الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های Enteroaggregative (EAEC) Escherichia coli جدا شده از کودکان با بیماری اسهال

مریم عباس زاده[۱] ، سعید بوذری[۲*] ،محمد مهدی اصلانی[۳]، ابوالفضل داوودآبادی[۴]

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خاتم
۲. PhD میکروبیولوژی، استاد انستیتو پاستور تهران
۳. PhD میکروبیولوژی، دانشیار انستیتو پاستور تهران
۴. کارشناس ارشد باکتری شناسی، انستیتو پاستور تهران

نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب ، خیابان دوازده فروردین، انستیتو پاستور تهران، بخش بیولوژی مولکولی، کد پستی: ۱۳۱۶۴، نمابر ۶۶۴۹۲۶۱۹، تلفن: ۶۶۹۵۳۳۱۱(داخلی۲۲۲۳) ، saeidbouzari@yahoo.com

دریافت مقاله: شهریور هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هشت

چکیده

سابقه و هدف : *بیماریهای اسهالی یک مساله مهم مورد توجه سلامت عمومی است . E. coli اسهال زا (DEC) یکی از باکتری های پاتوژن مهم روده ای خصوصا در کشورهای در حال توسعه می باشد. (Enteroaggregative E. coli (EAEC علت متداول باکتریایی اسهال میان مسافران به کشورهای در حال توسعه ، به عنوان دومین دلیل متداول بعد از ETEC و دلیل اسهال مزمن و سوءتغذیه در کودکان و اشخاص مبتلا به HIV در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته می باشد. EAEC به عنوان یک پاتوژن روده ای نوظهور شناخته می شود. به دلیل اثرات نامطلوب اسهال خصوصا تداخل در رشد کودکان، در برخی موارد درمان آنتی بیوتیکی توصیه می شود. اما بدین منظور باید مقاومت ها و حساسیت های سویه ها در هر منطقه خاص به آنتی بیوتیک ها معلوم گردد.*

روش کار: *در مطالعه توصیفی حاضر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۰۴ ایزوله EAEC جدا شده از کودکان با بیماری اسهال ، که با multiplex PCR طراحی شده برای این منظور (برای ژن های AA، aap و aggR) شناسایی شده بودند ، مورد بررسی قرار گرفت . حساسیت ایزوله ها برای ۱۱ آنتی بیوتیک مختلف با روش Disk diffusion آزمایش گردید.*

یافته ها: *به جز سیپروفلوکساسین (CIP) و نالیدیکسیک اسید (NA) که تمامی سویه ها به آنها حساس بودند ، در مورد بقیه آنتی بیوتیک ها مقاومت وجود دارد . در میان ایزوله های typical EAEC و atypical الگوی مقاومت چندان متفاوت نبود . همچنین مشخص گردید مقاومت به بیش از یک آنتی بیوتیک پدیده غالب در میان این ایزوله ها است.*

نتیجه گیری: *استفاده از آنتی بیوتیک به صورت منطقی انجام نمی گیرد و این امر درمان بیماری های عفونی را با مشکل مواجه می سازد.*

واژگان کلیدی: ***Enteroaggregative E. coli ، آنتی بیوگرام ، typical EAEC ، Atypical EAEC ، مقاومت آنتی بیوتیکی***

