Archive of SID

مجله دانشگاه علوم م پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال دهم ، شماره اول ، بهار ۱۳۸۱ ، ص ۶۰

جداسازی، سنجش وروتوکسین و گروه بندی سرمی سویه‌های اشریشیاکلی انتروهموراژیک در فصل پاییز ۱۳۷۸ در استان ایلام

نورخدا صادقی فرد [۱]، دکتر محمدمهدی اصلانی [۲]، فرید عزیزی جلیلیان [۳]، علی شیخیان [٤]

چکیده

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) به سروتیپ‌های مختلف O تعلق داشته و با سندرم‌های اورمی همولیتیک (HUS) و کولیت هموراژیک (HC) ارتباط دارد. به منظور جداسازی اشریشیاکلی انتروهموراژیک و سنجش وروتوکسین (VT) ۱۵۵۷ نمونه مدفوع جمع‌آوری گردید .برای جداسازی اولیه EHEC از محیط سوربیتول مکانکی آگار و برای تشخیص قطعی از تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید .برای استخراج وروتوکسین از روش کارمالی با استفاده از پلی میکسین B و برای سنجش وروتوکسین از سلول Vero استفاده گردید. در طی این مطالعه از ۱۵۵۷ نمونه مدفوع ۲۶ مورد اشریشیاکلی انتروهموراژیک جدا گردید و هر ۲۶ ایزوله بر روی سلولهای Vero اثرات سیتوپاتیک نشان دادند . اختلاف معنی‌داری بین میزان جداسازی EHEC و اسهال در نواحی روستایی مشاهده نشد و اکثر افرادی که حامل EHEC بودند افراد سالم و بدون علامت اسهالی بودند اما در نواحی شهری این اختلاف معنی‌دار بود (P=0.001). در سنجش نوع وروتوکسین از ۲۶ ایزوله جدا شده در ۱۸ ایزوله (۶۹/۲٪) وروتوکسین شماره۱ (VT1) در ۷ ایزوله (۲۶/۹٪) وروتوکسین شماره ۲ (VT2) و در یک ایزوله (۳/۹٪) هردو نوع وروتوکسین مشاهده گردید . در آزمون گروه بندی سرمی در میان ۲۶ ایزوله یک مورد (۳/۹٪) با آنتی‌سرم H7:157 واکنش اگلوتیناسیون مشاهده گردید و نتایج این مطالعه نشان می دهد که EHEC در ایلام شایع بوده و اکثر سویه‌ها تولید کننده وروتوکسین شماره ۱هستند، همچنین سروتیپ H7:157 از نظر اپیدمیولوژی شایع‌ترین سروتیپ نیست.

واژه‌های کلیدی : اشریشیاکلی انتروهموراژیک، وروتوکسین، سندرم اورمی همولیتیک، کولیت هموراژیک

مقدمه

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (Entero Hemorrhagic Escherichia Coli)[۱] یک کلاس مهم از اشریشیاکلی‌ها هستند و مهمترین نوع آن سروتیپ H7:157 می‌باشد .این باکتریها ابتدا در سال ۱۹۸۲ در آمریکا از مدفوع دو بیمار مبتلا به کولیت هموراژیک (Hemorrhagic Colitis)[۲] جدا گردیدند و بعد در سال ۱۹۸۳ نقش آنها در سندرم اورمی همولیتیک Hemolytic Uremic Syndrome[۳] به اثبات رسید. بافت هدف سویه‌های EHEC کولون است و به علت دارا بودن خصوصیات تهاجمی باعث هموراژی و التهاب در لامینا پروپریا می‌گردند و بدنبال آن تخریب و نکروز بافتی و تجمع سلولهای التهابی در مکان عفونت دیده می‌شود .عفونت این باکتریها ممکن است بصورت اسهال آبکی شبیه به سویه‌های EPEC و

۱- کارشناس ارشد باکتری شناسی - عضو هیئت علمی
۲- Ph.D میکروب شناسی و عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران
۳- کارشناس بخش میکروب شناسی
٤- دانشجوی Ph.D ایمونولوژی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی ایلام [۳،۱]

www.SID.ir

Archive of SID

ETEC باشد و یا بصورت اسهال خونی شبیه به گونه‌های شیگلا بروز کند و همچنین عوارض کشنده این باکتری‌ها کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک می‌باشد[۶،۵].

این باکتری‌ها یک سیتوتوکسین به نام وروتوکسین تولید می‌کنند که آنتی بادی ضد توکسین شیگلا آن را خنثی می‌کند. نشان داده‌اند که این توکسین می‌تواند یک شاخص بیماری‌زایی برای این نوع از اشریشیاکلی‌ها باشد[۷،۱].

