فصلنامه علمی-ترویجی پدافند غیرعامل

سال سوم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، (پیاپی ۹): صص ۱۱-۱۸

باکتری *شیگلا* به‌عنوان سلاح بیولوژیک در بیوتروریسم؛ راهکارهای مقابله با شیگلوزیس

محمد دورودیان[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، حسین هنری[۳]، آرش قهرودی تالی[۴]، هانی کشاورز[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۲۵

چکیده

بیوتروریسم شامل سوء استفاده از عوامل بیولوژیک به‌منظور ایجاد ترس یا کشتن انسان‌ها و نابودی دام‌ها یا گیاهان است. این پدیده امروزه با پیشرفت‌های علوم زیستی دامنه‌ای وسیع‌تر و ابعادی جدیدتر به خود گرفته است که از آن جمله می‌توان به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا سموم آن‌ها اشاره نمود. یکی از عوامل میکروبی بسیار مستعد جهت استفاده در کاربردهای نظامی، باکتری شیگلا است. شیگلوزیس یک بیماری عفونی است که سرایت‌پذیری بالایی داشته و با بی‌حالی، کسالت، اسهال، تب، حالت تهوع، استفراغ، درد شکمی، خون و موکوس یا چرک در مدفوع همراه می‌باشد. چندین فاکتور و ویژگی در این باکتری سبب گردیده تا به‌عنوان یک عامل بیولوژیک مستعد برای اهداف جنگ‌های بیولوژیک مطرح شود. دلایل مهم استفاده از شیگلا در کاربردهای بیوتروریستی عبارت‌اند از: ۱- دوز عفونی کننده خیلی پایین، ۲- وجود راه‌های مختلف انتقال، ۳- مقاومت دارویی روزافزون نسبت به عوامل دارویی، ۴- قدرت انتشار بالا و ایجاد عفونت‌های ثانویه در یک جمعیت و ۵- مرگ و میر نسبتاً بالا در مقایسه با باکتری‌های هم‌خانواده. یکی از بهترین راه‌های مقابله با باکتری شیگلا تولید واکسن‌های حفاظتی بر علیه آن است که با توجه به مشکلات تهیه واکسن‌های کار آمد، انتخاب بهترین عامل برای تحریک مناسب و ماندگار سیستم ایمنی حائز اهمیت است. امروزه با پیشرفت و توسعه فناوری‌های مهندسی ژنتیک، نگرش‌های جدیدی برای ساخت واکسن‌های زنده با قدرت بیماری‌زایی پایین و یا بدون قدرت بیماری‌زایی بر اساس حذف ژن‌های مؤثر در ایجاد بیماری در باکتری هدف شکل گرفته که به نظر می‌رسد به‌عنوان ابزاری در مقابله با شیگلوزیس می‌تواند راهگشا باشد. در این مطالعه علاوه بر بررسی اجمالی بیوتروریسم از زوایای مختلف، به بررسی راه‌های گوناگون مقابله با شیگلا و انواع واکسن‌های ساخته شده بر علیه آن پرداخته می‌شود.

کلیدواژه‌ها: بیوتروریسم، باکتری شیگلا، واکسن‌های زنده، شیگلوزیس

۱- دانش‌آموخته زیست‌شناسی سلولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز mohamad_doroudian@yahoo.com - نویسنده مسئول
۲- استاد و عضو هیئت علمی دانشکده و پژوهشکده علوم پایه - دانشگاه جامع امام حسین(ع)
۳- استادیار و عضو هیئت علمی دانشکده و پژوهشکده علوم پایه- دانشگاه جامع امام حسین(ع)
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی- دانشکده و پژوهشکده علوم پایه- دانشگاه جامع امام حسین(ع)

۱- مقدمه

هر عامل میکروبی یا توکسین بیولوژیک که توانایی ایجاد بیماری را داشته باشد، عامل بالقوه‌ای جهت استفاده به‌عنوان سلاح بیوتروریستی به‌شمار می‌آید. در این میان باکتری شیگلا که در گروه B (دوم) عوامل بیوتروریسم طبقه‌بندی می‌گردد، عامل بیماری شیگلوزیس می‌باشد که با علائم اسهال آبکی یا خونی، درد شکمی، تب، بی‌حالی و کسالت مشخص می‌گردد. این بیماری نسبت به سایر اشکال عفونت‌های سیستم گوارشی از شدت بالاتری برخوردار است. اگرچه امروزه روش‌های گوناگونی جهت درمان این عفونت مورد استفاده قرار می‌گیرد، با این حال، وجود راهکاری مؤثر و مطمئن جهت واکسیناسیون در مقابل شیگلوزیس وجود ندارد. یکی از مؤثرترین روش‌ها جهت مقابله با عامل شیگلا، استفاده از باکتری‌های زنده مهندسی ژنتیک شده با کاهش حدت بیماری‌زایی است که با حذف ژن‌های اصلی و مؤثر باکتری در بیماری‌زایی صورت می‌پذیرد. برتری این روش، عرضه مناسب آنتی‌ژن‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی و افزایش پاسخ ایمنی ماندگار در موجود زنده است. در همین راستا روش‌های متنوعی از ۱۹۸۰ تا به امروز پیشنهاد و مورد استفاده قرار گرفته‌اند که اکثر آن‌ها بر اساس نوترکیبی[1] قطعات با همولوژی بالا طراحی شده‌اند [۱و۲].

۲- بیوتروریسم[2]

۲-۱- تعریف بیوتروریسم

به‌طور کلی واژه بیوتروریسم شامل سوء استفاده از عوامل بیولوژیک (اعم از باکتری، ویروس، قارچ و انگل) و یا سموم حاصله از آن‌ها به‌منظور ایجاد ترس و وحشت، کشتن و یا ناتوان کردن طرف درگیر در جنگ و نابودی دام‌ها یا گیاهان می‌باشد [۳].

