Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

تعیین پاتوتایپ و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایههای *اشرشیاکلای* مولد اسهال، جداشده از اسهال کودکان در شهرستان خرم آباد ، ایران

فاطمه عزیزی[1*]، محمد رعایایی اردکانی[2]، سیده الهام رضا توفیقی[3]، احسان رشیدیان[4]

چکیده

زمینه و هدف : سویه‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلای* به عنوان عوامل اصلی بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای به شمار می‌روند. این مطالعه با هدف شناسایی و ارزیابی پاتوتایپ غالب جدایه‌های *اشرشیاکلای‌های* مولد اسهال انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، تعداد ۵۷۸ نمونه اسهال از کودکان زیر ده سال در خرم آباد جمع آوری شد. پس از کشت و جداسازی، جهت تعیین پاتوگروه جدایه‌های اشرشیاکلای-های مولد اسهال، ۴ پاتوتایپ *اشرشیاکلای* انتروتوکسیژنیک، *اشرشیاکلای* انتروپاتوژنیک، *اشرشیاکلای* انتروواینویزیو، *اشرشیاکلای* شیگا توکسیژنیک به روش PCR بررسی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به روش دیسک دیفیوژن (کربی بوئر) بررسی شد.

یافته ها: از ۵۷۸ نمونه مدفوع جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، ۸۱ جدایه *اشرشیا کلای* مولد اسهال تشخیص داده شد، که از این میان به ترتیب فراوانی *اشرشیاکلای* انتروتوکسیژنیک ۱۵/۱٪ ، انتروپاتوژنیک ۱۴ ٪، شیگا توکسیژنیک ۹/۷ ٪ و انتروواینویزیو ۵٪ از کل نمونه ها بود. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی-سیلین ۷۸٪، تتراسایکلین ۷۴/۱٪، کوتریماکسازول ۶۴/۲٪، نالیدیکسیک‌اسید ۵۶/۸٪، استرپتومایسین ۴۶/۹٪، مینوسایکلین ۳۸/۳٪ و سیپروفلوکساسین ۱۶/۱٪ مشاهده شد. مقاومت چند دارویی در ۳۰/۹٪ از این جدایه ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: *اشرشیا کلای* انتروتوکسیژنیک از متداولترین عوامل ایجاد کننده اسهال در کودکان زیر ده سال در این منطقه می باشند و لذا با مدیریت و کنترل بهداشت آب و غذا می توان از بروز چنین بیماری هایی بخصوص در فصول گرم سال جلوگیری کرد. اطلاعات در مورد فراوانی و نوع جدایه‌های غالب در عفونت‌های باکتریایی بخصوص عوامل ایجاد کننده عفونت‌های اسهالی می‌تواند در کنترل و مدیریت صحیح بیماری اسهالی در کودکان زیر ۱۰ سال موثر باشد.

واژگان کلیدی: اسهال، *اشرشیاکلای* مولد اسهال، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR .

۱-کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی.

۲- استاد گروه زیست شناسی.

۳- دانشیار گروه زیست شناسی.

۴- استادیار گروه زیست شناسی.

۱و۲ و۳ -گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴-گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

نویسنده مسئول:

فاطمه عزیزی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۱۶۸۱۱۹۶

Email: azizi_f65@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۴/۲۱ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۹/۸/۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۹/۱۲/۴

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اسهال حاد به عنوان دومین عامل مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال در بین بیماری‌های عفونی به شمار می‌رود (۱). با توجه به شیوع متفاوت بیماری‌ها از نقطه‌ای به نقطه دیگر به دلیل متفاوت بودن شرایط جوی، جغرافیایی، وضعیت اقتصادی، اجتماعی و سایرعوامل، شناخت عوامل عفونت‌زای مولد اسهال برای نظارت اپیدمیولوژیک و در بعضی موارد درمان صحیح بیماران ضروری می‌باشد (۲). سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization)، اسهال را بصورت دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل ۳ مرتبه در یک دوره ۲۴ ساعته تعریف کرده است (۳). در ایران اسهال منجر به ۱۸ میلیون مورد بیماری، ۱۲ میلیون ویزیت پزشکی، ۱ میلیون پذیرش در بیمارستان و ۵۱۶ مورد مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال می‌شود. اسهال حاد پنجمین علت مرگ ناشی از بیماری‌های عفونی است. همچنین ۱۶/۲ درصد از بیماری‌های عفونی در ایران را به خود اختصاص داده است (۴). عوامل اتیولوژیک اسهال شامل طیف وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها می‌باشند. در میان پاتوژن‌های باکتریایی *اشرشیاکلای* مولد اسهال (Diarrheagenic *Escherichia coli*) یکی از مهم‌ترین عوامل اسهال اندمیک و اپیدمیک در سطح جهان است (۵). باکتری گرم منفی *اشرشیاکلای*، متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه*، به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت دستگاه ادراری، دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش و عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد و به میزان زیادی با ظهور و شیوع سویه‌های جدید مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها همراه شده است (۶، ۷). با این وجود که *اشرشیاکلای* به عنوان یک باکتری در میکروفلور روده‌ی بسیاری از جانداران ازجمله انسان یافت می‌شود ولی همه سویه‌های آن بی ضرر نیستند و بعضی از آنها می‌توانند باعث بیماری شوند (۸). سویه‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال براساس ویژگی‌های حدت خاص خود، ارتباط با بعضی سروتایپ‌ها و خصوصیات اپیدمیولوژیکی به ۶ پاتوتایپ اصلی تقسیم می‌شوند: *اشرشیا-کلای* انتروپاتوژنیک (Enteropathogenic *Escherichia coli*)، *اشرشیاکلای* انتروهموراژیک (Enterohemorragic *Escherichia coli*)، *اشرشیا-کلای* انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic *Escherichia coli*)، *اشرشیاکلای* انترواگریگیتیو (Enteroaggregative *Escherichia coli*)، *اشرشیا-کلای* انتروانوزیو (Enteroinvasive *Escherichia coli*) و *اشرشیاکلای* با الگوی چسبندگی منتشر (Diffusely Adherent *Escherichia coli*) (۹). *اشرشیاکلای* انتروهموراژیک که گاهی از آن تحت عنوان *اشرشیاکلای* تولید کننده توکسین شیگا (STEC) و یا *اشرشیاکلای* تولید کننده وروتوکسین (Verotoxigenic *E. coli*) یاد می‌شود به عنوان عامل اسهال خونی، کولیت هموراژیک(Hemorrhagic colitis)، میکروآنژیوپاتی ترومبوتیک یا سندرم اورمیک همولایتیک (Hemolytic Uremic Syndrome) و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (Thrombotic thrombocytopenic purpura)، به ویژه در بین کودکان، شناخته شده است. این عوارض در موارد شدیدتر می‌تواند حتی به مرگ منجر شوند (۱۲). سویه *E. coli* O157:H7 تولید کننده شیگا توکسین یکی از باکتری‌های بیماری‌زای منتقل شونده از طریق مواد غذایی است. مهم‌ترین بیماری‌هایی که به وسیله این باکتری ایجاد می‌شوند شامل: اسهال خفیف، کولیت خونریزی دهنده، پورپورای ترومبوسیتوپنیک، سندرم اورمی همولیتیک و مرگ همراه با بروز ناگهانی در تمام سنین است (۱۳). این باکتری‌ها توکسینی تولید می‌کنند که در شرایط آزمایشگاهی برروی سلول‌های ورو (Vero) موثراست و عمدتا از انسان‌ها و برخی حیوانات نشخوارکننده جدا شده‌اند (۱۴). از خصوصیات اصلی سویه‌های STEC، تولید توکسین‌های شیگای نوع STX1 و STX2 (یا وروتوکسین‌های VT2

