Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 1 (03-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Typing of the Shiga toxin – Producing *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic children using Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Homa Khalafian[1], Hassan Momtaz[2]

1. Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2014/09/03
Accepted: 2014/11/23
Available online:2015/03/30

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(1): 14-21

Corresponding author at:

Dr. Hassan Momtaz

Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email:
hamomtaz@iaushk.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) may also be referred to as *Escherichia coli* pathotypes, since *E. coli* serogroups O26 and O157 are frequently implicated in outbreaks of diarrhea in children. This study aimed to analyze the clone relationship of Shiga toxin-producing *E. coli* serogroups O157 and O26 isolated from diarrhea in children less than 60 months by Multilocus Sequence Typing (MLST) method.

Materials and Methods: A total of 20 Shiga toxins-producing *E. coli* (STEC strains were selected from two serogroups O26 and O157 isolated from diarrheic children, and the PCR products from amplification of seven housekeeping genes were sequenced in them. The nucleotide sequences of each gene in each isolate were analyzed, then queried to the MLST database and, in addition, determination of allele-specific of each gene were determined of sequence types (ST).

Results: A total of 3 clones ST10, ST11 and ST21 were identified from 20 isolates, which identified three gene clusters A, B and C, respectively.

Conclusions: Despite of the different ST were found in our isolates studied. There was no a high genetic diversity among the two serogroup O26 and O157 isolates, which indicates the clone relationship between *E. coli* isolates circulating in Tehran.

Key Words: Shiga toxin, *Escherichia coli* (STEC), Diarrheic children, Multi-locus Sequence Typing (MLST)

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Khalafian H, Momtaz H. Typing of the Shiga toxin – Producing Escherichia coli strains isolated from diarrheic children using Multi Locus Sequence Typing (MLST). Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (1) :14-21

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

تایپینگ سویه های *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال به روش ترادف یابی چند جایگاهی(MLST)

هما خلفیان[۱]، حسن ممتاز[۲]

۱. دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۱۲
پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۲۱
انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۱/۱۰
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(1): 14-21

نویسنده مسئول:
دکتر حسن ممتاز

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران. ایران.

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۶۴

پست الکترونیک:
hamomtaz@iaushk.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین پاتوتیپی از *اشریشیاکلی* بوده که سروگروپ های مختلفی از آن از جمله O157 و O26 در ایجاد اسهال کودکان دخیل می باشند. مطالعه ی حاضر با هدف بررسی ارتباط کلونال جدایه های *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین جدا شده از موارد اسهال در کودکان کمتر از ۶۰ ماه به روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLST) انجام گرفت.

مواد و روش کار: تعداد ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین از دو گروه سرمی O26 و O157 جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال انتخاب و پس از ردیابی ۷ ژن خانه داردر آن ها،توالی نوکلئوتیدی تعیین شده از هر ژن در هر جدایه در بانک اطلاعاتی MLST آنالیز و علاوه بر تعیین کلون های مختلف، آلل های مربوط به هر ژن در هر کدام از ST های شناخته شده تعیین گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۳ کلون *ST10*، *ST11* و *ST21* در ۲۰ جدایه مورد مطالعه شناخته شد که در ۳ خوشه ژنتیکی *A*، *B* و *C* قرار گرفتند..

نتیجه‌گیری: علی رغم وجود کلون های مختلف در بین جدایه های مورد مطالعه، تنوع ژنتیکی زیادی در بین جدایه های متعلق به دو گروه سرمی *O26* و *O157* وجود نداشت که نشان گر وجودارتباط کلونال بین جدایه های در حال گردش *اشریشیاکلی* در سطح شهر تهران می باشد.

کلمات کلیدی : *اشریشیاکلی* ، شیگاتوکسین، اسهال کودکان، ترادف یابی چندجایگاهی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اشریشیاکلی تولید کننده ی توکسین شیگا (Shiga toxin-producing *E. coli*) و یا *اشریشیاکلی* تولید کننده توکسین ورو (Vero Toxigenic *E. coli*) به عنوان عامل سندروم هموراژیک اورمیک (Haemolytic-UraemicSyndrome) و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک، به ویژه در کودکان شناخته شده است. این عوارض در مواد شدید می تواند کشنده باشند (۱).

