مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هجدهم/پاییز۱۳۹۲/۳۸-۲۹

شناسایی سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک با استفاده از روش Real-time PCR در کودکان زیر ۲ سال شهر شیراز

محمد کارگر[۱]، **پژمان عباسی**[۲]، **عباس دوستی**[۳]، **صادق قربانی دالینی**[۲]

۱.دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران (مولف مسئول) تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۵۶۹۷ mkargar@jia.ac.ir

۲. کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، جهرم، ایران

۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) دومین گروه بزرگ *اشریشیا کلی* در ارتباط با اسهال و مسئول بیش از ۲۵٪ از کل بیماری‌های کودکان می‌باشند. هدف از این پژوهش ارزیابی شیوع سویه‌های ETEC و ژن‌های بیماری‌زای آن در کودکان زیر ۲ سال در شیراز می‌باشد.

روش بررسی: این پژوهش به صورت توصیفی-تحلیلی بر روی ۲۸۵ نمونه مدفوع اسهالی کودکان زیر ۲ سال در شیراز انجام شد. در ابتدا سویه‌های *اشریشیا کلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی استاندارد جداسازی گردیدند. سپس شیوع سویه‌های ETEC و حضور ژن‌های *st* و *lt* با استفاده از تکنیک Real-Time PCR و حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک (CLSI) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد پژوهش، ۴۹ مورد (۱۷٪) *اشریشیا کلی* تولید کننده اسهال جداسازی گردید که ۷ مورد آن (۱۴/۳٪) مربوط به سویه ETEC بود. از سویه‌های ETEC شناسایی شده، ۴ مورد (۵۷/۱۴٪) ژن *lt*، ۱ مورد (۱۴/۲۹٪) ژن *stIa* و ۲ مورد (۲۸/۵۷٪) دارای هر دو ژن *lt*، *stIa* بودند. تمامی سویه‌های ETEC نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمیکاسین و نیتروفورانتوین حساسیت و نسبت به پنی‌سیلین و ماکرولیدها مقاومت داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک در منطقه مورد پژوهش شیوع گسترده‌ای دارند. بنابراین پایش گسترده بیمارستانی این پاتوتیپ با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی به منظور ارزیابی شیوع آن در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها: *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، Real-time PCR، نوزادان، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

وصول مقاله:۹۱/۳/۲۷ اصلاحیه نهایی:۹۱/۶/۲۶ پذیرش:۹۲/۲/۸

مقدمه

بیماری‌های اسهالی مهم‌ترین مشکل سلامت عمومی در سرتاسر جهان هستند و سالانه منجر به مرگ بیش از ۲ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه می‌شوند (۱). سویه‌های ETEC یکی از مهم‌ترین عوامل اسهال آبکی نوزادان (بچه‌های زیر ۱ سال) و کودکان زیر ۲ سال در کشورهای در حال توسعه می‌باشند. این کودکان در ۲ سال اول زندگی، ۲ تا ۳ بار به اسهال ناشی از سویه‌های ETEC مبتلا می‌گردند و منجر به مرگ ۷۰۰/۰۰۰ نفر در سال می‌شوند (۲). به‌طور کلی ETEC با دو سندرم کلینیکی اسهال مسافرتی و اسهال در کودکان تازه از شیر گرفته شده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

