

بررسی ملکولی ژنهای حدت *stx1, stx2* در باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های اسهال و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

یوسف رمضانی^{۱*}، مهدی پرویز^۲، سعید خلیج زاده^۳

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

^۲ مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

^۳ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

پست الکترونیک: uosef.ramezani.ac@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: پاتوتایپهای مختلف اشریشیاکلی، از جمله *Enterohemorrhagic Escherichia EHEC coli* عامل ایجاد بیماریهای روده ای و خارج روده ای می باشند. اشریشیاکلی شیگا توکسین (*STEC*)، به همراه سویه های *EHEC* به عنوان شایع ترین عامل ایجاد کننده اسهال در کشورهای توسعه یافته شناخته می شوند. هدف از این مطالعه، بررسی ژنهای حدت در باکتری اشریشیاکلی به روش *Multiplex-PCR* جدا شده از نمونه های اسهال و تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی این نمونه ها می باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، پس از جمع آوری ۱۰۰ نمونه اسهال انسانی از مراکز درمانی سرپایی شهر تهران، آزمایش های کشت میکروبی و بیوشیمیایی انجام و ۵۵ سویه باکتری اشریشیاکلی جداسازی و همزمان *DNA* جدایه ها استخراج گردید. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و *E-test* بر اساس دستورالعمل *CLSI* با آنتی بیوتیک هایی از گروه های مختلف انجام شد. داده های آماری با *SPSS19* و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: اکثر اشریشیاکلی جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های اریترومايسين (۱۰۰٪) و آمپی سیلین (۹۴٪) مقاوم و نسبت به نیتروفوران توئین (۹۶٪) و آمیکاسین (۱۰۰٪) حساس بودند. در آزمون *E-Test* بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين (۱۰۰٪) و بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و آمیکاسین (۱۰۰٪) مشاهده شد. بر طبق نتایج آزمون ملکولی از مجموع ۵۵ نمونه انسانی، ۱۲ نمونه (۲۱/۸٪) واجد ژن *Stx2* و ۴ نمونه (۷/۲٪) حاوی ژن *Stx1* هستند.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده در این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات نشان داد که سن افراد، نوع نمونه، محل جغرافیایی، نوع رژیم غذایی، وضعیت بهداشت فردی، فصول سال، در روش های شناسایی و جداسازی باکتری نقش دارند.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، *STEC* ژن های حدت

وصول: ۹۴/۴/۲۹

اصلاح: ۹۴/۶/۲۸

پذیرش: ۹۴/۸/۲۶

مقدمه

اشریشیاکلی شایعترین باکتری جدا شده در آزمایشگاههای میکروب شناسی بالینی از نمونه‌های مدفوع و دستگاه ادراری است که عامل اصلی عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای می‌باشد [۲،۱]. عفونت‌های اسهالی یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در کودکان می‌باشد هر ساله تقریباً دو میلیون نفر در اثر اسهال جان خود را از دست می‌دهند. اکثریت موارد اسهالی حاد در کودکان ساکن در کشورهای در حال توسعه مشاهده می‌شود [۴]. سویه‌های اشریشیاکلی مولد سم شیکا (STEC) به عنوان عامل مهم بیماری جدی گوارشی انسان بوده که ممکن است منجر به ایجاد سندرم اورمی‌همولیتیک (HUS) گردد. به نظر می‌رسد شیوع عفونت‌های ناشی از پاتوتیپ‌های STEC (Shiga Toxin Escherichia coli) اشریشیاکلی با منشاء غذایی رو به افزایش بوده و هنگامی که مواد غذایی که به صورت فله تولید و توزیع شده‌اند، می‌تواند شمار زیادی از افراد را مبتلا نماید. سم ST توسط ژن sta رمزدهی شده و نوعی از آنزیم گوانیلات سیکلاز می‌باشد که به دو نوع Sta و Stb دسته بندی شده که هر دو از لحاظ ساختاری و عملکردی با هم تفاوت دارند. سم Sta در بیماریزایی انسان و سم Stb در ایجاد بیماری در حیوانات اهمیت دارد. Sta آنزیم گوانیلات سیکلاز یاخته میزبان را فعال نموده و منجر به ترشح یونها به فضای داخلی روده می‌شود، در حالیکه Stb باعث آزاد شدن سروتونین و پروستاگلاندین E2 از یاخته میزبان و افزایش مقادیر یونهای کلسیم در سیتوپلاسم شده که در نهایت منجر به ترشح یونها به فضای داخلی روده و ایجاد اسهال می‌گردد [۱]. بسیاری از بیماران آلوده با STEC ابتدا از اسهال آبکی رنج برده، اما در برخی ظرف یک تا دو روز منجر به بروز اسهال خونی و کولیت هموراژیک می‌گردد. بیماری اسهالی وابسته به STEC که منجر به موارد خطرناک می‌شود که بستگی به عملکرد بین باکتری و میزبان داشته و آب، غذای گوشتی، انواع فرآورده‌های دامی، آب میوه و ماست به عنوان مخزن این باکتری می‌باشند. نشخوارکنندگان به ویژه گاو و گوسفند نیز از مخازن طبیعی EHEC می‌باشند. به نظر می‌رسد که حضور سویه‌های EHEC در سالهای اخیر در ایران افزایش