www.SID.ir

Archive of SID

VT1,) می‌باشد که مهمترین عامل در بیماری‌زایی شناخته شده‌اند. این توکسین‌ها به ترتیب توسط ژن‌های *stx1* و *stx2* رمزدهی می‌شوند (۱۵). در بین سروتیپ‌های *اشرشیاکلای* تولیدکننده وروتوکسین، سروتیپ *E. coli* O157:H7 شایع‌ترین بوده و در نمونه‌های بالینی نیز شناسایی شده است (۱۷، ۱۶). هدف از این مطالعه تعیین فراوانی و ارزیابی حضورپاتوتایپ‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال، ارزیابی حضور *اشرشیاکلای*‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین و سویه *E. coli* O157:H7 و همچنین ارزیابی مقاومت آنتی-بیوتیکی این جدایه‌ها در بین بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدنی خرم آباد می‌باشد.

روش بررسی

جمع آوری نمونه‌ها

دراین مطالعه از مدفوع ۵۷۸ کودک زیر ۱۰ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدنی خرم‌آباد (دفع سه بار یا بیش‌تر مدفوع آبکی یا شل در ۲۴ ساعت) نمونه‌گیری انجام شد. فرم های رضایت نامه در اختیار والدین قرار گرفت و کلیه موارد به صورت شفاهی و کتبی به اطلاع سرپرستان کودکان رسانده شد. سایر مشخصات بیمار ازجمله سن، جنس، تاریخ مراجعه، علائم بالینی و حالت مدفوع ثبت شد. درادامه نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده درکنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. جهت غنی‌سازی باکتری‌ها از محیط کشت تریپتون سویا براث (Tryptic Soy Broth) استفاده شد. این محیط با ترکیب خاص خود از نظر pH و مواد غذائی امکان رشد برای میکروارگانیسم مورد نظر را فراهم می‌کند (۲۱). برای تایید هویت جدایه‌های *اشرشیاکلای* از تست‌های بیوشیمیایی متداول استفاده شد به این صورت که از محیط تریپتون براث حاوی نوبیوسین برروی محیط CT-SMAC کشت داده شده و پس از انکوبه سازی پرگنه های بی رنگ انتخاب شده برروی نوترینت آگار کشت داده شد . جهت اطمینان از *اشرشیاکلای* بودن باکتری‌ها انتقال برروی محیط‌های MR-VP، TSI و SIM انجام شد و حضور باکتری *E. coli* با اضافه کردن معرف کواکس به لوله حاوی محیط SIM (تست اندول) و معرف‌های MR و VP به محیط مذکور و برای واکنش TSI (H_2S , gas+, A/A) مورد تایید قرار گرفت (۲۱). همچنین برای شناسایی جدایه-های *E. coli* O157:H7 از محیط سوربیتول مک‌کانکی حاوی سفکسیم و تلوریت پتاسیم استفاده شد.کلونی‌های بی-رنگ به عنوان کلنی‌های مشکوک *E. coli* O157:H7 در نظر گرفته شدند . در نهایت نمونه‌های تعیین هویت شده تا انجام سایر مراحل بعدی کار دردمای ۲۰ °C- ذخیره شدند.

شناسایی پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال

جهت تعیین پاتوتایپ جدایه‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال از روش PCR استفاده شد. DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن استخراج شد. برای این کار چند پرگنه از کشت تازه باکتری مشکوک در یک سی سی آب مقطر استریل مخلوط شد و به مدت ده دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان منبع DNA برای مراحل بعدی در فریزر ۲۰ °C- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۲۲). پس از بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده، واکنش PCR با انتخاب پرایمرها (جدول۱) و در حجم ۵۰ میکرولیتر با کمک دستگاه ترموسایکلر (iCycler-BioRad-USA) انجام شد. مقادیر واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل µM ۰/۴ از هر کدام از پرایمرها، بافر، dNTPs با غلظت نهایی mM ۰/۲، $MgCl_2$ با غلظت نهایی mM ۳ و آنزیم *Taq* polymerase به میزان ۲/۵ واحد در واکنش استفاده شد. به هر واکنش ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده اضافه شد و طبق برنامه دمایی داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای ۳۵ سیکل تنظیم شد. شرایط چرخه‌ها به ترتیب یک مرحله در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل درسه بازه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

دمایی ۹۵، ۵۸، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت۱۰دقیقه انجام شد. محصولات PCR برروی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ۸۰ ولت و مدت زمان۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند. در این مطالعه از سویه‌های *اشرشیاکلای* (پاتوگروه های مختلف) شناسایی شده از مطالعات قبلی گروه میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد که به ترتیب شامل EPEC (دارای ژن‌های *eae*A و *bfp*A)، ETEC (دارای ژن‌های *lt* و *st*)، STEC (دارای ژن‌های *stx*1 و *stx*2) و EIEC (دارای ژن *ial*) بود. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در مرحله بعد با استفاده از آنتی‌سرم-های O157 و H7 حضور *E. coli* O157:H7 بررسی شد. به این صورت که مقداری از پرگنه ۲۴-۱۸ ساعته در یک قطره آنتی‌سرم مخلوط شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید، سپس لام به مدت ۶۰ ثانیه به آرامی به صورت دورانی حرکت داده شد، ایجاد آگلوتیناسیون واضح و مشخص در قطره آنتی‌سرم نشان دهنده مثبت بودن واکنش بود (۲۳). دراینجا از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

