View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۲/ ۱۰۸-۱۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت تهاجمی سلولی سروتیپ های *شیگلا* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال در کشت سلولی HEp-2

دکتر محمد مهدی سلطان دلال[۱،۲]*، دکتر عباس رحیمی فروشانی[۳]، فرزانه امین هراتی[۲]، سولماز اوحدیان مقدم[۲]، بهرام نیک منش[۴]، دکتر عبدالعزیز رستگار لاری[۵]

[۱] مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۲] گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۳] گروه اپیدمیولوژی و آمارزیستی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۴] آزمایشگاه مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [۵] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۶ اصلاح نهایی: ۹۲/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۷

چکیده:

زمینه و هدف: **اسهال یکی از مهمترین علل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. بیماری های روده ای سالانه سبب مرگ بسیاری از کودکان زیر ۵ سال می گردند. یکی از روش هایی که امکان بررسی خاصیت تهاجمی باکتری ها را می دهد، استفاده از کشت سلول است. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت تهاجمی تعدادی از سویه های جنس *شیگلا* با استفاده از کشت سلولی HEp-2 بوده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی تحلیلی، سوآپ رکتال های تهیه شده از ۲۸۰ بیمار مبتلا به اسهال (۱۴۰ بیمار با اسهال خونی و ۱۴۰ بیمار با اسهال آبکی به عنوان گروه مقایسه) مراجعه کننده به بیمارستان های امام خمینی و مرکز طبی کودکان، قبل از دریافت آنتی بیوتیک و ۱۴۰ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه ها در محیط های افتراقی و انتخابی هکتون و XLD آگار تلقیح و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، از نظر مورفولوژی بررسی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. برای بررسی خاصیت تهاجمی *شیگلا* در کشت سلولی HEp-2 علاوه بر ایزوله های آن، از ۲۰ سوش کلکسیون نیز استفاده گردید. همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها طبق دستورالعمل CLSI انجام شد.**

یافته ها: **۳۶ سوش *شیگلا* (۸/۶٪)، از نمونه های مورد بررسی جدا گردید. بیشترین گونه جدا شده از بیماران، *Shigella flexneri* با ۱۶ ایزوله بود. بررسی بر روی کشت سلولی HEp-2 نیز نشان داد که تنها ۱۴ سوش *شیگلا* (۹ ایزوله و ۵ کلکسیون) خاصیت تهاجمی داشتند.**

نتیجه گیری: **نتایج بدست آمده نشان می دهد اولاً تمامی ایزوله های *شیگلا* برخلاف انتظار قابلیت حمله و تهاجم به سلول های اپتلیال روده را ندارند؛ ثانیاً تهاجم یک صفت ثابتی است که در اثر زمان از بین نمی رود.**

واژه های کلیدی: اسهال، تهاجم سلولی، کشت سلولی، شیگلا.

مقدمه:

بیماری های اسهالی باکتریایی جزء بزرگترین مشکلات بهداشت عمومی می باشند. بر اساس برآورد WHO سالانه ۴/۵ بیلیون نفر در جهان مبتلا به بیماری های اسهالی می شوند که در سال ۲۰۰۲ از این تعداد ۱/۸ میلیون مورد مرگ گزارش گردیده است و تقریبا ۹۹درصد این موارد در کشورهای در حال توسعه بوده اند (۱). در میان پاتوژن های باکتریایی گونه های جنس شیگلا معمول ترین و مهمترین ایزوله های جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال می باشند؛ ۵ تا ۱۵ درصد تمامی موارد اسهال در سراسر جهان با عفونت های شیگلایی مرتبط می باشد که از این میان ۱/۱ میلیون مورد مرگ را شامل می شود؛ دو سوم تمام این موارد مرگ و میرها در کودکان زیر ۵ سال رخ می دهد (۳،۲).

شیگـلا باکتری پاتوژن داخل سلولی گرم منفی ای است که عامل اسهـال باسیلی در انسان می باشد. گونه هـای

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱،
E-mail:soltanirad34@yahoo.com

