

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

فاطمه عزیزی<sup>۱\*</sup>، محمد رعایایی اردکانی<sup>۲</sup>، سیده الهام رضا توفیقی<sup>۳</sup>، احسان رشیدیان<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سویه‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلا*ی به عنوان عوامل اصلی بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای به شمار می‌روند. این مطالعه با هدف شناسایی و ارزیابی پاتوتایپ غالب جدایه‌های *اشرشیاکلا*ی‌های 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 *اشرشیاکلا*ی-های مولد اسهال، ۴ پاتوتایپ *اشرشیاکلا*ی انتروتوکسیژنیک، *اشرشیاکلا*ی انتروپاتوژنیک، *اشرشیاکلا*ی انترواینویزیو، *اشرشیاکلا*ی شیگا توکسیژنیک به روش PCR بررسی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به روش دیسک دیفیوژن (کربی بوئر) بررسی شد.

**یافته‌ها:** از ۵۷۸ نمونه مدفوع جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال، ۸۱ جدایه *اشرشیاکلا*ی مولد اسهال تشخیص داده شد، که از این میان به ترتیب فراوانی *اشرشیاکلا*ی انتروتوکسیژنیک ۱/۱۵٪، انتروپاتوژنیک ۱۴٪، شیگا توکسیژنیک ۹/۷٪ و انترواینویزیو ۵٪ از کل نمونه‌ها بود. بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب در آنتی بیوتیک‌های آموکسی-سیلین ۷۸٪، تتراسایکلین ۷۴/۱٪، کوتریماسازول ۶۴/۲٪، نالیدیکسیک اسید ۵۶/۸٪، استرپتومایسین ۴۶/۹٪، مینوسایکلین ۳۸/۳٪ و سیپروفلوکساسین ۱۶/۱٪ مشاهده شد. مقاومت چند دارویی در ۳۰/۹٪ از این جدایه‌ها مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** *اشرشیاکلا*ی 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 بیماری‌هایی 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، *اشرشیاکلا*ی 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.

۱ و ۲ و ۳- 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



## 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 سایر عوامل، 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 اشرشیاکلاهی مولد اسهال (*Diarrheagenic Escherichia coli*) یکی از مهم‌ترین عوامل اسهال اندمیک و اپیدمیک در سطح جهان است (۵). باکتری گرم منفی اشرشیاکلاهی، متعلق به خانواده اتروباکتریاسه، 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 اشرشیاکلاهی به عنوان یک باکتری در میکروفلور روده‌ی بسیاری از جانداران از جمله انسان یافت می‌شود ولی همه سویه‌های آن بی‌ضرر نیستند و بعضی از آنها می‌توانند باعث بیماری شوند (۸). سویه‌های اشرشیاکلاهی مولد اسهال براساس ویژگی‌های حدت خاص خود، ارتباط با بعضی سروتایپ‌ها و خصوصیات

اپیدمیولوژیکی به ۶ پاتوتایپ اصلی تقسیم می‌شوند: اشرشیا-کلاهی انتروپاتوژنیک (*Enteropathogenic Escherichia coli*)، اشرشیاکلاهی انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)، اشرشیا-کلاهی انتروتوکسیژنیک (*Enterotoxigenic Escherichia coli*)، اشرشیاکلاهی انترواگریگتیو (*Enterotoxigenic Escherichia coli*)، اشرشیا-کلاهی انترواینویزیو (*Enteroinvasive Escherichia coli*) و اشرشیاکلاهی با الگوی چسبندگی منتشر (*Diffusely Adherent Escherichia coli*) (۹). اشرشیاکلاهی انتروهموراژیک که گاهی از آن تحت عنوان اشرشیاکلاهی تولیدکننده توکسین شیگا (STEC) و یا اشرشیاکلاهی تولیدکننده وروتوکسین (*Verotoxigenic Escherichia coli*) یاد می‌شود به عنوان عامل اسهال خونی، کولیت هموراژیک (*Hemorrhagic colitis*)، میکروآنژیوپاتی ترومبوتیک یا سندرم اورمیک همولیتیک (*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 تولیدکننده 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 بر روی سلول‌های ورو (*Vero*) موثر است و عمدتاً از انسان‌ها و برخی حیوانات نشخوارکننده جدا شده‌اند (۱۴). از خصوصیات اصلی سویه‌های STEC، تولید توکسین‌های شیگای نوع STX1 و STX2 (یا وروتوکسین‌های VT2

جهت اطمینان از *اشرشیاکلاهی* بودن باکتری‌ها انتقال بر روی محیط‌های *MR-VP*، *TSI* و *SIM* انجام شد و حضور باکتری *E. coli* با اضافه کردن معرف کوکس به لوله حاوی محیط *SIM* (تست اندول) و معرف‌های *MR* و *VP* به محیط مذکور و برای واکنش *TSI* (*H<sub>2</sub>S*, *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  $20^{\circ}\text{C}$  - ذخیره شدند.