اسهال از شایع ترین علایم بالینی عفونت قسمت های تحتانی دستگاه گوارش است. سازمان جهانی بهداشت، اسهال را به عنوان دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل ۳ مرتبه در یک دوره ۲۴ ساعته تعریف کرده است. اسهال حاد شدید ترین نوع اسهال بوده و توسط بسیاری از عوامل عفونی ویروسی، باکتریایی و انگلی بوجود می آید و از عوامل اصلی مرگ و میر در کودکان محسوب می شود (۲).

از خصوصیات اصلی پاتوتیپ STEC، تولید توکسین های شبه شیگای ۱ یا ۲ (وروتوکسین های ۱ و ۲) می باشد که مهم ترین عوامل در بیماری زایی این باکتری شناخته شده اند. این دو توکسین به ترتیب توسط ژن های *stx1*و*stx2* کد می شوند (۳). سروگروپ های مختلفی از سویه های STEC نظیر O157، O91، O45، O111، O128، O26 و ... در ایجاد عوارض مختلفی در انسان نظیر سندروم همولیتیک اورمیک و اسهال کودکان دخیل می باشند (۴).

روش های مختلفی نظیر بیوتایپینگ، سروتایپینگ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تایپینگ و پروفایل حساسیت پادزیستی جهت تایپینگ و دسته بندی عوامل عفونی از گذشته استفاده شده و می شود. اما امروزه روش های مولکولی به دلیل اختصاصیت بیشتر، سرعت بالاتر و قابلیت تکرار پذیری از اهمیت ویژه ای در این زمینه برخوردار شده اند. هدف از مطالعات مربوط به تایپینگ جدایه های یک باکتری بدست آوردن شواهد آزمایشگاهی جهت تعیین ارتباط ژنتیکی بین سویه های جدا شده یک باکتری در طی یک اپیدمی بیمارستانی می باشد.

اشریشیاکلی از جمله باکتری هایی است که در طول زمان مطالعات مختلفی روی تایپینگ آن انجام گرفته است. این باکتری با دارا بودن بیش از ۱۵۶ نوع آنتی ژن O ، ۵۶ نوع آنتی ژن H و ۸۰ نوع آنتی ژن K دارای تنوع ژنتیکی زیادی بوده و علاوه بر روش مرسوم سروتایپینگ، انواع روش های مولکولار بیولوژی نظیر PFGE، روش های مبتنی بر برش آنزیمی مثل RFLP، آنالیز پلاسمیدی، ریبوتایپینگ، روش های مبتنی بر PCR نظیر RAPD-PCR، Rep-PCR و ERIC-PCR جهت دسته بندی سویه های مختلف این باکتری استفاده شده است (۵،۶). به کارگیری روش های تایپینگ مولکولی در ارتباط دهی دقیق بین سویه ها و گونه ها بسیار اساسی است. اثبات ارتباط کلون های یک پاتوژن به ما این امکان را می دهد که منبع آلودگی (میزبان یا محیط) را پیدا کرده و سویه های عفونی را از غیر عفونی متمایز نموده و در نهایت عود یک بیماری را از عفونت مجدد تکفیک کنیم (۷،۸).

یکی از جدیدترین روش های تایپینگ مولکولی اجرام میکروبی که مبتنی بر تکثیر ژن های بیماری زا و ژن های ضروری میزبان می باشد، روش تایپینگ ترادف یابی چند جایگاهی (Multi Locus Sequence Typing=MLST) است. MLST روشی با قدرت تمایز بسیار بالا است که بر آنالیز پلی مورفیسم نوکلئوتیدی در توالی های ۷ قطعه داخلی ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت بازی از ژن ها (لوکوس ها) ی مولد آنزیم های ضروری برای سلول موسوم به ژن های خانه دار استوار است. ژن های خانه دار جز ژن های ساختاری بوده و در بیشتر یا تمام سلول ها بیان می شوند و سلول برای انجام اعمال متابولیکی خود به آن ها نیاز دارد. با توجه به این که برای هر کدام از این ژن ها، توالی های متفاوتی در داخل یک جدایه باکتریایی به عنوان آلل متمایز کننده وجود دارد، لذا وجود آلل های متفاوت از ژن های خانه دار در میان جدایه های یک سروتیپ و در نتیجه الگوهای متفاوت تایپینگ، می تواند در بررسی ارتباط کلونال جدایه های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت باشد. در این زمینه هم اکنون، پایگاه داده ها از طریق اینترنت برای چندین ارگانیسم در پایگاه www.mlst.net قابل دسترس بوده و این امکان را فراهم می کند تا نتایج تایپینگ سویه ها به شکل یکپارچه در آمده و مدیریت گردد (۹-۱۲). در پاتوتیپ STEC، ۷ژن خانه دار با اسامی *adk*، *fumC*، *gyrB*، *icd*، *mdh*، *purA*، *recA* شناخته شده است (۱۳).

در مطالعه حاضر با ردیابی ژن های مزبور در سویه های *اشریشیاکلی* مولد شیگا توکسین جدا شده از موارد اسهال کودکان (زیر ۵ سال) به بررسی تنوع ژنوتیپی این جدایه ها به روش MLST پرداخته شده و انواع STs (Sequence Types) مربوط به این جدایه ها تعیین گردیده است.

مواد و روش‌ها

جدایه های باکتریایی

تعداد ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* مولد شیگا توکسین که در مطالعات قبلی از موارد اسهال کودکان (زیر ۵ سال) در دو بیمارستان پیامبران و بقیۀ ا... (عج) شهر تهران جدا شده بودند انتخاب گردید. این جدایه ها در محیط کشت مایع BHI (مرک، آلمان) حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سلسیوس به شکل گلیسرینه نگهداری شده بودند. آزمایشات مربوطه در یک دوره زمانی ۶ ماهه از اسفند ۱۳۹۳ تا مرداد ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام گرفت.

آماده سازی باکتری ها

جهت احیاء جدایه های گلیسرینه، باکتری های موجود در محیط مایع BHI گلیسرین دار در محیط مایع BHI کشت و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جهت اطمینان از خالص بودن جدایه ها و عدم آلوده شدن آن ها در طول زمان نگهداری در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ، در محیط کشت EMB کشت داده شده و باکتری هایی که واجد کلنی‌هایی با جلای سبز فلزی بودند *اشریشیاکلی* در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومی از جدایه های رشد یافته در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (Genomic DNA Purification) ساخت شرکت فرمنتاز، (لیتوانی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تائید مولکولی جدایه های باکتریایی

به منظور تائید قطعی *اشریشیاکلی* در جدایه های مورد مطالعه آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) با ردیابی ژن *SrRNA* 16 باکتری انجام گرفت:

در این مرحله آزمایش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیوم (MgCl2)، ۲۰۰ میکرومول dNTP mix (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهایF و R (سیناژن، ایران)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاز، لیتوانی) و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه انجام گرفت.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه، ۳۱ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه.

جهت ردیابی ژن های *stx1*، *stx2* ، *eaeA* و *ehly* در جدایه های مورد نظر و اثبات STEC بودن این جدایه ها از زوج پرایمرهای آورده شده در جدول ۱ استفاده شد.

در این مرحله آزمایش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میلی مول کلرید منیزیم (MgCl2)، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix (فرمنتاس-لیتوانی)، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهایF وR (سیناژن، ایران)، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاز، لیتوانی) و ۱/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه انجام گرفت.

برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۴ سیکل تکراری ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

آزمایش MLST

روش MLST جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین جدا شده از موارد اسهال کودکان (زیر ۵ سال) طبق دستورالعمل توصیه شده در سایت **www.mlst.net** انجام گرفت. در این روش توالی نوکلئوتیدی مربوط به ۷ ژن خانه دار *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین بعد از تکثیر در آزمایش PCR، با استفاده از دستگاه ABI 3730 XL و روش Sanger Sequencing (شرکت Macrogen) تعیین توالی شده و توالی های نوکلئوتیدی تعیین شده برای ۷ ژن مربوط به هر جدایه با توالی های قبلی ثبت شده در این سایت مقایسه و ضمن تعیین شماره آلل های مربوط به هر ژن، Sequence Type (ST) مربوط به هر جدایه تعیین گردید.

برای انجام این روش از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۲) که از سایت رسمی MLST انتخاب شده اند استفاده گردید (۱۸):

تکثیر هر کدام از ژن های فوق به صورت جداگانه (در قالب PCR معمولی) انجام گرفت.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میلی مول $MgCl_2$، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R مربوط به هر ژن، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر جدایه تنظیم گردید.

برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن های خانه دار به شرح زیر بود:

یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه.

در پایان ارتباط فیلوژنتیکی بین ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* مورد مطالعه توسط الگوریتم eBURSTv3 (http://eburst.MLST.net) بررسی گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن های ۱۶srRNA، stx2،stx1 ، eaeA و ehly در در جدایه های *اشریشیاکلی*

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر (′3-5′)	نام ژن
۱۴	۹۱۹	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	***16SrRNA***
۱۵	۳۶۶	AAATCGCCATTCGTTGACTACTTCT TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA	**Shiga toxin 1 (*stx1*)**
۱۵	۲۸۲	CGATCGTCACTCACTGGTTTCATCA GGATATTCTCCCCACTCTGACACC	**Shiga toxin 2 (*stx2*)**
۱۶	۶۲۹	TGCGGCACAACAGGCGGCGA CGGTCGCCGCACCAGGATTC	**Enteropathogenic attachment & effacement (*eaeA*)**
۱۷	۴۳۲	CAATGCAGATGCAGATACCG CAGAGATGTCGTTGCAGCAG	**Haemolysin (*ehly*)**

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ۷ ژن خانه دار در *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین

نام ژن	فعالیت	توالی پرایمر (’3-5’)	اندازه محصول (جفت باز)
adk	Adenylate kinase	5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3	۵۸۳
fumC	fumarate hydratase	5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'	۸۰۶
gyrB	DNA gyrase	5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' 5'-GTCCATGTAGGCGTTCAGGG-3'	۹۱۱
Icd	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenas	5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'	۸۷۸
mdh	Malate dehydrogenase	5'-AGCGCGTTCTGTTCAAATGC-3' 5'-CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT-3'	۹۳۲
purA	Adenylosuccinate dehydrogenase	5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	۸۱۶
recA	ATP/GTP binding motif	5'-ACCTTTGTAGCTGTACCACG-3' 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'	۷۸۰

یافته‌ها

مطالعه حاضر با هدف تعیین ژنوتیپ های *اشریشیاکلی* در ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال زیر ۶۰ ماه به روش MLST انجام گرفت.

طبق مطالعه‌ی قبلی انجام شده توسط Momtaz و همکاران (۲۰۱۳) (۳) این ۲۰ جدایه متعلق به دو سروگروپ O157 (۵ جدایه) و O26 (۱۵ جدایه) بودند.

جهت تعیین ST (کلون) مربوط به جدایه ها، محصول PCR مربوط به ۷ ژن خانه دار از هر جدایه سکانس گردید.

توالی های نوکلئوتیدی تعیین شده از هر ژن پس از اصلاح (Trim) در قسمت Locus Query بخش Single Locus از سایت MLST ثبت و شماره آلل های مربوط به هر یک از ۷ ژن خانه دار در هر جدایه تعیین شد. شماره آلل های تعیین شده در قسمت Profile Query Allelic وارد و ST مربوط به هر جدایه مشخص گردید.

در مجموع ۳ کلون (ST) در ۲۰ جدایه مورد مطالعه شناخته شد که شماره آلل های مربوط به هر ST در هر سروگروپ از *اشریشیاکلی* های STEC در جدول (۴) نشان داده شده است:

ارتباط فیلوژنتیکی بین جدایه‌ها توسط الگوریتم eBURSTv3 (سایت http://eburst.MLST.net) بررسی گردید. با استفاده از نرم افزار GelClust و بر اساس روش ماتریکس فاصله طبق مدل UPGMA، الگوی سکانس تایپ های بدست آمده آنالیز و دندروگرام الگوی کلاسترینگ بدست آمده از مجموعه کلون ها ترسیم گردید (۱۹) (نمودار ۱).

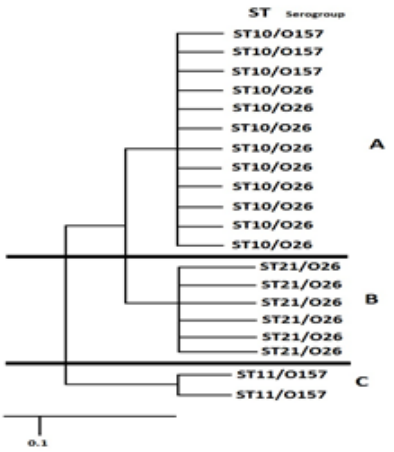
از میان ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی*، ۳ الگوی ژنتیکی متفاوت بدست آمده در کلاسترهای A و B و C دسته بندی شدند. در این میان جدایه های مربوط به سروگروپ O26 در کلاسترهای A و B و جدایه های متعلق به سروگروپ O157 در کلاسترهای A و C قرار گرفتند.

جدول ۳: توزیع ژن های حدت در جدایه های STEC مورد مطالعه

Pathotype	Serogroup	Virulence genes
EHEC	O157 (5)	*stx1*, *eaeA*, *ehly*: 5 (100%)
		stx1: 12 (80%)
		stx2: 2 (13.33%)
		eaeA: 8 (53.33%)
AEEC	O26 (15)	*stx1*, *eaeA*: 9 (60%)
		stx2, *eaeA*: 4 (26.66%)
		stx1, *stx2*, *eaeA*: 2 (13.33%)

جدول ۴: نتایج حاصل از بررسی سکانسینگ و شماره آلل های موجود در STهای شناخته شده در جدایه های STEC

سروگروپ	تعداد جدایه	شماره ST	*adk*	*fumC*	*gyrB*	*icd*	*mdh*	*purA*	*recA*
O26	۹	۱۰	۱۰	۱۱	۴	۸	۸	۸	۲
O157	۳	۱۰	۱۰	۱۱	۴	۸	۸	۸	۲
O26	۶	۲۱	۱۶	۴	۱۲	۱۶	۹	۷	۷
O157	۲	۱۱	۱۲	۱۲	۸	۱۲	۱۵	۲	۲



نمودار ۱: دندروگرام سروگروپ های STEC و نتایج حاصل از تایپینگ MLST

بحث

اسهال های میکروبی از دلایل شایع مرگ و میر کودکان در سراسر دنیا می باشند. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در ایران، میزان مرگ و میر ناشی از اسهال ۳۶/۹ مورد به ازای هزار تولد زنده و در کودکان زیر ۵ سال، ۹/۷ مورد در قبال هر هزار تولد زنده می باشد (۲۰).

اشریشیاکلی های اسهال زا از مهم ترین عوامل اتیولوژیک اسهال در کودکان زیر ۵ سال می باشد و مطالعات مختلفی در خصوص شناسایی این جرم در کودکان مبتلا به اسهال در مناطق مختلف کشور انجام گرفته است به عنوان مثال در مطالعه Momtaz و همکاران در سال ۲۰۱۳، شیوع اسهال های ناشی از

اشریشیاکلی در کودکان زیر ۵ سال در شهر تهران معادل ۶۸/۷۵ درصد گزارش گردید (۳).

طبق اطلاعات ما، تاکنون از روش MLST جهت تایپینگ *اشریشیاکلی* در ایران استفاده نشده، اما در نقاط مختلف دنیا مطالعات زیادی در خصوص ژنوتایپینگ *اشریشیاکلی* به این روش انجام گرفته است.

Mellmann و همکاران (۲۰۰۹) با به کارگیری روش MLST روی ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* مولد شیگاتوکسین که تماماً متعلق به گروه سرمی O91 بودند، ۱۰ کلون مختلف را شناسایی کردند که در این میان کلون ST442 با سندروم HUS در انسان مرتبط بود (۲۰).

در مطالعه Afset و همکاران (۲۰۰۸) دو روش تایپینگ مولکولی یعنی MLST و DNA Microarry جهت دسته بندی ژنتیکی ۵۶ جدایه *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال و به ظاهر سالم استفاده شد. در این مطالعه ۴ گروه فیلوژنیک و ۲۶ کلون (ST) مختلف شناسایی شد که غالب ترین آن ها کلون های ST10 و ST21 بودند (۲۱).

در مطالعه Bielaszewska و همکاران (۲۰۰۸) سویه های AEEC در ۱۸ کودک از ۱۱۸ کودک مبتلا به اسهال خونی و ۱۴۱ کودک از ۱۰۵۵۰ کودک مبتلا به اسهال غیرخونی جداسازی شدند که در بررسی مولکولی این جدایه ها به روش MLST ، ۲۶ کلون مختلف شناسایی شد (۲۲).

در مطالعه ای در پرو از ۲۲۱۲ کودک مبتلا به اسهال زیر ۶۰ ماه، ۲۹ جدایه STEC جدا شد که متعاقب بررسی با دو روش MLST و PFGE در ۱۹ جدایه STEC، ۱۳ کلون (ST) و در ۲۰ جدایه STEC آزمایش شده به روش PFGE، ۱۹ الگوی پالسفیلد شناسایی شد (۲۳).

در مطالعه دیگر در نروژ با ردیابی ژن های *stx*، *eae* و *bfpA* در ۲۵۱ کودک زیر ۵ سال مشکوک به گاستروآنتریت، ۵۸ جدایه EPEC جدا شد که در بین آن ها ۱۲ کلون مختلف شناسایی شد. عمده جدایه های مورد مطالعه در این بررسی متعلق به ST382 بودند (۲۴).

در مطالعه حاضر ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی*STEC جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال زیر ۶۰ ماه مورد بررسی قرار گرفت. این جدایه ها متعلق به دو سروگروپ O157 (از تحت گروه *اشریشیاکلی* خونریزی دهنده روده‌ای یا EHEC) وO26 (از تحت گروه *اشریشیاکلی* جایگزین شونده روی مخاط روده‌ای همراه با هجوم بافتی یاAEEC) بودند که پس از ردیابی ۷ ژن خانه دار در آن ها و مقایسه توالی های نوکلئوتیدی تعیین شده از این ژن ها با توالی های ثبت شده در پایگاه MLST، سه کلون(ST) مختلف شناسایی شد. در جدایه های متعلق به گروه سرمی O26 دو کلون ST10 و ST21 و در ۵ جدایه متعلق به گروه سرمی O157 دو کلون ST10 و ST11 شناخته شد. همان طور که مشهود است تعداد ST های ردیابی شده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات دیگران کمتر است شاید یکی از دلایل اصلی این مورد تعداد کم جدایه های مورد بررسی باشد. همان گونه که ذکر شد در این مطالعه تنها ۲۰ جدایه *اشریشیاکلی* STEC که از تنها دو بیمارستان شهر تهران جدا شده بودند مورد آنالیز قرار گرفته و هدف اصلی تنها یک مطالعه پایلوت در خصوص به کارگیری روش MLST بوده و در مطالعات بعدی با انتخاب حجم نمونه بیشتر از مناطق مختلف جغرافیایی در سطح کشور می توان در خصوص ژنوتایپینگ این باکتری اظهار نظر نمود.

آنالیز دندروگرام حاصل از تایپینگ جدایه ها نشان داد که تمامی ST های شناخته شده در جدایه های مورد مطالعه در بانک ژنی MLST وجود داشته و به عبارتی تمام جدایه های مورد بررسی دارای آلل هایی مشابه با آنچه محققین قبلی بررسی نموده اند، دارند طوری که ST21 عموماً از کشورهای آسیایی از جمله ژاپن و ST10 و ST11 عموماً از کشورهای اروپایی و آمریکایی شناسایی شده اند. با این حال آنالیز کلاسترینگ جدایه ها نشان گر وجود ۳ کلاستر در بین آن ها بود و عمده جدایه ها (۱۲ جدایه از ۲۰ جدایه مورد مطالعه) دارای الگوی ژنتیکی مشابه بوده که خود نشان دهنده وجود ارتباط ژنتیکی نزدیک مابین آن‌ها است و شاید یکی از دلایل این ارتباط منشاء جغرافیایی جدایه ها باشد که تماماً از بیماران بستری در شهر تهران جداسازی شده اند و احتمال دارد که در مطالعات وسیع تر و مقایسه جدایه های جدا شده از مناطق مختلف جغرافیایی در سطح کشور وجود ارتباط ژنتیکی نزدیک منتفی اعلام گردد و یا با به کارگیری روش های دیگر تایپینگ مولکولی از جمله PFGE و DNA Microarray دقیق تر بتوان قرابت یا تفاوت ژنتیکی جدایه های مختلف را بررسی نمود

