شناسایی مولکولی پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC) با تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در کودکان زیر ۵ سال شهر تهران و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

* **محمد مهدی سلطان دلال**: استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، بخش میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران (*نویسنده مسئول). msoltandallal@gmail.com

ابوالفضل اکبری: دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. Soltanirad34@yahoo.com

محمد حسن شیرازی: استاد، بخش میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران. mhshirazi@tums.ac.ir

محمد کاظم شریفی یزدی: استاد مرکز تحقیقات بیماری های مشترک انسان و دام (زئونوز) و گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mksharifiyazdi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: باکتری اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC; Enteropathigenic *E.coli*) از خانواده انتروباکتریاسه و به‌عنوان یک عامل مهم گاستروانتریت و اسهال به‌ویژه در کودکان کشورهای در حال توسعه و نیز توسعه نیافته می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی شیوع پاتوتایپ EPEC عامل اسهال در کودکان زیر ۵ سال شهر تهران و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها انجام گرفت.

روش کار: ۳۰۰ نمونه اسهال کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان کودکان تهران جمع‌آوری و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند. تمامی ایزوله‌ها به‌منظور بررسی وجود ژن اینتیمین (*eaeA*) با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های حاوی ژن *eaeA* به کمک تست آنتی بیوگرام در مورد ۱۶ آنتی‌بیوتیک به روش انتشار در دیسک صورت گرفت. برای تحلیل داده‌ها از روش‌های آمار توصیفی استفاده شد.

یافته‌ها: از تمام نمونه‌های اخذ شده از بیماران، ۳۶ مورد (۱۲٪) EPEC با تکنیک PCR مورد تأیید واقع شد. بیشتر پاتوتایپ‌های EPEC جدا شده ۲۲ مورد (۶۱/۱٪) مربوط به کودکان زیر ۱ سال بودند. تمام ۳۶ پاتوتایپ‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم حساس بودند. بیشترین میزان مقاومت پاتوتایپ‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آموکسی سیلین ۲۳ مورد (۶۳/۹٪) بود. همچنین ۲۴ ایزوله (۶۶/۷٪) الگوی مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌های رایج را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: پاتوتایپ‌های EPEC در ایران به عنوان عامل اسهال کودکان مطرح هستند که بایستی جهت شناسایی آنها از تکنیک‌های نوین و معتبر بهره گرفت.

کلیدواژه‌ها: مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه، اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC)، اسهال کودکان

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت در رویکردهای تشخیصی و درمانی نوین، بیماری اسهال هنوز به‌عنوان یکی از عوامل ابتلا و مرگ و میر به‌ویژه در کودکان کمتر از ۵ سال مورد توجه قرار می‌گیرد. برآورد می‌شود این بیماری در آسیا، آفریقا و آمریکا سالانه موجب ۵ میلیون مورد مرگ و میر می‌شود (۱). از عوامل میکروبی مهم در ایجاد بیماری اسهال می‌توان باکتری‌های پاتوژن (بیماری‌زای) مختلف را نام برد که اشریشیاکلی مولد اسهال (Diarrheagenic Escherichia Coli-DEC) به‌عنوان عامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان مطرح می‌باشد. پاتوتایپ‌ها (تایپ‌های بیماری‌زای)DEC معمولاً از طریق غذا و آب آلوده به مدفوع انسان و حیوانات به انسان منتقل می‌شوند. بهداشت فردی ضعیف و شرایط محیطی، انتقال باکتری‌ها را تسهیل می‌کنند. این پاتوتایپ‌ها عمدتاً بر اساس ویژگی‌های بیماری‌زایی و بالینی به شش گروه مهم دسته‌بندی می‌شوند (۲). با توجه به نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