#### شناسایی پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلاهی* مولد اسهال

جهت تعیین پاتوتایپ جدایه‌های *اشرشیاکلاهی* 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  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس در دور  $13000\text{ rpm}$  سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان منبع *DNA* برای مراحل بعدی در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۲۲). پس از بررسی کیفیت *DNA*‌های استخراج شده، واکنش *PCR* با انتخاب پرایمرها (جدول ۱) و در حجم  $50\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر با کمک دستگاه ترموسایکلر (*iCycler-BioRad-USA*) انجام شد. مقادیر واکنش در حجم  $50\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر شامل  $0.4\text{ }\mu\text{M}$  از هر کدام از پرایمرها، بافر، *dNTPs* با غلظت نهایی  $0.2\text{ mM}$ ،  $3\text{ mM}$  *MgCl<sub>2</sub>* و آنزیم *Taq polymerase* به میزان  $2/5$  واحد در واکنش استفاده شد. به هر واکنش  $4\text{ }\mu\text{g}$  میکرولیتر *DNA* استخراج شده اضافه شد و طبق برنامه دمایی داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای  $35$  سیکل تنظیم شد. شرایط چرخه‌ها به ترتیب یک مرحله در  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $3$  دقیقه،  $35$  سیکل درسه بازه‌ی

می‌باشد که مهمترین عامل در بیماری‌زایی شناخته شده‌اند. این توکسین‌ها به ترتیب توسط ژن‌های *stx1* و *stx2* رمزدهی می‌شوند (۱۵). در بین سروتیپ‌های *اشرشیاکلاهی* تولیدکننده وروتوکسین، سروتیپ *E. coli* O157:H7 شایع‌ترین بوده و در نمونه‌های بالینی نیز شناسایی شده است (۱۶، ۱۷). هدف از این مطالعه تعیین فراوانی و ارزیابی حضور پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلاهی* مولد اسهال، ارزیابی حضور *اشرشیاکلاهی*‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین و سوبه *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

در این مطالعه از مدفوع  $578$  کودک زیر  $10$  سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدنی خرم‌آباد (دفع سه بار یا بیش‌تر مدفوع آبکی یا شل در  $24$  ساعت) نمونه‌گیری انجام شد. فرم‌های رضایت‌نامه در اختیار والدین قرار گرفت و کلیه موارد به صورت شفاهی و کتبی به اطلاع سرپرستان کودکان رسانده شد. سایر مشخصات بیمار از جمله سن، جنس، تاریخ مراجعه، علائم بالینی و حالت مدفوع ثبت شد. در ادامه نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. جهت غنی‌سازی باکتری‌ها از محیط کشت تریپتون سویا برات (*Tryptic Soy Broth*) استفاده شد. این محیط با ترکیب خاص خود از نظر *pH* و مواد غذایی امکان رشد برای میکروارگانیسم مورد نظر را فراهم می‌کند (۲۱). برای تایید هویت جدایه‌های *اشرشیاکلاهی* از تست‌های بیوشیمیایی متداول استفاده شد به این صورت که از محیط تریپتون برات حاوی نوویوسین بر روی محیط *CT-SMAC* کشت داده شده و پس از انکوبه سازی پرگنه‌های بی رنگ انتخاب شده بر روی نوترینت آگار کشت داده شد.

### بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها

جهت تعیین حساسیت جدایه‌ها از دیسک دیفیوژن به روش کربی بوئر استفاده شد. از کدورت نیم مک فارلند جدایه‌ها در محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد و برای بررسی حساسیت جدایه‌ها از دیسک‌های آنتی بیوتیکی آموکسی سیلین ( $25 \mu\text{g}$ )، تتراسایکلین ( $30 \mu\text{g}$ )، کوتریماکسازول ( $25 \mu\text{g}$ )، نالیدیکسیک اسید ( $10 \mu\text{g}$ )، استرپتومایسین ( $30 \mu\text{g}$ )، مینوسایکلین ( $10 \mu\text{g}$ ) و سیپروفلوکساسین ( $30 \mu\text{g}$ ) استفاده شد (۲۴). پس از کشت باکتری‌ها دیسک گذاری انجام شد. پس از ۱۸ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رشد باکتری‌ها قطر هاله‌های عدم رشد اندازه گیری شد و بر اساس جدول CLSI مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی 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 در نظر گرفتن مرز معنی داری  $P < 0.05$  انجام شد.