۲-۲- تاریخچه بیوتروریسم

سابقه استفاده از سلاح بیولوژیک به بیش از سیصد سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد که رومی‌ها چاه‌های اطراف شهر را توسط لاشه‌های حیوانات مرده آلوده می‌کردند تا سربازان دشمن از آن‌ها نوشیده، بیمار و یا تلف شوند.

ژاپن و شوروی سابق، در جنگ جهانی دوم در ابعاد وسیعی از سلاح‌های بیولوژیک استفاده کردند. با آزمایش‌های بیولوژیک نظامی سال‌های ۱۹۴۳-۱۹۴۲ توسط دولت انگلستان در جزایری به‌نام گرویلند، تا مدت ۴۵ سال سکونت در این بخش امکان‌پذیر نبود [۴].

۲-۳- طبقه‌بندی سلاح‌های بیولوژیک

در طبقه‌بندی‌های کلاسیک، عوامل بیولوژیک بر اساس شدت بیماری حاصله، میزان سرایت و سایر ویژگی‌ها به سه گروه عمده طبقه‌بندی می‌گردند [۲].

- **عوامل بیماری‌زای گروه A:**
  - واریولا ماژور (عامل آبله)
  - باسیلوس آنتراسیس (عامل سیاه زخم)
  - یرسینیا پستیس (عامل طاعون)
  - کلستریدیوم بوتولینوم (عامل بوتولیسم)
  - فرانسیسلا تولارنسیس (عامل تولارمی)
  - فیلوویروس‌ها:
    - * تب هموراژیک ابولا
    - * تب هموراژیک ماربورگ
  - آرنا ویروس‌ها:
    - * لاسا (تب لاسا)
    - * جونین (تب هموراژیک آرژانتینی)
- **عوامل بیماری‌زای گروه B:**
  - کوکسیلا بورنتی (تب Q)
  - گونه‌های بروسلا (بروسلوز)
  - بورخولدریا مالئی (گلاندرز)
  - - ویروس‌های آلفا:
    - * آنسفالیت ونزوئلایی
    - * آنسفالیت اسبی شرقی و غربی
  - کلستریدیوم پرفرنجنس
  - آنتروتوکسین B استافیلوکوک
  - گونه‌های سالمونلا
  - شیگلا
  - اشریشیا کولی O۱۵۷H:۷
  - ویبریو کلرا
  - کریپتوسپوریدیوم پاروم
- **عوامل بیماری‌زای گروه C:**
  - ویروس نیپا
  - ویروس‌های هانتا
  - ویروس‌های عامل تب‌های هموراژیک
  - ویروس‌های مولد آنسفالیت
  - ویروس عامل تب زرد
  - مایکوباکتریوم توبرکولوزیس [۲].

۳- شیگلوزیس

باکتری شیگلا برای اولین بار توسط یک باکتریولوژیست ژاپنی به‌نام کیوشی شیگا[3] جدا شد و آن را باسیل دیسانتری نامید. شیگلوزیس

1- Recombination
2- Bioterrorism
3- Kiyoshi Shiga

باعث مرگ ۱/۵ میلیون نفر از بیش از ۱۶۴ میلیون موردی است که هر ساله به این عامل آلوده می‌گردند. عمده موارد ابتلا، در کودکان کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد [۵].

۳-۱- زیرواحدهای شیگلا

اعضای گروه *شیگلا*، ویژگی‌های مشترکی با جنس *اشریشیا*[1] دارند و ارتباطات ژنتیکی به روشنی نشان می‌دهد که آن‌ها یک زیرگونه[2] از *E. coli* هستند. این جنس به چهار گونه تقسیم می‌شود: *شیگلا دیسانتری*[3]، *شیگلا فلکسنری*[4]، *شیگلا سونه‌ای*[5]، *شیگلا بویدی*[6] که هر کدام بر اساس آنتی‌ژن O به زیرگروه‌های کوچک‌تر تقسیم می‌شوند. از روش‌های رایج شناسایی زیر گونه‌های جنس شیگلا و تفکیک آن‌ها از یکدیگر بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها می‌باشد. به‌علاوه، روش‌های تشخیصی با آنتی‌سرم‌های تک ظرفیتی، یکی دیگر از روش‌های مطمئن در شناسایی و تفکیک‌گونه و زیرگونه در جنس شیگلا محسوب می‌شود (جدول ۱) [۶].

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی گونه‌های مختلف شیگلا

Species	Glucose	Lactose	Monitol	Xylose	Sucrose	Ornitinedecarboxylase
S. dysenteriae	+	–	–	–	–	–
S. flexneri	+	–	+	–	+	–
S. sonnei	+	delayed	+	–	+	+
S. boydii	+	–	+	+	–	–

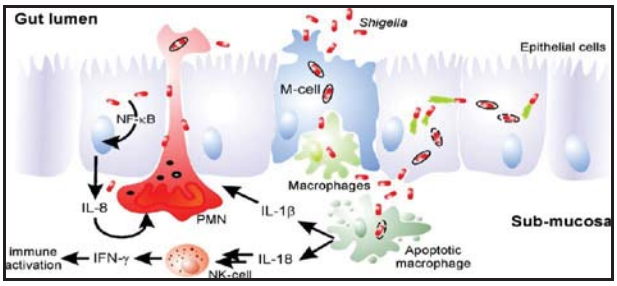
۳-۲- اپیدمیولوژی شیگلا

شیگلا دیسانتری به‌عنوان علت اصلی اپیدمی اسهال سال اخیر گزارش شده است و نسبت مرگ و میر آن در کشورهای جهان متفاوت می‌باشد. با این وجود، عامل شایع‌ترین نوع اسهال شیگلوزیس، گونه *فلکسنری* می‌باشد. در طی سی سال گذشته، *شیگلا دیسانتری* به‌صورت پاندمیک درکشورهای آمریکای مرکزی، بنگلادش، آسیای جنوبی و مرکزی و آفریقای جنوبی گزارش شده است. به‌طور کلی ۹۹ درصد مرگ و میر یعنی معادل با ۱/۱ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد [۷].