داشته و نباید به سادگی به فراموشی سپرده شود [۴،۳]. اسهال در ایران در مناطق مختلف دارای شیوع متفاوتی بوده که در سال ۱/۶ میلیون گزارش می‌شود که این رقم در سال ۲۰۰۳ به ۷۱۰۰۰ نفر کاهش یافت [۲۴]. شناسایی انواع مختلف DEC شامل واکنش‌های بیوشیمیایی، سروتایپینگ، سنجش‌های فتوتیپی براساس خصوصیات ویبرولانس و روشهای تشخیص مولکولی می‌باشد. از این میان، تشخیص ژنهای بیماری‌زایی اختصاصی با PCR غالباً مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این روش نتایج سریع و مطمئن با حساسیت بالا می‌دهد [۲۱]. موارد عفونت بدون علامت با اشریشیاکلی O157:H7 در موارد اپیدمی‌ها، غالباً قابل تشخیص است [۶،۵]. یکی از مسائل مهم در درمان بیماریهای عفونی، مقاومت باکتریهای پاتوژن نسبت به آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. مقاومت دارویی مفهوم پیچیده‌ای است که در آن چندین فاکتور از جمله نوع میکروارگانیسم عفونت‌زا، محل باکتری در داخل بدن، توزیع میکروارگانیسم در بدن، غلظت دارو در محل عفونت و وضعیت ایمنی بیمار دخالت داشته و بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند [۸]. هدف از این مطالعه بررسی و تعیین ژنهای حدت باکتری اشریشیاکلی به روش MultiPlex-PCR در نمونه‌های اسهالی انسانی جمع‌آوری شده از مراکز درمانی سرپایی در شهر تهران و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی این نمونه‌ها بوده است.

روش کار

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪، و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۰۰ نمونه اسهالی از بیماران با علائم بالینی و با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی، که از فروردین تا شهریور ۱۳۹۳ به مراکز درمانی سرپایی شهر تهران مراجعه نموده بودند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شد. برای تأیید وجود اشریشیاکلی و جداسازی باکتری، نمونه‌ها بر روی محیط‌های انتخابی و افتراقی مانند مک‌کانکی آگار، EMB، ECC (E.coli Chrome Agar) کشت داده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون جهت شناسایی حضور باکتری E.coli، آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی شامل: تستهای IMViC، Triple Sugar Iron Agar (TSI) جهت تشخیص نهایی

انجام شد و در نهایت ۵۵ ایزوله اشریشیاکلی پاتوژن شناسایی و تایید گردید [۱۵]. جهت انجام آزمون آنتی-بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل (Clinical CLSI and Laboratory Standards institute) استفاده گردید [۱۱]. تعدادی از کلونی باکتری را بوسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید [۱۱]. جهت انجام این مطالعه دیسک های آنتی-بیوتیک سفپیم (۳۰ میکروگرم)، نیتروفرانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم) از شرکت Himedia Laboratories Pvt.Limited- HIMEDIA (INDIA) تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها

این تحقیق بر روی ۵۵ ایزوله جداسازی شده از بیماران دارای اسهال با علائم بالینی انجام گرفت. میزان حساسیت سویه های مختلف به آنتی بیوتیک های مورد استفاده در جدول ۲ ذکر شده است. مطابق جدول بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين و آمپی سیلین به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها (دارای بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی) به آنتی بیوتیک آمیکاسین ۱۰۰ درصد و نیتروفرانتوئین ۹۶ درصد گزارش شد. همچنین در بین ۵۵ سویه جداسازی شده سویه ای که به تمامی داروها مقاوم و یا سویه ای که به کل داروهای مورد استفاده حساس باشند، در این تحقیق یافت نگردید. طبق یافته های این تحقیق که در نمودار ۱ مشخص شده است بیشترین میزان مقاومت چندگانه دارویی در برابر آنتی بیوتیک های مورد استفاده نسبت به ۵ آنتی بیوتیک به طور همزمان در ۶۰ درصد نمونه ها شناسایی گردید. نتایج حاصل از بررسی کمترین غلظت ممانعت از رشد MIC با روش E-Test بر روی نمونه ها در

