلورسین DNA (DS1000) در کنار مارکرهای ملکولی DNA (DM1100 یا DM2300) از شرکت SMOBiO تایوان) در دمای اتاق و ولتاژ ۷۵ بررسی و سپس DNA تخلیص شده در دمای منفی ۲۰ تا زمان استفاده بعدی نگهداری گردید. نتایج الکتروفورزیس با روش عکس‌برداری تحت نور UV با کمک دستگاه BIO-Gel document (BioDuc-It) ساخت شرکت BIO-RAD ذخیره و برای آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

stx در جدایه‌های کلینیکی شیگلای جدا شده از این منطقه در گذشته و حال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه

این مطالعه توصیفی تحلیلی و از نوع مقطعی (Cross sectional) بوده و مطابق با قوانین تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با کدهای اخلاق در پژوهش: IR.BPUMS.REC. ۱۳۹۴، ۱۱۷، و B-۹۳-۱۶-۱۶ در فاصله سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۵ انجام شد.

سویه‌های باکتری، کشت و آزمایش‌های باکتری‌شناسی

تعداد ۱۴۳ باکتری شیگلای مورد استفاده در این مطالعه از دو شیوع بیماری شیگلوز در شهر بوشهر مربوط به سال‌های قبل جداسازی شدند. تمامی این باکتری‌ها پس از شناسایی در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی نگهداری شدند. ۶۳ جدایه شیگلا مربوط به شیوع بیماری در فاصله سال‌ها ۸۳-۱۳۸۱ و ۸۰ جدایه مربوط به سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ بودند. در این مطالعه از سویه استاندارد شیگلا دیسانتری PTCC 1188 (مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) به عنوان سویه دارنده ژن سم *Stx* استفاده شد.

در زمان انجام آزمایش کلیه شیگلا پس از خروج از فریزر منفی ۷۰ بر روی محیط آگار خون دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده و مجدداً جنس و گونه آنها به کمک جداول بیوشیمیایی و آزمایش‌های استاندارد مربوط به شناسایی خانواده انتروباکتریاسه تأیید شدند. در این مرحله از آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلف نظیر اکسیداز، تخمیر قندها و رشد بر روی

درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در برنامه دوم به ترتیب ۳۰ سیکل متوالی از: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ (Annealing) اختصاصی برای هر پرایمر (مطابق جدول ۱) به مدت ۶۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه اجرا گردید. در برنامه پایانی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. در انتهای واکنش‌های PCR، کلیه نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش آگارز الکتروفورزیس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایش Nested PCR

آزمایش مجدد PCR با پرایمر *evt* بر روی محصول اولیه PCR با نتیجه مثبت و ضعیف این پرایمر انجام گردید. انجام این آزمایش نیاز به غلظت بالا از محصول PCR برای انجام آزمایش تعیین ترادف در مرحله بعد را فراهم کرد.

تعیین ترادف محصولات PCR

محصولات Nested PCR مربوط به پرایمر *evt* برای تعدادی از جدایه‌های شیگلا جهت انجام خدمات تعیین توالی به شرکت کره‌ای MacroGene ارسال گردید. محصولات PCR پس از مراحل تخلیص، با استفاده از پرایمرهای *evt* از هر دو سمت ژن تکثیر شده، (جدول ۲) تعیین توالی شدند.

آنالیزهای بیوانفورماتیک

ترادف پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه قبل از سفارش، به کمک نرم‌افزار بر خط Primer blast در NCBI server و وزن محصولات حاصل از پلیمریزاسیون هریک مورد پیش‌بینی اولیه قرار گرفت. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas

آزمایش PCR جدایه‌های کلینیکی شیگلا

کلیه آزمایش‌های PCR با حداقل دو بار تکرار و با استفاده از واکنش‌گرهای موجود در جدول ۱ در حجم ۲۵ میکرولیتری انجام شد. ترادف پرایمرهای کاربردی و سایر مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است (۹-۱۲).