زمینه میکروب‌شناسی که در سرتاسر جهان از جمله کشور ما صورت گرفته است پاتوتایپ E.coli انتروپاتوژن (EPEC) در اسهال کودکان شیوع قابل توجهی دارد (۳-۱). این پاتوتایپ به‌طور روزافزون در کشورهای در حال توسعه و نیز توسعه یافته (۵-۳) به‌عنوان عامل اسهال پایدار کودکان زیر ۵ سال مورد شناسایی قرار می‌گیرد (۹-۶). تشخیص سروتایپ‌های EPEC با استفاده از آنتی سرم اختصاصی آنتی‌ژن‌های سوماتیک باکتری (آنتی‌ژن O) به‌طور روتین انجام می‌گیرد (۵)؛ اما به نظر می‌رسد خصوصیات سرولوژیک و فاکتورهای ویرولانس این سویه‌ها تطابق کاملی با یکدیگر ندارند. به عبارتی کارایی تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی و سرولوژیک صد در صد نبوده و برخی پاتوتایپ‌های بیماری‌زا با این شیوه قابل شناسایی نبوده و نادیده گرفته می‌شوند (۱۰). پاتوتایپ‌های EPEC دارای جزایر بیماری‌زایی (Island Pathogenicity) حاوی لوکوس مسئول اتصال به انتروسیت می‌باشند. ژن ویرولانس *eaeA* که پروتئین اینتیمین را جهت اتصال و ایجاد زخم‌های خاص در سلول‌های روده رمزدهی می‌کند، درون این لوکوس جای گرفته است. در واقع وجود مشترک ژن اینتیمین در تمامی پاتوتایپ‌های EPEC یک ویژگی ویرولانس اختصاصی محسوب می‌شود امروزه تشخیص ژن‌های ویرولانس در پاتوتایپ‌های DEC جهت شناسایی و تعیین هویت قطعی این پاتوتایپ‌ها، به‌عنوان مناسب‌ترین شیوه بررسی این پاتوژن‌ها در نمونه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. از این رو به‌منظور تعیین ژن ویرولانس *eaeA* در نمونه‌های جدا شده در این مطالعه، تکنیک مبتنی بر DNA، PCR مورد استفاده قرار گرفت. این تکنیک نتایج مورد اطمینانی را به همراه داشته و از ویژگی و حساسیت بالایی در شناسایی ارگانیسم‌ها برخوردار است (۱۱ و ۱۰). از طرفی، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های پاتوژن به‌عنوان یکی از مشکلات بهداشت جهانی محسوب می‌شود. در همین راستا، غربالگری پاتوتایپ‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گروه اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC) به علت شیوع زیادی که در کودکان کشور ما دارد، حائز اهمیت می‌باشد. شناسایی عوامل بیماری و انجام آزمون تعیین حساسیت آنتی میکروبی آن‌ها در اخذ تدابیر بهداشتی جهت پیشگیری و درمان به‌موقع و مناسب کمک‌کننده است (۳-۱ و ۱۳). هدف از این تحقیق شناسایی مولکولی پاتوتایپ اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC) در کودکان زیر ۵ سال و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها بوده است.

روش کار

نمونه‌گیری و انجام تست‌های تشخیصی باکتری‌شناسی: در این مطالعه توصیفی و طی مدت ۴ ماه از اردیبهشت تا مرداد ۹۲، ۳۰۰ نمونه از اسهال کودکان زیر ۵ سال مراجعه‌کننده به بیمارستان کودکان تهران اخذ شد. نمونه‌ها با استفاده از سواب استریل در محیط انتقالی کری – بلر جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شد.

بر اساس گزارشات گذشته مبنی بر شیوع ۱۰ تا ۴۰ درصدی پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) در اسهال کودکان (۲ و ۱۲)، جهت احتیاط این فراوانی ۲۵٪ در نظر گرفته شده و با اطمینان ۹۵٪ نمونه طوری تعیین شد که حداکثر خطای برآورد فراوانی ۰/۰۵ باشد.

$$n = \frac{(t)^2(p)(q)}{d^2} = \frac{(1.96)^2(0.25)(0.75)}{(0.05)^2} = 288$$

جهت اطمینان از ۳۰۰ نمونه استفاده گردید.

پس از اخذ نمونه، مشخصات مربوط به هر یک (شامل تاریخ مراجعه، سن، جنس، نوع اسهال و سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک) ثبت گردید. نمونه‌ها بر روی محیط انتخابی هکتون انتریک آگار (MERCK) کشت داده شد تا پرگنه گونه‌های تخمیرکننده لاکتوز قابل‌تمایز باشند. سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و به کمک محیط‌های افتراقی TSI KIA، MR/VP، SIM، اوره، سیمون سیترات و لیزین، گونه‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

اشریشیاکلی جداسازی شدند. پس از انجام آزمایشات تشخیص باکتری‌شناسی و تعیین هویت گونه‌های اشریشیاکلی، سویه‌های شناسایی شده در محیط ذخیره skim milk (در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری گردید تا در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

استخراج DNA از گونه‌های E.coli: پس از کشت نمونه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰ ساعت انکوبه گذاری، ۱۰-۸ پرگنه تک E.coli با استفاده از لوپ برداشته و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه در تیوب‌های ۱/۵ سی‌سی مخلوط نموده و با ورتکس با دور ۳-۲ هزار به خوبی همگن شد. سایر مراحل استخراج DNA با کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت BIONEER) و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. DNA ی استخراج شده در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا در آزمون PCR مورد استفاده قرار گیرد.