انجام شد و در نهایت ۵۵ ایزوله اشریشیاکلی پاتوژن شناسایی و تایید گردید [۱۵]. جهت انجام آزمون آنتی-بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل (Clinical CLSI and Laboratory Standards institute) استفاده گردید [۱۱]. تعدادی از کلونی باکتری را بوسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید [۱۱]. جهت انجام این مطالعه دیسک های آنتی-بیوتیک سفپیم (۳۰ میکروگرم)، نیتروفرانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم) از شرکت Himedia Laboratories Pvt.Limited- HIMEDIA (INDIA) تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جهت انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC (Minimum inhibitory concentration) روش E.test (Epsilonometer test) استفاده گردید. آزمایش E.test با نوارهای آنتی بیوتیکی (strips) آنتی-بیوتیک های آمیکاسین، آمپی سیلین، اریترومايسين، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدکسیک اسید تهیه شده از شرکت HIMEDIA (INDIA-Pvt.Limited) در این مطالعه از نوارهای E.test با رقت های مختلف بر حسب میکروگرم استفاده شد.

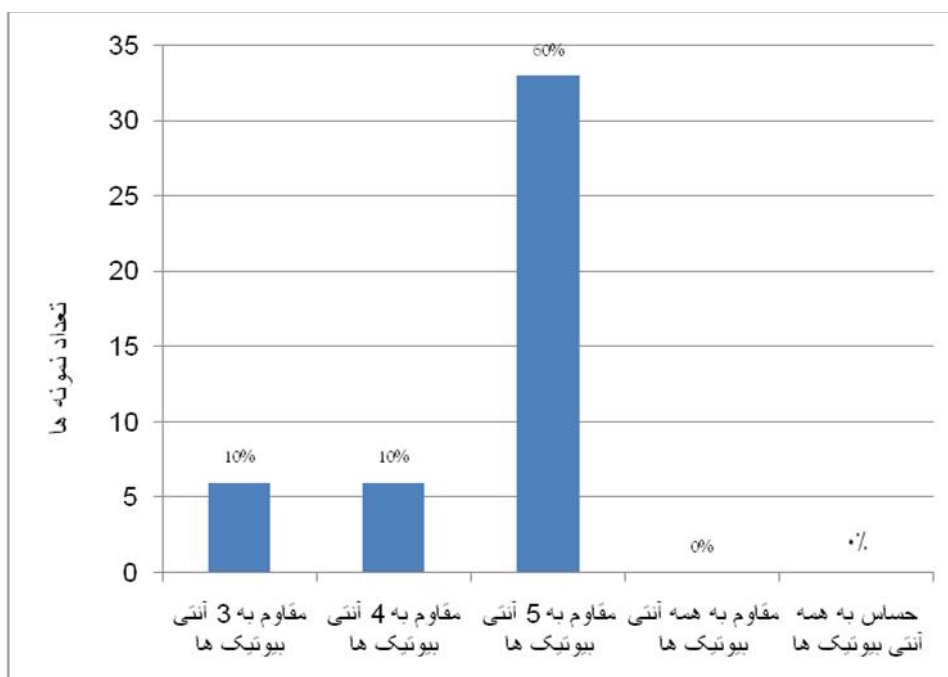
استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت تجاری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (MBK0041) انجام گردید. برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون Multiplex-PCR

پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	ژن هدف	طول محصول (bp)
SLT1-F	TGTAAGCTGGAAAGGTGGAGTATACA	Stx ₁	۲۱۰
SLT1-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	Stx ₁	۲۱۰
SLT11-F	GTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	Stx ₂	۴۸۴
SLT11-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	Stx ₂	۴۸۴