در کشورهای در حال توسعه ارتباط دارد (۳). دوره کمون این بیماری کوتاه و بین ۱۴ تا ۵۰ ساعت می‌باشد و مهم‌ترین علائم بالینی عفونت‌های ETEC اسهال آبکی، استفراغ، کرامپ شکمی و تب ضعیف می‌باشد. اسهال آبکی معمولا بدون خون، موکوس یا چرک مشاهده می‌شود. معمولا اسهال ناشی از ETEC در ۳ تا ۵ روز، خود به‌خود بهبود می‌یابد و شدت آن ممکن است خفیف تا شبه وبایی باشد (۴). سویه‌های ETEC برای اولین بار به عنوان عامل بیماری اسهال در خوک و عفونت مرگبار در نوزاد آن شناسایی گردید (۴). سپس در انسان برای اولین بار گزارش شد که برخی از سویه های یاد شده توانایی ایجاد اسهال آبکی در کودکان را دارند. در ادامهٔ پژوهش‌ها، دوپونت و همکاران توانایی سویه‌های ETEC را در ایجاد اسهال در داوطلبان بزرگسال نشان دادند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که آب و غذای آلوده معمول‌ترین منابع انتقال سویه‌های ETEC هستند (۵). عموما سویه‌های ETEC پس از استقرار در سطح مخاطی روده کوچک توانایی تولید انتروتوکسین‌های خود و افزایش ترشح سلولی را دارند. مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی ETEC انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (STIa/STIb) هستند. ژن‌های بیماری‌زای *lt* و *stIa/stIb* به‌ترتیب کد کننده انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (STIa/STIb) می‌باشند (۳). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سویه‌های ETEC توانایی تهاجمی محدودی بر روی کشت‌های سلولی از خود نشان می‌دهند. بنابراین سویه‌های ETEC از طریق فعالیت انتروتوکسین‌های LT و ST موجب بروز اسهال می‌شوند و ممکن است هر دو توکسین یاد شده یا تنها یکی از آن‌ها در یک سویه بیان شود. به دلیل حساسیت زیاد ETEC به داکسی‌سیکلین و به دلیل نیمه عمر طولانی آن در مدفوع، این دارو اولین انتخاب به منظور پیشگیری در مسافرین کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۴).

متاسفانه با وجود اهمیت بیماری‌زایی سویه‌های ETEC، پژوهش های محدودی در مورد پایش دقیق این باکتری در ایران انجام شده است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی شیوع و بررسی ژن‌های بیماری‌زای ETEC و همچنین بررسی تظاهرات بالینی مرتبط با آن در کودکان زیر ۲ سال در شهر شیراز انجام گرفت.

روش بررسی

جمع آوری نمونه

از فروردین تا آذر ماه ۱۳۸۹در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی، تعداد ۲۸۵ نمونه اسهالی از کودکان زیر ۲ سال از بیمارستان‌های شهید دستغیب و نمازی شیراز، پس از کسب موافقت کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه جمع آوری گردید. مشخصات مربوط به هر بیمار و علائم بالینی نظیر تب، استفراغ و نوع اسهال در پرسش‌نامه تنظیمی ثبت گردید.

جداسازی باکتری

پس از انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه، به‌منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت اولیه، از محیط EMB (Eosine Methylen Blue Lactose agar) استفاده گردید. سپس کلنی‌های تخمیر کننده لاکتوز دارای جلای سبز فلزی مشکوک به *اشریشیا کلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی TSI، SIM، MR/VP، سیمون سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز تعیین هویت گردیدند. سپس کشت خالص سویه‌های تایید شده تا قبل از انجام آزمون‌های مولکولی در محیط واجد گویچه‌های شیشه‌ای دارای گلیسرول در حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی گردیدند. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده مربوط به شرکت مرک آلمان بودند.

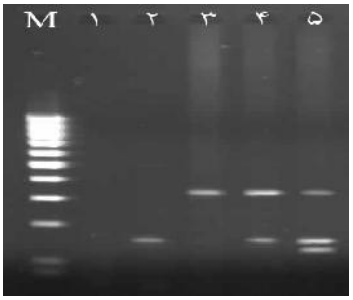
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

آزمون PCR چندگانه

کلنی‌های *اشریشیا کلی* بر روی محیط LB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس با استفاده از دستورالعمل کیت ساخت شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM} Kit) استخراج DNA انجام شد. آزمون PCR چندگانه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترحاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۰/۱ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱/۵ واحد DNA پلی مراز *Taq* (شرکت سیناژن، ایران)، ۰/۲ میلی‌مول از هر کدام از پرایمرها (۷ و ۶) (جدول ۱) انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای $95\ ^{\circ}C$ و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای $94\ ^{\circ}C$، اتصال در دمای $58\ ^{\circ}C$ و گسترش در دمای $72\ ^{\circ}C$ هرکدام به مدت ۱ دقیقه و نهایتا ۵ دقیقه در دمای $72\ ^{\circ}C$ جهت گسترش نهایی انجام گردید. از سویه *اشریشیا کلی* ATCC 35401 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت قطعه تکثیر یافته با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید (تصویر ۱).