انجام آزمون PCR: تکثیر ژن *eaeA* با استفاده از جفت پرایمرهای زیر صورت گرفت که محصول PCR ژن مورد نظر با این پرایمر، ۷۱۹ جفت باز بود. توالی جفت پرایمرهای فوروارد و ریورز مورد استفاده در آزمون PCR به قرار زیر بود (۲):

eaeA F:
CTGAACGGCGATTACGCGAA

eaeA R:
CGAGACGATACGATCCAG

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix (حاوی ۴ میکرولیتر dNTP،۳ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر MgCl2 و ۰/۱ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase)،۲/۵ میکرولیتر از coral load، ۵ میکرولیتر از آب مقطر DNase free (شرکت کیاژن)، ۳ میکرولیتر از DNA ی الگو و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (فوروارد و ریورز) بود. مراحل برنامه تکثیر ژن *eaeA* در دستگاه ترموسایکلر (PaQlab) شامل واسرشت اولیه (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و پس از آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و مرحله بسط (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. به‌منظور اطمینان از صحت فرآیند آزمون، مواد واکنشگر و ویژگی PCR، از DNA ی استخراج شده از سویه استاندارد ATCC *E.coli* 7852 (حاوی ژن *eaeA*) به‌عنوان استاندارد (کنترل مثبت) و از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پنج میکرولیتر از محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی ۵ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید در بافر تریس بورات-EDTA (TBE) ۰/۵X و با جریان ۸۰ ولت آشکارسازی شد. تعیین هویت باندهای حاصل به کمک مقایسه با مارکر وزن مولکولی (Ladder) ۱۰۰۰ جفت باز انجام شد. تهیه عکس از ژل با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور (GelDoc 1000 fluorescent system imaging Bio-Rad,) در مجاورت نور ماورای بنفش صورت گرفت (تصویر ۱).

تست آنتی بیوگرام جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تست آنتی بیوگرام جهت بررسی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های EPEC با استفاده از متد انتشار در دیسک و به روش کربی – بایر (Kirby-Baur) بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) صورت گرفت (۱۳). به این منظور، برحسب آنتی‌بیوتیک‌هایی که مصرف رایجی در کشور دارند و همچنین چندین آنتی‌بیوتیک که به‌تازگی در برنامه درمانی عفونت‌های گاستروانتریت و اسهال قرار گرفته‌اند از ۱۶ دیسک آنتی‌بیوتیکی مختلف (شرکت MAST) استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های مذکور شامل موارد ذیل بودند: سفالکسین (CFX)، آموکسی‌سیلین (A)، کلیستین سولفات (C)، تتراسایکلین (TET)، نالیدیکسیک اسید (NAL)، کوتریموکسازول (SxT)، سیپروفلوکساسین (CIPR)، کلرامفنیکل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

(CO)، استرپتومایسین (S)، سفوتاکسیم (CTX)، ایمی پنم (IMI)، مروپنم (MRP)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CTR)، نیتروفورانتوئین (NI) و جنتامایسین (GEN).

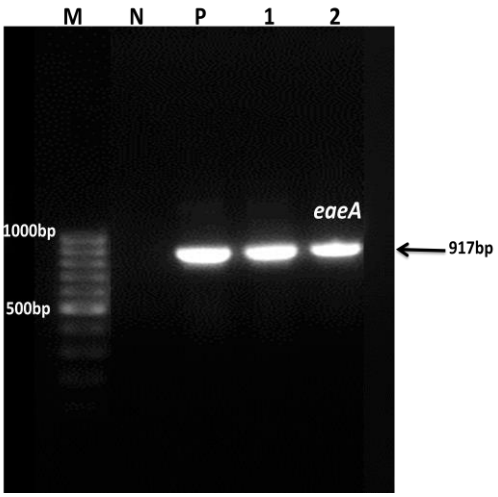
برای تحلیل داده ها از روش های آمار توصیفی استفاده شد.

یافته‌ها

از میان ۳۰۰ نمونه اسهالی مورد بررسی، ۳۶ مورد (۱۲٪) گونه اشریشیاکلی با استفاده از روش کشت و آزمون های بیوشیمیایی افتراقی جدا سازی شدند. تمامی جدایه ها حاوی ژن *eaeA* بوده و با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌عنوان سویه‌های EPEC مورد تایید واقع شدند (تصویر ۱).