1- Escherichia
2- Subtype
3- Shigella dysenteriae
4- Shigella flexneri
5- Shigella sonnei
6- Shigella boydii

۴- مکانیسم بیماری‌زایی شیگلا

گونه‌های مختلف *شیگلا* از طریق مجاری دهانی- روده‌ای و از مسیر بلع غذا یا آب آلوده وارد بدن انسان شده و باعث ایجاد بیماری می‌شود. این باکتری به شدت عفونی می‌باشد، تا آنجا که تعداد ۱۰ تا ۱۰۰عدد از باکتری برای ایجاد شیگلوزیس کافی است [۹]. قطعاً با این دوز عفونت‌زایی پائین، دست‌کم تعداد اندکی از باکتری‌ها می‌توانند از شرایط اسیدی موجود در معده عبور نمایند. پس از بلعیدن و پس از عبور باکتری از مجرای روده، به ناحیه رکتوسیگموئید (پیچش سمت راست و انتهایی روده بزرگ) می‌رسند. در آنجا باکتری به جداره‌های روده‌ای آن ناحیه حمله می‌کند و ایجاد زخم‌های روده‌ای می‌نماید. متعاقب آن، اسهال شدید همراه با خون ایجاد می‌گردد. نتیجه این عفونت ابتدایی، ایجاد ضایعات وسیع‌تر و گسترش زخم در نواحی مجاور ناحیه رکتوسیگموئید می‌باشد که ناشی از انتشار باکتری، از طریق نواحی بین سلولی به سلول‌های سالم مجاور می‌باشد (شکل ۱) [۸].



شکل ۱- مکانیسم تهاجم باکتری شیگلا

۵- پیشگیری از شیگلوزیس

شیگلا توسط غذا، دست، مدفوع و حشرات از فردی به فرد دیگر انتقال می‌یابد. با توجه به این نکات در نظر گرفتن موارد زیر می‌تواند تا حد زیادی از ابتلا به بیماری جلوگیری کند.

۱ـ کنترل بهداشتی آب، غذا، شیر، فاضلاب و حشرات
۲ـ مجزا کردن بیماران و ضدعفونی کردن مدفوع آن‌ها
۳ـ شناسایی افراد ناقل به‌ویژه افرادی که با مواد غذایی سروکار دارند و درمان آن‌ها [۹].

۶- درمان

جهت درمان شیگلوز معمولاً از داروهای ضد اسهال استفاده نمی‌شود، زیرا ممکن است که فرایند عفونت را طولانی نماید. گزارش‌های محققین حاکی از آن است که تجویز یک دوز واحد به‌صورت خوراکی ۲/۵ گرم تتراسایکلین جهت درمان موارد حاد دیسانتری مناسب می‌باشد. در حال حاضر داروی انتخابی، آمپی‌سیلین می‌باشد که

روزانه به مقدار ۲ گرم در بالغین به مدت ۵ روز بایستی مصرف گردد. این دارو برای کودکان به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن، ۱۰۰ میلی‌گرم می‌باشد. کوتریموکسازول می‌تواند به عنوان جایگزین برای آمپی‌سیلین مطرح گردد. مقاومت *شیگلا* به چند دارو اولین بار در ژاپن نشان داده شده است. آخرین تحقیقات بر روی مقاومت باکتری شیگلا به آنتی‌بیوتیک‌ها در انگلستان نشان داد که ۵۰ درصد از شیگلاها به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت شده‌اند. به همین جهت بهتر است قبل از تجویز دارو آزمون آنتی‌بیوگرام انجام گیرد و از دارویی که باکتری نسبت به آن حساسیت دارد استفاده شود. با این وجود، کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری شیگلا می‌تواند در آینده مانعی جدی جهت ادامه روند درمان‌های آنتی‌بیوتیکی به‌شمار آید [۱۲].

۷- ایمنی‌زایی در مقابل باکتری *شیگلا*

در حال حاضر هیچگونه واکسنی با کارآمدی صدرصد جهت پیشگیری و مقابله با *شیگلا* وجود ندارد. با این وجود، تحقیقات بسیار گسترده‌ای از سال‌ها پیش برای تولید واکسن علیه *شیگلا* صورت گرفته است که ثمراتی نیز دربر داشته و در زیر به آن‌ها اشاره شده است [۱۱].

۷-۱- واکسن زیرواحدی

مطالعات بالینی روشن کرده‌اند که واکسن LPS-پروتئازوم[1] *شیگلا فلکسنری ۲a* قادر خواهد بود پاسخ ایمنی اختصاصی سروتیپ را ایجاد کند. LPS می‌تواند با پروتئازوم، کمپلکس تشکیل دهد و به شکل استنشاقی در انسان مورد استفاده قرار گیرد. واکسن‌های زیرواحدی دیگری نیز طراحی شده‌اند که اثر آن‌ها بر انسان هنوز در حال بررسی می‌باشد. در موش و خوکچه هندی، کمپلکس‌های تخلیص شده IpaB،IpaC، IpaD و LPS که ایمنی موکوسی را تحریک می‌کنند باعث حفاظتی نسبی در مقابل *S. flexneri* شده‌اند [۱۲].

