Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

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

Journal homepage: www.ijmm.ir

Determination of phylogenetic groups and antibiotic resistance pattern of Enterotoxigenic *Escherishia coli* isolates from diarrheoic cases in Bam City by PCR

Hesam Alizade [1], Reza Ghanbarpour [2], Mohammad Reza Aflatoonian[3], Mohammad Hosein Sobhanipour[4]

1. Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences & Zoonosis Research Committee, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Molecular Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University & Zoonosis Research Committee, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Zoonosis Research Committee, Kerman University of Medical Sciences & Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4. Department of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/09/03
Accepted: 2014/11/19
Available online:2015/03/30

Article Subject:
Antimicrobial Resistance

IJMM 1394; 9(1): 6-13

Corresponding author at:

Mohammad Reza Aflatoonian

Zoonosis Research Committee, Kerman University of Medical Sciences & Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Email:
mraflatoonian@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Purposes of this study were to determine the phylogenetic groups, prevalence of enterotoxigenic pathotype and antibiotic resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates from diarrheic cases in Bam city.

Materials and Methods: In this study 155 *E. coli* were isolated from diarrheic samples in Bam city. Phylogenetic groups of isolates and enterotoxigenic pathotype were determined by detection of *chuA, yjaA,* TspE4C2 and *ST, LT* genes respectively.

Results: One hundred fifty five examined isolates were distributed in phylogenetic groups: A (71.60%), B1 (3.22%), B2 (9.67%) and D (15.48%). The genes for enterotoxigenic pathotype were detected in 52 isolates (33.54%), which *ST* gene were found in 29 isolates, *LT* in 16 isolates and *LT, ST* genes in 7 isolates. Twenty nine *ST* gene positive isolates were distributed in three phylogenetic groups A (48.28%), D (41.38%) and B2 (10.34%). According to the antibiotic susceptibility tests maximum and minimum antibiotic resistance rate was against to trimethoprim/sulfamethoxazole (74.19%) and ciprofloxacin and gentamycin (9.67%). Fifteen multiple antibiotic resistance patterns were detected in four phylogenetic groups.

Conclusions: *Escherichia coli* isolates from enterotoxigenic pathotype have a considerable antibiotic resistance rate in Bam city and were distributed in different phylogenetic groups. Since a considerable number of isolates were negative for *LT* and *ST* genes, it is necessary to study the other virulence genes and their phylogenetic background in *E. coli* isolates from diarrheic cases in Bam city.

Key Words: *Escherichia coli*, Enterotoxigenic, Antibiotic, Phylogenetic, Diarrhea

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

How to cite this article:

Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian M, Sobhanipour M. Determination of phylogenetic groups and antibiotic resistance pattern of Enterotoxigenic Escherishia coli isolates from diarrheoic cases in Bam City by PCR. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (1) :6-13

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

تعیین گروه فیلوژنتیکی و الگوی مقاومت پادزیستی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* از موارد اسهال در شهرستان بم به روش PCR

حسام علیزاده[۱]، رضا قنبرپور[۲]، محمد رضا افلاطونیان[۳]، محمد حسین سبحانی پور[۴]

۱. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان و کمیته تحقیقات زئونوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و کمیته تحقیقات زئونوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران
۳. کمیته تحقیقات زئونوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۱۲
پذیرش:۱۳۹۳/۰۸/۲۸
انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۱/۱۰
موضوع:
مقاومت پادزیستی

IJMM 1394; 9(1): 6-13

نویسنده مسئول:

محمد رضا افلاطونیان

کمیته تحقیقات زئونوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۶۴

پست الکترونیک:
mraflatoonian@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: هدف از انجام این مطالعه تعیین گروه فیلوژنتیکی، فراوانی پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک و تعیین مقاومت پادزیستی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از موارد اسهال در شهرستان بم بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۱۵۵ باکتری *اشریشیاکلی* از نمونه‌های اسهالی از شهرستان بم جداسازی شدند. مقاومت پادزیستی جدایه‌ها بررسی شد. گروه فیلوژنتیکی جدایه‌ها و پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک به ترتیب با شناسائی ژن‌های *chuA*، *yjaA*، TspE4C2 و *LT*، *ST* تعیین گردید.

یافته‌ها: جدایه‌های مورد آزمایش در گروه‌های فیلوژنی *A* (۷۱/۶ ٪)، *B1* (۳/۲۲ ٪)، *B2* (۹/۶۷ ٪) و *D* (۱۵/۴۸ ٪) انتشار داشتند. ژن‌های مربوط به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک در ۵۲ جدایه (۳۳/۵۴ ٪) شناسائی گردید که ژن *ST* در ۲۹ جدایه، ژن *LT* در ۱۶ جدایه و ژن های *ST* و *LT* در۷ جدایه حضور داشتند. بیست و نه جدایه واجد ژن *ST*، در سه گروه فیلوژنی *A* (۴۸/۲۸ ٪)، *D* (۴۱/۳۸ ٪) و *B2* (۱۰/۳۴ ٪) انتشار داشتند. بر اساس نتایج تعیین حساسیت پادزیستی بیشترین و کمترین مقاومت پادزیستی به ترتیب نسبت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۷۴/۱۹ ٪) و سیپروفلوکساسین و جنتامایسین (۹/۶۷ ٪) تعیین گردید. پانزده الگوی مقاومت پادزیستی چندگانه در چهار گروه فیلوژنتیکی شناسائی گردید.

