تشخیص توکسین حساس به حرارت و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک جدا شده از نمونه های اسهال کودکان زیر ۵ سال در شهر ساری

اسماعیل فتاحی*[۱]، فاطمه مدانلو[۱]، جعفر امانی[۲]، عسکری احمدپور[۱]

۱) گروه زیست شناسی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۳

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک(ETEC) از مهم ترین عوامل اسهال حاد باکتریایی در سراسر جهان می باشد. با اتصال ETEC به مخاط روده و تولید انتروتوکسین های حساس به حرارت(LT) و مقاوم به حرارت(ST) باعث بیماری در انسان به ویژه در کودکان می شود. این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ETEC انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۹۰ نمونه مدفوع اسهالی از کودکان زیر ۵ سال جهت جداسازی اشریشیاکلی جمع آوری شد. در ابتدا سویه های اشریشیاکلی با استفاده از تست های بیوشیمیایی جداسازی و میزان شیوع سویه ETEC و حضور ژن LT با استفاده از تکنیک PCR بررسی و سپس مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها با روش انتشار دیسک مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته های پژوهش: از ۵۰ جدایه اشریشیاکلی، ۴ سویه(۸ درصد) حاوی ژن توکسین LT بودند. تمام سویه های ETEC حاوی ژنLT نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریماکسازول، سفکسیم و جنتامایسین(۴ سویه) مقاومت نشان دادند. هم چنین این سویه ها نسبت به سفتریاکسون (۱۰۰ درصد)، ایمیپنم(۱۰۰ درصد)، تریمتوپریم، سولفامتاکسازول، سیپروفلوکسازین، نالیدیکسیک اسید(۷۵ درصد)، نیتروفورانتوئین، تتراسایکلین، آمیکاسین(۵۰ درصد) و به دیسک های آمپی سیلین و سفالوتین(۲۵ درصد) حساسیت نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سویه ETEC در این منطقه از میزان شیوع گسترده ای برخوردار بوده اند. بنا بر این به کارگیری روش تشخیصی سریع و دقیق ملکولی PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند بار عفونت های اسهالی را کم و به ارتقای سلامت کمک و از مرگ و میر کودکان جلوگیری نماید.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، اسهال، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

Email:esmail_fattahy@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

مقدمه

از میان باکتری های انتروپاتوژن ایجادکننده اسهال، اشریشیاکلی مهم ترین عامل اسهال اندمیک و اپیدمیک و به عنوان مهم ترین مشکل بهداشت عمومی در کشورهای درحال توسعه مطرح می باشد(۱). اشریشیاکلی به چندین پاتوتایپ دسته بندی می شود که انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی(ETEC) به عنوان مهم ترین عامل اسهال آبکی در کودکان زیر ۵ سال، افراد بالای ۶۰ سال و مسافران از اهمیت ویژه ای برخوردار است(۲). تولید انتروتوکسین ها و فاکتورهای کلونیزاسیون به عنوان فاکتورهای اختصاصی در ETEC، آن ها را از سایر گروه های اشریشیاکلی ایجاد کننده اسهال متمایز می سازد(۳،۴). باکتری ETEC توانایی تولید انتروتوکسین پروتئینی حساس به حرارت(LT) و مقاوم به حرارت(ST) را دارا بوده که به صورت مستقل یا توام باعث اسهال می شوند. توکسین حساس به حرارت(LT) در ایجاد اسهال در انسان از اهمیت بالایی برخوردار می باشد(۵). این توکسین یک پروتئین هتروهگزامر از خانواده AB5 توکسین بوده که ژن تولیدکننده آن بر روی پلاسمید قرار دارد(۷-۵). با ترشح توکسین LT اتصال ETEC به سطح سلول های اپی تلیال افزایش یافته و باعث کلونیزاسیون باکتری در سطح روده کوچک می شود و از طریق زیر واحد B به رسپتور گانگلیوزیدی GM1 به سلول های اپی تلیال روده اتصال می یابد و با واسطه اندوسیتوز وارد سلول می شود که بخش A1 توکسین با فاکتورهای ADP ریبوزیله کننده واکنش داده و با فعالیت آنزیمی خود ADP ریبوز را از ملکول های نیکوتین آمیدآدنین دی نوکلئوتید جدا و به Gsa منتقل می کند این عمل باعث مهار فعالیت GTP آزی و فعال سازی دائمی آدنیلات سیکلاز می شود این فعالیت موجب افزایش cAMP، تحریک ترشح کلریدسدیم در نوک ویلی ها شده و اسهال آبکی ایجاد می شود(۸،۹). اسهال ایجاد شده به وسیله ETEC از حالت خفیف تا شدید بدون خون همراه با درد غیر طبیعی ناحیه شکمی، استفراغ و گاهی همراه با تب، سردرد و درد عضلانی با دوره کمون ۵۰-۱۴ ساعت همراه است(۱۰،۱۱). از آن جایی که آلودگی با سویه ETEC مهم ترین عامل ایجادکننده اسهال در نوزادان و کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه و به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت در کشورهای دنیا محسوب می شود و بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی(WHO) این پاتوژن روده ای دومین عامل مرگ و میر پس از روتا ویروس ها در کودکان می باشد و شناسایی این سویه به طور روتین در آزمایشگاه های طبی انجام نمی گیرد لذا روش های مناسب شناسایی سویه ETEC و نحوه پیشگیری و درمان از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. روش های کشت و سرولوژی از متداول ترین روش های تشخیصی از دهه های پیشین تاکنون برای شناسایی سویه ETEC بوده است اما چون این روش ها مستلزم هزینه و صرف زمان می باشند مورد توجه واقع نمی باشند؛ اما پیشرفت های امروزی در زمینه ملکولی به خصوص روش تکثیری اسیدهای نوکلئیک به دلیل دقت و حساسیت بسیار بالا برای شناسایی ژن بیماری زا جایگاه ویژه ای را برای شناسایی این سویه فراهم ساخته است. متاسفانه با وجود اهمیت بیماری زایی سویه ETEC پژوهش های محدودی در مورد پایش دقیق این باکتری در استان مازندران انجام شده است. لذا این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ETEC در شهرستان ساری انجام شد.