۷-۲- واکسن‌های کشته شده

اخیراً واکسن‌های کشته شده حرارتی[2] *شیگلا فلکسنری* در مدل خرگوشی که به‌طور خوراکی به کار گرفته شده نشان داده که تا صددرصد ایجاد حفاظت می‌کنند، اگرچه بعضی واکسن‌های تهیه شده با این استراتژی بر روی میمون‌ها اثر ناامیدکننده‌ای دربر داشته‌اند [۱۳].

۷- ۳- واکسن زنده غیر مهاجم

محققین بسیاری روی ژن‌های دخیل در حدت‌زایی شیگلا کار کرده‌اند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های تهاجمی *virG*، *virF*، *invA*، *IpaABCD*، *stxAB*، *set* و *sen* و همچنین ژن‌های متابولیکی و ژن‌های مسیرهای تنظیم اسمزی شامل *aroA*، *aroD*، *int*، iuc، *guaAB*، *ompR* و *envZ* اشاره کرد. اهداف متعددی از غیر فعال نمودن این ژن‌ها در باکتری‌ها مدنظر می‌باشد که می‌توان به مواردی همچون، عدم توانایی بقا در فقدان پیش‌سازهای مهم متابولیکی، عدم توانایی در تنظیم اسمزی با شرایط محیطی در بدن میزبان و عدم انتشار در بدن میزبان اشاره کرد [۱۴].

یکی از روش‌های غیر فعال کردن ژن‌های حدت‌زا در باکتری‌های بیماری‌زا ایجاد جهش در این ژن‌ها می‌باشد که از سال‌ها پیش مورد استفاده قرار گرفته است. روش های متعددی جهت غیرفعال نمودن ژن‌ها تا به امروز انجام گرفته است که یکی از ابتدایی‌ترین روش‌هایی که به‌منظور ایجاد جهش در دهه ۱۹۴۰ توسط لویی پاستور[3] ابداع گردید، تکنیک پاساژ متوالی بود. این روش با تولیدمثل انتخابی که در گیاهان صورت می‌گیرد مشابه است و می‌تواند به‌منظور تولید ویروس‌های تخفیف حدت‌یافته (به‌عنوان کاندید واکسنی) و همچنین در افزایش و یا کاهش حدت در سویه‌های ویروسی باکتریایی کاربرد داشته باشند. بسیاری از تکنیک‌های اولیه که به‌منظور ایجاد سویه‌های زنده تخفیف‌حدت‌یافته در *شیگلا* صورت می‌گرفت از طریق پاساژهای متوالی به‌دست آمده است [۱۴].

میترت[4] و همکاران در سال ۱۹۸۴ سویه جهش‌یافته $IstratiT_{۳۲}$ را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در *شیگلا فلکسنری* ۲a ایجاد نمودند. این سویه پس از ۳۲ مرتبه کشت متوالی در محیط نترینت آگار جداسازی و سپس از نظر ایجاد ورم ملتحمه در چشم خوکچه هندی (تست Sereny) وآزمون PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بالینی این سویه واکسنی نشان داد که در دوزهای بالای خوراکی cfu ۲×۱۰^{۱۱} در انسان ایجاد ایمنی و حفاظت می‌کند. این واکسن ابتدا با نام تجاری وازیدن در بخارست تولید و ۸۱٪ محافظت در برابر *شیگلا فلکسنری* ۲a و ۸۹٪ در مقابل گونه‌های هترولوگ *شیگلا* از جمله *شیگلا سونه‌ای* را نشان داد [۱۵].

ونکاتسان[5] و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه‌های $IstratiT_{۳۲}$ را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. در این تحقیق از روش پاساژهای متوالی در محیط trypticase soy agar حاوی استرپتومایسین استفاده شد. انجام روش‌های مولکولی شامل سنجش بیماری‌زایی، ایمونوبلاتینگ، آنالیز DNA پلاسمیدی (با انجام هضم آنزیمی با دو آنزیم *SalI* و *HindIII*) نشان داد که بخشی از پلاسمید تهاجمی سویه $IstratiT_{۳۲}$ دچار حذف گردیده بود. در این مطالعه مشخص گردید مناطق حذف شده شامل لکوس‌های *virG*، *invA* و*IpaABCD* در پلاسمید تهاجمی شیگلا بود [۱۶].

1- Proteosome
2- Heat-Killed
3- Louis Pasteur
4- Meitert
5- Venkatesan

فرمال[1] و همکاران در سال ۱۹۵۶ باکتری جهش یافته *شیگلا فلکسنری* ۲a ۲۴۵۷O را با استفاده از عنصر جابه‌جاپذیر[2] ایجاد نمودند به‌طوری که در ژن *virF* آن تداخل ایجاد شده بود. این ژن (فاکتور رونویسی) مسئول فعال کردن فاکتورهای بیماری‌زا در باکتری شیگلا می‌باشد. نتایج آزمایش‌ها در میمون، حفاظت کامل این سویه واکسنی را نشان داد ولی در۳۴٪ از داوطلبان انسانی به اسهال (دیسانتری) منجر گردید [۱۷].