جدول ۱: ژن‌های هدف، توالی پرایمرها، دمای T_m و سایز تکثیر.

ویروتیپ	ژن	توالی های پرایمرها	سایز تکثیر(bp)	Tm تکثیر	منبع
ETEC	*stIa* *stIb* *st*	F: TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA F:TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA R: GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	۱۵۹ ۱۳۸	۸۰/۶	۶
ETEC	*lt*	F: TCTCTATGTGCATACGGAGC R: CCATACTGATTGCCGCAAT	۳۲۲	۸۵/۸	۷



تصویر ۱: نتایج PCR برای تشخیص سویه‌های ETEC..ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲: آمپلیکون ۱۵۹ جفت بازی ژن *stIa*، ردیف ۳: آمپلیکون ۳۲۲ جفت بازی ژن *lt*، ردیف ۴: نمونه دارای هر دو ژن *lt* و *stIa* و ردیف ۵: کنترل مثبت واجد هر سه ژن *lt*، *stIa* و *stIb*

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

آزمون Real-time PCR

آزمون Real-time PCR برای شناسایی سویه‌های ETEC در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مانند PCR چندگانه همراه با ۱ میکرولیتر SYBR Green I (Invitrogen، کشور آمریکا) انجام شد. این واکنش در دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) و با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۴۵ چرخه شامل ۹۵ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۵۸ °C به‌مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً آنالیز منحنی ذوب از دمای ۷۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد با بررسی شدت فلورسانس در هر ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه انجام گردید. تمامی واکنش‌ها ۳ بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی نیز استفاده شد. داده های به‌دست آمده به‌وسیله نسخه ۱/۷ نرم افزار rotor-gene 6000 پردازش گردید.

ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام گردید (۸). میزان حساسیت کلنی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتری‌آکسون (۳۰µg)، سفکسیم (۵µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰U)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، لووفلوکساسین (۵µg)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵µg و ۱/۲۵)، استرپتومایسین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، نیتروفورانتوین (۳۰۰µg)، آزیترومایسین (۱۵µg)، کلاریترومایسین (۱۵µg) و اریترومایسین (۱۵µg) با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد با توجه به دستور شرکت Mast کشور انگلستان ارزیابی شد. از سویه *اشریشیا کلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

آنالیز آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نسخه هفدهم نرم‌افزار *SPSS* (*spss Inc.*, Chicago, IL., USA)، آزمون مربع کای، انجام گردید. سطح معنی داری در $p<۰/۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

در مجموع تعداد ۲۸۵ نمونه اسهالی از کودکان زیر دو سال در شهر شیراز مورد مطالعه قرار گرفت. از این تعداد، ۱۶۵ نمونه (۵۸٪) مربوط به پسران و ۱۲۰ نمونه (۴۲٪) مربوط به دختران بود. از مجموع نمونه های مورد پژوهش با استفاده از روش کشت و تست‌های استاندارد بیوشیمیایی، ۴۹ مورد (۱۷٪) سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده اسهال (DEC) جداسازی گردید که ۲۹ مورد (۵۹٪) مربوط به پسران و ۲۰ مورد (۴۱٪) مربوط به دختران بود. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که بین جنسیت و گروه‌های سنی در افراد مبتلا به اسهال ناشی از DEC ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p=۰/۱۹۹$).

