

تشخیص مولکولی اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک در نمونه های اسهال کودکان زیر ۵ سال استان اردبیل

زکيه بذار^۱، سعيد بوذری^۲، محمد مهدي اصلانی^{۳*}، مهدي آسمار^۴، مانا علمي^۵، انيس جعفري^۲، پروين اکبري^۱

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

۲. PhD میکروبی شناسی بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران

۳. PhD میکروبی شناسی بخش باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران

۴. PhD انگل شناسی بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران

۵. PhD فراورده بیولوژیک بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: بخش میکروبی شناسی انستیتو پاستور ایران، تلفن و نمابر ۰۶۶۴۰۵۵۳۵، mmaslani@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: شهرپور نود پذیرش برای چاپ: آبان نود

چکیده

سابقه و هدف: اسهال حاد دومین عامل مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال محسوب می شود. شناخت عامل اسهال برای نظارت اپیدمیولوژیک، با توجه به این که شیوع بیماری از نقطه ای به نقطه دیگر بسته به شرایط جوی، جغرافیایی و وضعیت اقتصادی اجتماعی منطقه متفاوت است ضروری به نظر می رسد. سویه های EPEC از عوامل اصلی اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه محسوب می شوند. که این مطالعه با هدف تعیین شیوع این پاتوتایپ اشریشیاکلی در استان اردبیل و ارزیابی علائم بالینی آن ها انجام گرفت.

روش کار: نمونه گیری از ۳۶۳ کودک زیر ۵ سال مبتلا به اسهال از بیمارستان ها و مراکز بهداشت چند شهرستان اطراف استان انجام گرفت. و تعداد ۳۱ نمونه به عنوان کنترل از افراد سالم بدون علامت مورد بررسی قرار گرفت. طی مراحل استاندارد کشت و تشخیص بیوشیمیایی نمونه های اشریشیاکلی ایزوله شدند و سپس با استفاده از روش PCR پاتوتایپ های اشریشیاکلی جداسازی شدند. یافته ها: از کل نمونه های بررسی شده، تعداد ۱۹۴ (۵۳٪) نمونه اشریشیاکلی از مرحله کشت جداسازی شد. تعداد ۲۸ (۱۴٪) نمونه EPEC غیرکلاسیک و ۲ (۱٪) نمونه EPEC کلاسیک، به دست آمد.

نتیجه گیری: در این مطالعه شیوع این پاتوتایپ را در این منطقه با توجه به یافته های به دست آمده می توان مشاهده کرد که البته به بررسی بیشتری نیاز است.

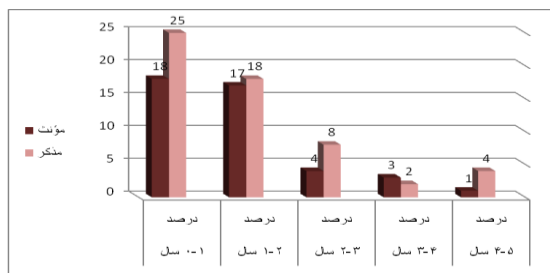
واژگان کلیدی: اسهال حاد، باکتری اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک، PCR، اردبیل

مقدمه

(EAEC)، انترواینوسیو (EIEC)، انتروهموراژیک (EHEC)، و وانترودیفیوزلی ادهیرنت (DAEC) تقسیم می شود (۲). EPEC آلوده کننده روده کوچک انسان است و یک مورد مهم در ایجاد اسهال در کودکان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. اطلاعات از چندین مطالعه نشان می دهد که atypical EPEC مسئول ۷۸٪ از همه موارد EPEC در بچه های زیر ۵ سال دارای اسهال می باشد (۳). در مطالعات انجام شده در تهران شیوع انتروپاتوژنیک تیپیکال (typical EPEC) در کودکان دارای اسهال ۱۱/۸٪ بوده و همچنین ۰/۴٪ از کودکان سالم جدا گردید. انتروپاتوژنیک آتیپیکال (atypical EPEC) در کودکان دارای اسهال با ۹/۳٪ ایزوله شده است (۴).