باکتری جهش‌یافته خود به خودی *شیگلا فلکسنری* ۲a وابسته به استرپتومایسین[3] در سال ۱۹۷۲ توسط دوپونت[4] و همکاران با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در محیط حاوی استرپتومایسین ساخته شد. عدم توانایی رشد در محیط فاقد استرپتومایسین از ویژگی‌های این سویه بود. این سویه در مطالعات بالینی در داوطلبان، بازگشت به حالت اولیه را از خود نشان داد به‌طوری که ۱۵-۳۵٪ از دریافت‌کنندگان دارای علائم اسهال و استفراغ بودند [۱۸]. تکنیک‌های به‌کارگرفته‌شده که در بالا به آن‌ها اشاره شد دارای معایبی از جمله عدم اختصاصیت، برگشت‌پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارا بودند و با پیشرفت‌هایی که در زمینه توالی‌یابی در سال‌های بعد ظهور پیدا کرد با تکنیک‌های پیشرفته‌تر مانند استفاده از پلاسمیدهای از خود بین‌برنده (خودکشان) جایگزین گردید.

سانسونتی[5] و همکاران در سال ۱۹۹۰ دو سویه موتان SC۵۶۰ و SC۴۳۳ را با استفاده از کاست omega و با تکیه بر رخداد تبادل آللی تولید کردند. این کاست حامل دو ژن مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین به همراه سیگنال پایان در هر طرف خود بود. این سویه‌ها به ترتیب فاقد ژن *icsA* (*virG*) و ژن *ompB* (شامل *envZ*، *ompR*) بودند. مطالعات بالینی، حفاظت ۱۰۰٪ پس از دریافت سه دوز از این سویه را در میمون نشان داد. علاوه بر دو سویه فوق، سویه SC۴۴۵ که از سویه SC ۴۳۳ (*ΔompR*، *ΔenvZ*) مشتق شده بود نیز ایجاد گردید که هر دو، جهش سویه‌های پیش از خود را داشت. در ایجاد این سویه (SC۴۴۵) از کاست *icsA::TnphoA* (ترانسپوزون آلکالین فسفاتاز) و فاژ P۱ استفاده شد، اما به دلیل تخفیف حدت شدید آن، قادر به ایجاد حفاظت پایدار در میزبان نبود [۱۹].

یوشیکاوا[6] و همکاران در سال ۱۹۹۵ با ایجاد دو جهش در ژن‌های *virG* و *thyA* توانستند سویه تخفیف‌حدت‌یافته *شیگلا فلکسنری* ۲a را به عنوان واکسن خوراکی تخفیف‌حدت‌یافته معرفی کنند. برای ایجاد سویه جهش‌یافته از انتقال ترانسپوزون استفاده شد. در این روش ابتدا ژن *virG* از طریق وارد شدن Tn۱۰ غیر فعال گردید و سپس به کمک آنزیم *San*I مورد تأیید قرار گرفت. به‌منظور ایجاد جهش ثانوی در ژن *thyA* از کاست *thyA::Tn*۱۰ از حامل اشریشیا کولی K۱۲ و فاژP۱ استفاده گردید [۲۰].

نوریگا[7] و همکاران در سال ۱۹۹۴ سویه جهش‌یافته CVD۱۲۰۱ (دارای جهش در ژن *aroA*) و CVD۱۲۰۳ (جهش در ژن‌های *aroA* و *virG*) را با استفاده از ناقل‌های خودکشان با تکیه بر پدیده تبادل آللی تولید کردند. در ساخت سویه CVD۱۲۰۱ از پلاسمید خودکشان pFJ۲۰۱ و در تهیه سوش جهش‌یافته CVD۱۲۰۳ از pKTN۷۰۱ استفاده شد. مطالعه‌های این سویه واکسنی (CVD۱۲۰۳) در خوکچه هندی نشان داد که تا ۸۳ ٪ قادر به ایجاد حفاظت می‌باشد. این سویه شامل یک حذف ۲۰۰ جفت بازی در ژن *aro A* و حذف دیگری در ژن *virG (icsA)* بود. طراحی و ساخت CVD۱۲۰۳ بر پایه اطلاعات حاصل از سویه‌های ۱۲۴SFL (حذف ژن *aroD* از سویه والدی *شیگلا فلکسنری* Y) و SFL۱۰۷ (حذف ژن *aroD* از سویه والدی *شیگلا فلکسنری* ۲a) قبلی بود. از آنجایی که CVD۱۲۰۳ در دوزهای ایمونوژن واکنش‌های التهابی زیادی ایجاد کرد، تغییر در دیگر مسیرهای بیوسنتزی آن مورد توجه قرار گرفت [۲۱].

کوتلوف[8] و همکاران در سال ۲۰۰۰ سویه جهش‌یافته CVD۱۲۰۷ را با ایجاد جهش در ژن‌های *virG*، *sen*، *set* و *guaBA* ساختند. در این مطالعه به‌منظور ایجاد جهش در ژن‌های فوق از تکنیک ارائه شده توسط نوریگا و همکاران استفاده شد. این کاندید دارای ۸۵ ٪ حذف در زیرواحد A پروتئین Sen و همچنین از فیوژن دو قطعه ۷۰۰ جفت بازی از ژن *Sen* حاصل شد. نتایج بالینی این سویه نشان داد که دریافت یک دوز خوراکی(1×10^8 cfu) از واکسن هیچ علائم بالینی را در داوطلبان ایجاد نمی‌کند. ولی از نظر ایمنی‌زایی نشان داده شد که دریافت یک دوز به تنهایی نمی‌تواند ایمنی کافی را ایجاد کند. آن‌ها در سال ۲۰۰۴ سویه کاندید واکسنی CVD۱۲۰۸ در سویه *شیگلا فلکسنری* ۲a (سویه ۲۴۵۷T) را بر پایه به‌کارگیری پلاسمیدهای خودکشان ساختند. در ساخت این سویه از سویه CVD۱۲۰۴ استفاده گردید. در این تحقیق از پلاسمیدهای خودکشان pFM۸۰۴B (دارای مبدأ حساس به حرارت و مارکر *SacB*) و pKTN۷۰۱ (دارای منشأ همانندسازی K۶R) استفاده شد. نتایج فاز یک بالینی که در سال ۲۰۰۷ توسط کوتلوف و همکاران انجام گرفت نشان داد که با دریافت یک دوز خوراکی (1×10^8 cfu) قادر به ایجاد حفاظت در انسان می‌باشد [۲۲].