وروتوکسین از نظر ساختمان آنتی‌ژنیک ممکن است به دو فرم وروتوکسین شماره ۱ (VT1) و وروتوکسین شماره ۲ (VT2) وجود داشته باشد و ایزوله‌های انسانی EHEC یک یا هردو وروتوکسین را تولید می‌نمایند[۱۳،۹].

حیوانات اهلی بخصوص گاوها مخزن مهم این کلاس از اشریشیاکلی‌ها می‌باشند و بخش وسیعی از عفونتهای این باکتری‌ها از طریق مصرف گوشت آلوده نپخته (مثل همبرگر) ایجاد می‌شود[۷،۶].

روش بررسی

در این تحقیق که به منظور جداسازی EHEC و سنجش وروتوکسین توسط سویه‌های EHEC در جمعیت انتخابی از جامعه معمولی در استان ایلام انجام گرفت، ۱۵۵۷ نمونه به صورت سواپ از مدفوع تهیه گردید.

برای جداسازی اولیه EHEC از محیط سوربیتول مکانکی آگار استفاده شد که در صورت مشاهده کلنی‌های سوربیتول منفی(کلنی بیرنگ) و تأیید EHEC توسط تست‌های بیوشیمیایی حداقل ۵ کلنی سوربیتول منفی از محیط برداشته می‌شد که تا موقع سنجش وروتوکسین در محیط مناسب نگهداری می‌شدند.

گروه بندی سرمی ایزوله‌های EHEC

ایزوله‌هایی که با تست‌های بیوشیمیایی بعنوان EHEC معرفی می‌شدند، با استفاده از آنتی سرمهای EPEC که حاوی یک آنتی سرم نانووالان، چهارآنتی سرم تری والان و ۱۲آنتی سرم مونووالان بودند سروتایپینگ گردیدند.

سرولوژی با آنتی سرمهای ۰۱۵۷و H7

اشریشیاکلی سوربیتول منفی و همینطور اشریشیاکلی‌های تولید کننده وروتوکسین برای یافتن سروتیپ H7:157 با آنتی سرمهای 0157 (Difco) با روش اسلاید اگلوتیناسیون و برای آنتی سرم H7 (Difco) با روش اگلوتیناسیون لوله‌ای سرولوژی گردیدند.

استخراج وروتوکسین

از روش کار مالی و همکاران با تغییراتی برای استخراج وروتوکسین استفاده شد .از سویه‌های سوربیتول منفی و همینطور پلیت مکانکی آگار یک کلونی اسویپ از ناحیه نیمه متراکم پلیت تهیه گردید و در ۱۰میلی‌لیتر از محیط کشت Penassay Broth کشت شد و سپس محیط کشت در انکوباتور شیکردار با دور۱۰۰rpm به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت انکوبه و آنگاه محیط کشت در ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از دور ریختن مایع رویی، رسوب در یک میلی لیتر از PBSحاوی ۲۰۰ میکروگرم پلی میکسین به مدت۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار۳۷°C دور ۱۰۰rpm انکوبه گردید، آنگاه این سوسپانسیون به یک لوله اپندروف ۱/۵ میلی لیتری منتقل و در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد .بعد از سانتریفوژ مایع رویی بطور استریل جدا شده و از این عصاره باکتریایی استخراج شده به وسیله پلی میکسین B برای سنجش وروتوکسین بر روی سلول Vero مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش وروتوکسین

برای سنجش وروتوکسین از سلول Vero استفاده شد و سنجش توکسین برروی سلولVero براساس روش توصیف شده به وسیله کونووالشوک و همکاران باکمی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت.

خنثی سازی

برای خنثی سازی ۵۰ میکرولیتر از توکسین را با ۵۰ میکرولیتر از آنتی سرمهای رقیق شده برعلیه وروتوکسین یک و وروتوکسین ۲ مخلوط کرده و مخلوط را به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷°C قرار داده می‌شد ، و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن بر روی سلول Vero مورد ارزیابی قرار گرفت .اگر اثرات سیتوپاتیک توکسین بوسیله آنتی توکسین‌های VT1 و VT2 خنثی می‌گردید ، خنثی سازی مثبت تلقی می‌شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