مواد و روش ها

بررسی نمونه های بالینی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۹۰ نمونه اسهال با مشخصه مدفوع آبکی بدون خون با سلول های التهابی از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی مراکز خصوصی و بیمارستان های شهر ساری از بچه های ۸ ماهه تا ۵ ساله در طی ۳ ماه از بهمن ۹۳ الی فروردین ۹۴ جمع آوری و نمونه ها به آزمایشگاه میکروب شناسی انتقال داده شدند. برای جدایه سازی اشریشیاکلی نمونه ها بر روی محیط محیط مک کانکی و EMB کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، کلنی ها با روش میکروبیولوژی استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

آزمایش های بیوشیمیایی از قبیل سیمون سیترات، TSI، SIM و اوره شناسایی گردیدند.

تهیه سویه باکتری ETEC مولد LT: در این مطالعه سویه استاندارد ETEC مولد LT بدون کد بین المللی از مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهیه و با استفاده از روش کشت مجدد، تست های بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی مورد تائید مجدد قرار گرفت.

استخراج DNA: برای اثبات حضور ژن کدکننده توکسین LT و انجام PCR استخراج DNA ژنومی باروش Boiling انجام شد. در این روش ابتدا باکتری E.coli در محیط بلاد آگار کشت داده شد و پس از رشد باکتری، منطقه اول کشت با لوپ برداشته و به محیط کشت LB مایع تلقیح گردید و جهت تکثیر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از رسیدن باکتری ها به فاز رشد لگاریتمی گرمادهی متوقف و ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به میکروتیوپ ml ۲ منتقل و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی خارج و به رسوب سلولی حاصل، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه و با ورتکس مخلوط گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و در نهایت پس از ورتکس، مایع رویی(Supernatant) برداشته و DNA الگو برای PCR استفاده شد.

اندازه گیری غلظت DNA ژنومیک استخراج شده: برای اندازه گیری غلظت نمونه های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. به این منظور ابتدا با الکل نانودراپ را تمیز و سپس با توجه به روش استخراج DNA از آب مقطر و یا بافر TE به عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه نانودراپ استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه استخراج شده را برداشته و غلظت آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده: جهت انجام واکنش PCR از یک جفت پرایمراختصاصی که از قسمت میانی ژن کدکننده توکسین LT از سویه ETEC به عنوان ژن هدف توسط اسفندیاری و همکاران(۱۲) طراحی شده بود استفاده و به شرکت تکاپوزیست جهت سنتز سفارش داده شد؛ که اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی نوکلئوتید	تعداد توکلئوتید	اندازه محصول(bp)
Forward	ATGCCCAGAGGGCATAATGAG	۲۱ باز	۵۶۵
Reverse	GATATATTGTGCTCAGATTCTGGG	۲۴ باز	

جدا سازی و تکثیر ژن LT توکسین با واکنش PCR: اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/µl)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر pmol/ µl ۱۰، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل با یکدیگر مخلوط شدند. واکنش PCR در ۳۵ سیکل مطابق با جدول شماره ۲ انجام گرفت. جهت بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول لودینگ دورن چاهک های ژل اگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز زیر نور UV مشاهده و تصویری از ژل با استفاده از دستگاه ژل داکت تهیه گردید.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

جدول شماره ۲. نحوه اجرای واکنش PCR برای تکثیر ژن LT

	مرحله	درجه حرارت(سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
۱	دناتوره شدن اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱ سیکل
	دناتوره شدن ثانویه	۹۵	۱ دقیقه	
۲	اتصال	۶۳	۴۵ ثانیه	۳۳ سیکل
	تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱ سیکل

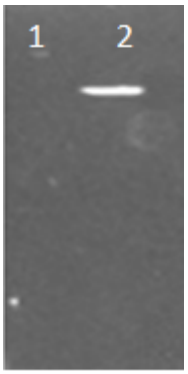
تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش: به منظور تعیین اختصاصیت این واکنش با استفاده از ژنوم تخلیص شده دیگر باکتری های خانواده انتروباکتریاسه شامل Klebsiella، Pesudomonase aeruginosa، Salmonella، Shigellae dysenteriae واکنش PCR انجام شد که پس از انجام واکنش محصول با ژل آگاروز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین میزان حساسیت واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی: به منظور تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی ETEC که می تواند توسط این روش شناسایی گردد، ژنوم باکتری با بافر(PH=8) TE رقیق شده و به عنوان الگو جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت سپس محصول واکنش توسط ژل آگاروز ۲ در صد الکتروفورز گردید.

سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی: در پایان این مطالعه مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های ETEC مولد LT توکسین مثبت حاصل از واکنش PCR با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار با دیسک های آنتی بیوتیکی(شرکت پادتن طب) شامل سفتریاکسون، ایمیپنم، تریمتوپریم، سولفامتاکسازول، سیپروفلوکسازین، نالیدیکسیک اسید، نیتروفورانتوئین، تتراسایکلین، آمیکاسین، آمپی سیلین، سفالوتین، کوتریماکسازول، سفکسیم و جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش

پس از کشت باکتری در محیط LB مایع سوسپانسیون حاوی تعداد مشخص باکتری تحت جداسازی DNA کروموزومی قرار گرفت و سپس کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۲ درصد بررسی شد. همان طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می شود DNA استخراج شده عاری از RNA بوده و از کیفیت مناسبی جهت انجام PCR برخوردار می باشد.



شکل شماره ۱. ژل الکتروفورز مربوط به DNA استخراج شده سویه ETEC
ستون ۱ (کنترل منفی ستون ۲) DNA ژنومی استخراج شده سویه ETEC

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

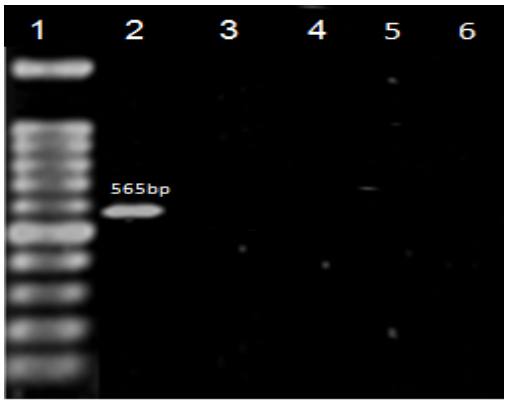
[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

واکنش PCR: واکنش PCR با DNA ژنومیک استخراج شده سویه ETEC با پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت که در این واکنش ژن LT به عنوان یک هدف برای تشخیص باکتری ETEC انتخاب شد. شرایط مختلفی برای بهینه سازی واکنش PCR مورد آزمون قرار گرفتند که شامل دماهای مختلف اتصال آغازگرها(۵۷ تا ۶۳ درجه سانتی گراد)، غلظت های مختلف $MgCl_2$، میزان dNTPs و غلظت های متفاوتی از آغازگرها بود. با توجه به این موارد توانستیم شرایط مطلوب واکنش را به دست آوریم که منجر به تکثیر قطعه ۵۶۵bp ژن مورد نظر گردید. قطعه مذکور بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با دستگاه ژل داکیومنت مشاهده گردید(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. ژل آگاروز مربوط به محصول PCR ژن lt
ستون ۱ نشانگر اندازه DNA (100 bp)
ستون ۲ محصول PCR ژن lt

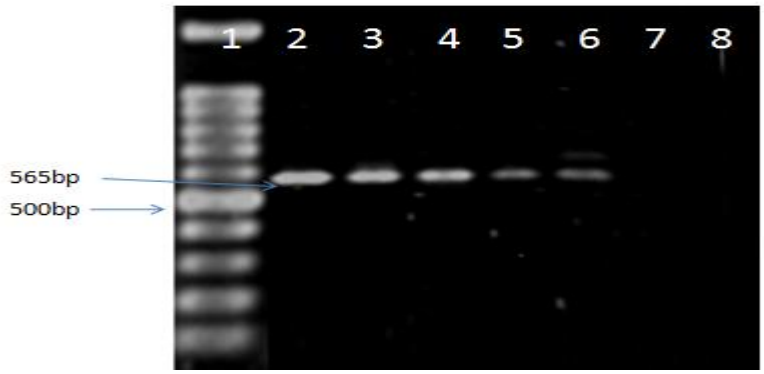
میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: پس از تائید محصولات PCR برای بررسی، میزان اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده، واکنش با استفاده از باکتری های خانواده آنتروباکتریاسه مانند کلبسیلا، سالمونلا، شیگلا دیسانتریه و سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت. همان طور که در شکل شماره ۳ دیده می شود به غیر از ردیف ۲ مربوط به قطعه ۵۶۵ bp حاوی ژن LT تمامی واکنش ها منفی بودند که این دلیلی بر اختصاصی بودن تست مورد نظر می باشد.