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

Enteroaggregative E. coli (EAEC) پاتوژن نوظهوری است که جزء خانواده اشریشیاکلی های اسهال زا می باشد . این پاتوژن موجب اسهال و سوءتغذیه در کودکان و بیماران HIV و مسافران به کشورهای در حال توسعه می شود(۱) . Nataro و همکارانش برای اولین بار آن را گزارش نمودند(۲). این باکتری به صورت توده های آجری شکل چسبیده به سلول های HEp-2 دیده می شوند و علت چسبندگی تجمعی آنها و وجود فیمبریا II و AAF I است که بیان آنها توسط ژن aggR کنترل می شود(۵-۳). مکانیسم دقیق بیماری زایی EAEC هنوز مشخص نمی باشد . EAEC دارای پلاسمید بزرگی است که برخی فاکتورهای ویرولانس مانند فیمبریای II و AAF I(۶) ،فعال کننده رونویسی aggR(۳) ، انتروتوکسین مقاوم به حرارت انترواگرگیتیو(۷) ، سیتوتوکسین pet(۸) و dispersin (۵) را کد می کند. برای شناسایی EAEC از پروب CVD432(۹) ، PCR بر اساس ژن aggR (۱۰)و multiplex PCR بر اساس سه ژن پلاسمیدی aap, aggR, AA (۱۱) استفاده می شود . بر اساس روش multiplex PCR ، سویه های EAEC به دو گروه typical (دارای هر سه ژن) و atypical (دارای یک یا دو ژن مذکور) طبقه بندی شده اند(۱۲).

عفونت EAEC معمولا خود محدود شونده بوده و با تجویز مایعات درمان می شود (۶). ریشه کنی EAEC حداقل در بعضی افراد آلوده شده مورد نیاز می باشد به این دلیل که ارگانیسم می تواند باعث اسهال طولانی مدت به همراه تغذیه نامناسب و تداخل در رشد کودکان شود. اسهال بلند مدت ممکن است نیاز به درمان تغذیه ای علاوه بر درمان آنتی بیوتیکی داشته باشد. برای این منظور انجام تست حساسیت توصیه می شود. نشان داده شده است که ایزوله های EAEC در مکان های مختلف اغلب به چندین آنتی بیوتیک مقاوم هستند. برای مثال Haider و همکارانش گزارش کرده اند که ۷۱ ٪ ایزوله های جدا شده از کودکان دارای اسهال، مقاومت چند دارویی را نشان داده اند(۱۳). Kahali و همکارانش نیز در مطالعه ای روی بیماران در کلکته هند که دچار اسهال بودند ، EAEC را از نمونه تعدادی بیمار جدا کردند و در مطالعات آنتی بیوگرام که روی این تعداد نمونه انجام شد ، مقاومت آنتی بیوتیکی به پنج یا بیشتر آنتی بیوتیک مشاهده شد(۳). از آن زمان به بعد سایر محققین نشان دادند که شیوع مقاومت به سولفونامیدها، تریمتوپریم ، آمپی سیلین و کلرامفنیکل بیشتر از ٪ ۵۰ می باشد، ولی EAEC معمولا به سیپروفلوکساسین حساس می باشد. سایر آنتی بیوتیک هایی که EAEC به آنها حساس می باشد شامل آزیترومایسین ، رفاکسیمین، آموکسیسیلین /کلاولانیک اسید و نالیدیکسیک اسید می باشند . درمان تجربی عفونت EAEC بر اساس حساسیت آنتی بیوتیکی در منطقه مربوطه می باشد(۹). در مطالعه حاضر پس از انجام multiplex PCR و قرار دادن نمونه ها در دو گروه تیپیکال و آتیپیکال ، حساسیت و مقاومت آنها به ۱۱ آنتی بیوتیک مختلف مقایسه گردیده است .

رو ش کار

۳۰۷ نمونه باکتری از کودکان مبتلا به اسهال از مرکز طبی کودکان تهران همراه با دو سویه استاندارد ۲-۱۷ و ۰۴۲ به عنوان کنترل مثبت و K12 به عنوان کنترل منفی مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت نمونه ها در محیط LB مایع و بعد از جدا کردن نمونه های خالص توسط محیط مک کانکی ، پلاسمید نمونه ها توسط روش لیز قلیایی(alkaline lysis) استخراج شد .

