

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

محمد کارگر<sup>۱</sup>، پژمان عباسی<sup>۲</sup>، عباس دوستی<sup>۳</sup>، صادق قربانی دالینی<sup>۲</sup>

۱. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران (مولف مسئول) تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۵۶۹۷-۰۷۱۱ 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* تولیدکننده 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 *stIa*، *lt* 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.

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

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

### مقدمه

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

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

به منظور پیشگیری در مسافری کشورهای در حال توسعه می باشد (۴).

متاسفانه با وجود اهمیت بیماری زایی سویه های ETEC، پژوهش های محدودی در مورد پایش دقیق این باکتری در ایران انجام شده است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی شیوع و بررسی ژن های بیماری زای 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 ۱۳۸۹ در یک مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۲۸۵ نمونه اسهالی از کودکان زیر ۲ سال از بیمارستان های 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 پرسش نامه تنظیمی ثبت گردید.

#### جداسازی باکتری

پس از انتقال سریع نمونه ها به آزمایشگاه، به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تعیین هویت اولیه، از محیط EMB (Eosine Methylene Blue Lactose agar) استفاده گردید. سپس کلنی های تخمیر کننده لاکتوز دارای جلای سبز فلزی مشکوک به *اشریشیا کلی* با استفاده از تست های بیوشیمیایی TSI، SIM، MR/VP، سیمون سترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز تعیین هویت گردیدند. سپس کشت خالص سویه های تایید شده تا قبل از انجام آزمون های مولکولی در محیط واجد گویچه های شیشه ای دارای گلیسرول در حرارت ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی گردیدند. تمامی محیط کشت های مورد استفاده مربوط به شرکت مرک آلمان بودند.

در کشورهای در حال توسعه ارتباط دارد (۳). دوره کمون این بیماری کوتاه و بین ۱۴ تا ۵۰ ساعت می باشد و مهم ترین علائم بالینی عفونت های ETEC اسهال آبکی، استفراغ، کرامپ شکمی و تب ضعیف می باشد. اسهال آبکی معمولاً بدون خون، موکوس یا چرک مشاهده می شود. معمولاً اسهال ناشی از ETEC در ۳ تا ۵ روز، خود به خود بهبود می یابد و شدت آن ممکن است خفیف تا شبه وبایی باشد (۴). سویه های 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 ادامه پژوهش ها، دوپونت و همکاران توانایی سویه های ETEC را در ایجاد اسهال در داوطلبان بزرگسال نشان دادند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده اند که آب و غذای آلوده معمول ترین منابع انتقال سویه های ETEC هستند (۵). عموماً سویه های ETEC پس از استقرار در سطح مخاطی روده کوچک توانایی تولید انتروتوکسین های خود و افزایش ترشح سلولی را دارند. مهم ترین عوامل بیماری زایی ETEC انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (STIa/STIb) هستند. ژن های بیماری زای *lt* و *stIa/stIb* به ترتیب کد کننده انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و انتروتوکسین مقاوم به حرارت (STIa/STIb) می باشند (۳). مطالعات مختلف نشان داده اند که سویه های ETEC توانایی تهاجمی محدودی بر روی کشت های سلولی از خود نشان می دهند. بنابراین سویه های ETEC از طریق فعالیت انتروتوکسین های LT و ST موجب بروز اسهال می شوند و ممکن است هر دو توکسین یاد شده یا تنها یکی از آن ها در یک سویه بیان شود. به دلیل حساسیت زیاد ETEC به داکسی سیکلین و به دلیل نیمه عمر طولانی آن در مدفوع، این دارو اولین انتخاب

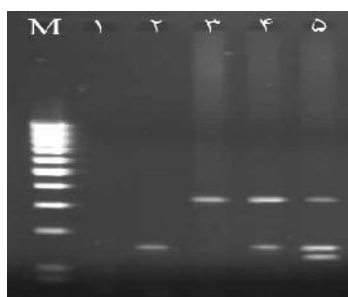
## آزمون PCR چندگانه

شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ، اتصال در دمای  $58^{\circ}\text{C}$  و گسترش در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  هر کدام به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً ۵ دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  جهت گسترش نهایی انجام گردید. از سویه *اشرشیا 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).