از ۱۵۵۷ فردی که از آنها نمونه تهیه گردید در ۲٦نفر اشریشیاکلی انتروهموراژیک جدا گردید که از این تعداد ۱۲ نفر (٤٦/۲٪) در نقاط روستایی و ١٤ نفر (٥٣/٨٪) در نقاط شهری زندگی می‌کردند .اختلاف معنی‌داری در میزان آلودگی در نقاط شهری و روستایی مشاهده نشد (P>0.05) . در استان ایلام بیشترین میزان آلودگی بهEHEC در مناطق شهری و روستایی در گروه سنی ۱۰-٦ سال مشاهده گردید ولی اختلاف در میزان جداسازی EHEC در گروههای سنی مختلف معنی‌دار نبود (P>0.05).جدول (۱) توزیع فراوانی افراد تحت بررسی برحسب وجود EHEC ، سن و محل سکونت را نشان می‌دهد. در این مطالعه EHEC از ٦نفر (۱/٦٪) از زنان روستایی، ۹نفر (۲/۱٪) از زنان شهری ، ٦نفر (۱/۷٪) از مردان روستایی و ٥نفر (۱/۲٪) از مردان شهری جدا گردید و اختلاف معنی‌داری در میزان جداسازی EHEC و جنس مشاهده نشد (P>0.05). همچنین EHEC از هیچکدام از افراد دارای اسهال در مناطق روستایی جدا نگردید ولی از ۲نفر (٥۰٪) از افراد اسهالی در نقاط شهری جدا گردید ، در مقابل از ۱۲نفر (۱/۷٪) از افراد سالم روستایی و ۱۲نفر (۱/٤٪) از افراد سالم شهری EHEC جدا گردید .بین میزان جداسازی EHEC از افراد سالم و افراد اسهالی در مناطق روستایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>0.05) ولی این اختلاف در نقاط شهری معنی‌دار بود(P=0.001). جدول (۲) توزیع فراوانی افراد تحت بررسی برحسب وجودEHEC و اسهال و محل سکونت آمده است. آزمایشات خنثی سازی نشان داد که از میان ۲٦ ایزوله EHEC جداشده از استان ایلام وروتوکسین شماره ۱ به وسیله ۱۸نمونه (۲٦/۲٪) و وروتوکسین شماره ۲ بوسیله ۷ نمونه (٦۹/۲٪) تولید می‌شود، همچنین یک نمونه (۳/۹٪) تولید کننده هر دو نوع وروتوکسین بود. برای گروه بندی سرمی تمام ایزولههایEHEC برای تعیین سروتیپ H7:157 ابتدا به وسیله آنتی‌سرم ۰۱۵۷سرولوژی شدند .از میان ۲٦ نمونه جدا شده یک نمونه (۳/۹٪) با آنتی‌سرم ۰۱۵۷ واکنش اگلوتیناسیون نشان داد، سپس این نمونه به محیط Veal Infusion Broth منتقل شد و به روش اگلوتیناسیون لوله‌ای با آنتی سرمH7 مورد آزمایش قرار گرفت که با آنتی‌سرمH7 اگلوتیناسیون نشان داد.

جدول ۱ : توزیع فراوانی وجود EHEC بر حسب سن و محل سکونت در فصل پاییز در استان ایلام ۱۳۷۸

ناحیه / نتیجه	روستایی				شهری				جمع			
	EHEC منفی		EHEC مثبت		EHEC منفی		EHEC مثبت		EHEC منفی		EHEC مثبت	
سن (سال)	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کمتر از ٦ سال	۱۳۹	۹۸/٦	۲	۱/٤	۱٥٥	۱۰۰	۰	۰	۲۹٤	۹۹/۳	۲	۰/۷
۱۰-٦	۱۱۹	۹۸/۳	۲	۱/۷	۱٤٤	۹۷/۳	٤	۲/۷	۲٦۳	۹۷/۸	٦	۲/۲
۳۰-۱۱	۲۹۲	۹۸	٦	۲	۳۲۲	۹۸/۹	۷	۲/۱	٦۱٤	۹۷/۹	۱۳	½
۳۱ و بالاتر	۱٥۸	۹۸/۷	۲	۱/۳	۲۰۲	۹۸/٥	۳	۱/٥	۳٦۰	۹۸/٦	٥	۱/٤
جمع	۷۰۸	۹۸/۳	۱۲	۱/۷	۸۲۳	۹۸/۳	۱٤	۱/۷	۱٥۳۱	۹۸/۳	۲٦	۱/۷

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : توزیع فراوانی افراد تحت بررسی بر حسب وجودEHEC ، اسهال و محل سکونت در فصل پاییز در استان ایلام ۱۳۷۸

