جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۸، آبان ۱۳۹۳(شماره پی در پی۹۱)

شناسایی *اشریشیاکلی* مهاجم با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در کودکان مبتلا به اسهال

وحید آیین[۱*]، محمد کارگر[۲]، عباس دوستی[۳]، محسن غلامی[۲]

[۱]مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران،[۳]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/٤

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 پلی‌مراز 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 پلی‌مراز انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن آگار مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون‌های آماری مربع کای و بینومیال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: فراوانی پاتوتیپ اشریشیاکلی مهاجم، ۱٦ مورد بود. در میان جدایه‌ها بیش‌ترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و بیش‌ترین مقاومت نیز به سفتی‌زوکسیم 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 پلی‌مراز ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

* **نویسنده مسئول: وحید آیین، یاسوج**، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی.
Email: vahid_aein@hotmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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(۲و۱). حضور سویه‌هایی که می‌توانند عامل دیسانتری باشند و از لحاظ بیوشیمیایی نزدیک به اشریشیاکلی و شیگلا باشند در سال ۱۹۹٤ 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(٤). 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(٦ و٥). این سویه مانند شیگلا سبب تهاجم به سلول‌های اپیتلیال روده وتخریب ومرگ سلول ها می شود. تهاجم این باکتری به مخاط روده بزرگ با علایم بالینی تب، کرامپ شدید شکمی و اسهال آبکی همراه با مقادیر زیاد خون وموکوس 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 میزبانش می‌شود(۸و۷) 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 ۳۰kb به منظور حمله باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده می‌باشد(۹). خیلی از اجزای سیستم ترشحی تیپ۳ از قبیل؛ فعال کننده 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 وسپس واکوئل اندوسیتیک را لیز کرده و در داخل سلول های 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 ٦۳kDa 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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اشریشیاکلی مهاجم: O112ac,O124 و O152 با بیان آنتی‌ژن O در گونه شیگلا یکسان هستند(٦). توانایی ایجاد کراتوکونژکتیویت در چشم خوکچه هندی و ایجاد پلاک در سلول‌های یک لایه هلا، روش‌های استاندارد برای شناسایی جدایه‌های اشریشیاکلی مهاجم هستند. به هر حال روش‌های مولکولی جایگزین این روش‌های فنوتیپی شده است(١٣) که شامل افزایش و تکثیر تعداد زیاد ژن *ipaH* (٤-١٠کپی) است و این ژن حاوی کپی‌هایی در کروموزوم و پلاسمید می‌باشد(١٥و١٤). این روش اشریشیاکلی مهاجم و شیگلا را از دیگر پاتوژن‌های ایجاد کننده اسهال متمایز می‌کند، اما تلاش‌ها، روش‌های مولکولی را جهت شناسایی دو ارگانیسم توسعه داده‌اند(١٧و١٦). متأسفانه با وجود اهمیت بیماری‌زایی سویه اشریشیاکلی 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 اشریشیاکلی 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 ٤ ماهه، تعداد ٢٠٠نمونه مدفوع اسهالی از کودکان زیر ٥ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر یاسوج از بهمن ماه سال ١٣٩٠ تا پایان اردیبهشت سال ١٣٩١جمع‌آوری شد. مراکز درمانی مورد پژوهش، بیمارستان امام سجاد(ع) (بیمارستان مرجع اطفال استان کهگیلویه و بویراحمد) وآزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر یاسوج بودند. در تمامی نمونه‌ها اطلاعات کلینیکی مربوط به هربیمارنیز در پرسش‌نامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه‌های مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده ابتدا بر روی محیط‌های مک کانکی، بلاد آگار،EMB [1] و XLD [2] کشت داده شدند. پس از ٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، تعیین هویت کلنی‌های مشکوک به اشریشیاکلی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیاییTSI[3]، SIM[4]، MR/VP[5]، سیمون سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز انجام شد. سپس سویه‌های اشریشیاکلی جداسازی شده در میکروتیوب‌های حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث واجد گلیسرول ٢٠ درصد استریل در دمای ٢٠- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید(١٥ و ١٤).

