مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۰/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۳

تعیین هویت مولکولی پاتوتیپ‌های Enteroaggregative و Enteropathogenic باکتری اشرشیاکلی (EAEC و EPEC) جدا شده از عفونت ادراری به روش Multiplex polymerase chain reaction و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

ناهید سلیمانی‌فرد[۱]، دکتر کیومرث امینی[۲]، دکتر غلامعلی مرادلی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: برخی از سویه‌های پاتوژنیک اشرشیاکلی می‌توانند باعث انواعی از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شوند. از مسایل مهم در درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان فراوانی ژن‌های پاتوتیپ‌های EAEC (Enteroaggregative Escherichia coli)، EPEC (Enteropathogenic Escherichia coli) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری می‌باشد.

روش‌ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی انجام و سپس آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) و E-test (Epsilometer test) با آنتی‌بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید. جهت شناسایی ژن‌های پاتوتیپ‌ها، از آزمون M-PCR (Multiplex polymerase chain reaction یا Multiplex PCR) استفاده شد.

یافته‌ها: اکثر اشرشیاکلی جدا شده نسبت به اریترومایسین (۱۰۰ درصد) و آمپی‌سیلین (۹۳/۳۳ درصد) مقاوم و نسبت به جنتامایسین (۶۶/۶۶ درصد) و سیپروفلوکساسین (۶۰/۰۰ درصد) حساس بودند و همچنین، بسیاری از سویه‌ها به چند دارو مقاومت داشتند. نتایج M-PCR نشان داد که ۱ نمونه (۲ درصد) دارای ژن CVD۴۳۲ (پاتوتیپ EAEC) بود.

نتیجه‌گیری: به دلیل اهمیت اشرشیاکلی به عنوان مهم‌ترین عامل اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه و با توجه به افزایش روزافزون مصرف و مقاومت نسبت به عوامل آنتی‌باکتریال، خطر جدی بیماران را تهدید می‌نماید. عدم همخوانی نتایج به دست آمده از روش M-PCR با نتایج مطالعات سایر محققان، ممکن است به علت منبع نمونه باشد که در این مطالعه، سویه‌های جدا شده از نمونه‌های ادراری مورد بررسی قرار گرفت؛ در حالی که سایر مطالعات، بر روی نمونه‌های اسهال خونی انجام شده است. از دیگر دلایل اختلاف، تفاوت‌های منطقه‌ی جغرافیایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، آنتی‌بیوگرام، Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC)، Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)، Multiplex polymerase chain reaction

ارجاع: سلیمانی‌فرد ناهید، امینی کیومرث، مرادلی غلامعلی. **تعیین هویت مولکولی پاتوتیپ‌های Enteroaggregative و Enteropathogenic باکتری اشرشیاکلی (EAEC و EPEC) جدا شده از عفونت ادراری به روش Multiplex polymerase chain reaction و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۰): ۱۹۵۴-۱۹۶۴

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
۳- مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر کیومرث امینی
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

مقدمه

خانواده‌ی انتروباکتریاسه شامل گونه‌های وابسته به هم و گسترده است که در خاک، آب، مواد در حال فساد و روده‌ی بزرگ انسان‌ها، حیوانات و حشرات یافت می‌شوند. این باکتری‌ها باعث ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات می‌گردند (۱). جنس اشرشیا شامل هفت گونه است و مهم‌ترین گونه‌ی آن اشرشیاکلی می‌باشد. این گونه، دارای عوامل حدت مهمی است که توسط ژن‌های مختلفی رمزدهی می‌شوند، از جمله آدزین‌های فیمبریه، آنتروتوکسین‌ها، سایتوتوکسین‌ها، کپسول و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد (۲). از خصوصیات اعضای پاتوتیپ (Enteropathogenic Escherichia coli) EPEC باکتری اشرشیاکلی، ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در اپی‌تلیوم روده می‌باشد که به یاخته‌های روده‌ی کوچک میزبان متصل می‌شوند و قادر به تولید سموم شیگا نمی‌باشند. از خصوصیات پاتوتیپ‌های (Enteroaggregative Escherichia coli) EAEC، می‌توان به عدم توانایی آن‌ها در تولید و ترشح سموم LT (Labile toxin) و ST (Stable toxin) و همچنین اتصال آن‌ها به سلول‌های HeLa به صورت تهاجمی اشاره نمود. مکانیسم ایجاد اسهال در پاتوتیپ EAEC خیلی پیچیده می‌باشد؛ به این ترتیب که ترکیبات مؤثر سیستم ترشحی نوع III در محو ریزپرزها و بر هم زدن تنظیم تبادلات یونی که باعث کاهش جذب آب می‌باشد، دخالت دارند (۳).