جدول (۱) واکنش‌گرها و حجم‌های بکار برده شده در آزمایش PCR			
حجم به میکرولیتر	شرکت سازنده	غلظت	واکنش‌گرها
۹	آمپلیکون	۲X	Master Mix Red
۱	ماکروژین	۱۰ p mol/μl	Primer forward
۱	ماکروژین	۱۰ p mol/μl	Primer reverse
۲	کیت ژین آل	۱/۲۰۰	Genomic extracted DNA
۱۲	داروپخش	-	Sterile injection distilled water

در این مطالعه هنگام بررسی حضور ژن *stx* در جدایه‌های کلینیکی شیگلا با روش PCR، به منظور دوری از هر گونه پاسخ منفی کاذب حاصل از متصل نشدن پرایمرها بدلیل جهش‌ها و تفاوت‌های سویه‌ای احتمالی، از دو جفت پرایمر که به قسمت‌های مختلف زیر واحد A در ژن *stx1* متصل می‌شوند استفاده شد. جفت پرایمر *evt* داخلی‌تر بوده و نسبت به جفت پرایمر *stx* دارای محصول PCR با وزن کمتری می‌باشد (جدول ۲).

در این مطالعه حضور پلاسمید تهاجمی در کلیه جدایه‌های کلینیکی شیگلا با استفاده از پرایمرهای ژن تهاجم *ipaH* آزمایش شد. آزمایش PCR با شیب دمایی به همراه کنترل مثبت و منفی و کاربرد پرایمرهای مربوطه برای تعیین بهینه دمایی هر ژن انجام شد (جدول ۲). مراحل پلی‌مریزاسیون ژن‌های هدف در دستگاه ترموسایکر T100 (BIO-RAD) در طی ۳ برنامه متوالی اجرا گردید. در برنامه اول نمونه‌ها در دمای ۹۴

ویرایش ۱/۴۵، Gene Quest DNASTAR Inc.

Blast از NCBI server مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۲) پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه					
پرایمر	ترادف بازهای پرایمر (5' to 3')	اندازه محصول (bp)	دمای (°C) آنیلینگ	جایگاه هدف	مرجع
<i>evt</i>	F: CAACACTGGATGATCTCAG R: CCCCTCAACTGCTAATA	۳۴۹	۵۶	<i>stx1</i> زیر واحد (A)	(۹ و ۱۰)
<i>stx</i>	F: CAGTTAATGTGGTTGCGAAG R: CTGCTAATAGTCTGCGCATC	۸۹۵	۵۵	<i>stx1</i> زیر واحد (A)	(۱۱)
<i>ipaH</i>	F: GCCGGTCAGCCACCCT CTGAGACTAC R: GTTCCTGACCGCCTTCCGTACCGTC	۶۲۰	۶۵	<i>ipaH</i> پلاسمید تهاجم	(۱۲)

یافته‌ها

آنالیز *In silico*

مطالعه بیوانفورماتیکی و Blast (شکل ۱) نشان داد که پرایمرهای *stx* و *evt* اختصاصی زیر واحد A از سم Stx هستند. پرایمر *stx* Forward (جدول ۲) در بخش ابتدایی و پرایمر *evt* Forward در بخش انتهایی این ژن دارای الگوی مکمل است و در جایگاه اتصال پرایمر Reverse هر دو دارای همپوشانی هستند. نتایج بررسی‌های تعیین ترادف نشان داد محصول پلی‌مریزاسیون با پرایمرهای *evt* مربوط به جدایه کلینیکی ۲۴، ترادفی با ۹۷ درصد یکسانی با زیر واحد A ژن *stx1* سم شیگلا دیسانتری داشت (شکل ۲).

آزمایش PCR ژن سم شیگلا

نتیجه آزمایش PCR با پرایمرهای *stx* (جدول ۲) در ۶۳ جدایه کلینیکی مربوط به شیوع شیگلوز در سال‌های ۸۳-۱۳۸۱ در کنار کنترل مثبت، منفی بود (شکل ۲). آزمایش تعیین بهینه دمایی برای پرایمر *evt* در کنار کنترل مثبت (*S. dysenteriae* PTCC 1188) در طیف دمایی مختلف نشان داد این پرایمر بطور اختصاصی به جایگاه مکمل خود اتصال یافته و بهینه دمایی برای این پرایمر ۵۶ درجه سانتی‌گراد انتخاب

گردید (شکل ۲ بخش C). این آزمایش نشان داد پاسخ ضعیف واکنش PCR به دلیل نامناسب بودن شرایط دمایی نبود. نتیجه آزمایش Nested PCR بر روی محصول پاسخ اولیه PCR با استفاده از پرایمرهای *evt* در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد در جدایه‌های کلینیکی مختلف در شکل ۲ (بخش B) مشاهده می‌شود.

