

# شناسایی اشریشیاکلی مهاجم با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در کودکان مبتلا به اسهال

وحید آیین<sup>۱</sup>، محمد کارگر<sup>۲</sup>، عباس دوستی<sup>۳</sup>، محسن غلامی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، <sup>۲</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران، <sup>۳</sup>مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۴

## چکیده

**زمینه و هدف:** تیپ‌های بیماری‌زای مهاجم اشریشیاکلی به سلول‌های اپیتلیال روده حمله نموده و سبب تخریب و مرگ سلول‌ها و هم‌چنین اسهال خونی می‌شوند. هدف از این مطالعه، شناسایی تیپ بیماری‌زایی اشریشیاکلی مهاجم با استفاده از تکنیک روش زنجیره‌ای پلی‌مرز در کودکان مبتلا به اسهال بود.

**روش بررسی:** این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۲۰۰ نمونه مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده از کودکان شهرستان یاسوج انجام شد. پس از تشخیص اولیه باکتری اشریشیاکلی با استفاده از کشت و روش‌های بیوشیمیایی، تشخیص پاتوتیپ اشریشیاکلی مهاجم با شناسایی ژن *ipaH* به وسیله روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن آگار مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون‌های آماری مربع کای و بینومیل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** فراوانی پاتوتیپ اشریشیاکلی مهاجم، ۱۶ مورد بود. در میان جدایه‌ها بیش‌ترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و بیش‌ترین مقاومت نیز به سفتری‌زوکسیم مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** تیپ بیماری‌زای اشریشیاکلی مهاجم در این مطالعه، نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده شیوع متوسطی دارند. با توجه به اهمیت کلینیکی این سویه در ایجاد اسهال خونی، پایش گسترده بیمارستانی این پاتوتیپ با استفاده از روش‌های دقیق مولکولی در سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** اشریشیاکلی مهاجم، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

\* نویسنده مسئول: وحید آیین، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی.

Email: vahid\_aein@hotmail.com

مقدمه

بیماری اسهال یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد که برآورد می‌شود حدود ۳ تا ۵ میلیون از موارد این بیماری منجر به مرگ شود. انواع متفاوتی از سویه‌های اشریشیاکلی ایجادکننده اسهال در این بیماری نقش دارند و کودکان نیز به وسیله پاتوتیپ‌های متفاوتی درگیر می‌شوند (۱ و ۲). حضور سویه‌هایی که می‌توانند عامل دیسانتری باشند و از لحاظ بیوشیمیایی نزدیک به اشریشیاکلی و شیگلا باشند در سال ۱۹۹۴ به عنوان یک سؤال مطرح و به موضوعی مورد مناقشه تبدیل شد (۳). توانایی اسهال‌زایی این سویه‌ها که اشریشیاکلی مهاجم نامیده شدند، به وسیله پژوهشی در سال ۱۹۷۱ نشان داده شد (۴). این پژوهش نشان داد که سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم و شیگلا از لحاظ بیوشیمیایی، ژنتیکی و بیماری‌زایی، خیلی به هم نزدیک و مرتبط هستند، اما پیشنهاد داده شد که اشریشیاکلی مهاجم، به عنوان یک گونه در جنس اشریشیاکلی قرار بگیرند (۶ و ۵). این سویه مانند شیگلا سبب تهاجم به سلول‌های اپیتلیال روده و تخریب و مرگ سلول‌ها می‌شود. تهاجم این باکتری به مخاط روده بزرگ با علایم بالینی تب، کرامپ شدید شکمی و اسهال آبکی همراه با مقادیر زیاد خون و موکوس است. این سویه از نظر ژنتیکی و بیماری‌زایی ارتباط نزدیکی با گونه‌های شیگلا دارد. کسب پلاسمید مهاجم *Pinv* باعث کد کردن محصولات مرتبط با توانایی حمله این سویه، به بافت‌های میزبان می‌شود (۷ و ۸) که مهم‌ترین فاکتور افتراق دهنده اشریشیاکلی مهاجم و شیگلا از انواع بیماری‌زای اشریشیاکلی باشد. نزدیک به یک سوم این پلاسمید بزرگ، کد کننده عناصر الحاقی و حاوی منطقه ۳۰ kb به

