مقاله
پژوهشی

بررسی ملکولی ژنهای حدت stx1,stx2 در باکتری اشریشیاکلی جداشده از نمونه‌های اسهال و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

یوسف رمضانی[1*]، مهدی پرویز[2]، سعید خلج‌زاده[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
[2]مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
[3]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 EHEC (Enterohemorragic Escherichia coli) عامل ایجاد بیماریهای روده‌ای و خارج روده‌ای می‌باشند. اشریشیاکلی شیگا توکسین (STEC)، به همراه سویه‌هایEHEC به عنوان شایع ترین عامل ایجاد کننده اسهال در کشورهای توسعه یافته شناخته می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی ژنهای حدت در باکتری اشریشیاکلی به روش Multiplex- PCR جداشده از نمونه‌های اسهال و تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این نمونه‌ها می‌باشد.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه توصیفی – مقطعی، پس از جمع‌آوری ۱۰۰ نمونه اسهال انسانی از مراکز درمانی سرپایی شهر تهران، آزمایش‌های کشت میکروبی و بیوشیمیایی انجام و ۵۵ سویه باکتری اشریشیاکلی جداسازی و همزمان DNA جدایه‌ها استخراج گردید. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و E-test بر اساس دستورالعمل CLSI با آنتی‌بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام شد. داده‌های آماری با SPSS19 و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

یافته‌ها: *اکثر اشریشیاکلی جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیکهای اریترومایسین (۱۰۰٪) و آمپی سیلین (۹۴٪) مقاوم و نسبت به نیتروفورانتوئین (۹۶٪) و آمیکاسین (۱۰۰٪) حساس بودند. در آزمون E-Test بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۱۰۰٪) و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین و آمیکاسین (۱۰۰٪) مشاهده شد. بر طبق نتایج آزمون ملکولی از مجموع ۵۵ نمونه انسانی، ۱۲ نمونه (۲۱/۸٪) واجد ژن Stx_2 و ۴ نمونه (۷/۲٪) حاوی ژن Stx_1 هستند.*

نتیجه‌گیری: *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 روش‌های شناسایی و جداسازی باکتری نقش دارند.*

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی، STEC، ژن‌های حدت*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۵؛ دوره ۸ (۱): ۴۷-۵۸
Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2016;8(1):47-58

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 شیگا (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 هنگامی‌که 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 گووانیلات 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 درحیوانات اهمیت دارد. Sta آنزیم گووانیلات 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 نفرکاهش یافت [۲۴]. شناسایی انواع مختلف DEC شامل واکنش‌های بیوشیمیایی، سروتایپینگ، سنجش‌های فنوتیپی براساس خصوصیات ویرولانس 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 پیچیده-ای 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، جمع آوری 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، TSI (Triple Sugar Iron Agar) 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 CLSI (Clinical 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 دیسک‌های آنتی-بیوتیک سفپیم (۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (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) از روش E.test (Epsilometer test) استفاده گردید. آزمایش E.test با نوارهای آنتی بیوتیکی (strips) آنتی-بیوتیکهای آمیکاسین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدکسیک اسید تهیه شده از شرکت HIMEDIA Pvt.Limited-INDIA) Himedia Laboratories) انجام شد. در این مطالعه از نوارهای E.test با رقت‌های 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 سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه می-باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده است [۱۶]. مخلوط ترکیبات مورد استفاده جهت انجام واکنش Multiplex-PCR شامل: آب مقطر ۱۲/۷ میکرولیتر، 10X. PCR buffer به میزان ۲ میکرولیتر، $MgCl_2$ 1.5mM به میزان ۰/۵ میکرولیتر، dNTP mix (5Mm) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای 0.5 µM مورد استفاده هرکدام ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase 2.5unit به میزان ۰/۳ میکرولیتر، نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید [۱۶]. بعد از انجام آزمون Multiplex-PCR در دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی محصول نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS19 و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی من ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

