مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۳/هفته دوم فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۷

شناسایی مولکولی و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین اشریشیاکلی در کودکان زیر ۵ سال شهر یاسوج

دکتر محمد کارگر[۱]، وحید آیین[۲]، دکتر عباس دوستی[۳]، محسن غلامی[۲]، مریم همایون[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی اسهال و همچنین بیماری‌هایی نظیر سندرم اورمی همولیتیک (HUS یا Hemolytic uremic syndrome) و کولیت هموراژیک (HC یا Hemorrhagic colitis) می‌باشند. هدف از این پژوهش، بررسی شیوع سویه‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین و ژن‌های بیماری‌زای آن در کودکان زیر ۵ سال شهر یاسوج می‌باشد.

روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۳۰۰ نمونه‌ی مدفوع اسهالی از کودکان زیر ۵ سال شهرستان یاسوج انجام شد. پس از تشخیص اولیه‌ی باکتری اشریشیاکلی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، ویروتیپ (STEC یا Shiga toxigenic Escherichia coli) با ارزیابی ژن‌های eaeA، stx_1 و stx_2 توسط تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) چندگانه شناسایی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standards institute) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در نمونه‌های مورد پژوهش، فراوانی ویروتیپ STEC، ۱۰۴ مورد (۳۴/۷ درصد) بود. از سویه‌های شناسایی شده ۱۴ مورد (۱۳/۵ درصد) ژن stx_1، ۳۱ مورد (۲۹/۸ درصد) ژن stx_2، ۹ مورد (۸/۷ درصد) ژن‌های stx_1-stx_2، ۱۲ مورد (۱۱/۵ درصد) ژن‌های eaeA- stx_1، ۲۵ مورد (۲۴ درصد) ژن‌های eaeA-stx_2 و ۱۳ مورد (۱۲/۵ درصد) هر سه ژن eaeA-stx_1-stx_2 را دارا بودند. با بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص شد که سویه‌های جداسازی شده، بیشترین میزان حساسیت را به آنتی بیوتیک ایمی‌پنم و بیشترین مقاومت را به آنتی بیوتیک سفتی زوکسیم دارند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های اشریشیاکلی تولید کننده‌ی شیگاتوکسین در منطقه‌ی مورد پژوهش شیوع گسترده‌ای دارند. با توجه به تنوع ژنتیکی سویه‌های جداسازی شده، پایش گسترده‌ی بیمارستانی این ویروتیپ با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی تولید کننده‌ی شیگاتوکسین، Polymerase chain reaction چندگانه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: کارگر محمد، آیین وحید، دوستی عباس، غلامی محسن، همایون مریم. **شناسایی مولکولی و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین اشریشیاکلی در کودکان زیر ۵ سال شهر یاسوج.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۳): ۷۸-۶۷

مقدمه

بیماری اسهال یکی از علل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. سالانه حدود ۲۵ میلیون عفونت روده‌ای اتفاق می‌افتد و برآورد می‌شود حدود ۵-۳ میلیون از این موارد، منجر به مرگ شود. انواع متفاوتی از سویه‌های اشریشیاکلی ایجاد کننده‌ی

۱- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، مرودشت، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد کارگر
Email: mkargar@jia.ac.ir

اسهال (DEC یا Diarrheagenic Escherichia coli) در این بیماری نقش دارند و کودکان نیز توسط تیپ‌های متفاوتی درگیر می‌شوند (۲-۱). در جریان شیوع اسهال خونی، اشریشیاکلی تولید کننده‌ی شیگاتوکسین (Shiga Toxigenic Escherichia coli یا STEC)، به عنوان یکی از سویه‌های مهم ایجاد کننده‌ی اسهال شناسایی شد که بیماری‌هایی مانند کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک و به ویژه نارسایی های حاد کلیوی در کودکان را ایجاد می‌کند (۴-۳).

با وجود این که چندین سویه‌ی اشریشیاکلی توانایی ایجاد کولیت‌های هموراژیک در انسان را دارند، اما سروتیپ O۱۵۷:H۷ مهم‌ترین سروتیپ شناسایی شده است (۵). این باکتری دارای مخازن بسیاری در بین حیوانات مختلف است و تماس با حیوانات یکی از مهم‌ترین راه‌های انتقال باکتری می‌باشد. البته گاوسانان به عنوان مخزن اصلی این باکتری محسوب می‌شوند. بنابراین، آلودگی با این سروتیپ، اغلب به علت استفاده از محصولات گاوی مانند گوشت چرخ شده، همبرگر، شیر و فراورده‌های آن ایجاد می‌شود (۷-۶).

این ویروتیپ دو توکسین قوی به نام توکسین‌های مشابه شیگا (Shiga like toxin) SLT_1 و SLT_2 و یا شیگاتوکسین stx_1 و stx_2 را تولید می‌کند که ژن‌های آن توسط فاژ کد می‌شوند. این توکسین ها دارای اثرات سیتوپاتیک بر روی سلول‌های اپی‌تلیال روده هستند و در ایجاد اسهال خونی نقش دارند (۸-۷). برخی از سویه‌ها یکی از این دو نوع توکسین و برخی دیگر هر دو نوع توکسین را تولید می‌کنند. نقش SLT_2 در ایجاد بیماری، مهم‌تر از SLT_1 است و احتمال دارد این مسأله به دلیل سطح بالاتر نسخه‌برداری از ژن stx_2 در بدن باشد (۹). از دیگر عوامل بیماری‌زای سویه‌های STEC، یک پروتئین ۹۴ کیلو دالتونی غشای خارجی به نام اینتیمین (Intimin) است که مسؤول اتصال باکتری به روده می‌باشد.