یکی از مسایل مهم در درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. مقاومت دارویی مفهوم پیچیده‌ای است که در آن چندین عامل از جمله نوع میکروارگانیسم عفونت‌زا، محل میکروب در داخل بدن، توزیع میکروارگانیسم در بدن، غلظت دارو در محل عفونت و وضعیت ایمنی بیمار دخالت دارد و بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند (۴).

مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی، قادر به مهار آنتی‌بیوتیک‌ها است و منشأ کروموزومی دارد. در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت‌های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و تبدیل سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود (۵). این مطالعه با هدف تعیین سویه‌های مقاوم باکتری E. coli (Escherichia coli) و شناسایی ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت در بین نمونه‌های جداسازی شده از بیماران انجام گردید.

روش‌ها

تعداد ۵۰ ایزوله از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری که عامل اصلی ایجاد کننده‌ی عفونت در آن‌ها، باکتری E. coli بود، جداسازی گردید. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های بلاد آگار (Blood agar)، مک کانکی آگار (Macconkey agar)، EMB آگار (Eosin-methylene blue agar) و کروم آگار (CHROM agar) E. coli انتقال داده شدند و در $37\ C^{o}$ به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تأیید حضور باکتری E. coli، آزمون‌های بیوشیمیایی مانند IMViC (Indol test, Methyl red test, Voges-Proskauer test, Citrate test) و TSI

(Triple sugar iron) جهت تشخیص نهایی انجام شد. بعد از تعیین هویت گونه‌های باکتری E. coli با آزمون‌های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش Kirby-Bauer و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده گردید (۶). تعدادی از کلونی باکتری به وسیله‌ی آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد تا برابر با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر- هینتون آگار (Muller-Hinton agar) کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله‌ی استاندارد بر روی محیط کشت قرار گرفت و در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه گردید و بعد از ۲۴ ساعت، نتایج خوانده شد (۷).

جهت انجام این مطالعه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سپفیم، نیتروفورانتوئین، سفتریاکسون، سفکسیم، نالیدکسیک اسید، اریترومایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین از شرکت HIMEDIA (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایش‌ها، از سویه‌ی استاندارد اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همچنین جهت انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC یا Minimum inhibitory concentration) از روش E-test (Epsilometer test) استفاده گردید. این آزمایش با آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدکسیک اسید تهیه شده از شرکت HIMEDIA (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) انجام شد. در این مطالعه از نوارهای E-test با رقت‌های مختلف بر حسب µg استفاده گردید. برای استخراج DNA، از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR۸۸۱۶۱۳) استفاده گردید.