منظور حمله باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده می‌باشد (۹). خیلی از اجزای سیستم ترشحی تیپ ۳ از قبیل؛ فعال‌کننده رونویسی، برخی افکتورها و چاپرون‌های کد کننده به وسیله منطقه ذکر شده و همچنین بیان *Inv* همگی به وسیله *VirB* و *MxiE* تنظیم می‌شوند (۱۰). علاوه بر ژن‌های پلاسمید مهاجم، خیلی از ژن‌های کروموزومی که اختصاصی گونه شیگلا نیستند و به وسیله کروموزوم حمل می‌شوند برای بیماری زای مورد نیاز هستند (۹). این باکتری به سلول‌های اپیتلیال نفوذ کرده و سپس واکوئل اندوسیتیک را لیز کرده و در داخل سلول‌های اپیتلیال تکثیر پیدا می‌کند. سپس از طریق سیتوپلاسم منتشر شده و سلول‌های مجاور را نیز آلوده می‌کند. حرکت سیتوپلاسمی به واسطه اکتین صورت می‌گیرد. به مکان عفونت شیگلا و اشریشیاکلی مهاجم، کلونیک موکوس می‌گویند، جایی که تهاجم به سلول‌های *M*، ماکروفاژها و سلول‌های اپیتلیال رخ می‌دهد و باعث اسهال آبکی می‌شود. در موارد شدید نیز ممکن است با دیسانتری حاوی خون و موکوس همراه باشد (۱۱). سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم ممکن است یک توکسین با اندازه ۶۳kDa به وسیله ژن *Sen* تولید کنند که در فعالیت انتروتوکسیک این سویه‌ها نقش بسزایی دارد (۱۲). مشخصات بیوشیمیایی کمی برای تمایز شیگلا و اشریشیاکلی مهاجم از یکدیگر وجود دارد، ۲ راه ساده بدین منظور، تست موکات و استات می‌باشد. اشریشیاکلی مهاجم ممکن است در هر ۲ تست مثبت باشد. با توجه به این که سویه شیگلا در هردو مورد منفی است (۱۱). تخمیر سالیسین و هیدرولیز اسکولین، نیز برای افتراق و جداسازی این ۲ گروه استفاده می‌شود (۳). از میان سروتیپ‌های مربوط به

اشريشياکلی مهاجم: O124، O112ac، O152 با بیان آنتی ژن O در گونه شیگلا یکسان هستند (۶). توانایی ایجاد کراتوکونژکتیویت در چشم خوچه هندی و ایجاد پلاک در سلول‌های یک لایه هلا، روش‌های استاندارد برای شناسایی جدایه‌های اشريشياکلی مهاجم هستند. به هر حال روش‌های مولکولی جایگزین این روش‌های فنوتیپی شده است (۱۳) که شامل افزایش و تکثیر تعداد زیاد ژن *ipaH* (۴-۱۰ کپی) است و این ژن حاوی کپی‌هایی در کروموزوم و پلاسمید می‌باشد (۱۵ و ۱۴). این روش اشريشياکلی مهاجم و شیگلا را از دیگر پاتوژن‌های ایجاد کننده اسهال متمایز می‌کند، اما تلاش‌ها، روش‌های مولکولی را جهت شناسایی دو ارگانیزم توسعه داده‌اند (۱۷ و ۱۶). متأسفانه با وجود اهمیت بیماری‌زایی سویه اشريشياکلی مهاجم و توانایی این سویه در تولید اسهال خونی، پژوهش‌های محدودی در مورد پایش دقیق این پاتوتیپ در ایران انجام شده است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی شیوع و بررسی ژن‌های بیماری‌زای اشريشياکلی مهاجم و همچنین بررسی تظاهرات بالینی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی مرتبط با آن در کودکان مبتلا به اسهال شهرستان یاسوج انجام گرفت.

