بررسی و شناسایی ژن های مقاومت به تتراسایکلین در سویه های اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک جدا شده از نمونه های اسهال کودکان به روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

المیرا ولی‌زاده[1]، کیومرث امینی[*1]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۳۱

چکیده

مقدمه: برخی از سویه های پاتوژنیک اشریشیاکلی می توانند باعث ایجاد بیماری های روده ای و خارج روده ای شوند. اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک مهم ترین عامل اسهال کودکان کشورهای در حال توسعه است. هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن های مقاومت به تتراسیکلین در اشریشیاکلی مولد اسهال می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی کودکان زیر ۵ سال از مراکز درمانی مختلف در شهر تهران که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند جمع آوری و در نهایت ۵۵ نمونه اشریشیاکلی با آزمون های مختلف میکروبی و بیوشیمیایی شناسایی و تایید گردید. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI با آنتی بیوتیک هایی از گروه های مختلف انجام شد. جهت شناسایی ژن های مقاومت به تتراسیکلین از آزمون PCR چندگانه ای استفاده شد.

یافته های پژوهش: بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک ها، آموکسی سیلین و تتراسایکلین به ترتیب ۳۶/۳ درصد و ۲۷/۵ درصد و کمترین غلظت ممانعت از رشد(MIC) در بین سویه های مقاوم به تتراسایکلین، ۶۶/۶ درصد سویه ها ۱۲۸ µg/ml و ۳۳/۳ درصد سویه ها ۲۵۶ µg/ml گزارش گردید. بیشترین فراوانی ژن های مقاوم به تتراسایکلین، ژن tetA و tetB بوده که هر یک به میزان ۶ نمونه(۲۰ درصد) شناسایی شدند. ژن tetC در ۲ ایزوله و ژن tetD در یک ایزوله شناسایی شدند.

بحث و نتیجه گیری: مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی در کودکان مبتلا به اسهال می تواند نشان دهنده مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، گسترش کاست های ژنی مقاومت به آنتی بیوتیک و انتقال ژنتیکی در بین جمعیت ها باشد. جهت درمان قطعی و عدم بروز مقاومت در سویه های پاتوژن، تعیین الگوی مقاومتی و میزان MIC جهت پیگیری روند مقاومت ضروری است.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، ژن مقاوم به تتراسایکلین، MIC، Multiplex PCR

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

مقدمه

اشریشیاکلی به عنوان باکتری بی هوازی در فلور روده انسان است و معمولاً بدون ایجاد آسیب محدود به لومن روده باقی می ماند، اما در شرایط ناتوانی یا ضعف سیستم ایمنی میزبان یا وقتی موانع طبیعی دستگاه گوارش آسیب ببیند باعث ایجاد بیماری می شود. اکثر عفونت های اشریشیاکلی به صورت عفونت های فرصت طلب در کلیه، مثانه، زخم، ریه ها و مننژ بروز می کنند که هر یک می توانند به یک تهدیدکننده حیات منجر شوند، از این رو اشریشیاکلی یکی از پاتوژن های مهم بیمارستانی محسوب می شود(۱).