جهت تعیین حساسیت جدایه‌ها از دیسک دیفیوژن به روش کربی بوئر استفاده شد. از کدورت نیم مک فارلند جدایه‌ها در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و برای بررسی حساسیت جدایه‌ها از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آموکسی‌سیلین (µg ۲۵)، تتراسایکلین (µg۳۰)، کوتریماکسازول (µg ۲۵)، نالیدیکسیک اسید(µg ۱۰)، استرپتومایسین (µg ۳۰)، مینوسایکلین(µg ۱۰) و سیپروفلوکساسین (µg ۳۰) استفاده شد (۲۴). پس از کشت باکتری‌ها دیسک گذاری انجام شد. پس از۱۸ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رشد باکتری ها قطر هاله‌های عدم رشد اندازه گیری شد و بر اساس جدول CLSI مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها ثبت شد (۲۵).

آنالیز آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ بررسی شدند و تحلیل داده‌ها با آزمون مربع کای و آزمون فیشر با درنظر گرفتن مرز معنی داری $P<0.05$ انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای انتخاب شده جهت شناسایی پاتوتایپ جدایه‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال

گروه پاتوژنی	ژن	توالی الیگونوکلئوتیدی ۵′⟶۳′	اندازه محصول	رفرنس
ETEC	*lt*	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT	۴۵۰bp	۲۶
ETEC	*st*	ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	۱۹۰bp	۲۶
EPEC	*bfp*A	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	۳۲۴bp	۲۶
EIEC	*ial*	GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	۶۵۰bp	۲۶
EPEC STEC	*eae*A	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	۳۸۴bp	۲۶
STEC	*stx*1	CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	۱۵۰bp	۲۶
STEC	*stx*2	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	۲۵۵bp	۲۶
STEC	*hlyA*	ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA CTT CAC GTG ACC ATA CAT AT	۱۶۵bp	۲۷

یافته‌ها

خصوصیات جدایه‌ها

از میان ۵۷۸ نمونه جمع آوری شده از کودکان مبتلا به اسهال حاد، با انجام کشت برروی محیط تریپتون براث حاوی نوبیوسین و CT-SMAC به همراه انجام تست‌های بیوشیمیایی ۱۸۶ نمونه از نظر آلودگی به اشرشیاکلای بیماری زا و فلور طبیعی مثبت شناخته شد که در این بین ۸۱ نمونه اشرشیاکلای مولد بیماری زا به روش PCR Multiplex- مثبت شناسایی شد (جدول ۲).

سویه‌های EPEC در دو دسته تیپیک (سویه‌هایی که دارای دو ژن *eaeA* ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی) و *bfpA* (ژن کد کننده پیلی) و آتیپیک (سویه‌هایی که دارای ژن *eaeA* و فاقد ژن *bfpA*) تقسیم می شوند که براساس پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه ژن های *eaeA* در ۲۶ مورد و ژن *bfpA* در ۲ مورد از *اشرشیاکلای*های جداسازی شده یافت شد. بنابراین ۹۲/۳ ٪ از سویه‌های EPEC، آتیپیک و ۷/۷ ٪ از سویه‌های EPEC، تیپیک بودند. از ۵۷۸ نمونه جمع

www.SID.ir

Archive of SID

آوری شده، ۱۸ نمونه متعلق به STEC بود و با توجه به پرایمرهای استفاده شده ۱۵ نمونه مثبت (۸۳/۳ ٪) مربوط به ژن *stx1* ، ۲مورد نمونه مثبت (۱۱/۱ ٪) مربوط به ژن *stx2* و یک مورد (۵/۵ ٪) شامل هر دو ژن *stx1* و *stx2* شناسایی شد. بطور کلی ۳/۱۱ ٪ از کل نمونه‌ها و ۹/۷ درصد از *اشرشیاکلای*های مولد اسهال مربوط به *اشرشیاکلای* تولید کننده توکسین شیگا (STEC) بودند. از طرفی هیچکدام از جدایه‌های STEC دارای ژن‌های *hly*A و *eae*A نبودند. بیشترین فراوانی مربوط به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک بود که ۱۵/۱ درصد از کل نمونه‌های اسهالی را به خود اختصاص داد. پس از آن انتروپاتوژنیک با فراوانی ۱۴ درصد درمیان *اشرشیاکلای* عامل اسهال شناسایی شد. کمترین پاتوتیپ مربوط به پاتوتیپ انتروانویزیو با فراوانی ۵٪ از کل نمونه‌های اسهالی بود. درنتایج آزمون آگلوتیناسیون برروی لام با استفاده از آنتی‌سرم‌های O157 و H7 هیچ حالت آگلوتینه‌ای در بین نمونه‌ها مشاهده نشده است.

با مقایسه توزیع فراوانی *اشرشیاکلای*های عامل اسهال در شرکت‌کنندگان مورد مطالعه به تفکیک ماه‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، درصد فراوانی این پاتوتایپ‌ها در گروه‌های مختلف شرکت‌کننده در مطالعه و براساس آزمون کای اسکوئر و آزمون دقیق فیشر (P<۰/۰۵) این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود (P =۰/۰۰۶). به این معنی که تفاوت معناداری از نظر ابتلا به ۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EPEC، ETEC، STEC و EIEC) در ماه‌های مختلف وجود داشت و با افزایش دما و بخصوص در فصل تابستان میزان نمونه‌های مثبت بیشتر از سایر فصول سال مشاهده شد (جدول۳).

از نظر تفکیک سن باتوجه به جدول ۳ این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود (p=۰/۰۰) و ابتلا به این بیماری در سنین مختلف بر میزان فراوانی ابتلا به ۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EPEC، ETEC، STEC و EIEC) تاثیر داشت. با توجه به درصد فراوانی پاتوتایپ‌ها از نظر تفکیک جنسیت در گروه‌های مختلف شرکت‌کننده در مطالعه این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود (p=۰/۱۹) و تفاوتی بین دو جنس در۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EPEC، ETEC، STEC و EIEC) وجود نداشت. همچنین توزیع فراوانی آلودگی *اشرشیاکلای*های مثبت بر حسب علائم بالینی در کودکان زیر۱۰ سال در جدول۴ آورده شده است.

نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

باتوجه به نتایج حاصل از بررسی الگوی حساسیت و مقاومت به ۷ آنتی‌بیوتیک به کار برده شده در این پژوهش براساس بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی دربین جدایه‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال به ترتیب در آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۷۸٪)، تتراسایکلین (۷۴/۱ ٪)، کوتریماکسازول (۶۴/۲ ٪)، نالیدیکسیک‌اسید (۵۶/۸ ٪)، استرپتومایسین (۴۶/۹ ٪)، مینوسایکلین (۳۸/۳٪) و سیپروفلوکساسین (۱۶/۱ ٪) مشاهده شد، همچنین مقاومت‌های چندداروییی در ۳۰/۹٪ از سویه های جداشده مشاهده شد (جدول ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲ : توزیع فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های *اشرشیاکلای* مثبت (n=۸۱)

پاتوتایپ	ژن ها	تعداد ایزوله ها	(٪) تعداد نمونه های مثبت
EPEC	*eae*A+*bfp*A	۲	۲۶ (۱۴)
	*eae*A	۲۴	
ETEC	*lt*	۱۶	۲۸ (۱۵/۱)
	st	۹	
	lt+*st*	۳	
STEC	*stx*1	۱۵	۱۸(۹/۷)
	*stx*2	۲	
	stx1+stx2	۱	
	hlyA	۰	
	*eae*A	۰	
EIEC	*ial*	۹	۹ (۵)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ : توزیع فراوانی جدایه‌های *اشرشیا کلای* مولد اسهال

بهار فراوانی (٪)	تابستان فراوانی (٪)	پاییز فراوانی (٪)	زمستان فراوانی (٪)	۰ تا ۲ سال فراوانی (٪)	۲ تا ۴ سال فراوانی (٪)	۴ تا ۶ سال فراوانی (٪)	۶تا ۸ سال فراوانی (٪)	۸ تا ۱۰ سال فراوانی (٪)	پسر فراوانی (٪)	دختر فراوانی (٪)
۶(۲۳/۱)	۱۹ (۷۳/۱)	۱ (۴)	۰	۲۳(۸۸/۵)	۳(۱۲)	۰	۰	۰	۱۱(۴۲/۳)	۱۵(۵۷/۷)
۸ (۸/۷)	۱۶(۱۴/۵۷)	۴(۱۴/۳)	۰	۱۵(۵۳/۶)	۴(۱۴/۳)	۵(۱۸)	۳(۱۱)	۱(۴)	۱۷(۶۰/۷)	۱۱(۳۹/۳)
۳(۱۷)	۱۴(۷۸)	۱(۶)	۰	۱۶(۸۹)	۲(۱۲)	۰	۰	۰	۹(۵۰)	۹(۵۰)
۳(۳۳/۳)	۵(۵۶)	۱(۱۲)	۰	۵(۵۶)	۰	۲(۲۳)	۲(۲۳)	۰	۶(۶۶/۷)	۳(۳۳/۳)

EPEC: انتروپاتوژنتیک *اشرشیا کلای*؛ ETEC: انتروتوکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ STEC: شیگا توکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ EIEC: انتروواینویزیو *اشرشیا کلای*

جدول۴ : توزیع فراوانی آلودگی سویه های *اشرشیاکلای* مثبت بر حسب علائم بالینی در کودکان زیر۱۰ سال

علائم بالینی	EPEC تعداد (٪)	ETEC تعداد (٪)	STEC تعداد (٪)	EIEC تعداد (٪)
استفراغ	۱۹ (۷۳)	۱۲ (۴۲/۸)	۳ (۱۶/۶)	۲ (۲۲/۲)
تب	۱۶ (۶۱/۵)	۱۹ (۶۷/۸)	۷ (۳۸/۸)	۷ (۷۷/۸)
اسهال آبکی	۲۲ (۸۴/۶)	۲۸ (۱۰۰)	۱۲ (۶۶/۶)	۶ (۶۶/۶)
اسهال دارای موکوس	۲۱ (۸۰/۸)	۰	۰	۸ (۸۸/۹)
اسهال خونی	۰	۰	۱۰ (۵۵/۵)	۹ (۱۰۰)

EPEC: انتروپاتوژنتیک *اشرشیا کلای*؛ ETEC: انتروتوکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ STEC: شیگا توکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ EIEC: انتروواینویزیو *اشرشیا کلای*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های اشرشیاکلای مولد اسهال

پاتوتایپ	مقاومت آنتی‌بیوتیکی							
	AM (٪) تعداد	TE (٪) تعداد	COT (٪) تعداد	NA (٪) تعداد	S (٪) تعداد	MI (٪) تعداد	CIP (٪) تعداد	MDR (٪) تعداد
EPEC	۲۰ (۷۶/۹)	۲۳ (۸۲/۱)	۱۸ (۶۹/۲)	۱۱ (۴۲/۳)	۷ (۲۶/۹)	۱۰ (۳۸/۵)	۶ (۲۳/۱)	۱۰ (۳۵/۷)
ETEC	۲۶ (۹۳)	۲۵(۸۹/۳)	۱۵ (۵۴)	۱۴ (۵۰)	۶ (۲۱/۴)	۱۵ (۵۴)	۱ (۳/۶)	۸ (۳۰/۸)
STEC	۱۳ (۷۲/۲)	۹ (۵۰)	۱۵ (۳۸/۳)	۱۳ (۷۲/۲)	۱۶ (۸۸/۹)	۳ (۱۶/۷)	۶ (۳۳/۳)	۴ (۲۲/۲)
EIEC	۴ (۴۴/۴)	۳ (۳۳/۳)	۴ (۴۴/۴)	۸ (۸۸/۹)	۹ (۱۰۰)	۳ (۳۳/۳)	۰ (۰)	۳ (۳۳/۳)
جمع	۶۳ (۷۸)	۶۰ (۷۴/۱)	۵۲ (۶۴/۲)	۴۶ (۵۶/۸)	۳۸ (۴۶/۹)	۳۱ (۳۸/۳)	۱۳ (۱۶/۱)	۲۵ (۳۰/۹)

