Archive of SID

Semnan University of Medical Sciences

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 21, Issue 1 (Winter 2019), 1-204

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:
Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

www.SID.ir

Archive of SID

کومش- جلد ۲۱، شماره ۱ (پیاپی ۷۳)، زمستان ۱۳۹۷

شناسایی ژن *cdtB* در میان باکتری‌های روده‌ای در بیماران مبتلا به گاستروانتریت و سندرم روده تحریک‌پذیر

لیلا گنجی[۱](Ph.D)، مسعود آل‌بویه[۲](Ph.D)، محمدحسن شیرازی[۱*](Ph.D)، ناصر ابراهیمی دریانی[۳](M.D)، عباس میرشفیعی[۴](Ph.D)، سید سعید اشراقی[۱](Ph.D)، پریسا اسلامی[۵](M.Sc) ، محمدرضا زالی[۲](M.D)

۱-دپارتمان پاتوبیولوژی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲-مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دپارتمان گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دپارتمان پاتوبیولوژی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- دپارتمان میکروب شناسی، آزمایشگاه مرکزی، بیمارستان میلاد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۳۸۶۲۹ drshirazi1952@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۹

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

چکیده

هدف: *Cytholethal Distinding Toxins (CDTs)* **از جمله توکسین‌های باکتریایی است که تاکنون در برخی از باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکولی، گونه‌های سالمونلا و کمپیلوباکتر شناسایی شده است. این توکسین از سه ژن مجاور هم شامل *cdtA*، *cdtB* و *cdtC* تشکیل شده است. زیرواحد *CdtB*بخش کاتالیک توکسین بوده و موجب تخریبDNA سلول میزبان می‌شود. علی‌رغم تعیین حضور ژن *cdtB* در میان باکتری‌های مختلف، نقش آن‌ها در بروز بیماری‌هایی مانند گاستروانتریت حاد و سندرم روده تحریک‌پذیر، به‌خوبی مشخص نشده است. جهت روشن شدن این ارتباط، در این مطالعه فراوانی حضور واریانت‌های ژنی*cdtB* در باکتری‌های مختلف بیماران مبتلا به گاستروانتریت و سندرم روده تحریک‌پذیر در مقایسه با افراد غیر بیمار بررسی شده است.**

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به گاستروانتریت و IBS و افراد سالم (گروه کنترل) انجام شد. تمامی نمونه‌ها تحت استخراج DNA ژنومی قرار داده شدند. حضور ژن *cdtB* باکتری‌های *کمپیلوباکتر، یرسینیا انترکولیتیکا، پرووویدنسیا آلکالیفاسینز، سالمونلا انتریکا و اشرشیاکولی* به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید. در نهایت محصول‌های ژنی جهت تایید تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: کمپیلوباکترهای کدکننده ژن *cdtB* به ترتیب در ۷/۵ (۵/۸۰) و ۳۴/۶ (۵۲/۱۵۰) درصد افراد مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر و گاستروانتریت شناسایی شد. هم‌چنین ۱۴ درصد (۱۴/۱۰۰) بیماران با گاستروانتریت و ۵ درصد (۸/۸۰) مبتلایان به سندرم روده تحریک‌پذیر حامل سالمونلاهای کدکننده *cdtB* بودند. هیچیک از نمونه‌های هر سه گروه مورد مطالعه ژن *cdtB* اشریشیاکولی و پرووویدنسیا آلکالیفاسینز را نداشتند. بررسی توالی‌های ژنی حاصل هویت ژن‌های هدف در گونه‌های باکتریایی مختلف را تایید نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از حضور باکتری‌های پاتوژن کدکننده CDT-B در دستگاه گوارش بیماران مبتلا به IBS و گاستروانتریت بود. با توجه به حضور بالای سالمونلا و کمپیلوباکتر کدکننده‌ی*cdtB* در مبتلایان به سندرم روده تحریک‌پذیر، به نظر می‌رسد که ابتلا به این باکتری‌ها یکی از فاکتورهای خطر ابتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر-پسا عفونت در بیماران ایرانی باشد.

واژه‌های کلیدی: پاتوژن‌های روده‌ای، سندرم روده تحریک‌پذیر، گاستروانتریت،Cytholethal Distinding Toxins

مقدمه

Cytholethal Distinding Toxincs (CDTs) از جمله سیتوتوکسین‌های باکتریایی است که برای اولین بار توسط جانسون و لیور و در سال ۱۹۸۷ در باکتری اشریشیاکولی و یک سال بعد در کمپیلوباکتر ژوژنی شناسایی شد [۱]. این هولوتوکسین با اندازه ۶۸ کیلودالتون متعلق به خانواده AB2 توکسین‌ها است و معمولاً از سه ژن مجاور هم به نام‌های *cdtA*، *cdtB* و*cdtC* تشکیل شده است. دو زیرواحد *cdtA* و*cdtC* در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

اتصال به سلول میزبان نقش دارند [۲-۴]، در حالی‌که *cdtB* بخش کاتالیک توکسین بوده و قادر است با اتصال به DNA میزبان موجب تخریب DNA شود [۶،۵]. CDT بر روی رده‌های مختلف سلولی پستانداران مانند ورو (vero) و هلا (Hella) تاثیر گذاشته و موجب متوقف شدن گذر سیکل سلولی از مرحله G2 به M و یا G1 به S می‌شود (بسته به لاین سلولی) که اثر آن به صورت طویل شدن (Elongation)، تورم (Swelling) و در نهایت مرگ سلولی (Cell Death) قابل مشاهده است [۵-۹].