به ژن کد کننده‌ی این پروتئین eaeA (E. coli attaching and effacing) می‌گویند. وجود ژن eae در سویه‌های STEC به وضوح با خطر افزایش اسهال خونی در انسان همراه می‌باشد (۱۰).

شدت بیماری‌زایی سویه‌های STEC تنها وابسته به عوامل بیماری‌زای آن‌ها نیست؛ بلکه به توانایی بالای این پاتوژن‌ها برای زندگی در شرایط سخت و تنش‌های محیطی مانند مقاومت به pH پایین سیستم گوارش نیز ارتباط دارد. در بین سروتیپ‌های STEC، سروتیپ O۱۵۷:H۷ بیشتر در موارد همه‌گیری مشاهده می‌شود و بیماری‌زایی شدیدی دارد. اما سایر سروتیپ‌ها ممکن است موجب عفونت‌های انسانی با شدت کمتر و متفاوتی شوند. این تفاوت در کمیت و کیفیت بیماری‌های ایجاد شده توسط سویه‌های STEC باعث تقسیم‌بندی‌های جدید شده است که یکی از ساده‌ترین این تقسیم‌بندی‌ها، تقسیم STEC به دو سروتیپ اشریشیاکلی O۱۵۷ و غیر O۱۵۷ می‌باشد (۱۱).

تشخیص آزمایشگاهی عفونت STEC توسط روش‌هایی مانند استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، سنجش‌های سرولوژیکی، کشت سلولی و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR یا Polymerase chain reaction) امکان پذیر است (۱۲). تشخیص این باکتری، با توجه به عدم توانایی تخمیر سوربیتول با استفاده از محیط کشت سوربیتول

مک کانکی آگار (Mac Conkey agar) به عنوان یک محیط متمایز کننده همراه با سفیکسیم و تلوریت پتاسیم (Agar Cefixime tellurit-sorbitol MacConkey یا CT-SMAC) انجام می‌شود.

همچنین با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی دیگری مانند Rainbow آگار، CHROM آگار و ID O۱۵۷:H آگار نیز امکان جداسازی سویه‌ی O۱۵۷ وجود دارد (۱۴-۱۳، ۱). تعیین هویت سویه‌های STEC را می‌توان با استفاده از روش‌های سرولوژی و شناسایی شیگاتوکسین تشخیص داد. همچنین روش بررسی توکسیسیته‌ی سلولی، با استفاده از رده‌های سلولی HeLa و Vero روش بسیار حساسی است؛ زیرا این رده‌های سلولی میزان زیادی از Gb۳ و Gb۴ را دارند که گیرنده‌های شیگاتوکسین هستند. آزمایش‌های خنثی‌سازی نیز با استفاده از آنتی بادی‌های ضد SLT_1 و SLT_2 انجام می‌شود، اما بر خلاف حساسیت بسیار بالای این آزمایش‌ها به صورت متداول از آن‌ها استفاده نمی‌شود. آزمون PCR یک روش مناسب برای شناسایی سویه‌های STEC است که مانند روش‌های سرولوژی، به طور مستقیم بر روی نمونه‌ی مدفوع قابل انجام است. هر چند که به دلیل حساسیت پایین استفاده از نمونه‌های مستقیم مدفوع برای PCR پیشنهاد نمی‌شود (۱۳).

سویه‌های STEC، تنها پاتوتایپ مشترک انسان و دام (Zoonotic) اشریشیاکلی می‌باشند و بیش از ۳۸۰ سروتیپ آن تا کنون از انسان جدا شده است. البته اکثر بیماری‌های انسانی توسط تعداد کمی از سروتیپ‌ها ایجاد می‌شود و ارتباط مستقیمی با مکان و فصل شیوع دارد. پس از O۱۵۷، سروتیپ‌های O۲۶، O۴۵، O۹۱، O۱۰۳، O۱۱۱، O۱۱۳، O۱۲۱ و O۱۴۵ عامل بیشترین موارد STEC هستند (۱۳، ۱۱).

متأسفانه با وجود اهمیت بیماری‌زایی سویه‌های STEC و به ویژه سروتیپ O۱۵۷ :H۷ پژوهش‌های محدودی در مورد پایش دقیق این ویروتیپ در ایران انجام شده است. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی شیوع و بررسی ژن‌های بیماری‌زای STEC و همچنین بررسی تظاهرات بالینی و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی مرتبط با آن در کودکان زیر ۵ سال شهرستان یاسوج انجام گرفت.

روش‌ها

نمونه‌گیری: در یک مطالعه‌ی مقطعی- توصیفی و طی یک دوره‌ی ۶ ماهه، تعداد ۳۰۰ نمونه‌ی مدفوع از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر یاسوج از بهمن ماه سال ۱۳۹۰ تا پایان تیر ماه سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. مراکز درمانی مورد پژوهش، بیمارستان امام سجاد (ع) (بیمارستان مرجع اطفال استان کهگیلویه و بویراحمد) و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر یاسوج بودند. نمونه‌ها به فاصله‌ی چند ساعت پس از جمع‌آوری مورد بررسی قرار گرفتند. در تمامی نمونه‌ها، اطلاعات کلینیکی مربوط به هر بیمار نیز در پرسش‌نامه‌ی تنظیمی ثبت گردید.