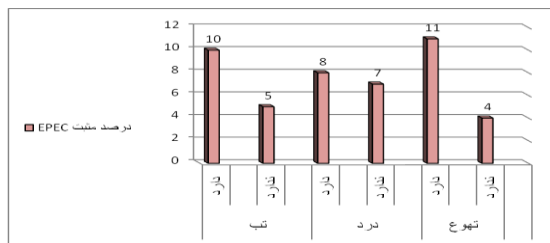
اگر چه در جهت شناسایی عوامل ایجاد کننده اسهال و کنترل و پیشگیری آن ها موفقیت هایی به دست آمده است ولی هنوز هم اسهال در ردیف عوامل اصلی توقف رشد و مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال و دومین علت مرگ و میر در کودکان این رده سنی می باشد. از مهمترین عوامل باکتریال ایجاد کننده اسهال می توان اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک، سالمونلا، شیگلا، و بیروکلا، یرسینیا انتروکولیتیکا و آئروموناس را نام برد. مطالعات انجام شده در کشور انگلیس نشان داده که ۲۰٪ اشخاص هر سال مبتلا به عفونت روده ای می شوند (۱). E.coli به وجود آورنده اسهال Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) به ۶ گروه انتروتوکسیژنیک (ETEC)، انتروپاتوژنیک (EPEC)، انتروآگریگتیو

(۴-۵) با ۱٪ کمترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند. بیشترین فراوانی اشریشیاکلی در رده سنی زیر یک سال مربوط به جنس مذکر با ۲۵٪ و در مورد جنس مونث نیز بیشترین فراوانی مربوط به افراد زیر یک سال با ۱۸٪ می باشد

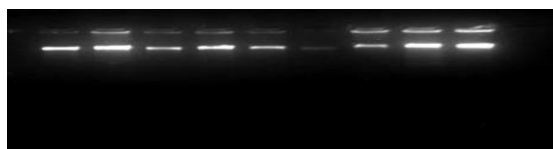


(نمودار ۱). اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک بیشتر از رده سنی زیر ۲ سال با فراوانی ۶٪ جدا شد. بیشترین میزان فراوانی در گونه باکتری ایزوله شده EPEC ، در رابطه با طول مدت اسهال ، در زمان ۱ تا ۵ روز با ۱۴٪ مشاهده شد . بیشترین نمونه های که از آن ها EPEC جداسازی شد با علامت کلینیکی تهوع با فراوانی ۱۱٪ مراجعه کرده بودند(نمودار ۲).

نمودار ۲. توزیع EPEC جدا شده بر حسب علائم بالینی



نمودار ۱: توزیع کودکان مبتلا به اسهال اشریشیا کلی بر اساس سن و جنس نمونه های ایزوله شده تخلیص پلاسمید شدند. 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). نمونه های *escv* مثبت، *bfpA* منفی به عنوان اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آنتیپیکال معین و گزارش شد. ۲۸ نمونه (۵/۱۴٪) اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آنتیپیکال ایزوله شد(شکل ۲). از ۲۳ نمونه کنترل جدا شده از کشت، ۲ نمونه اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آنتیپیکال جدا سازی شد. نمونه های *escv* مثبت و *bfpA* مثبت به عنوان اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آنتیپیکال معین و گزارش شد. ۲ نمونه (۱٪) اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آنتیپیکال به دست آمد(شکل ۳).



شکل ۱. نمونه پلاسمید



شکل ۲. محصول PCR ژن *escv*

ردیف ۱: کنترل منفی ، ردیف ۳ و ۵: نمونه های مثبت، ردیف ۶: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰۰bp ، ردیف ۱۱: کنترل مثبت

پیشرفت در تکنیک های مولکولی، توانایی ما را در شناسایی انتروپاتوژن ها در نمونه های مدفوع و شناسایی عوامل جدید در ارتباط با بیماری اسهال بالا برده است(۵). هدف از این مطالعه تعیین شیوع باکتری اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک در کودکان زیر ۵ سال استان اردبیل با کمک روش های تشخیصی میکروبیشناسی و آزمونهای بیوشیمیایی و مولکولی می باشد.

روش کار

در این مطالعه نمونه ها از بین کودکان زیر ۵ سالگی که دارای علائم بالینی گاستروانتریت بوده اند در طول مدت ۱ سال از مراکز درمانی اردبیل ، خلخال ، مشکین شهر ، پارس آباد و گرمی، انتخاب گردیدند، نمونه ها طبق روش استاندارد نمونه گیری شده و سپس به انستیتو پاستور ایران انتقال داده شدند. در مجموع ۳۶۳ نمونه جمع آوری گردید که پس از انجام مراحل میکروبی و استخراج DNA، جهت مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت نمونه ها به روش استاندارد در محیط های Selenit F ، (SF) محیط (SS) Salmonella and Shigella ، Mac conkey (Mac) Agar) و تشخیص به روش بیوشیمیایی استاندارد با استفاده از محیط های Triple Sugar Iron Agar (TSI) و IMVIC ، (VP)(MR) Methyl Red ، Indol Voges proskauer ، Simmons citrat Agar (cit) انجام شد.