در این مطالعه ۱۴ جدایه (۲۲/۳ درصد) از ۶۳ جدایه کلینیکی شیگلا دارای پاسخ مثبت در آزمایش PCR با پرایمرهای *evt* بودند. این ۱۴ جدایه شامل ۹ گونه شیگلا فلکسنری (۱۴/۳ درصد)، ۴ گونه شیگلا سونه‌ای (۶/۴ درصد) و ۱ گونه شیگلا بوییدی (۱/۶ درصد) می‌شدند. تمامی این جدایه‌ها دارای آزمایش PCR با پرایمرهای *ipaH* مثبت بوده و از لحاظ تست‌های بیوشیمیایی شناسایی خانواده انتروباکتریاسه و آنتی سرم‌های اختصاصی گونه‌های مختلف شیگلا تأیید شدند.

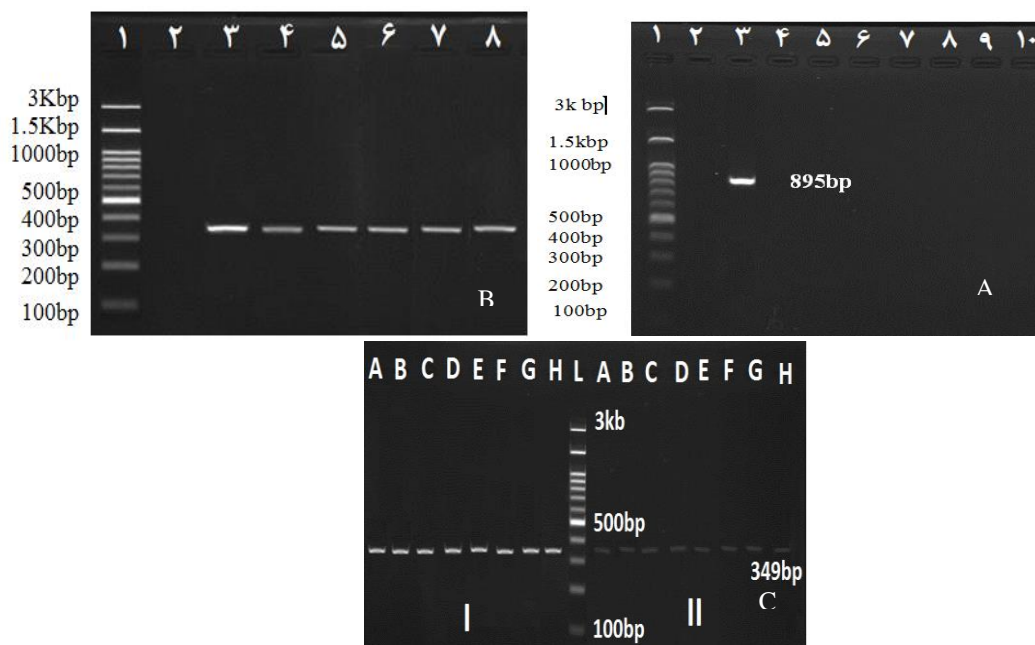
پاسخ آزمایش‌های مجزای PCR با پرایمرهای *stx* و *evt* در ۸۰ جدایه کلینیکی شیگلا مربوط به شیوع شیگلوز در سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ منفی بود. بررسی علائم کلینیکی به‌دست آمده از زمان جمع‌آوری‌های نمونه نشان می‌دهد که کلیه بیماران دارای علائم اسهال خونی و بدون علائم سندروم HUS بودند.

```

GAATATGATTATCATTTCATTACGTTATTGTTACGTTTATCCGGTGCGCCGTAA
AACGCCGTCCTCAGGGCGTGGAGGATGCAAGAATATAAGTTATCGTATGGTGC
TCAAGGAGTATTGTGTAATATGAAAATAATTATTTTTAGAGTCTAACTTTTTTC
TTTTTATCTTTTCAGTTAATGTGGTTGCGAAGCAATTACCTTAGACTTCTCGA
CCGCAAAGACGTATGTAGATTCGCTGAATGTCAATCGCTCTGCAATAGGTAATC
CATTACAGACTATTTTCATCAGGAGGTACGCTTTACTGATGATTGATAGTGGCAC
AGGGGATAAATTTGTTGCAAGTTGATGTCAGAGGGATAGATCCAGAGGAAGGGC
GGTTAATAATCTACGGCTTATTGTTGAACGAAATAATTATATGTGACAGGATT
TGTTAACAGGACAAATAATGTTTTTATCGCTTTGCTGATTTTTTCACATGTTACCT
TTCCAGGTACAACAGCGGTTACATTGCTGGTGACAGTAGCTATAACCAGTTAC
AGCGTGTGACGGGATCAGTCGTACGGGGATGCAGATAAATCGCCATTCGTTGA
CTACTTCTTATCTGGATTAATGTCGCATAGTGAACCTCAGTACGCGAGTCTGT
GGCAAGAGCGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGCTGAACCTTACGTTTTCGG
CAAATACAGAGGGGATTTTCGTAACAACACTGGATGATCTCAGTGGGCGTCTTAT
GTAATGACTGCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAACCTGGGGAAGGTTGAGTAGT
GTCCCTGCCTGACTATCATGACAAAGACTCTGTTCCGTGTAGGAAGAATTCTTTG
GAAGCATTAAATGCAATTCTGGGAAGCGTGGCATTAACTGAATTTTCATCATC
ATGCATCCGGAGTTGCCAGAATGGCATCTGATGAGTTCTTCTATGTGCCGGC
AGATGGAAGAGTCCGTGGGATTACGCACAATAAAATATTGTGGGATTCAATCAC
TCTGGGGCAATCTCTGATGCGCAGAACATTAGCAGTTGAGGGGGTAATAATGAA
AAAAACATTATAATAGCTGCATCGCTTTCATTTTTTCAGCAAGTGCCTGGCG
ACGCCTGATTGTGTAACCTGAAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGATGACGAT
ACCTTACAGTTAAAGTGGGTGATAAAGAATTATTTACCAACAGATGGAATCTT
CAGTCTTCTTCTCAGTGCACAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAATAACTA
ATGCCTGTCATA
    
```