جداسازی باکتری: نمونه‌های مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده، ابتدا بر روی محیط‌های مک کانکی، بلاد آگار (Blood agar)، EMB (Eosin-Methylene Blue Agar) و XLD (Xylose lysine deoxycholate agar) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌های

محیط کشت از نظر وجود باکتری اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین هویت کلنی‌های مشکوک به اشریشیاکلی، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی TSI (Triple sugar iron)، SIM (Sulfur indole motility)، MR/VP (Methyl red/ Voges-Proskauer)، سیمون سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز (تمامی محیط‌های کشت مربوط به شرکت Merck آلمان) انجام شد. سپس سویه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده در میکروتیوب‌های حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB یا Tryptic soy broth) واجد گلیسرول ۲۰ درصد استریل در دمای ۲۰- °C نگهداری گردید (۱۶-۱۵).

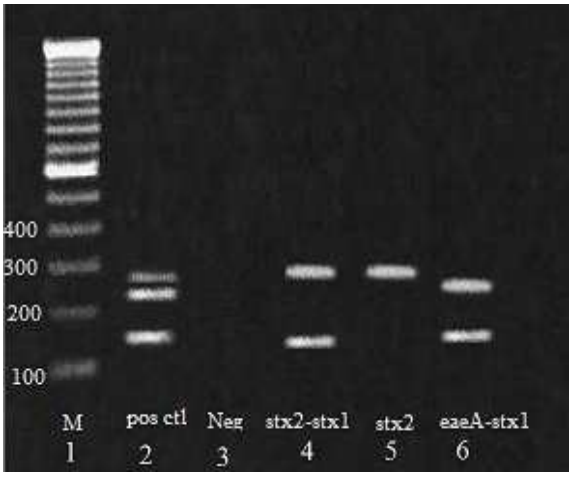
بررسی ژن‌های بیماری‌زا: سویه‌های اشریشیاکلی در محیط مولر هینتون آگار (Müller-Hinton agar) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) انجام گردید (۱۷). برای ردیابی همزمان ژن‌های بیماری‌زا، از روش PCR چندگانه استفاده شد (۱۸). توالی پرایمرهای مورد استفاده، توسط نرم‌افزار Gene Runner مورد بررسی قرار گرفت. در جدول ۱ توالی الیگونوکلئوتیدی سه جفت پرایمر مورد استفاده برای ژن‌های هدف *eaeA*، stx_2 و stx_1 و اندازه‌ی محصولات نشان داده شده است.

آزمون PCR چندگانه در حجم نهایی ۲۵ µl، حاوی ۲ µl DNA الگو، ۲۰۰ µmol dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates)، ۱/۵ µmol، $MgCl_2$، ۱/۵ واحد DNA پلیمراز Taq (شرکت سیناژن، ایران)، ۰/۲ µmol از هر کدام از پرایمرها انجام شد (۲۰-۱۹). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با شرایط ۹۵ °C ۵ دقیقه (واسرشت‌سازی ابتدایی)، ۹۴ °C ۶۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۵۸ °C ۶۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ °C ۶۰ ثانیه (گسترش پرایمر) ۳۲ سیکل و ۷۲ °C ۳ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. در نهایت، ۱۰ ml از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل گردید و پس از الکتروفورز توسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. از سویه‌ی اشریشیاکلی ATCC۳۵۴۰۱ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور شناسایی ویروتیپ‌های اشریشیاکلی

ویروتیپ	ژن	توالی پرایمر ۵′→۳′	اندازه‌ی تکثیر (bp)	منبع
STEC EPEC	eaeA	F: ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG R: GCCTTCATCATTTCGCTTTC	۲۴۸	۲۹
STEC	stx_1	F: CTGGATTTAATGTCGCATAGTG R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	۱۵۰	۱۹
STEC	stx_2	F: GGCACTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	۲۵۵	۱۹

STEC: Shiga toxigenic Escherichia coli; EPEC: Enteropathogenic Escherichia coli



شکل ۱. نمایش ژن‌های بیماری‌زای شناسایی شده با روش PCR چندگانه بر روی ژل آگاروز. ۱: اندازه‌ی نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: شاهد مثبت، ۳: شاهد منفی، ۴: آمپلیکون ۲۵۵ جفت بازی ژن stx۲ و ۱۵۰ جفت بازی ژن stx۱، ۵: آمپلیکون ۲۵۵ جفت بازی ژن stx۲ ۶: آمپلیکون ۲۴۸ جفت بازی ژن eaeA و ۱۵۰ جفت بازی ژن stx۱

ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده، با روش استاندارد EUCAST-2011 CLSI

(Clinical and laboratory standard institute) CLSI کمیته‌ی اروپایی آزمون حساسیت ضد میکروبی (EUCAST-۲۰۱۱ یا European committee on antimicrobial susceptibility testing) (۲۲-۲۱)، نسبت به دیسک‌های‌های آنتی بیوتیکی سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، سفیکسیم (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتی‌زوکسیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۱۰ µg)، آمیکاسین (۴۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۵ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، تری متوپریم- سولفامتوکسازول (۱/۲۵ µg + ۲۳/۷۵)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، افلوکساسین (۱۰ µg) و نورفلوکساسین (۱۰ µg) با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی بازدارنده‌ی رشد و با توجه به دستور شرکت ROSCO کشور دانمارک ارزیابی شد. از سویه‌ی اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان شاهد استفاده گردید.

آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نسخه هیجدهم نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و Microsoft Excel ۲۰۱۰ و همچنین آزمون‌های χ^2 و Fisher's exact انجام گردید. مرز معنی‌داری بر روی $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

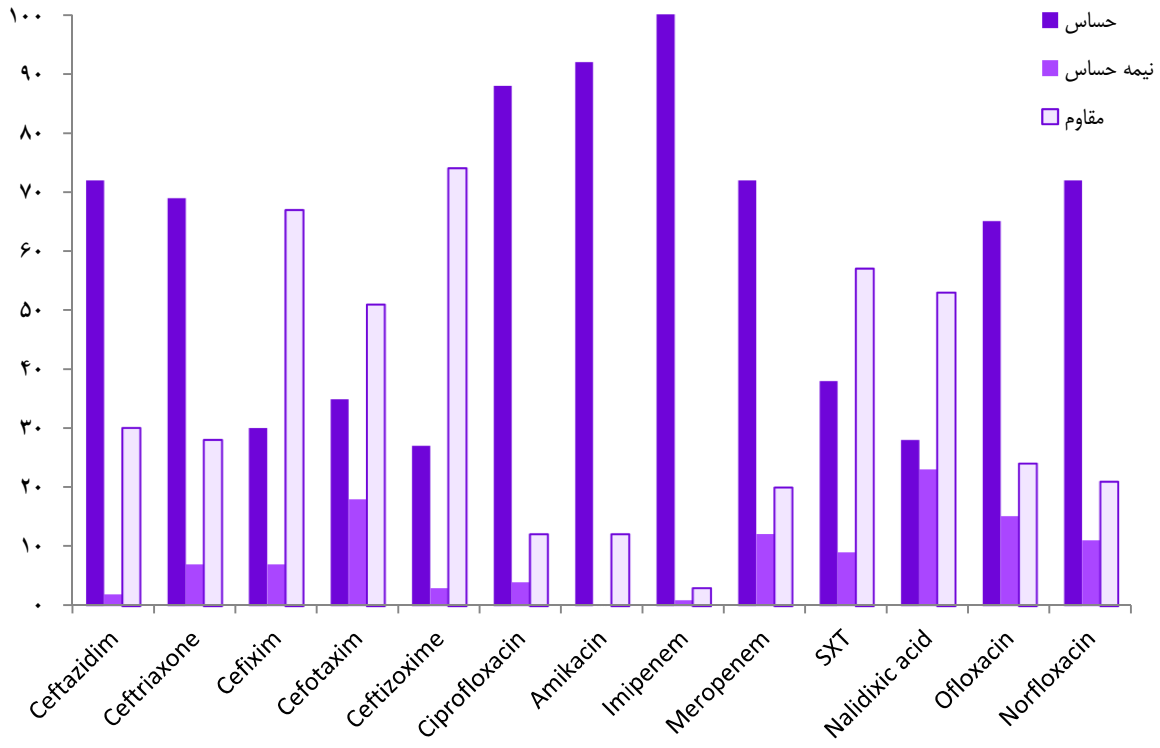
در این پژوهش تعداد ۳۰۰ نمونه‌ی مدفوع اسهالی از کودکان زیر ۵ سال در شهرستان یاسوج مورد مطالعه قرار گرفت. برای تفکیک کودکان زیر ۵ سال، گروه‌بندی سنی جمعیت مورد پژوهش به ۹ گروه سنی انجام شد (جدول ۲). از مجموع نمونه‌های مورد پژوهش، ۱۶۲ نمونه (۵۴ درصد) مربوط به پسران و ۱۳۸ نمونه (۴۶ درصد)، مربوط به دختران بود. بیشترین فراوانی DEC (Diarrheagenic Escherichia coli) در جنس پسر و دختر به ترتیب ۳۹ (۱۳ درصد) و ۳۷ (۱۲/۳ درصد) و در هر دو جنس مربوط به گروه سنی ۵-۳ ماه بود (جدول ۲). با استفاده از آزمون دو جمله‌ای مشخص گردید که بین بیماران پسر و دختر مورد پژوهش، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P = ۰/۱۸۴$). بیشترین میزان جداسازی DEC، مربوط به فروردین ماه با ۶۹ مورد جداسازی (۲۳ درصد) بود. از این تعداد، ۴۰ مورد (۱۳/۳ درصد) از پسران و ۲۹ مورد (۹/۶۶ درصد) از دختران جداسازی گردید. با استفاده از آزمون χ^2 مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین فصل و جنسیت وجود ندارد ($P = ۰/۰۹۶$).

در کل، با استفاده از روش مولکولی در ۱۰۴ نمونه (۳۴/۷ درصد) سویه‌های STEC شناسایی شد. از این تعداد، ۶۲ مورد (۵۹/۶ درصد) مربوط به نمونه‌های جدا شده از پسران و ۴۲ مورد (۴۰/۴ درصد) مربوط به دختران بود. با استفاده از آزمون χ^2 نشان داده شد که ارتباط معنی‌داری بین ویروتیپ STEC و جنسیت وجود ندارد (P = ۰/۵۲۷). از سویه‌های جدا سازی شده ۱۴ مورد (۱۳/۵ درصد) ژن stx_1، ۳۱ مورد (۲۹/۸ درصد) ژن stx_2، ۹ مورد (۸/۶ درصد) ژن‌های stx_1-stx_2، ۱۲ مورد (۱۱/۵ درصد) ژن‌های $eaeA$-stx_1، ۲۵ مورد (۲۴/۰ درصد) ژن‌های $eaeA$-stx_2 و ۱۳ مورد (۱۲/۵ درصد) ژن‌های $eaeA$-stx_1-stx_2 را داشتند. بین جنسیت (P = ۰/۱۸۳) و سن کودکان زیر پنج سال (P = ۰/۸۹۵) و شیوع STEC ارتباط معنی‌داری شناسایی نشد.