کلنی‌های *اشرشیا کلی* بر روی محیط LB به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس با استفاده از دستورالعمل کیت ساخت شرکت سیناژن ایران (DNP<sup>TM</sup> Kit) استخراج DNA انجام شد. آزمون PCR چندگانه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۰/۱ میلی‌مول  $\text{MgCl}_2$ ، ۱/۵ واحد پلی DNA مرز *Taq* (شرکت سیناژن، ایران)، ۰/۲ میلی‌مول از هر کدام از پرایمرها (۶ و ۷) (جدول ۱) انجام شد. شرایط دمایی PCR

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

منبع	$T_m$ تکثیر	سایز تکثیر (bp)	توالی‌های پرایمرها	ژن	ویروتیپ
۶	۸۰/۶	۱۵۹	F: TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA F: TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA R: GCAGGATTACAACAATTCACAGCAG	<i>stla</i> <i>stlb</i> <i>st</i>	<i>ETEC</i>
۷	۸۵/۸	۳۲۲	F: TCTCTATGTGCATACGGAGC R: CCATACTGATTGCCGCAAT	<i>lt</i>	<i>ETEC</i>



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 *stla*، ردیف ۳: آمپلیکون ۳۲۲ جفت بازی ژن *lt*، ردیف ۴: نمونه دارای هر دو ژن *stla* و *lt* و ردیف ۵: کنترل مثبت واجد هر سه ژن *stla* و *stlb*

## آزمون Real-time PCR

آزمون Real-time PCR برای شناسایی سویه های ETEC در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مانند PCR چندگانه همراه با ۱ میکرولیتر SYBR Green I (Invitrogen, Rotor- کشور آمریکا) انجام شد. این واکنش در دستگاه Gene 6000 (Corbett Research, Australia) و با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و در ادامه  $45^{\circ}\text{C}$  چرخه شامل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و  $58^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً آنالیز منحنی ذوب از دمای  $70^{\circ}\text{C}$  تا  $99^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد با بررسی شدت فلورسانس در هر ۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه انجام گردید. تمامی واکنش ها ۳ بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی نیز استفاده شد. داده های به دست آمده به وسیله نسخه ۱/۷ نرم افزار rotor-gene 6000 پردازش گردید.

## ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیکی با روش استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام گردید (۸). میزان حساسیت کلنی ها به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم ( $30\mu\text{g}$ )، سفتری آکسون ( $30\mu\text{g}$ )، سفکسیم ( $5\mu\text{g}$ )، آمپی سیلین ( $10\mu\text{g}$ )، پنی سیلین ( $10\text{U}$ )، ایمی پنم ( $10\mu\text{g}$ )، سیپروفلوکساسین ( $5\mu\text{g}$ )، لووفلوکساسین ( $5\mu\text{g}$ )، نالیدیکسیک اسید ( $30\mu\text{g}$ )، کلرامفنیکل ( $30\mu\text{g}$ )، تتراسیکلین ( $30\mu\text{g}$ )، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول ( $23/75\mu\text{g}$  و  $1/25$ )، استرپتومایسین ( $10\mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10\mu\text{g}$ )، آمیکاسین ( $30\mu\text{g}$ )، نیتروفوراتونین ( $300\mu\text{g}$ )، آزیترومایسین ( $15\mu\text{g}$ )، کلاریترومایسین ( $15\mu\text{g}$ ) و اریترومایسین ( $15\mu\text{g}$ ) با اندازه گیری قطر هاله بازدارنده رشد با توجه به دستور شرکت Mast کشور انگلستان ارزیابی شد. از سویه اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل استفاده گردید.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هفدهم/پاییز ۱۳۹۲

## آنالیز آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نسخه هفدهم نرم افزار SPSS (*SPSS Inc., Chicago, IL., USA*)، آزمون مربع کای، انجام گردید. سطح معنی داری در  $p < 0.05$  قرار داده شد.

## یافته ها

در مجموع تعداد ۲۸۵ نمونه اسهالی از کودکان زیر دو سال در شهر شیراز مورد مطالعه قرار گرفت. از این تعداد، ۱۶۵ نمونه ( $58\%$ ) مربوط به پسران و ۱۲۰ نمونه ( $42\%$ ) مربوط به دختران بود. از مجموع نمونه های مورد پژوهش با استفاده از روش کشت و تست های استاندارد بیوشیمیایی، ۴۹ مورد ( $17\%$ ) سویه های اشریشیا کلی تولید کننده اسهال (DEC) جداسازی گردید که ۲۹ مورد ( $59\%$ ) مربوط به پسران و ۲۰ مورد ( $41\%$ ) مربوط به دختران بود. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که بین جنسیت و گروه های سنی در افراد مبتلا به اسهال ناشی از DEC ارتباط معنی داری وجود ندارد ( $p = 0.199$ ).

۲۱ مورد ( $43\%$ ) از بیماران آلوده به DEC بستری و ۲۸ مورد ( $47\%$ ) به صورت سرپایی درمان شدند. هم چنین آنالیز آماری نشان داد که بین چگونگی درمان و جداسازی باکتری DEC ارتباط معنی داری وجود ندارد ( $p = 0.475$ ). میزان فراوانی نسبی سویه های اشریشیا کلی جداسازی شده در فصل بهار، تابستان و پاییز به ترتیب  $37\%$ ،  $47\%$  و  $16\%$  بود. با آزمون مربع کای مشخص شد که ارتباط معنی داری ( $p = 0.028$ ) بین فصول مورد مطالعه و فراوانی نسبی DEC وجود دارد.