شکل شماره ۳. ژل آگاروز مربوط به اختصاصیت واکنش PCR با استفاده از باکتری های مختلف
ستون ۱(نشانگر اندازه DNA (100 bp DNA Ladder)، ستون ۲ سویه ETEC،
ستون ۳ کلبسیلا پنومونیه، ستون ۴ سودوموناس آئروژینوزا،
ستون ۵ سالمونلاتیفی، ستون ۶ شیگلا دیسانتریه

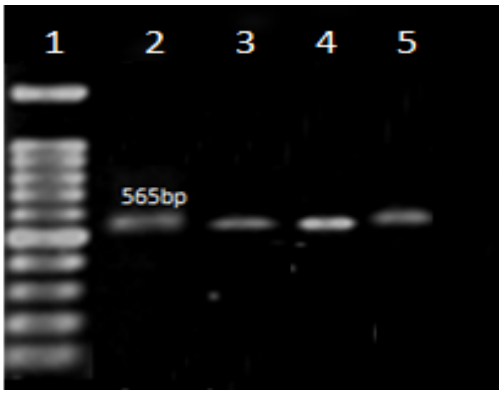
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

میزان حساسیت واکنش PCR: پس از تهیه رقت از ژنوم ETEC با غلظت ۷۸ نانوگرم در میکرولیتر واکنش برای هریک از رقت ها همان طور که در شکل شماره ۴ مشاهده می شود تا رقت 10^{-7} از DNA ژنومیک انجام شد(ستون ۶). با توجه به این که غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه ۷۸ نانوگرم در میکرولیتر بوده پس حساسیت واکنش برابر ۷/۸ پیگوگرم در میکرولیتر خواهد بود.



شکل شماره ۴. ژل آگاروز مربوط به تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومی ETEC
ستون ۱ نشانگر اندازه DNA (100 bp)، ستون ۲ تا ۸ رقت های ۱-۱۰ تا ۷-۱۰ می باشد
که در رقت انتهایی غلظت DNA برابر ۷/۸ پیکوگرم در میکرولیتر می باشد.

در این مطالعه از ۹۰ نمونه مدفوع اسهالی مورد بررسی، ۵۰ جدایه با هویت اشریشیاکلی جدا گردید. از ۵۰ جدایه اشریشیاکلی، ۴ سویه(۸ درصد) حاوی ژن توکسین LT که ۳ مورد(۶ درصد) با جنسیت دختر و ۱ مورد(۲ درصد) با جنسیت پسر بوده است(شکل شماره ۵).

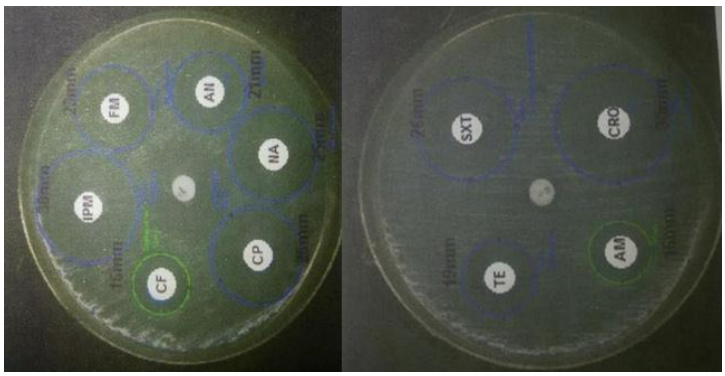


شکل شماره ۵. تصویر ژل آگاروز مربوط به نمونه های بالینی آلوده به ژن lt
ستون ۱ نشانگر اندازه DNA (100 bp)، ستون ۲ کنترل مثبت، ستون ۳ تا ۵
محصول PCR ژن LT از نمونه های بالینی مثبت

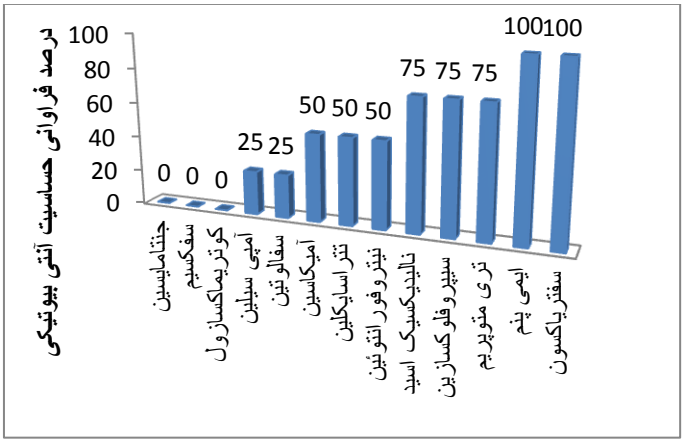
نتایج تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی سویه های مثبت حاوی ژن توکسین LT نشان داد که از ۴ ایزوله حاصله تمامی جدایه ها نسبت به کوتریماکسازول، سفکسیم و جنتامایسین مقاوم بودند. تمام سویه های ETEC حاوی ژن LT نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریماکسازول(۱۰۰ درصد)، سفکسیم(۱۰۰ درصد) و جنتامایسین(۱۰۰ درصد) مقاوم بوده اند. هم چنین این سویه ها نسبت به سفتریاکسون(۱۰۰ درصد)، ایمیپنم (۱۰۰ درصد) تریمتوپریم، سولفامتاکسازول(۷۵ درصد)، سیپروفلوکسازین(۷۵ درصد)، نالیدیکسیک اسید ۷۵ درصد، نیتروفورانتوئین(۵۰ درصد)، تتراسایکلین(۵۰ درصد)، آمیکاسین(۵۰ درصد) دیسک های آمپی سیلین (۲۵ درصد) و سفالوتین(۲۵ درصد) حساسیت نشان دادند(شکل شماره ۶ و نمودار شماره ۱).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]