شیگلا از راه مدفوعی دهانی انتقال یافته و از طریق آب و غذای آلوده وارد بدن انسان می شوند. این باکتری ها بسیار عفونی می باشند تاجاییکه ۱۰ تا ۱۰۰ عدد از آن ها برای ایجاد عفونت کافی است (۴). عفونت ناشی از این پاتوژن منجر به بیماری شدید و حاد التهابی روده می شود که با اسهال آبکی همراه با ترشحات چرکی مشخص می گردد. بیوپسی کولون از بیماران آلوده نشان از نفوذ گسترده سلول های التهابی، ادم بافت و مناطقی از اپیتلیوم که به طور کامل تخریب شـــده اند می باشد. شیگلا قادر به حمله به سلول های اپیتلیال برای به دست آوردن ورود به اپی تلیوم کولون و استثمار سلـــول های تخصصی اپیتلیـــال در فولیکول های لنفاوی می باشد(۸-۵). عوامل چسبندگی و تهاجم به سلول‌های میزبان و تولید سم از مواردی هستند که در بیماری زایی باکتری‌ها دخیل می‌باشند (۹). بطور کلی قدرت تهاجم عبارتست از توانایی ارگانیسم‌های پاتوژن جهت نفوذ در بافت‌های بدن،البته باید توجه داشت که هر تهاجمی، بیماری زایی را بدنبال نخواهد داشت، همانگونه که بیماری زایی فقط از تهاجم حاصل نمی‌شود. تهاجم و پاتوژنیسیته اکثر باکتری‌ها بر این پایه است که گیرنده‌هایی در سطح برخی از سلول‌های حیوانی و باکتری‌ها وجود دارد. لذا ارگانیسم‌های بیماریزا توانایی اتصال به سطح سلول‌های میزبان از طریق گیرنده‌ها وایجاد بیماری زایی را دارند (۱۲-۱۰). دستیابی به چنین نتیجه‌ای، متضمن بررسی‌های بسیار دقیق پیرامون بیماری زایی این باکتری‌هاست. در این زمینه، کشت سلولی یکی از بهترین و جالب‌ترین روش‌هایی است که مطالعه مکانیسم بیماری زایی ارگانیسم‌ها را بسیار آسان کرده است. حتی جداسازی، شناسائی و تعیین مقدار عوامل اتیولوژیکی نیز با این تکنیک قابل بررسی هستند. خاصیت تهاجم باکتری‌های روده‌ای یکی از مکانیسم‌های بیماری زایی آنهاست که به خوبی با تکنیک کشت سلولی قابل بررسی است (۱۵-۱۳).

در شـیگلوز، بـاکتری در سـلول‌هـای اپـی تلیـال مخاطی نفوذ کرده و در آنجا شروع بـه رشـد و نفـوذ در سلول‌های مجاور می‌کند که در نتیجه باعـث جراحـت و خرابی سلول‌های مخاطی می‌شود و به ندرت بـاکتری‌هـا در لامینا پروپریا (...) نفوذ می‌کنند. اما در سایر پاتوژن‌ها مثل یرسینیا و سالمونلا، سویه های ویرولانت به سـادگی در سلول‌های اپی تلیـال مخـاط نفـوذ کـرده و سـریعاً بـه لامینا پروپریا و غده‌های لنفاوی آسیب رسـانده و شـروع بـه تکثیـر در سـلول‌هـای تـک هسته‌ای نمـوده و باعـث تـــشکیل گرانولـــوم مـــی‌شـــوند (۱۷،۱۶) و بـــرعکس موتان های غیـــر ویرولانت قـادر بـه ورود و حملـه بـه ســلول هـــای M در پـــلاک پیـــر (Peyer's patches) نمی باشند (۱۸). توانایی بـاکتری هـای مهـاجم روده ای مثل شیگلا در تهـاجم بـه لایـه کـشت سـلولی بـه عنـوان معیاری برای انـدازه گیـری بیمـاری زایـی آنهـا اسـتفاده می شـــود. در واقـــع سویه هـای *Shigella flexneri* و *Shigella sonnei* که توانایی ورود به سلول های هـلا را از دست می دهند در میزبان هـای حیـوانی غیـر بیمـاریزا هستند (۲۰-۱۹). سیستم هـای آزمایـشی فراوانـی جهـت تشخیص مراحل مختلف ویـرولانس گونـه هـای شـیگلا بکـــار گرفتـــه مـــی شـــوند؛ از جملـــه ایـــن آزمایـــشات Hela cell invasion assay می باشد (۲۱)؛ بـا توجـه بـه مطالب فوق و عدم پاسخگویی به سـوال هـایی مبنـی بـر وضعیت خاصیت تهاجمی ایزوله های شیـــگلا در ایـران و یا تـاثیر گـذر زمـان بـر مانـدگاری خاصـیت تهـاجمی سوش های کلکـسیون و مقایـسه ایـن دو گـروه، نیـاز بـه یک مطالعه با استفاده از کشت سلولی احساس شـد. لـذا این مطالعه با هدف بررسی خاصیت تهاجمی سویه ها ی شیگلا با استفاده از کشت سـلولی HEP-2 بـوده و اینکـه آیا تمامی ایزوله های شیگلا قابلیت تهاجم به سلول های اپیتلیال را دارند یا نه، انجام شده است.