Multiplex PCR برای ۳ ژن ویرولانس aap , aggR , AA پلاسمیدی به ترتیب با پرایمرها و شرایط زیر انجام شد . پرایمرها از کمپانی MWG تهیه گشته بودند.

aap: F 5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3'
R 5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC-3'
aggR: F 5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3'
R 5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3'
AA probe: F 5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3'
R 5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'

بافر PCR 10X ۲/۵ میکرولیتر ، $MgCl_2$ ۱/۵ میکرومول ، dNTP ۲ میکرومول ، سه جفت پرایمر forward و reverse از هر کدام ۱/۵ میکرومول ، Taq DNA polymerase ۱ میکرولیتر ،آب مقطر ۱۰ میکرولیتر و DNA الگو ۲ میکرولیتر استفاده شد . برنامه PCR، ۹۵° C، ۲ دقیقه برای یک چرخه ، ۹۴°C یک دقیقه ، ۵۰°C یک دقیقه ، ۷۲°C یک دقیقه برای سی چرخه و ۷۲°C پایانی هشت دقیقه تعیین گردید .

از نمونه کشت داده شده در LB ، در کنار شعله ، یک لوپ برداشته و در لوله با ml ۵ آب مقطر استریل ، رقیق شد . سپس محتویات این لوله روی پلیت LB جامد ریخته شده و پس از اینکه تمام سطح آن با مایع پوشیده شد، با سمپلر مایع اضافی برداشته و دور ریخته شد . پلیت ها با در نیمه باز در انکوباتور گذاشته شد تا خشک شوند . سپس دیسک های مربوط به آنتی بیوتیک های مختلف روی پلیت قرار گرفتند و در انکوباتور به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. در اطراف نمونه های حساس به آنتی بیوتیک یک هاله روشن که عدم رشد باکتری را نشان می دهد مشاهده می شد .

* لیست دیسک های آنتی بیوتیک مصرف شده ، محصول شرکت BioMerieux و غلظت آنها به شرح زیر می باشد :

Chloramphenicol (C)۳۰ µg, Ceftizoxim (CF) ۳۰ µg, Ciprofloxacin (CIP) ۵ µg, Cephalothin (CT) ۳۰ µg, Gentamycin (GM) ۱۰ µg, Kanamycin (K) ۳۰ µg, Nalidixic Acid (NA) ۳۰ µg, Sulfamethaxazol trimethoprim (SXT)*, Tetracyclin (TE) ۳۰ µg, Stereptomycin (S) ۱۰ µg, Ampicillin (AM) ۱۰ µg

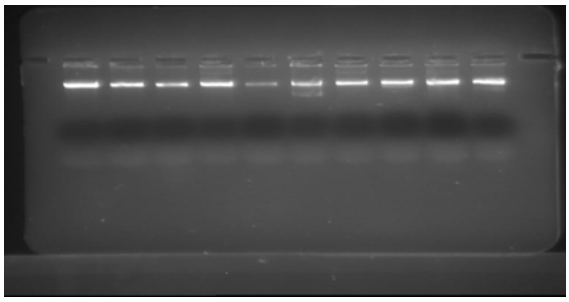
* sxt از دو آنتی بیوتیک تشکیل شده است . sulfamethaxazol با غلظت ۲۳/۷۵ µg و trimethoprim با غلظت ۱/۲۵ µg .

یافته ها

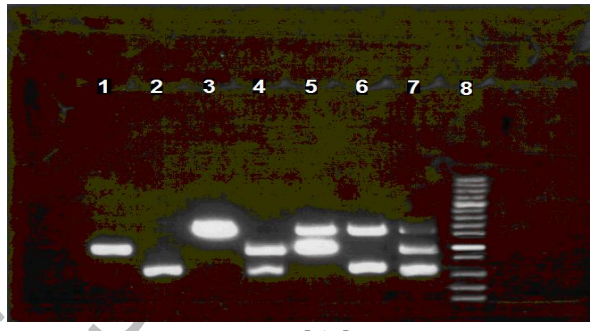
پس از انجام مراحل تخلیص پلاسمید به روش لیز قلیایی ، پلاسمید روی ژل الکتروفورز گردید تا از وجود و کیفیت پلاسمید استخراج شده اطمینان حاصل شود(شکل ۱) .