۲۲ مورد (۶۱/۱٪) سویه‌های EPEC از کودکان زیر یک سال جدا شدند. از این ۳۶ ایزوله، ۲۱ سویه (۵۸/۳٪) متعلق به کودکان پسر و ۱۵ سویه (۴۱/۷٪) متعلق به کودکان دختر بودند.

درصد فراوانی مقاومت پاتوتایپ‌های EPEC جدا شده از نمونه‌ها به شرح ذیل بود: تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین: ۲۳ مورد (۶۳/۹٪)، نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین:۱۷ مورد (۴۷/۲٪)، کوتریموکسازول: ۱۵ مورد (۴۱/۷٪)، سفالکسین ۱۱ (۳۰/۵٪)، سفتریاکسون، کلرامفنیکل و سفوتاکسیم: ۸ مورد (۲۲/۲٪)، نیتروفورانتوئین: ۶ مورد (۱۶/۷٪، کلیستین سولفات و سیپروفلوکساسین: ۴ مورد (۱۱/۱٪) و جنتامایسین و سفتازیدیم: ۲ مورد (۵/۶٪) (نمودار ۱). لازم به ذکر می‌باشد که تمامی ۳۶ ایزوله به‌طور کامل به ایمی پنم و مروپنم حساس بودند. همچنین ۲۴ ایزوله (۶۶/۷٪) کاملا به سفتازیدیم و جنتامایسین و ۱۳ ایزوله (۳۶/۱٪) کاملا به کلیستین سولفات و سیپروفلوکساسین حساس بودند. نتایج ما نشان داد که ۲۹ ایزوله (۸۰/۶٪)، پاتوتایپ‌ها حداقل به یک آنتی‌بیوتیک رایج مقاوم هستند. ۲۴ ایزوله (۶۶/۷٪) الگوی مقاومت چندگانه را نشان دادند که تمامی آن‌ها به کوتریموکسازول مقاوم بودند.

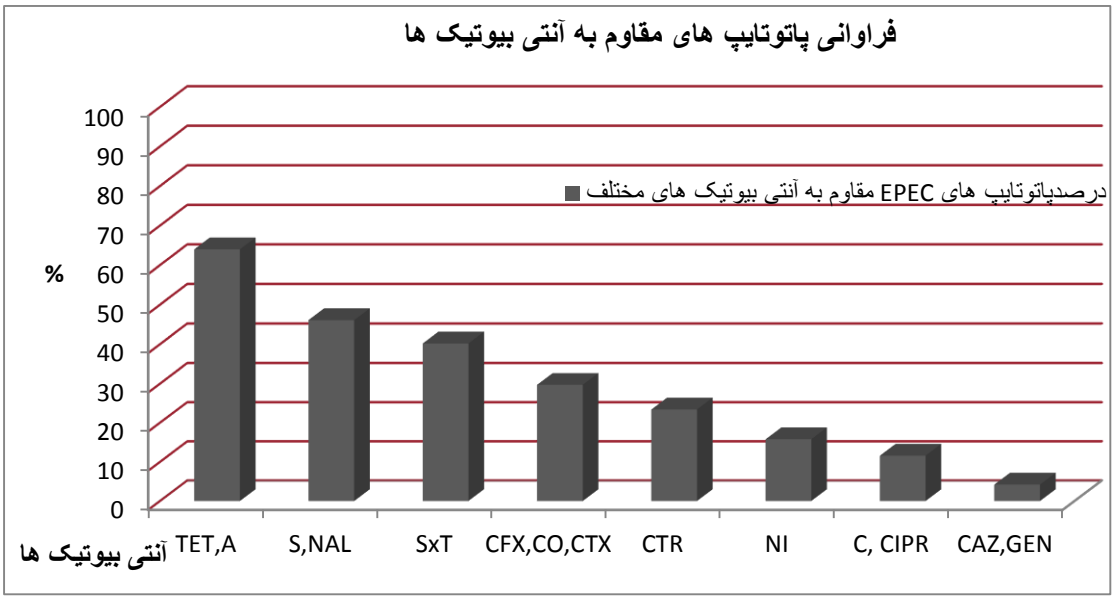


تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *eaeA (intimin)* (product size: 917 bp). شماره M: مارکر وزن مولکولی (ladder) ۱۰۰۰ bp، شماره N: کنترل منفی، شماره P: 7852 *Escherichia Coli ATTC* (کنترل مثبت) و شماره های۱ و۲ نمونه های ایزوله ی بالینی EPEC