#### روش بررسی

در یک مطالعه‌ی مقطعی - توصیفی و طی یک دوره ۴ ماهه، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع اسهالی از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر یاسوج از بهمن ماه سال ۱۳۹۰ تا پایان اردیبهشت سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. مراکز درمانی مورد پژوهش، بیمارستان امام سجاده (بیمارستان مرجع اطفال استان کهگیلویه و بویراحمد)

و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر یاسوج بودند. در تمامی نمونه‌ها اطلاعات کلینیکی مربوط به هر بیمار نیز در پرسش‌نامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه‌های مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده ابتدا بر روی محیط‌های مک کانکی، بلاد آگار، EMB<sup>(۱)</sup> و XLD<sup>(۲)</sup> کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، تعیین هویت کلنی‌های مشکوک به اشريشياکلی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی TSI<sup>(۳)</sup>، SIM<sup>(۴)</sup>، MRVP<sup>(۵)</sup>، سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز انجام شد. سپس سویه‌های اشريشياکلی جداسازی شده در میکروتیوب‌های حاوی محیط تریپتیکاز سوی برات واجد گلیسرول ۲۰ درصد استریل در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۵ و ۱۴).

به منظور بررسی ژن‌های بیماری‌زا، ایزوله‌های اشريشياکلی در محیط مولر هیتتون آگار کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری استخراج DNA با روش جوشاندن انجام گردید. برای ردیابی ژن *ipaH* از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای طراحی شده به وسیله ستابتر و همکاران استفاده شد (۱۸). آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۵ میکرومول MgCl<sub>2</sub>، ۱/۵ واحد Taq DNA پلی‌مرز (شرکت سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از پرایمرها انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ۹۴ درجه

1-EosinMethylene Blue  
2-Xylose lysine deoxycholate agar  
3-Triple Sugar Iron Agar  
4-Sulfide IndoleMotility  
5-Methyl Red/Voges-Proskauer

سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه (اتصال پرایمر)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه (گسترش پرایمر) ۳۳ سیکل و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. از سویه اشریشیاکلی ATCC 35401 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی بر اساس راهنمای استاندارد CLSI<sup>(۱)</sup> نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (رسکو، دانمارک)؛ سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفیکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتی‌زوکسیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۴۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۵ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۳/۷۵+۱/۲۵ میکروگرم)، افلوکساسین (۱۰ میکروگرم) و نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم) بررسی شد. از سویه اشریشیاکلی ATCC25922 به عنوان کنترل استفاده گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های مربع کای و بینومینال تجزیه و تحلیل شد.

#### یافته‌ها

در این پژوهش تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال شهرستان یاسوج مورد مطالعه قرار گرفت. گروه‌بندی سنی جمعیت مورد پژوهش به ۹ گروه سنی انجام شد (جدول ۱). از مجموع

نمونه‌های مورد پژوهش، ۱۱۴ نمونه (۵۷ درصد) مربوط به پسران و ۸۶ نمونه (۴۳ درصد)، مربوط به دختران بود. فراوانی اشریشیاکلی ایجاد کننده اسهال در جنس پسر و دختر به ترتیب ۲۸ (۱۴ درصد) و ۲۰ (۱۰ درصد) و در هر دو جنس مربوط به گروه سنی ۵-۳ ماه بود (جدول ۱). با استفاده از آزمون دو جمله‌ای مشخص گردید که بین بیماران پسر و دختر مورد پژوهش اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $p=0/56$ ). بیش‌ترین میزان جداسازی اشریشیاکلی ایجاد کننده اسهال، مربوط به فروردین ماه با ۶۳ مورد جداسازی (فراوانی ۳۱/۵ درصد) بود.