برای اطمینان از صحت شرایط و مواد PCR ، PCR برای پلاسمید سویه ۲-۱۷ به عنوان کنترل مثبت ، با هر کدام از پرایمرهای AA ، aggR و aap به تنهایی ، ترکیب دوتایی آنها و هر سه با هم انجام شد(شکل ۲). سپس multiplex PCR برای نمونه های دیگر انجام گردید و نتایج روی ژل ٪۱/۵ مشاهده شد(شکل ۳). نمونه هایی که هر سه ژن AA ، aap و aggR را دارا بودند در گروه باکتری های EAEC تیپیکال و آنهایی که یک یا دو ژن را دارند در گروه باکتری های EAEC آتیپیکال قرار داده شدند.۲۹۹ نمونه از ۳۰۷ نمونه ای که با استفاده از محیط مک کانکی E. coli خالص تشخیص داده شده بودند، مورد آزمایش multiplex PCR قرار گرفتند. در این آزمایش ۱۳۳ نمونه تیپیکال (٪۴۴) ، ۷۱ نمونه ها آتیپیکال (٪۲۴) و ۹۵ (٪۳۲) نمونه ها نیز بودند(جدول ۱) .

Archive of SID
www.SID.ir

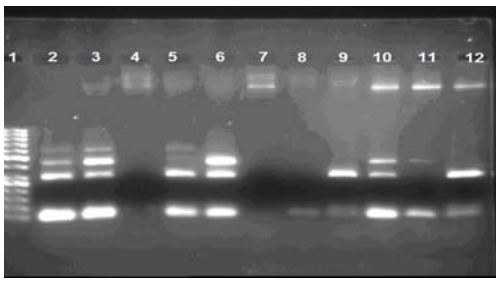


شکل ۱. نمونه پلاسمیدها



شکل۲. انجام Multiplex PCR برای سویه رفرانس ۲-۱۷ EAEC با ترکیب های مختلف پرایمری:

چاهک ۱ : نتیجه PCR با پرایمر aggR
چاهک ۲ : نتیجه PCR با پرایمر aap
چاهک ۳ : نتیجه PCR با پرایمر AA
چاهک ۴ : نتیجه PCR با دو پرایمر aggR و aap
چاهک ۵ : نتیجه PCR با دو پرایمر AA و aggR
چاهک ۶ : نتیجه PCR با دو پرایمر AA و aap
چاهک ۷ : نتیجه PCR با هر سه پرایمر
چاهک ۸ : مارکر ۱۰۰bp



شکل ۳ . انجام multiplex PCR برای نمونه های EAEC

چاهک ۱ : مارکر ۵۰ bp
چاهک ۲ : نمونه کنترل مثبت ۲-۱۷
چاهک ۳ و ۵ : نمونه های تیپیکال
چاهک ۴ ، ۷ ، ۸ : نمونه های منفی
چاهک ۶ ، ۹ ، ۱۰ ، ۱۱ ، ۱۲ : نمونه های آتیپیکال

جدول ۱. نتیجه multiplex PCR

multiplex PCR			*EAEC*	*تعداد نمونه*
aap	*aggR*	*AA*		
+	+	+	Typical	۱۳۳ (۴۴٪)
+	+	-	Atypical	۵۴ (۱۸٪)
+	-	-		۱۷ (۶٪)
-	-	-	-	**۹۵ (۳۲٪)**

تعداد کل : ۲۹۹ سویه

سویه های تیپیکال و آتیپیکال از لحاظ مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف تفاوتی نشان نمی دهند . بیشترین درصد مقاومت به آمپی سیلین (AM) و بیشترین حساسیت در بین سویه ها به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید (NA) ، جنتامایسین (GM) و سیپروفلوکساسین (CIP) دیده شد (جدول ۲) .