اشریشیاکلی انتروپاتوژن(EPEC) علت عمده اسهال کودکان کشورهای در حال توسعه می باشد. از خصوصیات اعضاء این پاتوتیپ ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در اپی تلیوم روده بوده و قادر به تولید سموم شیگا نمی باشند. سویه های معمول این پاتوتیپ پلاسمیدهایی را با خود حمل می کنند که آن ها را قادر می سازد تا خارهایی تحت عنوان خارهای به صورت مجتمع Bundle Pilus: (BFP) Forming تولید کرده تا به صورت موضعی به سلول های اپی تلیال متصل شوند. ژن eae ژن کدکننده اینتیمین(Gene Encoding Intimin) واقع در ناحیه ای از کروموزوم باکتری به نام جزیره بیماریزایی تخریب انتروسیت می باشد(۱۶). عباسی و همکاران در سال ۱۳۹۱ با بررسی بر روی اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک گزارش نمودند که مکانیسم اصلی بیماریزایی این سویه ها اتصال و تخریب است(۱۱). در درمان این عفونت ها از آنتی بیوتیک های دسته پنی سیلین ها و سفالوسپورنی های نسل اول، دوم و سوم به وفور استفاده می شود(۲). تتراسایکلین یک آنتی بیوتیک وسیع الطیف است که رشد قسمت اعظمی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را مهار می کند. ویژگی آنتی باکتریایی و فقدان اثرات جانبی این آنتی بیوتیک، باعث استفاده زیاد آن در عفونت های دامی و انسانی شده است(۲). مکانیسم های اصلی در مقاومت به تتراسایکلین از طریق کسب ژن tet شامل: پمپ های انتشار به خارج، محافظت ریبوزومی و غیرفعال شدن آنزیمی است. از دیگر مکانیسم های مقاومت به تتراسایکلین در برخی از باکتری ها شامل جهش، سد نفوذناپذیری و سیستم های انتقال چندگانه است(۳). با این وجود ژن tetB کدکننده پمپ های انتشار به خارج است که علاوه بر تتراسایکلین مقاومت به مینوسایکلین را نیز ایجاد می کند(۴،۵). بیشترین شیوع ژن های tet را در گرم منفی ها، پمپ های انتشار به خارج دارند که توسط ژن های tetG, tetD, tetC, tetB, tetA کد می شود(۶). در تحقیقات صورت گرفته در ایران میزان مقاومت به تتراسایکلین در بین سویه های انتروپاتوژنیک ۶۲/۷ درصد که ژن tetB شناسایی شد(۷). در مطالعه ای که بین سال های ۲۰۰۶-۲۰۰۲ در میان ایزوله های انسانی و حیوانی انجام شده ژن tetB به عنوان فراوان ترین ژن مقاومت گزارش شده است(۸). هدف از انجام این مطالعه شناسایی ژن های مقاومت tetD, tetC, tetB, tetA در باکتری اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک جدا شده از اسهال به روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC (Minimum Inhibition Concentration) می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: نمونه های انسانی مورد نیاز برای انجام این بررسی از کودکان زیر ۵ سال با علائم اسهال از مراکز درمانی مختلف در شهر تهران که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند جمع آوری گردیده و به آزمایشگاه منتقل و بر روی محیط کشت های مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار(EMB) و کروم آگار E.coli کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت کلنی های رشد یافته بررسی و با آزمون های تشخیصی و تکمیلی بیوشیمایی باکتری اشریشیاکلی به تعداد ۵۵ نمونه شناسایی گردید(۹،۱). از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. در این پژوهش از دو روش انتشار در آگار(Disk Diffusion) و روش رقیق سازی در آگار(Agar dilution method) به ترتیب برای تعیین قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک های مورد آزمایش استفاده شد و تفسیر نتایج

حاصل مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد(۱۰). انتخاب آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه بر اساس حضور کاست های ژنی مقاومت به آن ها در اینتگرون کلاس یک و دو و جداول CLSI بوده است. تعدادی از کلونی باکتری را به وسیله 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(۱۰). جهت انجام این مطالعه دیسک های آنتی بیوتیک آموکسی سیلین(۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین(۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول(۲۵ میکروگرم)، نالیدکسیک اسید(۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین(۱۰ میکروگرم)، استرپتومایسین(۱۰ میکروگرم)، از شرکت Himedia Laboratories HIMEDIA (Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید.

تعیین MIC سویه های مقاوم به تتراسایکلین: این آزمون با استفاده از پودر تتراسایکلین هیدروکلراید با قدرت تاثیر ۹۷۰ میکروگرم در میلی لیتر(تهیه شده از شرکت داروهای دامی ایران، (Guyuan Pharmaceutical CO. Lte و به روش رقیق سازی در آگار(Agar Dilution) انجام گرفت. روش مورد استفاده در این مطالعه طبق سند(M7-A7) CLSI انجام گرفته است(۱۰). محلول دارویی اصلی با غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بیوتیک مورد استفاده تهیه شد و از آن جهت ساخت غلظت های مختلف آنتی بیوتیک در محیط آگار استفاده شده است، در این تحقیق غلظت MIC تتراسایکلین به میزان ۵۱۲-۲ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. طبق سند CLSI اگر MIC ایزوله ها برای تتراسایکلین بیشتر از ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر باشد، سویه مقاوم خواهد بود و اگر کمتر از ۴ میکروگرم در میلی لیتر باشد سویه حساس گزارش می شود. طبق استاندارد CLSI برای MIC غلظت نهایی تلقیح سوسپانسیون باکتری باید ۱۰۴ CFU/ml باشد. سپس پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه برای مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت قرار داده می شوند. بعد از گذشت زمان لازم برای انکوبه کردن نمونه ها، کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که از رشد باکتری جلوگیری کرده است به عنوان MIC برای آن ایزوله تعریف می گردد. این آزمون برای کلیه غلظت های استفاده شده به صورت دوبار تکرار انجام گرفت.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت باکتری های گرم منفی سیناژن(Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید.

برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله اتصال ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه(تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بوده است. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول شماره ۱ ذکر شده است(۳،۱۲). مخلوط های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می باشد: آب مقطر ۱۷/۳۵ میکرولیتر، 1X. PCR buffer به میزان ۲ میکرولیتر، MgCl2 به میزان ۰/۷ میکرولیتر، dNTP mix (5Mm) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۰/۶ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر، نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت(۳). آزمون Multiplex-PCR در دستگاه BIORAD انجام شد. جهت بررسی محصول نمونه ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده های آماری با نرم افزار SPSS vol.19 و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته های پژوهش

تعداد ۵۵ نمونه اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC) جدا شده از مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال در این مطالعه مورد آنالیز قرار گرفته اند.

نتایج آنتی بیوگرام: با تطابق قطر هاله ها با جدول استاندارد(۱۱،۱۳) نتایج به صورت حساس و مقاوم گزارش شد. بیشترین مقاومت در بین آنتی بیوتیک ها به آموکسی سیلین و تتراسایکلین به ترتیب ۳۶/۳ درصد و ۲۷/۵ درصد گزارش شد(جدول شماره ۲).

نتایج MIC: حداقل غلظت مهاری ایزوله های بالینی جدا شده نسبت به تتراسایکلین در ابتدا با غلظت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر برای ۲۱ نمونه بالینی که به تتراسایکلین با روش دیسک دیفیوژن مقاوم گزارش شده اند تعیین گردید. میزان MIC سویه های مقاوم به تتراسایکلین، ۶۶/۶ درصد سویه ها ۱۲۸میکروگرم در میلی لیتر و ۳۳/۳ درصد سویه ها ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد(جدول شماره ۳)(شکل شماره ۱).

نتایج Multiplex-PCR: یکی از ژن های دخیل در بیماریزایی EPEC ژن tet است که روی ناحیه کروموزومی به نام لوکوس LEE قرار دارد. نتایج PCR این ژن در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. بیشترین ژن شناخته شده مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌ها ژن tetA و tetB بوده است که هر یک به میزان ۶ نمونه(۲۰ درصد) شناسایی شدند. ژن tetC تنها در ۲ ایزوله و ژن tetD در یک ایزوله شناسایی شدند. فراوانی ژن های یافت شده در جدول شماره ۴ مشخص شده است.

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام (Multiplex-polymerase chain reaction) Multiplex-PCR

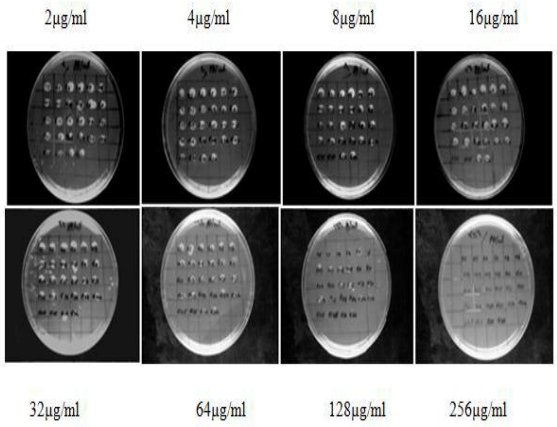
جدول پرایمرهای مورد استفاده			
نام پرایمر	توالی پرایمر (5’ to 3’)	ژن هدف	اندازه باند(bp)
eae-f	CTGAACGGCGATTACGCGAA	eae	۹۱۷
eae-r	CCAGACGATACGATCCAG	eae	
BFP-f	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	bfPA	۳۲۶
BFP-r	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	bfPA	
tet(A)-f	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	tet(A)	۲۱۰
tet(A)-r	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	tet(A)	
tet(B)-f	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	tet(B)	۶۵۹
tet(B)-r	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	tet(B)	
tet(C)-f	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	tet(C)	۴۱۸
tet(C)-r	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	tet(C)	
tet(D)-f	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	tet(D)	۷۸۷
tet(D)-r	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC	tet(D)	