نتیجه‌گیری: جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* در شهرستان بم از مقاومت پادزیستی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده و در گروههای فیلوژنتیکی مختلفی انتشار دارند. از آنجائیکه تعداد قابل توجهی از جدایه‌های *اشریشیاکلی* از نظر ژن‌های *ST* و *LT* منفی بودند مطالعه سایر ژن‌های حدت و زمینه فیلوژنتیکی آنها در موارد اسهال درشهرستان بم ضروری است.

کلمات کلیدی : *اشریشیاکلی*، انتروتوکسیژنیک، فیلوژنتیک، آنتی بیوتیک، اسهال

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

مقدمه

اسهال‌های باکتریایی به عنوان یکی از معضلات مهم بهداشتی در جوامع انسانی مطرح هستند. چهار دسته باکتری انتروپاتوژن ایجاد کننده اسهال شامل برخی پاتوتیپ‌های *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، سالمونلاهای غیر تیفوئیدی (Non Typhoid Salmonella)، کمپیلوباکتر (Campylobacter) و شیگلا (Shigella) می‌باشند (۱). در این میان پاتوتیپ‌های *اشریشیاکلی* ایجاد کننده اسهال کودکان بویژه در کشورهای در حال توسعه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این پاتوتیپ‌ها در چندین دسته شامل پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (Enterotoxigenic *Escherichia coli*) (ETEC)، انتروپاتوژنیک

اشریشیاکلی (Enteropathogenic *Escherichia coli*) (EPEC)، *اشریشیاکلی* تولید کننده شیگا توکسین *اشریشیاکلی* تولید کننده وروتوکسین(Verotoxin-producing *E. coli*) (STEC/VTEC) / (Shiga toxin-producing *E. coli*)، انتروواینویسیو *اشریشیاکلی* (EIEC) (Enteroinvasive *E. coli*)، انترواگرگیتیو *اشریشیاکلی* (EAggEC) (Enteroaggregative *E.coli*) و ادهزین منتشره *اشریشیاکلی* (DAEC) (Diffuse adherent *E. coli*) دسته‌بندی می‌گردند (۲). در بین این شش دسته *اشریشیاکلی*، پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک به عنوان مهمترین عامل اسهال کودکان و مسافران، از شیوع بیشتری در کشورهای در حال توسعه برخوردار است (۳). انتروتوکسین های حساس به حرارت (LT) (Heat labile enterotoxin) و مقاوم به حرارت (ST) (Heat stable enterotoxin) مهمترین عوامل حدت در سویه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* بوده و بوسیله ژن‌های LT و ST کد می‌شوند. در این پاتوتیپ توکسین‌های مقاوم به حرارت ممکن است با برخی عوامل فیمبریه‌ایی همراه باشد (۴). توکسین حساس به حرارت در سویه‌های *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک از نظر فیزیولوژیک، ساختمان و آنتی‌ژنیکی شباهت زیادی به توکسین *ویبریوکلرا* (Vibrio cholerae) دارد که از طریق افزایش AMP حلقوی (Adenosine mono phosphate cyclic) موجب بروز اسهال می‌گردد، در حالی که توکسین مقاوم به حرارت غیرآنتی-ژنیک بوده که به خاطر وزن مولکولی کوچک آن است. مکانیسم عمل این توکسین نیز از طریق GMP حلقوی (Guanidine mono phosphate cyclic) می باشد (۳). با توجه به نقش مهم توکسین‌های مقاوم و حساس به حرارت در شناسایی پاتوتیپ‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* چندین روش PCR جهت شناسایی ژن‌های کد کننده این توکسین‌ها در جدایه‌های *اشریشیاکلی* ارائه شده است (۵).

اخیرا جهت شناسایی و دسته‌بندی سویه های بیماریزا *اشریشیاکلی* روش‌های بررسی فیلوژنتیکی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. در این ارتباط با استفاده از روش PCR و شناسایی ژن‌های chuA، yjaA و TspE4C2 سویه‌های *اشریشیاکلی* به چهار گروه فیلوژنتیکی A، B1، B2 و D تقسیم می شوند. این چهار دسته فیلوژنتیکی از نظر ویژگی‌های فنوتیپی شامل قابلیت تخمیر قندها و مقاومت پادزیستی از یکدیگر متمایزند (۷).