۲۱ مورد (۴۳٪) از بیماران آلوده به DEC بستری و ۲۸ مورد (۴۷٪) به‌صورت سرپایی درمان شدند. هم‌چنین آنالیز آماری نشان داد که بین چگونگی درمان و جداسازی باکتری DEC ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p=۰/۴۷۵$). میزان فراوانی نسبی سویه‌های *اشریشیا کلی* جداسازی شده در فصل بهار، تابستان و پاییز به‌ترتیب ۳۷٪، ۴۷٪ و ۱۶٪ بود. با آزمون مربع کای مشخص شد که ارتباط معنی‌داری ($p=۰/۰۲۸$) بین فصول مورد مطالعه و فراوانی نسبی DEC وجود دارد.

با ردیابی ژن‌های بیماری‌زایی *lt*، *stIa* و *stIb*، توسط هر دو روش PCR چندگانه و Real-time PCR، ۷ مورد (۱۴/۳٪) سویه ETEC شناسایی گردید. از سویه‌های جدا شده، ۴ مورد (۵۷/۱۴٪) حاوی ژن *lt*، ۱ مورد (۱۴/۲۹٪)

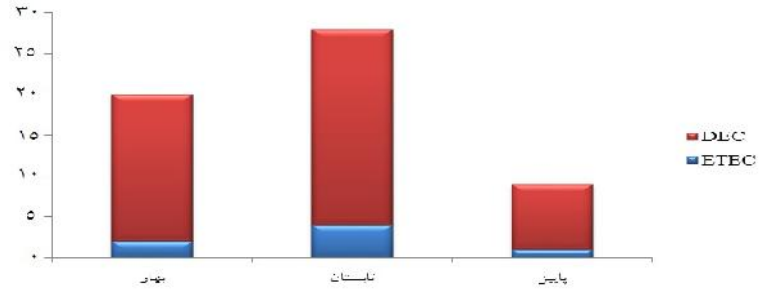
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

حاوی ژن *stIa* و ۲ مورد (۲۸/۵۷٪) به‌صورت هم‌زمان ژن‌های *lt* و *stIa* را داشتند. از سویه‌های یاد شده ۵ مورد (۷۱/۴۳٪) مربوط به دختران و ۲ مورد آن (۲۸/۵۷٪) مربوط به پسرها بودند. اما بین جنسیت (p =۰/۲۵۷) و سن کودکان زیر دو سال (p=۰/۹۸۲) و شیوع ETEC ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی شیوع سویه‌های ETEC در گروه‌های سنی مختلف.

سن (ماه)	فراوانی (٪)
۰-۲	۱ (۱۴/۲۹)
۳-۵	۲ (۲۸/۵۷)
۶-۸	۱ (۱۴/۲۹)
۹-۱۱	۲ (۲۸/۵۷)
۱۲-۱۷	۰ (۰)
۱۸-۲۴	۱ (۱۴/۲۹)
جمع	۷ (۱۰۰/۰)

به‌دلیل جمع آوری تصادفی نمونه‌ها، توزیع فراوانی بیماران در فصل‌های مختلف متفاوت بود. فراوانی نسبی سویه‌های ETEC جداسازی شده در فصل‌های بهار، تابستان و پاییز به‌ترتیب ۴/۱٪، ۸/۲٪ و ۲٪ بود (نمودار ۱). با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که بین فصول مورد پژوهش و فراوانی سویه‌های ETEC ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (p =۰/۳۶۸). دربیماران مبتلا ETEC ، در ۵ نفر(۷۱/۴۳٪) اسهال آبکی، در ۲ نفر(۲۸/۵۷٪) اسهال خونی، در ۵ نفر(۷۱/۴۳٪) تب و در ۳ نفر(۴۲/۵۶٪) از استفراغ گزارش شد (جدول ۳).