دمایی ۹۵، ۵۸، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۸۰ ولت و مدت زمان ۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند. در این مطالعه از سویه‌های اشرشیاکلاهی (پاتوگروه‌های 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 *eaeA* و *bfpA*)، ETEC (دارای ژن‌های *stx1* و *stx2*)، EIEC (دارای ژن *ial*) بود. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در مرحله بعد با استفاده از آنتی‌سرم‌های 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). در اینجا از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

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

| گروه پاتوزنی | ژن          | توالی الیگونوکلئوتیدی  | اندازه محصول | رفرنس |
|--------------|-------------|--|--------------|-------|
|              |             | ۵' → ۳'  |              |       |
| ETEC         | <i>lt</i>   | GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC<br>CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT     | ۴۵۰bp        | ۲۶    |
| ETEC         | <i>st</i>   | ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T<br>CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT  | ۱۹۰bp        | ۲۶    |
| EPEC         | <i>bfpA</i> | AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC<br>GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA   | ۳۲۴bp        | ۲۶    |
| EIEC         | <i>ial</i>  | GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA<br>GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC    | ۶۵۰bp        | ۲۶    |
| EPEC<br>STEC | <i>eaeA</i> | GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC<br>CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG     | ۳۸۴bp        | ۲۶    |
| STEC         | <i>stx1</i> | CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G<br>AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC | ۱۵۰bp        | ۲۶    |
| STEC         | <i>stx2</i> | GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC<br>TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G | ۲۵۵bp        | ۲۶    |
| STEC         | <i>hlyA</i> | ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA<br>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 بر روی محیط تریپتون براث حاوی نوویوسین و CT-SMAC به همراه انجام تست‌های بیوشیمیایی ۱۸۶ نمونه از نظر آلودگی به *اشرشیاکلاهی* بیماری‌زا و فلور طبیعی مثبت شناخته شد که در این بین ۸۱ نمونه *اشرشیاکلاهی* مولد بیماری‌زا 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 می‌شوند که براساس پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه ژن‌های *eaeA* در ۲۶ مورد و ژن *bfpA* در ۲ مورد از *اشرشیاکلاهی*‌های جداسازی شده یافت شد. بنابراین ۹۲/۳٪ از سویه‌های EPEC، آتیپیک و ۷/۷٪ از سویه‌های EPEC، تیپیک بودند. از ۵۷۸ نمونه جمع

داشت و با افزایش دما و بخصوص در فصل تابستان میزان نمونه‌های مثبت بیشتر از سایر فصول سال مشاهده شد (جدول ۳).

از نظر تفکیک سن با توجه به جدول ۳ این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود ( $p=0/00$ ) و ابتلا به این بیماری در سنین مختلف بر میزان فراوانی ابتلا به ۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EIEC, ETEC, EPEC, STEC) 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 ( $p=0/19$ ) و تفاوتی بین دو جنس در ۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EIEC, ETEC, EPEC, STEC) وجود نداشت. همچنین توزیع فراوانی آلودگی اشرشیاکلاهی‌های مثبت بر حسب علائم بالینی در کودکان زیر ۱۰ سال در جدول ۴ آورده شده است.

#### نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

با توجه به نتایج حاصل از بررسی الگوی حساسیت و مقاومت به ۷ آنتی‌بیوتیک به کار برده شده در این پژوهش براساس بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌های اشرشیاکلاهی 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 چنددارویی در ۳۰/۹٪ از سوبه‌های جدا شده مشاهده شد (جدول ۵).

آوری شده، ۱۸ نمونه متعلق به STEC بود و با توجه به پرایمرهای استفاده شده ۱۵ نمونه مثبت (۸۳/۳٪) مربوط به ژن *stx1*، ۲ مورد 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 اشرشیاکلاهی‌های مولد اسهال مربوط به اشرشیاکلاهی تولید کننده توکسین شیگا (STEC) بودند. از طرفی هیچکدام از جدایه‌های STEC دارای ژن‌های *hlyA* و *eaeA* نبودند. بیشترین فراوانی مربوط به پاتوتیپ انتروتوکسیژنیک بود که ۱۵/۱ درصد از کل نمونه‌های اسهالی را به خود اختصاص داد. پس از آن انتروتوتوکسیژنیک با فراوانی ۱۴ درصد در میان اشرشیاکلاهی‌های عامل اسهال شناسایی شد. کمترین پاتوتیپ مربوط به پاتوتیپ انترواینویزیو با فراوانی ۵٪ از کل نمونه‌های اسهالی بود. در نتایج آزمون آگلوتیناسیون بر روی لام با استفاده از آنتی‌سرم‌های O157 و H7 هیچ حالت آگلوتینه‌ای در بین نمونه‌ها مشاهده نشده است.