MDR: مقاومت چند دارویی؛ CIP: سیپروفلوکسازین؛ MI: مینوسایکلین؛ S: استرپتومایسین؛ NA: نالدیسیک اسید؛ COT: کوتریماکسازول؛ TE: تتراساکلین؛ AM: آموکسیسیلین؛ EPEC: انتروپاتوژنتیک *اشرشیا کلای*؛ ETEC: انتروتوکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ STEC: شیگا توکسیژنیک *اشرشیا کلای*؛ EIEC: انتروایونیزیو *اشرشیا کلای*

بحث

اسهال یکی از مشکلات اساسی برای سلامت کودکان در ایران و سایر کشورهای درحال توسعه می باشد و اهمیت زیادی در سراسر دنیا دارد و به عنوان دومین عامل مرگ و میر درمیان بیماری های عفونی در کودکان زیر ۵ سال شناخته می شود. در ایران نیز اسهال دومین عامل مرگ و میر بعد از عفونت‌های تنفسی به شمار می‌رود. در میان عوامل بیماری-زای باکتریایی، *اشرشیاکلای* به‌عنوان یکی از باکتری‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. *اشرشیاکلای* مولد اسهال از مهم‌ترین عوامل اسهال‌های اندمیک و اپیدمیک در جهان شناخته شده است (۲۸). این مطالعه که به مدت ۸ ماه در بیمارستان شهید مدنی خرم آباد به منظور تعیین میزان فراوانی و شناسایی پاتوگروه‌های جدایه‌های *اشرشیاکلای* مولد اسهال درکودکان زیر۱۰ انجام شد و به روش PCR-Multiplex ۸۱ نمونه مثبت از بین بیماران مبتلا به اسهال شناخته شد. مطالعات صورت گرفته در ایران از میان جدایه‌های مختلف *اشرشیاکلای* EPEC و ETEC به عنوان شایع‌ترین عوامل اسهال حاد مخصوصا در کودکان به شمار می‌رود (۲۹). بوذری و همکاران (۲۰۱۸) فراوانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی STEC، EHEC و EPEC را در ۱۰۲ نمونه مدفوعی مربوط به بیماران مبتلا به اسهال حاد را مورد سنجش قرار داده و حضور ژن‌های *eae*،*bfp*،*stx1*،*sts2* و *eaf* به وسیله PCR بررسی کردند. در این مطالعه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۷۶/۹ ٪ نسبت به آمپی‌سیلین، و ۷۶/۹ ٪ جنتامایسین گزارش شد. از طرفی در۸۰/۷۷ ٪ ایزوله‌های *اشرشیاکلای* مقاومت چند دارویی MDR دیده شد (۳۰).

در مطالعه حاضر از ۵۷۸ نمونه بررسی شده، ETEC با فراوانی ۱۵/۱ ٪ بالاترین پاتوگروه شایع بود. ETEC در برخی از کشورهای در حال توسعه مانند؛ گابن، اکوادور، تایوان، بنگلادش، عراق و نیجریه به عنوان اصلی‌ترین عامل ایجاد اسهال در کودکان معرفی شده است (۳۱) و یکی از مهم‌ترین عوامل اسهال حاد در بین کودکان زیر ۵ سال می‌باشد (۳۲). عباسی و همکاران (۲۰۱۴) از میان ۸ موردی که به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان ETEC شناسایی کردند ۴ مورد دارای ژن *st*، ۳ مورد دارای ژن *lt* و یک مورد دارای هر دو ژن *st* و *lt* بودند (۳۳). علیزاده و همکاران (۲۰۱۵) در بم، میزان ETEC در افراد مبتلا به اسهال را ۳۳/۵۴٪ گزارش کردند که ۱۸/۷٪ دارای ژن *st*، ۱۰/۳۲ ٪ دارای ژن *lt* و ۴/۵۲٪ دارای هر دو ژن *st* و *lt* بودند (۳۴). انتقال این پاتوتیپ از راه آب و غذای آلوده می‌باشد و با توجه به مشاهده بیشتر آن در سنین زیر دو سال که عمدتا غذای کودک شیر مادر می‌باشد و همچنین فصل تابستان، به نظر می‌رسد علت اصلی ابتلا، آب آلوده بوده و لذا آگاه سازی مادران برای پیشگیری از این موضوع می‌تواند نقش بسزایی در کاهش بیماری داشته باشد. با افزایش سن کودک و تشکیل میکروفلور روده و ایجاد ایمنی به تدریج از میزان ابتلا به این بیماری کاسته شده است. پاتوتایپ بعدی که بیشترین میزان فراوانی را بین پاتوتیپ‌های بررسی شده است، EPEC با فراوانی ۱۴٪ بود که ۹۲/۳٪ این جدایه‌ها حاوی ژن *eaeA* و آتیپیک و ۷/۷٪ جدایه‌ها دارای ژن *bfpA* و تیپیک *بودند*. درزنجان و تهران فراوانی EPEC درکودکان زیر۵ سال مبتلا به اسهال به ترتیب ۱۳/۶ و ۵/۳ ٪ گزارش شده است (۳۵،۳۶). کودکان بخصوص در مرحله نوزادی احتمالا به دلیل عدم تکامل سیستم ایمنی نسبت به این عامل حساس‌تر هستند و با افزایش سن و تشکیل میکروفلور روده از حساسیت نسبت به این عامل کاسته می-شود.