سویه های تیپیکال و آتیپیکال مورد آزمایش الگوهای مقاومت به آنتی بیوتیک متفاوت با درصدهای مختلفی را از خود نشان دادند . این سویه ها از این نظر هتروژن هستند و در اکثر موارد الگوی مقاومت به چند آنتی بیوتیک در میان سویه ها شایع می باشد(جداول ۳ و ۴) .

جدول ۲. درصد مقاومت نمونه ها به آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک	*Te*	*NA*	*CF*	*S*	*C*	*CT*	*K*	*AM*	*SXT*	*GM*	*CIP*
typical	۵۷	۰	۵۵	۵۴	۴۳	۱۳	۱۴	۱۰۰	۵۷	۰	۰
atypical	۵۳	۰	۵۲	۵۲	۴۸	۱۷	۱۵	۱۰۰	۶۳	۰	۰

جدول۳.الگوی کلی مقاومت نمونه های typical

ردیف	Te	NA	CF	S	C	CT	K	AM	SXT	GM	CIP	درصد
۱			+	+				+	+			۱۳
۲			+					+				۱۳
۳	+		+	+	+			+	+			۹/۳
۴	+		+	+				+	+			۹/۳
۵								+				۷/۴
۶	+		+	+	+		+	+	+			۵/۵
۷	+		+	+	+	+		+	+			۳/۷
۸			+	+	+			+	+			۳/۷
۹				+	+			+				۳/۷
۱۰	+							+	+			۳/۷
۱۱			+	+		+		+	+			۱/۸
۱۲	+		+		+			+	+			۱/۸
۱۳	+		+		+	+	+	+	+			۱/۸
۱۴	+		+					+	+			۱/۸
۱۵			+					+	+			۱/۸
۱۶	+		+	+	+			+				۱/۸
۱۷	+			+	+		+	+	+			۱/۸
۱۸	+			+	+			+				۱/۸
۱۹	+			+				+	+			۱/۸
۲۰	+						+	+	+			۱/۸
۲۱	+				+			+	+			۱/۸
۲۲					+			+	+			۱/۸
۲۳	+				+	+		+	+			۱/۸
۲۴	+					+		+	+			۱/۸
۲۵	+		+		+	+		+	+			۱/۸

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. الگوی کلی مقاومت نمونه های atypical

ردیف	Te	NA	CF	S	C	CT	K	AM	SXT	GM	CIP	درصد
۱			+					+				۳۳
۲			+	+	+			+	+			۸/۳
۳	+							+	+			۸/۳
۴	+		+	+				+	+			۵/۵
۵				+				+	+			۵/۵
۶								+	+			۵/۵
۷	+		+	+	+			+	+			۵/۵
۸								+				۲/۸
۹				+		+		+	+			۲/۸
۱۰	+					+		+	+			۲/۸
۱۱						+		+				۲/۸
۱۲	+					+		+				۲/۸
۱۳					+			+	+			۲/۸
۱۴			+		+			+	+			۲/۸
۱۵	+		+	+	+	+	+	+	+			۲/۸
۱۶			+	+				+	+			۲/۸
۱۷	+		+					+				۲/۸

بحث

EAEC به عنوان عامل اسهال حاد و مزمن در کودکان و مسافران در کشورهای در حال توسعه و حتی توسعه یافته ، به وسیله الگوی چسبندگی خاص خود به سلول های HEp-2 که همانند آجرهای روی هم می باشد ، شناسایی می شود(۱۴). از آنجا که این آزمایش نیاز به مهارت و امکانات خاص دارد ، همیشه تمایل تشخیص اولیه بر پایه حضور فاکتورهای بیماری زا وجود داشته است . در میان روش های مختلف مانند روشPCR Tsukamoto(1996) (۱۰) بر پایه ژن aggR و یا روش Sarantuya(2004) (۱۵) با استفاده از ژن های aggR و astA ، روش multiplex PCR Cerna(2003) (۱۱)که بر پایه سه ژن پلاسمیدی aap ، aggR و AA می باشد یک تست مولکولی سریع و یکی از حساس ترین روشهای تشخیص EAEC می باشد .