با ردیابی ژن های بیماری زایی *stla*، *lt* و *stlb* توسط هر دو روش PCR چندگانه و Real-time PCR، ۷ مورد ( $14/3\%$ ) سویه ETEC شناسایی گردید. از سویه های جدا شده، ۴ مورد ( $57/14\%$ ) حاوی ژن *lt*، ۱ مورد ( $14/29\%$ )

به پسرها بودند. اما بین جنسیت ( $p=0/257$ ) و سن کودکان زیر دو سال ( $p=0/982$ ) و شیوع ETEC ارتباط معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲).

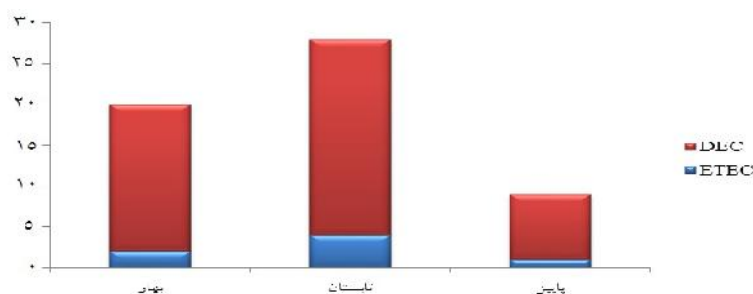
حاوی ژن *stIa* و ۲ مورد ( $28/57\%$ ) به صورت هم‌زمان ژن‌های *lt* و *stIa* را داشتند. از سویه‌های یاد شده ۵ مورد ( $71/43\%$ ) مربوط به دختران و ۲ مورد آن ( $28/57\%$ ) مربوط

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)

و فراوانی سویه‌های ETEC ارتباط معنی داری وجود ندارد ( $p=0/368$ ). در بیماران مبتلا ETEC، در ۵ نفر ( $71/43\%$ ) اسهال آبکی، در ۲ نفر ( $28/57\%$ ) اسهال خونی، در ۵ نفر ( $71/43\%$ ) تب و در ۳ نفر ( $42/56\%$ ) از استفراغ گزارش شد (جدول ۳).

به دلیل جمع آوری تصادفی نمونه‌ها، توزیع فراوانی بیماران در فصل‌های مختلف متفاوت بود. فراوانی نسبی سویه‌های ETEC جداسازی شده در فصل‌های بهار، تابستان و پاییز به ترتیب  $4/1\%$ ،  $8/2\%$  و  $2\%$  بود (نمودار ۱). با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که بین فصول مورد پژوهش



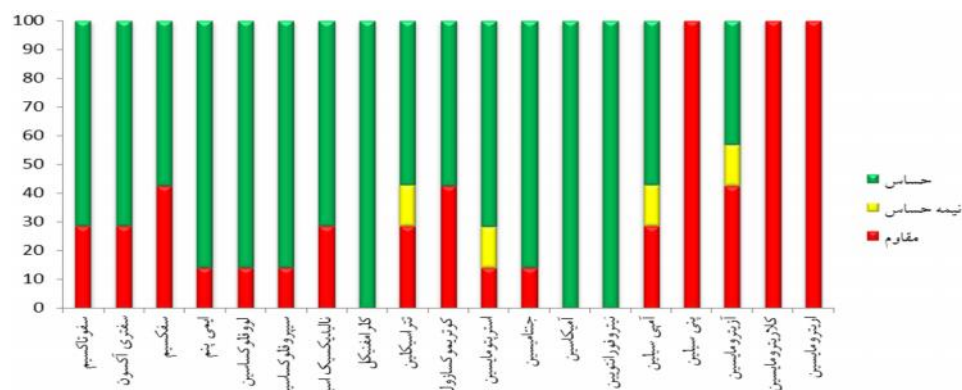
نمودار ۱: توزیع فراوانی سویه‌های ETEC و DEC بر اساس فصول پژوهش.

جدول ۳: مشخصات بالینی کودکان مبتلا به ETEC.

جنسیت	سن	اسهال آبیکی	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	+	-	+	-	+

که تمامی ۷ نمونه ETEC به بیش از ۴ گروه آنتی بیوتیکی مقاوم می باشند. فراوانی مقاومت چند دارویی به ۴، ۵ و ۹ گروه آنتی بیوتیکی به ترتیب ۷۱/۴٪، ۱۴/۳٪ و ۱۴/۳٪. شناسایی گردید (نمودار ۲).