روش بررسی:

ایـن مطالعـه توصـیفی - تحلیلـی طـی ۱۰ مـاه از بهمن ماه سال ۱۳۸۹ الی آبان ماه ۱۳۹۰ انجـام پـذیرفت. در این مطالعه ابتدا سوآپ رکتال های تهیه شـده از ۲۸۰ بیمار مبتلا به اسهال (۱۴۰ بیمـار بـا اسـهال خـونی و ۱۴۰ بیمار با اسهال آبکی بـه عنـوان گـروه مقایـسه)، مراجعـه کننـده بـه بیمارسـتان هـای امـام خمینـی و مرکـز طبـی

کودکان، قبل از دریافت آنتی بیوتیک و ۱۴۰ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور نمونه ها در محیط های افتراقی و انتخابی هکتون (Hektoen Enteric Agar=HE) و Xylose lysine deoxycholate (XLD) آگار تلقیح و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، از نظر مورفولوژی بررسی شدند. سپس کلنی های مشکوک به شیگلا در محیط XLD و هکتون انتخاب و جهت بررسی نهایی از تست های بیوشیمیایی مانند (TSI agar) Triple Sugar Iron، Urea، Lysine agar، Sulfide-Indole-Motility (SIM)، Simmons citrate و MR-VP تست سرولوژی استفاده شدند (۲۲) (تمام محیط های کشت و افتراقی از شرکت Merk و آنتی سرم از شرکت Difco تهیه شد). همچنین ۲۰ سوش شیگلا از کلکسیون دانشکده بهداشت، جهت بررسی خاصیت تهاجمی استفاده گردید. از سوش *E. coli* K12 نیز به عنوان کنترل منفی (سوش غیر مهاجم)و از دو سوش شیگلا فلکسنری (*Shigella flexneri*) تایپ II و تایپ IV که بوسیله دو روش سرنی (Sereny test) و کشت سلولی در بخش میکرب شناسی دانشکده بهداشت، قدرت تهاجمی آنها قبلاً مورد تایید قرار گرفته بود، به عنوان کنترل مثبت (سوش مهاجم) در تمام آزمایشات استفاده شد. لازم به ذکر است که جهت بررسی سویه های شیگلا از نظر خاصیت تهاجمی با استفاده از کشت سلول (HEp-2)، از روش های تایید شده در سایر مطالعات استفاده شد(۲۴،۲۳،۱۴).

در این مطالعه برای کشت سلول‌های HEp-2 از محیط Minimum Essential Medium (MEM) (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، حاوی (FCS) Fetal Calf Serum به میزان ده درصد استفاده گردید. به این ترتیب که به ازای هر ml ۹۰ از محیط MEM، از ml ۱۰ FCS غیر فعال شده استفاده شد. سپس ml ۲ بیکربنات سدیم ۱۰ درصد و ۱ میلی لیتر محلول پنی سیلین – استرپتومایسین (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) و ۲ میلی لیتر گلوتامین نیز اضافه و به این ترتیب محیط برای مصرف آماده شد. درصورت لزوم به همین ترتیب می‌توان محیط‌های ۵ درصد و ۲ درصد از FCS را نیز تهیه کرد که بیشتر به منظور نگهداری و یا تعویض محیط کشت سلولی تهیه می‌شوند.

برای تهیه محیط مخصوص رشد داخل سلولی باکتری (Intracellular growth medium)، به ۸۰ میلی لیتر محیط MEM حاوی FCS، ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنتی بیوتیک و ۱۰ میلی لیتر از محلول لیزوزیم (۳۰۰ µg/ml) اضافه شد و قبل از مصرف از نظر استریل بودن کنترل گردید. همچنین برای تهیه کشت سلولی، سلول‌های HEP-2 (تهیه شده از انستیتو پاستورایران) در فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی کشت داده شدند و از آنجایی که هدف ازدیاد سلول بود، بعد از تشکیل یک لایه سلولی، سلول‌ها را تریپسینیزه کرده و به منظور نگهداری در فلاسک‌های مخصوص و برای آزمایش نمایش قدرت تهاجمی، در Leighton tubes به تعداد مشخصی کشت داده شد. نحوه کار بدین صورت بود که ابتدا محیط کشت را خالی کرده و با ۵-۴ میلی لیتر محلول Dulbecco's PBS سلول‌ها را شسته و ۲ میلی لیتر تریپسین به آن اضافه نموده و بعد از ۳-۲ دقیقه که سلول‌ها در مجاورت تریپسین قرار گرفتند، تریپسین را خالی کرده و فلاسک را برای مدت ۱۵ دقیقه در اتو ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده تا سلول‌ها از هم جدا شوند. سپس ۵ میلی لیتر محیط کشت MEM کامل به آن اضافه شد و به کمک یک پوار لاستیکی که به انتهای پی پت پاستور متصل بود سلول‌ها را از جدار فلاسک جدا و در محیط شناور شدند. برای نگهداری سلول‌ها و ازدیاد آنها جهت آزمایشات بعدی مقداری از سوسپانسیون سلولی را در فلاسک‌های دیگر ریخته و به آن ۵ میلی لیتر MEM اضافه نموده و در اتو ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و هر روز سلول‌ها را با میکروسکوپ Inverted مشاهده نموده و بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت سلولی تعویض می‌شود. این سلول‌ها بعد از ۳-۲ روز یک لایه سلولی کامل تشکیل می‌دهند.