بحث و نتیجه‌گیری

پاتوتایپ‌های مختلف DEC، از جمله پاتوتایپ‌های انتروپاتوژنیک (EPEC) عامل عمده اسهال نوزاد انسان در کشورهای توسعه نیافته می‌باشند اما به‌طور روزافزون در کشورهای توسعه یافته نیز شناسایی می‌شوند (۳). سال های متمادی است که عفونت ناشی از پاتوتایپ EPEC مرتبط با شیوع گاستروانتریت نوزادی در کودکان (به‌ویژه گروه سنی زیر یک سال) از نقاط مختلف جهان گزارش می‌شود (۱،۳،۸،۱۱). الگوی توزیع جغرافیایی جهانی پاتوتایپ‌های EPEC مولد اسهال از منطقه ای به منطقه ی دیگر متغیر می‌باشد. از این رو بایستی به‌منظور کنترل دقیق بیماری ناشی از این پاتوتایپها، فراوانی آن‌ها در هر منطقه ی خاص مورد شناسایی قرار گیرند. شناسایی سروتیپ های EPEC با استفاده از آنتی سرم های اختصاصی بر اساس آنتی‌ژن‌های O به‌طور روتین انجام می‌شود که در مطالعات اپیدمیولوژیک مفید می‌باشد (۵)؛ اما اینگونه ارزیابی می‌شود که تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژی جهت شناسایی دقیق و کامل پاتوتایپ‌های بیماری‌زا کافی نبوده و ممکن است برخی سویه‌ها از لحاظ تشخیصی نادیده گرفته

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]



نمودار ۱- درصد فراوانی پاتوتایپ‌های EPEC مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

شده و از نظر محقق دور بمانند. بنابر این جهت شناسایی دقیق و مطمئن این پاتوتایپ‌ها بایستی از تکنیک های مبتنی بر DNA و حساس نظیر PCR استفاده نمود. اخیرا در مطالعات متعددی سویه‌های اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) با تکنیک PCR مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (۲،۱۰،۱۲،۱۴). در مطالعه ی حاضر از ۶۷ گونه ی E.coli جدا شده از اسهال کودکان، ۳۶ ایزوله (۱۲٪ از تمامی موارد) دارای ژن *eaeA* بوده و به کمک تکنیک PCR به‌عنوان پاتوتایپ EPEC مورد تایید واقع شدند. بیشترین فراوانی EPEC در کودکان زیر یک سال مشاهده شد.

در ایران نصرالهی و همکاران در یک مطالعه ی مشابه در ساری، از بین عوامل ایجاد کننده اسهال، شیوع سروگروه های EPEC را در کودکان زیر یک سال ۱۲٪ گزارش کردند (۱۵). نتایج مربوط به شیوع این عوامل باکتریایی با نتایج بدست آمده از مطالعه ی ما کاملا همخوانی دارد. منصوری و همکاران نیز در مطالعه خود EPEC را به‌عنوان شایع ترین عامل اسهال باکتریایی و با فراوانی ۴۹٪ در کودکان زیر ۵ سال شهر کرمان گزارش نمودند. این مطالعه بیشترین شیوع این عوامل بیماری‌زا را در کشور ما نشان داد (۱۶). مطلبی و همکاران در کاشان فراوانی پاتوتایپ EPEC را در اسهال کودکان زیر ۵ سال ۲۸/۶٪ گزارش کردند (۱۷).

جعفری و همکاران در یک مطالعه ی مشابه در تهران، از بین عوامل ایجاد کننده اسهال، فراوانی سروگروه های EPEC را ۳۸/۸٪ گزارش کردند (۱۸). سلمان زاده و همکاران در مطالعه خود EPEC را در دو گروه کودکان مبتلا به اسهال و گروه کنترل بررسی کردند. نتایج بدست آمده در دو گروه کودکان به ترتیب ۶٪ و ۵٪ نشان داده شد (۱۹).

در برخی ازمطالعات انجام شده درخارج از کشور نتایج موافق و مخالف نتایج داخل کشور به دست آمده است. بطوریکه Tilak و Mudaliar در مطالعه ای درهند نشان دادند که در گروه کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال، ۳۶/۸٪ از جدایه ها ها متعلق به اشریشیاکلی پاتوتایپ EPEC بود، و در گروه کودکان بدون اسهال هیچیک از جدایه ها متعلق به پاتوتایپ EPEC نبود. ۷۳/۳٪ جدایه های EPEC مربوط به کودکان زیر ۲ سال بود (۲۰). Lozer و همکاران فراوانی پاتوتایپ EPEC را در کودکان زیر پنج سال در برزیل ۹/۳٪ گزارش نمودند (۲۱). Hegde و همکاران در هند میزان اسهال ناشی از EPEC را درکودکان ۱۶ درصد نشان دادند (۲۲). Nweze در نیجریه اسهال ناشی از EPEC را درکودکان ۲۱/۵۷٪ نشان دادند (۲۳). اگر چه بیشتر مطالعات حاکی از نقش با اهمیت این پاتوتایپ در ایجاد اسهال کودکان می‌باشد، اما