کاستر[9] و همکاران در سال ۱۹۹۹ ژن‌های *virG* و *iuc* باکتری *شیگلا*

1- Formal
2- Transposon Element
3- S.flexneri streptomycin dependent strains
4- DuPont
5- Sansonetti
6- Yoshikawa
7- Noriega
8- Kotloff
9- Coster

فلکسنری ۲a را به کمک فاژ P۱ و کاست آنتی‌بیوتیکی کانامایسین–سوکروز (Kmr-*sacB*) غیر فعال کردند. این سویه با حذف ۳/۶ Kb از ژن *virG* شامل ژن *virG* و ناحیه مجاور و نیز ناحیه ۴Kb از لکوس کروموزومی *iuc* به‌دست آمد و SC۶۰۲ نامیده شد. مطالعات بالینی سویه واکسنی در داوطلبان آمریکای شمالی در سال ۲۰۰۴ انجام شد و مشخص نمود که حذف *virG* به تنهایی برای کاهش تخفیف حدت در این باکتری کافی به نظر نمی‌رسد و نیاز به کاهش تخفیف حدت بیشتری می‌باشد [۲۳].

۸- بحث و نتیجه‌گیری

عامل *شیگلا* به‌عنوان یکی از عوامل مورد استفاده در بیوتروریسم شناخته شده است. شیگلوزیس با علائمی مانند اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از خون و مخاط، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی تشخیص داده می‌شود. عفونت *شیگلایی* به‌طور تقریبی هر ساله ۱۶۴/۷ میلیون انسان را آلوده می‌کند که از این تعداد ۱۶۳/۲ میلیون مورد در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند. بر اساس آمار ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی[1]، ۷۰ درصد از مبتلایان را کودکان بین یک تا پنج سال تشکیل می‌دهند [۲۱].