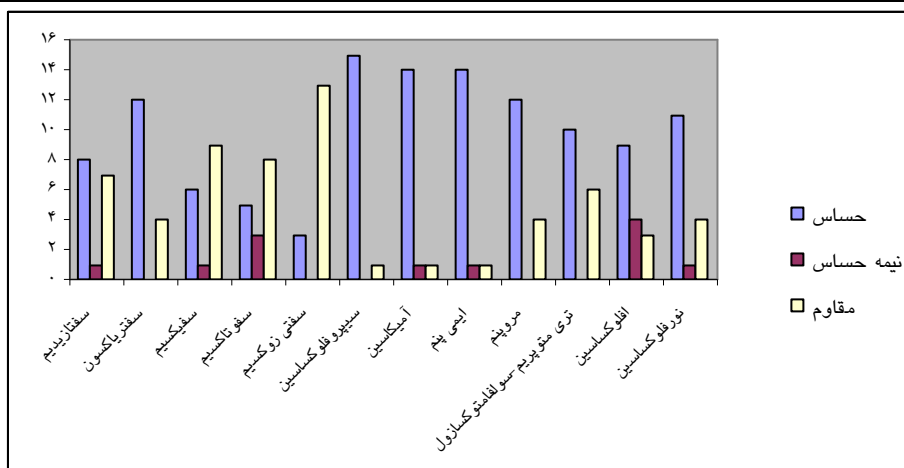
از این تعداد ۳۳ مورد (۱۶/۵ درصد) از پسران و ۳۰ مورد (۱۵ درصد) از دختران جداسازی گردید. با استفاده از آزمون مربع‌کای مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین فصل و جنسیت وجود ندارد ( $p=0/63$ ). در کل با استفاده از روش مولکولی PCR در ۱۶ نمونه (۸ درصد) سویه‌ی اشریشیاکلی مهاجم شناسایی شد و همه دارای ژن *ipaH* بودند. از این تعداد، ۷ مورد (۲/۵ درصد) مربوط به نمونه‌های جدا شده از پسران و ۹ مورد (۴/۵ درصد) مربوط به دختران بود. با استفاده از آزمون مربع‌کای نشان داده شد که ارتباط معنی‌داری بین تیپ اشریشیاکلی مهاجم و جنسیت وجود ندارد ( $p=0/26$ ). به دلیل جمع‌آوری تصادفی نمونه‌ها، توزیع فراوانی سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم در ماه‌های مختلف سال متفاوت بود. فراوانی این سویه در ماه‌های بهمن، اسفند، فروردین و اردیبهشت به ترتیب: ۲ (۱ درصد)، ۴ (۲ درصد)، ۵ (۲/۵ درصد)، ۵ (۲/۵ درصد) بود. با استفاده از آزمون مربع‌کای

مشخص شد که رابطه معنی دار بین مراکز درمانی و پاتوتیپ اشريشیاکلی مهاجم وجود ندارد ( $P=0/82$ ). ارزیابی حساسیت سویه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی، نشان داد که بیش‌ترین میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و ایمپنم وجود دارد. همچنین بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب مربوط به سفتری‌زوکسیم، سفوتاکسیم و سفیکسیم بود (نمودار ۱).

مشخص شد که بین ماه‌های مورد پژوهش و فراوانی سویه‌های اشريشیاکلی مهاجم ارتباط معنی داری وجود ندارد ( $p=0/59$ ). در کودکان مبتلا به اشريشیاکلی مهاجم؛ ۹ نفر (۴/۵ درصد) علائم اسهال خفیف، ۷ نفر (۳/۵ درصد) اسهال شدید، ۸ نفر استفراغ (۴ درصد) و ۹ نفر (۴/۵ درصد) نیز علامت تب را نشان دادند. فراوانی اشريشیاکلی مهاجم در جدایه‌های بیمارستانی ۱۰ مورد (۶۲/۵ درصد) و در آزمایشگاه‌های خصوصی ۶ مورد (۳۷/۵ درصد) بود. با استفاده از آزمون مربع کای

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی جمعیت مورد پژوهش بر اساس جنسیت و گروه سنی