جدول ۲: میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن

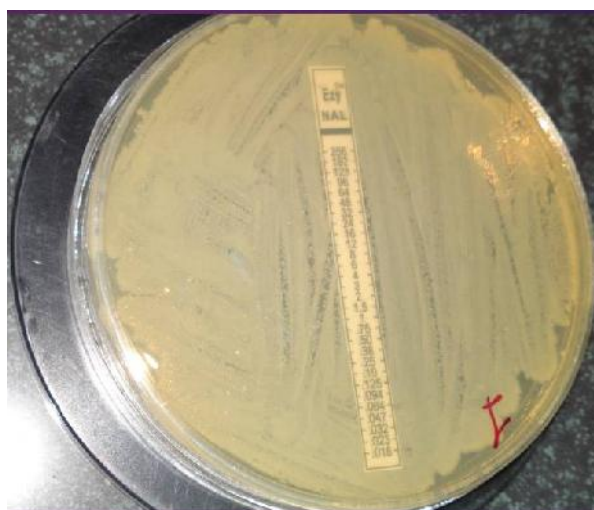
نوع آنتی بیوتیک	میزان حساسیت (%) Sensitive	حساسیت متوسط (%) Intermediate	میزان مقاومت (%) Resistance
نیتروفوران‌توئین	۹۶	-	۴
اریترومایسین	-	-	۱۰۰
آمیکاسین	۱۰۰	-	-
سفپیم	۲۳	۷	۷۰
نالیدکسیک اسید	۲۵	-	۷۵
آمپی سیلین	۳	۳	۹۴
سیپروفلوکساسین	۶۰	-	۴۰
سفترایکسون	۴۲	-	۵۸
سفکسیم	۴۳/۳۴	۳/۳۳	۵۳/۳۳
جنتامایسین	۶۷	۱۶	۱۷



نمودار ۱: نتایج مقاومت چند گانه در بین سویه‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری
اشریشیاکلی با روش E-Test بر حسب درصد

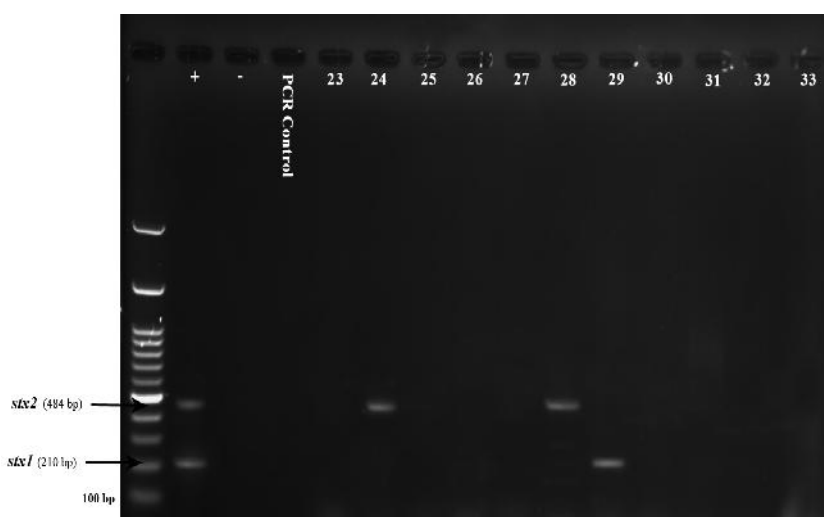
نوع آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
سیپروفلوکساسین	۹۰	۱۰
نالیدکسیک اسید	۲۱	۷۹
جنتامایسین	۱۰۰	-
آمیکاسین	۱۰۰	-
آمپی سیلین	۴۰	۶۰
اریترومایسین	-	۱۰۰



شکل ۱: نتیجه آزمون تعیین MIC به روش E-Test نواری با آنتی بیوتیک نالیدکسیک اسید

جدول ۴: فراوانی ژنهای مورد مطالعه

ژن هدف	تعداد ژن	درصد
<i>Stx₁</i>	۴	۷/۲
<i>Stx₂</i>	۱۲	٪۲۱/۸



شکل ۲: نتایج Multiplex PCR به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۵۰ bp، کنترل مثبت، نمونه‌های شماره ۲۹ واجد ژن *Stx₁* ۲۱۰ bp، نمونه‌های شماره ۲۴، ۲۸ واجد ژن *Stx₂* ۴۸۴ bp

جدول ۳ ذکر گردیده است. در این آزمون، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين (۱۰۰ درصد) و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین به میزان ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آمیکاسین به میزان ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر نمونه (۱۰۰ درصد) مشاهده شد (شکل ۱). نتایج آزمون ملکولی مطابق جدول ۴ نشان داد که بیشترین میزان فراوانی ژنهای حدت در اشریشیاکلی جداسازی شده از نمونه‌های اسهال مربوط به ژن Stx2 با ۲۱/۸ درصد بوده است. در ۳ نمونه نیز هیچ یک از ژنها مورد بررسی شناسایی نگردید. در یک نمونه ژنهای Stx₁ و Stx₂ به طور همزمان ردیابی گردید. با توجه به میزان کم شیوع ژنهای حدت ارتباط معناداری با میزان حساسیت آنتی-بیوتیکی نمونه‌ها داشته است که در بروز عوامل بیماریزا تاثیر گذاشته است (P value < ۰/۰۵). با نتیجه آزمون Multiplex-PCR با ژنهای مورد نظر در شکل ۲ قابل مشاهده است.