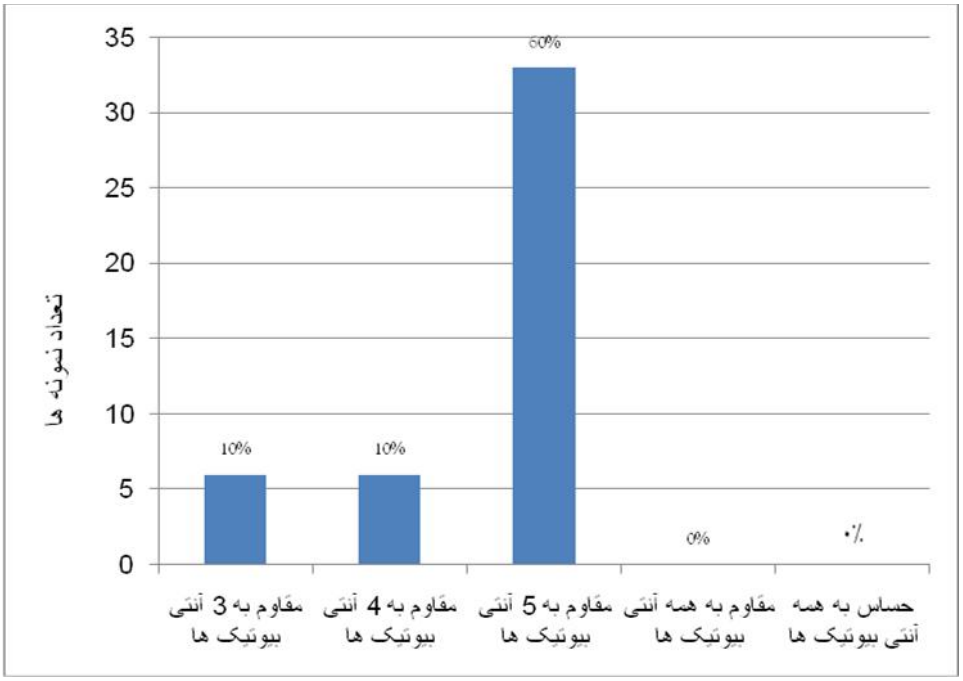
این تحقیق بر روی ۵۵ ایزوله جداسازی شده از بیماران دارای اسهال با علائم بالینی انجام گرفت. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده در جدول ۲ ذکر شده است. مطابق جدول بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد و کمترین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

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون Multiplex-PCR

پرایمر	توالی پرایمر (5'–3')	ژن هدف	طول محصول (bp)
SLT1-F	TGTAACTGGAAAGGTGGAGTATACA	Stx_1	۲۱۰
SLT1-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	Stx_1	۲۱۰
SLT11-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	Stx_2	۴۸۴
SLT11-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	Stx_2	۴۸۴

جدول۲: میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن

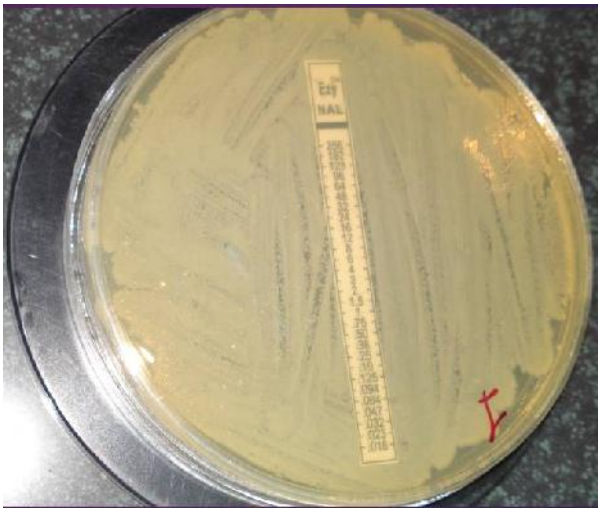
نوع آنتی‌بیوتیک	میزان حساسیت (٪) Sensitive	حساسیت متوسط(٪) Intermediate	میزان مقاومت (٪) Resistance
نیتروفورانتوئین	۹۶	–	۴
اریترومایسین	–	–	۱۰۰
آمیکاسین	۱۰۰	–	–
سفپیم	۲۳	۷	۷۰
نالیدکسیک اسید	۲۵	–	۷۵
آمپی سیلین	۳	۳	۹۴
سیپروفلوکساسین	۶۰	–	۴۰
سفتریاکسون	۴۲	–	۵۸
سفکسیم	۴۳/۳۴	۳/۳۳	۵۳/۳۳
جنتامایسین	۶۷	۱۶	۱۷