گروه سنی (بر حسب ماه)	پسر	دختر	جمع کل
۰-۲	۶ (۳٪)	۴ (۲)	۱۰ (۵)
۳-۵	۲۸ (۱۴)	۲۰ (۱۰)	۴۸ (۲۴)
۶-۸	۲۷ (۱۳/۵)	۱۸ (۹)	۴۵ (۲۲/۵)
۹-۱۱	۱۶ (۸)	۹ (۴/۵)	۲۵ (۱۲/۵)
۱۲-۱۷	۱۷ (۸/۵)	۱۷ (۸/۵)	۳۴ (۱۷)
۱۸-۲۳	۴ (۲)	۴ (۲)	۸ (۴)
۲۴-۳۵	۹ (۴/۵)	۷ (۳/۵)	۱۶ (۸)
۳۶-۴۷	۲ (۱)	۲ (۱)	۴ (۲)
۴۸-۷۲	۵ (۲/۵)	۵ (۲/۵)	۱۰ (۵)
جمع	۱۱۴ (۵۷)	۸۶ (۴۳)	۲۰۰ (۱۰۰)



نمودار ۱: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی اشريشیاکلی مهاجم جدا شده از کودکان زیر ۵ سال شهر یاسوج

بحث

اسهال یکی از مهم‌ترین عوامل ابتلا و مرگ و میر اطفال می‌باشد و نیاز به شناسایی پاتوژن‌های ایجاد کننده آن یک موضوع مهم در بحث سلامت است (۲۰). در پژوهش‌های مختلف تعداد زیادی از پاتوژن‌ها از نظر توانایی ایجاد اسهال بررسی شده‌اند و *اشریشیاکلی* اسهال‌زا به عنوان پاتوژن مهم ایجاد اسهال عنوان شده است (۲۱). با وجود اهمیت قابل توجه سویه *اشریشیاکلی* مهاجم در ایجاد اسهال خونی، متأسفانه گزارش‌های محدودی در مورد ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی این باکتری در ایران وجود دارد. هدف از این پژوهش، شناسایی سویه *اشریشیاکلی* مهاجم با استفاده از روش PCR در کودکان مبتلا به اسهال شهر یاسوج بود.

در پژوهش انجام شده در برزیل (۲۰۰۷)، شیوع سویه *اشریشیاکلی* مهاجم با استفاده از تکنیک  $1/3$  درصد گزارش شد (۲۲). همچنین PCR مولکولی پژوهش انجام گرفته در ویتنام نیز به جداسازی و تشخیص سویه *اشریشیاکلی* مهاجم در کودکان زیر ۵ سال پرداخت که شیوع آن  $0/8$  درصد گزارش شد (۲۳). از مجموع ۵۲۰ نمونه جدا شده، *اشریشیاکلی* با ۱۰۲ مورد دارای بیش‌ترین شیوع بود. شیوع پاتوتیپ *اشریشیاکلی* مهاجم  $14/71$  درصد گزارش شد (۲۴). بررسی صورت گرفته در شمال غربی اکوادور نشان داد که *اشریشیاکلی* مهاجم بیش‌ترین شیوع را در میان نمونه‌های جداسازی شده دارد (۲۵). نتایج این پژوهش نشان دهنده درصد بالاتر آلودگی