با مقایسه توزیع فراوانی اشرشیاکلاهی‌های 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 اسکور و آزمون دقیق فیشر ( $P<0/05$ ) این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود ( $P=0/006$ ). به این معنی که تفاوت معناداری از نظر ابتلا به ۴ پاتوتایپ مورد بررسی (EIEC, ETEC, STEC) در ماه‌های مختلف وجود

جدول ۲: توزیع فراوانی جدایه‌ها در نمونه‌های اشرشیاکلاهی مثبت (n=۸۱)

| تعداد نمونه‌های مثبت (%) | تعداد ایزوله‌ها | ژن‌ها            | پاتوتایپ |
|--------------------------|-----------------|------------------|----------|
|                          | ۲               | <i>eaeA+bfpA</i> | EPEC     |
| ۲۶ (۱۴)                  | ۲۴              | <i>eaeA</i>      |          |
|                          | ۱۶              | <i>lt</i>        | ETEC     |
|                          | ۹               | <i>st</i>        |          |
| ۲۸ (۱۵/۱)                | ۳               | <i>lt+st</i>     |          |
|                          | ۱۵              | <i>stx1</i>      | STEC     |
|                          | ۲               | <i>stx2</i>      |          |
| ۱۸ (۹/۷)                 | ۱               | <i>stx1+stx2</i> |          |
|                          | ۰               | <i>hlyA</i>      |          |
|                          | ۰               | <i>eaeA</i>      |          |
| ۹ (۵)                    | ۹               | <i>ial</i>       | EIEC     |



جدول ۳: توزیع فراوانی جدایه های اشرشیا کلاهی مولد اسهال

| بهار<br>فراوانی (%) | تابستان<br>فراوانی (%) | پاییز<br>فراوانی (%) | زمستان<br>فراوانی (%) | ۰ تا ۲ سال<br>فراوانی (%) | ۲ تا ۴ سال<br>فراوانی (%) | ۴ تا ۶ سال<br>فراوانی (%) | ۶ تا ۸ سال<br>فراوانی (%) | ۸ تا ۱۰ سال<br>فراوانی (%) | پسر<br>فراوانی (%) | دختر<br>فراوانی (%) |
|---------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| ۶(۲۳/۱)             | ۱۹ (۷۳/۱)              | ۱ (۴)                | ۰                     | ۲۳(۸۱/۵)                  | 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 کلاهی؛ ETEC: انترو توکسیژنیک/اشرشیا کلاهی؛ STEC: شیگا توکسیژنیک/اشرشیا کلاهی؛ EIEC: انترواینویزیو/اشرشیا کلاهی

جدول ۴: توزیع فراوانی آلودگی سویه های اشرشیا کلاهی مثبت بر حسب علائم بالینی در کودکان زیر ۱۰ سال

| علائم بالینی      | EPEC<br>تعداد (%) | ETEC<br>تعداد (%) | STEC<br>تعداد (%) | EIEC<br>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 کلاهی؛ ETEC: انترو توکسیژنیک/اشرشیا کلاهی؛ STEC: شیگا توکسیژنیک/اشرشیا کلاهی؛ EIEC: انترواینویزیو/اشرشیا کلاهی

جدول ۵: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های اشرشیاکلای مولد اسهال

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

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

## بحث

شایع‌ترین عوامل اسهال حاد مخصوصاً 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 *stx1*، *stx2* و *eae* به وسیله PCR بررسی کردند. در این مطالعه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۷۶/۹٪ نسبت به آمپی‌سیلین، و ۷۶/۹٪ جنتامایسین گزارش شد. از طرفی در ۸۰/۷۷٪ 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

اسهال یکی از مشکلات اساسی برای سلامت کودکان در ایران و سایر کشورهای در حال توسعه می‌باشد و اهمیت زیادی در سراسر دنیا دارد و به عنوان دومین عامل مرگ و میر در میان بیماری‌های عفونی در کودکان زیر ۵ سال شناخته می‌شود. در ایران نیز اسهال دومین عامل مرگ و میر بعد از عفونت‌های تنفسی به شمار می‌رود. در میان عوامل بیماری‌زای 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 خرم‌آباد به منظور تعیین میزان فراوانی و شناسایی پاتوگروه‌های جدایه‌های اشرشیاکلای مولد اسهال در کودکان زیر ۱۰ 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 به‌عنوان

