

بررسی حساسیت و اختصاصیت روش سروتایپینگ در مقایسه با روش مولکولی در شناسایی انتروپاتوژنیک ای. کلای جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال

اعظم محمودی ازناوه^۱، بی تا بخشی^۲،* شهین نجار پیرایه^۳

۱. کارشناس ارشد باکتری شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲. استادیار گروه باکتری شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران
۳. دانشیار گروه باکتری شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

*نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی؛ کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶،
b. bakhshi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: بهمن نود و سه پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: انتروپاتوژنیک اشرشیا کلای به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری زای عفونی کودکان و عامل اسهال پایدار و مزمن در جهان است. این ارگانسیم دارای سروتایپ های مشخصی است که در کودکان ایجاد اسهال می کند. ژنی که برای شناسایی این باکتری استفاده می شود *eae* نام دارد. در آزمایشگاه های بالینی ایران برای تشخیص این پاتوتایپ از روش سروتایپینگ استفاده می شود ولی نشان داده شده است که می تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شود. این مطالعه با هدف مقایسه روش سروگروپینگ و روش مولکولی برای شناسایی پاتوتایپ *EPEC* ای. کلای انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تعداد ۸۸۵ ایزوله ای. کلای که از تعداد ۱۳۸۷ نمونه کودکان مبتلا به اسهال جمع آوری شده بود بررسی شد. نمونه ها از لحاظ وجود سروگروه های *EPEC* توسط آزمون های سرولوژی بررسی شدند و شناسایی مولکولی انتروپاتوژنیک ای. کلای با استفاده از تشخیص ژن *eae* به وسیله *PCR* و پرایمرهای اختصاصی آن انجام شد.

یافته ها: از میان ۸۸۵ ایزوله ای. کلای تعداد ۳۵ ایزوله (۳/۹۵٪) توسط یکی از آنتی سرم های گروه *O* مثبت شدند و به عنوان گونه مشکوک به *EPEC* در نظر گرفته شدند از این تعداد، تنها ۱۰ مورد (۱/۱۳٪) حاوی ژن *eae* بودند و این در حالی است که با استفاده از روش *PCR* ۶۸ ایزوله (۷/۶۸٪) از ۸۸۵ ای. کلای حاوی ژن *eae* بودند و *EPEC* نامیده شدند. با توجه به این اطلاعات، حساسیت و ویژگی برای روش سروتایپ به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۹۶/۹٪ بدست آمد.

نتیجه گیری: روش سروتایپینگ که برای تشخیص *EPEC* در آزمایشگاه ها به طور روتین استفاده می شود دارای نتایج مثبت و منفی کاذب فراوانی است و باید ترتیبی اتخاذ شود تا روش های مولکولی مورد اعتماد جایگزین این روش شود.

واژگان کلیدی: انتروپاتوژنیک اشرشیا کلای، سروگروپینگ، *PCR*

مقدمه

انتروهموراژیک ای. کلای (*EHEC*)، انتروپاتوژنیک ای. کلای (*EPEC*) و *diffusely adherent E. coli* (DAEC) قابل تقسیم می باشند (۳). *EPEC* عامل اسهال در کودکان است که توکسین تولید نمی کند و تهاجمی نیست (۴). بیماری زایی اولیه آن به علت تولید لژیون های "Attaching and Effacing" است که باعث تخریب میکرو ویلی در سطح لومن روده می شود. توانایی تولید A/E توسط لوکوس *LEE* کد می شود. این لوکوس حاوی ژن *eae* است که کد کننده اینتیمین است و باعث اتصال *EPEC* به سلول اپی تلیال می شود. از این ژن برای شناسایی مولکولی انتروپاتوژنیک ای. کلای استفاده می شود (۵).

این پاتوتایپ یکی از مهم ترین عوامل عفونی در کودکان زیر ۲ سال در کشورهای در حال توسعه است. شیوع *EPEC* بر اساس اختلاف در

بیماری های اسهالی یکی از عوامل جهانی منجر به مرگ و میر است که سالانه باعث مرگ دو میلیون نفر در جهان می شود و بیشترین علت مرگ و میر در میان کودکان در کشور های جهان سوم است (۱). اگر چه خیلی از ویروس ها، باکتری ها و انگل ها می توانند اسهال مداوم ایجاد کنند، زیاردیا، کریپتوسپوریوم، انترواگریگیتو ای. کلای و انتروپاتوژنیک ای. کلای از مهمترین علل ایجاد اسهال هستند (۲).

اشرشیا کلای ساکن روده انسان است و به عنوان فلور نورمال و بدون ضرر محسوب می شود، اما میتواند عامل اسهال شدید به خصوص در کودکان باشد. ای. کلای ها بر اساس ویژگی های ویرولانسان به پاتوتایپ هایی شامل انتروتوکسیژنیک ای. کلای (*ETEC*)، انترواینوسیو ای. کلای (*EIEC*)، انترواگریگیتو ای. کلای (*EAggEC*).

روی محیط NA کشت داده شده اند و بعد از مدت ۲۴ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۳۷ درجه برای انجام سروتایپ آماده شدند. به این صورت که یک قطره از آنتی سرم روی یک لام تمیز قرار داده شده و یک کلنی از باکتری به آرامی در آن حل شد. واکنش مثبت بر اساس رویت یک رسوب شیری رنگ قابل مشاهده در نتیجه آگلوتیناسیون بین آنتی ژن های موجود در سطح باکتری و آنتی سرم های اضافه شده بر روی لام می باشد(۹). اگر واکنش منفی گزارش شد این روش برای سه پلی والان دیگر این تکرار می شود و اگر برای هر چهار پلی والان منفی شود، نمونه سروتایپ منفی خواهد بود. نمونه های مثبت از لحاظ سروتایپ به عنوان مشکوک به انتروپاتوژنیک ای. کلای در نظر گرفته می شود و سویه مورد نظر از لحاظ داشتن ژن ویروالانس مورد بررسی قرار می گیرد.

DNA/شیرشیا کلای های ایزوله شده با روش جوشاندن استخراج شدند. ابتدا ای. کلای ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس ۲۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری در آب مقطر قابل تزریق در میکروتیوپ تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵°C جوشانده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm، ۱۰۰ μl از محلول رویی به عنوان DNA الگو به میکروتیوپ جدیدی انتقال یافت و در دمای ۲۰°C - برای آزمایشات بعدی نگه داری شد.

تشخیص ژن *eae* با استفاده از پرایمر های اختصاصی این ژن مورد بررسی قرار گرفتند. سویه ها هم چنین از نظر دارا بودن و یا نبودن ژن های *stx1* و *stx2* برای تفکیک انتروهموراژیک ای. کلای بررسی شدند. لیست پرایمر های استفاده شده در جدول یک نشان داده شده است. از ایزوله استاندارد EPEC که در مطالعات قبلی به دست آمده بود به عنوان کنترل مثبت(۱۰) و از ای. کلای ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جمعیت مورد مطالعه، گروه سنی، معیارهای تشخیصی، مدت تشخیصی و ... متفاوت است بر اساس روش های مولکولی (شناسایی ژن اینتیمین) EPEC عامل ۱۰-۵ درصد از اسهال فصلی کودکان در کشورهای در حال توسعه است. وقتی از روش های شناسایی بر اساس ویژگی اتصال سلولی و یا سروتایپ استفاده می شود، تخمین شیوع EPEC با تنوع زیادی در مطالعات تا میانگین ۲۰-۱۰٪ بالاتر می رود(۲). امروزه شناسایی EPEC بر اساس وجود ژن ها ویروالانس اختصاصی است برای سال ها تشخیص EPEC بر اساس تشخیص سروتایپی O:H بود(۶). در طی دو دهه اخیر با شناسایی مکانیسم پاتوژن EPEC روش های شناسایی مولکولی از طریق شناسایی ژن های ویروالانس جایگزین روش های فنوتیپی شده است و با گسترش این روش ها سویه های EPEC یافت شده است که در تقسیم بندی سرورگروپ های کلاسیک نیز قرار نمی گیرند(۷، ۸).

این مطالعه با هدف تعیین حساسیت و ویژگی روش سروتایپینگ در مقایسه با روش مولکولی در شناسایی انتروپاتوژنیک ای. کلای انجام شد.

روش کار

تعداد ۸۸۵ نمونه ای جمع آوری شده *E. coli* از کودکان بستری شده در سه بیمارستان تهران در این مطالعه استفاده شد. این تعداد/شیرشیا کلی از ۱۳۸۷ نمونه مدفوعی و طی سال های ۸۹-۹۱ به دست آمدند. سویه های ای. کلای با استفاده از تستهای بیوشیمیایی متداول شامل تست اکسیداز، اوره، سیترات، حرکت، اندول، MR-VP تایید شد. این ایزوله ها در محیط مایع LB کشت داده شده و بعد از مدت ۱۶ ساعت و اضافه کردن ۳۰ درصد گلیسرول در فریژر برای انجام مطالعات بعدی نگه داری شدند. ۸۸۵ نمونه ای. کلای جدا شده با استفاده از آنتی سرم پلی والان خریداری شده از شرکت بهار افشان) آزمایش شد. نمونه های ای. کلای

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	سایز باند تکثیری	رفرنس
Eae-F	TGCGGCACAACAGGCGGCGA	۴۲۲	(۱۰)
Eae-R	CGGTCGCCGCACCAGGATTC		
stx1-F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG	۸۹۴	(۱۱)
stx1-R	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG		
stx2-F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	۴۷۸	(۱۱)
stx2-R	GGATGCATCTCTGGTCATTG		

۵۳ و ۵۵ درجه به ترتیب برای ژن های *eae* و *stx* درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله Extension در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. Extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه انجام گرفت.

PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۱۶ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۵/۲ میکرولیتر پرایمر PCR 10X، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۳ میکرولیتر dNTP، ۰/۲۵ میکرولیتر جفت پرایمر و ۱۵/۹ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. مرحله Denaturation اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ده دقیقه انجام گرفت. تعداد سیکل واکنش ۳۰ عدد و شامل مرحله Denaturation ثانویه به مدت ۱ دقیقه، مرحله Annealing در دمای

یافته ها

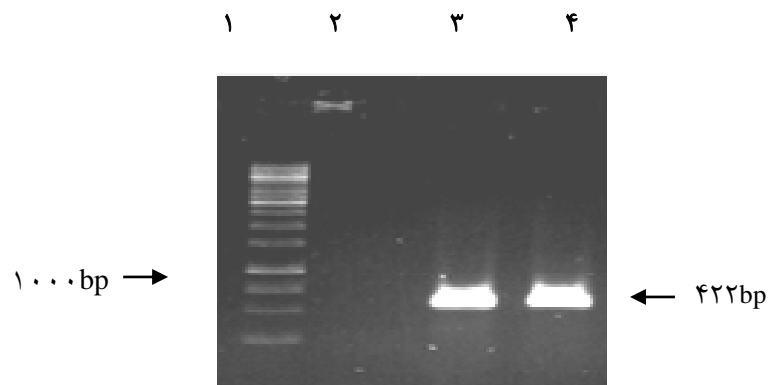
eae بودند و باند ۴۲۲ bp برای تمام ایزوله های *eae*⁺ مشاهده شد. شکل یک نشان دهنده نتیجه PCR برای ایزوله های مثبت و منفی و سویه کنترل است. نتیجه PCR برای ژن *stx*₁ و *stx*₂ در تمام ایزوله ها منفی گزارش شد (شکل ۲). تنها ۱۰ ایزوله هم با روش سروتایپ و هم با روش مولکولی به عنوان EPEC شناسایی شد. با توجه به اطلاعات به دست آمده و روش معرفی شده توسط Parikh و همکاران (۱۲)، حساسیت و ویژگی روش سروگروپینگ به ترتیب برابر ۱۴/۷ و ۹۶/۹ درصد محاسبه شد (جدول ۲).

از ۸۸۵ ایزوله *E. coli* تعداد ۳۵ ایزوله (۳/۹۵٪) جز یکی از ۴ آنتی-سرم پلی والان مورد استفاده بودند. نمونه های ای. کلای به طور مجزا از نتیجه سروتایپینگ با روش شناسایی مولکولی بررسی شدند. بدین منظور از PCR و پرایمر اختصاصی مربوط به ژن *eae* استفاده شد. این ژن جهت اتصال باکتری به سلول اپی تلیال روده و ایجاد بیماری ضروری است. از تعداد ۸۸۵ ایزوله ای. کلای تعداد ۶۸ نمونه (۷/۶۸٪) حاوی ژن ویرولانسی

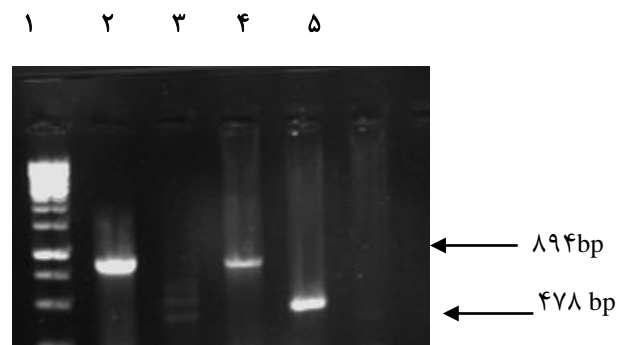
جدول ۲. توزیع نمونه های ای. کلای براساس نتیجه آزمایش مولکولی و سروتایپینگ

	وجود بیماری بر اساس تست مولکولی	عدم وجود بیماری بر اساس تست مولکولی
تعداد ایزوله های مثبت	۱۰	۲۵
تعداد ایزوله های منفی	۵۸	۷۹۲

شکل ۱



شکل ۲



شکل ۱. PCR ژن *eae*. چاهک شماره ۲: کنترل منفی (E.coli ATCC 25922). چاهک شماره ۳: کنترل مثبت. چاهک شماره ۴ نمونه جدا شده از بیمار. چاهک شماره ۱ مارکر 1Kb.

شکل ۲. PCR ژنهای *stx1* و *stx2*. چاهک شماره ۲ و ۳: کنترل مثبت *stx1* (دو سویه EHEC)، چاهک شماره ۴: کنترل منفی (E.coli ATCC 25922). چاهک شماره ۵: کنترل مثبت *stx2*. چاهک شماره ۱ مارکر 1Kb.

بحث

براساس گزارش های عنوان شده در خصوص سیستم تشخیص پاتوژن تا سال ۲۰۱۱ انتروپاتوژنیک ای. کلای توسط گروه O سروتایپ طبقه بندی می شد. این روش بسیار مشکل آفرین بود. برای مثال بعضی از سویه های انترواگریگیتو ای. کلای در گروه EPEC قرار می گرفتند و برعکس بعضی از سویه های حاوی ژن *eae* در سرورگروپ O قرار نمی گرفتند و به عنوان non-EPEC شناخته می شدند. سویه های غیر پاتوژن O1 و O18 هم EPEC گزارش می شدند (۱۹). سازمان جهانی بیماری های عفونی این موضوع را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه این شد که از این پس ژن اینتیمین جایگزین سروتایپ گروه O به عنوان نشانگر پاتوژن اولیه برای سویه های EPEC از سال ۲۰۱۲ باشد (۲۰). این در حالی است که در آزمایشگاه های بالینی در ایران سروتایپینگ روش اصلی شناسایی انتروپاتوژنیک ای. کلای است و ایزوله های مثبت شده با این روش به عنوان انتروپاتوژنیک ای. کلای به پزشک گزارش می شوند و در نتیجه تشخیص نادرست، آنتی بیوتیک های نامناسب برای بیمار تجویز می شود که می تواند به عنوان یکی از علل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و از عوامل مقاومت بالای باکتری های کامنسال باشد (۲۱).

نتیجه گیری

به این ترتیب در کشور ما نیز باید تدبیری اندیشیده شود تا روشهای مولکولی که بسیار سریع تر و با دقت بیشتری هستند جایگزین روش سروتایپینگ که از دقت کمی برخوردار است و نتایج مثبت کاذب فراوانی را نشان می دهد، شود. بدین ترتیب با بالا رفتن صحت نتیجه آزمایش از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک جلوگیری می شود و از انتقال افقی ژن های مقاومت و در نتیجه بروز مقاومت در باکتری ها جلوگیری می گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت که بدین وسیله قدردانی می گردد.

در این مطالعه از تعداد ۸۸۵ نمونه ای. کلای ۲۵ و ۵۸ ایزوله به ترتیب تنها توسط روش سروتایپینگ و مولکولی مثبت شناخته شدند. تنها ۱۰ ایزوله با استفاده از هر دو روش سرولوژیک و مولکولی مثبت بوده اند. بدین معنی که با روش های سرولوژی نه تنها میزان واقعی انتروپاتوژنیک ای. کلای شناسایی نمی شود بلکه تعداد زیادی نتایج مثبت کاذب را نشان می دهد و تنها میزان ۱۴/۷٪ (۱۰ ایزوله از ۶۸ ایزوله) از تعداد کل واقعی انتروپاتوژنیک ای. کلای ها مشخص میشوند. به عبارت دیگر ۲/۸۲٪ (۲۵ ایزوله از ۸۸۵ ایزوله) باکتری های مشکوک به عنوان انتروپاتوژنیک ای. کلای با روش سروتایپینگ از لحاظ ژنتیکی منفی گزارش شده اند. با توجه به این اطلاعات حساسیت و ویژگی برای روش سروتایپ به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۹۶/۹٪ است (شکل ۲) که نشان دهنده ضعیف بودن عملکرد تست سروتایپ برای تمایز مثبت های واقعی از مثبت های کاذب است و در نهایت باعث ایجاد نتایج غیر قابل اعتماد می شود.

در مطالعه حاضر تنها تعداد ۱۰ ایزوله از ۳۵ (۲۸/۵٪) ایزوله ای که نتایج سروتایپ مثبت داشتند حاوی ژن ویرولانس *eae* بودند و به عنوان پاتوژن شناخته شده اند. عدم وجود ژن های ویرولانس در سروتایپ های کلاسیک EPEC در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است (۹، ۱۳-۱۵).

نامناسب بودن تست سروتایپینگ در تشخیص ای. کلای پاتوژن در دیگر نقاط جهان نیز مطرح شده است. در مقاله هایی که توسط vidotto در سال ۲۰۰۰، fujioka در سال ۲۰۰۹ و Eklund در سال ۲۰۰۱ به چاپ رسیده است بیان شده است که روش سروتایپ به تنهایی برای تشخیص ای. کلای های اسهالی ناکافی است و سروتایپ های جدید دیگری هم برای این باکتری شناسایی شده است که جز سروتایپ های کلاسیک قرار نمی گیرند و در نتیجه روش سروتایپ تنها برای سرورگروپ های مشخصی کارآمد است (۷، ۱۶، ۱۷). این مسئله در سویه هایی که در ایران نیز جداسازی میشوند دیده شده است. در مطالعه بودری و همکاران که در سال ۲۰۱۱ به چاپ رسیده است، از روش شناسایی مولکولی برای تشخیص EPEC بهره گرفته شد و نشان داده شد که ۹/۸٪ سویه های به دست آمده با آنتی سرم های موجود غیر قابل تیپ بندی می باشند (۱۸).

REFERENCES

1. World Health Organization. Bridging the Gaps. The WorldHealth Report, 1995.
2. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(9):852-6.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
4. Kaper JB. Defining EPEC. 1996. p. 130-3.
5. Vallance B, Finlay B. Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(16):8799-806.
6. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev.* 1984;6:31-51.
7. VIDOTTO MC, KOBAYASHI RK, DIAS AM. Unidentified serogroups of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) associated with diarrhoea in infants in Londrina, Parana, Brazil. *J Med Microbiol.* 2000;49(9):823-6.
8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142-201.
9. Yang JR, Wu FT, Tsai JL, Mu JJ, Lin LF, Chen KL, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic Escherichia coli in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3620-5.
10. Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie MR, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of class 1 integrons among enteropathogenic Escherichia coli. *Can J Microbiol.* 2012;58(5):637-43.
11. Jafari F, Garcia-Gil L, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani M, Pourhoseingholi M, et al. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. *J Infect.* 2009;58(1):21-7.
12. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol.* 2008;56(1):45-50.
13. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic Escherichia coli categories among the traditional enteropathogenic E. coli O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(6):545-52.
14. Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, et al. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated Escherichia coli. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58(2):65-9.
15. Sunabe T, Honma Y. Relationship between O-serogroup and presence of pathogenic factor genes in Escherichia coli. *Microbiol Immunol.* 1998;42(12):845-9.

16. Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2829-34.
17. Fujioka M, Kasai K, Miura T, Sato T, Otomo Y. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(6):476-80.
18. Bouzari S, Aslani MM, Oloomi M, Jafari A, Dashti A. Comparison of multiplex PCR with serogrouping and PCR-RFLP of *fliC* gene for the detection of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Braz J Infect Dis*. 2011;15(4):365-9.
19. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Japan as of 2011. In: IASR, editor. 2012.
20. Versalovic J. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2011.
21. Mahmoudi-Aznavah A, Bakhshi B, Najar-Peerayeh S, Kazemnejad A, Rafieepour Z, Rahbar M, et al. Commensal *E. coli* as an Important Reservoir of Resistance Encoding Genetic Elements. *Int J Enteric Pathog*. 2013;1(2):43-7.