برنامه‌ی آزمون M-PCR (Multiplex PCR یا Multiplex polymerase chain reaction): این برنامه شامل مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه ۹۵ ^{o}C به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دناتوراسیون ۹۵ ^{o}C به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال ۵۸ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی بسط ۷۲ ^{o}C به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ سیکل)، مرحله‌ی بسط نهایی ۷۲ ^{o}C به مدت ۷ دقیقه می‌باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ آمده است (۱۸، ۱۶). مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۱۶/۸ µl، 1X. PCR buffer به میزان ۱/۲۵ µl، $MgCl_2$ به میزان ۱/۲۵ µl، (۵ Mm) dNTP mix (Deoxyribonucleotide) به میزان ۰/۲ µl، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۱/۵ µl، آنزیم Tag polymerase به میزان ۰/۱ µl، نمونه‌ی DNA ۲/۵ µl در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شد و بعد از رنگ‌آمیزی، در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

این تحقیق بر روی ۵۰ ایزوله‌ی جداسازی شده از

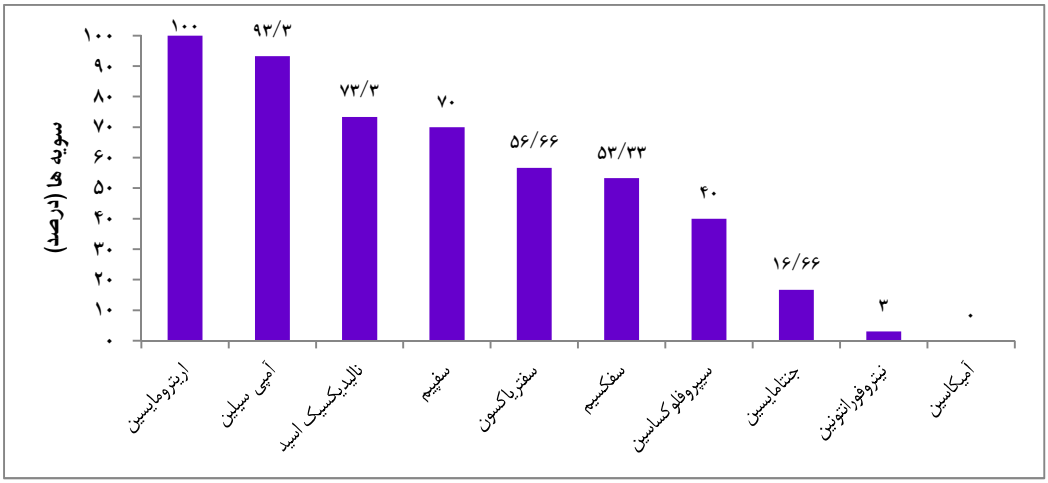
بیماران با علایم بالینی انجام گرفت. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، در جدول ۲ آمده است. همان‌گونه که قابل مشاهده است، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی) گزارش شد. همچنین نتایج مقاومت سویه‌ها به کل آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به منظور مقایسه‌ی بهتر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در شکل ۱ آمده است. برای بررسی سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR یا Multi-drug resistant)، میزان مقاومت به ۳ دارو، ۴ دارو، ۵ دارو و یا بیشتر، میزان مقاومت به همه‌ی داروها و نیز میزان حساسیت به کل داروهای مورد استفاده تعیین گردید که نتایج در شکل ۲ گزارش شده است. همچنین سویه‌ای که به همه‌ی داروها مقاوم باشد و همچنین سویه‌ای که به کل داروهای مورد استفاده حساس باشد، در بین سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق یافت نگردید. نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش E-test (Epsilometer test) نواری و شانه‌ای بر روی نمونه‌ها در جدول ۳ آمده است.