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 سیتوتوکسیستی درکشت سلولی، ایمونواسی و روش PCR جهت دستیابی به شاخص‌های تولید شینگاتوکسین بر روی 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 از میان اشرشیاکلای‌های مولد اسهال، سویه STEC در میان کودکان زیر ۵ سال بیشترین شیوع بروز اسهال حاد را داشته است (۲۹). یکی از خصوصیات اصلی سویه‌های STEC (EHEC)، تولید توکسین‌های شینگلای 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 در کودکان 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. عزیزاده 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 در ۱۰۰

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). عزیزاده 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 عمدتاً 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 آتیبیک و ۷/۷٪ جدایه‌ها دارای ژن *bfpA* و تیبیک بودند. درزنجان و تهران فراوانی EPEC در کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال به ترتیب ۱۳/۶ و ۵/۳٪ گزارش شده است (۳۵، ۳۶). کودکان بخصوص در مرحله نوزادی احتمالاً 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 می‌شود.

STEC با فراوانی ۹/۷٪ سومین پاتوتیپ شایع مشاهده شده بود. ۸۳/۳٪ این جدایه‌ها 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 عموماً غذاهای با منشأ دامی می‌باشد و به دلیل ایجاد اسهال خونی و مخاطرات ناشی از آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در مطالعه حاضر شیوع بالای مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های مورد مطالعه مشاهده شده است و مقاومت چنددارویی در ۳۰/۹٪ از سویه‌های جدا شده مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که توسط کلانتر و همکاران (۲۰۱۱) انجام شده است بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی-بیوتیک‌های تتراسایکلین (۸۹/۹٪)، کلرامفنیکل (۸۸/۹٪)، آمپسیلین (۷۹٪) و سفکسیم (۷۵٪) گزارش شد (۴۲). باتوجه به نتایج این مطالعه که نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در میان پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلاهی* است، تاکید بیشتری بر شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (دیسک دیفیوژن) توصیه می‌شود.

### نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داده است که *اشرشیاکلاهی* از عوامل مهم ابتلاء به اسهال در کودکان زیر ۵ سال است. استفاده از روش‌های مولکولی مانند Multiplex-PCR در شناسایی این پاتوتایپ‌ها بسیار کمک کننده است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روش‌های متداول وقت‌گیر و پرهزینه باشد. از طرفی امروزه پاتوتایپ‌های *EPEC* و *EPEC* شیوع بالا داشته و از اهمیت بیشتری جهت مبارزه و درمان بیماران برخوردار است و باتوجه به اینکه همچنان مطالعات گسترده-ای جهت شناسایی و کنترل عوامل اصلی انتقال دهنده بیماری اسهالی ناشی از عفونت‌های روده‌ای در حال انجام است (۴۳) اما شاهد سویه‌های *اشرشیاکلاهی* در بین بیماران مبتلا به اسهال حاد هستیم و جداسازی سویه‌های *STEC* و سروتایپ‌های *O157:H7* و غیر *O157:H7* هم همچنان در برخی مناطق مثبت گزارش شده است، بنابراین تشخیص و شناسایی سویه-ها 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

جدایه *اشرشیاکلاهی* بررسی کرده که نتایج نشانگر ۲ جدایه (۲٪) دارای ژن‌های *stx2* و *eaeA*، یک جدایه (۱٪) دارای ژن *stx1* و هیچ جدایه‌ای با هر سه 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 سروتایپ‌های پراهمیت جهت مدیریت بیماری و جلوگیری از بروز سندروم موثر باشد.

*EIEC* با فراوانی ۵٪ کمترین فراوانی را در میان پاتوتایپ‌های مورد بررسی داشت. تفاوت در گزارش سویه-های *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 مخصوصاً 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 *اشرشیاکلاهی* مولد اسهال جدا شد که بیشترین پاتوتایپ‌ها 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).

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

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 می‌شود.

## قدردانی

## 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. Relationship between O\_serogroup and presence of pathogenic factor genes in *Escherichia 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 chromosomal super-integrations 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., Eftekhari, 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.

- 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) from 1995 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. Antibiotic resistance and prevalence gene resistance to tetracyclin in *Escherichia 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-Bouzzari 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-Kashefieh 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 *Escherichia coli* isolates diarrheic 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., Kashefieh, M. and Memariani, M. Multi-drug-resistant enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *J Chemother.* 2014; 27(3):152-155.

- 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, Rezatofghi S.E. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in children, Khouzesan, 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.

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

Fatemeh Azizi <sup>1\*</sup>, Mohammad Roayaei Ardakani <sup>2</sup>, Seyedeh Elham Rezatofighi <sup>3</sup>, Ehsan Rashidian <sup>4</sup>

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 suffering 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 Abad 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: amoxicillin (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