ناحیه / نتیجه	روستایی				شهری				جمع			
	EHEC منفی		EHEC مثبت		EHEC منفی		EHEC مثبت		EHEC منفی		EHEC مثبت	
علائم بالینی	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
افراد اسهالی	۸	۱۰۰	۰	۰	۲	۵۰	۲	۵۰	۱۰	۸۳/۳	۲	۱۶/۷
افراد سالم بدون علامت	۷۰۰	۹۸/۳	۱۲	۱/۷	۸۲۱	۹۸/۶	۱۲	۱/۴	۱۵۲۱	۹۸/۵	۲۴	۱/۵
جمع	۷۰۸	۹۸/۳	۱۲	۱/۷	۸۲۳	۹۸/۳	۱۴	۱/۷	۱۵۳۱	۹۸/۳	۲۶	۱/۷
	Fisher Exact Test P = ۰/۸۷				Fisher Exact Test P = ۰/۰۰۱				Fisher Exact Test P= ۰/۰۱۵۹			

بحث

درباره شیوع EHEC چه سروتیپ H7:157 و چه دیگر سروتیپ‌ها در بیماران اسهالی ، اطلاعات کمی در ایران وجود دارد و به نظر می‌رسد یکی از عمده‌ترین علل عدم مطالعه در این زمینه کمبود امکانات و تجهیزات کشت سلولی برای سنجش وروتوکسین سویه‌های EHEC در کشور باشد.

در این مطالعه که به منظور جداسازی و سنجش وروتوکسین اشریشیاکلی انتروهموراژیک انجام گرفت، از ۱۵۵۷ نفر سواپ مدفوع تهیه گردید که در ۲۶نمونه EHEC جدا گردید که قابل مقایسه با مطالعه پیرارد و همکاران در بلژیک می‌باشد .در مطالعه پیرارد که برروی ۱۰۲۴۱ نمونه مدفوع انجام گرفت در ۸۳ نمونه EHEC ایزوله گردید که ۲۰نمونه (۰/۲٪) از سویه‌های H7:157 و ۶۳ نمونه (۰/۶۲٪) از سویه‌های غیرH7:157 بودند [۱۲].

در این مطالعه از میان ۲۶ ایزوله جدا شده یک نمونه (۳/۹٪) با آنتی‌سرم H7:157 واکنش اگلوتیناسیون نشان داد . مطالعات متعدد انجام شده در آمریکای شمالی و انگلستان سروتیپ H7:157 از EHEC را به عنوان عامل عمده اسهال و با شیوعی نزدیک به سالمونلا و کمپیلوباکتر معرفی می‌کند، در مقابل اطلاعات کمی در مورد سویه‌های Non - 0157 از EHEC در دسترس می‌باشد .در کانادا « پای» و همکاران میزان جداسازی سویه‌های Non-0157 از EHEC را ۰/۶۶٪ در مقابل ۲/۵٪ برای H7:157 گزارش کردند .در این مطالعه و همینطور مطالعه پیرارد میزان جداسازی سویه‌های Non-0157 از EHEC با یافته‌های «پای» و همکاران مغایرت دارد [۱۱].

به نظر می‌رسد که اپیدمیولوژی سروتیپ ۱۵۷ در کشور ما کاملاً متفاوت با کشورهای دیگر باشد، این وضعیت باید با مطالعه برروی حیوانات و همینطور گوشت یا سایر فرآورده‌های دامی مورد تأیید یا تکذیب قرار گیرد .عدم شیوع سروتیپ ۰۱۵۷در بعضی کشورهای دیگر هم گزارش شده است، چنانچه در مطالعه «بلانکو» و همکاران که برروی شیوعEHEC انسانی و حیوانی صورت گرفت، سویه‌های EHEC از ۵۵ نمونه (۱۴٪) از ۳۸۷ نمونه مدفوع گوساله جدا گردید که به سروتیپ‌های مختلف از جمله H7:157 تعلق داشتند، در حالی که EHEC از سه نمونه (۰/۶٪) از ۴۸۲ نمونه بچه‌های دارای اسهال جدا گردید که هیچکدام به سروتیپ ۰۱۵۷ تعلق نداشت [۳].