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از آزمایش انتشار دیسک و فراوانی ایزوله های مقاوم برحسب تعداد و درصد

آنتی‌بیوتیک	تعداد نمونه‌های مقاوم (٪)
آموکسی سیلین	۲۰ (۳۶/۳)
تتراسایکلین	۱۵ (۲۷/۵)
مینوسایکلین	۹ (۱۶/۳)
جنتامایسین	۱ (۱/۸)
استرپتومایسین	۱(۱/۸)
نالیدیکسیک اسید	۲ (۳/۶)
کوتریماکساوزل	۷ (۱۲/۷)

جدول شماره ۳. تعیین میزان MIC سویه های مقاوم به تتراسایکلین

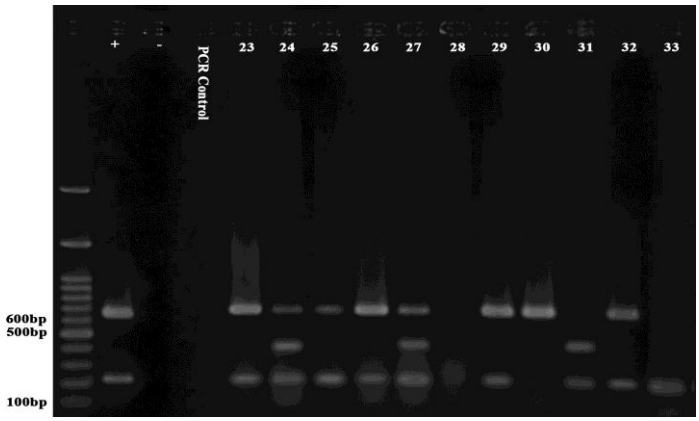
تعداد ایزوله ها									
MIC	tet(A)	tet(B)	tet(C)	tet(D)	tet(B), tet(C)	tet(B), tet(D)	tet(A), tet(B)	No tet	مجموع
۱۲۸ µg/ml	۴	-	۱	-	۱	–	-	۲۰	۱۴
۲۵۶ µg/ml	۰	۲	-	-	-	۱	۲	۱۴	۷
مجموع	۴	۲	۱	-	۱	۱	۲	۳۴	۲۱



شکل شماره ۱. میزان MIC ایزوله های EPEC مقاوم به تتراسایکلین در غلظت های ۲۵٦ میکروگرم در میلی لیتر

جدول شماره ٤. میزان فراوانی ژن های tet در میان ایزوله های EPEC

ژن مقاومت به تتراسایکلین	تعداد(درصد) ایزوله های حاوی ژن
tet A	۶ (۲۰)
tet B	۶ (۲۰)
tet C	۲ (۶/۶)
tet D	۱ (۳/۳)
tet(B), tet(C)	۱ (۳/۳)
tet(B), tet(D)	۱ (۳/۳)
tet(A), tet(B)	۲ (۶/۶)



شکل شماره ۲. محصول PCR بر روی ژل آگارز، به ترتیب از چپ به راست، نشانگر bp ۱۰۰، کنترل مثبت، کنترل منفی، کنترل PCR، ۳۳-۲۳ نمونه های بالینی اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های اسهالی، چاهک شماره ۲۳-۲۸، ۲۹، ۳۱-۳۳ واجد ژن tetB و tetC، چاهک های شماره ۲٤،۲۷،۳۱: نمونه های دارای ژن tetC با طول باند bp ٤۱۸، چاهک های ۲۷-۲۳ و ۲۹،۳۰،۳۲: نمونه های دارای ژن tetB با طول باند bp ٦۵۹