تاکنون مشخص شده است که سویه‌های بیماریزای خارج گوارشی *اشریشیاکلی* عمدتا در گروه فیلوژنی B2 و به مقدار کمتری در گروه D انتشار دارند. در حالی که سویه‌های کومنسال و اسهال‌زای *اشریشیاکلی* ممکن است در گروه‌های B1 و A انتشار داشته باشند (۸). جهت درمان عفونت‌های گوارشی استفاده از پادزیست‌های مناسب معمول می باشد که باعث کاهش دوره بیماری و همچنین دوره دفع باکتری از طریق مدفوع می‌شود. در مورد اسهال‌های *اشریشیاکلی* ناشی از پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک پادزیست‌های مشخصی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در برخی موارد مقاومت‌های پادزیستی در مقابل این پاتوتیپ‌ها بروز نموده است (۶).

هدف از انجام این مطالعه عبارت بودند از تعیین فراوانی پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* از طریق شناسایی ژن‌های کد کننده توکسین‌های حساس و مقاوم به حرارت، شناسایی گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* و نهایتاً تعیین مقاومت پادزیستی و شناسایی الگوی مقاومت پادزیستی باکتری-های جدا شده در گروه‌های فیلوژنتیکی مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تشخیص باکتری:

در این مطالعه ۱۵۵ نمونه اسهالی از آزمایشگاه‌های سطح شهرستان بم از شهریور ماه ۱۳۸۹ تا اسفند ۱۳۸۹ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان انتقال داده شدند. جهت جداسازی *اشریشیاکلی*، نمونه‌ها در محیط‌های مک‌کانکی و EMB (ایتالیا، میلان، Biolife Laboratory) کشت داده شدند و پس از مدت زمان ۲۴ ساعت جهت تائید *اشریشیاکلی* بودن، جدایه‌ها با آزمایشات بیوشیمیائی مورد بررسی قرار گرفتند بطوریکه با استفاده از محیط‌های اوره آگار، سیمون سیترات، TSI و SIM نسبت به تعیین فرمول IMViC و تائید بیوشیمیائی جدایه‌ها اقدام گردید. از هر نمونه اسهالی دو جدایه *اشریشیاکلی* تایید شده انتخاب گردید و تا زمان شروع آزمایشات مولکولی و آنتی‌بیوگرام در محیط تریپتیک سوی براث (ایتالیا، میلان، Biolife Laboratory) به همراه ۳۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند. لازم به ذکر است که آزمایشات فقط بر روی یک جدایه از هر نمونه اسهالی (۱۵۵

جدایه) انجام گرفت و جدایه دوم در موارد خاصی نظیر عدم رشد جدایه اولی، جایگزین گردید.

تعیین حساسیت پادزیستی:

دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب، کرج، ایران) شامل سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامایسین (GM)، نالیدیکسیک اسید (NA)، کوتریموکسازول (SXT) و سفوتاکسیم (CTX) به روش انتشار دیسک (Disk Diffusion) جهت تعیین حساسیت پادزیستی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش PCR:

آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های *LT* و *ST* (انتروتوکسین‌های جدایه‌های انتروتوکسیژنیک) و همچنین ژن-های *chuA*، *yjaA* و TspE4C2 (جهت فیلوتایپینگ) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا از تمامی جدایه‌های تائید شده و همچنین سویه‌های استاندارد، DNA به روش لیز با NaOH نیم نرمال استخراج شد. از سویه MG1655 به عنوان سویه استاندارد کنترل منفی استفاده گردید، سویه‌های استاندارد کنترل مثبت در هر آزمایش PCR در جدول شماره ۱ ذکر شده است. شرایط تکثیر ژن‌های هدف جهت شناسائی پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک و فیلوتایپینگ جدایه‌ها به ترتیب طبق روش‌های پیشنهادی Aranda و همکاران (۲۰۰۹) و Clermont و همکاران (۲۰۰۰) بود (**۹ و۱۰**). توالی زوج پرایمرهای بکار رفته و وزن مولکولی محصولات مورد انتظار PCR در جدول شماره ۱ ذکر شده است. تعیین گروه‌های فیلوژنی بر اساس حضور و یا عدم حضور ژن-های *chuA*، *yjaA* و TspE4C2 طبق روش‌های پیشنهادی محققین انجام گرفت (**۱۰و۸**) که بطور خلاصه جدایه‌های فاقد هر سه ژن *chuA*، *yjaA* و TspE4C2 و جدایه‌هایی که فقط دارای ژن *yjaA* بودند در گروه فیلوژنی A دسته بندی شدند. جدایه‌های واجد ژن TspE4C2در گروه فیلوژنی B1 قرار داده شدند و جدایه‌هایی که دارای هر سه ژن *chuA*، *yjaA* و TspE4C2 و یا فقط دارای ژن‌های *chuA* و TspE4C2 بودند در گروه فیلوژنی B2 دسته‌بندی شدند. جدایه‌هایی که واجد ژن‌های *chuA* و TspE4C2 و یا فقط دارای ژن *chuA* بودند در گروه فیلوژنی D تقسیم‌بندی شدند.