به دلیل جمع‌آوری تصادفی نمونه‌ها، توزیع فراوانی سویه‌های STEC در ماه‌های مختلف سال متفاوت بود. فراوانی باکتری‌های جداسازی شده در ماه‌های بهمن، اسفند، فروردین، اردیبهشت، خرداد و تیر به ترتیب ۱۸ (۱۷/۳ درصد)، ۲۰ (۱۹/۲ درصد)، ۲۲ (۲۱/۱ درصد)، ۲۲ (۲۱/۱ درصد)، ۱۳ (۱۲/۵ درصد)، ۹ (۸/۷ درصد) بود. با استفاده از آزمون χ^2 مشخص شد که بین ماه‌های مورد پژوهش و فراوانی سویه‌های STEC ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (P = ۰/۶۸۹). در کودکان مبتلا به STEC، ۵۲ نفر (۵۰ درصد) علایم اسهال خفیف، ۵۱ نفر (۴۹/۰ درصد) اسهال شدید، ۷۳ نفر (۷۰/۲ درصد) استفراغ و ۶۴ نفر (۶۱/۵ درصد) نیز علامت تب را نشان دادند. فراوانی ژنوتیپ‌های STEC در جدایه‌های بیمارستانی ۵۵ مورد (۵۲/۹ درصد) و در آزمایشگاه‌های خصوصی ۴۹ مورد (۴۷/۱ درصد) بود. با استفاده از آزمون Exact's Fisher مشخص شد که رابطه‌ی معنی‌دار بین مراکز درمانی و ژنوتیپ‌های STEC وجود ندارد (P = ۰/۹۴۰).

جدول ۲. توزیع فراوانی مطلق و نسبی جمعیت مورد پژوهش بر اساس جنسیت و گروه سنی

گروه سنی	پسر تعداد (درصد)	دختر تعداد (درصد)	جمع کل تعداد (درصد)
۰-۲	۱۲ (۴/۰۰)	۹ (۳/۰۰)	۲۱ (۷/۰۰)
۳-۵	۳۹ (۱۳/۰۰)	۳۷ (۱۲/۳۳)	۷۶ (۲۵/۳۳)
۶-۸	۳۳ (۱۱/۰۰)	۲۳ (۷/۶۶)	۵۶ (۱۸/۶۶)
۹-۱۱	۲۲ (۳۴/۰۰)	۱۴ (۴/۶۶)	۳۶ (۱۲/۰۰)
۱۲-۱۷	۲۲ (۷/۳۳)	۲۲ (۷/۳۳)	۴۴ (۱۴/۶۶)
۱۸-۲۳	۸ (۲/۶۶)	۷ (۲/۳۳)	۱۵ (۵/۰۰)
۲۴-۳۵	۱۳ (۴/۳۳)	۱۰ (۳/۳۳)	۲۳ (۷/۶۶)
۳۶-۴۷	۴ (۱/۳۳)	۴ (۱/۳۳)	۸ (۲/۶۶)
۴۸-۷۲	۹ (۳/۰۰)	۱۲ (۴/۰۰)	۲۱ (۷/۰۰)
جمع	۱۶۲ (۵۴)	۱۳۸ (۴۶)	۳۰۰ (۱۰۰)



شکل ۲. الگوی حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها در سویه‌های STEC (Shiga toxigenic Escherichia coli) جداسازی شده از کودکان شهر یاسوج

ارزیابی حساسیت سویه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی، نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین وجود دارد. همچنین بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب مربوط به سفتی‌زوکسیم، سفیکسیم و تری متوپریم-سولفامتوکسازول بود (شکل ۲).

بحث

اسهال همیشه به عنوان یک چالش بزرگ، سلامت انسان را تهدید می‌کند و نیاز به شناسایی پاتوژن‌های ایجاد کننده‌ی آن یک موضوع مهم در بحث سلامت است. عوامل باکتریایی حدود ۲۴ درصد از اسهال‌ها را ایجاد می‌کنند و بیش از ۷۰ درصد مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال در اثر بیماری های اسهالی اتفاق می‌افتد (۷). با وجود اهمیت قابل توجه برخی سویه‌های STEC در ایجاد اسهال خونی، متأسفانه گزارش‌های محدودی در مورد ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی این باکتری در ایران وجود دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که در شهر یاسوج، ۳۴/۷ درصد از سویه‌های DEC متعلق به ویروتیپ STEC می‌باشند.

بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک، میزان شیوع آلودگی با سویه‌های STEC در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است. همچنین فراوانی حیوانات مخزن نیز عامل دیگری برای افزایش موارد آلودگی محسوب می‌شود. میزان آلودگی با STEC در انواع گروه‌های سنی توسط محققین مختلفی در سطح جهان بررسی شده است. شیوع سویه‌های STEC در فنلاند

(۲۳) ۱/۵ درصد، در آمریکا (۱۸) ۱/۶ درصد و در بنگلادش (۲۴) ۷۱/۶ درصد گزارش گردیده است.