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمامی سویه های ETEC به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، آمیکاسین و نیتروفورانئوئین حساس و نسبت به پنی سیلین و ماکرولیدها مقاومت داشتند. همچنین این آزمون نشان داد



نمودار ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اشریشیا کلی اترو توکسیژنیک.

سویه های ETEC در ایجاد اسهال کودکان، اما گزارش های 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 سویه های DEC متعلق به ویرو تیپ ETEC می باشند. Amisano و همکاران در فاصله سال های 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 ژن های بیماری زای *lt* و *stx*، با روش PCR در ۴ مورد (۰/۵٪) ETEC را شناسایی کردند (۱۶). Arif و

## بحث

اشریشیا کلی اترو توکسیژنیک (ETEC) از مهم ترین عوامل ایجاد کننده اسهال در نوزادان و کودکان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد (۲). بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، این پاتوژن روده ای دومین عامل مرگ و میر پس از روتاویروس ها در کودکان می باشد (۹). ویرو تیپ ETEC در برخی از کشورهای در حال توسعه مانند؛ گابن، اکوادور، تایوان، بنگلادش، عراق و نیجریه به عنوان اصلی ترین عامل ایجاد بیماری اسهالی در کودکان معرفی شده است (۱۵-۱۰). با وجود اهمیت قابل توجه مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هجدهم/پاییز ۱۳۹۲

متفاوت و همچنین توزیع جغرافیایی مناطق مورد پژوهش می‌باشد. مهم‌ترین علایم بالینی شناسایی شده در پژوهش ما اسهال آبکی، تب و به میزان کم تر 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 به ترتیب 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* اسهال‌زا 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* به ترتیب 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 به ترتیب ۴/۳٪ و ۱۴٪ گزارش کردند (۲۵). Nweze و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نیجریه فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به ترتیب ۲/۷٪ و ۱/۵٪ گزارش نمودند (۱۵). پژوهش‌های Reyes و همکاران در سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ در نیکاراگوئه نشان داد که فراوانی

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 Rivaler 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 آمریکا 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 می‌توان ارائه نمود. اختلاف در میزان فراوانی سویه‌های ETEC در مطالعات مختلف، به دلیل استفاده از تکنیک‌های تشخیصی

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 اریترومايسين، آمپی سیلین، تتراسیکلین، استرپتومايسين و داکسی سیکلین 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 ضد میکروبی 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، آمپی سیلین، اریترومايسين 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 این رو 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 به دلیل حمایت‌های اجرایی، کمال تشکر را دارند.

ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* به ترتیب ۶/۵٪ و ۱/۴٪ می‌باشد (۱۹). همچنین Amisano و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ایتالیا، فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به ترتیب ۴٪ و ۲/۷٪ گزارش کردند (۱۶). Arif و همکاران در سال ۲۰۰۹ در عراق شیوع ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را به ترتیب ۱۰/۵٪ و ۱۵/۸٪ گزارش نمودند (۱۴). همچنین جعفری و همکاران در تهران فراوانی ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *st* را در کودکان زیر ۵ سال را به ترتیب ۳/۷٪ و ۴/۵٪ و در افراد بالاتر از ۱۴ سال فراوانی ژن‌های یاد شده را به ترتیب ۱۵/۴٪ و ۲۲/۴٪ گزارش کردند (۱۷ و ۱۸). در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن‌های بیماری‌زایی *lt* و *stIa* در بین سویه‌های /شریشیا کلی اسهال‌زا به ترتیب ۱۲/۲٪ و ۶٪ مشاهده گردید، اما در هیچ کدام از جدایه‌ها ژن *stIa* جداسازی نگردید. در برخی از پژوهش‌ها از آزمون PCR برای شناسایی عوامل حدت ETEC استفاده شده است. در آزمون‌های سنتی PCR نیاز به ازدیاد ژن در دستگاه ترموسایکلر و پس از آن استفاده از ژل الکتروفورز دارد که به همین دلیل زمان‌بر و طاقت فرسا هستند (۲۶). مهم‌ترین مزیت تکنیک Real-time PCR، سرعت زیاد آن به دلیل 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 به دنبال داشت. بنابراین، استفاده از روش Real-time PCR به منظور پایش گسترده سویه ETEC در بررسی‌های اپیدمیولوژی مولکولی می‌تواند ارزشمند باشد. از اواخر دهه ۱۹۷۰ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دوکسی سیکلین و تریمتوپریم-سولفامتوکسازول به عنوان داروی انتخابی علیه سویه‌های ETEC متداول شده است. اما به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه این باکتری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتری مانند سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و افلوکساسین به عنوان

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره هجدهم/پاییز ۱۳۹۲

## 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.

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 enteropathogenic 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 enteropathogenic bacteria in children less 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospital. *J Infect* 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. Schultz 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, Sadosky 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.