نتایج تحقیق حاضر حکایت از آن داشت که اکثر جدایه - های در حال گردش STEC در کودکان مبتلا به اسهال در شهر تهران، متعلق به یک الگوی MLST خاص بوده و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نمی باشند. نتایج تحقیقات مشابه با استفاده از این روش در زمینه اپیدمیولوژی اسهال های ناشی از *اشریشیاکلی* اثبات کننده ریز تکامل این پاتوژن بوده و می تواند به عنوان یک روش قابل قبول در کنترل اسهال های کلی باسیلی مورد استفاده قرار گیرد. علی رغم این که بسیاری از مطالعات نشان دهنده ی قدرت بالای افتراق دهی روش MLST در مطالعات اپیدمیولوژی عوامل عفونی می باشد، با این وجود پیشنهاد می گردد جهت بررسی جامع روابط خویشاوندی و ارتباط کلونال انواع سویه های *اشریشیاکلی* از سایر روش های تایپینگ مولکولی نظیر PFGE استفاده گردد و سایر گروه های سرمی *اشریشیاکلی* از پاتوتیپ ها و تحت تیپ های مولد اسهال نوزادان از جمله پاتوتیپ ETEC مورد مطالعه قرار گیرد تا با بررسی دقیق مولکولی در مناطق مختلف کشور دقیق تر بتوان در خصوص کلون های ژنتیکی در حال گردش *اشریشیاکلی* در سطح کشور اظهار نظر نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از زحمات همکاران بخش عفونی بیمارستان های پیامبران و بقیۀ ا... (عج) تهران به ویژه جناب آقای مهندس سرشار و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جناب آقای مهندس سهراب صفری قدردانی می نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Scan J Infect Dis. 2005;37(6-7):405-16 .
2. Nasrolahi M, Sharif M. Prevalence of diarrhea caused by Enteropathogenic E.Coli in under one year old children. J Qazvin Uni Med Sci. 2000;4(1):63-8. Persian.
3. Momtaz H, Dehkordi FS, Hosseini MJ, Sarshar M, Heidari M. Serogroups, virulence genes and antibiotic resistance in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from diarrheic and non-diarrheic pediatric patients in Iran. Gut Pathog. 2013 11;5(1):39 .
4. Momtaz H, Safarpoor Dehkordi F, Taktaz T, Rezvani A, Yarali S. Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from bovine mastitic milk: serogroups, virulence factors, and antibiotic resistance properties. Scientific World Journal. 2012;2012:618709 .
5. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol. 2009;9(4):430-40 .
6. Stepan RM, Sherwood JS, Petermann SR, Logue CM. Molecular and comparative analysis of Salmonella enterica Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. BMC Microbiol. 2011 27;11:153 .
7. Loeb M. Host genomics in infectious diseases. Infect Chemother. 2013;45(3):253-9.
8. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. Rev Infect Dis. 1986; 8(5):682-92 .
9. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 2003;11(10):479-87 .
10. Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Moreno Switt AI. Molecular methods for serovar determination of Salmonella. Crit Rev Microbiol. 2013.
11. Almeida LA, Araujo R. Highlights on molecular identification of closely related species. Infect Genet Evol. 2013 Jan;13:67-75.
12. Lee K, French NP, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, et al. Multivariate analyses revealed distinctive features differentiating human and cattle isolates of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 in Japan. J Clin Microbiol. 2011; 49(4):1495-500 .
13. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial

resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12:8-12. .

14. Brian MJ, Frosolono M, Murray BE, Miranda A, Lopez EL, Gomez HF, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic Escherichia coli infection and hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1992;30(7):1801-6.

15. Heuvelink AE, van de Kar NC, Meis JF, Monnens LA, Melchers WJ. Characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. Epidemiol Infect. 1995;115(1):1-14.

16. Idress M, Mussarat U, Badshah Y, Qamar R, Bokhari H. Virulence factors profile of drug-resistant Escherichia coli isolates from urinary tract infections in Punjab, Pakistan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(12):1533-7.

17. http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli

18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7rd ed. Washington: Mosby; 2012 .

19. Manary M, Iannotti L, Trehan I, Weisz A. Systematic review of the care of children with diarrhoea in the community-based management of severe acute malnutrition. 2012. Available at: http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/updates_management_SAM_infantandchildren_review4.pdf?ua=1

20. Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, Wieler LH, Harmsen D, Werber D, et al. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing Escherichia coli O91. Emerg Infect Dis. 2009;15(9):1474-7 .

21. Afset JE, Anderssen E, Bruant G, Harel J, Wieler L, Bergh K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic Escherichia coli strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. J Clin Microbiol. 2008;46(7):2280-90

22. Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H, et al. Shiga toxin-negative attaching and effacing Escherichia coli: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. Clin Infect Dis. 2008 Jul 15;47(2):208-17 .

23. Contreras CA, Ochoa TJ, Ruiz J, Lacher DW, Rivera FP, Saenz Y, et al. Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from Peruvian children. J Med Microbiol. 2011 ;60 (Pt 5): 639-46 .

24. Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) with prolonged diarrhoea. J Med Microbiol. 2004;53(Pt 11):1137-44.