در ایران علیخانی و همکاران در استان‌های مازندران و ایلام، میزان شیوع ویروتیپ‌های STEC و EPEC (Enteropathogenic Escherichia coli) در کودکان زیر ۱۰ سال را بررسی کردند. در این جامعه‌ی آماری، ۱۸۰ کودک مبتلا به اسهال و ۱۱۰۸ کودک نیز بدون اسهال بودند که از افراد اسهالی ۱۶ سویه‌ی STEC و از افراد بدون اسهال نیز ۲۳ مورد STEC جداسازی شد (۲۵). جعفری و همکاران در تهران شیوع انتروپاتوژن‌ها در کودکان زیر ۵ سال را توسط تکنیک PCR و آزمایش‌های بیوشیمیایی بررسی کردند. در این پژوهش، *شیگلا* با بیشترین فراوانی (۲۶/۷ درصد) به عنوان اولین عامل و سویه‌های STEC (۱۸/۹ درصد) به عنوان دومین عامل ایجاد کننده‌ی اسهال معرفی شدند (۲۶).

همچنین جعفری و همکاران در پژوهشی دیگر در تهران به بررسی اسهال در بیماران بالای ۵ سال پرداختند که بیشترین میزان فراوانی مربوط به شیگلا (۳۹/۸ درصد) و سویه‌های *اشریشیاکلی* ایجاد کننده‌ی اسهال (۳۱/۷ درصد) بود و شیوع ویروتیپ‌های EPEC، (Enteroaggregative Escherichia coli) EAEC، (Enterotoxigenic Escherichia coli) ETEC و STEC به ترتیب برابر ۳/۲ درصد، ۵/۴ درصد، ۱۲/۷ درصد و ۱۷/۳ درصد گزارش شد (۲۷).

در این پژوهش، از ۳۰۰ نمونه در کودکان زیر ۵ سال در یاسوج، ۱۰۴ کودک (۳۴/۷ درصد) دارای ویروتیپ STEC بودند که مشابه تحقیق انجام شده توسط Reyes و همکاران (۱) و نیز Nessa و همکاران (۲۴) نشان دهنده‌ی میزان بالای آلودگی است و به اهمیت نقش سویه‌ی STEC در ایجاد اسهال اشاره دارد. در حالی که در مطالعه‌ای در مرودشت، میزان آلودگی با سروتیپ O۱۵۷:H۷ E.coli ۱/۱۴ درصد گزارش گردید. این نتیجه حاکی از تفاوت قابل توجه فراوانی سویه‌های STEC در مناطق مختلف کشور می‌باشد.

در اکثر پژوهش‌ها استفاده از تکنیک PCR چندگانه به منظور شناسایی ویروتیپ‌ها به عنوان روشی مناسب معرفی شده است و روش‌های کشت و سرولوژی با توجه به محدودیت‌های تشخیصی، به مرور زمان جای خود را به روش‌های مولکولی داده‌اند. البته در پژوهش حاضر برای تأیید برخی نتایج مشکوک PCR چندگانه، از روش PCR جداگانه (Single) نیز استفاده گردید. در نیکاراگوئه Reyes و همکاران ویروتیپ‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های مدفوعی را با استفاده از روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار دادند. بیشترین ژن‌های شناسایی در پژوهش یاد شده eltB، estA، eaeA، vt_1، vt_2، ial و CVD۴۳۲ بود. این مسأله نشان دهنده‌ی اهمیت نقش سویه‌های STEC و EPEC در ایجاد اسهال می‌باشد (۱).

در پژوهش انجام شده توسط Guion و همکاران در آمریکا، از تکنیک PCR real time چندگانه به منظور بررسی ویروتیپ‌های مختلف اشریشیاکلی استفاده شد (۱۷). از ۵۷ سویه‌ی *E.coli* O۱۵۷:H۷ جداسازی شده در امریکا توسط Byrne و همکاران، ۳۸ سویه ژن‌های stx_1، stx_2، eaeA و hly، ۱۱ سویه ژن‌های stx_1، eaeA و hly، ۵ سویه ژن‌های stx_2، eaeA و hly و ۳ سویه نیز ژن‌های stx_1، stx_2 و eaeA را داشتند (۲۸).

البرزی و همکاران در شیراز، شیوع سروتیپ O۱۵۷:H۷ در مبتلایان به اسهال خونی را بررسی نمودند که در نهایت از ۳۴ درصد نمونه‌ها شیگلا، از ۸/۶ درصد اشریشیاکلی و از ۲ درصد *کمپیلوباکتر* جداسازی گردید. اما از هیچ یک از نمونه‌های مورد پژوهش سروتیپ O۱۵۷:H۷ جداسازی نشد (۲۹). در بررسی شمس و همکاران در تهران بر روی ۹۴۷ نمونه‌ی مدفوع اسهالی از کودکان زیر ۱۴ سال، ۲۷ (۲/۸ درصد) سویه STEC دارای ژن‌های stx_1 یا stx_2 بودند (۱۵).