تا کنون ژن*cdt* در دو کلاس گاما و اپسیلون باکتری‌ها از رده پروتئوباکترها شناسایی شده است. در کلاس گاما پروتئوباکترها فامیل پاستورلاسه (شامل هموفیلوس دو کره‌ای، هموفیلوس پاراسوئیس، و اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتانس) و فامیل انتروباکتریاسه دارای این سیتوتوکسین می‌باشند. در کلاس اپسیلون باکتری‌ها، کمپیلوباکتریال‌ها (شامل کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر) کدکننده ژن*cdt* می‌باشند [۱۰،۱۱]. این توکسین در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه در جنس‌هایی مانند اشریشیاکولی، سالمونلا، شیگلا،یرسینیا و پرووایدنسیا شناسایی شده است [۱۰].

سندرم التهابی روده ناراحتی گوارشی است که با درد مزمن شکمی و تغییر در اجابت مزاج (اسهال و یاییوست مکرر) مشخص می‌شود. هرچند پاتولوژی دقیق بیماری به خوبی مشخص نشده است، اما عوامل متعددی همچون زمینه ژنتیکی، عوامل محیطی (روحی- روانی) و عفونت‌های باکتریایی به عنوان مهم‌ترین ریسک فاکتورهای ابتلا به سندرم التهابی روده معرفی شده‌اند [۱۲]. پیش‌رفت سندرم روده تحریک‌پذیر به دنبال عفونت‌های روده‌ای مبنای بروز اسهال‌ها و یبوست‌های مزمن در برخی از بیماران است [۱۳]. نتایج مطالعات حاکی از آن است که در۴-۳۱ درصد افراد مبتلا به گاستروآنتریت حاد عفونی باکتریایی (Acute Infectious Gastroenteritis) سندرم روده تحریک‌پذیر ایجاد خواهد شد که آن‌را post-infectiousirritable Bowel Syndrome (PI-IBS) می‌نامند. عوامل باکتریال ایجادکننده گاستروانتریت به عنوان فاکتورهای خطر در ابتلا و یا تشدید بیماری‌های التهابی رود (Inflammatory Bowel Disease IBD) معرفی شده‌اند. در حالی که نقش باکتری‌های اشرشیاکولی، کمپیلوباکتر ژوژنی، سالمونلا و شیگلا در ایجاد PI-IBS در برخی از کشورها اثبات شده است، چگونگی این رخداد و عوامل بیماری‌زایی دخیل در آن مشخص نشده است [۱۴،۱۵]. از سویی شناخت پیچیدگی اکولوژی میکروفلور روده‌ای در سال‌های اخیر موجب طرح این فرضیه شده است که تغییرات کمّی و کیفی این میکروفلور با برخی بیماری‌ها از جمله بیماری‌های مزمن دستگاه گوارش، از جمله سندرم التهابی روده، مرتبط است. پراکندگی CDT در میان طیف مختلفی از باکتری‌ها که بسیاری از آن‌ها به عنوان فلور روده (میکروبیوتای روده) مطرح هستند، سبب شده است که استقرار آن‌ها به‌عنوان مظنونین ایجادکننده گاستروانتریت مزمن و سندرم روده تحریک‌پذیر مفروض باشد. در ایران شیوع گاستروانتریت بین ۵/۴ تا ۱۰/۸ و سندرم روده تحریک‌پذیربین ۱/۱ تا ۲۵ بازای هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد [۱۶-۱۸]. در حالی‌که مطالعات به نسبت جامعی در خصوص نقش اغلب پاتوژن‌های روده‌ای بیماری‌زا در بروز گاستروانتریت در کشور انجام گرفته است [۱۹]، ولی این اطلاعات در مبتلایان به سندرم روده تحریک‌پذیر چندان موجود نمی‌باشد. هم‌چنین در خصوص Cytholethal Distinding Toxins در بروز علائم گوارشی نیز اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. بوذری و همکاران این نقش را در ۳۷/۵ درصد از سویه‌های اشرشیاکولی بررسی کرده‌اند، ولی این ارتباط در مورد سایر پاتوژن‌های روده‌ای مشخص نشده است [۲۰]. به تازگی بخشی و همکاران فراوانی CDT را در جدایه‌های کمپیلوباکتر در مبتلایان به گاستروانتریت سنجیدند (۵۸/۳ درصد)، ولی این مطالعه بر روی کودکان انجام شده بود [۲۱]. جهت روشن شدن این ارتباط به‌طور هم‌زمان در چندین جنس باکتریایی، در این تحقیق تلاش شده است تا در یک مطالعه مقطعی به بررسی میزان فراوانی انواع مختلف واریانت‌های ژنی *cdtB* در جنس‌های باکتریایی مختلف در بیماران دچار گاستروانتریت و سندرم روده تحریک‌پذیر، در مقایسه با افراد سالم پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی تعداد ۲۳۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به گاستروانتریت و IBS مراجعه کننده به بیمارستان‌های میلاد و طالقانی و همین‌طور ۵۰ نمونه مدفوع افراد سالم (به عنوان گروه کنترل) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های مدفوع با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNAبه منظور استخراج DNA از نمونه مدفوع با استفاده از کیت Bioneer (Korea) و مطابق پروتوکل ذکر شده در کیت انجام شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمایش در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هم‌چنین به منظور ارزیابی کمیت DNA استخراج شده، میزان جذب نوری(Optical density) آن‌ها توسط دستگاه NanoDrop در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیریشد. میزان جذب نوری نزدیک به ۱/۸ نمایانگر غلظت مناسب DNA است.