شکل شماره ۶. حساسیت دیسک های آنتی بیوتیکی نسبت به سویه های مثبت حاوی ژن LT توکسین



نمودار شماره ۱. الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک جدا شده از نمونه های بالینی

بحث و نتیجه گیری

انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی از عوامل اصلی اسهال عفونی و یکی از عمده ترین مشکلات بهداشتی جوامع در سطح جهان به شمار می آید که هر ساله سبب مرگ تعداد زیادی از مردم به ویژه کودکان کمتر از ۵ سال در کشورهای در حال توسعه می شود. اسهال از طریق طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها شامل ویروس ها، باکتری ها و انگل ها ایجاد می شود. عوامل ایجادکننده اسهال در کشورهای مختلف متغییر است. به گونه ای که در کشورهای توسعه یافته ویروس ها از مهم ترین عوامل ایجاد بیماری اسهالی بوده، در حالی که سویه اشریشیاکلی ETEC که از پاتوژن های باکتریایی روده به حساب می آید یکی از مهم ترین سویه مولد اسهال در مسافرین مناطق گرمسیری و اندمیک در سراسر دنیا می باشد(۱۳). آلودگی به ETEC باعث ایجاد اسهال آبکی در افراد شده و دوره آن تقریباً یک هفته می باشد. در عفونت، ابتدا ETEC از طریق حداقل ۲۵ فاکتور کلونیزاسیون مختلف و فیمبریه به اپی تلیوم روده کوچک متصل می شوند. پاتوتایپ ETEC ممکن است یک یا تمام انتروتوکسین ها شامل LT، ST-P و ST-H را بیان کنند. انتروتوکسین با اتصال به رسپتور مخصوص در سطح اپی تلیال باعث ایجاد تغییراتی در این سلول ها می شوند و باعث مهار جذب سدیم و تحریک ترشح کلر و مانع از ترشح آب به لومن روده کوچک شده و موجب ایجاد اسهال آبکی می شوند. انتروتوکسین ها و فاکتورهای کلونیزاسیون از فاکتورهای ویرولانس اختصاصی در ETEC هستند که آن ها را از سایر گروهه ای اشریشیاکلی ایجادکننده اسهال متمایز می سازد(۹). انتروتوکسین LT یک مولکول هتروهگزامر AB5 است که از لحاظ ساختاری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

تقریباً ۸۵ درصد اسیدهای آمینه آن مشابه با توکسین ویبریو کلرا می باشد. از طریق زیر واحد B با گانگلیوزیدهای GM-1 در سطح اپی تلیال روده متصل شده و با واسطه آندوسیتوز وارد سلول می شود. زیر واحد A دارای فعالیت توکسیک بوده و با فاکتورهای ADP ریبوزیله کننده واکنش داده و با فعالیت آنزیمی خود ADP ریبوز را به Gsa منتقل می کند که این عمل موجب مهار فعالیت GTP آزی و فعالیت دائمی آدنیلات سیکلاز و متعاقباً افزایش cAMP، مهار جذب سدیم و تحریک ترشح کلرید از سلول های راسی ویلی و ایجاد اسهال می گردد(۱۴،۱۵). از آن جایی که آلودگی با سویه ETEC مهم ترین عامل ایجادکننده اسهال در نوزادان و کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه و به عنوان یک تهدید جدی برای سلامت در کشورهای دنیا، حتی پیشرفته محسوب می شود. لذا روش های شناسایی سویه ETEC و نحوه پیشگیری و درمان از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. تا به امروز روش های متعددی شامل روش های کشت کلاسیک، سرولوژی و مولکولی PCR جهت شناسایی LT و یا ژن مربوط به آن استفاده می شود. کشت سلولی اگر چه از حساسیت بالایی در شناسایی توکسین برخوردار می باشد اما مانند روش کشت سنتی دارای معایبی است که می توان به آهسته و وقت گیر بودن آن، نیاز به تجربه و مهارت های خاص در استانداردسازی این روش اشاره نمود؛ و علاوه بر آن به امکاناتی نظیر آنتی توکسین مخصوص جهت خنثی سازی آزمایش نیاز دارد. در چند سال گذشته روش الایزا با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال یا پلی کلونال تخلیص شده با روش Affinity به عنوان لیگاندهای دریافت کننده این توکسین برای شناسائی مستقیم توکسین LT در نمونه های مدفوع طراحی شده که این روش نیز دارای نقش بالقوه ای در تشخیص توکسین LT بوده چرا که می تواند حضور توکسین LT را تشخیص دهد. علی رغم این که این آزمایش بسیار سریع بوده و در هر آزمایشگاهی قابل انجام و نتیجه آن در کمتر از یک روز مشخص می شود با این وجود به دلیل نیاز به آنتی بادی های مونوو پلی کلونال ضد توکسین و صرف هزینه زیاد استفاده چندانی از این روش نمی شود. اگر چه محققین یکی پس از دیگری سعی در برطرف نمودن معایب روش های یاد شده نموده اند ولی تلاش برای روش های جدیدی که در آن برخی از معایب روش های قبلی برطرف شده باشد و یا نسبت به روش های قبل از حساسیت و سرعت عمل بیشتری برخوردار باشد، پیوسته مد نظر محققین بوده است(۱۶).