بحث

طبق یافته‌های این تحقیق بیشترین میزان مقاومت چنگانه به طور همزمان در ۶۰ درصد نمونه‌ها شناسایی گردید. بروز مقاومت‌های چنگانه دارویی در بین سویه‌های ایجاد کننده بیماریهای عفونی خطرناک، می‌تواند در ایجاد سویه‌های مقاوم و انتقال در بین باکتریهای بیماریزا در جمعیت‌های انسانی موثر باشد. همچنین بررسی ژنهای حدت نشان داد که وجود عوامل حدت در باکتری و بروز علائم بالینی با میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده می‌تواند ارتباط داشته باشد. بیماریهای ایجاد شده توسط باکتری اشریشیاکلی شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورا، سندرم اورمی همولتیک و در موارد شدید مرگ و میر ارتباط نزدیک با عوامل حدت این باکتری و میزان شیوع آنها دارد. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ۲ صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی بیوتیک ها بوده در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و سویه های حساس

به مقاوم ناشی می‌شود [۴]. دیاس‌نتو^۱ و همکاران در مطالعه ای بر روی ۱۸۸ نمونه ادرار در برزیل، اشریشیاکلی را از ۲۶ درصد موارد جدا و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۲۷ درصد) گزارش نمودند [۱۲]. تامبرکار^۲ و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۶۸ نمونه ادراری در هند در سال ۲۰۰۶، اشریشیاکلی را از ۵۹ درصد موارد جدا کردند و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۸۷ درصد) و کوتریماکسازول (۹۱ درصد) و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفرانتوئین (۲۹ درصد) گزارش کردند [۱۳]. در مطالعه تانخیواله^۳ و همکاران بر روی اشریشیاکلی در ۲۰۰۴، بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول (۸۲ درصد) و آمپی سیلین (۷۹/۹ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفرانتوئین (۳۸ درصد) و سفتی‌زوکسیم (۴۱/۳ درصد) گزارش شد [۱۴]. اخیراً طی مطالعه‌ای سلیمانی-فرد و همکاران در سال ۱۳۹۳ با بررسی بر روی نمونه‌های اشریشیاکلی ادراری، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومايسين (۱۰۰ درصد) و آمپی سیلین (۹۳/۳ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به نیتروفرانتوئین (۳ درصد) گزارش شد [۲۳]. در تحقیق حاضر بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين و آمپی سیلین به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد و بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک آمیکاسین ۱۰۰ درصد و نیتروفرانتوئین ۹۶ درصد گزارش شد. در بین سویه‌های جداسازی شده سویه‌ای که به تمامی داروها مقاوم و یا حساس باشند، در این تحقیق یافت نگردید. مقایسه نتایج تحقیقات حاضر با سایرین نشان می‌دهد که مقاومت به اریترومايسين و آمپی سیلین در اکثر این مطالعات یکسان بوده و تفاوت در میزان شیوع آن می‌باشد. دلیل این امر ناشی از بروز مقاومت همه‌گیر نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر به دلیل مصرف بیش از حد این داروها و بروز ژنهای مقاومت و انتقال به سایر سویه‌ها می‌باشد. بودری و همکاران بیشترین درصد مقاومت را به آمپی سیلین، و بیشترین

1 - DiasNeto

2- Tamberkar

3 -Tankhiwale

حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدکسیک اسید، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین گزارش نمودند [۷]. در صورتی که در مطالعه ما نالیدکسیک اسید به عنوان مقاوم گزارش شده است، که این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در مناطق جغرافیایی نمونه‌برداری و یا سابقه استفاده از این دارو جهت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشد که منجر به بروز پدیده مقاومت در سویه‌ها شده است. حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در روش دیسک‌گذاری و نوآرهای E-Test تفاوت داشته و بعضاً آنتی‌بیوتیک‌هایی که در روش دیسک‌گذاری مقاوم گزارش شده‌اند مانند آمپی‌سیلین در روش E-Test حساس، ولی در غلظت‌های بالا گزارش شد. برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مانند اریترومایسین و نالیدکسیک اسید در هر دو روش به سویه‌ها مقاوم بوده‌اند، دلیل این امر با میزان غلظت دارویی که در روش E-Test با کاغذ آغشته شده است مرتبط بوده و غلظت‌های مختلفی از دارو با باکتری مواجه شده که دارای قدرت تاثیرگذاری بیشتری نسبت به روش دیسک‌گذاری که تنها در یک رقت است، می‌باشد. در مطالعه سلیمانی فرد بر روی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری به روش E-Test بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین مشاهده شد [۲۳] که با نتیجه مطالعه حاضر علیرغم تفاوت در نوع نمونه مشابهت دارد.