Stx Forward
Stx Reverse
evt Forward
evt Reverse
Stx Reverse
evt Reverse
*Stx*B
*Stx*A
evt Amplicon

شکل (۱) محل قرارگیری پرایمرها بر روی ژن *Stx* مربوط به شیگلا دیسانتری با زیر واحدهای A و B (Gen Bank: X07903.1)



شکل (۲) الکتروفورزیس محصول PCR با پرایمر *stx* و *evt* در گونه‌ها و جدایه‌های کلینیکی مختلف شیگلا

A: الکتروفورزیس محصول PCR با پرایمر *stx* ۱- نشانگر وزنی DNA (DM2300) در ژل آگارز ۲/۵ درصد ۲- کنترل منفی ۳- کنترل مثبت (*S. dysenteriae* PTCC1188) ۴ الی ۱۰ جدایه‌های کلینیکی شیگلا با گونه‌های مختلف غیر از گونه دیسانتری

B: الکتروفورزیس محصول Nested PCR با پرایمر *evt* ۱- نشانگر وزنی DNA (DM2300) در ژل آگارز ۲/۷ درصد ۲- کنترل منفی ۳- کنترل مثبت (*S. dysenteriae* PTCC1188) ۴ و ۵- جدایه‌های کلینیکی *S. flexneri* ۶ و ۷- جدایه‌های کلینیکی *S. sonnei* ۸- جدایه‌های کلینیکی *S. boydii*

C: الکتروفورزیس محصول PCR با گرایدانت دمایی پرایمر *evt* L: نشانگر وزنی DNA (DM2300) در ژل آگارز ۲/۷ درصد A تا H: طیف دمایی مختلف به درجه سانتی‌گراد به ترتیب کاهشی از ۶۰، ۵۹/۲، ۵۸، ۵۶/۱، ۵۳/۸، ۵۱/۹، ۵۰/۷، ۵۰، I: سویه استاندارد *S. dysenteriae* PTCC1188 و II: جدایه کلینیکی *S. flexneri*