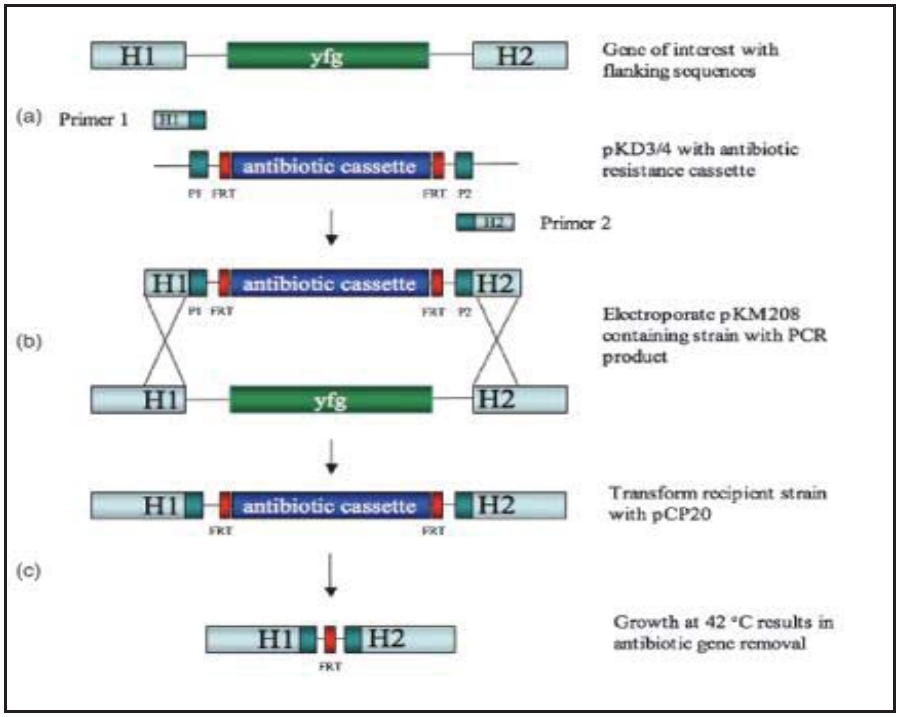
فراوانی بالای *شیگلا* در کشورهای در حال توسعه به‌طور کلی به فقدان آب بهداشتی سالم، ضعف در رعایت اصول بهداشتی، سوء تغذیه و وجود مشکلاتی در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی نسبت داده می‌شود. انتقال به‌طور عمومی از طریق مسیر دهانی - مدفوعی صورت می‌گیرد که به واسطه بهداشت ضعیف و ارتباط نزدیک اشخاص تقویت می‌گردد. آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای درمان شیگلوزیس به کار گرفته می‌شوند، باعث کاهش دوره دفع باکتری از بیمار می‌گردند. با این وجود، مقاومت آنتی بیوتیکی در *شیگلا* به‌طور چشمگیری در حال افزایش است. این افزایش روز افزون در مقاومت، به‌دلیل استفاده عمومی از آنتی‌بیوتیک‌های ارزان‌قیمتی است که سویه‌های مقاوم را نسبت به خدمات بهداشتی محدود در کشورهای در حال توسعه افزایش داده است. در نتیجه، سازمان سلامت بهداشت جهانی، توسعه واکسن‌های ایمن و کارا در مقابل *شیگلا* را در اولویت برنامه خود قرار داده است [۲۲]. مهندسی ژنتیک معکوس، روش قدرتمندی برای شناسایی کارکرد ژن‌ها و ایجاد جهش در آن‌ها می‌باشد؛ به شرطی که با ایجاد جهش و یا غیرفعال‌سازی ژن مورد نظر، تاثیرهای آن بر روی میکروارگانیسم قابل ارزیابی و سنجش باشد. در تحقیقاتی که در آن ایجاد جهش با تکیه بر روش‌های تبادل آللی انجام پذیرفته از وکتورهای خودکشان بهره گرفته شده است، اگر چه این روش در بسیاری از باکتری‌ها کارایی دارد اما بسیار پیچیده می‌باشد. عدم تکثیر حامل خودکشان در برخی از سویه‌ها، فرکانس پایین نوترکیبی در حالت کراسینگ‌اور دوگانه[2] و جداسازی سویه‌های جهش‌یافته مورد نظر که سهم بسیار کمی از سویه‌های تاریخت شده را تشکیل می‌دهند از مشکلات این روش‌ها می‌باشند. اما به‌منظور حل کردن مشکل فوق، در برخی از تحقیقات از نشانگرهای شمارشگر انتخاب شونده[3] استفاده شده است. معایب استفاده از این روش‌ها را می‌توان در استفاده از پلاسمیدهای متعدد جهت ساخت همسانه مورد نیاز، استفاده از پلاسمیدهای متعدد، هزینه بالا و زمان زیاد، انتخاب قطعه با طول بالا با ناحیه هدف و نیز احتمال از بین نرفتن پلاسمید خودکشان در میزبان مورد نظر برشمرد. جهت رفع این نواقص، روش نوترکیبی می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. در این روش بر خلاف راهکارهای قبلی، نیازی به مراحل متعدد دست‌ورزی به‌منظور ایجاد ناقل خودکشان نیست؛ هم‌چنین از نظر زمان و هزینه کاملاً مقرون به‌صرفه‌تر از روش‌های پیشین می‌باشد. در این روش با استفاده از حامل‌های دارای ژن‌های نوترکیبی فاژی تحت پروموتوری القاپذیر، ازدیاد کاست آنتی‌بیوتیکی و طراحی آغازگرهای اختصاصی با طول کوتاه (۳۵ تا ۷۰ نوکلئوتید) ایجاد جهش امکان‌پذیر خواهد بود. پلاسمیدها به عمل نوترکیبی یا جابه جایی ژن تغییریافته با ژن اصلی کمک کرده و در نهایت باعث حذف و ایجاد جهش در ژن اصلی می‌گردند. طراحی آغازگرهای مختلف به‌منظور کاست آنتی‌بیوتیکی و هم به‌منظور اطمینان از جابه جایی ژن جهش‌یافته و ژن اصلی انجام می‌گیرد، آغاز گرها به نحوی طراحی می‌گردند که کاست آنتی‌بیوتیکی دارای دو طرف مشابه با ژن مورد نظر جهت انجام جهش باشد. همچنین این روش در مقایسه با سایر تکنیک‌ها کم‌هزینه‌تر، ساده‌تر، سریع‌تر و قدرتمندتر می‌باشد. سادگی این روش به جهت عدم استفاده از پلاسمیدهای متعدد و همچنین تواتر بالای انجام عمل نوترکیبی در باکتری‌ها می‌باشد. سرعت بالای این روش به‌دلیل عدم استفاده از حاملین و عدم نیاز با انجام دست‌ورزی گسترده در شرایط *in vitro* می‌باشد. از مشکلات این روش، نیازمندی به طراحی آغازگرهای متعدد و هم‌چنین سختی انتقال DNA خطی به داخل باکتری می‌باشد (شکل ۲) [۲۲].

تاکنون تلاش‌های بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و مؤثر بر علیه عامل بیماری اسهال خونی در جهان صورت گرفته است. با این وجود، هیچ‌کدام از آن‌ها به دلایلی مانند ایمن نبودن در کودکان، عدم تحریک نامناسب ایمنی مخاطی، پیچیده بودن روند تولید واکسن و گران بودن، مجوز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده‌اند و گاهی مصرف آن‌ها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. در نتیجه، تحقیقات برای تولید این واکسن همچنان ادامه دارد و با توجه به اطلاعات به‌دست آمده، امروزه محققین عقیده دارند که بیشترین امید را می‌بایست معطوف به واکسن‌های زنده و زیرواحدی داشت.