مطالعات مختلفی در زمینه شناسایی پاتوتیپ EHEC در نقاط مختلف دنیا و ایران بعمل آمده است که نشان دهنده اهمیت این عوامل در بیماری‌زایی سویه‌های اشریشیاکلی می‌باشد، بویژه آنکه اکثر جدایه‌های انتروهموراژیک و وروتوکسیژنیک مسئول بیماری‌های مهمی در انسان از جمله سندرم اورمی‌همولیتیک و کولیت خونریزی دهنده می‌باشند و به میزان قابل توجهی در دام‌ها وجود داشته که به عنوان مخزن جهت انتقال به انسان مطرح می‌باشند. اشریشیاکلی مولد Stx را می‌توان در فلور مدفوعی طیف وسیعی از حیوانات شامل گاو، گوسفند، بز و خوک، گربه، سگ، جوجه و مرغان دریایی یافت. به نظر می‌رسد مهمترین گونه حیوانی آلوده کننده انسان، گاو بوده که بعنوان مخزن تقویت STEC عمل کرده و آلودگی را از طریق فرآورده‌های گوشتی و لبنیات آلوده با تماس

مستقیم به انسان انتقال می‌دهند [۱۷، ۹]. خان^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ سویه‌های STEC را با استفاده از روش PCR بررسی کردند، که از مجموع ۶۲ نمونه جمع آوری شده مختلف شامل نمونه‌های (انسان، گاو، گوشت گاو) ۱۹ درصد واجد ژن Stx₂، ۳۶/۵ درصد حاوی ژن Stx₁ و ۴۴/۵ درصد هر دو ژن را داشتند [۱۹]. بلانکو^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۳ به منظور بررسی ژنهای Stx₁ و Stx₂ در نمونه‌های مدفوعی انسان از روش Multiplex PCR استفاده کرده و مشخص گردید که ۵۵ درصد نمونه‌ها واجد ژن Stx₁، ۳ درصد ژن Stx₂، ۴۲ درصد دارای هر دو ژن Stx₁، Stx₂ می‌باشند. فراوانی بالای ژن Stx در این مطالعه قابل توجه است [۲۰]. مویو^۳ و همکاران در تانزانیا در سال ۲۰۰۷، از روش M-PCR به منظور شناسایی پاتوتیپ‌های EAEC، EPEC، ETEC، EIEC و EHEC استفاده کردند. در ۲۲/۹ درصد از کودکان مبتلا به اسهال اشریشیاکلی تشخیص داده شد. ژنهای مربوط به EHEC (Stx1 and Stx2) و EIEC در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد [۲۱]. کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۰ در ایران، طی مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های Stx₁، Stx₂، eaeA و hly انجام داده‌اند عنوان نمودند که ۳ سویه دارای مخلوطی از ژنهای Stx₁ و eaeA و ۱ سویه دارای مخلوطی از ژنهای Stx₁ و Stx₂ و eaeA بود [۲۲]. کاگنی^۴ و همکاران طی بررسی سال ۲۰۰۴ بر روی نمونه گوشت و همبرگر به روش Multiplex PCR، اعلام نمودند ۴۳ نمونه دارای E.coli o157:H7 بوده که ۴۱ نمونه واجد ژن Stx₁ و Stx₂ بودند [۱۷]. ساری‌مهمت-اوغلو^۵ و همکاران سال ۲۰۰۹ در بررسی بر روی گوشت‌های تازه گاو از نظر وجود E.coli O157:H7 در ترکیه گزارش نمودند که ۷۹/۰ درصد نمونه‌ها آلوده به E.coli O157:H7 بوده که در ۲ نمونه ژنهای Stx₁ و Stx₂ در این نمونه‌ها به روش Multiplex PCR شناسایی گردید [۹]. بارکوسی^۶ در تحقیقات خود که طی فصول مختلف

1-Khan

2-Blanco

3-moyo

4-Cagney

5- Sarimehmetoglu

6-Barkocy

از انتقال این ژنها در جمعیت‌های انسانی و حیوانی جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

نگارنده این پایان نامه (شماره کد ۶۲۳۳۰۵۰۷۹۲۲۰۰۵) کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد بویژه جناب آقای دکتر کیومرث امینی که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد. همچنین از زحمات و تلاش‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر علیرضا مختاری تشکر و قدردانی می‌گردد.