برای عفونی نمودن سلول‌های HEp-2، ابتدا

محیط کشت سلول‌های HEp-2 موجود در لوله‌های در پیچ دار Leighton را که قبلاً تهیه شده بود خالی کرده و سلول‌ها را با ۱/۵ میلی‌لیتر Earle's Salt شستشو و پس از چند دقیقه آن را خالی نموده و به آن ۱/۵ میلی‌لیتر محیط مخصوص این مرحله که در واقع همان محیط MEM بدون آنتی بیوتیک حاوی باکتری است اضافه نموده و سپس لوله‌ها را بطور افقی به مدت ۳ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در طول ۳ ساعت باکتری‌های مهاجم با استفاده از قدرت تهاجمی خود وارد سلول‌ها می‌شوند و پس از ۳ ساعت، محیط کشت سلولی را که در اثر رشد باکتری‌ها زردرنگ شده بود دور ریخته و سلول‌ها چندین بار با Earle's salt به آرامی شستشو شدند.

برای مرحله رشد داخل سلولی باکتری‌ها، پس از شستشوی سلول‌های HEp-2 با Earle's salt، یکبار دیگر سلول‌ها را با ۱/۵ میلی لیتر محیط مخصوص مرحله دوم یعنی محیط رشد داخل سلولی شسته و ۱/۵ میلی لیتر از محیط فوق را به سلول‌های HEp-2 اضافه نموده و لوله‌ها را بطور افقی به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شوند. در طول این مدت باکتری‌های مهاجم که در مرحله اول وارد سلول‌های HEp-2 شده‌اند بطور داخل سلولی شروع به تکثیر نموده و فضای سلولی را پر می‌نمایند. بهتر است هر ساعت تغییر رنگ محیط کشت را که نشانه رشد باکتری‌های خارج سلولی است کنترل نمود. درصورت تغییر رنگ محیط، دوباره سلول‌ها را ۳ بار و هر بار بوسیله ۱/۵ میلی لیتر Earle's salt شستشو داده و سپس به سلول‌ها ۱/۵ میلی‌لیتر محیط رشد داخل سلولی اضافه شد. پس از ۴ ساعت، محیط کشت سلولی را دور ریخته و سلول‌ها را ۳ بار با Dulbecco's PBS به آرامی شسته و بدین ترتیب لامل های حاوی سلول‌های HEp-2 آماده رنگ آمیزی شدند. برای رنگ آمیزی سلول‌های HEp-2 نیز پس از شستشوی سلول‌های HEp-2 با PBS، به سلول‌های مذکور ۱ میلی لیتر متانول اضافه نموده و بعد از مدت ۵ دقیقه، آهسته لوله Leighton حاوی لامل را تکان داده به طوری که لامل از جای خود جدا گردد و در متانول شناور شود و به آرامی لامل را به سمت دهانه لوله هدایت نموده و بوسیله یک پنس کوچک لامل در ظرف مخصوص رنگ آمیزی قرار داده و روی لامل به مقدار کافی رنگ گیمسا با نسبت ۲ به ۱۰ رقیق شده اضافه شد. بعد از مدت ۲۰ دقیقه، بوسیله آب مقطر رنگ گیمسا را شسته و پس از ۲۰-۱۰ ثانیه بوسیله پنس، لامل را به ترتیب و سریع در محلول‌های استن – گزیلل (۳۳/۶۷) و گزیلل خالص فرو برده و لامل ها روی یک لام حاوی چند قطره Entellan مونته می‌شوند. بهتر است بوسیله یک سواب، Entellan اضافه را پاک نموده و بعد از چند ساعت لام‌ها را در زیر میکروسکوپ بررسی نمود. در پایان موارد مثبت بر اساس مشاهدات نفوذ باکتری به درون سلول، به صورت + ۳۰-۱۰، ++ ۷۰-۳۰ و +++ ۱۰۰-۷۰ یادداشت شدند.

یافته ها:

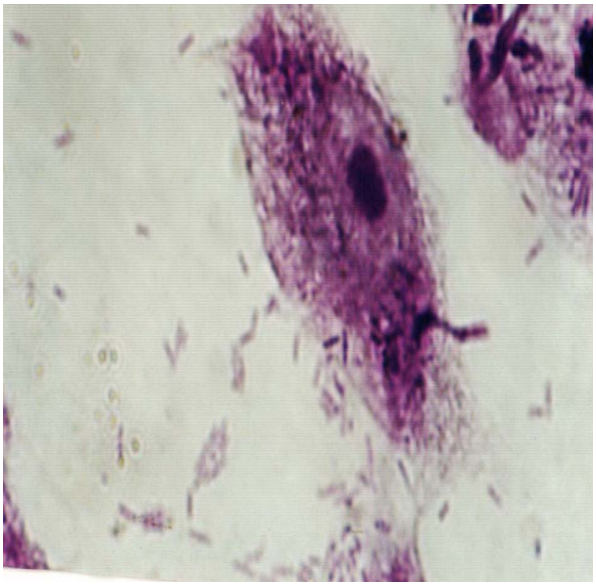
بررسی ۴۲۰ نمونه، شامل بیماران مبتلا به اسهال آبکی (۱۴۰ نمونه)، اسهال خونی (۱۴۰ نمونه) و افراد سالم به عنوان شاهد (۱۴۰ نمونه) نشان داد که ۳۶ بیمار (۸/۶٪) در اثر شیگلا مبتلا به اسهال بودند؛ که از این تعداد ۲۰ مورد (۴/۸٪) اسهال خونی و ۱۶ مورد (۳/۸٪) اسهال آبکی داشتند. در هیچ یک از افراد سالم که به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند شیگلایی جدا نگردید. نتایج بدست آمده نشان داد که فراوانی ایزوله های شیگلا مهاجم به سلول HEp-2 در جنس مذکر (۴۲/۹٪) ۶ و در جنس مونث (۵۷/۱٪)۸ مورد بوده است. از نظر سنی بالاترین میزان تهاجم شیگلا به سلول HEp-2 در رده سنی ۱ الی ۱۰ سال با ۶ مورد (۴۲/۹٪) و در مراحل بعد صفر الی ۱ سال و ۱۰ سال به بالا به ترتیب با ۵ مورد (۳۵/۷٪) و ۳ مورد (۲۱/۴٪) قرار داشته است.

از میان ۳۶ ایزوله شیگلا، ۹ سوش و از میان ۲۰ سوش کلکسیون، ۵ سوش خاصیت تهاجمی به سلول های HEp-2 را داشتند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی سوش‌های مهاجم شیگلا بر حسب ایزوله و کلکسیون

گونه های شیگلا	ایزوله	کلکسیون
شیگلا دیسانتری (*S. dysenteriae*)	۲ (۲)	۰
شیگلا سونئی (*S. sonnei*)	۹ (۳)	۲ (۱)
شیگلا بویدی (*S. boydii*)	۹ (۲)	۱ (۰)
شیگلا فلکسنری (*S. flexneri*)	۱٦ (۲)	۱۷ (٤)

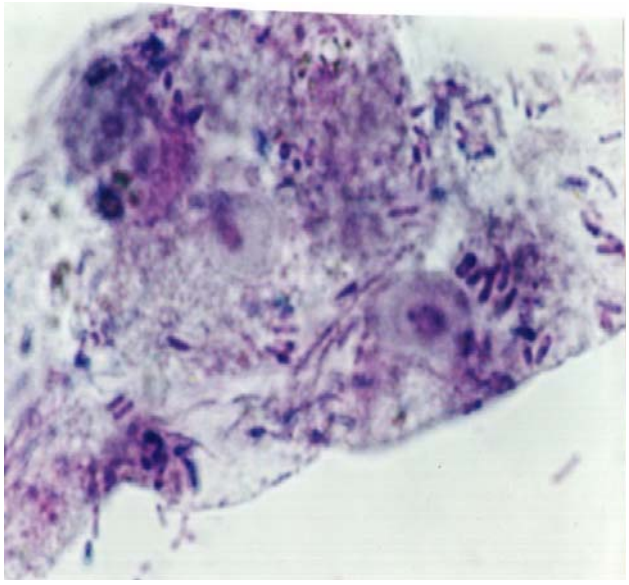
اعداد داخل پرانتز نشان دهنده موارد مثبت با خاصیت تهاجمی می باشند.



تصویر شماره ۱: مراحل تهاجم شیگلا به سلول های HEp-2 پس از انکوباسیون ۱ ساعته

ورود شیگلا به داخل سلول قابل مشاهده می باشد.

در مورد سوش‌های شیگلا باید گفت که زمان انکوباسیون ۱ ساعته برای ورود این ارگانیسم‌ها به داخل سلول مناسب می‌باشند(تصویر شماره ۱). تجربیات ما نشان داد که شیگلا قدرت رپلیکاسیون داخل سلولی خوبی دارد و قادر به تخریب لاین سلولی در انتهای ۳ ساعت زمان انکوباسیون می باشد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: مراحل تهاجم شیگلا به سلول های HEp-2 پس از انکوباسیون کامل ۳ ساعته

تخریب لاین سلولی توسط شیگلا قابل مشاهده می باشد.