در این مطالعه پس از انجام multiplex PCR بر روی نمونه های ایرانی ، در ۴۴٪ نمونه ها هر سه ژن مورد مطالعه دیده شدند . در ۱۸٪ تنها دو ژن و در ۷۰٪ حداقل یک ژن دیده شد . درحالیکه در مطالعه Cerna(11) ۸۲٪ نمونه ها دارای هر سه ژن بودند . هیچ کدام دارای دو ژن با هم نبوده و ۸۶٪ حداقل دارای یک ژن بودند . اینکه پراکندگی بیشتری در الگوی ژنی نمونه های ایرانی دیده می شود ، می تواند نشان دهنده هتروژنیسیتی بیشتر این نمونه ها باشد .

در بررسی آنتی بیوگرام نمونه های EAEC با ۱۱ آنتی بیوتیک مختلف چه در نمونه های تیپیکال و چه در نمونه های آتیپیکال طیف وسیعی از مقاومت ها و حساسیت ها مشاهده شده و کلا الگوی ثابت مقاومتی مشاهده نگردید که نشان دهنده هتروژن بودن ایزوله های EAEC می باشد . قبلا Kahali نیز در آزمایشات خود به این نتیجه رسیده بود (۳). در بررسی های انجام شده در بیشتر موارد الگوی مقاومت به چند آنتی بیوتیک مشاهده شد که لزوم مدیریت صحیح در مصرف داروها را یادآور می شود . Kahali (۳) ، Haider و همکارانش (۱۳) نیز به این مساله اشاره کرده اند.

REFERENCES

1. Huang, D.B., et al., Enteroaggregative Escherichia coli: an emerging enteric pathogen. Am J Gastroenterol, 2004. 99(2): p. 383-9.

2. Nataro JP, Kaper JB, Robins Browne R, Prado V, Vial P. Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J 1987;6:829-31.

3. Kahali, S., 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): p . 4111-20.

4. Morabito, S., et al., Enteroaggregative, Shiga toxin-producing Escherichia coli O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol, 1998. 36(3): p. 840-2.

5. Torres, Alfredo G., Xin Zhou , and Kaper , James B. , Adherence of Diarrheagenic Escherichia coli Strains to Epithelial Cells. Infection and immunity, 2005, p. 18–29.

6. Huang , D. and A. Mohanty A review of an emerging enterpathogen : enteroaggregative Escherichia coli. J Clin Microbiol, 2006. 55: p. 1303-1311.

7. Vial, P.A., et al., Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis, 1988. 158(1): p. 70-9.

Archive of SID
www.SID.ir

8. Villaseca, J.M., et al., Pet toxin from enteroaggregative Escherichia coli produces cellular damage associated with fodrin disruption. Infect Immun, 2000. 68(10): p. 5920-7.

9. Okeke, I.N. and J.P. Nataro, Enteroaggregative Escherichia coli. Lancet Infect Dis, 2001. 1(5): p. 304-13.

10. Tsukamoto , T., PCR methods for detection of enteropathogenic Escherichia coli (localised adherence)and enteroaggregative Escherichia coli. Kansenshogaku Zasshi 1996. 76: p. 569-573.

11. Cerna, J. F. , Nataro, J. P. , Garcia, T. E. , Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of Enteroaggregative Escherichia coli strains. Clinical microbiology , 2003, p. 2138-2140.

12. Bouzari, S. , Jafari, A. , Zarepour , M. , Distribution of virulence related genes among enteroaggregative Escherichia coli isolates : using multiplex PCR and hybridization . Infection, Genetics and Evolution , 2005 , 5: 79-83 .

13. Haider, K., et al., Enteroaggregative Escherichia coli infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. J Diarrhoeal Dis Res, 1991. 9(4): p. 318-22.

14. kaper, J., et al., Pathogenic Escherichia coli. Nature review, 2004. 2: p. 123-140.

15. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K, Kawano Y., 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.

Archive of SID

www.SID.ir