بررسی حساسیت و اختصاصیت روش‌سروتایپینگ 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 مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای عفونی کودکان و عامل اسهال پایدار و مزمن در جهان است. این ارگانیسم دارای سروتایپ های مشخصی است که در کودکان ایجاد اسهال می‌کند. ژنی که برای شناسایی این باکتری استفاده می‌شود eae نام دارد. در آزمایشگاه‌های بالینی ایران برای تشخیص این پاتوتایپ از روش سروتایپینگ استفاده می‌شود 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. نمونه‌ها از لحاظ وجود سروگروه‌های EPEC توسط آزمون‌های سرولوژی بررسی شدند و شناسایی مولکولی انتروپاتوژنیک ای. کلای با استفاده از تشخیص ژن eae به وسیله PCR و پرایمرهای اختصاصی آن انجام شد.*

یافته‌ها: *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.*

نتیجه‌گیری: *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

بیماری‌های اسهالی یکی از عوامل جهانی منجر به مرگ و میر است که سالانه باعث مرگ دو ملیون نفر در جهان می‌شود و بیشترین علت مرگ و میر در میان کودکان در کشور های جهان سوم است(۱). اگر چه خیلی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها می‌توانند اسهال مداوم ایجاد کنند، ژیاردیا، کریپتوسپوریوم، انترواگریگیتیو *ای. کلای* و انتروپاتوژنیک *ای. کلای* از مهمترین علل ایجاد اسهال هستند(۲).

اشرشیا کلای ساکن روده انسان است و به عنوان فلور نرمال و بدون ضررمحسوب می‌شود، اما میتواند عامل اسهال شدید به خصوص در کودکان باشد. *ای. کلای* ها بر اساس ویژگی‌های ویرولانسشان به پاتوتایپ‌هایی شامل انتروتوکسیژنیک *ای. کلای*(ETEC) , انتروانویسیو *ای.کلای*(EIEC) ، انترواگریگیتیو *ای. کلای*(EAggEC)، انتروهموراژیک *ای.کلای*(EHEC)، انتروپاتوژنیک *ای. کلای* (EPEC) و diffusely adherent *E. coli* (DAEC) قابل تقسیم می باشند(۳).

EPECعامل اسهال در کودکان است که توکسین تولید نمی‌کند و تهاجمی نیست(۴). بیماری زایی اولیه آن به علت تولید لژیون‌های "Attaching and Effacing" است که باعث تخریب میکرو ویلی در سطح لومن روده می‌شود. توانایی تولید A/Eتوسط لوکوس LEEکد می‌شود. این لوکوس حاوی ژن*eae* است که کد کننده اینتیمین است و باعث اتصال EPEC به سلول اپی‌تلیال می‌شود. از این ژن برای شناسایی مولکولی انتروپاتوژنیک *ای. کلای* استفاده می‌شود(۵).

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

جمعیت مورد مطالعه، گروه سنی، معیارهای تشخیصی ، متد تشخیصی و ... متفاوت است بر اساس روش‌های 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 می‌شود، تخمین شیوع EPEC با تنوع زیادی در مطالعات تا میانگین ۲۰-۱۰٪ بالاتر می رود(۲). امروزه شناسایی EPEC بر اساس وجود ژن‌ها ویرولانس اختصاصی است برای سال‌ها تشخیص EPEC بر اساس تشخیص سروتایپی O:H بود(۶). در طی دو دهه اخیر با شناسایی مکانیسم پاتوژنز EPEC روش‌های شناسایی مولکولی از طریق شناسایی ژن‌های ویرولانس جایگزین روش‌های فنوتیپی شده است است و با گسترش این روش ها سویه های EPEC یافت شده است که در تقسیم بندی سروگروپ‌های 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 نمونه‌ی جمع آوری شده *E.coli* از کودکان بستری شده در سه بیمارستان تهران در این مطالعه استفاده شد. این تعداد *اشریشیا کلی* از ۱۳۸۷ نمونه مدفوعی و طی سال‌های 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 فریزر 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. نمونه‌های *ای. کلای* 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 می‌شود 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 ویرولانس مورد بررسی قرار می‌گیرد.

DNA *شریشیا کلای* های ایزوله شده با روش جوشاندن استخراج شدند. ابتدا *ای.کلای* ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷C° روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس ۲۰۰µl از سوسپانسیون باکتری در آب مقطر قابل تزریق در میکروتیوپ تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵C° جوشانده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm،۱۰۰ µl از محلول رویی به عنوان DNA الگو به میکروتیوپ جدیدی انتقال یافت و در دمای ۲۰C° -برای آزمایشات بعدی نگه‌داری 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 ژن‌های stx_1 و stx_2 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 دست‌آمده بود به عنوان کنترل مثبت(۱۰) و از ای. کلای ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر('3-'5)	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		

PCR در حجم نهایی ۲۵میکرولیتر شامل۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۶/ میکرولیتر MgCl2 ، ۵/۲ میکرولیتر بافر PCR 10X، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، 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 ۵۳ و ۵۵ درجه به ترتیب برای ژن‌های *eae* و *stx* درجه سانتیگراد به مدت۱ دقیقه و مرحله Extension در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۱ دقیقه در نظر گرفته شد. Extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه انجام گرفت.

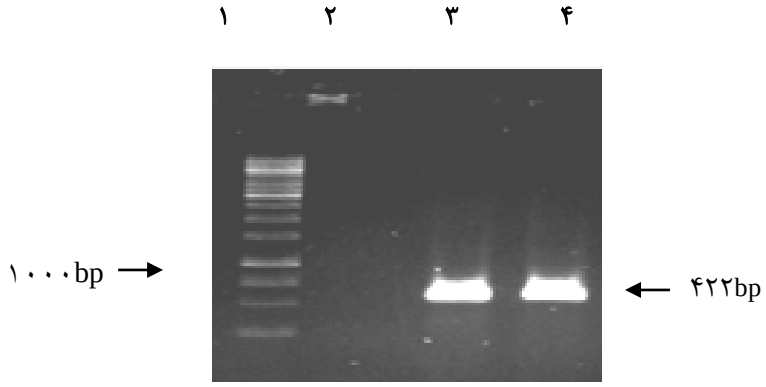
یافته ها

از ۸۸۵ ایزوله *E.coli* تعداد۳۵ ایزوله (۳/۹۵٪) جز یکی از ۴ آنتی‌سرم پلی والان مورد استفاده بودند . نمونه‌های *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 ویرولانس *eae* بودند و باندbp ۴۲۲ 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(شکل۲). 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).

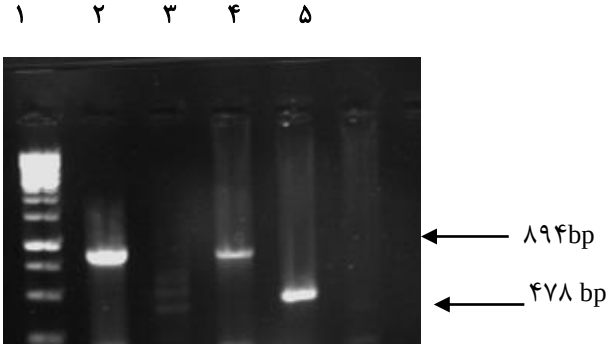
جدول ۲. توزیع نمونه های ای.کلای براساس نتیجه آزمایش مولکولی و سروتایپینگ

	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

شکل۱



شکل۲



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.

شکل۲. PCR ژنهای stx1 و stx2. چاهک شماره۲و۴: کنترل مثبت stx1 (دو سویه EHEC)، چاهک شماره ۳: کنترل منفی E.coli ATCC 25922)، چاهک شماره ۵: کنترل مثبت stx2، چاهک شماره ۱ مارکر 1Kb.

بحث

در این مطالعه از تعداد ۸۸۵ نمونه *ای.کلای* ۲۵و 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 می‌دهد 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 انتروپاتوژتیک *ای. کلای* با روش سروتایپینگ از لحاظ ژنتیکی منفی گزارش شده‌اند. با توجه به این اطلاعات حساسیت و ویژگی برای روش سروتایپ به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۹۶/۹٪ است(شکل ۲) که نشان‌دهنده ضعیف بودن عملکرد تست سروتایپ برای تمایز مثبت های واقعی از مثبت های کاذب است و در نهایت باعث ایجاد نتایج غیر قابل اعتماد می‌شود.

در مطالعه حاضرتنها تعداد ۱۰ ایزوله از۳۵ (۲۸/۵٪) ایزوله‌ای 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 نمی‌گیرند و در نتیجه روش سروتایپ تنها برای سروگروپ های مشخصی کارآمد است(۷, ۱۶, ۱۷). این مسئله در سویه هایی که در ایران نیز جداسازی میشوند دیده شده است. در مطالعه بوذری و همکاران که درسال 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).

براساس گزارش‌های عنوان شده در خصوص سیستم تشخیص پاتوژن تا سال ۲۰۱۱ انتروپاتوژنیک *ای.کلای* توسط گروه O سروتایپ طبقه بندی می‌شد. این روش بسیار مشکل آفرین بود. برای مثال بعضی از سویه‌های انترواگریگیتیو *ای.کلای* در گروه EPEC قرار می‌گرفتند و برعکس بعضی از سویه‌های حاوی ژن *eae* در سروگروپ O قرار نمی‌گرفتند و به عنوان non-EPEC شناخته می‌شدند. سویه های غیر پاتوژن O1 و O18 هم EPEC گزارش می‌شدند(۱۹). سازمان جهانی بیماری‌های 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 سویه‌های 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 می‌تواند به عنوان یکی از علل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و از عوامل مقاومت بالای باکتری های کامنسال باشد(۲۱).

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

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-producingEscherichia 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-Aznaveh 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.