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

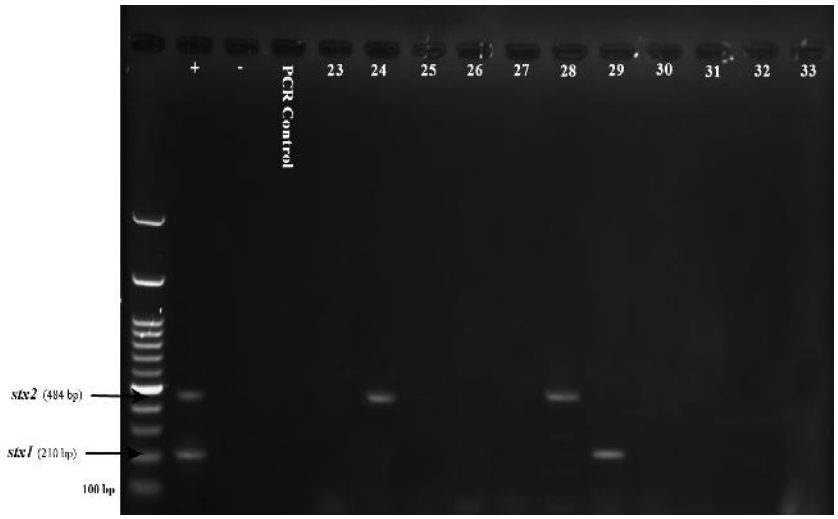
نوع آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
سیپروفلوکساسین	۹۰	۱۰
نالیدکسیک اسید	۲۱	۷۹
جنتامایسین	۱۰۰	-
آمیکاسین	۱۰۰	-
آمپی سیلین	۴۰	۶۰
اریترومایسین	-	۱۰۰



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
Stx_1	۴	۷/۲
Stx_2	۱۲	٪۲۱/۸



شکل۲: نتایج Multiplex PCR به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۵۰ bp، کنترل مثبت، نمونه‌های شماره ۲۹ واجد ژن Stx_1 ۲۱۰ bp، نمونه‌های شماره ۲۴، ۲۸ واجد ژن Stx_2 ۴۸۴ bp

جدول ۳ ذکر گردیده است. در این آزمون، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین (۱۰۰ درصد) و بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین به میزان ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و آمیکاسین به میزان ۴ میکروگرم بر میلی لیتر در هر ۵۵ نمونه (۱۰۰ درصد) مشاهده شد (شکل۱). 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 Stx_1 و Stx_2 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 نظردر شکل۲ قابل مشاهده است.

بحث

طبق یافته‌های این تحقیق بیشترین میزان مقاومت چندگانه به طور همزمان در ۶۰ درصد نمونه‌ها شناسایی گردید. بروز مقاومت‌های چندگانه دارویی در بین سویه-های 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 پورپورآ، 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[1] 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[2] 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 نیتروفورانتوئین (۲۹ درصد) گزارش کردند [۱۳]. در مطالعه تانخیواله[3] 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 نیتروفورانتوئین (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 اریترومایسین (۱۰۰ درصد) و آمپی سیلین (۹۳/۳ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به نیتروفورانتوئین (۳ درصد) گزارش شد [۲۳]. در تحقیق حاضر بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد و بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک آمیکاسین ۱۰۰ درصد و نیتروفورانتوئین 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 اریترومایسین و آمپی‌سیلین 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. بوذری و همکاران بیشترین درصد مقاومت را به آمپی‌سیلین، 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 نوارهای 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 آنتی-بیوتیکها 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 جداشده از نمونه‌های ادراری به روش E-Test بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک 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 مهمی‌در 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[1] 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 Stx_2، ۳۶/۵ درصد حاوی ژن Stx_1و ۴۴/۵ درصد هر دو ژن را داشتند [۱۹]. بلانکو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۳ به منظور بررسی ژنهای Stx_1 و Stx_2در 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 هردو ژنStx1, Stx2 می‌باشند. فراوانی بالای ژن Stxدر این مطالعه قابل توجه است [۲۰]. مویو[3] و همکاران در تانزانیا در سال ۲۰۰۷، از روش M-PCR به منظور شناسایی پاتوتیپ های 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[4] 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[5] و همکاران سال ۲۰۰۹ در بررسی بر روی گوشتهای تازه گاو از نظر وجود E.coli O157:H7 در ترکیه گزارش نمودند که ۰/۷۹درصد 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[6] در تحقیقات خود که طی فصول مختلف

1 -Khan
2 -Blanco
3- moyo
4 -Cagney
5- Sarimehmetoglu
6 -Barkocy

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 کاملا 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 stx_1 بوده است. در مجموع نتایج بدست آمده از این تحقیقات در مورد ژنهای حدت درپاتوتیپ 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 منشاء 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 می توان در زمان کوتاه و با دقت بیشتر حضور ژنهای بیماریزا را شناسایی و با درمان مناسب از انتقال این ژنها در جمعیت‌های انسانی و حیوانی جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

نگارندهٔ 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.

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 press2003.
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, Hosek 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 enterohemorragic 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].

Original Article

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

Ramezani U[1], Parviz M[2], Khalajzadeh S[3]*

[1]Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
[2]Lecturer, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
[3]Assistant 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

Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2016;8(1):47-58

Abstract

Background and Objectives: *Pathotypes of Escherichia coli, including EHEC (Enterohemorragic 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*

Recivied: 20 Jul 2015
Revised: 19 Sep 2015
Accepted:17 Nov 2015