سال بر روی نمونه‌های مدفوع انسانی انجام داد مشخص نمود که میزان جداسازی ژنهای Stx1 و Stx2 در فصل تابستان (۵۱ درصد) بوده که نسبت به سایر فصول بیشتر بوده است [۱۰]. مقایسه تحقیق حاضر با سایر تحقیقات صورت گرفته موید این مطلب است که میزان شیوع ژن Stx در بین نمونه‌های اسهالی بالا بوده، و در این میان فراوانی ژن Stx2 که با بروز علائم بالینی اسهال ارتباط مستقیم دارد کاملاً منطقی می‌باشد. در پژوهش اخیر نیز تنها در یک نمونه از ژنهای مورد مطالعه به طور همزمان عوامل حدت Stx1 و Stx2 شناسایی گردید. همچنین کمترین میزان شیوع فراوانی هریک از ژنها با نتایج سایر تحقیقات منطبق بوده و کمترین فراوانی مربوط به ژن Stx1 بوده است. در مجموع نتایج بدست آمده از این تحقیقات در مورد ژنهای حدت در پاتوتیپ EHEC با نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران همخوانی داشته است. تفاوت در میزان فراوانی با سایر محققین می‌تواند به سن افراد، نوع نمونه، محل جغرافیایی، نوع رژیم غذایی، روش‌های شناسایی و جداسازی باکتری، وضعیت بهداشت فردی و حتی فصول سال نیز ارتباط داشته باشد [۹]، هر چند در این تحقیق همکاریهای لازم در جهت نمونه‌برداری بیشتر و افزایش تعداد نمونه‌ها صورت نگرفته است، ولی با تحلیل این نتایج مشخص می‌گردد که عدم رعایت بهداشت و ساده انگاری این قضیه صدمات جبران ناپذیری را به جمعیت‌های انسانی وارد می‌کند.

نتیجه‌گیری

از زمانی که نحوه بیماری‌زایی سویه‌های تولیدکننده توکسین‌های مشابه شیگا و عوامل اتصال دهنده آنها به سلول‌های روده مشخص گردید، از روش‌های متنوعی برای شناسایی آنها استفاده شده، بویژه آنکه محققین در پی ردیابی این ژنها در انواع مختلف دام‌ها و مخصوصاً غذاهای با منشأ دامی می‌باشند. از اینرو با به کارگیری روش‌های جدید که دارای حساسیت بیشتر و صرف زمان کمتر جهت تشخیص می‌باشند، از جمله روش‌های نوین ملکولی، می‌توان به بررسی وجود جدایه‌های بیماری‌زای STEC و EHEC و عوامل حدت آنها در نمونه‌های بالینی اقدام نمود. با روش Multiplex PCR می‌توان در زمان کوتاه و با دقت بیشتر حضور ژنهای بیماری‌زا را شناسایی و با درمان مناسب