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت بیماری های اسهالی عفونی در سراسر دنیا بسیار زیاد است و در بین این موارد انتروپاتوژتیک اشریشیاکلی به عنوان عامل مهم اسهال کودکان و مرگ و میر نوزدان به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشد. مکانیزم بیماریزایی EPEC ایجاد لژیون های Attaching and effacing است. این لژیون ها باعث تخریب میکروویلی ها و اتصال باکتری به سلول اپی تلیال روده می شود. این امر منجر به کاهش توانایی جذب در روده می شود و تنظیم الکترولیت ها را در روده از بین می برد. کنترل کننده های ژنتیکی ها لژیون های A/E روی نواحی کروموزومی به نام لوکوس LEE قرار دارد و ژن eae که مسئول چسبندگی باکتری با سلول است روی این ناحیه قرار گرفته است(۱۴). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ در ایران توسط نجیبی و همکاران انجام شده است از ۳۰۹ نمونه اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال ۲۸ ایزوله(۹ درصد) EPEC گزارش شده است(۷). داده های اخیر نشان داده است که EPEC آتیپیک در کشورهای در حال توسعه و هم در کشورهای توسعه یافته شیوع بیشتری از نوع تیپیک آن دارند(۱۶،۱۵). در مطالعه حاضر ۹۶/۴۳ درصد ایزوله ها به عنوان آتیپیک طبقه بندی شده اند به این علت که ژن bfpA به تنهایی در حال افزایش است. این میزان در مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۶ و سال ۲۰۱۰ به ترتیب ۳۵/۶ درصد و ۶۱/۷ درصد بوده است(۱۷،۱۸). در مطالعه ای که توسط سانتونا و همکاران طی سال های ۱۹۹۹-۱۹۹۶ و در نقاط مختلف جغرافیایی انجام شد، شیوع EPEC آتیپیک در سه کشور ایتالیا، موزامبیک و آنگولا تحت بررسی قرار گرفت که میزان جداسازی سویه های آتیپیک در این سه کشور به ترتیب ۱۰۰، ۵۲/۶ و ۵۸/۳ درصد بوده است. این نتایج نشان دهنده شیوع بیشتر EPEC آتیپیک در کشورهای در حال توسعه است(۱۵،۲۲). بوذری و همکاران با استفاده از شناسایی ژن bfpB شیوع EPEC آتیپیک را در سال ۲۰۱۱، ۳۴ درصد گزارش کرده اند(۱۹). در کشورهای دیگر نیز کاهش شیوع انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی تیپیک گزارش شده است. در ویتنام در سال ۲۰۰۱ تمام نمونه های EPEC جداسازی شده آتیپیک بودند. در اروپا، آمریکای شمالی و آسیا گزارشات بسیاری از این کاهش وجود دارد(۲۰،۲۱). کاهش سویه های آتیپیک در ایران، با یافته های مطالعات خارج از کشور نیز قابل مقایسه است. این کاهش، نشانه افزایش سطح بهداشت عمومی در ایران است. در مطالعه حاضر ۱۵ ایزوله از لحاظ فنوتیپی مقاوم به تتراسایکلین بودند. از این ۱۵ ایزوله، ۱۱ ایزوله(۷۳/۳ درصد) ایزوله حاوی حداقل یک ژن مقاومت به تتراسایکلین بودند و ۴ ایزوله دارای دو ژن مقاومت به تتراسایکلین به طور هم زمان بوده است. در این مطالعه شیوع ژن های مقاوم به تتراسایکلین کمتر بوده است. به طوری که ژن tetD شیوعی با میزان ۳/۳ درصد داشته است. tetC در دو ایزوله با فروانی ۶/۶ درصد مشاهده شد. در این مطالعه tetA و tetB بیشترین میزان شیوع را داشته و هر دو ژن در ۲۰ درصد ایزوله ها یافت شدند. شناسایی تعداد کم ژن های مقاوم به تتراسایکلین با وجود مقاومت فنوتیپی در مطالعات دیگر هم گزارش شده است. شیوع کم ژن های مقاومت به تتراسایکلین می تواند به علت جهش در ناحیه اتصال پرایمر باشد که می تواند منجر به نتیجه منفی کاذب شود. هم چنین مقاومت به تتراسایکلین می تواند به علت ژن های مقاومت دیگری باشد که تاکنون در اشریشیاکلی شناسایی نشده اند(۲۳). در مطالعه کرمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در همدان میزان مقاومت سویه های انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی نسبت به تتراسایکلین ۵۸/۴ درصد و مقاومت چندگانه ۶۸/۷ درصد گزارش شده است که نسبت به مطالعه حاضر هم خوانی داشته و میزان بالاتری از شیوع سویه های مقاوم به تتراسایکلین مشاهده گردید(۲۸). از طرفی بعضی از مقاومت ها به جای کسب ژن می تواند بر اساس جهش های ایجاد شده در بخش 16s-rRNA ایجاد شود که در نتیجه شناسایی عوامل ژنتیکی مقاومت در این موارد قابل ردیابی نمی باشد(۲۴). نکته حائز اهمیت در مسئله مقاومت به ژن های تتراسایکلین این است که به دلیل عدم استفاده از تتراسایکلین به عنوان درمان انتخابی برای کودکان، اما مقاومت بالایی