در سال های اخیر با توجه به پیشرفت های صورت گرفته در زمینه ملکولی، یکی از روش های شناسایی سویه ETEC روش ملکولی PCR است که این روش از دقت و حساسیت بسیار بالایی برای شناسایی ژن بیماری زا بر خوردار می باشد. لانگ و همکاران در سال ۱۹۹۴(۱۷) و اومیارا و همکاران در سال ۱۹۹۵ (۱۸)، اسفندیاری و همکاران در سال ۱۳۹۴(۱۲) این تحقیقات را بر روی نمونه های انسانی انجام دادند. هم چنین آزمایشاتی روی نمونه های گوساله برای شناسایی این باکتری صورت گرفته است، Kaura و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۱۹)، Sharma و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۰)، Wani و همکاران در سال ۲۰۰۴(۲۱) و هم چنین Rajkhowa و همکاران در سال ۲۰۰۸(۲۲)، پورتقی در سال ۱۳۸۹(۲۳) با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی که برای ژن LT طراحی شده بود توانستند توکسین LT را در گوساله شناسایی نمایند. ما در این تحقیق ازروش PCR جهت شناسایی سریع و اختصاصی سویه ETEC به عنوان یک روش شناسایی روتین استفاده نمودیم. جهت راه اندازی این روش اولین اقدام جداسازی DNA بود که بدین منظور چندین فاکتور برای انتخاب متد استخراج مد نظر قرار گرفت از جمله حجم نمونه، حساسیت متد، سمیت مواد، مدت زمان استخراج و وسایل اختصاصی مورد نیاز و در دسترس، با توجه به این موارد و بررسی مقالات و روش های موجود برای استخراج DNA پرداختیم تا با استفاده از آن روشی ساده و مقرون به صرفه طراحی و بهینه نماییم که روش Boiling به عنوان روشی ساده، آسان و ارزان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۵۰ نمونه بالینی با هویت اشریشیاکلی با ردیابی ژن LT در ۴ مورد(۸ درصد) ETEC شناسایی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

گردید؛ که ۳ مورد(۶ درصد) با جنسیت دختر و ۱ مورد(۲ درصد) با جنسیت پسر بود. جعفری و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۴) میزان شیوع سویه ETEC را ۱۲/۷ درصد و Vilchez(۲۵) و همکاران در نیکاراگوئه در سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ شیوع عفونت ETEC در نوزادان را ۲۰/۵ درصد گزارش نموده و نشان دادند که بین ابتلاء به ETEC و ایجاد اسهال ارتباط معناداری وجود دارد. Nessa و همکاران در سال ۲۰۰۷(۲۶) میزان شیوع سویه ETEC در کودکان مبتلا به اسهال در کشور بنگلادش را ۲۴/۳ درصد گزارش نمود. گزارش Amisano و همکاران در سال ۲۰۰۸(۲۷) میزان شیوع ژن بیماری زای LT را ۰/۵ درصد اعلام نمودند. مطالعه Arif و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۸) در عراق که شیوع ETEC در کودکان زیر ۵ سال را ۱۰/۵ درصد نشان داد. نتایج مطالعات مختلف بیانگر آنست که میزان شیوع ETEC در کشورهای مختلف متغییر می باشد. این اختلاف احتمالاً به نوع پرایمر اختصاصی به کار رفته، روش مولکولی و اقلیم جغرافیایی و رعایت بهداشت عمومی ارتباط داشته باشد. هر چند در این مطالعه تعداد محدودی از نمونه ها بررسی شده است لذا برای دستیابی به نتایج صحیح تر نیاز است تا به طور گسترده در نقاط مختلف کشور مطالعات صورت گیرد تا بتوان از نتایج حاصل قضاوت صحیح تری در مورد میزان شیوع ژن بیماری زای lt ارائه نمود. نتایج نشان می دهد که روش های مولکولی همانند استفاده از تکنیک PCR نسبت به روش های کشت و سنتی در تشخیص دقیق تر و سریع تر می باشد.

نزدیک به ۵۰ سال است که برای مقابله با سویه های ETEC از آنتی بیوتیک های دوکسی سیکلین و تریمتوپریم-سولفامتوکسازول استفاده می شود که این باکتری ها نسبت به این آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند؛ اما مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها باعث شد تا از داروهای جدیدتری بر علیه این سویه استفاده شود؛ که برخی سویه های ETEC نسبت به این داروها نیز مقاومت نشان دادند. پژوهش های اخیر در ایران سویه های ETEC با مقاومت چندگانه جداسازی گردید. مطالعه کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۲ نشان داد که تمامی سویه های ETEC جداسازی شده به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین حساس و نسبت به پنی سیلین و ماکرولیدها مقاومت داشتند. هم چنین نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان می دهد که سویه های جداسازی شده مقاومت چند دارویی به ۴، ۵ و ۹ گروه آنتی بیوتیکی به ترتیب ۷۱/۴ درصد، ۱۴/۳ درصد و ۱۴/۳ درصد داشتند(۲۹). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ در هند و بنگلادش انجام شد نشان می دهد که سویه های ETEC دارای مقاومت چندگانه می باشد. نتایج حاکی از مقاومت چند دارویی نسبت به اریترومایسین، آمپی سیلین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، داکسی سیلین می باشد(۳۰). مطالعه کلانتر و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان می دهد که سویه های اشریشیاکلی جداسازی شده از کودکان نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، کلرامفنیکل، آمپی سیلین و سفکسیم به ترتیب ۸۹/۷، ۸۸/۶، ۷۹/۴ و ۷۵/۹ درصد مقاومت نشان دادند(۳۱). اما نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های ETEC جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون(۸۵ درصد)، ایمیپنم(۸۰ درصد)، تریمتوپریم سولفامتاکسازول(۸۰ درصد)، سیپروفلوکسازین(۷۵ درصد)، نالیدیکسیک اسید(۷۰ درصد)، نیتروفورانتوئین(۶۸ درصد)، تتراسایکلین(۵۰ درصد)، آمیکاسین(۴۶ درصد)، آمپی سیلین(۲۳ درصد) و سفالوتین(۲۴ درصد) مقاومت داشته است. اما نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریماکسازول، سفکسیم و جنتامایسین کاملاً مقاوم بوده اند. نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر محققان تا حدود زیادی متفاوت می باشد؛ که این تفاوت ممکن است به الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها در نقاط مختلف کشور و جهان ارتباط داشته باشد. از این رواین مسائل می تواند به عنوان یک زنگ خطر در مورد شیوع سویه های ETEC در کشور در نظر گرفته شود.