در باکتری‌های جداسازی شده از یاسوج، ۱۴ سویه ژن stx_1، ۳۱ سویه ژن stx_2، ۹ سویه ژن‌های stx_1-stx_2، ۱۲ سویه ژن‌های stx_1eaeA-، ۲۵ سویه ژن‌های eaeA-stx_2 و ۱۳ سویه هر سه ژن eaeA-stx_1-stx_2 را داشتند. پژوهش‌های قبل در مورد نمونه‌های کلینیکی (۷) و مواد غذایی (۱۰، ۵) فراوانی بیشتر ژن stx_1 نسبت به stx_2 و وجود همزمان ژن‌های stx_1 و eae را در سطح استان فارس به عنوان الگوی ژنتیکی نشان می‌دهد. اما فراوان‌ترین ژنوتیپ پژوهش حاضر، stx_2 به تنهایی و یا همراه با ژن eae بود. این در حالی است که در جهرم نیز پس از انجام PCR برای ردیابی شیگاتوکسین، از ۱۷ نمونه‌ی مثبت با آنتی سرم تنها در یک سویه‌ی ژن شیگاتوکسین stx_2 مشاهده گردید (۱۶). شباهت عوامل ویرولانس سویه‌های جدا شده از مناطق مختلف می‌تواند نشان دهنده‌ی شیوع یک سویه در مکان مورد پژوهش و معیاری برای اندازه‌گیری شدت بیماری‌زایی باکتری‌های در حال چرخش باشد (۵).

نهایی و همکاران پس از بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های STEC جدا شده از بیمارستان‌های شهر تبریز، حساسیت ۱۰۰ درصد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و سفالکسین را گزارش نمودند (۳۰). همچنین در پژوهش انجام شده توسط کارگر و همکاران، مقاومت تمامی جدایه‌های EHEC به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین و اریترومایسین و حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین، تری متوپریم- سولفامتوکسازول و کلرامفنیکل در شهر مرودشت گزارش شده است (۷). اکبری و همکاران نیز مقاومت بیشتر سویه‌های STEC به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفالکسین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم و حساسیت تمامی جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، جنتامایسین را گزارش نمودند (۳۱). اما نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سویه‌های STEC جدا شده، نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم و سفیکسیم مقاومت قابل توجه و در برابر آنتی بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین حساسیت زیادی دارند.

نتیجه‌گیری

بیماری‌های اسهالی در همه‌ی گروه‌های سنی و در تمام مناطق جغرافیایی جهان اتفاق می‌افتد. نتایج این پژوهش نشان داد که ویروتیپ STEC اشریشیاکلی تولید کننده‌ی اسهال از مهم‌ترین عوامل ایجاد اسهال در کودکان زیر ۵ سال می‌باشد. در نتیجه، انجام مطالعات گسترده و پایش مناطق مختلف کشور به منظور شناسایی ویروتیپ‌های در حال چرخش اشریشیاکلی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی ضروری به نظر می‌رسد.

با مقایسه‌ی پژوهش‌های مختلف می‌توان

نتیجه‌گیری نمود که حساسیت یا مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های جدا شده از مناطق جغرافیایی مختلف مطلق نیست. این مسأله می‌تواند نشان دهنده‌ی دورنمای شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های STEC به آنتی‌بیوتیک‌های متداول در اغلب کشورهای دنیا باشد. شایان یادآوری است که در حال حاضر، ایمی‌پنم بهترین انتخاب برای درمان بیماران مبتلا به این سویه می‌باشد. اما به نظر می‌رسد که این حساسیت نیز شکننده باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به شماره‌ی ۸۷۰۰۱۴۰۲۰ بود. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و همچنین پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به‌دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1. Reyes D, Vilchez S, Paniagua M, Colque-Navarro P, Weintraub A, Mollby R, et al. Diarrheagenic Escherichia coli markers and phenotypes among fecal E. coli isolates collected from Nicaraguan infants. J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3395-6.
2. Schultsz C, van den Ende J, Cobelens F, Vervoort T, van GA, Wetsteyn JC, et al. Diarrheagenic Escherichia coli and acute and persistent diarrhea in returned travelers. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3550-4.
3. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 142-201.
4. Chang WS, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, Khatib A, Lye YL, Loo YY, et al. Quantification of Escherichia coli O157:H7 in organic vegetables and chickens. Int Food Res J 2013; 20(2): 1023-9.
5. Kargar M, Daneshvar M, Homayoon M. Surveillance of virulence markers and antibiotic resistance of shiga toxin producing E.coli O157:H7 strains from meats purchase in Shiraz. Iran South Med J 2011; 14(2): 76-83.
6. Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent Escherichia coli outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC). Arch Microbiol 2011; 193(12): 883-91.
7. Kargar M, Homayoon M. Outbreaks of infection sources and antibiotic resistance in EHEC strains among children under 5 years old in Marvdasht. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2010; 19(4): 268-73.
8. Beddoe T, Paton AW, Le NJ, Rossjohn J, Paton JC. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. Trends Biochem Sci 2010; 35(7): 411-8.
9. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8(1): 26-38.
10. Shah Ili M, Kargar M, Rezaeian Jahrommi AA, Homayoon M, Kargar M, Ghorbani-Dalini S. Evaluation of virulance genes of shiga toxin producing Escherichia coli from juice purchase and vegetables in Shiraz. Journal of Microbial World 2010; 3 (1): 40-7.
11. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 4930-40.
12. Smith HR, Scotland SM. ACP Broadsheet 135: January 1993. Isolation and identification methods for Escherichia coli O157 and other Vero cytotoxin producing strains. J Clin Pathol 1993; 46(1): 10-7.
13. Gould LH, Bopp C, Strockbine N, Atkinson R, Baselski V, Body B, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing Escherichia coli infections by clinical laboratories. MMWR Recomm Rep 2009; 58(RR-12): 1-14.
14. Viazis S, Diez-Gonzalez F. Enterohemorrhagic *Escherichia coli:* the twentieth century's emerging foodborne pathogen: a review. Advances in Agronomy 2011; 111: 1-50.
15. Shams S, Haghi-Ashtiani MT, Nasrollahi L,