نسبت به پژوهش انجام شده در برزیل و ویتنام است (۲۲ و ۲۳). روش‌های کشت و سرولوژی با توجه به محدودیت‌های تشخیصی، به مرور زمان جای خود را به روش‌های مولکولی داده‌اند. در پژوهش انجام شده نمونه ۱۵۵ مجموع در زاهدان، در ۱۳۷۷ و سال در اسهال مبتلا به کودکان ۶ ماهه تا ۶ ساله از مدفوع بررسی مورد پسر را ۱۰۳ و دختر ۵۲ شامل خونی ۱۳ درصد شیگلا و ۲۸ درصد نهایت در دادند. قرار گردید (۲۶). اکبری و گزارش مهاجم *اشریشیاکلی* سویه جداسازی به تهران، در ۱۳۸۷ سال در همکاران ۵ زیر کودکان اسهال *اشریشیاکلی* مهاجم در های جمع اسهالی نمونه ۳۰۰ مجموع در پرداختند. سال افتراقی بیوشیمیایی‌های تست از با استفاده و آوری مورد (۱۳ درصد) سویه ۳۹ جداسازی به موفق شدند. از بین *اشریشیاکلی*‌های جداسازی *اشریشیاکلی* شده ۷ مورد  $2/3$  درصد *اشریشیاکلی* مهاجم با شناسایی شد (۲۷). در بررسی PCR استفاده از تکنیک صورت گرفته در تایوان (۲۰۰۷)، شیوع سویه‌ی با استفاده از روش‌های *اشریشیاکلی* مهاجم  $20$  درصد گزارش Real-Time PCR سرولوژی و تکنیک شد (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۲ و در ویتنام به بررسی شیوع پاتوژن‌های سبب‌زای اسهال و دات Multiplex PCR با استفاده از روش‌های مولکولی بلات هیبریدی‌اسیون پرداخته شد. بیش‌ترین شیوع مربوط به شیگلا بود و *اشریشیاکلی*  $27/5$  درصد از شیوع را به خود اختصاص داد. فراوانی *اشریشیاکلی* مهاجم،  $0/8$  درصد گزارش شد (۲۹). تفاوت در

تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

شریشیاکلی مهاجم در مطالعه‌های گزارش سویه مختلف به علت توزیع جغرافیایی این سویه در مکان‌های مختلف جهان است، اما نکته واضح، نقش این پاتوتیپ در ایجاد اسهال کودکان است، بنابراین پایش گروه‌های سنی مختلف در فصول مختلف لازم است.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که /شریشیاکلی مهاجم از عوامل مهم ابتلا به اسهال به خصوص در اطفال می‌باشد. با توجه به کمبود مطالعه‌ها و پژوهش‌های موجود در زمینه شناسایی و افتراق این پاتوتیپ از دیگر پاتوژن‌های سبب‌زای اسهال، استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR در شناسایی این پاتوتیپ کمک کننده است. انجام مطالعه‌های گسترده و پایش مناطق مختلف کشور به منظور شناسایی این پاتوتیپ با استفاده از تکنیک‌های مولکولی ضروری به نظر می‌رسد. بررسی حساسیت یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده /شریشیاکلی مهاجم نشان داد که در حال حاضر سیپروفلوکساسین بهترین انتخاب برای درمان بیماران مبتلا به این باکتری می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد جهرم می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و هم‌چنین پرسنل محترم مرکز

## REFERENCES

1. Reyes D. Diarrheagenic *Escherichia coli* Markers and Phenotypes among Fecal *E. coli* Isolates Collected from Nicaraguan Infants. *J Clin Microbiol* 2010; 3395-96.
2. Schultsz C, van den Ende J, Cobelens F, Vervoort T, van Gompel A, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travellers. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3550-3554.
3. Van den Beld MJC, Reubsat FAG. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 899-904.
4. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
5. Benner DJ, Fanning GR, Steigerwalt AG, Orskov I, Orskov F. Polynucleotide sequence relatedness among three groups of pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 1972; 109: 953-965.
6. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationship of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun* 2004; 72: 5080-5088.
7. Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 252: 11-18.
8. Silva RM, Toledo MR, Trabulsi LR. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 441-444.
9. Sansonetti PJ. *Escherichia coli*, *Shigella*, antibiotic associated diarrhea, and prevention and treatment of gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 1992; 5: 66-73.
10. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 750-774.
11. Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval D, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, Levine MM, Morris Jr JG. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* 1995; 63: 4721-4728.
12. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella* spp and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2687-2691.
13. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989; 57: 1290-1298.
14. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting 4 genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta galactosidase. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 970-976.
15. Luscher D, Altwegg M. Detection of *Shigella*, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 285-290.
16. Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Busch U, Huber I. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1245-1251.
17. Yamazaki Y, Fukasawa A. Multiplex polymerase chain reaction method discriminating *Escherichia coli* and *Shigella* sp. *Arch Microbiol* 2011; 193: 83-87.
18. Sethabutr O, Echeverria P, Hoge CW, Bodhidatta L, Pitarangsi C. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR in the stools of patients with dysentery in Thailand. *J Diarrhoeal* 1994; 12: 265-269.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 2011.
20. Kargar M, Homayoon M. Outbreaks of Infection Sources and Antibiotic Resistance in EHEC Strains among Children Under 5 Years Old in Marvdasht. *J Islamic Azad University Tehran Medical Branch* 2010; 19: 268-73.
21. Brooks JT, Ochieng JB, Kumar L, Okoth G, Shapiro RL, et al. Surveillance for bacterial diarrhea and antimicrobial resistance in rural western Kenya, 1997-2003. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 393-401.
22. Katia Rsa, Sandra H. Single multiplex assay to identify simultaneously, enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing *coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267(6): 145-150.