امروزه توجه و اهمیت به اسهال و باکتری‌های پاتوژن عامل آن در حال گسترش می‌باشد و در این میان بررسی روش‌های تشخیص خصوصیت تهاجمی در باکتری‌ها در بسیاری از نقاط دنیا در حال مطالعه و تحقیق می‌باشد. شیگلا غشای واکوئل‌های فاگوسیتیکی که آن را به دام انداخته است را به سرعت لیز می‌کند؛ بنابراین این باکتری در سیتوپلاسم سلول آزاد می‌شود. از طرفی این باکتری توانایی پلیمریزه کردن اکتین را نیز دارد؛ لذا براحتی می تواند از سلولی به سلول دیگر منتقل شود (۲۵). تاکنون مکانیسم مولکولی این واکنش‌ها به خوبی مشخص نشده است با این حال در برخی مطالعات بر روی برخی از گونه های شیگلا تحقیقات گسترده ای صورت گرفته است به عنوان مثال، متوجه شده اند که شیگلا فلکسنری قادر است تولید مقدار زیادی از اینترفرون را در فیبروبلاست سلول‌های موجود در لاین سلولی مورد تهاجم باکتری‌ها، تحریک کند (۲۶)؛ همچنین این گونه بخوبی می‌تواند به سلول‌های HT-29 حمله کند و در آن تکثیر یابد (۲۷). در یک

بررسی در دانشگاه میشیگان نیز سلول های Henle 407 و HeLa به عنوان میزبان های شیگلا دیسانتری مقایسه گردیدند و نشان داده شد که کارآیی اتصال و تهاجم بدون سانتریفیوژ، در سلول های Henle 407 بیشتر از سلول های Hela بوده است (۲۸).اگرچه قدرت تهاجم شیگلا دیسانتری و شیگلا فلکسنری بطور معمول با سلول های هلا مورد ارزیابی قرار می گیرد، اما ثابت شده است که سلول های Henle 407 جهت ارزیابی اتصال و تهاجم در این دو سویه مفیدتر می باشند. همچنین تحقیقات نشان داده اند که قدرت اتصال و تهاجم گونه های شیگلا با غلظت های پایین ایمنوگلوبولین A مهار می گردد (۳۱-۲۹). بر اساس نتایج این مطالعه، شیگلا از هر دو گروه قادر به نفوذ به داخل سلول ها بود و مطلبی که در طول کار مورد توجه واقع شد این بود که اکثر سوش‌های شیگلا در مرحله دوم انکوباسیون یعنی مرحله تکثیر داخل سلولی از خود قدرت تخریب لایز سلولی نشان دادند. این مطلب از آنجا نتیجه شد که سلول‌های HEp- 2،ابتدا تنها در یک مرحله انکوباسیون یعنی مرحله ورود به سلول، مورد تهاجم میکروارگانیسم قرار داده شدند و تهاجم شیگلا به سلول‌ها را در پایان ۳ ساعت متوقف و با رنگ‌آمیزی و مونته کردن آن تصویر شماره ۱ تهیه شد. سپس همین سوش یکبار دیگر در معرض سلول HEp-2 قرار گرفت، ولی این بار اجازه یافت تا مرحله دوم انکوباسیون نیز کامل شود و با انجام بقیه مراحل، تصویر شماره ۲ تهیه گردید. مقایسه این دو تصویر، خاصیت تخریب تک لایه ای سوش‌های شیگلا را بخوبی نشان می‌دهد.

نتایج ما همچنین نشان داد که سلول HEp-2 همانند سایر سلول های دیگر مانند Hela و Hmle، قابلیت تهاجمی شیگلا را بخوبی نشان می دهد و بیان می دارد که زمان انکوباسیون ۷ ساعته، برای تخریب کامل لایه های سلولی توسط سویه های شیگلا کفایت می کند. اختلاف قدرت عفونت زایی شیگلا در لایز سلولی HEp-2 می تواند ناشی از ژن های کد شونده آن ها باشد. شیگلا فلکسنری جزء میکروارگانیسم هایی است که قادر به ورود به سلول های غیرفاگوسیتی هستند. سلول های HEp-2 نیز جزء این دسته از سلول ها بوده و ما نیز در این تحقیق از این سلول ها به جای سلول های Hela استفاده نمودیم تا شرایط مطلوب جهت مشاهده خاصیت تهاجمی این باکتری را بررسی نماییم. اهمیت این بررسی در واقع ارایه یک الگوی بهینه شده و کامل برای مطالعات بعدی در زمینه خصوصیات تهاجمی این باکتری می باشد و پروتکل نهایی که در این مطالعه به آن رسیده و بهترین نتیجه را در مشاهده تهاجم این باکتری گرفته ایم در واقع حاکی از تفاوت های مولکولی بین سویه ای در تهاجم می باشد و نشان از این مطلب دارد که این تفاوت های فنوتایپی منشا ژنوتایپی دارند که مطالعات بیشتر در آینده، در این زمینه را می طلبد.

مطالعات قبلی نشان داده اند که برای بیان اپتیمال فنوتیپ تهاجمی بر روی سلول های HEp-2، نیاز است تا ایزوله های شیگلا فلکسنری، قبلاً در ۳۷ درجه رشد کرده باشند، که این مطلب می تواند بیانگر نحوه انتقال این باکتری نیز باشد. در سایر مطالعات نیز خاصیت تهاجمی شیگلا فلکسنری بر روی سلول های HEp-2 مورد بررسی قرار گرفته است، تا جایی که این باکتری در برخی بررسی ها به عنوان کنترل مثبت برای بررسی خاصیت تهاجمی بر روی سلول های مذکور به کار گرفته شده است (۳۳،۳۲).