1- WHO

2- Double crossing over

3- Counterselectable



شکل ۲- نمایی شماتیک از حذف ژنی با استفاده از روش نوترکیبی

مراجع

1. Chien-Shun Chiou, Wen-Bin Hsu, Hsiao-Lun Wei and Jiann-Hwa Chen, Molecular Epidemiology of a Shigella flexneri Outbreak in a Mountainous Township in Taiwan, Republic of China, p 1048–1056Vol. 39, No. 3, (**2001**).
2. Malabi M venkatesan et al. "construction, Characterization، and animal Testing of WRSd1, a Shigella Dysenteriae 1 Vaccine" Infectious and Immunity, 2950-2958, (**2002**).
3. Goldberg Wei, BurlandM.B., Venkatesan V., Deng M.M., Fournier W., Mayhew G., G., Plunkett III G., Darling D,Mau A.,Perna B.; Complete genomic sequence and comparative genomics of Shigella flexneri 2a strain 2457T. Infect. ; Immun, 71, 2775–2786, (**2003**).
4. .Robertson AG, .Robertson LJ. From asps to allegations: biological warfare in history. .Mil. Med. ; 160(8):369-73, (**1995**).
5. Abuhammour, M. D. and Glenn, M. F. Shigella infection. J. Medicin, Vol 3, No2, (**2002**).
6. Key B, Clemens J, Kotloff. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhoea and dysenteric mortal. Tex. Book. pp 146-151, (**1999**).
7. Johnson J, Alverez C, Sanz J, Ramiro R. Late detection of a shigellosis outbreak in a school in Madrid. Eurosurveillance. 10: 268-70. (**2005**).
8. Chen R., Smith M.R., Thirumalai K., Zychlinsky A.; A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE.; EMBO J, 15, 3853–3860, (**1996**).
9. Dinarello C.A.; Interleukin-1b, Interleukin-18 and the Interleukin- 1b converting enzyme.; Ann. N.Y. Acad, Sci. 856, 1– 11, (**1998**).
10. Yunus M., Mizanur Rahman A.S., Farooque A.S., Glass R.I., Clinical trial of ampicillin v. trimethoprim-sulphamethoxazole in the treatment of Shigella dysentery. J.Trop.Med.Hyg. p 195-9, (**1982**).
11. .Fries LF, .Montemarano AD,Mallett CP, .Taylor DN, .Hale TL, .Lowell GH.; Safety and immunogenicity of a proteosome-Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. .Infect Immun,Jul,69(7):4545-53, (**2001**).
12. David F., KerenI., Hugh H., Collins G., Peter S., Samuel B.; Role of Antigen Form in Development of Mucosal Immunoglobulin A Response to Shigella flexneri Antigens; Infection and immunity, Mar, p. 1193-1202, (**1981**).
13. Jennison AV, Verma NK. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Micro Rev. 28:43-58, (**2004**).
14. Amy V. J., Naresh K.;Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development FEMS.; Microbiology Reviews, 28 43–58, (**2004**).
15. Meitert S, Hale TL. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-1STRATI Shigella flexneri 2a vaccine strain. Vaccine. 9:358-363, (**1991**).
16. Venkatesan M, Baron LS and Buysse JM. Spontaneous insertion of an IS1-like element into the virFgene is responsible for avirulence in opaque colonial variants of Shigella flexneri 2a. Infect. Immun. 60: 175–182, (**1992**).
17. Formal N, Girard M.P., Steele D., Chaignat C.L., Kieny M.P., A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine.24:2732–2750, (**2006**).

18. .DuPont HL, .Levine MM, .Hornick RB, .Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. .J Infect Dis.; 159(6):1126-8, (**1989**).
19. Sansonetti PJ, Tobe T, Nagai N, Okada B, Adler M, Yoshikawa and Sasakawa C. Temperature-regulated expression of invasion genes in Shigella flexneri is controlled through the transcriptional activation of the virB gene on the large plasmid. Mol. Microbiol. 5:887-893. (**1991**).
20. Yoshikawa C, Brinkmann, V.,U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303: 1532–1535, (**2004**).
21. Noriega FR, et al. 1996. Engineered DguaB-A DvirG Shigella flexneri 2a Strain CVD 1205: Construction, Safety, Immunogenicity, and Potential Efficacy as a Mucosal Vaccine. INFECTION AND IMMUNITY. 64:3055-3061, (**1996**).
22. Kotloff KL, Winickoff JP. Ivanoff B, Clemens JD. Swerdlow D L. Sansonetti PJ. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, Bull. W. H. O.; 77: 651-666, (**1999**).
23. Coster TS, et al. Vaccination against Shigellosis with Attenuated Shigella flexneri 2a Strain SC602. INFECTION AND IMMUNITY. 67: 3437–3443, (**1999**).

Shigella Bacteria as a Biological Weapon in Bioterrorism Strategies for Countering Shigellosis

M. Doroudian[1]

M. Saadati[2]

H. Honari[3]

A. Ghahroudi Tali[4]

H. Keshavarz[4]

Abstract

Bioterrorism includes the abuse of biological agents to terrorize or kill people and destroy livestocks or plants. Nowadays with the improvement in biological science, bioterrorism has broader range and modern dimensions such as the use of pathogenic microorganisms and their toxins. One of the most potent microbial agents that has military applications is the bacteria called shigella. Shigellosis is an infectious disease that is highly contagious and is accompanied by lethargy, malaise, diarrhea, fever, nausea, vomiting, stomach ache, blood and mucus and pus in excrement. Several factors and properties in shigella have caused it to be considered as a potent bacteria used for biological warfare. The major reasons to use shigella in bioterrorism applications include : 1- The lower infectious dose, 2- Presence of multiple infectious ways, 3- Increasing drug resistance therapeutic agents, 4- High spreading power and causing secondary infections in population, and 5- Higher mortality rate in comparison with other bacteria in its family.

One of the best ways to counter shigella is to produce protective vaccine against it, in regard to the problems in the production of efficient vaccines, choosing the best agent for the appropriate and viable stimulation of the immune system is of utmost importance. Nowadays with the advancement and developments of genetic engineering technologies, new concepts for producing live vaccines with less or no pathogenesis based on the deletion of effective genes in development of disease in target bacteria have been introduced that seem to be as a promising tool to counter shigellosis. In this study, in addition to a quick analysis of bioterrorism from different angles, various ways and the different kinds of vaccine made against shigella have been scrutinized to counter it.

Key Words: *Bioterrorism, Shigella, Live vaccines, Shigellosis*

1- Graduate of Cellular Biology from Islamic Azad University, Central Tehran Branch - Writer in Charge (Email: mohamad_doroudian@yahoo.com)
2- Professor and Academic Member of Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University (Pbh), Tehran
3- Assistant Professor and Academic Member of Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University (Pbh), Tehran
4- Graduate of Cellular Biology from Imam Hossein University (Pbh), Tehran