طراحی پرایمرها (سکانس نوکلئوتیدی پرایمرها). برای شناسایی ژن*cdtB* باکتری‌های یرسینیا انترکولیتیکا، سالمونلا انتریکا، اشریشیاکولی، پرووِیدنسیا آلکالیفاسینز و اگریگاتی باکتر اکتینوکومیتانس با استفاده از نرم‌افزارهای CLC sequence viewer 5، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). در میان پنج جنس باکتریایی مختلف، بررسی‌های ژنی موید وجود ناحیه‌ای محافظت شده (Conserved) در توالی ژن *cdtB* بود. هم‌چنین ژن *cdtB* درهر جنس باکتریایی دارای توالی منحصر به خود است که امکان طراحی پرایمر اختصاصی برای هر جنس باکتریایی را فراهم می‌سازد. جهت شناسایی ژن *cdtB* کمپیلوباکتر از پرایمر طراحی شده توسط Bang و همکاران استفاده شد [۲۲]. با BLAST کردن توالی پرایمرهای طراحی شده در پایگاه ژنی NCBI، میزان هومولوژی ناحیه‌ی انتخاب شده با ژنوم سایر میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید.

شرایط PCR . ترکیبات لازم جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب از مواد آب مقطر، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار (ژن فن آوران)، بافر PCR (X 1) (ژن فن‌آوران)، مخلوط dNTP (۰/۲میلی‌مولار) (ژن فن‌آوران)، پرایمر Forward ۰/۳میلی‌مولار، پرایمر Reverse ۰/۳ میلی‌مولار، آنزیم Taq پلی‌مراز (Fermentas) و ۵ نانوگرم DNA انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده و اپتیمایز شده برای هر واکنش در جدول ۲ ذکر شده است. پس از اتمام واکنش تکثیر، محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد تهیه شده با محلول TBE 1X با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از پایان کار ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۱۰µg/ml رنگ‌آمیزی گردید و با دستگاه Gel documentation در زیرنور فرابنفش رویت و عکس آن تهیه شد. از نمونه DNA استاندارد متعلق به اشرشیاکولی حاوی ژن کدکننده *cdt* (اهدایی از آزمایشگاه مرجع اشرشیاکولی، انستیتوپاستور ایران) به عنوان نمونه کنترل خارجی در آزمون PCR استفاده گردید. همچنین از توالی‌های ژنی جدایه‌های بالینیرسینیا انترکولیتیکا، کمپیلوباکتر ژوژنی و سالمونلا انتریکا به عنوان کنترل مثبت واکنش PCR استفاده گردید.

تایید محصول PCR:

به منظور تایید باندهای مشکوک، تعیین توالی محصول PCR (سکانسینگ) انجام شد. ردیف‌های دریافتی شامل سکانس حاصل از پرایمرهایF و R از نظر دقت و هم‌پوشانی با هم بررسی گردید. خوانش توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas (version2.4.1) انجام شد. Alignment اولیه به منظور حصول اطمینان از صحت خوانش با Blast متعلق به سایت NCBI صورت پذیرفت. هم‌چنین با وارد کردن توالی‌های مورد نظر در نرم‌افزار BioEdit و تبدیل توالی‌ها به Complement Reverse در صورت ضرورت آنالیز تمامی سکانس‌ها انجام گردید.

آنالیز آماری: در این مطالعه، پس از ورود داده‌ها، فراوانی مطلق و نسبی با آزمون Two-way ANOVA و با استفاده از نرم افزار GraphPad, Prism (v.3) محاسبه شد. میزانp کم‌تر و یا مساوی (p=≤۰/۰۵) معنادار در نظرگرفته شد.

جدول ۱. پرایمر های استفاده شده در این مطالعه

Genus/spacious	Sequence (5´-3´)	PCR product (bp)	Reference
Y. entercolitica	TAGCAATAGCAAATGGATAG ATCTGCTCTAATTCTTGA	376	This study
S. enterica	TTCTGACCATGATCATCTG AGATTCCAGGTGTATTCATC	283	This study
E. coli	AGGCCATTAACTGGATGATT TTTCCWRCTACHGCATAATC	178	This study
C. jejuni	GTTGGCACTTGGAATTTGCAAGGC RTTRAARTCNCCYAADATCATCC	470	Bang 2003
P. alkalifacience	GTAGCGAGCTTGGAATTTGCAAGGC TTTRAATTTCAGAAAGATCATCC	680	This study

نتایج

در این مطالعه نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر، بیماران مبتلا به گاستروانتریت و افراد فاقد علائم گوارشی (کنترل، ۵۰ فرد) مورد بررسی قرار داده شد. هویت گونه‌های کمپیلوباکتر، یرسینیا انترکولیتیکا، سالمونلا انتریکا، اشریشیاکولی و پرووِیدنسیا آلکالیفاسینز کد کننده توکسین *cdtB* به روش مولکولی PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *cdtB* تایید شد. وجود باند ۴۸۰، ۳۷۰، ۲۸۰ و ۱۷۸جفت بازی ژن *cdtB* به ترتیب تاییدکننده هویت کمپیلوباکترها، یرسینیا انترکولیتیکا، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکولی کد کننده توکسین *cdtB* بود. از میان ۲۳۰ نمونه مدفوع افراد مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر، تعداد ۵ نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

باند ۴۸۰ جفت بازی مربوط به ژن *cdtB* کمپیلوباکتر، و ۱۴ نمونه باند ۲۸۰ جفت بازی مربوط به سالمونلا انتریکا مشاهده شد. در افراد مبتلا به گاستروانتریت، تعداد ۵۲ نمونه باند ۴۸۰ جفت بازی مربوط به ژن *cdtB* کمپیلوباکتر و ۸ نمونه باند ۲۸۰ جفت بازی مربوط به سالمونلا انتریکا شناسایی گردید. از افراد مبتلا به گاستروانتریت تنها یک درصد از نظر *cdtB* یرسینیا انترکولیتیا مثبت بودند (جدول ۲). غربالگری ژن وجود *cdtB* کمپیلوباکتررا در دو نمونه از گروه کنترل نشان داد. هیچیک از نمونه‌های هر سه گروه مورد مطالعه باند ۱۷۸ جفت بازی مربوط به ژن *cdtB* اشریشیاکولی و باند جفت‌بازی مربوط به پرووایدنسیا آلکالیفاسینز را نداشتند (شکل ۱).

هویت گونه‌های کمپیلوباکتر نتایج ترادف‌یابی بر روی نمونه‌های استخراج شده از محصولات PCR حضور پاتوژن‌های مذکور را در نمونه‌های مدفوع بیماران تایید نمود. این ترادف‌ها با شماره‌ی دسترسی KT008107.1، KR778819.1 و KT008106.1 در پایگاه اطلاعات ژنی NCBI به ثبت رسیده‌اند.

بررسی آماری نتایج، اختلاف معناداری را بین حضور کمپیلوباکترهای کد کننده *cdtB* در مبتلایان به گاستروانتریت در مقایسه با افراد سالم و مبتلایان به سندرم روده تحریک‌پذیر نشان داد (*p* value 0.02). چنین وضعیتی در رابطه با سالمونلا نیز صادق بود؛ به گونه‌ای که میزان آلودگی به آن در گروه‌های بیماران گاستروانتریت و IBS به‌طور معنادار بالاتر از افراد سالم بود (*p* value 0.01). این ارتباط در مورد سایر باکتری‌های هدف مشاهده نگردید (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی ژن *cdtB* در باکتری های روده ای در بیماران مبتلا به سندروم روده تحریک پذیر، گاستروانتریت و افراد سالم

جمعیت مورد مطالعه	*Campylobacterspp.* تعداد (%)	*Salmonella enterica* تعداد (%)	*E.coli* تعداد (%)	*Y. entercolitica* تعداد (%)	*P. alkalifaciance* تعداد (%)
سندرم روده تحریک پذیر(تعداد=۸۰)	۵(۷/۵)	۱۴ (۱۴)	۰	۰	۰
گاستروانتریت (تعداد=۱۵۰)	(۳۴/۵۲۶)	۸ (۵)	۰	۱(۰/۶)	۰
گروه کنترل(تعداد=۵۰)	۲(۴)	۰	۰	۰	۰
p value	۰/۰۲	۰/۰۱			

بحث و نتیجه‌گیری

جایگاه طبیعی باکتری‌های انتروپاتوژن کد کننده سیتوتوکسین CDT غشاء مخاطی(Mucucotaneuse) میزبان می‌باشد، جائی که آن‌ها را قادر به کلنیزاسیون نموده تا بتوانند در نقش فلور نرمال و یا پاتوژن موجب ایجاد بیماری شوند [۲۳]. نقش سیتوتوکسین به عنوان یکی از فاکتورهای بیماری‌زایی در تعدادی از باکتری‌ها همچون کمپیلوباکتر ژوژنی به اثبات رسیده است. به تازگی این توکسین به عنوان یکی از بیومارکرها در تشخیص و درمان IBS مطرح شده است [۲۵،۲۴]. با توجه به اهمیت این ژنوتوکسین، حضور ژن *cdtB* باکتری‌های کمپیلوباکتر، سالمونلا انتریکا، اشریشیاکولی، یرسینیا انترکولیتیکا، و پرووایدنسیا در نمونه مدفوع بیماران مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر و افراد مبتلا به گاستروانتریت در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جا که آلودگی به این باکتری‌های هدف در تعداد کم قابل پیش‌بینی بود، از روش PCR بر رویDNA استخراج شده مدفوع بیماران استفاده گردید[۲۶]. لازم به ذکر است که تعیین فراوانی این توکسین به‌طور مستقیم در نمونه بیماران انتخاب شده برای باکتری‌های ذکر شده برای اولین بار صورت پذیرفته است.

این نتایج میزان فراوانی کمپیلوباکترهای کدکننده ژن توکسین *cdtB* در نمونه بالینی افراد مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر را ۷/۵ درصد و در بیماران مبتلا به گاستروانتریت ۳۴/۶ درصد تعیین نمود؛ در حالی‌که این میزان در افراد سالم ۲ درصد تعیین شد. بر اساس اطلاعات موجود، تاکنون مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های بیماران مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر از نظر کمپیلوباکترهای کد کننده‌ی *cdtB* گزارش نشده است، ولی مطالعات متعددی نقش این باکتری‌ها را در گاستروانتریت مورد بررسی قرار داده‌اند. در اغلب این مطالعات جدایه‌های باکتریایی کمپیلوباکتر از نظر وجود ژن *cdtB* بررسی گشته‌اند. Kabir و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه خود، ردیابی ژن *cdtB* در نمونه مدفوع بیماران مبتلا به گاستروانتریت را روشی مناسب جهت تعیین فراوانی کمپیلوباکتر معرفی نمودند [۲۷]. گونه‌های کمپیلوباکتر مسئول ایجاد گاستروانتریت در ۹/۳ نفر در هر ۱۰۰۰ نفر در سال در انگلیس و ۵/۸ نفر در هر ۱۰۰۰ نفر در سال در هلند و همچنین ۱/۳ میلیون نفر در سال در آمریکا تعیین شده‌اند [۲۸]. در ایران مطالعات محدودی بر روی بالغین انجام پذیرفته است، ولی مطالعات مختلف این فراوانی را در حدود ۱ تا ۱۲درصد تعیین نموده‌اند [۳۰،۲۹،۱۷،۱۶]. تاکنون مطالعه‌ای در کشور بر روی نقش کمپیلوباکترهای کد کننده *cdtB* در بروز گاستروانتریت و IBS صورت نگرفته است. مطالعات در سایر کشورها نشان داده‌اند که ۳۶درصد مبتلایان به عفونت کمپیلوباکتر می‌توانند طی ۱-۲ سال بعد از ابتلا

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

دچارIBS شوند [۳۱]. به نظر می‌رسد که پس از عفونت با این باکتری علائم بیماری روده تحریک‌پذیر (IBS) بیش‌تر از نوع اسهالی-غالب باشد. به‌طور مشابهی در مطالعه حاضر دو بیمار مبتلا به IBS که حضور فراوان کمپیلوباکتر را در مدفوع خود نشان می‌دادند، نیز این الگوی اسهالی-غالب از بیماری را نشان می‌دادند. به‌نظر می‌رسد القای پایدار پاسخ ایمنی طی کلنیزاسیون سویه‌های مخفی شده در زیر اپیتلیوم مسئول بروز IBS در این بیماران باشند [۳۲]. بالا بودن میزان فراوانی کمپیلوباکترهای کدکننده توکسین CDT در بالغین مبتلا به گاستروانتریت، نشان‌دهنده اهمیت و نقش این باکتری در ایجاد اسهال‌های مزمن در بالغین است. در مطالعه‌ای که بر روی مدل رت به عنوان مدل Post-infectious IBS در آمریکا انجام شده بود، نقش کمپیلوباکتر کدکننده *cdtB* در تغییر شکل مدفوع، تغییر حرکات روده، ارتشاح سلول‌های اینترا-اپی‌تلیال التهابی و التهاب رکتوم به تایید رسید [۳۳]. این محققین از سویه موتانت CDT همسان به‌عنوان کنترل استفاده نموده بودند و بر این مبنا این توکسین را مسئول تغییرات پاتوفیزیولوژیک IBS معرفی نمودند. در حال حاضر در اروپا، کمپیلوباکتر مسئول موارد بیش‌تری در مقایسه با سالمونلا در بروز سندرم روده تحریک‌پذیر پس از عفونت محسوب می‌شود.

در مطالعه حاضر شناسایی حضور سالمونلاهای کدکننده CDT در نمونه مدفوع بیماران مبتلا به IBS، گاستروانتریت و افراد سالم جامعه برای اولین بار انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ۱۴ درصد از بیماران مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر و ۵ درصد از بیماران مبتلا به گاستروانتریت دارای ژن مذکور بودند. ژن توکسین باکتری سالمونلا در هیچیک از افراد سالم شناسایی نشد. میزان بالای این ژنوتوکسین در افراد مبتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر دور از انتظار بود. هرچند مطالعه‌ای که فراوانی توکسین سالمونلا را در بیماران ردیابی کرده باشد در منابع اطلاعاتی یافت نشد، اما Mezal و همکاران (۲۰۱۴) برای اولین بار ژن *cdtB* در گونه‌های سالمونلا انتریکا سروار جاویانا (جدا شده از غذا و محیط پیرامون) را شناسایی کردند. براساس نتایج آن‌ها همه ۵۰ سروار حاوی توکسین CDT بودند [۳۴]. در مطالعه‌ای که توسط Schwille-kiuntke و همکاران انجام شد، عفونت به سالمونلا به عنوان عامل بروز علائم حاد post-infectious IBS در بیماران معرفی گردید [۳۵].

از نظر حضور اشریشیاکولی کد کننده توکسین CDT در این مطالعه هیچیک از بیماران (سندرم التهابی روده، گاستروانتریت) و نیز افراد سالم مثبت نشدند. جهت اطمینان از این یافته، تمامی اشریشیاکولی‌های جدا شده از دو گروه بیمار و گروه کنترل نیز توسط PCR بر روی DNA کشت تازه از نظر حضور ژن *cdt* بررسی شدند که نتایج آن‌ها نیز از نظر حضور توکسین منفی بود. هرچند مطالعه‌ای که توکسین CDT باکتری اشریشیاکولی را به طور مستقیم در بیماران شناسایی کرده باشد در منابع علمی یافت نشد، با این حال تعدادی از محققان حضور این توکسین را در بین اشریشیاکولی‌های کدکننده شیگا توکسین Shiga toxin –producing E.coli(STEC) جدا شده از منابع مختلف بررسی کرده اند. Osekو همکاران (۲۰۰۵) اشریشیاکولی‌های کدکننده شیگا توکسین جدا شده از انسان و حیوانات را از نظر حضور CDT بررسی کردند. آن‌ها توکسین CDT را در ۲۴/۶ درصد از اشریشیاکولی‌های کد کننده شیگا توکسین با سروتایپ‌های O157:H7 و سروتایپ‌های عامل سندرم اورمیک همولیتیک (Heamolytic uraemic syndrome)و سندرم اورمیک همولیتیک (Haemorragic colitis) شناسایی کردند [۳۶]. در مطالعه Bielaszewska و همکاران (۲۰۰۵) تنها ۵ درصد از سروارهای non-O157 STEC جدا شده از افراد مبتلا به سندرم اورمیک همولیتیک و کولیت هموراژیک، کد کننده توکسین CDT بودند. هم‌چنین تنها ۱ درصد از اشریشیاکولی‌های ایزوله شده از افراد سالم دارای توکسین CDT بودند [۳۷]. در مطالعه Kim و همکاران از میان ۳۶۶ اشریشیاکولی جدا شده تنها ۲/۷ درصد حاوی توکسین CDT بودند [۳۸]. هرچند وظیفه این توکسین در پاتوژنز باکتری هنوز نامعلوم است، اما اثرات کشندگی این توکسین بر روی سلول‌ها و همراهی با دیگر ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی (مانند اینتمین)، مؤید نقش توکسین در پاتوژنز بیماری‌های ایجاد شده توسط اشریشیاکولی‌های پاتوژن تولیدکننده شیگا توکسین است. همان‌طور که از بررسی متون و مطالعات پیداست، به نظر می‌رسد که اشریشیاکولی‌های انتروپاتوژنیک (Enteropathogenic E.coli) بیش‌ترین گروه کدکننده توکسین CDT باشند. در حالی‌که تنها ۱-۵ درصد از سایر سویه‌های اشریشیاکولی کد کننده توکسین CDT ذکر شده هستند. با استناد به اینیافته، به نظر می‌رسد که اشریشیاکولی‌های جدا شده از بیماران بررسی شده در این مطالعه جزیی از فلور نرمال بوده و عدم حضور توکسین CDT در آن‌ها منطقی باشد. این نتایج نقش اشریشیاکولی کدکننده CDT را در بروز IBS رد می‌نماید.

در این مطالعه، درحالی‌که ژن توکسین CDT یرسینیا انترکولیتیکا در مدفوع هیچ‌یک از بیماران مبتلا به IBS و افراد کنترل شناسایی نگردید، حضور آن در ۱ درصد از بیماران مبتلا به گاستروانتریت گزارش شد. بر خلاف این یافته در یک مطالعه که توسط Chad K Porter و همکاران انجام شده بود،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

یرسینیا انتروکولتیکا به‌عنوان شایع‌ترین عامل عفونی باکتریایی مسئول IBS تعیین گردید[۳۹]. با توجه به آن‌که در مطالعه حاضر حضور ژن *cdt* به‌عنوان شاخص برای ارزیابی نقش یرسینیاهای توکسیژنیک در IBS درنظر گرفته شده بود، فراوانی مذکور نمی‌تواند نقش یرسینیا را در بروز این بیماری رد نماید. اطلاعاتی در رابطه با فراوانی این ژن در سویه‌هاییرسینیا انتروکولتیکا وجود ندارد. نقش یرسینیا در بروز گاستروانتریت در ایران پیش از این توسط ۰/۶ درصد گزارش شده بود [۴۰].

محدویت‌های مطالعه:

- محدود بودن زمان مطالعه جهت بررسی و پیگیری وضعیت بیماران در مدت طولانی‌تر
- محدود بودن مطالعات انجام شده جهت مقایسه‌ی نتایج

نتایج این مطالعه پیشنهادگر نقش‌پذیری احتمالی باکتری‌های پاتوژن در ایجادیا بروز علائم مرتبط با بیماری‌هایIBS و گاستروانتریت در کشور است. این نتایج پراکندگی حضور این توکسین را در میان گونه‌های متفاوت باکتری‌ها در میان اعضای میکروبیوتای روده‌ی بیماران و افراد سالم مشاهده شد. به نظر می‌رسد که استقرار باکتری‌های کدکننده توکسین*CdtB* فاکتور خطری برای ابتلا به سندرم روده تحریک‌پذیر در در این بیماران باشد، که اثبات آن موید مطالعات جامع‌تر است. کشت و جداسازی این باکتری‌ها و سنجش نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های مذکور می‌تواند به روشن شدن این ارتباط کمک نماید.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل قسمتی از پایان‌نامه دکترای تخصصی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت (کد طرح۲۲۷۲۶-۲۷-۰۲-۹۲) می‌باشد که با همکاری مرکز بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است. نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از ریاست آزمایشگاه مرجع اشریشیاکولی انستیتوپاستور ایران، جناب آقای دکتر سعید بوذری که با اهدای نمونه DNA کد کننده ژن هدف ما را در انجام این پروژه یاری کردند، قدردانی نمایند.

منابع

[1] Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Campylobacter spp. Microb Pathog 1988; 4:115-126.

[2] Lara-Tejero M, Galan JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. Infect Immun 2001; 69:4358-4365.

[3] Lee RB, Hassane DC, Cottle DL, Pickett CL. Interactions of campylobacter jejuni cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. Infect Immun 2003; 71:4883-4890.

[4] Pickett CL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family.Trends Microbiol 1999; 7:292-297.

[5] Elwell CA, Dreyfus LA. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. Mol Microbiol 2000; 37:952-963.

[6] Lara-Tejero M. A bacterial toxin that causes DNA damage to modulate cellular responses. Sci Word J 2001;1:190-191.

[7] Hassane DC, Lee RB, Mendenhall MD, Pickett CL. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. Infect Immun 2001; 69:5752-5759.

[8] Hassane DC, Lee RB, Pickett CL. Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. Infect Immun 2003; 71:541-545.

[9] Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. Infect Immun 1998; 66:1934-1940.

[10] Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. Microbiology 2011; 157:1851-1875.

[11] Okuda J, Kurazono H, Takeda Y. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene among species of Shigella and Vibrio and cloning and sequencing of the cdt gene from Shigella dysenteriae. Microb Pathog 1995; 18:167-172.

[12] Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2006; 130:1588-1594.

[13] El-Salhy M. Irritable bowel syndrome: diagnosis and pathogenesis. World J Gastroenterol 2012; 18:5151-5163.

[14] Zanini B, Ricci C, Bandera F, Caselani F, Magni A, Laronga AM, et al. Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. Am J Gastroenterol 2012; 107:891-899.

[15] Morales W, Pimentel M, Hwang L, Kunkel D, Pokkunuri V, Basseri B, et al. Acute and chronic histological changes of the small bowel secondary to C. jejuni infection in a rat model for post-infectious IBS. Dig Dis Sci2011; 56:2575-2584.

[16] Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis 2008; 61:269-273.

[17] Jafari F, Garcia-Gil LJ, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani MM, Pourhoseingholi MA, 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; 58:21-27.

[18] Jahangiri P, Jazi MS, Keshteli AH, Sadeghpour S, Amini E, Adibi P. Irritable bowel syndrome in Iran: SEPAHAN systematic review No. 1. Int J Prev Med 2012; 3:S1-9.

[19] Staji H, Salimi Bejestani MR, Changizi E, Javaheri Vayeghan A. Distribution of escherichia coli Shiga toxin encoding genes (stx1, stx2) in Sangesari lambs suffering from diarrhea by Multiplex PCR technique. Koomesh 2015; 17:84-91. (Persian).

[20] Bouzari S, Oloomi M, Oswald E. Detection of the cytolethal distending toxin locus cdtB among diarrheagenic Escherichia coli isolates from humans in Iran. Res Microbiol 2005; 156:137-144.

[21] Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Lili AK, Najar-Peerayeh S, Nikmanesh B. A molecular survey of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli virulence and diversity. Iran Biomed J 2014; 18:158-164.

[22] Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J, Madsen M. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in Campylobacter spp. isolated from Danish broilers. J Med Microbiol 2001; 50:1087-1094.

[23] Ganji L, Alebouyeh M, Shirazi MH, Eshraghi SS, Mirshafiey A, Daryani NE, et al. Dysbiosis of fecal microbiota and high frequency of Citrobacter, Klebsiella spp., and Actinomycetes in patients with irritable bowel syndrome and gastroenteritis. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2016; 9:325-330.

[24] Kim JH, Lin E, Pimentel M. Biomarkers of irritable bowel syndrome. J Neurogastroenterol Motil 2017; 23:20.

[25] Schmulson M, Balbuena R, de Law CC. Clinical experience with the use of anti-CdtB and anti-vinculin antibodies in

www.SID.ir

Archive of SID

irritable bowel syndrome. J Neurogastroenterol Motil 2012; 18:434-442.

[34] Mezal EH, Bae D, Khan AA. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB fromSalmonella enterica serovar Javiana.Pathog Dis 2014; 72:95-103.

[35] Schwille-Kiuntke J, Enck P, Zendler C, Krieg M, Polster AV, Klosterhalfen S, et al. Postinfectious irritable bowel syndrome: follow-up of a patient cohort of confirmed cases of bacterial infection with Salmonella or Campylobacter. Neurogastroenterol Motil 2011; 23:e479-e488.