جدول ۱: الیگونوکلئوتید های اختصاصی، سویه استاندارد و وزن مولکولی محصولات آزمایشاتPCR

ژن	سویه استاندارد	سکانس پرایمر	وزن محصولات (جفت باز)	رفرانس
ST	10407	5’-ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T-3’ 5’-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3’	190 bp	**Aranda et al. (2009)**
LT	10407	5’-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3’ 5’-CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT-3’	450 bp	**Aranda et al. (2009)**
chuA	ECOR62	5’-GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT-3’ 5’-TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA-3’	279 bp	**Clermont et al. (2000)**
yjaA	ECOR62	5’-TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG-3’ 5’-ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC-3’	211 bp	**Clermont et al. (2000)**
TspE4C2	ECOR62	5’-GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA-3’ 5’-CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG-3’	152 bp	**Clermont et al. (2000)**

یافته‌ها

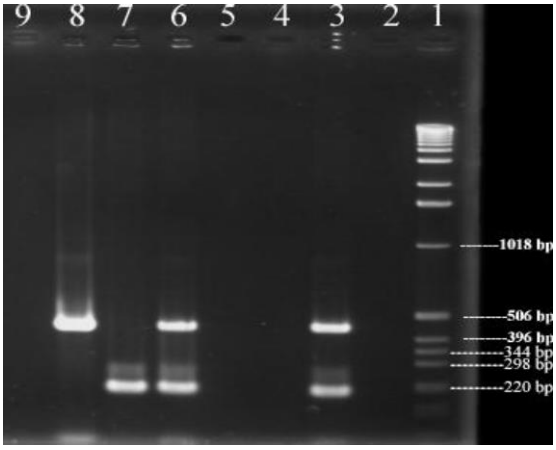
در این مطالعه از تمامی نمونه‌های اخذ شده باکتری *اشریشیاکلی* جدا گردید. از مجموع ۱۵۵ جدایه *اشریشیاکلی* مورد بررسی، ۵۲ جدایه (۳۳/۵۴ ٪) حداقل از نظر حضور یکی از ژن-های*ST* و *LT* مثبت بودند بدین ترتیب که ۲۹ جدایه (۱۸/۷۰ ٪) از نظر وجود ژن *ST* و ۱۶ جدایه (۱۰/۳۲ ٪) از نظر وجود ژن *LT* مثبت بودند و ۷ جدایه (۴/۵۲ ٪) نیز دارای هر دو ژن *ST* و *LT* بودند (تصویر شماره یک).

نتایج آزمایش فیلوتایپینگ جدایه‌ها نشان داد که ۱۵۵ جدایه در چهار گروه فیلوژنی A، B1، B2 و D توزیع شده‌اند، که ۱۱۱ جدایه در گروه فیلوژنتیکی A (۷۱/۶۱ ٪)، ۲۴ جدایه در گروه فیلوژنتیکی D (۱۵/۴۸ ٪)، ۱۵ جدایه در گروه فیلوژنتیکی B2 (۹/۶۷ ٪) و ۵ جدایه درگروه فیلوژنتیکی B1 (۳/۲۲ ٪) انتشار داشتند (تصویر شماره ۲).

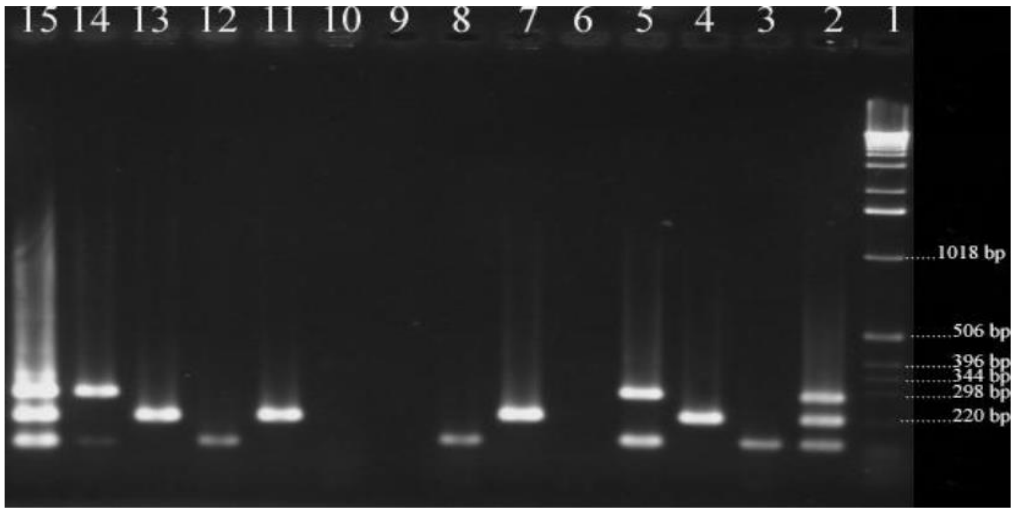
ارزیابی جدایه‌های مثبت از نظر ژن *ST* به همراه تعیین گروه فیلوژنی نشان داد که از ۲۹ جدایه واجد ژن *ST*، ۱۴ جدایه

(۴۸/۲۸ ٪) در گروه فیلوژنی A، ۱۲ جدایه (۴۱/۳۸ ٪) در گروه فیلوژنی D و ۳ جدایه (۱۰/۳۴ ٪) در گروه فیلوژنی B2 حضور دارند. همچنین از ۱۶ جدایه واجد ژن LT، ۷ جدایه (۴۳/۷۵ ٪) در گروه فیلوژنی A، ۴ جدایه (۲۵ ٪) در گروه فیلوژنی D، ۳ جدایه (۱۸/۷۵ ٪) در گروه فیلوژنی B2 و ۲ جدایه (۱۲/۵۰ ٪) در گروه فیلوژنی B1 حضور داشتند. از ۷ جدایه واجد ژن‌های *LT* و *ST*، ۴ جدایه (۵۷/۱۴ ٪) در گروه فیلوژنی A، ۲ جدایه (۲۸/۵۷ ٪) در گروه فیلوژنی D و یک جدایه (۱۴/۲۸ ٪) در گروه فیلوژنی B1 حضور داشتند.

نتایج تعیین حساسیت پادزیستی نشان داد که ۹۰/۹۷ ٪ از جدایه‌ها نسبت به یکی از پادزیست‌های مورد آزمایش مقاوم بودند که بیشترین مقاومت پادزیستی به ترتیب نسبت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۷۴/۱۹ ٪)، سفوتاکسیم (۵۱/۶۱ ٪) و نالیدیکسیک اسید (۴۸/۳۸ ٪) بود لازم به ذکر است که در بین پادزیست های مورد بررسی، کمترین میزان مقاومت نسبت به پادزیست‌های سیپروفلوکساسین (۹/۶۷ ٪) و جنتاماسیسن (۹/۶۷ ٪) تعیین گردید. در مجموع ۱۴۱ جدایه نسبت به یک یا چند پادزیست مقاوم بودند که بر این اساس پانزده الگوی مقاومت ترکیب پادزیستی شناسائی گردید که فروانترین الگو مقاومت چندگانه پادزیستی به ترتیب مربوط به سفوتاکسیم، نالیدیکسیک اسید و کوتریماکسازول (۲۴/۵۱ ٪) و سفوتاکسیم و کوتریماکسازول (۲۱/۲۹ ٪) بودند. جدایه‌های واجد مقاومت پادزیستی چندگانه در گروه‌های فیلوژنتیکی مختلفی انتشار داشتند که جزئیات آن در جدول شماره ۲ ذکر شده است.



شکل ۱: نتیجه آزمایش PCR جهت شناسائی ژن های *LT* و *ST* در ژل آگارز ۲ ٪.۱: لدر ۱ کیلوبازی ۲: کنترل منفی (سویه استاندارد MG1655) ۳: کنترل مثبت (سویه استاندارد 10407) ۶: جدایه واجد هر دو ژن *LT* و ST ۷: جدایه مثبت برای *ST* ۸: جدایه مثبت برای *LT*



شکل ۲: نتیجه آزمایش PCR جهت شناسائی ژن های *yjaA*, *chuA* و TspE4C2 در ژل آگارز ۲ ٪، ۱: لدر ۱ کیلوبازی ۲: کنترل مثبت (سویه استاندارد ECOR62) ۳ و ۸ و ۱۲: جدایه ها در گروه فیلوژنیB1 ۴ و ۷ و ۹ و۱۰ و ۱۱ و ۱۳: جدایه ها در گروه فیلوژنی A ۵ و ۱۴: جدایه ها در گروه فیلوژنی D ۶: کنترل منفی (سویه استاندارد MG1655) ۱۵: جدایه ها در گروه فیلوژنی B2

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و گروه های فیلوژنتیکی از ۱۵۵ جدایه *اشریشیاکلی*

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	گروه های فیلوژنتیکی				تعداد کل(%)
	A	B1	B2	D	
CP, CTX, GM, NA, SXT	-	-	۲	۵	۷ (۴/۵۱)
CP, CTX, NA, SXT	۳	-	-	-	۳ (۱/۹۳)
CP, CTX, GM, SXT	۲	-	-	-	۲ (۱/۲۹)
CP, GM, NA, SXT	-	-	۲	-	۲ (۱/۲۹)
CP, NA, SXT	۲	-	-	-	۲ (۱/۲۹)
CP, GM, SXT	۲	-	-	-	۲ (۱/۲۹)
CTX, GM, SXT	۷	-	-	-	۷ (۴/۵۱)
GM, NA, SXT	۲	-	-	-	۲ (۱/۲۹)
CTX, NA, SXT	۳۱	۲	۵	–	۳۸ (۲۴/۵۱)
CP, NA	۳	-	-	-	۳ (۱/۹۳)
CTX, GM	۲	-	-	-	۲ (۱/۲۹)
NA, SXT	۳	-	۳	۱۲	۱۸ (۱۱/۶۱)
CTX, SXT	۲۶	۲	-	۵	۳۳ (۲۱/۲۹)
NA	۱۲	۲	۲	-	۱۶ (۱۰/۳۲)
SXT	۲	-	–	۲	۴ (۲/۵۸)
تعداد کل جدایه های مقاوم(%)	۹۷(۶۲/۵۸)	۶ (۳/۸۷)	۱۴ (۹/۰۳)	۲۴ (۱۵/۴۸)	۱۴۱ (۹۰/۹۶)

CP سیپروفلوکساسین، GM جنتامایسین، NA نالیدیکسیک اسید، SXT کوتریماکسازول، CTX سفوتاکسیم

بحث

این مطالعه با هدف شناسائی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* و با تعیین حضور ژن های *LT* و *ST* انجام گرفت. همچنین ارزیابی زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌ها صورت پذیرفت و مقاومت پادزیستی جدایه‌ها در ارتباط با زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌ها تعیین گردید. اسهال‌های عفونی به عنوان یکی از مهمترین معضلات بهداشتی در مناطق مختلف جهان می باشند و مسئول تعداد قابل ملاحظه ای از موارد مرگ و میر بویژه در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد. سویه‌های ایجاد کننده اسهال *اشریشیاکلی* در دسته‌های مختلفی قابل تقسیم-بندی هستند که در این میان پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۱).

در مطالعه حاضر ۳۳/۵۴ ٪ از جدایه‌ها متعلق به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک بودند. بررسی Jafari و همکاران (۲۰۰۸) بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از موارد اسهال نشان داد که میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسیژنیک ۳۲/۹ ٪ بوده است بطوریکه۳۲ ٪ از جدایه‌ها واجد ژن *LT*، ۵۳/۲ ٪ واجد ژن *ST* و ۱۴/۸ ٪ جدایه دارای هر دو ژن *LT* و *ST* بودند (۱۲). بررسی توسط Shahrokhi و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پاتوتیپ‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* جدا شده از کودکان زیر ۵ سال در طی سالهای ۱۹۸۸ و ۱۹۹۸ صورت گرفته، نشان داد که در سال ۱۹۸۸، ۳۱/۳ ٪ از جدایه‌های انتروتوکسیژنیک واجد ژن *LT*، ۶۰/۳ ٪ واجد ژن ST و ۸/۴ ٪ واجد ژن های *LT* و ST بودند در حالیکه در سال ۱۹۹۸، ۳۶/۹ ٪ از جدایه‌های انتروتوکسیژنیک واجد ژن *LT*، ۳۵/۷ ٪ واجد ژن *ST* و ۲۷/۴ ٪ واجد ژن های *LT* و *ST* بودند. در مطالعه مذکور جدایه‌های مثبت از نظر *ST* فراوانی بیشتری در میان جدایه‌های سال ۱۹۸۸ داشتند، اما در جدایه‌های سال ۱۹۹۸ ژن *LT* از فراوانی بیشتری برخوردار بود (۱۳). بررسی مشابه که در جمهوری کره بر روی عوامل باکتریایی درگیر در اسهال‌های حاد انجام شده، فراوانی پاتوتیپ‌های انتروتوکسیژنیک را ۱۷ ٪ گزارش نموده است (۱۱). بررسی Moyo و همکاران (۲۰۰۷) در کشور Tanzania بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از کودکان مبتلا به اسهال حاد و مزمن نشان دادکه ۳/۶ ٪ از جدایه‌ها دارای ژن ST بود و هیچیک از جدایه‌ها واجد ژن *LT* نبودند (۱۴). در همین ارتباط بررسی Vila و همکاران (۱۹۹۹) بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال نشان دادکه ۷۵ ٪ از جدایه‌ها دارای توکسین مقاوم به حرارت (*ST*)، ۱۴ ٪ توکسین حساس به حرارت (*LT*) و ۱۱ ٪ از جدایه‌ها دارای هر دو توکسین بودند (۱۵). مطالعه‌ای که توسط Nweze

(۲۰۱۰) در کشور نیجریه بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از افراد مبتلا به عفونت‌های گوارشی حاد صورت گرفت نشان می‌دهد که ۲۱/۵۷ ٪ از جدایه‌ها در پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک قرار داشتند (۱۶). بررسی توسط Rodas و همکاران (۲۰۱۱) در کشور Bolivia بر روی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* انجام گرفت که بر اساس نتایج آن، ۷۰ ٪ از جدایه‌ها واجد ژن *LT*، ۲۳ ٪ از جدایه‌ها واجد ژن‌های *LT/ST* و ۷ ٪ از جدایه‌ها نیز واجد ژن ST بودند (۱۷). همانگونه که ذکر گردید بررسی نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج سایر محققان در ایران و دیگر کشورها مشابهت‌ها و تفاوت‌هایی را از نظر فراوانی ژن‌های کد کننده عوامل حدت سویه‌های انتروتوکسیژنیک نشان می دهد.

با توجه به اهمیت پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* در اسهال‌ها، شناسایی هر چه بیشتر ویژگی‌های ژنوتیپی آن‌ها نظیر تعیین نوع توکسین (حساس و مقاوم به حرارت) و همچنین تعیین گروه‌های فیلوژنی آنها مهم می‌باشد (۱۸، ۱۷). در این ارتباط مطالعه‌ای در سه کشور فرانسه، مالی و کرواسی بر روی جدایه‌های کومنسال *اشریشیاکلی* از نمونه‌های مدفوع انسانی صورت گرفته است که نشان می‌دهد اکثر جدایه‌ها متعلق به گروه‌های A (۴۰ ٪) و B1 (۳۴ ٪) بودند، گرچه ۱۵ ٪ جدایه‌ها در گروه فیلوژنی D و ۱۱ ٪ نیز در گروه B2 حضور داشتند (۱۸).

در مطالعه حاضر ۵۲ جدایه متعلق به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک در چهار گروه فیلوژنی انتشار داشتند، در حالیکه در مطالعه‌ای که توسط Usein و همکاران (۲۰۰۹) در کشور Romania بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال انجام شده است نشان می‌دهد که این جدایه‌ها در پاتوتیپ‌های مختلف *اشریشیاکلی* تقسیم‌بندی شده و جدایه‌های متعلق به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک در سه گروه فیلوژنی A، B1 و B2 انتشار دارند (۱۹). در ارتباط با فیلوتایپینگ جدایه‌های *اشریشیاکلی* از موارد اسهال، مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ توسط Perez و همکاران در کشور Costa Rica بر روی ۱۷۳ جدایه *اشریشیاکلی* از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال حاد صورت گرفت. از این تعداد ۴ جدایه برای پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک مثبت بود، که یک جدایه در گروه فیلوژنی A، دو جدایه در گروه فیلوژنی B1 و یک جدایه نیز در گروه فیلوژنی D قرار داشت (۲۰).

با توجه به میزان شیوع و گستردگی بروز اسهال در کشورهای در حال توسعه استفاده از پادزیست ها جهت درمان کاربرد فراوانی دارد که در این ارتباط بروز مقاومت پادزیستی بویژه مقاومت‌های پادزیستی چندگانه از مهمترین مشکلات در درمان اسهال‌های ناشی از *اشریشیاکلی* می باشد (۱۵).

یکی از اهداف بررسی حاضر تعیین مقاومت پادزیستی جدایه‌ها و انتشار آن‌ها در گروه‌های فیلوژنی بود که فراوانی قابل توجهی از مقاومت نسبت به پادزیست‌های نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول و سفوتاکسیم در این مطالعه مشاهده شد علاوه بر آن الگوی مقاومت پادزیستی نیز در ارتباط با زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌ها نیز تایید گردید. بررسی که توسط Shahrokhi و همکاران (۲۰۱۱) بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* از موارد اسهال کودکان زیر ۵ سال در تهران انجام شده است نشان دهنده وجود الگوی مقاومت چندگانه نسبت به پادزیست‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، تتراسایکلین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به میزان ۱۲/۸۳ ٪ و همچنین در مورد الگوی مقاومت پادزیستی آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، تتراسایکلین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به میزان ۷/۹۶ ٪ بود (۱۳). بررسی Rodas و همکاران (۲۰۱۱) نیز مقاومت بالایی در مقابل پادزیست‌های آمپی‌سیلین (۵۳/۵ ٪)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۳۲/۵ ٪)، تتراسایکلین (۲۸ ٪) و کلرامفنیکل (۱۴ ٪) را نشان می دهد. در مطالعه مذکور اکثر جدایه ها نسبت به نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین و سفوکسیتین مقاوم نبودند و همه جدایه ها نسبت به سیپروفلوکساسین حساس بودند (۱۷). بررسی فراوانی مقاومت پادزیستی بر روی جدایه‌های *اشریشیاکلی* در کشور Vietnam نشان می‌دهد که ۷۸/۶ ٪ از سویه‌های انتروتوکسیژنیک نسبت به پادزیست‌های پنی‌سیلین، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفوتاکسیم، سفوروکسیم و ایمی‌پنیم مقاوم بودند (۲۱). درکشور Tanzania نیز درصد قابل توجهی از سویه‌های انتروتوکسیژنیک مقاومت پادزیستی را دارا بودند به طوری که، ۸۴٪ از جدایه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین، ۲۵٪ به کلرامفنیکل، ۶۸/۲٪ به تتراسایکلین، ۷۹/۵٪ به کوتریماکسازول، ۲/۳٪ نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند (۱۵). بررسی مقایسه‌ای فراوانی مقاومت پادزیستی در سویه‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* در سال‌های ۱۹۹۴-۱۹۹۷ و سال‌های ۲۰۰۱-۲۰۰۴، نشان دهنده افزایش مقاومت نسبت به پادزیست‌های تری‌متوپریم-

سولفامتوکسازول، نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در این دوره زمانی بود (۶).