نسبت به آن مشاهده می شود. در بعضی از کشورها از جمله آمریکا این آنتی بیوتیک به عنوان فاکتور رشد در دوزهای کمتر از درمان به غذای دام اضافه می شود(۲۵). در مطالعه ای که پرلگ و همکاران انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مقاومت به تتراسایکلین از والدین به نوزدان به صورت افقی و توسط باکتری های فلور انتقال می یابد(۲۶). در این مطالعه نوزادان از بدو تولد مورد بررسی قرار گرفته و الگوی PFGE باکتری های مقاوم در نوزاد و والدین با هم مقایسه شده و نتیجه آزمون در هر دو منبع مشابه بوده که می توان نتیجه گرفت از یک کلون منشاء گرفتند. در تحقیق ما ۴ ایزوله همراهی دو ژن tet مشاهده شد. در مطالعات قبلی هم وجود دو ژن مقاومت به تتراسایکلین در یک سویه مشاهده شده است. در هیچ کدام از این مطالعات مانند این مطالعه همراهی ژن مقاومت به تتراسایکلین از نوع A-D مشاهده نشده است(۲۷،۲۳). با توجه به نتایج به دست آمده و نتایج در گذشته مقاومت کمی به آنتی بیوتیک ها گزارش شده بود، اما امروزه به دلیل گسترش کاست های ژنی مقاوم در آن ها مقاومت به این آنتی بیوتیک ها به شدت افزایش یافته است. جهت درمان قطعی و عدم بروز مقاومت های روزافزون در سویه ها پاتوژن، تعیین الگوی مقاومتی و حتی MIC آن ها برای پیگیری روند مقاومت ضروری است. با توجه به اسهال ایجاد شده توسط سویه های EPEC و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در این ایزوله ها حتی نسبت به آنتی بیوتیک هایی که جزء خط اول درمان برای این ارگانیسم نیستند، اهمیت انتقال ژنتیکی در بین جمعیت ها مشخص می گردد و باید تدبیری اتخاذ شود تا به صورت دوره ای میزان مقاومت و مکانیسم آن به طور مداوم و به صورت دوره ای در این باکتری ها بررسی شده تا بدین صورت با انتخاب داروی مناسب برای درمان از افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری جلوگیری شود. از طرفی مقاومت بالا به تتراسایکلین، در کودکان زیر ۵ سال دیده می شود با توجه به این آنتی بیوتیک در درمان کودکان استفاده نمی شود، این امر می تواند نشان دهنده انتقال ژن های مقاومت از محیط و حتی از والدین کودکان باشد.

References

1. Jawetz M. Medical microbiology. 20thed. Adelbergs Publication 2007;P.165.
2. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65:232-60.
3. Koo H-J, Woo G-J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in Escherichia coli isolated from meat and meat products. Int J Food Microbiol 2011;145:407-13.
4. Chopra I. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:637.
5. Testa RT, Petersen PJ, Jacobus NV, Sum P, Lee VJ, Tally FP. In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2270.
6. Skockova A, Cupakova S, Karpiskova R, Janstova B, editors. Detection of tetracycline resistance genes in Escherichia coli from raw cows milk. J Microbiolo Biotechnol Food Sci 2012: 1:777-84.
7. Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie M, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of class 1 integrons among enteropathogenic Escherichia coli. Can J Microbiol 2012;58:637-43.
8. Schwaiger K, Holzel C, Bauer J. Resistance gene patterns of tetracycline resistant Escherichia coli of human and porcine origin. Vet Microbiol 2010;142:329.
9. Murray P, Baron E, Jorgensen J. Manual of clinical microbiology 8th ed. American Society for Microbiology Publication 2003;P.103.
10. Gaydos JM, Harrington BJ. Agar disk diffusion for the quality control testing of Autobac elution disks. Antimicrob Agents Chemother1982;21:516-8.
11. Abbasi M, Aslani MM, Mostafavi E, Alikhani MY, Nikbin VS. [Determination of adhesion virulence factors of