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

فراوانی این پاتوتایپ در مناطق مختلف می‌تواند تحت تاثیر فاکترهای مختلفی باشد. اختلاف در میزان شیوع گزارش شده از این مطالعات با مطالعه ی حاضر و همچنین سایر مطالعات انجام شده در کشور ما، می‌تواند ناشی از تفاوت در توزیع منطقه ای، جامعه نمونه‌گیری و زمان مطالعه باشد.

از طرفی شناخت و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های باکتریایی جهت طراحی استراتژی های مناسب درمانی مفید است. در مطالعه مطلبی و همکاران ۷۰٪ موارد جدا شده الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه را نشان دادند. به‌طوریکه بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت به آمپی سیلین (۱۰۰٪)، سفالکسین (۸۴٪) و سفتریاکسون (۷۴٪) گزارش شد. با این حال مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ها در مطالعه ما به ترتیب ۲۹٪ (سفالکسین) و ۲۳٪ (سفتریاکسون) گزارش شد (۱۷). در مطالعه Moyenuddin مقاومت به استرپتومایسین (۶۴/۳٪) و تتراسایکلین (۵۳/۶٪) بیشترین میزان را نشان داد و تمامی سویه‌ها به نالیدیکسیک اسید و سولفامتوکسازول حساس بودند و میزان مقاومت به آموکسی‌سیلین ۳۹/۳٪ و کلرامفنیکل ۱۰/۷٪ بود (۲۴). جعفری و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که ۱/۶٪ پاتوتایپ‌های EPEC به جنتامایسین، ۷۹/۶٪ به استرپتومایسین، ۸۸/۱٪ به کوتریموکسازول، ۶۹/۵٪ به تتراسایکلین، ۵۲/۵٪ به کلرامفنیکل و ۹۱٪ به آمپی سیلین مقاوم هستند. در این مطالعه تمام سروتایپ ها به نالیدیکسیک اسید حساس گزارش شدند (۱۸). در مقابل در مطالعه ما ۶۶٪ پاتوتایپ‌ها به سفتازیدیم و جنتامایسین، ۶۴٪ به تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین، ۴۷٪ به نالیدیکسیک اسید و ۴۲٪ ایزوله ها به کوتریموکسازول مقاوم بودند که این حاکی از افزایش روز افزون مقاومت به این آنتی‌بیوتیک می‌باشد. در مطالعه Tilak و Mudaliar در کودکان زیر ۵ سال در هند نشان داده شد که الگوی آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های EPEC نسبت به کوتریموکسازول ۳۴/۴٪، نالیدیکسیک اسید ۳۰٪ و آمپی سیلین ۳۰٪ مقاوم بودند (۲۰).

Mandoando و همکاران در مطالعه خود در اسپانیا مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوتایپ‌های EPEC جدا شده از کودکان زیر ۵ سال به آمپی سیلین را ۷۱٪ گزارش کردند. در این مطالعه مقاومت به کلرامفنیکل ۳۶٪، سولفامتوکسازول ۵۷٪ و تتراسایکلین ۵۷٪ بود (۲۵). Jordi V و همکاران در مطالعه خود نشان دادند دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید بر روی EPEC بسیار موثر هستند. در این مطالعه مقاومت به آمپی سیلین و کوتریموکسازول بالای ۵۰٪ بود در حالیکه مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱۵/۸٪ گزارش شد (۲۶). این نتایج با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد که نشان می دهد بیش از ۵۰ درصد سویه‌های EPEC به آمپی سیلین و کوتریموکسازول مقاوم هستند. افزایش مقاومت این پاتوتایپ‌ها به آنتی‌بیوتیک ها از جمله کوتریموکسازول در سالهای اخیر نیز می‌تواند به‌عنوان یک تهدید سلامت و بهداشت جامعه به‌ویژه در بین کودکان تلقی شود. این تفاوت می‌تواند تفاوت در توزیع پاتوتایپ‌های مقاوم در فصول و مناطق خاص باشد.