به عنوان نتیجه‌گیری این مطالعه می‌توان ذکر نمود که تقریبا یک سوم از جدایه‌ها در این بررسی دارای ژن‌های کد کننده پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* بودند که این نکته، نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی سایر پاتوتیپ‌ها از طریق شناسایی ژن‌های کد کننده عوامل حدت آن‌ها ضروری می‌سازد از طرفی دیگر جدایه‌هایی که فاقد ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر بودند، احتمالا با توجه به قابلیت بیماریزایی آن‌ها دارای ژن‌های حدت دیگری می‌باشند. با توجه به تفاوت‌هایی که در ارتباط با زمینه فیلوژنتیکی جدایه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف جهان گزارش شده است نیاز به مطالعات ژنتیکی بیشتر در جهت فیلوتایپینگ و ژنوتایپینگ جدایه‌های *اشریشیاکلی* در عفونت‌های گوارشی می‌باشد، که این یافته‌ها جهت طراحی معیارهای پیشگیری کننده با اهمیت محسوب می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح مصوب مرکز تحقیقات بیماری-های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان است که بدینوسیله از همکاری بی‌دریغ معاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی کرمان تشکر می‌گردد. نویسندگان مراتب تشکر خود را از پرفسور اریک اسوالد (ENVT، تولوز، فرانسه) جهت تهیه و ارسال سویه‌های استاندارد به کار رفته در این مطالعه را اعلام می‌دارند.

تعارض منافع:

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

References

1. Herbert L, DuPont MD. Bacterial Diarrhea. N Engl J Med. 2009; 361:1560-9.
2. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Ignacio Santos J, et al. Association of Diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic E. coli with Acute Diarrhea. J Clin Microbial. 2009; 47(1): 93-8.
3. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, Treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(3): 465-83.
4. Rodas C, Iniguez V, Qadri F, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjoling A. Development of Multiplex PCR Assays for Detection of Enterotoxigenic Escherichia coli Colonization Factors and Toxins. J Clin Microbial. 2009; 47(4): 1218-20.
5. Nweze EI. Virulence Properties of Diarrheagenic E. coli and Etiology of Diarrhea in Infants, Young Children and Other Age Groups in Southeast, Nigeria. Amer-Euras J Sci Res. 2009; 4(3): 173-9.
6. Arancibia EM, Pitart C, Ruiz J, Marco F, Gascon J, Vila J. Evolution of antimicrobial resistance in enteroaggregative Escherichia coli and enterotoxigenic Escherichia coli causing traveller's diarrhoea. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 343-47 .
7. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Envir Microbiol. 2008; 10(10): 2484-96.
8. Escobar-Paramo P, Menach AL, Gall TL, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ Microbiol. 2006; 8(11):1975-84.
9. Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5849-53.
10. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4555-58.
11. Cho SH, Kim JH, Kim JC, Shin HH, Kang YH, Lee BK. Surveillance of bacterial pathogens associated with acute diarrheal diseases in the Republic of Korea during one year 2003. J Microbiol. 2006; 44(3): 327-35.
12. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(4): 269-73.
13. Shahrokhi N, Bouzari S, Jafari A. Comparison of virulence markers and antibiotic resistance in enterotoxigenic Escherichia coli isolated ten years apart in Tehran. J Infect Dev Ctries. 2011; 5(4): 248-54.
14. 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.

15. Vila J, Vargas M, Casals C, Urassa H, Mshinda H, Schellemberg D, et al. Antimicrobial resistance of diarrheagenic Escherichia coli isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(12): 3022-24.

16. Nweze EI. Aetiology of Diarrhoea and Virulence Properties of Diarrhoeagenic Escherichia coli among Patients and Healthy Subjects in Southeast Nigeria. J Health Popul Nutr. 2010; 28(3):245-52 .

17. Rodas C, Mamani R, Blanco J, Blanco JE, Wiklund G, Svennerholm AM, et al. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. Braz J Infect Dis. 2011; 15(2): 132-37.

18. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventre A, Elion J, et al. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiol. 2001; 147(6): 1671-6.

19. Usein CR, Tatu-Chitoiu D, Ciontea S, Condei M, Damian M. Escherichia coli pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. Jpn J Infect Dis. 2009; 62(4): 289-93 .

20. Perez C, Gomez-Duarte OG, Arias ML. Diarrheagenic Escherichia coli in Children from Costa Rica. Am J Trop Med Hyg. 2010; 83(2): 292-7 .

21. Nguyen TV, Phung VL, Chinh HL, Andrej W. Antibiotic Resistance in Diarrheagenic Antibiotic Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in HanoVietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(2): 816-9.