

شناسایی سویه های *Enteropathogenic Escherichia coli* در اسهال کودکان توسط Multiplex PCR و مطالعه قابلیت چسبندگی آن ها به سلول اپی تلئال

ابوالفضل داوودآبادی، مریم عباس زاده، ماناعلوی، انیس جعفری، سعیدبوزری*

بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: سعید بوزری، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

تلفن: ۲۰-۶۶۹۵۳۳۱۱ داخلی ۲۲۲۳ saeidbouzari@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۳۱

چکیده:

زمینه و اهداف: *Enteropathogenic Escherichia coli* (EAEC) یک پاتوژن روده ای در حال ظهور است که باعث اسهال حاد و مزمن در کودکان می شود. مشخصه EAEC الگوی چسبندگی آجر مانند به سلول های Hep-2 یا HeLa است که برای تشخیص EAEC تست طلایی محسوب می شود. این چسبندگی متمایز از الگوی *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) و *Diffusely Adherent E. coli* (DAEC) است. در این مطالعه برای تشخیص سویه های EAEC از تست Multiplex PCR (mPCR) استفاده شد و نتایج با تست چسبندگی به سلول HeLa مقایسه گردید.

روش بررسی: سویه های *E. coli* از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در مرکز طبی کودکان تهران جدا و شناسایی آنها طبق روش های استاندارد انجام گرفت. غربالگری اولیه سویه های EAEC بر اساس تست چسبندگی به سلول انجام شد و ۱۷۰ سویه که به نوعی به سلول چسبندگی داشتند، انتخاب شدند. برای تشخیص سویه های EAEC از تست mPCR استفاده شد، این تست بر مبنای سه ژن پلاسمیدی *aaP*، *aggR* و *AA* طراحی شده است. سپس برای تعدادی از سویه های mPCR مثبت و منفی تست اتصال به سلول HeLa انجام گرفت.

یافته ها: بر اساس mPCR، ۱۱۴ سویه (۶۷٪) به عنوان EAEC تشخیص داده شدند. ژن های پلاسمیدی *aaP*، *aggR* و *AA* به ترتیب در ۱۱۴ (۱۰۰٪)، در ۱۱۰ (۹۶/۴٪) و در ۸۰ (۷۰٪) سویه دیده شدند. بر اساس تست چسبندگی به سلول ۵۳ (۸۶/۹٪) سویه mPCR مثبت و ۳ (۲۷/۲٪) سویه mPCR منفی نیز دارای الگوی چسبندگی آجرمانند بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که mPCR قادر است اکثر سویه های EAEC، که دارای الگوی چسبندگی آجر مانند هستند، را تشخیص دهد. این تست قادر است آن دسته از سویه های EAEC را که الگوی آجر مانند را هم نشان نمی دهند، تشخیص دهد. به نظر می رسد که mPCR یک تست سریع و با ویژگی خوب برای تشخیص سویه های EAEC باشد و به ویژه برای غربالگری تعداد زیاد ایزوله در موارد اپیدمی مناسب می باشد.

کلید واژه ها: EAEC, Multiplex PCR, HeLa cells، چسبندگی آجر مانند

مقدمه:

انترواگرگیتیو/شریشیالکی (EAEC) یک پاتوژن روده ای در حال ظهور است که باعث اسهال مزمن و حاد در کودکان کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می شود (۱). در مطالعات سال های اخیر در بین پاتوتایپ های مولد اسهال در/شریشیالکی، EAEC عامل اصلی اسهال بوده است (۲-۴). در مطالعه سلمان زاده و همکاران روی ۲۰۰ سویه/شریشیالکی بدست آمده از نمونه مدفوع کودکان در تهران مشخص شد که EAEC شایع ترین پاتوتایپ (۲۴٪) عامل اسهال در بین پاتوتایپ های مولد اسهال در/شریشیالکی است (۵).

سه گروه از اشریشیالکی های مولد اسهال؛

Enter aggregative *Escherichia coli* (EAEC),
Diffusly Adherent *E.coli* (DAEC),
Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)
اتصال به سلول های HEp-2 یا HeLa را دارند. الگوی چسبندگی EPEC به سلول به صورت چسبندگی موضعی (LA) و در DAEC به صورت منتشر (DA) می باشد. مشخصه EAEC الگوی چسبندگی اگرگیتیو (AA) با آرایشی مانند آجرهای روی هم چیده شده است که هنوز تست طلایی در تشخیص این پاتوتایپ محسوب می شود (۶-۸).

حداقل در بعضی از سویه های EAEC ویژگی چسبندگی به سلول به وسیله پلاسمید ۶۵-۶۰ MDa (پلاسمید PAA) کد می شود. این پلاسمید چندین فاکتور ویروالانس از جمله؛ یکی از پیلای چسبندگی (AAF/I, AAF/II, AAF/II)، پروتئین منتشر کننده (AaP)، توکسین کد شونده به وسیله پلاسمید (Pet) و انتروتوکسین ۱ مقاوم به حرارت EAEC (EAST-1) را کد می کند (۹، ۶).

ترشح پروتئین منتشر کننده (AaP) نیاز به حضور یک کمپلکس انتقالی ABC دارد که به وسیله پلاسمید PAA کد می شود. ژن های کد کننده این ترانسپورتر (کمپلکس Aat) در ارتباط با پروب AA می باشند. پروتئین AaP و کمپلکس Aat هر دو تحت کنترل *aggR* هستند (۱۰).

تشخیص عفونت ناشی از EAEC از طریق جداسازی/شریشیالکی از مدفوع بیماران و انجام تست های چسبندگی به سلول HEp-2 یا پروب های DNA (مانند پروب AA) صورت می پذیرد. روش های مولکولی مختلفی بر اساس تکثیر ژن های ویروالانس برای تشخیص و خصوصیت بندی EAEC توصیف شده اند. یکی از

روش هایی که اخیراً مطرح شده آزمون Multiplex PCR (mPCR) می باشد که در آن از ژن های پلاسمیدی *aatA* (پروب AA)، *aggR* و *aaP* برای تشخیص سویه های EAEC استفاده می شود (۷).

در مطالعه بوذری و همکاران (۲۰۰۵) سویه های EAEC بر اساس آزمون mPCR به دو گروه تیپیک و آتیپیک تقسیم شدند. سویه های تیپیک هر سه ژن پلاسمیدی *aaP*, *aggR*, *AA* را با هم روی پلاسمید PAA دارند، در حالی که سویه های آتیپیک از این دسته ژن ها، یک یا دو ژن را دارند (۱۱).

هدف از این مطالعه استفاده از آزمون mPCR برای تشخیص سویه های EAEC و مقایسه نتایج آن با تست چسبندگی به سلول HeLa بود.

مواد و روش ها :

از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در مرکز طبی کودکان تهران ۱۷۰ سویه/شریشیالکی (که چسبندگی آنها در تست HeLa cell adherence تعیین شده بود) مورد مطالعه قرار گرفتند. این سویه ها در محیط کشت LB (Luria Broth) آگار به صورت Slant کشت داده شد و برای مطالعه بیشتر در یخچال (۴°C) نگهداری شدند.

Multiplex PCR:

تخلیص DNA پلاسمیدی از طریق پروتکل لیز قلیایی انجام گرفت (۱۲). برای تکثیر سه ژن پلاسمیدی *aggR*, *aaP*, *AA* از پرایمرهای شرح داده شده توسط Cerna و همکارانش استفاده شد (۷) (جدول ۱).

mPCR در حجم نهایی ۲۵ μl شامل؛ ۲ μl DNA پلاسمیدی، ۲/۵ μl ————— PCR 10X (Kiagene)، ۱/۵ μl $MgCl_2$ ، ۲۰۰ μmol از هر یک از dNTPS، ۲۰ pmol جفت پرایمر AA، ۱۵ pmol جفت پرایمر *aggR*، ۱۰ pmol جفت پرایمر *aaP* و یک واحد آنزیم Taq پلیمرز (KiaGen) صورت گرفت.

برنامه واکنش mPCR شامل؛ یک حرارت اولیه ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل متشکل از ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله پایانی ۷۲ °C به مدت ۸ دقیقه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر (ependorf) انجام گرفت. از سویه استاندارد EAEC 042 به عنوان کنترل مثبت و از سویه/شریشیالکی K۱۲ به عنوان کنترل

منفی استفاده شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. بعد از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید ۱ mg/ml، ژل توسط دستگاه ترانسلومیناتور (BioDoc) مشاهده و از آن عکس تهیه شد.

مطالعه چسبندگی سویه های باکتریایی به سلول HeLa:

برای ۶۱ سویه EAEC mPCR مثبت و ۱۱ سویه /شریشیاکلی mPCR منفی تست چسبندگی به سلول HeLa انجام گرفت. برای تست چسبندگی از روش شرح داده شده توسط Cravioto و همکارانش استفاده شد (۱۳). به طور خلاصه ابتدا لامل های استریل در کف چاهک های پلیت ۶ خانه (Greiner) گذاشته شدند. سپس سلول های HeLa در محیط RPMI در داخل این

چاهک ها کشت داده شدند تا سلول های تک لایه HeLa حدود ۷۰٪ سطح لامل ها را بپوشانند. سپس محیط کشت RPMI با محیط DMEM دارای ۱٪ D - مانوز جایگزین شده و ۵۰ µl از کشت LB سویه ها به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۳ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از شستشوی سلول ها توسط بافر PBS 1X، سلول ها با ۱ ml از محلول ۳ به ۱ اتانول-اسید استیک فیکس شدند. بعد از رنگ آمیزی سلول ها توسط ۱ ml رنگ گیمسا، لامل ها بر روی لام ها فیکس شده و لام ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. از سویه استاندارد EAEC 042 به عنوان کنترل مثبت و از سویه /شریشیاکلی K ۱۲ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های ویروالانس پلاسمیدی

ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)
<i>aap</i>	F 5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3' R 5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC-3'	۳۱۰
<i>aggR</i>	F 5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3' R 5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3'	۴۵۷
<i>AatA</i>	F 5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3' R 5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	۶۲۹

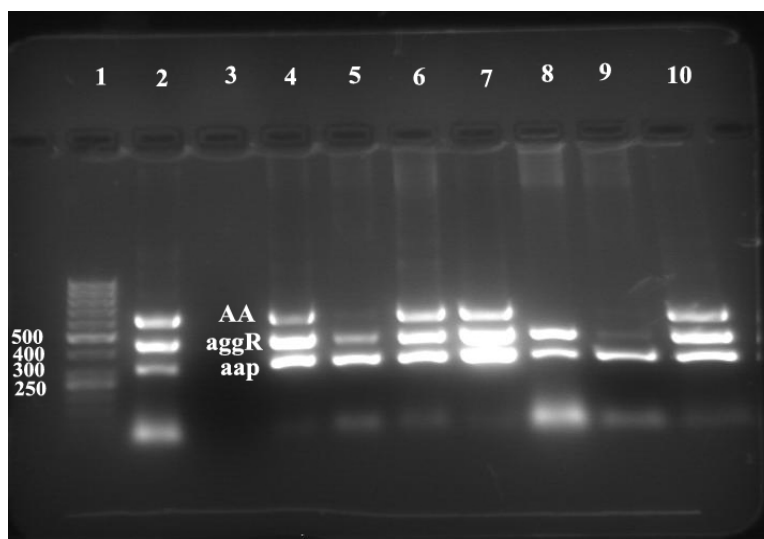
یافته ها:

Multiplex PCR:

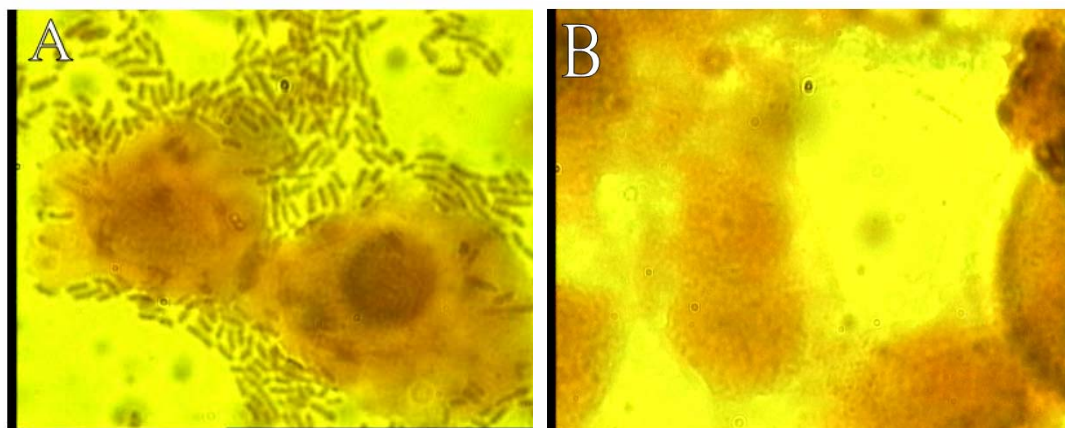
بر اساس mPCR از ۱۷۰ سویه /شریشیاکلی ۱۱۴ سویه (۶۷٪) به عنوان EAEC شناخته شدند (شکل ۱). در بین ۱۱۴ سویه مذکور، ۷۹ سویه (۶۹٪) دارای هر سه ژن بوده و به عنوان EAEC، تیپیک در نظر گرفته شدند. ۳۵ سویه دیگر (۳۱٪) هر کدام یک یا دو ژن پلاسمیدی داشتند که به عنوان EAEC آتیپیک منظور شدند. از نظر فراوانی ژن ها به ترتیب ژن *aap* در تمام ۱۱۴ سویه (۱۰۰٪)، ژن *aggR* در ۱۱۰ سویه (۹۶/۴٪) و ژن *AA* در ۸۰ سویه (۷۰٪) وجود داشت.

چسبندگی سویه های mPCR مثبت و منفی به سلول HeLa:

از میان ۶۱ سویه mPCR مثبت که به عنوان EAEC شناخته شدند، ۵۳ سویه (۸۶/۹٪) دارای الگوی چسبندگی AA و ۸ سویه (۱۳/۱٪) هیچ گونه چسبندگی به سلول نداشتند (شکل ۲). همچنین در بین ۱۱ سویه /شریشیاکلی mPCR منفی ۳ سویه (۲۷/۲٪) دارای الگوی چسبندگی AA بوده و ۸ سویه (۷۲/۸٪) هیچ گونه چسبندگی به سلول نداشتند.



شکل ۱: آزمون mPCR برای تعدادی از سویه های EAEC. چاهک اول مربوط به مارکر ۵۰ bp، چاهک دوم مربوط به سویه کنترل مثبت 042، چاهک سوم مربوط به سویه کنترل منفی K۱۲. چاهک های ۴، ۶، ۷ و ۱۰ مربوط به سویه های EAEC تیپیک و چاهک های ۵، ۸ و ۹ مربوط به سویه های EAEC آتیپیک می باشند



شکل ۲: الگوی اتصال سویه های EAEC به سلول HeLa، (A) الگوی اتصال آجرمانند سویه های EAEC به سلول HeLa (B) سویه های EAEC فاقد اتصال به سلول

بحث:

در مطالعه ما ۸۶/۹ درصد از سویه های mPCR مثبت دارای الگوی چسبندگی AA یا آجر مانند بودند، اما بقیه (۱۳/۱ درصد) هیچ گونه چسبندگی به سلول HeLa نداشتند. مطالعه ما مطابق با مطالعه Kahali و همکاران می باشد که در آن ۸۵/۱ درصد از سویه های mPCR مثبت دارای الگوی چسبندگی AA بوده و بقیه (۱۴/۹ درصد) فاقد چسبندگی به سلول HeLa بوده اند (۹). ولی در مطالعه Ana Carolina تمام سویه های mPCR مثبت الگوی چسبندگی AA را داشتند (۲). چون EAEC یک گروه غیر یکنواخت (هتروژن) است تمام سویه هایی که الگوی چسبندگی AA را نشان می دهند، پلاسمید PAA را حمل نمی کنند. این امر باعث می شود که آزمون mPCR که ژن های موجود بر روی پلاسمید مذکور را هدف قرار می دهد، برای این دسته از سویه ها منفی باشد (۱۵).

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه تست چسبندگی به سلول برای تشخیص EAEC نیاز به مهارت خاص داشته و تنها در آزمایشگاه های مرجع انجام می شود، لذا استفاده از یک تست سریع و با ویژگی خوب می تواند در تشخیص این باکتری کمک کننده باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که mPCR قادر است اکثر سویه های EAEC را شناسایی کند. اگرچه تعدادی از سویه ها به دلیل نداشتن پلاسمید از لحاظ mPCR منفی می باشند. در کل به نظر می رسد که mPCR برای تشخیص سویه های EAEC یک تست سریع و با ویژگی خوب است و به خصوص برای غربالگری تعداد زیاد ایزوله در مواقع اپیدمی مناسب می باشد.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از آقای امیر دشتی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر می نمایم.

آزمون چسبندگی به سلول های HEp-2 یا HeLa هنوز تست طلایی برای تشخیص EAEC است. تست چسبندگی به سلول تنها در آزمایشگاه های مرجع انجام می شود و نیاز به مهارت و وسایل خاص داشته و همچنین وقت گیر است. بنابراین، استفاده از روش های آسان و سریع برای تشخیص این باکتری ضروری است. در مطالعه ما از لحاظ فراوانی ژن ها به ترتیب: ژن *aaP* در ۱۰۰ درصد، ژن *ggR* در ۹۶/۴ درصد، ژن *AA* در ۷۰ درصد سویه ها وجود داشت. در مطالعه بوذری و همکاران (۲۰۰۵) روی سویه های EAEC که الگوی AA را داشتند، ژن *aaP* در ۷۷ درصد، ژن *aggR* در ۶۶ درصد و ژن *AA* در ۵۸ درصد سویه ها دیده شده است (۱۱). فراوانی ژن های ویروالانس در مطالعه اخیر در مقایسه با مطالعه حاضر کمتر می باشد. زیرا در مطالعه حاضر ابتدا سویه های EAEC بر اساس چسبندگی به سلول شناسایی شده و سپس برای آنها mPCR گذاشته شده است. ولی با این حال ترتیب فراوانی ژن ها در هر دو مطالعه یکی است.

در مطالعه Amidous samine که همانند مطالعه ما ابتدا از mPCR برای تشخیص سویه های EAEC استفاده شده، ژن *aaP* در ۹۴ درصد، ژن *aggR* در ۷۹ درصد و ژن *AA* در ۶۹ درصد سویه ها دیده شده است (۱۴). در مطالعه Kahali و همکاران مشخص شده که ژن *aaP* بیشترین فراوانی (۷۶ درصد) را داشته و بعد از آن ژن *aggR* (۶۵/۳ درصد) بوده است (۹). در مطالعه ما ۲۷/۲ درصد از سویه های mPCR منفی دارای الگوی چسبندگی AA بوده اند. در مطالعه Ana Carolina هم ۴۰ درصد سویه های mPCR منفی دارای الگوی چسبندگی AA بوده اند (۲). همچنین در مطالعه Cerna و همکاران ۱۴ درصد و در مطالعه بوذری و همکاران ۱۸/۹ درصد از سویه های دارای چسبندگی AA از نظر آزمون mPCR منفی بوده اند (۷، ۱۱). این نتایج نشان می دهد که تعدادی از سویه های EAEC که الگوی چسبندگی AA را دارند فاقد سه ژن پلاسمیدی بوده و mPCR قادر به شناسایی آنها نمی باشد.

فهرست مراجع:

1. Bangar R, Ballal M. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. *Indian J Med Sci* 2008; 62(1): 8-12.
2. Moreno AC, Filho AF, Gomes TD, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, et al. Etiology of

- childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008. (Article in Press)
3. Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, *et al.* Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam ,Tanzania. *BMC Infect Dis* 2007; **7**: 92-99.
 4. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, *et al.* Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among E. coli strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(1): 133-9.
 5. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* 2007; **56**(Pt 1): 4-8.
 6. Okeke IN, Lamikanra A, Czczulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J Infect Dis* 2000; **181**(1): 252-60.
 7. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(5): 2138-40.
 8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**(1): 142-201.
 9. Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy RK, *et al.* Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(9): 4111-20.
 10. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**(1): 12-8.
 11. Bouzari S, Jafari A, Zarepour M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. *Infect Genet Evol* 2005; **5**(1): 79-83.
 12. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3th ed . New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; PP:1.35 - 1.37
 13. Cravioto J, Arrieta R. Stimulation and mental development of malnourished infants. *Lancet* 1979; **2**(8148): 899.
 14. Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77**(1): 142-50.
 15. Jenkins C, Tembo M, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Phillips AD, *et al.* Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2006; **55**(Pt 11): 1493-7.