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

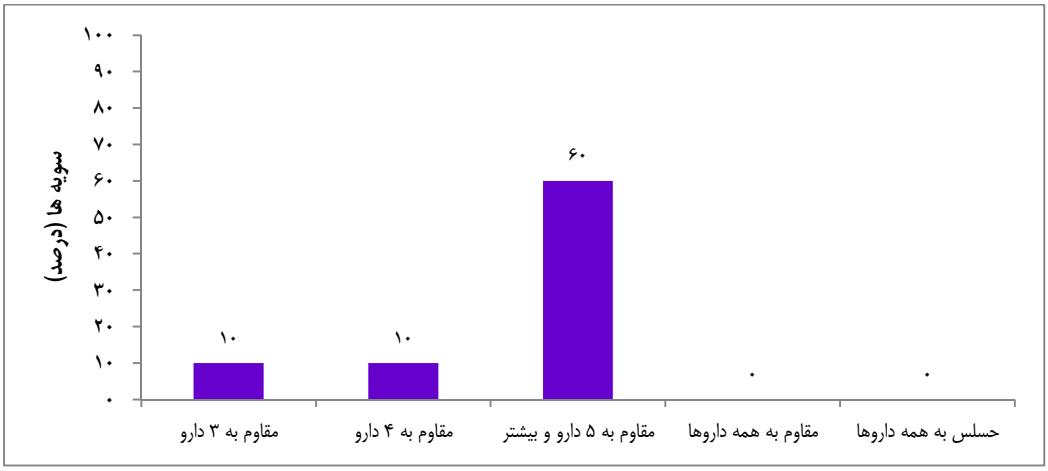
پرایمر	توالی پرایمر (۵’ to ۳’)	ژن هدف	اندازه باند (bP)	غلظت پرایمر (pmol)
eae-f	CTGAACGGCGATTACGCGAA	eae	۹۱۷	۵
eae-r	CCAGACGATACGATCCAG(۱۲)	eae	۹۱۷	۵
BFP-f	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	bfPA	۳۲۶	۵
BFP-r	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA(۵)	bfPA	۳۲۶	۵
EAEC-f	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	CVD۴۳۲	۶۳۰	۵
EAEC-r	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT(۱۵)	CVD۴۳۲	۶۳۰	۵

جدول ۲. میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت (درصد) Resistance	حساسیت متوسط (درصد) Intermediate	میزان حساسیت (درصد) Sensitive
نیتروفورانتوئین	۳/۳۴	–	۹۶/۶۶
اریترومایسین	۱۰۰	–	–
آمیکاسین	–	–	۱۰۰
سفپیم	۷۰/۰	۶/۶۷	۲۳/۳۳
نالیدکسیک اسید	۷۳/۳۴	–	۲۶/۶۶
آمپی‌سیلین	۹۳/۳۴	۳/۳۳	۳/۳۳
سیپروفلوکساسین	۴۰/۰۰	–	۶۰/۰۰
سفتریاکسون	۵۶/۶۶	–	۴۳/۳۴
سفکسیم	۵۳/۳۳	۳/۳۳	۴۳/۳۴
جنتامایسین	۱۶/۶۷	۱۶/۶۷	۶۶/۶۶



شکل ۱. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به کل آنتی‌بیوتیک‌ها



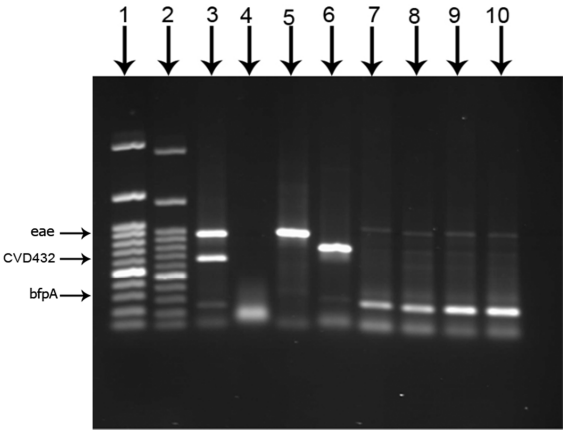
شکل ۲. بررسی سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR یا Multi-drug Resistant)

در این آزمون، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین مشاهده شد (شکل ۳). بر اساس نتایج حاصل از شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های EAEC و EPEC با استفاده از روش Multiplex PCR از مجموع ۵۰ نمونه مورد بررسی ژن CVD۴۳۲ در پاتوتیپ EAEC با قطعه‌ی ۶۳۰ جفت باز در ۱ جدایه (۲ درصد) مشاهده گردید. در هیچ یک از نمونه‌ها، ژن bFPA (Bundle-forming pilus) مربوط به پاتوتیپ EPEC با قطعه‌ای به وزن ۳۲۶ جفت باز مشاهده نشد. همچنین ژن EAE با قطعه‌ای به وزن ۹۱۷ جفت باز در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید (شکل ۴).