بحث

در این مطالعه نرخ شیوع حداقل ۲۲ درصد ژن *Stx1* در جدایه‌های قدیمی‌تر شیگلا، انتقال این ژن به سایر گونه‌های شیگلا غیر از دیستری را توضیح می‌دهد. میزان انتقال این ژن به سایر گونه‌های شیگلا در این مطالعه با نرخ گزارش‌های داده شده در مناطق دیگر همسو بود (۸). بیشترین فراوانی شیوع این ژن به ترتیب در گونه‌های شیگلا فلکسنری، شیگلا سونه‌ای و شیگلا بوییدی بود. انتقال ژن *Stx* به گونه‌های شیگلا سبب تکوین سویه‌های با پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر نسبت به سویه‌های فاقد این سم می‌شود (۸). گزارش‌هایی از ایجاد سندروم HUS توسط شیگلا سونه‌ای دارای ژن *Stx* در بچه‌های بنگلادش در سال ۲۰۱۳ و اخیراً در بیماری ۲۷ ساله در امریکا در سال ۲۰۱۷ داده شده است (۱۳). هر چند در این مطالعه، دلایل متقن برای ارتباط بین جدایه‌های کلینیکی شیگلای دارنده ژن *Stx1* جدا شده از بیماران و افزایش شدت بیماری‌زایی و بروز سندروم HUS در بیماران مشاهده نشد ولی تمامی عواقب این انتقال ژنی در آن سویه‌ها قابل پیش‌بینی نبود. حضور ژن *Stx* ممکن است در مراحل اولیه انتقال بوده و هنوز منجر به بروز فنوتیپ بیماری‌زایی در جدایه حامل نشده باشد، بنابراین آگاهی از تکوین این سویه‌ها همیشه از راه مشاهده شدت علائم کلینیکی در بیماران ممکن نیست و ضروری است در مطالعات بعدی بیان ژن *Stx* در جدایه‌های بیماری‌زا با روش‌های ملکولی بیان ژن پیگیری شود تا شناخت بهتری از مکانیسم‌های انتقال و تکوین این سویه‌ها به‌دست آید.

اصول بیماری‌زایی گونه‌های مختلف شیگلا با یکدیگر مشابه است ولی مطالعات نشان داده است که

اپیدمیولوژی گونه‌های شیگلا منحصر به گونه بوده و در مناطق و زمان‌های مختلف متفاوت بوده و تغییرات آن همسو با تغییر توسعه اجتماعی جوامع تحت قلمرو آن گونه‌ها است (۱۷-۱۴). به نظر می‌رسد که این روند همچنین نرخ شیوع فاکتورهای بیماری‌زا را در جدایه‌های شیگلا تحت تأثیر قرار دهد. البته محتمل است، نبود ژن *Stx* در جدایه‌های جدید این مطالعه مقطعی بوده و یا به خاطر محدود بودن تعداد نمونه‌های کلینیکی جدید باشد. بنابراین شاید هنوز با قاطعیت نتوان نتیجه گرفت که این ژن در اثر تغییر گروه‌های این باکتری در جدایه‌های جدید حذف شده باشد (۱۷).

در این مطالعه ردیف بازهای نوکلئیک اسید DNA سازنده ژن *Stx* ۹۷ درصد با ژن *Stx1* موجود در سویه شیگلا دیستری شباهت داشت. در گذشته اعتقاد بر آن بوده که ژن *Stx1* فقط در سویه‌های شیگلا دیستری و *Aeromonas culy* وجود دارد اما گزارش‌هایی از انتقال افقی (Horizontal) این ژن به کمک فاژ ØOC-j13 به گونه‌های مختلف شیگلا داده شده که می‌تواند سبب افزایش پتانسیل توان بیمارزایی در سویه‌های پذیرنده گردد (۵ و ۸).