Shahsiah R, Monajemzadeh M, Tahbaz-Lahafi B, et al. Frequency of shiga toxin-producing genes of Escherichia coli isolated from diarrheic stools of Iranian children by PCR. Iran J Pediatr 2013; 23(6): 637-42.
16. Kargar M, Heidary S, Abbasian F, Shekarforoosh Sh. Survey of different enrichment methods, prevalence and antibiotic resistance of *E. coli* O157:H7 in raw milk of Jahrom cows. Iran J Infect Dis Trop Med 2006; 11(34): 7-11.
17. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic Escherichia coli by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. J Clin Microbiol 2008; 46(5): 1752-7.
18. Vidal M, Kruger E, Duran C, Lagos R, Levine M, Prado V, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic Escherichia coli associated with enteric infections. J Clin Microbiol 2005; 43(10): 5362-5.
19. Lopez-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic Escherichia coli. Emerg Infect Dis 2003; 9(1): 127-31.
20. Wang L, Li Y, Mustaphai A. Rapid and simultaneous quantitation of Escherichia coli 0157:H7, Salmonella, and Shigella in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. J Food Prot 2007; 70(6): 1366-72.
21. Silley P. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? Rev Sci Tech 2012; 31(1): 33-41.
22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
23. Keskimaki M, Eklund M, Pesonen H, Heiskanen T, Siitonen A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 40(4): 151-6.
24. Nessa K, Dilruba A, Islam J, Kabir L, Hossai MA. Usefulness of a multiplex PCR for detection of diarrheagenic escherichia coli in a diagnostic microbiology laboratory setting, Bangladesh. J Med Microbiol 2007; 1(2): 38-42.
25. Alikhani MY, Mirsalehian A, Fatollahzadeh B, Pourshafie MR, Aslani MM. Prevalence of enteropathogenic and shiga toxin-producing Escherichia coli among children with and without diarrhoea in Iran. J Health Popul Nutr 2007; 25(1): 88-93.
26. Jafari F, Garcia-Gil LJ, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani MM, Pourhoseingholi MA, 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.
27. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis 2008; 61(4): 269-73.
28. Byrne CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ, et al. Characterization of Escherichia coli O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States. Appl Environ Microbiol 2003; 69(8): 4683-8.
29. Alborzi A, Aelami MH, Astaneh B, Pourabbas B, Farshad S, Kalani M, et al. Is Escherichia coli O157:H7 a common pathogen in children with bloody diarrhea in Shiraz, Iran? Turk J Pediatr 2008; 50(4): 349-53.
30. Nahaei MR, Akbari Dibavar M, Sadeghi J, Nikvash S. Frequency of enterohaemorrhagic Escherichia coli isolated from patients with acute diarrhea in Tabriz hospitals. Iranian J Med Microbiol 2007; 1(3): 39-46.
31. Akbari A, Pourmand MR, Fard Sanei F, Mardani N, Soltan Dallal MM. Detection of E.coli strains containing shiga toxin (Stx1/2) gene in diarrheal specimens from children less than 5 years old by PCR technique and study of the patterns of antibiotic resistance. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2009, 17(4): 279-85.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 31.12.2013
Vol. 32, No. 273, 2nd Week, April 2014
Accepted: 26.02.2014

Molecular Identification and Antibiotic Resistance of Shigatoxigenic *Escherichia Coli* Strains in Children of the Age of Under 5-Years with Diarrhea in Yasuj, Iran

Mohammad Kargar PhD[1], Vahid Aein MSc[2], Abbas Doosti PhD[3], Mohsen Gholami MSc[2], Maryam Homayoon MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: Shigatoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*) strain is one of the most important causes of diarrhea, hemorrhagic colitis, and haemolytic uremic syndrome. The aim of this study was to survey the prevalence of shigatoxigenic strains and virulence genes in children of the age of under 5-years in Yasuj, Iran.

Methods: This cross-sectional study was performed on 300 stool samples taken from children of the age of under 5-years with diarrhea in Yasuj. After initial identification of *E. coli* strains by culture and biochemical tests, shiga toxigenic Escherichia coli (STEC) genes such as *eaeA*, stx_1 and stx_2 detected by multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique and antibiotic susceptibility of isolates was evaluated using disc diffusion method under the guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Findings: Out of the samples, 104 (34.7%) STEC genes were separated. Out of considered virulence genes, 14 cases (13.46%) had stx_1, 31 cases (29.81%) stx_2, 9 cases (8.65%) genotype stx_1-stx_2, 12 cases (11.54%) *eaeA*-stx_1, 25 cases (24.04%) *eaeA*-stx_2 and 13 cases (12.5%) had third *eaeA*-stx_1-stx_2 genes. Antibiotic susceptibility test showed that the most susceptible antibiotic was imipenem for STEC; the most resistant antibiotic was ceftizoxime.

Conclusion: Results showed that STEC strains have high prevalence in our study area. Therefore, hospital-wide surveillance using molecular techniques should be proposed in other regions of our country.

Keywords: Shigatoxigenic *Escherichia coli*, Multiplex PCR, Antibiotic resistance

Citation: Kargar M, Aein V, Doosti A, Gholami M, Homayoon M. **Molecular Identification and Antibiotic Resistance of Shigatoxigenic Escherichia Coli Strains in Children of the Age of Under 5-Years with Diarrhea in Yasuj, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(273): 67-78

1- Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
3- Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
4- Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran
Corresponding Author: Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir