Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

Original Article

Evaluation of the prevalence of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from stool specimens of patients with diarrhea admitted to Tehran Children's Hospital by the PCR Method

Bahmanabadi R[1], Khalili MB[2], Bakhshi B[3], Soltan Dallal MM[4,5*]

1- Department of Microbiology, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I. R. Iran.
2- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I. R. Iran.
3- Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.
4- Department of Food Microbiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.
5- Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2017/08/26 | Accepted: 2018/02/26

Abstract:

Background: Infectious diarrheal diseases are a major cause of death in community, especially in children. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) are considered as a major cause of children's diarrhea in developing countries. The aim of this study was to evaluate the prevalence of both typical Enteropathogenic (tEPEC) and atypical Enteropathogenic (aEPEC) *E. coli* isolated from patients admitted to the children's hospital in Tehran by the PCR method.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, a total of 157 children diarrheal samples were collected from February 2016 to August 2017 and were sent to the microbiology department in the School of Public Health in Tehran University of Medical Sciences for testing. The identification of isolates was performed by conventional biochemical tests. The typical and atypical *E. coli* isolates were identified for the presence of *eae*, *sxt1*, *sxt2* genes, and *bfp A* by the PCR method. The drug resistance patterns of isolated EPEC were tested by the agar disk diffusion method. The antibiotics used were amoxicillin-clavulanic, ampicillin, gentamicin, trimethoprim- sulfamethoxazole, ciprofloxacin, cefepim, Nitrofurantoin and imipenem.

Results: Out of 101 *E. coli* isolates, 7 were identified as EPEC. All the isolated strains carried *eae* but not *stx1*, *stx2*, and *bfp A* genes. Also, 100% of the isolates were resistant to amoxicillin-clavulanic and ampicillin.

Conclusion: A high prevalence of EPEC in children can be considered as a threat to the children's health. In this study, all the isolates were *aEPEC*.

Keywords: *Escherichia coli* Enteropathogenic, Typical, Atypical, Children, Diarrhea, PCR

* **Corresponding Author.**
Email: msoltandallal@gmail.com
Tel: 0098 912 145 2646
Fax: 0098 2188 99 2971

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2018; Vol. 22, No 2, Pages 222-229

Please cite this article as: Bahmanabadi R, Khalili MB, Bakhshi B, Soltan Dallal MM, Rezaei N. Evaluation of the prevalence of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from stool specimens of patients with diarrhea admitted to Tehran Children's Hospital by the PCR Method. ***Feyz*** 2018; 22(2): 222-9.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

بررسی فراوانی *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک تیپیکال و آتیپیکال جدا شده از نمونه‌های مدفوع مبتلایان به اسهال بستری در بیمارستان کودکان تهران با روش مولکولی PCR

راشین بهمن‌آبادی[۱]، محمد باقر خلیلی[۲]، بی‌تا بخشی[۳]، محمد مهدی سلطان دلال[۴،۵]

خلاصه:

سابقه و هدف: بیماری‌های اسهالی عفونی یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در جامعه به‌خصوص در کودکان محسوب می‌شوند. سویه‌های *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) به‌عنوان عامل عمده اسهال در کودکان به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه مطرح هستند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک تیپیکال (tEPEC) و آتیپیکال (aEPEC) جداشده از نمونه‌های بیمارستان کودکان تهران با روش مولکولی PCR می باشد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی– مقطعی از دی ۱۳۹۵ تا مرداد ۱۳۹۶ تعداد ۱۵۷ نمونه مدفوع از کودکان مبتلا به اسهال که به بخش میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های *اشریشیاکلی* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند و سپس نمونه‌ها از لحاظ وجود پاتوتایپ EPEC از طریق PCR با استفاده از شناسایی ژن‌های *eae*،*sxt1* و*sxt2* و همچنین وجود سویه‌های تیپیکال و آتیپیکال با استفاده از شناسایی ژن *bfp A* مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی مقاومت چندداروییEPEC جدا شده با استفاده از روش دیسک‌دیفیوژن آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاولانیک اسید، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم، سیپروفلوکساسین، سفپیم، نیتروفورانتوئین و ایمی‌پنم مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: از ۱۰۱ نمونه *اشریشیاکلی*، ۷ سویه EPEC جداسازی گردید و همه سویه‌ها دارای ژن *eae* و فاقد ژن‌های *stx*، *stx2* و *bfp A* و *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک آتیپیکال بودند. از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ۱۰۰ درصد جدایه‌ها مقاوم به آموکسی‌سیلین-کلاولانیک اسید و آمپی‌سیلین بودند.

نتیجه‌گیری: شیوع بالای EPEC در کودکان یک تهدید در کشور است. در مطالعه حاضر تمامی ایزوله‌ها از نوع *aEPEC* بودند.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک، تیپیکال، آتیپیکال، کودکان، اسهال، PCR

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۲، خرداد و تیر ۹۷، صفحات ۲۲۹-۲۲۲

مقدمه

از ۴/۸۷۹ میلیون مرگ‌ومیر جهانی کودکان زیر ۵ سال به‌دلیل بیماری‌های عفونی، اسهال به‌تنهایی باعث ۰/۸۰۱ میلیون مرگ‌ومیر در سال ۲۰۱۰ شده است [۱]. اسهال می‌تواند توسط پاتوژن‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی ایجاد شود.

اشریشیاکلی یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه و یک فلور طبیعی ساکن روده حیوانات و انسان است. پاتوژن *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) یکی از ۶ پاتوتایپ *اشریشیاکلی* اسهال‌زا (Diarrheagenic *Escherichia coli*) و علت عمده اسهال کودکان در کشورهای درحال توسعه است [۲]. مشخصه فنوتیپی EPECتوانایی ایجاد ضایعات Effacement Attachment/ (A/E) است [۳]. ژن مسئول تشکیل ضایعه A/E در یک جزیره پاتوژنیسیته کروموزومی قرار گرفته است که به آن Locus of enterocyte effacement (LEE) گفته می‌شود. LEE مجموعه‌ای از ژن‌ها از جمله ژن intimin (*eae*) را حمل کرده که نقش حیاتی در فنوتیپ EPEC بازی می‌کند [۴]. EPEC به دو زیر گروه تیپیکال (*tEPEC*) و آتیپیکال (*aEPEC*) تقسیم می شود که تفاوت اصلی بین این دو گروه در حضور پیلی تشکیل‌دهنده کلاف (*bfp A*) در زیرگروه تیپیکال و فقدان آن در زیرگروه آتیپیکال است. سویه تیپیکال EPEC علاوه بر ژن eae (ژن کد-کننده اینتیمین که برای تولید زخم‌ها لازم می‌باشد)، دارای ژن bfp (Forming Bundle Pilus) که در پلاسمید واقع شده است نیز

[۱] کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، پردیس بین‌المللی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

[۲] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

[۳] دانشیار، گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۴] استاد، گروه میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

[۵] استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش میکروب شناسی

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۵۲۶۴۶ **دورنویس:** ۰۲۱ ۸۸۹۹۲۹۷۱

پست الکترونیک: msoltandallal@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۶/۱۲/۷

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

می‌باشد، ولی سویه‌های آتیپیکال EPEC تنها حاوی ژن eae هستند [۵]. زیرگروه تیپیکال (*tEPEC*) منجر به اسهال در کشور-های در حال توسعه می‌شود، درصورتی‌که زیرگروه آتیپیکال به‌طور مکرر از مناطق توسعه‌یافته جداسازی می‌شود [۶]. در سال‌های اخیر گونه‌های *tEPEC* به‌ندرت به‌عنوان عوامل اسهال حاد دوران کودکی جدا شده و غلبه سویه‌های *aEPEC* در هر دو دسته کشورهای صنعتی و درحال توسعه مشاهده شده است [۸،۷]. همچنین، برخی از مطالعات نشان می‌دهد سویه *aEPEC* به‌عنوان عامل اسهال پایدار دخالت دارد [۱۰،۹]. در مطالعه Blanco و همکاران در سال ۲۰۰۶ از مجموع ۷۱ *EPEC* جداشده از کودکان مبتلا به اسهال در اروگوئه به‌وسیله PCR نشان داده شد که ۵۷ ایزوله (۸۰/۲ درصد) جزء *EPEC* تیپیکال بوده و ۱۴ ایزوله (۱۹٪/۷) آتیپیکال هستند [۱۱]. باتوجه به نقش حیاتی التهاب و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در مبارزه با عفونت، تعجب‌آور نیست که بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی استراتژی‌های تکامل یافته برای غیرفعال کردن این دفاع دارند. *اشریشیا کلی*، عامل بیماری اسهال نوزادان، یک پاتوژن خارج سلولی روده‌ای است که التهاب و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده را مهار می‌کند. EPEC به روده متصل شده و در روده باقی می‌ماند. اگرچه EPEC یک پاتوژن خارج سلولی است، به سطح آتیپیکال روده متصل باقی می-ماند و می‌تواند در سیگنالینگ درون سلولی دخالت کند. بقای سلول میزبان و پیشگیری از آپوپتوز به‌عنوان مکانیسم بیماریزایی حیاتی EPEC و دیگر پاتوژن‌های A/E مطرح می‌باشد [۱۲]. یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌های عفونی مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. مقاومت دارویی مفهوم پیچیده‌ای است که در آن چندین فاکتور از جمله نوع میکرو-ارگانیسم عفونت‌زا، محل میکروب در داخل بدن، توزیع میکرو-ارگانیسم در بدن، غلظت دارو در محل عفونت و وضعیت ایمنی بیمار دخالت داشته و بر یکدیگر تاثیر می‌گذارند [۱۳]. هدف این پژوهش تعیین فراوانی *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک تیپیکال و آتیپیکال جدا شده از نمونه‌های بیمارستان کودکان تهران با روش مولکولی PCR است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی-توصیفی از دی ۱۳۹۵ تا مرداد ۱۳۹۶ بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده فرمول n=z2P(1-P)/d2 و خطای قابل قبول ۰/۰۵ تعداد ۱۵۷ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه‌کننده به بیمارستان فوق تخصصی کودکان تهران جمع‌آوری شد.

جداسازی و شناسایی

برای جداسازی باکتری *اشریشیاکلی*، نمونه مدفوع در محیط هکتون انتریک آگار (مرک) کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون انجام شد. سپس، با استفاده از محیط‌های افتراقی و تست‌های بیوشیمیایی از جمله سیمون سیترات، اوره، لیزین، MRVP، SIM و TSI (مرک، آلمان) سویه‌های *اشریشیاکلی* پاتوژن شناسایی و تائید گردیدند.

ذخیره‌سازی و نگهداری ایزوله‌ها

جهت استفاده از ایزوله‌های جمع‌آوری شده در مراحل بعدی، ایزوله‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت ذخیره داده شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

PCR

ابتدا DNA با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد؛ به‌این‌ترتیب که یک کلونی از کشت شبانه (Overnight) باکتری در ۲۰۰ µl از آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس، برای ۱۰ دقیقه در RPM ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده و سپس ۱۰۰ µl از مایع رویی حاوی DNA به آرامی به تیوب استریل دیگر منتقل شد. DNA استخراج شده داخل میکروتیوب ۰/۵ در دمای ۲۰- فریزر نگهداری شد. پس از تهیه مخلوط اصلی (با حجم ۲۰ میکرولیتر) به تعداد کافی، به تمام میکروتیوب‌ها ۵ میکرولیتر DNA الگو اضافه شد که در نهایت واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل‌دهنده واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرو-لیتر بود. برای تهیه این محلول به ۱۶ میکرولیتر از آب مقطر استریل به‌ترتیب ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، ۰/۵ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۳ میکرولیتر dNTP ، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم ۵ واحدی DNA Tag Polymerase اضافه گردید. اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده و برنامه زمان‌بندی آزمون PCR به‌ترتیب در جداول شماره ۱ و ۲ ذکر شده است.

آنتی‌بیوگرام

بعد از تعیین گونه *E.coli* با آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن به-روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل (Clinical and

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

laboratory standards institute; CLSI) استفاده گردید [۱۴]. آزمایش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید (AMC 30 µg)، آمپی‌سیلین (Am 10 µg)، جنتامایسین (GM 10 µg)، سولفومتاکسازول-تری‌متوپریم (STX)، سیپروفلوکساسین (CIP 5µg)، سفپیم (Cpm 30µg)، نیتروفورانتوئین (FD 300µg) و ایمی‌پنم (IMI 10µg) تهیه شده از شرکت Mast, UK انجام گردید.

جدول شماره ۱- توالی جفت پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر

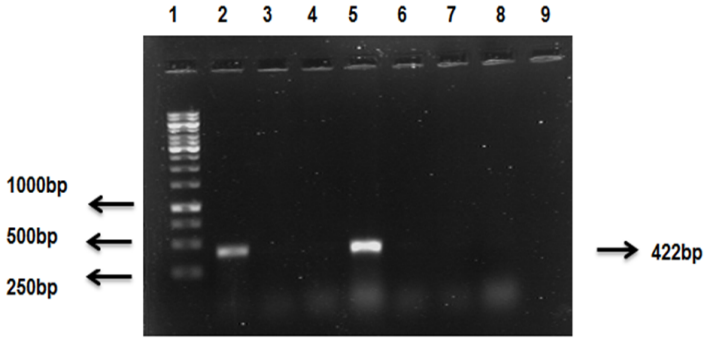
ژن	توالی	طول قطعه (bp)	منبع
eae	F:5'ACACTCCGATTCCTCTGGTG3' R;3'CTTGCACATAAGCAGGCAAA5'	۴۲۲	[۱۵]
Stx1	F:5'CAGTTAATGTGGTGGCGAAG3' R:3'CTGCTAATAGTTCTGCGCATC5'	۸۹۴	[۱۶]
Stx2	F:5'CTTCGGTATCCTATTCCCGG3' R: 3'GGATGCATCTCTGGTCATTG5'	۴۷۸	[۱۷]
bfp	F:5'AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC3' R:3'GCCGCTTTATCCAACCTGGTA5'	۳۲۲	[۱۶]

جدول شماره ۲- برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های مورد بررسی با واکنش PCR

برنامه	نوع عملیات	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل برنامه
۱	Primary Denaturation	۹۴	۵ دقیقه	۱
۲	Denaturation	۹۳	۴۰ ثانیه	۳۰
۳	Annealing	۵۳	۴۰ ثانیه	۳۰
۴	Extension	۷۲	۴۰ ثانیه	-

نتایج

در این مطالعه از ۱۵۷ نمونه اسهال گرفته شده از کودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان کودکان تهران، ۱۰۱ ایزوله (۶۴/۳ درصد) *اشریشیاکلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شد. با بررسی ژن *eae*، ۷ جدایه (۶/۹ درصد) *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک شناسایی شدند (شکل شماره ۱) و ازآنجایی‌که *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک نیز دارای ژن *eae* می‌باشد، برای تمایز از ژن‌های *stx1* و *stx2* نیز استفاده شد که هر ۷ جدایه مذکور فاقد آن بودند. همچنین، برای تشخیص سویه‌های تیپیکال و آتیپیکال از ژن *bfp A* استفاده شد که هر ۷ جدایه فاقد ژن *bfp A* بوده و از نوع آتیپیکال بودند. در گروه کودکان مبتلا به EPEC از ۷ جدایه، ۵ جدایه از پسران و ۲ جدایه از دختران جدا شد و بیشترین طیف سنی مربوط به سنین بین ۲ الی ۳ سال بود.



شکل شماره ۱- نتایج PCR برای آنالیز محصولات ژن *eae*

ستون ۱: مارکرkb۱، ستون ۲: سویه کنترل مثبت، ستون ۵ : جدایه مثبت، ستون ۳ و ۴ و ۶ و ۷ و ۸: جدایه منفی،ستون ۹: سویه کنترل منفی

برای تمامی ۷ جدایه *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک به‌دست آمده از نمونه‌های بالینی، آزمایش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین- کلاولانیک اسید، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، تری-متوپریم سولفومتاکسازول، سیپروفلوکساسین، سفپیم، نیتروفورا-نتوئین و ایمی‌پنم صورت گرفت که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها مقاوم به آموکسی سیلین – کلاولانیک اسید و آمپی‌سیلین بودند و بیشترین

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بود. همچنین، همه جدایه‌ها حساس به جنتامایسین، ایمی‌پنم و نیتروفورانتوئین بودند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک‌دیفیوژن

نوع آنتی‌بیوتیک	حساس	حساس	مقاوم
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید	۰	۰	۷ (۱۰۰)
آمپی‌سیلین	۰	۰	۷ (۱۰۰)
تری‌متوپریم سولفامتوکسازول	۱ (۱۴/۳)	۰	۶ (۸۵/۷)
سیپروفلوکساسین	۵ (۷۱/۴)	۰	۲ (۲۸/۶)
سفپیم	۵ (۷۱/۴)	۰	۲ (۲۸/۶)
نیتروفورانتوئین	۷ (۱۰۰)	۰	۰
ایمی‌پنم	۷ (۱۰۰)	۰	۰
جنتامایسین	۷ (۱۰۰)	۰	۰

بحث

بررسی‌های انجام شده توسط محققین مختلف نشان می‌دهد که بیماری اسهالی عفونی به‌طور وسیعی در سرتاسر جهان شیوع دارد و یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در کشورهای درحال توسعه به‌خصوص در کودکان است که منجر به حدود ۲/۵- ۱/۶ میلیون مرگ سالانه در کودکان می‌شود. انسان مخزن اصلی پاتوتیپ EPEC بوده و در سال ۱۹۹۵ این سویه‌ها به دو دسته مجزا تقسیم شدند: سویه‌های انتروپاتوژنیک تیپیک: سویه‌هایی که دارای دو ژن eae (ژن کدکننده پروتئین خارجی) و bfp (ژن کدکننده پیلی) می‌باشند؛ و سویه‌های انتروپاتوژنیک آتیپیک: سویه‌هایی که دارای ژن eae بوده و فاقد ژن bfp می‌باشند [۱۸]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که از ۱۰۱ سویه *E.coli*، ۷ جدایه (۶/۷ درصد) متعلق به پاتوتیپ EPEC از نوع آتیپیک بود؛ یعنی شامل ژن eae مثبت و فاقد ژن bfp بودند. در مطالعه انجام شده توسط زالی و همکاران روی اتیولوژی اسهال حاد در ایران، *اشریشیاکلی* به‌عنوان شایع‌ترین پاتوژن ایجادکننده اسهال گزارش شد. بین سروتیپ‌های مختلف *اشریشیاکلی*، سروتیپ *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک شایع‌ترین گونه گزارش شده در همه مطالعات بود [۱۹]. در مطالعه سلطان‌دلال و همکاران روی میزان باکتری‌های انتروپاتوژنیک در کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال، از ۱۶۰۰ نمونه سواب رکتوم، در مجموع ۲۳۵ سویه (۱۴/۷ درصد) از آنها مثبت بود که ۱۰۹ (۶/۸ درصد) *اشریشیاکلی* انتروپاتوژن جداسازی شد [۲۰]. در تحقیق نصرالهی و شریف روی میزان شیوع اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک در کودکان زیر یک‌سال، ۴۰۰ کودک مورد مطالعه قرار گرفتند. در این تحقیق ۱۲ درصد موارد اسهال به سویه‌های EPEC تعلق داشت و ۵۵ درصد موارد اسهال ناشی از این باکتری در فصل تابستان مشاهده گردید. در این مطالعه اسهال ناشی از EPEC با نوع تغذیه، شرایط نگهداری کودک و سطح آگاهی بهداشتی مادران ارتباط معنی‌دار داشت [۲۱]. جعفری و همکاران با بررسی ۸۰۸ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ مشخص کردند که علت ۳۸/۸ درصد موارد *اشریشیاکلی* بوده و شیوع اشریشیاکلی‌های پاتوژنیک ۱۲/۶ درصد بود [۱۲]. در مطالعه دیگری علیخانی و همکاران در طول ماه‌های تابستان سال ۲۰۰۶، ۲۴۷ نمونه از کودکان دارای اسهال و ۱۱۰۸ نمونه از کودکان بدون علامت از نظر وجود EPEC و دیگر پاتوژن‌های باکتریایی را بررسی کردند؛ پاتوژن‌های انتریک بالقوه در ۱۴۰ مورد (۵۶/۷ درصد) از کودکان دارای اسهال تشخیص داده شد و از موارد مثبت کودکان مبتلا به اسهال در ۱۱۱ مورد (۴۴/۹ درصد) EPEC دیده شد [۲۲]. بررسی انجام شده در کاشان توسط مطلبی و همکاران طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۰ روی ۳۱۳ نمونه مدفوعی کودکان زیر ۵ سال نشان داد که ۱۷ مورد آن مربوط به *اشریشیاکلی* است. از این تعداد ۵۱ نمونه (۲۸/۶ درصد) *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک بود [۲۳]. نتایج ما با نتایج گذشته در سال ۲۰۰۱ هم‌خوانی دارد، اگرچه در مقایسه با سایر محققین از درصد پایین‌تری برخوردار است. در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۱ در نروژ انجام شد، ۵۹۸ نمونه از ۴۴۰ کودک زیر ۲ سال به‌دست آمد و ۴۴ نفر (۷٪/۳۵) دارای EPEC بودند [۹]. محققین در سال ۲۰۰۵ با استفاده از PCR وجود ژن ویرولانس *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک را در ۲۸۰ نمونه مدفوعی کودک زیر ۲ سال بررسی کرده و نشان دادند و *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک در ۵۵ درصد موارد عامل اصلی اسهال است [۲۴]. در یک مطالعه دیگر، در سال ۲۰۰۶ در اسپانیا از ۲۰۱۵ بیمار، ۱۱۰

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

EPEC (۵٪/۴۵) جدا شد [۲۵]. در مطالعه انجام شده توسط Albert و همکاران در کویت، طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۷، ۵۳۷ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال زیر ۵ سال با طول دوره اسهال کمتر از ۱۴ روز بررسی شد و فراوانی *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک ۸/۴ درصد بود که بیشتر مربوط به سویه آتیپیکال می‌شد [۲۶]. این‌که چرا در دهه اخیر شیوع اسهال‌های ناشی از سویه‌های آتیپیک بیش از تیپیک می‌باشد دقیقا مشخص نبوده، لیکن به‌دلیل این که جدایه‌های آتیپیک در کشورهای صنعتی شایع بوده، علت بالا بودن میزان شیوع این پاتوتیپ را می‌توان صنعتی شدن کشور دانست [۶]. علیخانی و همکاران در سال ۲۰۰۶، ۳۵ ایزوله (۱۱٪/۸) تیپیکال و ۲۳ ایزوله (۹٪/۳) آتیپیکال با روش PCR شناسایی کردند [۲۲]. در یک مطالعه انجام شده در نروژ در سال ۲۰۰۱ از ۴۴ فرد دارای *EPEC*، ۴۳ نفر آتیپیکال (۹۷٪/۷) و تنها ۱ مورد (۲٪/۲۷) تیپیکال بود [۹]. Blanco و همکاران در سال ۲۰۰۶ در اسپانیا ۱۰۵ مورد (۵٪/۲) *EPEC* آتیپیکال و فقط ۵ سویه تیپیکال (۰٪/۲) شناسایی کردند [۲۵]. Santona و همکاران در سال ۲۰۱۲ در نمونه‌های ایتالیا هیچ *EPEC* تیپیکالی یافت نکردند و همه ۲۸ *EPEC* آتیپیکال بودند و در آنگولا و موزامبیک ۲/۶ درصد *EPEC* آتیپیکال بودند [۶]. در مطالعه ما از بین ۷ جدایه *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک که با روش PCR شناسایی شد، تمام ۷ جدایه فاقد ژن‌های *stx1*، *stx2* و *bfp A* بوده و در نتیجه آتیپیکال بودند. بر طبق مطالعات انجام شده فراوانی EPEC تیپیکال در ایران در سال ۲۰۰۶، ۱۱/۸ درصد و در سال ۲۰۱۰، ۶۶ درصد و فراوانی EPEC آتیپیکال در سال‌های ذکر شده به‌ترتیب ۹/۳ و ۳۴ درصد بوده است [۲۷]. فراوانی EPEC تیپیکال به‌ترتیب در نروژ ۲/۲۷ درصد، در اسپانیا ۰/۰۲ درصد و در اروگوئه ۸۰/۲ درصد و فراوانی EPEC آتیپیکال به‌ترتیب در نروژ ۹۷/۷ درصد، در اسپانیا ۵/۲ درصد و در اروگوئه ۱۹/۷ درصد بوده است که این موضوع تفاوت وجود سویه‌های تیپیکال و آتیپیکال را در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه نشان می‌دهد [۲۴،۱۱،۹]. مطالعات اپیدمیولوژیک اخیر نشان می‌دهد که در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شیوع سویه‌های آتیپیکال بیشتر از تیپیکال می‌باشد [۲۸]. دلایل شیوع بالای سویه‌های آتیپیکال مشخص نیست و بیشتر یافته‌ها نشان می‌دهد سویه‌های که آتیپیکال ممکن است یک ویژگی ذاتی برای حضور طولانی‌تر در روده نسبت به دیگر پاتوژن‌های اسهال‌زا داشته باشند. به‌علت وجود ژن bfp A سویه-های تیپیکال به سلول‌های اپی‌تلیال روده متصل شده و فعالیت طبیعی سلولی را مختل می‌کنند؛ از سوی دیگر سویه‌های آتیپیکال آپوپتوز را در سلول‌های اپیتلیال روده‌ایی کاهش داده و باعث کلونیزاسیون طولانی می‌شوند [۲۹]. در تهران و طی سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ بیشترین مقاومت به‌ترتیب علیه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین؛ ۴۵/۷ درصد، آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید؛ ۳۷/۱ درصد، تری‌متوپریم/ سولفومتاکسازول؛ ۵۴/۳ درصد، تتراسایکلین؛ ۳۷/۱ درصد، استرپتومایسین؛ ۲۲ درصد و کلرامفنیکل؛ ۲۰ درصد بوده و نسبت به جنتامایسین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سیپروفلو-کساسین مقاومتی گزارش نشده است [۱۷]. در یک مطالعه دیگر در سال ۲۰۰۸ بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراساکلین؛ ۸۹/۹ درصد، کلرامفنیکل؛ ۸۸/۹ درصد، آمپی‌سیلین؛ ۷۹ درصد و سفکسیم؛ ۷۵ درصد گزارش شده است [۲۳]. در سال ۲۰۰۹ مطلبی و همکاران شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی را برای آمپی-سیلین؛ ۱۰۰ درصد، سفالکسین؛ ۸۴ درصد و سفتریاکسون؛ ۷۴/۵ درصد گزارش کردند و بیشترین میزان حساسیت نسبت به سیپرو-فلوکساسین به میزان ۵۶/۸ درصد بود [۲۷]. در بررسی حاضر تجزیه و تحلیل الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای همه EPECهای آتیپیکال جدا شده از کودکان دارای اسهال انجام شد و ۱۰۰ درصد جدایه‌ها مقاوم به آموکسی‌سیلین–کلاولانیک اسید و آمپی‌سیلین بودند و بیشترین میزان مقاومت نسبت به این آنتی-بیوتیک‌ها بود. مشخص شد که نمونه‌های EPEC به داروهای ضد میکروبی متداول مقاوم بودند و تمام سویه‌ها (۱۰۰ درصد) به جنتامایسین، نیتروفورانتوئین و ایمی‌پنم حساس بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد تمامی جدایه‌های *اشریشیاکلی* آنتروپاتوژن جداشده در این مطالعه، برخلاف مطالعات اپیدمیو-لوژی انجام شده در کشورهای درحال توسعه، فاقد ژن *bfp A* بوده و از نوع آتیپیکال (*aEPEC*) بودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۳۴۲۹۹ می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019

References:

[1] Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, E. Lawn J, et al. Global, regional,and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. ***Lancet*** 2002; 379(9832): 2151–61.

[2] Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Silva SO, Morais MB, Fagundes Neto U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. ***Emerg Infect Dis*** 2002; 8(8): 855–8.

[3] Blanco M, E.Blanco J, Dahbi GH, P.Alonso M, Mora A, A.Coira M, et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. ***Int Microbiol*** 2006; 9(2): 103-10.

[4] Castillo A, Eguiarte LE, Souza V. A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*:the search for the unit of selection. ***Proc Natl Acad Sci U. S. A.*** 2005; 102(5): 1542–7.

[5] Nazari Z, Moradli G, Bakhshi B. Molecular identification of *Escherichia coli* EPEC isolated from children under the age of 5 years by multiplex PCR in Kermanshah. ***Scien J Ilam Uni Med Sci*** 2016; 24(1): 154-61. [in Persian]

[6] Santona S, Diaz N, Fiori PL, Francisco M, Sidat M, Cappuccinelli P, et al. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. ***J Infect Dev Ctries*** 2013; 7(3): 214-9.

[7] Hernandes RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. An overview of *atypical enteropathogenic Escherichia coli*. ***FEMS Microbiol Lett*** 2009; 297(2): 137–49.

[8] 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.

[9] Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of *atypical enteropathogenic Escherichia coli* with prolonged diarrhoea. ***J Med Microbiol*** 2004; 53(11): 1137–44.

[10] Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. *Atypical enteropathogenic Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. ***Emerg Infect Dis*** 2006; 12(4): 597–603.

[11] Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, et al. Typing of intimin (eae) genes from *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B). ***J Med Microbiol*** 2006; 55(9): 1165-74.

[12] Wong Fok Lung T, Pearson JS, Schuelein R, Schuelein R L. Hartland E. The cell death response to *enteropathogenic Escherichia coli* infection. ***Wiley Online Library*** 2014; 16(12): 1736–45.

[13] Tuite N, Reddington K, Barry T, Zumla , Enne V. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? ***J Antimicrob Chemother*** 2014; 69(7): 1729-33.

[14] Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI supplement M100S, 26th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute., Wayne, PA, 2016.

[15] Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie M, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of `class 1 integrons among *enteropathogenic Escherichia coli*. ***Can J Microbiol*** 2012; 58(5): 637-43.

[16] Singh T, Das S, Ramachandran VG, Wani S, Shah D, Maroof KA, Sharma A. Distri bution of Integrons and Phylogenetic Groups among Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Children<5 Years of Age in Delhi, India. ***Front Microbiol*** 2017; 8: 561.

[17] Jafari F, Garcia-Gil LJ, 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.

[18] Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. ***J Infecti Dis*** 1985; 152(3): 560-5.

[19] Zali Mr, Moez Ak, Parcham Ak, Nik-Kholgh B. Etiologies of acute diarrheal diseases in Iran. ***J Res Med Sci*** 2003; 7(4): 346-56.

[20] Soltan Dallal MM. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. ***Arch Iran Med*** 2001; 4(4): 201-321.

[21] Nasrollahi M, Sharifi M. Prevalence of diarrhea caused by *Enteropathogenic E.coli* in children less than one year in sari. ***J SSU*** 1999; 793: 26-30. [in Persian]

[22] Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical *enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)* in Iranian children with and without diarrhoea. ***J Med Microbiol*** 2006; 55(Pt 9): 1159-63.[in Persian]

[23] Motallebi M, Piroozmand A, Rohani M, Akbari H, Khorshidi A. Multiple drug resistance of *enteropathogenic Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Kashan, Iran. ***African JMR*** 2011; 5(20): 3305-9.

[24] Pereira ACM, Britto-Filho JD, José de Carvalho J, de Luna MdG, Rosa ACP. *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. ***Microbial Path*** 2008; 45(5-6): 310-4.

[25] Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, et al. Identification of two new intimin types in *atypical enteropathogenic Escherichia coli*. ***Int Microbiol*** 2006; 9(2): 103-10.

[26] Albert MJ, Rotimi VO, Dhar R, Silpikurian S, Pacsa AS, Molla AM, et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* are not a significant cause of diarrhoea in hospitalised children in Kuwait. ***BMC Microbiol*** 2009; 9(1): 62.
[27] Kalantar E, Soheili F, Salimi H, Soltan Dallal MM. Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. ***J Jundishapur Microbiol*** 2011; 4(1): 23-8.
[28] Ochoa TJ, Contreras CA. *Enteropathogenic escherichia coli* infection in children. ***Curr Opin Infect Dis*** 2011; 24(5): 478-83.
[29] Dutta S, Guin S, Ghosh S, Pazhani GP, Rajendran K, Bhattacharya MK, et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. ***PloS One*** 2013; 8(2): e56068.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:43 +0330 on Tuesday February 19th 2019