جدول ۳. نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری اشرشیاکلی با روش Epsilometer test بر حسب درصد

نوع آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
سیپروفلوکساسین	۸۰	۲۰
نالیدکسیک اسید	۲۰	۸۰
جنتامایسین	۱۰۰	–
آمیکاسین	۱۰۰	–
آمپی‌سیلین	۴۰	۶۰
اریترومایسین	–	۱۰۰

شکل ۳. نتیجه‌ی آزمون تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) به روش Epsilometer test نواری با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین



شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR (Polymerase chain reaction) بر روی ژل آگارز
نتایج Multiplex PCR: از سمت چپ ۱ و ۲: ladder، ۳-شاهد مثبت، ۴- شاهد منفی، ۵- سویه‌ی استاندارد، ۶ تا ۱۰: نمونه های مجهول
eae: 917bp ،bfpA: 326bp ،CVD432: 630bp

بحث

بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری اشرشیاکلی شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورآ، سندرم اورمی همولتیک و در موارد شدید مرگ می‌باشد. اسهال، یکی از عوامل بیماری‌زا و مرگ و میر در میان کودکان زیر ۵ سال در جهان سوم محسوب می‌شود. عفونت ادراری نیز یکی از شایع‌ترین عفونت‌هایی است که رتبه‌ی دوم را پس از عفونت‌های دستگاه تنفس به خود اختصاص داده است و سالیانه در حدود ۱۵۰ میلیون نفر در جهان بروز می‌نماید (۸). باکتری‌های فراوانی قادر به ایجاد عفونت در سیستم ادراری هستند که در بین آن‌ها، E. coli به عنوان شایع‌ترین عامل مطرح می‌باشد. در واقع، در تمام دنیا هنوز E. coli میکروارگانیسم غالب در عفونت‌های ادراری است که ۹۰-۸۰ درصد موارد عفونت‌های ادراری را ایجاد می‌کند (۸).

مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ۲ صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی‌بیوتیک‌ها است؛ در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت‌های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود (۴).

Dias Neto و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۱۸۸ نمونه‌ی ادرار در برزیل، اشرشیاکلی را از ۲۶ درصد موارد جدا و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین (۲۷ درصد) گزارش نمودند (۹). Tambekar و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۶۸ نمونه‌ی ادراری در هند، اشرشیاکلی را از ۵۹ درصد موارد جدا کردند و بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین (۸۷ درصد) و کوتریماکسازول (۹۱ درصد) و کمترین مقاومت را نسبت به نیتروفورانتوئین (۲۹/۰ درصد) گزارش کردند (۱۰).

در مطالعه‌ی Tankhiwale و همکاران بر روی اشرشیاکلی، بیشترین مقاومت نسبت به

کوتریموکسازول (۸۲/۰ درصد) و آمپی‌سیلین (۷۹/۹ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین (۳۸/۰ درصد) و سفتی‌زوکسیم (۴۱/۳ درصد) گزارش شد (۱۱). در تحقیقاتی که توسط زمان‌زاد و همکاران در شهرکرد، بالاترین مقاومت‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و کوتریماکسازول مشاهده گردید (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومایسین (۱۰۰ درصد) و آمپی‌سیلین (۹۳/۳ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به نیتروفورانتوئین (۳/۰ درصد) و آمیکاسین (۰ درصد) بود که با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا همخوانی دارد. در مطالعات گوناگون در نواحی مختلف اروپا و آمریکای شمالی در دهه‌ی ۹۰، نشان داده شد که مقاومت به آمپی‌سیلین اغلب به بالاتر از ۳۰ درصد رسیده و روز به روز افزایش داشته است؛ به طوری که ظرف ۴ سال از ۲۶ درصد در خانم‌های دچار سیستیت بدون عارضه در آمریکا به ۳۴ درصد رسید (۱۳).