این مطالعه نشان می دهد که سویه های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک در انتشار مقاومت و ایجاد اسهال کودکان زیر ۵ سال بسیار با اهمیت هستند و باید در درمان عفونت های ناشی از آن ها به این مهم توجه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

داشت تا این فرآیند به حداقل کاهش یابد. هم چنین این مطالعه نشان داد با توجه به تنوع در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و افزایش روز افزون مقاومت این پاتوتایپ نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بایستی در مصرف این آنتی بیوتیک ها دقت و به منظور درمان و جلوگیری از گسترش اسهال ناشی از این سویه های مقاوم در کودکان انجام آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی بیوتیک انجام گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه خانم فاطمه مدانلو دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا... آملی می باشد. لذا از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا... آملی و تمامی کسانی که در انجام پژوهش همکاری نمودند تشکر و قدرانی می گردد.

References

1.Nicklasson M, Sjoling A, Lebens M, Tobias J, Janzon A, Brive L, et al. Mutations in the Periplasmic chaperone leading to loss of surface expression of the colonization factor CS6 in enterotoxigenic Escherichia coli clinical isolates. Microbiol Pathol 2008;44:246-54.

2.Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Bradleysack R. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries epidemiology microbiology clinical features,treatment and prevention. Clin Microbiol Rev 2005;18:465-83.

3.Menezes CA, Imamura SY, Trabulsi LR, Fernandesfilho A, Martinez MB, Guth BE, et al. production characterization and application of antibodies against heat labile type I toxin for detection of enterotoxigenic Escherichia coli. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:875-80.

4.Millar DG, Hirst TR. Cholera toxin and Escherichia coli enterotoxin B subunits inhibit macrophage mediated antigen processing and presentation evidence for antigen persistence in Non acidic recycling endosomal compartments. Cell Microbiol 2001; 3:311-29.

5.Sizemore DR, Roland KL, Ryan US. Enterotoxigenic Escherichia coli virolance factors and vaccine approaches. Expert Rev Vaccines 2004; 3:585-95.

6. Eric AB, Hardwidge PR. Biochemical characterization of the enterotoxigenic Escherichia coli Leo A protein. Microbiol 2007;153:3776-84.

7. Steinsland H, Valentinerbranth P, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Clonal relatedness of enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from a cohort of young children in Guinea Bissau. J Clin Microbiol 2004; 42: 3100-7.

8.Merritt EA, Pronk SE, Sixma TK, Kalk KH, Zanten BA, Hol WG. Structure of partially activated E. coli heat labile enterotoxin at 2.6 A resolution. FEBS Lett 1994; 337:88-92.

9. Svennerholm AM, Tobias J. Vaccine against Enterotoxigenic Escherichia coli. Expert Rev Vaccines 2008;7:795-804.

10.Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. Microbes Infect 2010;12:89-98.

11. Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic Escherichia coli disease. Vaccine 2007; 25:2545-66.

12.Esfandiari P, Amani J, Imanifooladi AA, Forghanifard MM, Mirhossaini SA. [Detection of heat-labile toxin in enterotoxigenic Escherichia coli using PCR-ELISA technique]. J Gorgan Uni Med Sci 2015;17:114-21.(Persian)

13. Shams Z, Tahamyan Y, Pourbakhsh A, Hosseiny MH, Kargar M, Hayati M. Detection of entrotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal samples of calves by molecular and serological method. Com Clin Pathol 2010;2:81-6.

14. Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli identification and haracterization. J Infect Dis 1980:142:279-86.