نتایج مطالعات نشان می‌دهد بین شیوع شیگلای دارنده ژن سم *Stx1* و مسافرت به مناطق خاص ارتباط اپیدمیولوژیک وجود دارد. توسط گری (Gray) و همکاران، ۲۶ جدایه کلینیکی شیگلا فلکسنری سروتیپ 2a کد کننده سم *Stx1* جدا شده از بیماران آمریکایی و یا فرانسوی که به کشورهای هاییتی (Haiti)، جمهوری دومینکن (Dominican Republic) و یا جزیره هیسپانیولا (Hispanola) سفر کرده بودند، گزارش داده شد (۶). در مطالعه گوپتا (Gupta) و همکاران، حضور ژن *Stx1* در ۳ جدایه کلینیکی شیگلا دیسانتری تایپ ۴،

جدا شده از بیمارانی که به جزیره هیسپانیولا مسافرت کرده بودند گزارش شد (۱۸). استراچ (Strauch) و همکاران از آلمان، ویژگی‌های شیگلا سونه‌ای دارای ژن *stx1* جدا شده از بیماری که به اوکراین سفر کرده بود را شرح دادند (۲ و ۱۹). شیوع شیگلا بوییدی به‌طور جهانی پایین است ولی در مطالعه گری و همکاران به حضور ژن *stx* در جدایه‌های کلینیکی شیگلا بوییدی نیز اشاره گردید (۵). ارتباط اپیدمیولوژیکی این سویه به منطقه خاص سؤال‌های متعددی را مطرح می‌سازد. مثلاً چه ویژگی‌های محیطی، در این مناطق وجود دارد که این مکان‌ها را مستعد تکوین و انتقال ژن در این سویه‌ها می‌کند. همچنین تغییرات احتمالی که در این سویه‌ها پس از انتقال ژن صورت می‌پذیرد و منجر به انتخاب و ماندگاری آنها می‌شود چیست. آنچه مسلم است ویژگی‌های اکوسیستمی این مناطق برای انتقال افقی ژن به سایر گونه‌ها و تکامل این سویه‌ها مناسب بوده است. هر چند یک مخزن طبیعی برای شیگلا در این مناطق (جزیره هیسپانیولا) شناخته نشده است ولی اعتقاد بر این است که تکامل این سویه‌ها سبب ماندگاری بهتر این باکتری‌ها به ویژه در زیستگاه‌های آب محیطی (Aquatic environment) موجود در این مناطق می‌گردد (۶). در تأیید این فرضیه نتایج مطالعات نشان داده است که سویه‌های شیگلای تولیدکننده سم *Stx* نسبت به سویه‌های فاقد این سم قدرت دفاعی و زنده ماندن بیشتری در آمیب‌ها و پروتوزوآهای محیطی دارند و این آمیب‌ها خود می‌توانند به عنوان مخزن مطمئن‌تری برای ماندگاری این سویه‌ها در اکوسیستم محلی نسبت به سویه‌های فاقد سم باشند (۸ و ۲۰).

در مطالعه حاضر همگی این بیماران بومی همین منطقه بوده‌اند و هیچ‌گونه اطلاعی از سفر بیماران به مناطق و کشورهای دیگر در دسترس نمی‌باشد. اما حضور این

سویه‌ها در بوشهر به چه دلایلی بوده است. آیا به دلایل توسعه این بندر در سال‌های گذشته و مهاجرت‌های مختلف از مناطق همجوار و کشورهای دیگر به این بندر بوده و یا تشابه اقلیم بوشهر با جزایر و مناطق مشابه امکان تکوین این سویه‌ها را فراهم آورده بود. برای شناخت این دلایل مهم است که حضور این ژن در مطالعات آینده در باکتری شیگلا و سایر گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در نمونه‌های کلینیکی و آب‌های محیطی بررسی شود.

در مطالعات قبلی در ایران، به وجود ژن سم *Stx* در داخل جدایه‌های کلینیکی شیگلا دیسنتری و همورژیک /شرشیا کلی جدا شده از مدفوع بیماران (۲۱ و ۲۲) و همچنین در باکتری /شرشیا کلی جدا شده از مدفوع دام اشاره شده است (۲۳ و ۲۴). در طول دهه گذشته تشخیص ژن *stx* در گونه‌های مختلف جدایه‌های کلینیکی شیگلا در مناطق مختلف جهان روند افزایشی داشته است (۸).

این مطالعه اولین گزارش حضور ژن *stx-A* در جدایه‌های کلینیکی شیگلاهای فلکسنری، سونه‌ای و بوییدی در نمونه‌های جدا شده از انسان در ایران می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در گذشته گونه‌های مختلفی از شیگلای حاوی ژن *stx1* در بندر بوشهر، شایع بوده‌اند. ممکن است، نبود ژن *stx1* در جدایه‌های کلینیکی جدید این مطالعه مقطعی بوده و یا به دلیل محدود بودن تعداد این نمونه‌ها باشد. با توجه به اهمیت این ژن در بیماری‌زایی شیگلا و حضور آن به عنوان یک عامل بالقوه در افزایش پتانسیل بیماری‌زایی، به نظر می‌رسد تداوم بررسی حضور این ژن با روش‌های ملکولی در جدایه‌های کلینیکی شیگلا در آینده لازم و ضروری باشد. شناخت

حمایت دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با کد مالی ۴۱۰۳ صورت گرفته است. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از مسئولین محترم به جهت تأمین بودجه طرح و تهیه امکانات تقدیر و قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع کلینیکی و محیطی شیگلایهای دارنده ژن *Stx* به همراه پیگیری علائم کلینیکی و بررسی مسافرت‌های احتمالی در بیماران، می‌تواند در برنامه ریزی‌های آینده کنترل شیگلوز و پیشگیری از عوارض ناشی از عفونت با این سویه‌ها در منطقه بوشهر مؤثر باشد.

سپاس و قدرانی

این مقاله منتج شده از پایان نامه‌های کارشناسی ارشد خانم غزل نورآبادی و مژگان سیاوشی می‌باشد که با

References:

- Kozyreva VK, Jospin G, Greninger AL, et al. Recent Outbreaks of Shigellosis in California Caused by Two Distinct Populations of *Shigella sonnei* with either Increased Virulence or Fluoroquinolone Resistance. *mSphere* 2016; 1(6):1-18.
- Nyholm O, Lienemann T, Halkilahti J, et al. Characterization of *Shigella sonnei* Isolate Carrying Shiga Toxin 2-Producing Gene. *Eid* 2015; 21(5): 891-2.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(1): 26-38.
- Ramamurthy T, Bag PK, Pal A, et al. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol* 1993; 39(4): 310-7.
- Gray MD, Leonard SR, Lacher DW, et al. Stx-Producing *Shigella* Species From Patients in Haiti: An Emerging Pathogen With the Potential for Global Spread. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2(4): 1-5.
- Gray MD, Lampel KA, Strockbine NA, et al. Clinical isolates of Shiga toxin1a-producing *Shigella flexneri* with an epidemiological link to recent travel to Hispaniola. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(10): 1669-77.
- Mauro SA, Koudelka GB. Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins* 2011; 3(6): 608-25.
- Gray MD, Lacher DW, Leonard SR, et al. Prevalence of Shiga toxin-producing *Shigella* species isolated from French travellers returning from the Caribbean: an emerging pathogen with international implications. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(8): 765.e9-765.e14.
- Cruz CBNd, Souza MCSd, Serra PT, et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. *BioMed Research International* 2014; 9.
- Faruque SM, Khan R, Kamruzzaman M, et al. 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(8): 3908-13.
- Vargas M, Gascon J, Jimenez De Anta MT, et al. Prevalence of *Shigella enterotoxins* 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3608-11.
- Jiménez KB, McCoy CB, Achí R. Detection of shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Braz J Microbiol* 2010; 41(4): 993-1000.
- Adams C, Vose A, Edmond MB, et al. *Shigella sonnei* and hemolytic uremic syndrome: A case report and literature review. *IDCases* 2017; 8: 6-8.
- Ka T, Dk D, A S, et al. Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and

- emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3757-9
15. Niyogi SK, Mitra U, Dutta P. Changing patterns of serotypes and antimicrobial susceptibilities of *Shigella* species isolated from children in Calcutta, India. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54(3): 121-2.
 16. Talukder KA, Islam MA, Khajanchi BK, et al. Temporal shifts in the dominance of serotypes of *Shigella dysenteriae* from 1999 to 2002 in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5053-8.
 17. Muthuirulandi Sethuvel DP, Devanga Ragupathi NK, Anandan S, et al. Update on: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. *Lett Appl Microbiol* 2017; 64(1): 8-18.
 18. Gupta SK, Strockbine N, Omondi M, et al. Emergence of Shiga toxin 1 genes within *Shigella dysenteriae* type 4 isolates from travelers returning from the Island of Hispanola. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(6): 1163-5.
 19. Greco KM, McDonough MA, Butterson JR. Variation in the Shiga toxin region of 20th-century epidemic and endemic *Shigella dysenteriae* 1 strains. *J Infect Dis* 2004; 190(2): 330-4.
 20. Saeed A, Abd H, Edvinsson B, et al. *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. *Arch Microbiol* 2009; 191(1): 83-8.
 21. Amani J, Ahmadpour A, Imani Fooladi AA, et al. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR-ELISA. *Braz J Infect Dis* 2015; 19(3): 278-84.
 22. Kargar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins (stx1, stx2), eaeA and hly genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pac J Trop Med* 2015; 8(1): 24-8.
 23. Momtaz H, Dehkordi FS, Hosseini MJ, et al. Serogroups, virulence genes and antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic pediatric patients in Iran. *Gut Pathog* 2013; 5(1): 39.
 24. Tahamtan Y, Hayati M, Namavari M. Prevalence and distribution of the stx, stx genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. *Iran J Microbiol* 2010; 2(1): 8-13.

Original Article

Presence of Shiga Toxin Gene in Clinical Isolates of Shigella Species from the Past to Present in Bushehr, Iran

G. Noorabadi (MSc)^{1*}, M. Siyavashi (MSc)¹, K. Vahdat (MD)², O. Gharibi (BS)³,
M. Mahmudpour (MD)², MA. Haghighi (PhD)^{2,4**}

¹ Student Research Committee, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

² The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

³ Reference laboratory, Provincial Health Center, Vice Chancellery Health, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

⁴ Department of Microbiology & Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 19 Jan, 2018 Accepted 11 Mar, 2018)

Abstract

Background: The Shiga cytotoxin (Stx) is involved in serious human intestinal diseases. Recently *stx* has been found in non-S dysenteriae1 Shigella species. This study aimed to identify *stx* gene in clinical strains of Shigella isolated from two shigellosis outbreaks in previous years in Bushehr, southwest of Iran.

Materials and Methods: Purified DNA of 143 Shigella isolates was used for PCR to detect *stx* and *ipaH* genes. The number of PCR products in various Shigella species isolates was sequenced with the same primers (*evt*) used to amplify this region.

Results: Fourteen (22.3%) out of 63 shigella isolates related to previous shigellosis outbreaks during 2002-2004 contained the PCR positive result with *evt* primers. The sequencing results indicated that the *evt* PCR product had the most identity (97%) with Shigella dysentery shiga toxin subunit A. All clinical shigella strains isolated during 2013-2015 yielded PCR negative results with primers *stx* and *evt*. PCR results revealed that *ipaH* is present in all isolates. According to biochemical and species-specific antiserum tests, the *stx* gene harboring isolates included 9 (14.3%) *S. flexneri*, 4 (6.4%) *S. sonnei*, and 1(1.6%) *S. boydii*.

Conclusion: The *stx* gene has already been distributed in different Shigella species of Bushehr region. However, the absence of this gene in the clinical isolates of recent shigellosis outbreaks may be temporary. Because *stx* gene increases the pathogenic potential of Shigella, it is necessary to monitor the prevalence of the *stx* harboring Shigella species by molecular methods in the future.

Keywords: Shigella species, Shiga-toxin, *Stx* gene, PCR

©Iran South Med J.All right reserved

Cite this article as: Noorabadi G, Siyavashi M, Vahdat K, Gharibi O, Mahmudpour M, Haghighi MA. Presence of Shiga Toxin Gene in Clinical Isolates of Shigella Species from the Past to Present in Bushehr, Iran. Iran South Med J 2018; 21(4):276-286

Copyright © 2018 Noorabadi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence: Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: mahaghighy@gmail.com

*ORCID: 0000-0002-9960-5063

**ORCID: 0000-0003-1876-3658

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>