[36] Osek JA. Detection of cytolethal distending toxin genes in shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from different sources. Bull Vet Inst Pulawy 2005; 49: 153-156.

[37] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis 2011; 11:671-676.

[38] Kim JH, Kim JC, Choo YA, Jang HC, Choi YH, Chung JK, et al. Detection of cytolethaldistending toxin and other virulence characteristics of enteropathogenic Escherichia coli isolates from diarrheal patients in Republic of Korea. J Microbiol Biotechnol 2009; 19:525-529.

[39] Porter CK, Choi D, Cash B, Pimentel M, Murray J, May L, et al. Pathogen-specific risk of chronic gastrointestinal disorders following bacterial causes of foodborne illness. BMC Gastroenterol 2013; 13: 46.

[40] Dallal MS, Khorramizadeh MR, MoezArdalan K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran. East Mediterr Health J2006; 12: 792-797.

patients with diarrhea in Mexico. Rev Gastroenterol Mex 2016; 81:236-239.

[26] Ganji L, Azimirad M, Farzi N, Alebouyeh M, Shirazi MH, Eshraghi SS, et al. Comparison of the detection limits of the culture and PCR methods for the detection of clostridium difficile, clostridium perfringens, campylobacter jejuni, and yersinia enterocolitica in human stool. Arch Pedia Infect Dis 2016; 5.

[27] Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of Campylobacter strains isolated from diarrheal patients in Japan. Jpn J Infect Dis 2011; 64:19-27.

[28] World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.

[29] Hassanzadeh P, Motamedifar M. Occurrence of campylobacter jejuni in Shiraz, southwest Iran. Med Princ Pract 2007; 16:59-62. (Persian).

[30] Irajian G, Jazayeri Moghadas A, Beheshti A, Salehian A, Monem M, Moghaddas F. Prevalence of campylobacter jejuni samples from patients referred to semnan public health centers in 2007. Iran J Med Microbil 2008; 1:35-39. (Persian).

[31] Thornley JP, Jenkins D, Neal K, Wright T, Brough J, Spiller RC. Relationship of campylobacter toxigenicity in vitro to the development of postinfectious irritable bowel syndrome. J Infect Dis 2001; 184:606-609.

[32] Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. Vet Immunol Immun 2003; 91:1-12.

[33] Pokkunuri V, Pimentel M, Morales W, Jee SR, Alpern J, Weitsman S, et al. Role of cytolethal distending toxin in altered stool form and bowel phenotypes in a rat model of post-infectious

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of *cdtB* gene among enteric bacteria in patients with gastroenteritis and irritable bowel syndrome

Leila Ganji (Ph.D)[1], Masoud Alebouyeh (Ph.D)[2], Mohammad Hassan Shirazi (Ph.D)[*1], Naser Ebrahimi Daryani (M.D)[3], Abbas Mirshafiey (Ph.D)[4], Seyed Saeed Eshraghi (Ph.D)[1], Parisa Eslami (M.Sc)[5], Mohammad Reza Zali(M.D) [2]

1- Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Dept. of Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Dept. of immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Dept. of Microbiology, Central Laboratory, Milad Hospital, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 *9123138629* drshirazi1952@gmail.com

Received: 13 Sep 2017; Accepted: 1 Oct 2018

Introduction*:* Cytolethal distending toxin (CDT) is one of the bacterial toxins that present in a variety of Gram-negative human pathogens, such as *E. coli*, Salmonella spp. and Campylobacter spp. CDT consist of three subunits encoded by three adjacent genes, including *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*. It is approved thet *cdtB* had toxic activity and caused DNA damage of the host cell. Despite its presence in different bacterial species, role of CDT in acute and chronic infections, such as gastroenteritis and irritable bowel syndrome (IBS) is unclear. To clear this correlation, we studied the prevalence of *cdtB* gene among different enteropathogenic bacteria in patients with gastroenteritis and IBS compared with healthy people.

Materials and Methods*:* This study was conducted on stool samples that obtained from patients with gastroenteritis, IBS and healthy people (as control). All the samples were subjected to DNA extraction. *cdtB* of *Campylobacter* spp., *Yersinia entercolitica*, Providencia alkalifacience, *Salmonella enterica* and *E. coli* was analyzed by PCR using specific primers.

Results: *CdtB* encoding *Campylobacter* spp. was found in 7.5% (5/80) and 34.6% (52/150) of patients with IBS and gastroenteritis, respectively. Also, the PCR results showed that 14% (14/150) of the patients with gastroenteritis and 5% (8/80) of IBS patients carried CdtB encoding *Salmonellaenterica*. None of the samples were infected with CdtB -encoding *E. coli* and *Providensia* spp. Finally, all results were confirmed by sequencing.

Conclusion: Our results showed the presence of CdtB encoding pathogenic bacteria in IBS patients and those with gastroenteritis. Regarding the high frequency of CdtB encoding *Salmonella* and *Campylobacter*spp., it was proposed that infection to these bacterias could be considered as a risk factor for the development of post-infectious IBS in Iranian patients. Further studies are needed to establish this relationship.

Keywords*:* Enteric pathogens, Irritable Bowel Syndrome, Gastroenteritis, Cytholethal distending toxin.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Tuesday May 14th 2019

www.SID.ir