Tadesse و همکاران در آمریکا در مجموع ۱۷۲۹ نمونه‌ی E. coli را جدا کردند و یک روند رو به افزایش در مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سولفونامید، تتراسایکلین و جنتامایسین مشاهده کردند. مقاومت چند دارویی (۳ <) در مورد E. coli افزایش پیدا کرد؛ به طوری که از دهه‌ی ۱۹۵۰ تا ۲۰۰۰ از ۷/۲ درصد به ۶۳/۶ درصد رسید و شایع‌ترین فنوتیپ همکاری مقاومت در مورد تتراسایکلین و استرپتومایسین (۲۹/۷ درصد) و تتراسایکلین و سولفونامید (۲۹/۰ درصد) مشاهده شد (۱۴).

بوذری و همکاران در مطالعه‌ای بر روی ۲۰۴ ایزوله‌ی EAEC جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، بیشترین درصد مقاومت به آمپی‌سیلین و بیشترین حساسیت در بین سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدکسیک اسید، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین را گزارش نمودند (۱۵). در تحقیق حاضر نیز میزان مقاومت چند دارویی به ۵ دارو و بیشتر حدود ۶۰ درصد گزارش شده است.

مطالعات مختلفی در مورد شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های اشرشیاکلی با استفاده از روش M-PCR در کشورهای مختلف انجام شده است. Aranda و همکاران از روش M-PCR برای شناسایی پاتوتیپ‌های EPEC (تیپیک و آتیپیک)، EAEC، ETEC (Enterotoxigenic Escherichia coli)، EIEC (Enteroinvasive Escherichia coli)، STEC (Shiga toxin-producing Escherichia coli) و شیگلا در نمونه‌های مدفوعی به دست آمده از افراد مبتلا به اسهال خونی حاد استفاده کردند و میزان EPEC تیپیک در ۶/۰ درصد موارد، EPEC آتیپیک در ۶/۰ درصد موارد، EAEC در ۴/۷ درصد، EIEC در ۲/۰ درصد، گونه‌های شیگلا در ۲/۰ درصد، سویه‌ی STEC در ۰/۷ درصد و مخلوطی از EPEC تیپیک و آتیپیک را در ۰/۷ درصد مشاهده نمودند (۱۶).

Vilchez و همکاران روش Multiplex PCR را با استفاده از ۸ جفت پرایمر اختصاصی به منظور شناسایی پاتوتیپ‌های EAEC، EIEC، EHEC (Enterohemorrhagic Escherichia coli)، EPEC و ETEC به کار بردند. در مطالعه‌ی ایشان، ۶۸ نمونه (۱۱/۶ درصد) شامل EAEC، ۱۲ نمونه (۲/۰ درصد)

شامل EIEC، ۳۹ نمونه (۶/۶ درصد) شامل EPEC و ۱۳ نمونه (۲/۲ درصد) شامل ETEC بودند (۱۷).

Moyo و همکاران در تانزانیا، از روش M-PCR به منظور شناسایی پاتوتیپ‌های EAEC، EPEC، ETEC، EIEC و EHEC استفاده کردند. ۲۲/۹ درصد از کودکان، مبتلا به اسهال ناشی از اشرشیاکلی بودند. ۱۴/۶ درصد از سویه‌ها به عنوان پاتوتیپ EAEC شناسایی شدند که حامل ژن aggR و ژن aat بودند. ۴/۶ درصد از سویه‌ها به عنوان پاتوتیپ EPEC شناسایی و در ۹۲/۳ درصد از پاتوتیپ‌های EPEC، به عنوان EPEC تیپیک حامل هر دو ژن eae و bfPA شناسایی گردیدند. ۳/۶ درصد از سویه‌ها به عنوان پاتوتیپ ETEC شناسایی و حامل ژن Stla یا Stlb بودند و ژن‌های مربوط به EHEC (Stx۲ و Stx۱) و EIEC (ial) در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. EAEC تیپیک و EPEC تیپیک به عنوان شایع‌ترین عامل اسهال خونی در کودکان تانزانیا شناسایی گردیدند (۱۸).

کارگر و همکاران در ایران، با استفاده از روش Multiplex PCR در طی مطالعه‌ای بر روی ژن‌های Stx۱، Stx۲، eaeA و hly، ۳ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های Stx۱ و eaeA و ۱ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های Stx۱ و Stx۲ و eaeA و ۱ سویه نیز دارای ژن hly بود (۱۹).

در این مطالعه، با استفاده از روش MultiPlex PCR جهت شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های EAEC و EPEC از مجموع ۵۰ نمونه، ۱ نمونه (۲ درصد) دارای ژن CVD۴۳۲ بود (پاتوتیپ EAEC). نتایج آزمون مولکولی به دست آمده با روش M-PCR در پاتوتیپ EPEC در این مطالعه، با مطالعات محققین دیگر در نقاط مختلف دنیا تفاوت دارد که می‌توان این دلایل را برای این موضوع مد نظر قرار داد:

دلیل اول ممکن است به علت منبع نمونه باشد که در این مطالعه، سویه‌های جدا شده از نمونه‌های ادراری مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که در سایر مطالعات، بیشتر بر روی نمونه‌ی اسهال خونی بررسی انجام شده است. یکی دیگر از دلایل اختلاف، تفاوت‌های منطقه‌ی جغرافیایی است. اکثر مطالعات در بین کشورهای آمریکایی و اروپایی صورت گرفته است و در ایران، مطالعات زیادی برای شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های E. coli با استفاده از M-PCR صورت نگرفته است که این خود می‌تواند دلیلی بر وجود اختلاف بین نتایج این تحقیق با سایر پژوهش‌ها باشد.

با استفاده از روش Multiplex PCR می‌توان در کوتاه‌ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن‌های بیماری‌زا پی برد و با درمان مناسب و به موقع، از ایجاد سویه‌های مقاوم و انتقال این ژن‌ها در جمعیت‌های انسانی و حیوانی جلوگیری به عمل آورد. جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید ۲ عامل عمده یعنی استفاده‌ی زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت. اساس درمان مناسب در عفونت‌های ادراری، انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارایی بالا و ارزان می‌باشد. اقدامات کنترل عفونت و رعایت نکات بهداشتی در حذف یا کاهش این نوع سویه‌ها به ویژه در بیمارستان‌ها باید بسیار جدی گرفته شود. امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها یک معضل جهانی است که ناشی از مصرف بی‌رویه و روزافزون داروها

می‌باشد و متأسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. همچنین ضمن استاندارد شدن روش آنتی‌بیوگرام باید به نتایج آزمون حساسیت آنتی‌میکروبی عفونت‌های ادراری جهت کاربرد صحیح آنتی‌بیوتیک مؤثر توجه ویژه‌ای معطوف گردد.

تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و بخش باکتری‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Brooks GF, Morse SA, Brooks GF. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 22th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 488.
2. 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.
3. Ketchum PA. Microbiology: Concepts and applications. Hoboken, NJ: Wiley; 1998. p. 221-41.
4. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 836-71.
5. Aertsen A, Vanoirbeek K, de Spiegeleer P, Sermon J, Hauben K, Farewell A, et al. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 2004; 70(5): 2660-6.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement [Online]. [cited 2012 Jan]; Available from: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard [Online]. [cited 2012 Jan]; Available from: URL:http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf
8. 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.
9. Dias Neto JA, Dias Magalhães da Silva L, Carlos Pereira Martins A, Brianezi Tiraboschi R, Alonso Domingos AL, Jorge Suaid H, et al. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. Acta Cir Bras 2003; 18(Suppl 5): 36-8.
10. Tambekar DH, Dhanorkar DV, Gulhane SR, Khandelwal VK, Dudhane MN. Antibacterial susceptibility of some urinary tract pathogens to commonly used antibiotics. African Journal of Biotechnology 2006; 5(17): 1562-5.
11. 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.
12. Zamanzad B, Shirzad H, Naseri F. Comparison of the causative bacteria and antibacterial susceptibility pattern of nosocomial and community- acquired urinary tract pathogens in 13-35 years old women, Shahrekord, 2004. J Arak Univ Med Sci 2005; 8(4): 23-30. [In Persian].
13. Sotto A, De Boever CM, Fabbro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 438-44.
14. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950–2002. Emerg Infect Dis 2012; 18(5): 741-9.
15. Bouzari S, Jafari A, Azizi A, Oloomi M, Nataro JP. Short report: characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children. Am J Trop Med Hyg 2001; 65(1): 13-4.
16. Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5849-53.
17. 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(Pt 5): 630-7.

18. 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.

19. Kargar M, Dianati P, Homayoon M. Evolution of Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enterohemorrhagic Escherichia coli Isolated from Hamburger by Multiplex PCR in Shiraz. J Isfahan Med Sch 2011; 29(148): 977-87. [In Persian].

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.09.2014
Vol. 32, No. 310, 3rd Week, January 2015
Accepted: 04.12.2014

Molecular Identification of Enteroaggregative and Enteropathogenic Escherichia Coli Pathotypes (EPEC and EAEC) Strains Isolated from Urinary Tract Infections and their Antibiotic Susceptibility Pattern

Nahid Soleimanifard MSc[1], Kumarss Amini PhD[2], Gholamali Moradli PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Some of the pathogenic strain of Escherichia coli (E. coli) can cause none-enteritidis and enteritidis diseases. Antibiotic resistance is important in treatment of infectious diseases. The aim of this study was assessment of the the frequency of antibiotic-resistance genes in the clinically isolated enteroaggregative and enteropathogenic virutypes of Escherichia coli (EPEC and EAEC).

Methods: Clinically isolated strains were identified using biochemical test and antibiotic sensitivity assessment performed by disc diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, and epsilometer test (E-test) in different groups. The virutypes genes were identified via multiplex polymerase chain reaction (M-PCR).

Findings: All of the clinically isolated strains (100%) were resistance to erythromycin and 93.33% to ampicillin; 66.66% of the strains were susceptible to gentamycin and 60.00% to ciprofloxacin. Many of strains were multiple-drug resistant (MDR). In multiplex polymerase chain reaction, an enteroaggregative virutype of Escherichia coli was isolated (2%) carrying gene CVD432.

Conclusion: There is a serious risk for patients due the importance of Escherichia coli as major cause of child diarrhea in developing countries and according to increasing in utilization of resistance to the antibacterial drugs. Inconsistency in our finding and other researches may be due the difference sources of isolation sites; in this study, isolated sources were from urine samples, but in other researches, fecus was the source. Another source of inconsistency may lay in geographical differences.

Keywords: Escherichia coli, Antibiogram, Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC), Multiplex polymerase chain reaction

Citation: Soleimanifard N, Amini K, Moradli Gh. **Molecular Identification of Enteroaggregative and Enteropathogenic Escherichia Coli Pathotypes (EPEC and EAEC) Strains Isolated from Urinary Tract Infections and their Antibiotic Susceptibility Pattern.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(310): 1954-64

1- Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
3- Lecturer, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
Corresponding Author: Kumarss Amini PhD, Email: kamini@iau-saveh.ac.ir