15. James M. Fleckenstein, Alaullah S. Designing vaccines to neutralize effective

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

toxin delivery by enterotoxigenic Escherichia coli. Toxins 2014; 6: 1799-812.
16.March SB, Ratnam S. Sorbitol macconkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869-72.
17.Leelang A, Tsai YL, Mayer CL, Patton KC, Palmer CJ. Multiplex PCR for detection of the heat labile toxin gene and shiga like toxin I and II genes in Escherichia coli isolated from natural waters. Appl Environ Microbiol 1994; 60:3145-9.
18. Omeara D, Oshaughnessy E, Cryan B, Fanning S. Escherichia coli by PCR.toxin encoding gene of enterotoxigenic Colorimetric detection of heat labile. J Clin Microbiol 1995; 33:1957-60.
19.Kaura YK, Minakshikumar T, Chaturvedi GC. Characteristics of Escherichia coli strains isolated from diarrhoeic buffalo and cow calves. Ind J Microbiol 1991; 31:33-47.
20.Sharma DK, Soni SS, Kashyap SK, Shringi BN. Seroprevalence antibiotic sensitivity pattern and transfer of plasmid coded characters of Escherichia coli. Indian Vet J 2004; 81: 6-8.
21.Shakil A, Waniasifa N, Iffiat F, Irfan A, Yoshikazu N, Khursheed Q, et.al. Investigation of diarrhoeic faecal samples for enterotoxigenic, Shiga toxin-producing and typical or atypical enteropathogenic Escherichia coli in Kashmir India. FEMS Microbiol Let 2006;261: 238-44.
22. Rajkhowa S, Hussain C. Detection of heat stable and heat labile enterotoxin genes of Escherichia coli in diarrhoeic faecal samples of mithun calves by polymerase chain reaction. J Appl Microbiol 2009; 106: 455-8.
23. Pourtaghishotorban H. Dahpahlevan V. Shaghayegh A, Badiee A. [Molecular detection of diarrheagenic entrotoxigenic Escherichia coli from calves fecal samples in Alborz province]. J Vet Clin Res 2011;233-8. (Persian)
24.Jafari F, Garsia_Gil LJ, Salmanzadeh_Arabi S, Shokorzadeh L, Aslani MM,Pourhoseingholi MA,et al. Diagnostic and prevalence of entropathogenic bacteria in children less 5 years of age with acute diarrhea in Tehran chidren's hospital. J Infec 2009;58:21-27
25.Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from Leon Nicaragua. J Med Microbiol 2009;58:630-7.
26. Nessa K, Ahmed D, Islam J, Kabir FL, Hossain MA. Usefulness of a multiplex PCR for detection of diarrheagenic Escherichia coli in a diagnostic microbiology laboratory setting. Bangladesh J Med Microbiol 2007;1:38-42.
27.Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F. Diarrheagenic Escherichia coli in acute gastroenteritis in infants in North West Italy. New Microbiol 2011;34:45-51.
28. Arif K, Salih L. Identification of different categories of diarrheagenic Escherichia coli in stool samples by using multiplex PCR technique. Asian J Med Sci2010;2:237-43.
29. Kargar M, Abbasi P, Doosti A, Ghorbanidalini S. [Identification of enterotoxigenic Escherichia coli strains in children under 2 years of age by real time PCR in Shiraz]. SJKU 2013;18: 29-38.(Persian)
30. Tobias J, Svennerholm AM. Strategies to overexpress enterotoxigenic Escherichia coli colonization factors for the construction of oral whole cell inactivated ETEC vaccine candidates. Appl Microbiol Biotechnol2012; 93:2291-300.
31. Kalantar E, Alikhani MY, Naseri MH, Torabi V. Antibiotic resistance patterns of STEC and ETEC strains: A study on frozen foods of animal origin and children with acute diarrhea. J Microbiol Infect Dis 2013; 3: 31-5.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]

Detection of Heat-labile Toxin and Evaluation of Antibiotic Resistance in Enterotoxigenic Escherichia Coli Isolated from Samples of Diarrhea in Children below 5 Years Old in Sari

Fattahi E[1], Modanlou F[1], Amani J[2], Ahmadpour A[1]*

(Received: August 15, 2016 Accepted: October 4, 2016)

Abstract

Introduction: Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is the most important agent which causes acute bacterial diarrhea throughout the world. ETEC binds to the intestinal mucosa and produce heat-labile enterotoxin (LT) and heat-stable toxin (ST), causinh disease in humans, especially in children. The present study was done for detection of heat-labile toxin and evaluation of antibiotic resistance in ETEC.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 90 stool samples for the isolation of Escherichia coli in children below 5 years-old were collected. At first, strains of E. coli, using biochemical tests, were isolated and the prevalence of ETEC strains and presence of gene LT toxin was, using PCR technique, investigated. Then, antibiotic sensitivity was studied by disk diffusion method.

Findings: Out of the 50 Escherichia coli isolates, 4 strains (8%) were containing LT toxin gene. All the strains ETEC containing LT toxin were quite resistant to antibiotics cotrimoxazole, cefixime, gentamicin (100%). Also, these strains proved to be sensitive to ceftriaxone, imipenem (100%), trimethoprim- sulfamethoxazole, ciprofloxacin, nalidixic acid, nitrofurantoin, tetracycline, amikacin (50%), ampicillin (25%), cefalotin (25%).

Discussion & Conclusions: The results showed that ETEC strain in the area of the outbreak is widespread. Therefore, application of rapid diagnostic techniques and precise molecular PCR and antibiotic resistance pattern can reduce diarrheal infections and help health promotion to prevent child deaths.

Keywords: Enterotoxigenic Escherichia coli, diarrhea, antibiotic resistance, PCR

1. Dept of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**Corresponding author Email: esmail_fattahy@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.164]