References

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Medical microbiology, United States 25th. 2006.
2. Saify M. H, G . Barnes J.R, Glisson . A M, fadly. L.R ,McDonald aDEs. Diseases of poultry, Iowa state press 2003.
3. Besser M, Richard E, Griffin M, Patricia M, Slutsker M, MPH, Laurence, Escherichia coli O157: H7 Gastroenteritis and the Hemolytic uremic syndrome: An Emerging Infectious Disease 1, Annu Rev Med. 1999;50(1):355-67.
4. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM, Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe, J Infect Dis. 1985;152(3):560-5.
5. Ryan CA, Tauxe RV, Hisek GW, Wells JG, Stoesz PA, McFadden HW, “ et al”, Escherichia coli O157: H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings, J Infect Dis. 1986;154(4):631-8.
6. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, Harvey B, Hockin JC, Karmali M, “et al”, A severe outbreak of Escherichia coli O157:H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing home, N Engl J Med. 1987;317(24):1496-500.
7. Bouzari S, Jafari A, Azizi A, Oloomi M, Nataro J. Short report: characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children, J Trop Med hygiene 2001;65(1):13-4 [Persian].
8. Fluit AC, Visser MR, Schmitz F-J, Molecular detection of antimicrobial resistance, Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):836-71.
9. Sarimehmetoglu B, Aksoy MH, Ayaz ND, Ayaz Y, Kuplulu O, Kaplan YZ, Detection of Escherichia coli O157:H7 in ground beef using immune magnetic separation and multiplex PCR, Food Control 2009;20(4):357-61.
10. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, “et al”, Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli, including O157: H7 and non-O157 serotypes and Salmonella in commercial beef processing plants, J Food Protect 2003;66(11):1978-86.
11. Cockerill FR, Clinical, Institute LS, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: approved standard, National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2012.
12. Dias Neto JA, Silva LDMd, Martins ACP, Tiraboschi RB, Domingos ALA, Suaid HJ, “et al”, Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection, Acta Cirurgica Brasileira 2003;18:36-8.
13. Tambekar D, Dhanorkar D, Gulhane S, Khandelwal V, Dudhane M, Antibacterial susceptibility of some urinary tract pathogens to commonly used antibiotics, Afr J Biotechnol 2006;5(17).
14. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U, Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates, Indian J Med Res. 2004;120(6):553-6.
15. Smith DR, Moxley RA, Peterson RE, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Bretschneider G, “et al”, A two dose regimen of a vaccine against type III secreted proteins reduced Escherichia coli O157: H7 colonization of the terminal rectum in beef cattle in commercial feedlots, Food born pathogen Dis. 2009;6(2):155-61.
16. Gannon V, D'souza S, Graham T, King R, Rahn K, Read S, Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic Escherichia coli strains, J Clin Microbiol, 1997;35(3):656-62.
17. Cagney C, Crowley, H., Duffy, G., Sheridan J. J., O'Brien S., Carney, E., “et al”, Prevalence and numbers of Escherichia coli O157:H7 in ground beef and beef burgers from butcher shop and supermarkets in the Republic of Ireland, Food Microbiol 2004;21:203-12.
18. Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR, Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit, Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;52(3):203-8.

19. Khan A, Das S, Ramamurthy T, Sikdar A, Khanam J, Yamasaki S, “et al”, Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India, *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2009-15.
20. Blanco M, Blanco J, Mora A, Rey J, Alonso J, Hermoso M, “et al”, Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain, *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1351-6.
21. Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H, Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania, *BMC Infect Dis.*2007;7(1):92.
22. Kargar M DP HM, Evolution of virulence genes and antibiotic resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from hamburger by multiplex PCR in shiraz, *J Isfahan Med Sch (IUMS)* 2011 [Persian].
23. Soleimanifard N, Amini K, Moradli Gh, Molecular Identification of *Escherichia coli* Pathotypes EPEC and EAEC Molecular Identification of *Escherichia coli* Pathotypes EPEC and EAEC Pattern by Multiplex Polymerase Chain Reaction, *J Isfahan Med Sch (IUMS)* 2015;32(310):1—11 [Persian].
24. Jafari F, Garcia-Gil L, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani M, Pourhoseingholi M, “et al”, Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals, *J Infect* 2009: 58(1):21-7[Persian].

Molecular analysis of virulence genes stx1, stx2 in *Escherichia coli* isolated from stool samples and determining of their antibiotic resistance

Ramezani U^{1*}, Parviz M², Khalajzadeh S³

¹Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

²Lecturer, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

³Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

***Corresponding Author:** Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Email: uosef.ramezani.ac@gmail.com

Abstract

Background and Objectives: Pathotypes of *Escherichia coli*, including EHEC (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) are an important cause of enteric disease and extra-intestinal. Shiga toxin *E.coli* (STEC), along with EHEC strains are known as the most common cause of diarrhea in developing countries. The purpose of this study was to evaluate the virulence genes in *E.coli* strain by Multiplex-PCR method isolated from diarrhea and determine antibiotic resistance.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, after collecting 100 samples of human diarrhea of outpatient treatment centers in Tehran, culture and biochemical tests and 55 strains of *Escherichia coli* strains isolated and at the same time was extracted DNA. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion and E-test method based on CLSI guidelines with antibiotics from various groups. Statistical data were analyzed with SPSS version 19, using descriptive statistics.

Results: Most *E.coli* isolates resistant to antibiotics Erythromycin (100%) and Ampicillin (94%) and were sensitive to Nitrofurantoin (96%) Amikacin (100%). The test E-Test greatest Resistance to antibiotics erythromycin (100%) and the most sensitivity was observed to antibiotics Gentamycin and Amikacin (100%). According to the results of molecular analysis of 55 human samples, was identified in 12 samples (21/8%) *Stx*₂ gene and 4 sample (7/2%) *Stx*₁ gene.

Conclusion: The results obtained in this study compared to other studies showed that involved age, sample type, geographic location, type of diet, personal hygiene, seasons, identification and isolation procedures.

Keywords: *Escherichia coli*, STEC, virulence genes