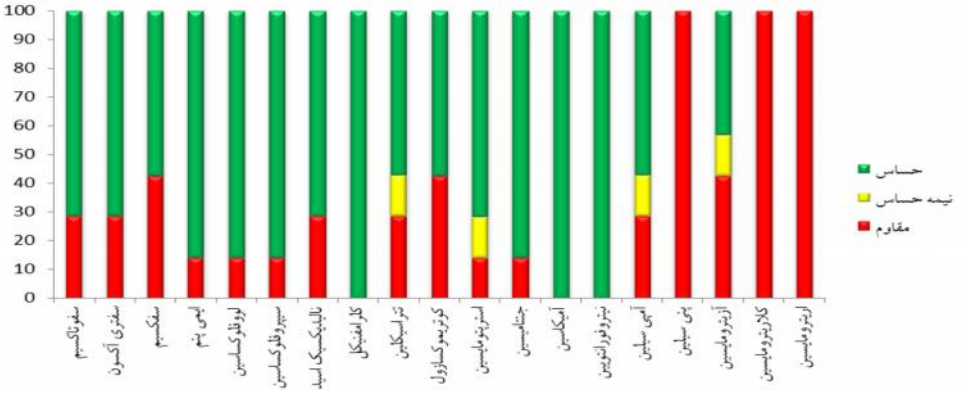
نمودار ۱: توزیع فراوانی سویه‌های DEC و ETEC بر اساس فصول پژوهش.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

جدول ۳: مشخصات بالینی کودکان مبتلا به ETEC.

جنسیت	سن	اسهال آبکی	اسهال خونی	تب	استفراغ	بستری
پسر	۱ ماهه	+	–	+	–	–
دختر	۳ ماهه	+	–	+	+	+
دختر	۵ ماهه	–	+	–	+	–
پسر	۸ ماهه	+	–	–	–	–
دختر	۹ ماهه	+	–	+	+	–
دختر	۱۱ ماهه	–	+	+	–	–
دختر	۲۴ ماهه	+	–	+	–	+

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمامی سویه‌های ETEC به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمیکاسین و نیتروفورانتوئین حساس و نسبت به پنی‌سیلین و ماکرولیدها مقاومت داشتند. همچنین این آزمون نشان داد که تمامی ۷ نمونه ETEC به بیش از ۴ گروه آنتی‌بیوتیکی مقاوم می‌باشند. فراوانی مقاومت چند دارویی به ۴، ۵ و ۹ گروه آنتی‌بیوتیکی به ترتیب ۷۱/۴٪، ۱۴/۳٪ و ۱۴/۳٪ شناسایی گردید (نمودار ۲).



نمودار۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک.

بحث

اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده اسهال در نوزادان و کودکان به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه می‌باشد (۲). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی(WHO)، این پاتوژن روده‌ای دومین عامل مرگ و میر پس از *روتاویروس‌ها* در کودکان می‌باشد (۹). ویروتیپ ETEC در برخی از کشورهای درحال توسعه مانند؛ گابن، اکووادر، تایوان، بنگلادش، عراق و نیجریه به‌عنوان اصلی‌ترین عامل ایجاد بیماری اسهالی در کودکان معرفی شده است (۱۵-۱۰). با وجود اهمیت قابل توجه سویه‌های ETEC در ایجاد اسهال کودکان، اما گزارش‌های محدودی در مورد ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی این باکتری در ایران وجود دارد. نتایج ما در این پژوهش نشان داد که در شهر شیراز ۱۷٪ از سویه‌های DEC متعلق به ویروتیپ ETEC می‌باشند. Amisano و همکاران در فاصله سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در ایتالیا، با بررسی ۱۶۰ نمونه اسهال جمع آوری شده از کودکان، ۷۵ مورد (۴۶/۸۸٪) DEC جداسازی نمودند. همچنین با ردیابی ژن‌های بیماری‌زای *lt* و *sta*، با روش PCR در ۴ مورد (۰/۵٪) ETEC را شناسایی کردند (۱۶). Arif و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