enteropathogenic Escherichia coli (eaeA-, bfpA-) isolates from Asymptomatic individuals compared to those with diarrhea]. Modares J Med Sci Pathobiol 2013:15:99-108. (Persian)
12. 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;7:92.
13. Committee SA. Antibiogramme societe française microbiologie report 2003. Int J Antimicrol Agents 2003;21:364-91.
14. Clarke S, Haigh R, Freestone P, Williams P. Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen. Clin Microbiol Rev 2003;16:365-78..
15. Santona S, Diaz N, Fiori PL, Francisco M, Sidat M, Cappuccinelli P, et al. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic Escherichia coli isolated in industrialized and developing countries. J Infect Dev Count 2013;7:214-9.
16. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection. Trans Soc Trop Med Hyg 2008;102:852-6.
17. Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli in Iranian children with and without diarrhoea. J Med Microbiol 2006;55:1159-63.
18. Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie MR. The occurrence of atypical enteropathogenic Escherichia coli strains among children with diarrhea in Iran. J Infect Chemo 2013;19:615-20.
19. Bouzari S, Aslani MM, Oloomi M, Jafari A, Dashti A. Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of fliC gene for the detection of enteropathogenic Escherichia coli. Braz J Infect Dis 2011;15:365-9.
20. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi Vietnam. J Clin Microbiol 2005;43:755-60.
21. Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbricotti SH, Fagundesneto U, Mendes CM, et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of Escherichia coli are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. J Clin Microbiol 2007;45:3396-9.
22. Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic Escherichia coli in Norwegian children with diarrhoea. J Med Microbiol 2003;52:1015-9.
23. Blake D, Humphry R, Scott K, Hillman K, Fenlon D, Low J. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal Escherichia coli populations. J Appl Microbiol 2003;94:1087-97.
24. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Beef Cattle. Appl Environ Microbiol 2015 15;81:5560-6.
25. Nelson ML, Levy SB. Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. Antimicrob Agents Chemother1999;43:1719-24.
26. Prelog M, Grif K, Decristoforo C, Würzner R, Kiechl U, Brunner A, et al. Tetracycline-resistant Escherichia coli strains are inherited from parents and persist in the infants intestines in the absence of selective pressure. Eur J Pediatr 2009;168:1181-7.
27. Lee C, Langlois B, Dawson K. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. Appl Environ Microbiol 1993;59:1467-72.
28. Karami P, Aslani MM, Najafi Mosleh M, Alikhani MY. [Determine the pattern of antibiotic resistance of Escherichia coli strains Entropathogen isolated from children with diarrhea]. Hamadan Med Uni J 2012;1:27-31. (Persian)

Survey and Identification of the Tetracycline Resistance Genes Instrains Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Diarrheal Children by Multiplex PCR and Determine Antibiotic Resistance

Valizadeh E[1], Amini K[1]*

(Received: June 20, 2015 Accepted: September 22, 2015)

Abstract

Introduction: Some pathogenic strains of Escherichia coli can cause intestinal and external intestinal diseases. Enteropathogenic Escherichia coli is one of the most important factors of children diarrhea in developing countries. The aim of this study was to determine the prevalence of antibiotic resistance and the prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli causing diarrhea.

Materials & methods: A total of 150 stool samples of diarrheal children under 5 years from treatment centers in Tehran hospital were selected randomly, collected and finally 55 cases were confirmed as Escherichia coli with different biological and biochemical tests. Antibiogram testing was performed by disk diffusion method according to CLSI guidelines with various antibiotics. Multiplex PCR test was used for identifying the tetracycline resistance genes.

Findings: The results showed that the most resistance to antibiotics were amoxicillin and tetracycline 36.3% and 27.5%, respectively, and were reported the minimum inhibitory concentration (MIC) of the strains resistant to tetracycline, 66.6% of the strains 128 µg/ ml and 33.3 % of the strains 256 µg/ ml. The most prevalence were identified of tetracycline resistant genes, genes tetBand tetA in 6 samples (20%). TetC gene identified in 2 isolated and tetD gene in 1 isolation.

Discussion & Conclusions: Antibiotic-resistant Escherichia coli in children with diarrhea can indicate excessive use of antibiotics, the spread of antibiotic resistance gene cassettes and genetic transmission among the population. Treatment and absence of resistance gene in pathogenic strains, is necessary determine the resistance pattern and the MIC to follow up the process of resistance.

Keywords: Escherichia coli, Tetracycline resistant gene, MIC, Multiplex PCR

1.Dept of Microbiology,Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran
**Corresponding author Email : kamini@iau-saveh.ac.ir*