در مطالعه حاضر همچنین چند پاتوتایپ (۴/۲٪) به سفتازیدیم مقاوم مشاهده شدند که این مسئله می‌تواند در صورت عدم توجه به مصرف به‌موقع و مناسب این آنتی‌بیوتیک در آینده ای نزدیک منجر به ظهور روزافزون پاتوتایپ‌های مقاوم شود. با این حال حدود ۸۰٪ پاتوتایپ‌ها حداقل به یک آنتی‌بیوتیک رایج مقاوم هستند. ۲۴ ایزوله (۶۷٪) الگوی مقاومت چندگانه را نشان دادند که حداقل به ۵ آنتی‌بیوتیک مختلف مقاوم بودند. نکته قابل توجه از این نتایج این که تمامی ایزوله های با مقاومت چند گانه به کوتریموکسازول مقاوم بودند. تحقیقات در آمریکا نشان می دهد حدود ۷۵٪ ازسروتیپ های EPEC حداقل به یک دارو مقاوم اند و ۶۴٪ سروتیپ ها الگوی مقاومت چندگانه را نشان می دهند (۲۴). شناسایی روزافزون پاتوتایپ‌های باکتریایی با الگوی مقاومت به چند دارو بعلت محدودیت در انتخاب درمان، سبب نگرانی سازمان بهداشت جهانی شده است. از طرفی ظهور افزایشی پاتوتایپ‌های مقاوم به چند

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

دارو که حاکی از انتقال عناصر مقاومت بین این پاتوتایپ‌هاست، مقابله با این عوامل را دو چندان دشوار می سازد (۲۶،۲۷). از آنجایی که فراوانی این پاتوتایپ‌ها رو به افزایش بوده و می‌تواند به‌عنوان یک مشکل بهداشتی چالش برانگیز باشد، شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف می‌تواند در طراحی رویکردهای بهداشتی و درمانی در برابر عفونت‌های ناشی از این عوامل بیماری‌زا بسیار مفید واقع شود.

از آنجایی که شیوع پاتوتایپ‌های EPEC در اسهال کودکان زیر ۵ سال کشور ما قابل توجه است، پیشنهاد می شود در کنار تست های روتین آزمایشگاهی از قبیل تست های بیوشیمیایی و سرولوژی، جهت شناسایی دقیق این سویه‌ها از تکنیک های معتبر و حساس مبتنی بر DNA بهره گرفت. از طرفی با توجه به افزایش مقاومت این پاتوتایپها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و کلاسیک و ظهور پاتوتایپ‌های با الگوی مقاومت چندگانه، جهت درمان قطعی بیماری و جلوگیری از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بایستی از مصرف بی رویه و بدون تجویز پزشک خودداری کرد. بدیهی است که این مهم، مستلزم شناسایی دقیق عامل بیماری و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن قبل از تجویز دارو می‌باشد.

تقدیر و تشکر

مجریان طرح لازم می دانند تا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه های طرح را فراهم نمودند صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی شود. ضمناً این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۷۷۴۹ می باشد.

منابع

1. Soltan-Dallal MM. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. Archives of Iranian Medicine; 2001. 4(4): 201-3.

2. Bueris V, Palma Sircili M, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, et al..Detection of diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia. Brazil 2007 Epub; 2007.102(7):839-44.

3. Prère MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O. Bacterial etiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups.Pathol Biol; 2006.54(10):600-2.

4. 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):438-49.

5. Hoque SS, Faruque AS, Mahalanabis D, Hasnat A. Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. J Trop Pediatr; 1994.40(6):351-4.

6. Ruchaud-Sparagano MH, Maresca M, Kenny B. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. Cell Microbiol; 2007.9(8):1909-21.

7. Guth BE, Giraldi R, Gomes TA, Marques LR. Survey of cytotoxin production among Escherichia coli strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC. Cell Microbiol; 2001. 40(5):341-4.

8. Dow MA, Toth I, Malik A, Herpay M, Nogrady N, Ghenghesh KS, et al. Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and enteroaggregative E. coli (EAEAC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Libya. Microbiology & Infectious Diseases; 2006. 29 (3): 100-18.

9. Tawfeek HI, Najim NH, Al-Mashikhi S. Studies on diarrhoeal illness among hospitalized children under 5 years of age in Baghdad during 1990-97. East Mediterr Health J; 2002. 8(1):181-8.

10. Abigail C, Joanna C. Young, Nicholas C and Gad F. Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. Gut Microbes; 2012. 3(2)71–87.

11. Vanessa B, Marcelo Palma S, Carla Romano T, Maurilio FS, Marcia Regina F, Marina Baquerizo M, et al. Diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador ,Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz; 2007. 102(7): 839-44 .

12. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol Rev; 1998. 58(11): 142–201

13. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Fifteen Information Supplement; 2005. 25(1): 15-100.

14. Fujioka M, Otomo Y, Ahsan CR. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic Escherichia coli. J Microbiol Methods; 2013

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

phenotypic characterization of atypical enteropathogenic Escherichia coli serotypes isolated from children with and without diarrhea. J Microbiol Immunol Infect; 2011 Feb.44(1):27-32.

Mar.92(3):289-92.

15. Nasrolahi M, Sharif M. Prevalence of diarrhea caused by Enteropathogenic E.Coli in under one year old children. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences; 2000. 4 (1):63-68. (Persian).

16. Mansouri Sh. Bacterial causes of diarrhea in Kermanian children under five years old. Journal of Kerman University of Medical Sciences; 1992. 1(3): 2-9. (Persian).

17. 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 Journal of Microbiology Research; 2011. 5(20: 3305-3309.

18. Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis; 2008 Jul.61(4):269-73.

19. Salmanzadeh-Ahrabi S, Habibi E, Jaafari F, Zali MR. Molecular epidemiology of Escherichia coli diarrhoea in children in Tehran. Ann Trop Paediatr; 2005 Mar. 25(1):35-9.

20. Tilak GP, Mudaliar JL. Role of enteropathogenic Escherichia coli in paediatric diarrhoeas in South India. Mater Sociomed; 2012.24(3):178-81.

21. Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky IC, et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. BMC Infect Dis; 2013 Sep 8.13:418.

22. Hegde A, Ballal M, Shenoy S. Detection of diarrheagenic Escherichia coli by multiplex PCR. Indian J Med Microbiol; 2012 Jul-Sep.30(3):279-84.

23. Nweze E. Aetiology of diarrhoea and virulence properties of diarrhoeagenic Escherichia coli among patients and healthy subjects in southeast Nigeria. J Health Popul Nutr; 2010 Jun.28(3):245-52.

24. Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseley SL, Bopp CA, Blake PA. Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of Escherichia coli strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States. J Clin Microbiol; 1989 Oct.27(10):2234–2239.

25. Mandoando M, Eusebio V, Joaquim R, Sergi S, Fatima A, Xaviera V, et al. Etiology of diarrhea in children yonger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. Am. J. Trop. Med. Hyg; 2007. 6(3): 522–527.

26. Jordi V, Martha V, Climent C, Honorato U, Hassan M, David S, et al. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic Escherichia coli Isolated from Children under the Age of 5 Years from Ifakara, Tanzania. Dec; 1999. 43(12):3022–3024.

27. Aslani MM, Alikhani MY. Molecular and

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]

Identification of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) pathotype using PCR technique in under 5- years old children in Tehran and evaluation of their antibiotic resistance patterns

***Mohammad Mehdi Soltan Dallal**, Professor, Food Microbiology Research Center, Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). msoltandallal@gmail.com
Mohammad Hasan Shirazi, Associate professor, Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran.
Abolfazl Akbari, PhD Studentn Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine, School of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Mohammad Kazem Sharifi Yazdi, Professor, Zoonosis Research Centre, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Para Medicine Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract
Background: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) pathotypes are belonging to enterobacteriaceae family that is known as agent of gastroenteritis and diarrhea in under 5 year old children. This research is aimed to identify of EPEC pathotypes in diarrheal fewer than 5 years old children and study the patterns of antibiotic resistance of these strains in Tehran.
Methods: 300 samples were collected from children with diarrhea visited in children Hospital in Tehran. Bacterial isolates confirmed as *E. coli* species on the basis of standard bacterial and biochemical tests. All isolates were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for detection of *eaeA* (intimin) gene in terms of EPEC pathotypes. Then, antibiogram test for EPEC pathotypes was performed using 16 different antibiotic disces by disc diffusion agar (Kirby-Bauer) method.
Results: Among all specimens, 36 (12%) isolates bearing *eaeA* gene were confirmed as EPEC using PCR. 22 specimens (61.1%) of identified pathotypes were isolated from under 1 year old children. All pathotypes were sensitive to imipenem and meropenem. Antibiotic resistance toward amoxicillin and tetracycline 23 (63.9%) was higher than others. Also 24 isolates (66.7%) showed multi-resistant pattern toward several routine antibiotics.
Conclusion: Since EPEC pathotypes are diagnosed as agent of diarrhea in children in our country, identification of these pathotypes showed be made through novel techniques.

Keywords: Multi-antibiotic resistance, Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Childhood diarrhea

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-16]