همکاران در سال ۲۰۰۹ در عراق شیوع ETEC در اسهال کودکان را ۲۶/۳٪ گزارش نمودند (۱۴). اما Nweze و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نیجریه تنها در ۴/۲٪ موارد اسهال کودکان ETEC را شناسایی کردند (۱۵). همچنین Riveral و همکاران در پرو در سال ۲۰۰۷ با استفاده از روش Real-time PCR فراوانی نسبی این پاتوژن روده‌ای را در کودکان ۲ تا ۲۴ ماهه مبتلا به اسهال ۵/۳٪ گزارش نمودند (۹). Muller و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع سویه ETEC را در بیماران کشورهای برزیل، دانمارک، فرانسه، آلمان، مکزیک و امریکا ۸/۵٪ گزارش کردند (۳). اما Nessa و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیوع سویه ETEC در بیماران مبتلا به اسهال در کشور بنگلادش را ۲۴/۳٪ گزارش نمودند (۱۳). در ایران جعفری و همکاران در بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ در تهران شیوع سویه ETEC را ۱۲/۷٪ گزارش کردند (۱۷). همچنین در بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در کودکان زیر ۵ سال تهران میزان شیوع این پاتوتیپ ۶/۸٪ بوده است (۱۸). Yang و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تایوان با استفاده از روش Real-time PCR، ۱۰ مورد (۶۶/۷٪) سویه ETEC جداسازی و گزارش نمودند (۱۲). Reyes و همکاران در نیکاراگوئه در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶، شیوع ETEC در نوزادان را ۶/۵٪ گزارش نمودند و نشان دادند که بین ابتلا به ETEC و ایجاد اسهال ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۱۹). با وجود شیوع اندک ETEC در اغلب کشورها، اما یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر حجم کم نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. بدیهی است که با پایش گسترده‌تر شیوع این باکتری در سطح کشور قضاوت صحیح‌تری در مورد شیوع این باکتری در مناطق مختلف کشور می توان ارائه نمود. اختلاف در میزان فراوانی سویه‌های ETEC در مطالعات مختلف، به دلیل استفاده از تکنیک‌های تشخیصی متفاوت و همچنین توزیع جغرافیایی مناطق مورد پژوهش می‌باشد. مهم‌ترین علایم بالینی شناسایی شده در پژوهش ما اسهال آبکی، تب و به میزان کم‌تر اسهال خونی بود. جعفری و همکاران نیز مهم‌ترین علایم شناسایی شده در کودکان مبتلا به ETEC را اسهال آبکی و اسهال خونی گزارش نمودند. همچنین Peresterl و همکاران در گابن (۱۰) و Hein و همکاران نیز در تایلند (۲) مهم‌ترین علایم بالینی را در کودکان مبتلا به ETEC، اسهال آبکی، اسهال خونی، تب و استفراغ گزارش نمودند که با یافته‌های ما در این پژوهش همخوانی دارد. در بیشتر پژوهش‌های یاد شده نیز مانند پژوهش حاضر، ارتباط بیماری ناشی از ETEC با فصول گرم نشان داده شده است(۲۳-۲۰ و ۱۸-۱۶). Vidal و همکاران در سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۳ در آمریکا شیوع ژن‌های *st* و *lt* در کودکان زیر ۵ سال را به‌ترتیب ۱/۴٪ و ۲/۲٪ گزارش کردند (۲۲). همچنین محققین یاد شده در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ شیوع ژن‌های *lt* و *st* در کودکان زیر ۹ سال را ۱/۹٪ و ۰٪ گزارش نمودند (۲۳). Yang و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تایوان فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *st* در بین سویه‌های *اشریشیا کلی* اسهال زا را ۶۶/۷٪ گزارش نمودند. اما در سویه‌های جدا شده ژن بیماری‌زایی *lt* را شناسایی نکردند (۱۲). در بررسی Spano و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی کودکان زیر ۲ سال در برزیل فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* به‌ترتیب ۳/۲٪ و ۰/۴۶٪ گزارش گردید (۲۴). همچنین Al-Gallas و همکاران در سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴ در تونس فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به‌ترتیب ۴/۳٪ و۱۴٪ گزارش کردند (۲۵). Nweze و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نیجریه فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به‌ترتیب ۲/۷٪ و ۱/۵٪ گزارش نمودند (۱۵). پژوهش‌های Reyes و همکاران در سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ در نیکاراگوئه نشان داد که فراوانی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* به‌ترتیب۶/۵٪ و۱/۴٪ می‌باشد (۱۹). همچنین Amisano و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ایتالیا، فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به‌ترتیب۴٪ و ۲/۷٪ گزارش کردند (۱۶). Arif و همکاران در سال ۲۰۰۹ در عراق شیوع ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به‌ترتیب ۱۰/۵٪ و ۱۵/۸٪ گزارش نمودند (۱۴). همچنین جعفری و همکاران در تهران فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را در کودکان زیر۵ سال را به‌ترتیب ۳/۷٪ و ۴/۵٪ و در افراد بالاتر از ۱۴ سال فراوانی ژن‌های یاد شده را به‌ترتیب ۱۵/۴٪ و ۲۲/۴٪ گزارش کردند (۱۸ و ۱۷). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *stIa* در بین سویه‌های */شریشیا کلی* اسهال‌زا به‌ترتیب ۱۲/۲٪ و ۶٪ مشاهده گردید، اما در هیچ‌کدام از جدایه‌ها ژن *st1a* جداسازی نگردید. در برخی از پژوهش‌ها از آزمون PCR برای شناسایی عوامل حدت ETEC استفاده شده است.در آزمون های سنتی PCR نیاز به ازدیاد ژن در دستگاه ترموسایکلر و پس از آن استفاده از ژل الکتروفورز دارد که به‌همین دلیل زمان‌بر و طاقت فرسا هستند (۲۶). مهم‌ترین مزیت تکنیک Real-time PCR، سرعت زیاد آن به‌دلیل عدم نیاز به مراحل پس از PCR برای شناسایی محصولات ازدیاد یافته می‌باشد. ما در این پژوهش برای اطمینان از نتایج Real-time PCR، هم‌زمان از روش PCR چندگانه و الکتروفورز نیز برای پایش ژن‌های *lt* و *st* استفاده نمودیم که نتایج مشابهی را به‌دنبال داشت. بنابراین، استفاده از روش Real-time PCR به‌منظور پایش گسترده سویه ETEC در بررسی‌های اپیدمیولوژی مولکولی می‌تواند ارزشمند باشد. از اواخر دهه ۱۹۷۰ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دوکسی‌سیکلین و تریمتوپریم-سولفامتوکسازول به عنوان داروی انتخابی علیه سویه های ETEC متداول شده است. اما به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه این باکتری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتری مانند سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و افلوکساسین به عنوان انتخاب‌های بعدی استفاده شده است. اما تا کنون مقاومت قابل توجهی از آن‌ها نیز گزارش نشده است. پژوهش‌های اخیر در بنگلادش و هند جداسازی سویه‌های ETEC دارای مقاومت چندگانه را نشان داده است. مطالعات انجام شده از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۱ بر روی این باکتری‌ها مقاومت چندگانه به اریترومایسین، آمپی سیلین، تتراسیکلین، استرپتومایسین و داکسی‌سیکلین را نشان داده است. اما تنها در موارد محدودی مقاومت به سیپروفلوکساسین گزارش شده است. همچنین پژوهش‌های انجام شده در هند تایید کننده مقاومت چند دارویی شامل مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و فلوروکینولون‌ها بوده است (۴). تاکنون هیچ گزارشی از بررسی حساسیت ضدمیکروبی در مورد سویه‌های ETEC در ایران ارائه نشده است. اما پژوهش ما نشان دهنده مقاومت چند دارویی تمامی سویه‌های جدا شده به ویژه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین، اریترومایسین و کینولون‌ها بود. از این رو این مساله می‌تواند به عنوان یک زنگ خطر در مورد شیوع سویه‌های ETEC در کشور در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ETEC، یکی از عوامل مهم اسهال در کودکان زیر یک سال می‌باشد. از این‌رو پایش گسترده بیمارستانی، ژنوتایپینگ و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های ETEC در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به‌دلیل حمایت‌های اجرایی، کمال تشکر را دارند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