بعد از جداسازی نمونه های اشریشیاکلی ، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی(دستی) صورت گرفت. سپس DNA استخراج شده به منظور بررسی کیفی بر روی ژل آگارز ۸٪ الکتروفورز شد. همچنین از نظر کمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه ها در دو مرحله مورد PCR قرار گرفتند: در مرحله اول نمونه ها با پرایمر *escv* ، PCR شدند و سپس تمامی نمونه های که در مرحله اول با پرایمر *escv* مثبت شدند در مرحله دوم با پرایمر *bfpA* برای جداسازی EPEC کلاسیک مورد PCR قرار گرفتند. PCR ، طی ۵ مرحله (۱) مرحله اول دمای دنایچه شدن اولیه می باشد - ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، (۲) مرحله دوم دمای دنایچه شدن می باشد - ۹۴ درجه

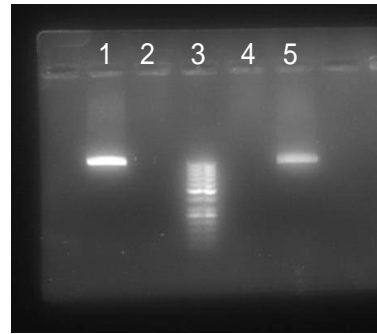
اندازه (bp)	توالی پرایمر	ژن
520	F GGCTCTCTTCTTTATGGCTG R CCTTTTACAACTTCATCGCC	<i>escv</i>
920	F GATAAACTGATACTGGGCAGC R AGTGACTGTTCCGGGAAGCAC	<i>bfpA</i>

سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، (۳) مرحله سوم دمای *annealing* است - ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، (۴) مرحله چهارم دمای *extension* است - ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، و (۵) مرحله پنجم دمای *final extension* است - ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

یافته ها

از ۳۶۳ نمونه مورد بررسی ۱۹۴ (۵۳/۵٪) سویه اشریشیاکلی از مرحله کشت جداسازی شد. و از ۳۱ سویه کنترل ۲۳ نمونه (۷۴/۵٪) از مرحله کشت جداسازی گردید. از کل اشریشیاکلی های ایزوله شده ، فراوانی جنس مذکر با ۵۸٪ و جنس مونث با ۴۲٪ بود. کودکان در رده سنی زیر یک سال با ۴۳٪ بیشترین میزان فراوانی و در رده سنی (۲-۱) سال با ۳۹٪ و با رده سنی (۳-۲) سال با ۱۰٪ و در رده سنی (۴-۳) با ۷٪ و در رده سنی

۱۷٪ از کودکان کمتر از ۲ سال سالم سروتاپ EPEC جدا شده است (۱۰). در نمونه های دارای علامت، می توان EPEC را حتی پس از گذشت ۲ هفته پس از پایان یافتن علائم از مدفوع جدا کرد (۱۰). در مقایسه با محدود شدن اهمیت EPEC در کشورهای توسعه یافته، EPEC یک عامل مهم در اسهال بچه ها در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود. اپیدمی های اسهال در اثر اشریشیاکلی های پاتوژن می توانند هزاران انسان را مبتلا کرده و صدمات زیادی به بهداشت عمومی و سلامت یک جامعه وارد کند چرا که این عوامل باکتریایی نقش مهمی در انتقال عامل بیماری به کودکان دارند. در این تحقیق شیوع atypical EPEC ۱۴/۵٪ و typical EPEC ۱٪ می باشد. بیشترین نمونه ای که EPEC از آن ها جدا شده با قوام مدفوع نوع شل با فراوانی ۸٪ بوده است که بیشتر از رده سنی زیر ۲ سال با فراوانی ۶٪ جدا شده است. بیشترین نمونه های که از آن ها EPEC جداسازی شد با علائم کلینیکی تهوع با فراوانی ۱۱٪/ مراجعه کرده بودند. یکی از دلایل متغییر بودن شیوع EPEC توزیع جغرافیایی محیط می باشد همانطور که اشاره شد شیوع این باکتری در مناطق گرمسیری بیشتر است در حالی که اردبیل یک منطقه سردسیر است پس می توان شیوع پایین تری را انتظار داشت. فراوانی بیشتر EPEC در رده سنی زیر ۲ سال می تواند به دلیل این باشد که ۸۲٪ از نمونه های ما از رده سنی زیر ۲ سال بوده، و اینکه ممکن است به دلیل استفاده از غذاهای کمکی در کودکان زیر ۲ سال باشد، کودکانی که تنها از شیر مادر استفاده می کنند ایمنی بدنشان بیشتر است ولی کودکانی که علاوه بر شیر مادر از غذای کمکی هم استفاده می کنند به دلیل آلودگی های بطری شیر، آب آلوده و سوء تغذیه و غیره، بیشتر در معرض بیماری قرار دارند. بر مبنای اطلاعات بدست آمده سن بیماران تعیین کننده است و با جنسیت ارتباط معناداری یافت نشد. به طور کلی مقایسه نتایج حاصله نشان می دهد که در حالی که اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک تیپیکال یکی از عوامل اسهال بچه ها در کشور های در حال توسعه است، اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک آتیپیکال یکی از عوامل مهم اسهال در کشورهای صنعتی می باشد. نظر به اینکه در این مطالعه سویه های انتروپاتوژنیک آتیپیکال با فراوانی ۱۴/۵٪ و سویه های انتروپاتوژنیک تیپیکال با فراوانی ۱٪ جداسازی شده است نشان دهنده این مطلب است که سویه های آتیپیکال در این تحقیق شیوع بیشتری داشتند که این نیز نیاز به تحقیق و مطالعه بیشتری دارد. البته این آمار مربوط به این مطالعه می باشد و بر اساس روش مولکولی PCR بوده است ممکن است در جوامع و استان های دیگر متفاوت باشد.