www.SID.ir

Archive of SID

تعدادی از اپیدمی‌های عفونت EHEC از نظر اپیدمیولوژیک در ارتباط با مصرف شیرخام، گوشت نپخته یا تماس مستقیم با احشام بوده است و از آنجایی که در استان ایلام و همینطور در مزارع دامداری تماس گسترده‌ای با احشام و فضولات احشام وجود دارد و افراد بطور معمول از شیر غیر پاستوریزه استفاده می‌کنند، بنابراین در معرض خطر بالای تماس با ارگانیسم‌های موجود در روده احشام از جملهEHEC هستند. در این مطالعه آزمایشات خنثی‌سازی نشان داد که اکثریت ایزوله‌های EHEC تولید کننده VT1 بودند، به طوری که ۱۸نمونه (۶۹/۲٪) تولید کننده VT1 و ۷نمونه (۲۶/۹٪) تولید کننده VT2 بودند ، و یک نمونه (۳/۹٪) هر دو نوع وروتوکسین با هم تولید می‌کرد. گوناگونی وروتوکسین سویه‌های EHECکه به وسیله محققین مختلف گزارش شده است، در مطالعه ما هم به دست آمد [۴،۲] . برخی از محققین استفاده از روش استخراج به وسیله پلی‌میکسین B را از این جهت که باعث افزایش میزان آزادسازی توکسین از سلول می‌شود در شناخت وروتوکسین‌های مختلف مؤثر می‌دانند و تمام سویه‌هایی که تیتر بالایی از توکسین را تولید می‌کردند نوع VT1 را می‌ساختند ، در حالی که بعضی از انواع از توکسین‌زایی متوسط یا ضعیف

VT2 برخوردار بودند [۱۰] .۰به نظر می‌رسد حضور سویه‌های EHECدر سالهای اخیر افزایش یافته است ولی قبل از سال ۱۹۸۲ نیز این باکتری وجود داشته است.

پیشنهاد

از آنجا که در کلیه مقالات و مطالعات صورت گرفته در سراسر جهان ، احشام به ویژه گاو و گوساله به عنوان مخازن این باکتری مطرح هستند به نظر می‌رسد در درجه اول باید نسبت به بررسی احشام به عنوان مخازن اقدام شود.

سپاسگزاری : از مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی ایلام، پرسنل محترم بخش میکروب شناسی و بخش کشت سلول انستیتو پاستور ایران ، پرسنل محترم شبکه‌های بهداشت شهرستانها، درمانگاهها و خانه‌های بهداشت روستایی که درتمام مراحل این تحقیق از هیچ کمکی دریغ ننمودند ، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Bielaszewsk A.M,Janda J, Blahova K,et al. ***Human Escherichia coli 0157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat'smilk;*** Epidemiol Infect, 1997, Vol (119): 229-305.

2- Blanco JE, Blanco M, Mora A, et al. ***Methods used for the detection of verotoxigenic Escherichia coli in foods***; Alimentaria, 1996, Vol 34 (275):99-108.

3- Blanco M, Blanco JE, Blanco J, et al. ***Prevalence and characteriststics of human and bovine verotoxigenic E.coli strains isolated in Galicia(North-Western Spain)***; Eur J . Epidemiol, 1996, Vol 12(1): 13-19.

4- Bouzari. S , Vatsala .B. R, Varghese. A***. Characterization of verotoxinproducing strains of Enteropathogenic E . coli (EPEC) from children with diarrhea: Effect of the toxin on rabbit intestine;*** Med J Islamic Rep of Iran, 1994,Vol 8(1): 47-51.

5- Easton L. E***scherichia coli 0157: occurrence, transmission and laboratory detection***; Br.J of Biomedical Science, 1997, Vol (54): 57-64.

6- Nataro . J . P , Kakper. J . B . ***Diarrheagenic Escherichia coli;*** Clinical Microbiology Reviews , 1998, Vol 11(1): 142-201.

7- Karch H. ***Control of Enterohaemorrhagic E.coli infection: the need for a network involving Microbiological laboratories and clinical and public Health institutions;*** Eur J Clin Microbio Infect Dis, 1996, Vol 15(4): 276-280.

8- Mckee . M . L , Melton - celas . A . R , Moxley R.A, et al. ***Enterohaemorrhagic E.coli H6:157 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to Hep-2 cells;*** Infect Immun, 1995, Vol (63): 3739-3744.

9- Ismaili. A , Philpott. D.J, Dytoe .M.T, et al. ***Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin - producing E.coli,*** Infect Immun, 1995,Vol (63): 3316-3326.

10- O'Brien .A.D , Holmes .R.K. ***Shiga and shiga-like toxin***; Microbiol Rev,1987, Vol(51): 206-220.

11- Pai . C . H , Ahmed . N , Lior . M , et at. ***Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing E.coli: a two years prospective study;*** J Infec Dis,1998, Vol (157): 1054-1057.

12- Pierard . D , Stevens . D , Morian . L , et al. ***Three years PCR screening for VTEC in human stools in Brussels;*** Elsevier Science Publishing Inc, Brussels,1994.

13- sears . C .L , Kaper . J . B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of actionand linkage to Intestinal Secretion; Microbiol Rev, 1996, Vol(60): 167-215.

www.SID.ir