23. Bui Thi Thu H, Flemming S, Phung Dac C, Oralak S, Tran Thu H, Tran Minh T, and Anders D. Characterization of 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.
24. Nweze E. Virulence Properties of Diarrheagenic *E. coli* and Etiology of Diarrhea in Infants, Young Children and Other Age Groups in Southeast, Nigeria. *Am J Sci* 2009; 4: 173-179.
25. Vieira N. High Prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am J Hyg* 2005; 76: 528-533.
26. Javadzadeh M. Role of Shigella, Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Entamoeba histolytica* in causing dysentery in children. *J Mazandaran University of Medical Science* 2003; 39(13): 29-35.
27. Akbari A, Pourmand Mr, Sharifi Yazdi Mk, Hosseini M, Soltan Dallal Mm. Isolation of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) from diarrhea in children by PCR technique. *Payavard Salamat*, 2010; 3: 25-30.
28. Ji-Rong Y, Fang-Tzy W, Jin-Lai T, Jung-Jung M, Ling-Fen L, Kuang-Lo C, Steve Hsu-Sung K, Chuen-Sheue C and Ho-Sheng W. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol* November 2007; 459(11): 3620-3625.
29. Hien B. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2008: 996-1004.

# Detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR technique in Children with Diarrhea

Aein V<sup>1\*</sup>, Kargar M<sup>2</sup>, Doosti A<sup>3</sup>, Gholami M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology Research Center, Yasuj University Of Medical Science, Yasuj, Iran, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Islamic Azad University Jahrom Branch, Jahrom, Iran, <sup>3</sup>Biotechnology Research Center, Islamic Azad University Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Received: 5 Jan 2014

Accepted: 24 April 2014

## Abstract:

**Background & aim:** Enteroinvasive *Escherichia coli* is one of the important agents of invasion to intestinal epithelial cells, damage and cell death which due to dysentery. The aim of this study was to detect Enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR technique from Children's Diarrhea in Yasuj.

**Methods:** This cross-sectional study was performed on 200 stool samples taken from children with diarrhea in Yasuj. After initial identification of *E. coli* strains by culture and biochemical tests, EIEC gene such as *ipaH* detected by PCR technique and antibiotic susceptibility of isolates was evaluated by using disc diffusion (CLSI) method.

**Results:** Out of all examined samples, 16(8%) EIEC were separated. Antibiotic susceptibility test showed that the most susceptible antibiotic is ciprofloxacin for EIEC and also most resistant antibiotic is ceftizoxime.

**Conclusion:** Results showed that EIEC strains have a moderate prevalence than other studies in our study area. Therefore, for importance of this strain to producing dysentery, hospital-wide surveillance using molecular techniques has been proposed in other regions of country.

**KeyWords:** Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogen, PCR, Antibiotic resistance

---

**Corresponding author:** Aein V, Clinical Microbiology Research Center, Yasuj University Of Medical Science, Yasuj, Iran

**Email:** Vahid\_aein@hotmail.com

## Please cite this article as follows:

Aein V, Kargar M, Doosti A, Gholami M. Detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR technique in Children with Diarrhea. Armaghane-danesh 2014; 19(8): 727-736.