STEC با فراوانی۹/۷٪ سومین پاتوتیپ شایع مشاهده شده بود. ۸۳/۳٪ این جدایه ها دارای ژن *stx1* ، ۱۱/۱ ٪ ژن *stx2* و ۵/۵ ٪ دارای هر دو ژن *stx1* و*stx2* بودند. این پاتوتایپ یکی از عوامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام می‌باشد و در برخی مناطق به عنوان شایع‌ترین پاتوتیپ گزارش شده است. عامل آلودگی به این پاتوتیپ عموما غذاهای با منشاء دامی می‌باشد و به دلیل ایجاد اسهال خونی و مخاطرات ناشی از آن از اهمیت ویژه‌ایی برخوردار است. تشخیص سویه‌های STEC به عنوان پاتوژن روده‌ای به دلیل بروز سندروم‌های خطرناکی مانند اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک بسیار با اهمیت است. در یک تحقیق صورت گرفته در سال ۲۰۰۹ درکانادا جداسازی سویه‌های *اشرشیاکلای* با روش‌های مختلفی از جمله سیتوتوکسیسیتی درکشت سلولی، ایمونواسی و روش PCR جهت دست‌یابی به شاخص‌های تولید شیگاتوکسین برروی ۸۷۶ نمونه مدفوع صورت گرفت و نتایج نشانگر توانایی بالای روش‌های مولکولی جهت تشخیص سویه‌های STEC بوده است (۲۷). بسیاری از مطالعات صورت گرفته در ایران نشان داده است که ازمیان *اشرشیاکلای*‌های مولد اسهال، سویه STEC درمیان کودکان زیر۵ سال بیشترین شیوع بروز اسهال حاد را داشته است(۲۹). یکی از خصوصیات اصلی سویه‌های STEC (EHEC)، تولید توکسین‌های شیگلای نوع یک یا دو و یا هردو (وروتوکسین‌های VT1, VT2) می‌باشد که مهمترین عامل در بیماری‌زایی شناخته شده‌اند. این توکسین‌ها به ترتیب توسط ژن‌های *stx1* و *stx2* رمزدهی می‌شوند (۱۵). در این پژوهش فراوانی سویه‌های STEC در اسهال کودکان ۳/۱ درصد. تمامی این سویه‌ها از کودکان زیر ۵ سال جدا شدند و نشان دهنده رابطه معنی‌دار بین سن و ابتلا به STEC بود و فراوانی آن‌ها در بین کودکان دختر و پسر یکسان بود. مطالعات صورت گرفته در برخی شهرهای ایران از جمله در شیراز (۳۷)، تهران (۳۲)، تبریز (۳۸) میزان STEC را درکودکان زیر ۵ سال به ترتیب ۳۱، ۲۵، ۱۲/۱٪ گزارش شده است که نتایج این مطالعات نشانگر شیوع بالاتر STEC در این مناطق نسبت به منطقه مورد بررسی در مطالعه حاضر دارد. علیزاده و همکاران (۲۰۱۴) در کرمان، میزان STEC در افراد مبتلا به اسهال را ۷/۴۴ ٪ گزارش کردند (۳۹) که نتایج این مطالعات نشان از شیوع پایین‌تر STEC در این مناطق نسبت به منطقه مورد بررسی در مطالعه حاضر دارد. عادلی و همکاران (۲۰۱۳)، ژن‌های *stx1*،*stx2* و *eaeA* را در۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه اشرشیاکلی بررسی کرده که نتایج نشانگر ۲جدایه (۲٪) دارای ژن‌های *stx2* و *eaeA*، یک جدایه (۱٪) دارای ژن *stx1* و هیچ جدایه‌ای با هرسه ژن مشاهده نشد (۴۰). در هیچ یک از نمونه‌های مطالعه حاضر ژن *hly* شناسایی نشد. همچنان مطالعات گسترده‌ای جهت تشخیص و شناسایی سویه‌ها به عنوان اقدامی مهم جهت کاهش عوارض کلینیکی از جمله سندروم اورمی همولیتیک باید صورت گیرد و با مطالعات بیشتر و با بهره‌گیری از روش‌های دقیق مولکولی می‌توان در بالا بردن آگاهی‌ها از شیوع سروتیپ‌های پراهمیت جهت مدیریت بیماری و جلوگیری از بروز سندروم موثر باشد.

EIEC با فراوانی ۵٪ کمترین فراوانی را در میان پاتوتیپ‌های مورد بررسی داشت. تفاوت در گزارش سویه‌های EIEC در مناطق مختلف، حاکی از توزیع جغرافیایی متنوع این جدایه‌ها در زمان‌ها و مکان‌های مختلف می‌باشد. آنچه از نتایج مطالعات در سرتاسر جهان استنتاج می‌شود این است که سویه‌های EIEC در ایجاد اسهال کودکان نقش داشته و لازم است تا در کنار سایر عوامل باکتریایی، تست‌های تشخیصی دقیق برای آنها طراحی و به کار گرفته شود. به طور کلی در مورد علل بیماری‌های اسهالی در بین کشورهای در حال توسعه مخصوصا در بین کودکان می‌توان کمبود دسترسی به امکانات بهداشتی و درمانی، عدم توجه به بهداشت دست‌ها و مواد غذایی، نبود سیستم صحیح تصفیه آب و فاضلاب روستایی و نبود امکانات آموزشی مناسب در این زمینه را نام برد.

در مطالعه مهدوی و همکاران (۲۰۱۸) روی نمونه‌های اسهالی مربوط به کودکان زیر پنج سال در استان خوزستان از ۲۶ درصد از نمونه‌ها *اشرشیاکلای* مولد اسهال جدا شد که بیشترین پاتوتیپ‌ها به ترتیب مربوط به EAEC (۱۶/۸ ٪)، EPEC (۴/۸ ٪)، EIEC (۲/۹ ٪)، ETEC (۲/۹ ٪) و EAEC (LEE مثبت) (۰/۴۸ ٪) بود و STEC در هیچکدام از نمونه‌ها مشاهده نشده بود (۴۱).

درمطالعه حاضر شیوع بالای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مشاهده شده است و مقاومت چندداروییی در ۳۰/۹٪ از سویه های جداشده مشاهده شده است. . در مطالعه‌ای که توسط کلانتر و همکاران (۲۰۱۱) انجام شده است بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین(۸۹/۹٪)، کلرامفنیکل(۸۸/۹٪)، آمپی‌سیلین(۷۹٪) و سفکسیم (۷۵٪) گزارش شد (۴۲). باتوجه به نتایج این مطالعه که نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا درمیان پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلای* است، تاکید بیشتری برشناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (دیسک دیفیوژن) توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داده است که *اشرشیاکلای* از عوامل مهم ابتلاء به اسهال در کودکان زیر۵ سال است. استفاده از روش‌های مولکولی مانند Multiplex-PCR در شناسایی این پاتوتایپ‌ها بسیارکمک کننده است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روش‌های متداول وقت‌گیر و پرهزینه باشد. از طرفی امروزه پاتوتایپ‌های ETEC و EPEC شیوع بالا داشته و از اهمیت بیشتری جهت مبارزه و درمان بیماران برخوردار است و باتوجه به اینکه همچنان مطالعات گسترده‌ای جهت شناسایی و کنترل عوامل اصلی انتقال دهنده بیماری اسهالی ناشی از عفونت‌های روده‌ای درحال انجام است (۴۳) اما شاهد سویه‌های *اشرشیاکلای* در بین بیماران مبتلا به اسهال حاد هستیم و جداسازی سویه‌های STEC و سروتیپ‌های O157:H7 و غیر O157:H7 هم همچنان دربرخی مناطق مثبت گزارش شده است، بنابراین تشخیص و شناسایی سویه‌ها اقدام مهمی جهت کاهش عوارض کلینیکی مخاطره آمیز مانند سندروم اورمی همولیتیک به شمار می‌رود و با مطالعات بیشتر و با بهره‌گیری از روش‌های دقیق مولکولی در مناطق مختلف ایران می‌تواند در بالا بردن آگاهی ما از شیوع

www.SID.ir

Archive of SID

سروتیپ‌های پراهمیت جهت مدیریت بیماری و جلوگیری از بروز سندروم موثر باشد.

قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان نامه فاطمه عزیزی فارغ التحصیل کارشناسی ارشد زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی می‌باشد. بدین وسیله از اساتید و کارکنان دانشکده علوم پایه دانشگاه شهیدچمران اهواز و بیمارستان شهیدمدنی خرم آباد که امکانات لازم جهت انجام این پژوهش را فراهم نمودند، سپاسگزاری می شود.

منابع

1-Bern C, Martinez J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ*. 1992; 70(6):705-14.
2-Yamashiro T, Nakasone N, Higa N, Iwanaga M, Insisiengmay S, Phounane T, et al. Etiological study of diarrhoeal patients in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *J Clin Microbiol*
1998; 36:2195-9.
3-Boschi-Pinto, C., Velebit, L. and Shibuya, K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2008; 86(9):710-717.
4-Kalantar, E., Soheili, F., Salimi, H. and Soltan Dallal, MM. Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. *Jundishapur J Microbiol*. 2011; 4(1): 23-8.
5-Sunabe, T. and Honma, Y. Relathion ship between O_serogroup and presence of pathogenic factor genes in *Esherichia coli*. *Microbiol Immunol*. 1998 ; 42(12): 845-849.
6-Nield, BS., Holmes, AJ., Gillings, MR., Recchia, GD., Mabbutt, BC., Nevalainen, KM, et al. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS MICROBIOL LETT.* 2001 ; 195(1):59-65.
7-Rowe-Magnus, DA., Guerout, AM., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J. and Mazel, D. The evolutionary history of chromosomalsuper-integrons provides an ancestry for multiresistance integrons. *P NATL ACAD SCI USA*. 2001 ; 98(2):652-657.
8-Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. and Dozois, CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 ; 62: 1-10.
9-Bueris, V., Sircili, MP., Taddei, CR., doc Santos, MF., Franzolin, MR., Martinez, MB., et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *MEM I OSWALDO CRUZ*. 2007 ; 102(7):839-844.
10-Prère, MF., Bacrie, SC., Baron, O. and Fayet, O. Bacterial etiology of diarrhea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. *Pathol Biol (Paris)*. 2006 ; 54(10): 600-602.
11-Unsworth, KE., Mazurkiewicz, P., Senf, F., Zettl, M., McNiven, M., Way, M. et al. Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Microbiol*. 2007 ;9(2):438-449.
12-Christian WO, Bertil K. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *SCAND J INFECT DIS*. 2005; 37: 405-16.
13-Li, F., Zhao, C., Zhang, W., Cui, S., Meng, J., Wu, J. et al. Use of Ramification Amplification Assay for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Other *Escherichia coli* Shiga Toxin- Producing Strains. *J CLIN MICROBIOL*. 2005 ;43(12):6086 -6090.
14-Mainil J.G. Daube G. Verotoxigenic Escherichia coli from animals, humans and foods: who's who?, *J APPL MICROBIOL* . 2005; 98(6): 1332-1344.
15-Nataro, JP. and kaper, JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *CLIN MICROBIOL REV*. 1998 ;11(1):142-201.
16-Hosseini-Mazinani, SM., Eftekhar, F., Milani, M. and Ghandili S. Characterization of betalactamases from urinary isolates of *Escherichia coli* in Tehran. *Iranian Biomedical Journal*. 2007;11(2): 95-99.
17-Arbeloa, A., Oates, CV., Marches, O., Hartland, EL. and Frankel G. The enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 2010;79(3): 1067-76.

www.SID.ir

Archive of SID

18-Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., López, C., Justel, P. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin) producing Escherichia coli isolates from minced beef in Lugo(Spain) from1995 through 2003. *BMC Microbiol*. 2007;7(13): 1-9.

19.Aslani MM,Zavari A,Alikhani MY. The role of typical Enteroaggregative Escherichia (tEAEC) strains in diarrhea among children. *SJKU*. 2011 ;39-47.

20-Hamzavi H, Azaran A, Makvandi M. Evaluation of the prevalence of *Rotavirus* in children under 5 years with acute diarrhea in Ahvaz, 2014. *Iran J Med Microbiol*. 2017 ; 10 (6): 52-59.

21-COOK .G.C. Diagnostic procedures in the investigation of infectious diarrhea. *Bailliere Clin Gastroenterol* .1993 ; 7(2):421-449.

22-Ausubel, FM., Brent, R., Kingstone, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA. et al. Short protocols in molecular biology. Second edition. *TRENDS BIOTECHNOL*. 1999 : 1-15.

23-Hamzavi H, Azaran A, Makvandi M, Karami S, Roayaei Ardakani M, Mozaffari Nejad A.S .Performance of Latex agglutination, ELISA and RT-PCR for diagnosis of Rotavirus infection .*Journal of Biological Research*. 2017; 90(6522):92-95.

24-*Bayat M, Haghi F, Zeighami H.* Antimicrobial resistance of Enteropathogenic Escherichia coli isolated from diarrheal children in Zanjan during 2012-13. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences.* 2014;21(1):61-68.

25-Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, Keramat F, Aghazadeh H, Alikhani MY, et al. Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 ;37:443-454.

26-Lopez-Saucedo, C., Cerna JF., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazque FR., Torres, J., Tarr, PI, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *EMERG INFECT DIS.* 2003 ; 9(1): 127-131.

27-Kargar M , Homayoun M. Prevalence of shiga toxins (stx1, stx2), eaeA and hly genes of Escherichia coli O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pac J Trop Med*.2015;8(1):24-8.