شکل ۳. محصول PCR ژن bfpA

ردیف ۵۱: نمونه های مثبت، ردیف ۳: مارکر وزن مولکولی ۵۰ bp

بحث

اسهال یکی از مشکلات اساسی کودکان در ایران و سایر کشورهای در حال توسعه است (۶). شناخت باکتری های انتروپاتوژنیک عامل بیماری اسهالی، برای کنترل بیماری ضروری می باشد. این مطالعه که طی ۱ سال در بیمارستان های اردبیل و شهرهای اطراف انجام شد، تعیین کننده میزان شیوع اسهال حاد ناشی از باکتری اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک در کودکان زیر ۵ سال می باشد. با استفاده از تکنیک های تشخیصی بیوشیمیایی و مولکولی ما باکتری اشریشیاکلی را با کمک کشت در ۱۹۴ نمونه (۵۳/۵٪) از بیماران اسهالی جداسازی سازی کردیم و پاتوتاپ اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک را به کمک تکنیک PCR در ۳۰ نمونه (۱۵٪) از ۱۹۴ نمونه جدا شده از کشت شناسایی کردیم. در مطالعه ای که در برزیل و مکزیک و آفریقای جنوبی انجام شد، سویه های EPEC عامل ۳۰ تا ۴۰ درصد اسهال کودکان آن منطقه محسوب می شود (۷). اغلب شیوع عفونت سویه های EPEC در نوزادان زیر شش ماه رخ می دهد و به میزان اندک در افراد بالای ۱ سال سبب بیماری می گردند (۸). در مطالعات انجام شده در انیستیتو پاستور تهران، ۱۲/۶٪ EPEC جداسازی شد که بیشترین فراوانی مربوط به فصل تابستان و بچه های زیر یک سال بوده است (۹). اطلاعات از چندین مطالعه نشان می دهد که atypical EPEC مسئول ۷۸٪ از همه موارد EPEC در بچه های زیر ۵ سال دارای اسهال می باشد (۳). در مطالعات انجام شده در تهران شیوع انتروپاتوژنیک تیپیکال (typical EPEC) در کودکان دارای اسهال ۱۱/۸٪ بوده و همچنین ۰/۴٪ از کودکان سالم جدا گردید. انتروپاتوژنیک آتیپیکال (atypical EPEC) در کودکان دارای اسهال با ۹/۳٪ ایزوله شده است (۴). مطالعه اپیدمی در چندین کشور نشان دهنده حاملین بدون علامت است، که در مدفوع تعداد ۲۰-

REFERENCES

1. Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *BMJ*; 1999; 318; 1046-50.
2. Whittam TS, Bumbaugh, AC. Inferences from whole genome sequences of bacterial pathogens *Curropin Gaenet Dev*; 2002 12; 719-725.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2, 123-140 .

- 4 . Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in Iranian children with and without diarrhea .J Med Microbio . 2006;55:1159-1163.
- 5.Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengard B, Hedlund KO, Karnell A et al. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. Clin Infect Dis 2000; 30(5):770-8.
- 6.Salmanzadeh-ahrabi S, Habibi E, Jafari F, Zali MR. Molecular epidemiology of Eschreichia coli diarrhea in children in Tehran. Ann Trop Ped .2005; 25:35-9.
- 7.Nataro jp, kaper Jb. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev; 1998 11; 142-201.
- 8.Donnenberg MS, whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli .J Clin Invest; 2001. 107; 539-548.
9. Jafari F, Garcia-Gil LJ, Salmanzadeh S, Ahrabi M, Shokrzadeh L, Aslani M, Pourhoseingholi MA, Derakhshan F, Zali MR. 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
- 10.Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black R E, Clements ML, O'Brien A D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli independent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect.Dis. 1985 152; 550-559.