References

1. Davidson G, Brane G, Bass D, Cohen M, Fassano A, Guandalini S. Infectious diarrhea in children: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 35: S143-150.
2. Hien B, Scheutz F, Dac Cam P, Serichantalergs O, Huong T, Thu T, Dalsgaard A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 2008; 46: 996–1004.
3. Muller D, Greune L, Karch H, Fruth A, Tschape H, Schmidt A. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step Multiplex PCR. J Clin Microbiol 2007; 73: 3380–3390.
4. Qadri F, Svennerholm A, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 465–483.
5. Alam NH. Treatment of infectious diarrhea in children. Paediatr Drugs 2003; 5:151–165.
6. Guion E, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and Real-time Multiplex PCR. J Clin Microbiol 2008; 46: 1752–1757.
7. Toma CY, Lu Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol 2003; 41:2669–2671.
8. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
9. Rivera FP, Ochoa TH, Maves RC, Bernal M, Medina AM, Meza R, et al. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from peruvian children. J Clin Microbiol 2010; 48: 3198-3203.
10. Presterl P, Zwick R, Reichmann R, Aichelburg A, Winkir S, Kremsner PG, Graninger W. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. Am J Trop Med Hyg 2003; 69: 406–410.
11. Vieira N, Solberg OD, Ponce K, Howsmon R, Cevallos W, Trueba G, et al. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. Am J Trop Med Hyg 2007; 76:528-33.
12. Yang J, Wu F, Tsai J, Mu J, Lin L, Chen K, et al. Comparison between O serotyping method and Multiplex Real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45: 3620-5.
13. Nessa k, Ahmed D, Islam J, Lutful MF, Anowar M. usefulness of a Multiplex PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in a diagnostic microbiology laboratory setting. Bangladesh J Med Microbiol 2007; 01: 38-42.
14. Arif K, Salih L. identification of different categories of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool samples by using Multiplex PCR technique. Asian J Med Sciences 2010; 2: 237-243.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]

15. Nweze EI. Virulence properties of diarrheagenic *E. coli* and etiology of diarrhea in infants, young children and other age groups in southeast, Nigeria. American-Eurasian J Scient Res 2009; 4: 173-179.
16. Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. New Microbiol 2011; 34: 45-51
17. Jafari F, Shokorzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh_Arabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to entropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Jpn J Infect Dis 2008; 61: 269-273.
18. Jafari F, Garsia_Gil LJ, Salmanzadeh_Arabi S, Shokorzadeh L, Aslani MM, Pourhoseingholi MA, et al. Diagnostic and prevalence of entropathogenic bacteria in children less 5 years of age with acute diarrhea in Tehran chidren's hospital. J Infec 2009; 58: 21-27.
19. Reyes D, Vilchez S, Paniagua M, Colque-Navarro P, Weintraub A, Kuhn I. Diarrheagenic *Escherichia coli* markers and phenotypes among fecal *E. coli* isolates collected from Nicaraguan infants. J Clin Microbiol 2010; 48: 3395–3396.
20. Shehabi A, Bulos N, Hajjaj KG. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in Jordanian children. Scand J Infect Dis 2003; 35: 368-371.
21. Schultsz C, Ende J, Cobelen F, Vervoort T, van Gompe A, Wetsteyn JCFM, Dankert J. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. J Microbiol 2000; 38: 3550-3554.
22. Vidal R, Vidal MC, Lagos R, Levine M, Prado V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2004; 42: 1787–1789.
23. Vidal M, Kruger E, Duran C, Lagos R, Levine M, Prado V, Roberto T. Single Multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. J Clin Microbiol 2005; 43: 5362–5365.
24. Spano L, Sadovsky AI, Segui PN, Saick KW, Kitagawa MS, Pereira EL, et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. J Clin Microbiol 2008; 57: 359–363.
25. Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Ben Haasen A. Etiology of Acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. Am J Trop Med Hyg 2007 ;77: 571–582.
26. Johnson JRP, Delavari M, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis 2001; 183:78–88.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-12]