تمامی این مشاهدات از نظر شناخت نحوه تهاجم این باکتری و آسیب رسانی به سلول ها اهمیت داشته و چه بسا راهگشایی جهت ارایه یکسری دستورالعمل ها برای اقدامات درمانی و یا پیشگیری (از طریق شناخت دقیق راه انتقال) باشد.

نتیجه گیری:

نتایج بدست آمده نشان داد که با وجود پر هزینه و وقت گیر بودن تکنیک کشت سلول، این روش از روش‌های قابل اطمینان در شناسایی خاصیت تهاجم پاتوژن‌های روده‌ای می باشد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۱۸۲۱ مورخ ۸۹/۱۱/۲۴ می باشد که بدینوسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه جهت تقبل هزینه های طرح، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع:

1. World Health Organization. Global burden of disease (GBD) [internet]. 2002 [cited 2004]. available from: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/.

2. Kuo HW, Kasper S, Jelovcan S, Hoger G, Lederer I, Konig C, et al. A food-borne outbreak of Shigella sonnei gastroenteritis, Austria, 2008. Wien Klin Wochenschr. 2009; 121(3-4): 157-63.

3. von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, et al. A multicentre study of Shigella diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations and microbiology. PLoS Med. 2006 Sep; 3(9): e353.

4. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis. 1989 Jun; 159(6): 1126-8.

5. Cristea D, Ceciu S, Chitoiu DT, Bleotu C, Lazar V, Chifiriuc MC. Comparative study of pathogenicity tests for *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. Roum Arch Microbiol Immunol. 2009 Jan-Mar; 68(1): 44-9.

6. Pazhani GP, Ramamurthy T, Mitra U, Bhattacharya SK, Niyogi SK. Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella spp.* isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhoea in Kolkata (Calcutta), India. Epidemiol Infect. 2005; 133(6): 1089-95.

7. Khan AI, Huq S, Malek MA, Hossain Ml, Talukder KA, Faruque AS, et al. Analysis of fecal leukocytes and erythrocytes in *Shigella* infections in urban Bangladesh. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006 Jul; 37(4): 747-4.

8. Ménard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. Trends Microbiol. 1996 Jun; 4(6): 220-6.

9. Khan A, Huq S, Hossain M, Talukder K, Malek M, Faruque A. Presumptive shigellosis: clinical and laboratory characteristics of Bangladeshi patients. Scand J Infect Dis. 2005; 37(2): 96-100.

10. Soltan Dallal MM. Bacterial diarrheal infections and mechanisms of their pathogenicity. Nabz. 1995; 5(4): 48-52.

11. Janda JM, Abbott SL. New gram-negative enteropathogens: fact or fancy? Rev. Med. Microbiol. 2006; 17: 27-37.

12. Gunnar N, Schroeder, Hubert Hilbi. Molecular pathogenesis of *Shigella spp.*: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008 Jan; 21(1): 134-56.

13. Douce GR, Amin II, Stephen J. Invasion of HEp-2 cells by strains of *Salmonella typhimurium* of different virulence in relation to gastroenteritis. J Med Microbiol. 1991 Dec; 35(6): 349-57.

14. Stacey G. Current developments in cell culture technology. Adv Exp Med Biol. 2012; 745: 1-13.

15. Xu D, Saeed A, Wang Y, Seidel V, Sandström G, Yu J. Natural products modulate Shigella–host-cell interaction. J Med Microbiol. 2011; 60(11): 1626-32.

16. Penheiter KL, Mathur N, Giles D, Fahlen T, Jones BD. Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. Mol Microbiol. 1997 May; 24(4): 697-709.

17. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. The ISME J. 2007; 1(5): 403-18.

18. Usman AD, Arzai AH, Sulaiman SK. The genetic and molecular basis of bacterial invasion of epithelial cells. A review. Bajopas. 2008; 1(1): 25-8.

19. Levine MM, Noriega F. A review of the current status of enteric vaccines. PNG Med J. 1995 Dec; 38(4): 325-31.

20. Daskaleros PA, Payne SM. Congo red binding phenotype is associated with hemin binding and increased infectivity of *Shigella flexneri* in the HeLa cell model. Infect Immun. 1987 Jun; 55(6): 1393-8.

21. Lawlor KM, Daskaleros PA, Robinson RE, Payne SM. Virulence of iron transport mutants of *Shigella flexneri* and utilization of host iron compounds. Infect Immun. 1987 Mar; 55(3): 594-9.

22. Jawetz E. Medical microbiology. 25th ed. NewYourk: McGraw-Hill Medical; 2011

23. Sen A, Leon MA, Palchaudhuri S. Comparative study of attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Shigella dysenteriae*. Infect Immun. 1990; 58(7): 2401-3.