28-Sarshar M,Tavvafi H,Ghorbani-Dalini, Souod N. Antibiotical resistance and prevalence gene resistance to tetracyclin in Esheriahia coli causing diarrhea in children. *IJIDTM Journal*. 2012;17(57):13-18.

29-Alikhani MY, Mirsalehian A, Fatollahzadeh B, Pourshafie MR, Aslani MM. Prevalence of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children with and without diarrhoea in Iran. *J Health Popul Nutr.* 2007; 25:88-93.

30-Bouzari S , Farhang E , Hosseini S.M, Alikhani M.Y. Prevalence and antimicrobial resistance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea. *Iran J Microbiol*; 2018; 10 (3) :151-157.

31-Kargar M,Abbasi P, Doosti A,Ghorbani- Dalini S. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in children under 2 years of age by real-time PCR in shiraz. 2013; SJKU;18(3):29-38.

32-Kashefiyeh M, Zeighami H, Haghi F. Frequency of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates Harboring *eltB* and *eltA* Genes in Diarrheal Specimens among Children Younger than 5 Years in Tabriz Hospitals. *Journal of Zanjan University Medical Sciences*; 2013; 21(88):120-127.

33-Abbasi, P. and kargar, M. Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of *LT, STIa* and *STIb* Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Enteric Pathog*. 2014; 2(1): e16431.

34-Alizade, H., Ghanbarpour, R., Aflatoonian, M.R. and Sobhanipour, M.H. Determination of phylogenetic groups and antibiotic resistance pattern of Enterotoxigenic *Escherishia coli* isolates diarrheoic cases in Bam City by PCR. *Iran J Med Microbiol*. 2015; 9(1):6-13.

35-Asadi Karam, MR., Bouzari, S., Oloomi, M., Aslani, MM. and Jafari, A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains in Tehran,Iran. *Iran J Microbiol*. 2010; 2(1):3-7.

36-Gilmour MW, Chui L, Chiu T, Tracz DM, Hagedorn K, Tschetter L, et al. Isolation and detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in clinical stool samples using conventional and molecular methods. *J Med Microbiol* .2009; 58(Pt 7): 905–11.

37-Abbasi, P., Kargar, M., Doosti, A., Mardaneh, J., Ghorbani-Dalini, S. and Dehyadegari, MA. Characterization of Shiga-toxin producing *E.coli* (STEC) and enteropathogenic *E.coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for *stx1, stx2,eaeA*. *Iran J Microbiol*. 2014; 6(3):169-174.

38-Zeighami, H., Haghi, F., Hajiahmadi, F., Kashefiyeh, M. and Memariani, M. Multi-drug-resistant enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *J Chemother*. 2014; 27(3):152-155.

www.SID.ir

Archive of SID

39-Alizade, H., Ghanbarpour, R. and Nekoubin, M. Phylogenetic of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and a typical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Human and Cattle in Kerman,Iran. *Int J Enteric Pathog*. 2014; 2(1):e15195.

40-Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, Shakib P. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran. *Feyz.* 2013; 17(2): 188-94.

41-Mahdavi Borujerdi S, Roayaei Ardakani M, Rezatofighi S.E. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in children, Khouzestan, Iran. *J Infect Dev Ctries.* 2018; 12(8):649-656.

42-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. *Jundishapur Journal of Microbiology* . 2011; 4(1): 23-28.

43-Matthew J. Moriarty, Kenneth Semmen, Gary K. Bissonnette, Jacek Jaczynski. Internalization assessment of *E. coli O157:H7* in hydroponically grown Lettuce. *LWT-FOOD SCI TECHNOL***.** 2019; 100: 183–188.

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of Pathotypes and Antibiotic Resistance Patterns of Diarrheagenic *Escherichia Coli* Strains Isolated from Children with Diarrhea in Khorram Abaad, Iran

Fatemeh Azizi [1*], Mohammad Roayaei Ardakani [2], Seyedeh Elham Rezatofighi [3], Ehsan Rashidian [4]

1-Master's Degree Graduate.
2-Professor of Biology.
3-Associate Professor of Biology.
4-Assistant Professor of Pathobiology.

1,2,3-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Iran.

**Corresponding author:*
Fatemeh Azizi; Master's degree graduate, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz
Tel:+989121681196
Email: azizi_f65@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: *Escherichia coli* pathogenic strains are considered as the main cause of intestinal and extra-intestinal diseases. This study aimed to identify and evaluate the dominant pathotypes of diarrheagenic *E. coli* isolates among children sufering from diarrhea in Khoram Abad city, Iran.

Subjects and Methods: In this current study, 578 diarrhea samples of the children less than 10 years old were collected in Khoram Abbad city. After culture and isolation, the pathogenic groups of diarrheagenic *E. coli* (DEC) isolates including four pathotypes of *Enterotoxigenic E. coli*, *Enteropathogenic E. coli*, *Enteroinvasive E. coli*, and *Shiga toxigenic E. coli* were investigated by PCR. Disk diffusion method (Kirby Bauer) was used for detection of antimicrobial sensitivity of the isolates.

Results: Out of 578 stool samples collected 81 isolates were DEC. The frequencies of the isolates were respectively: *Enterotoxigenic E. coli* (15.1%), *enteropathogenic E. coli (14%), Enteroinvasive E. coli* (5%), and *Shiga toxigenic E. coli* (9.7%). The highest antibiotic resistance levels were respectively reported to: amoxicilin (78%), tetracycline (74.1%), co-trimoxazole (64.2%), nalidixic acid (56.8%), streptomycin (46.9%), minocycline (38.3%), and ciprofloxacin (16.1%). Multiple drug resistance was found in 30.9% of the isolates.

Conclusion: Enterotoxigenic *E. coli* is one of the most common diarrheagenic agent affecting the children less than 10 years old in this region. Therefore, such diseases are preventable by controlling water and food hygiene especially in warm seasons.

Keywords: Diarrhea; Diarrheagenic *Escherichia coli*; Antibiotic resistance; PCR.

►*Please cite this paper as:*
Azizi F, Roayaei Ardakani M, Rezatofighi SE, Rashidian E. Determination of Pathotypes and Antibiotic Resistance Patterns of Diarrheagenic Escherichia Coli Strains Isolated from Children with Diarrhea in Khorram Abaad; Lorestan; Iran. Jundishapur Sci Med J 2021; 20(1):31-43

Received: July 11, 2020 **Revised: Oct 23, 2020** **Accepted: Feb 22, 2020**

www.SID.ir