24. Motiur R, Shrajum M, Shamsun N, Mohammad A, Khorshid A, Munirul A, John A. TnphoA mutants of providencia alcalifaciens with altered invasiveness of HEp-2 cells. J Med Microbiol. 2002 Aug; 51(8): 682-6.

25. Heindl JE, Saran I, Yi CR, Lesser CF, Goldberg MB. Requirement for formin-induced actin polymerization during spread of *Shigella flexneri*. Infect Immun. 2010; 78(1): 193-203.

26. Hess CB, Niesel DW, Holmgren J, Jonson G, Klimpel GR. Interferon production by *Shigella flexneri*-infected fibroblasts depends upon intracellular bacterial metabolism. Infect Immun. 1990; 58(2): 399-405.

27. Seganti L, Conte MP, Longhi C, Marchetti M, Nicaletti M, Orsi-N. Invasiveness of *Shigella flexneri* in poliovirus infected HT-29 cells. Microbiologica. 1994; 17(1): 29-36.

28. Guhathakurta B, Sasmal D, Ghosh AN, Kumar R, Saha P, Biswas D, et al. Adhesion and invasion of a mutant *Shigella flexneri* to an eukaryotic cell line in absence of the 220-kb virulence plasmid. FEMS Microbiol Lett. 1999 Dec; 181(2): 267-75.

29. Turbyfill KR, Joseph SW, Oaks EV. Recognition of three epitopic regions on invasion plasmid antigen C by immune sera of rhesus monkeys infected with *Shigella flexneri* 2a. Infect Immun. 1995 Oct; 63(10): 3927-35.

30. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infect Immun. 1982 Mar; 35(3): 852-60.

31. Willer Eda M, Lima Rde L, Giugliano LG. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. BMC Microbiol. 2004 Apr; 4: 18.

32. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Neogi PK, Faruque AS. Characteristics of invasion of H Ep-2 cells by *Providencia alcalifa* ciens. J Med Microbiol. 1995 Mar; 42(3): 186-90.

33. Watarai M, Kamata Y, Kozaki S, Sasakawa C. Rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells. J Exp Med. 1997 Jan; 185(2): 281-92.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Feb, March; 15(6): 100-108. ***Original article***

Investigation the *Shigella* serotypes invasive cells isolated from patients with diarrhea in HEp-2 cell culture

Soltandallal MM (PhD)[1,2*], Rahimi-Forushani A (PhD)[3], Aminharati F (MSc)[2], Ohadian-Moghadam S (MSc)[2], Nikmanesh B (MSc)[4], Rastegar-Lari A (PhD)[5]

[1]Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; [2]Microbiology Dept., Pathobiology Dept., Tehran University of Medical Sciences. Tehran, I.R. Iran; [3]Epidemiology and Biostatics Dept., Tehran University of Medical Sciences Tehran, I.R. Iran; [4]Children's Medical Center Laboratory, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; [5]Microbiologt Dept., Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

Received: 5/June/2012 Revised: 13/Jul/2013 Accepted: 28/Nov/2013

Background and aims: Diarrhea is one of the most prevalent cause of children`s death in developing countries. Gastrointestinal diseases are the cause of much death among the children under the age of 5 every year. In this study the invasiveness character of *Shigella* strains was investigated by HEp-2cell cell culture technique.

Methods: In this descriptive study, 280 rectal swabs (140 with dysentery and 140 watery diarrhea) from patients suffering from diarrhea before using any antibiotic and 140 from healthy people as control group were collected. These specimens were cultured in Hektoen and XLD agar as selective and differential media, then after 24 hours incubation in 37˚C their morphology were studied and finally the isolates were confirmed with biochemical tests. *Shigella spp* strains consist of 20 collection strains were used for consideration of invasiveness in *Shigella*. Antibiotic typing also performed according to CLSI instructions.

Results: Thirty six strains of Shigella (8.6%) were isolated from thesamples under the study. Most strains isolated from patients, were *Shigella* flexneri isolated with 16. Our study on HEp-2 cell cultures showed that only 14 (9 isolates, 5 collections) had invasive properties of *Shigella* strains.

Conclusion: The results show that firstly all *Shigella* isolates are not capable of invading intestinal epithelial cells; Secondly invasion is not a constant attitude and it would not go away by time.

Keywords: **Cell invasion, Cell culture, Diarrhea, *Shigella*.**

Cite this article as: Soltan-Dallal MM, Rahimi-Forushani A, Aminharati F, Ohadian-Moghadam S, Nikmanesh B, Rastegar-Lari A. Investigation the *Shigella* serotypes invasive cells isolated from patients with diarrhea in HEp-2 cell culture. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Feb, March; 15(6): 100-108.

[*]**Corresponding author:**
Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982188992971, Email: soltanirad34@yahoo.com