به منظور بررسی ژن‌های بیماری‌زا، ایزوله‌های اشریشیاکلی در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند و پس از ٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری استخراج DNA با روش جوشاندن انجام گردید. برای ردیابی ژن ipaH، از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای طراحی شده به وسیله ستابتر و همکاران استفاده شد(١٨). آزمون PCR در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر حاوی ٢ میکرولیتر DNA الگو، ٢٠٠ میکرومول dNTPs، ١/٥ میکرومول $MgCl_2$، ١/٥ واحد Taq DNA پلی‌مراز (شرکت سیناژن، ایران) و ١ میکرولیتر از پرایمرها انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با شرایط ٩٥ درجه سانتی‌گراد ٥ دقیقه (واسرشت سازی ابتدایی)، ٩٤ درجه

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

سانتی‌گراد ٦٠ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ٥٨ درجه سانتی‌گراد ٦٠ ثانیه(اتصال پرایمر)، ٧٢ درجه سانتی‌گراد ٦٠ ثانیه (گسترش پرایمر)٣٣ سیکل و ٧٢ درجه سانتی‌گراد ٣ دقیقه (گسترش نهایی) انجام شد. در نهایت ١٠ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ١/٥ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرارگرفت. از سویه اشریشیاکلی ATCC 35401 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشرشیاکلی بر اساس راهنمای استاندارد CLSI[1] نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی(رسکو، دانمارک)؛ سفتازیدیم(٣٠ میکروگرم)، سفترياکسون(٣٠ میکروگرم)، سفیکسیم (٣٠ میکروگرم)، سفوتاکسیم (٣٠ میکروگرم)، سفتی‌زوکسیم(٣٠ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(١٠ میکروگرم)، آمیکاسین (٤٠ میکروگرم)، ایمی‌پنم(١٥ میکروگرم)، مروپنم (١٠ میکروگرم)، تری‌متوپریم‌ـ سولفامتوکسازول (١/٢٥+٢٣/٧٥ میکروگرم)، افلوکساسین (١٠ میکروگرم) و نورفلوکساسین (١٠ میکروگرم) بررسی شد. از سویه اشریشیا کلی 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 ٢٠٠ نمونه مدفوع کودکان زیر ٥ سال مبتلا به اسهال شهرستان یاسوج مورد مطالعه قرار گرفت. گروه‌بندی سنی جمعیت مورد پژوهش به ٩ گروه سنی انجام شد(جدول١). از مجموع نمونه‌های مورد پژوهش، ١١٤ نمونه(٥٧ درصد) مربوط به پسران و ٨٦ نمونه(٤٣ درصد)، مربوط به دختران بود. فراوانی *اشریشیاکلی* ایجاد کننده اسهال در جنس پسر و دختر به ترتیب ٢٨(١٤ درصد) و٢٠(١٠ درصد) و در هر دو جنس مربوط به گروه سنی ٥ ـ٣ ماه بود (جدول١). با استفاده از آزمون دو جمله‌ای مشخص گردید که بین بیماران پسر و دختر مورد پژوهش اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(p=٠/٥٦). بیش‌ترین میزان جداسازی *اشریشیاکلی* ایجاد کننده اسهال، مربوط به فروردین ماه با ٦٣ مورد جداسازی (فراوانی٣١/٥ درصد) بود.

از این تعداد ٣٣ مورد(١٦/٥ درصد) از پسران و ٣٠ مورد(١٥ درصد) از دختران جداسازی گردید. با استفاده از آزمون مربع‌کای مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین فصل و جنسیت وجود ندارد(p=٠/٦٣).

در کل با استفاده از روش مولکولی PCR در ١٦ نمونه(٨ درصد) سویه‌ی *اشریشیاکلی* مهاجم شناسایی شد و همه دارای ژن *ipaH* بودند. از این تعداد، ٧ مورد (٣/٥ درصد) مربوط به نمونه‌های جدا شده از پسران و ٩ مورد(٤/٥ 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=٠/٢٦). 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؛ ٢(١ درصد)، ٤(٢ درصد)، ٥ (٢/٥ درصد)، ٥ (٢/٥ درصد) بود. با استفاده از آزمون مربع‌کای

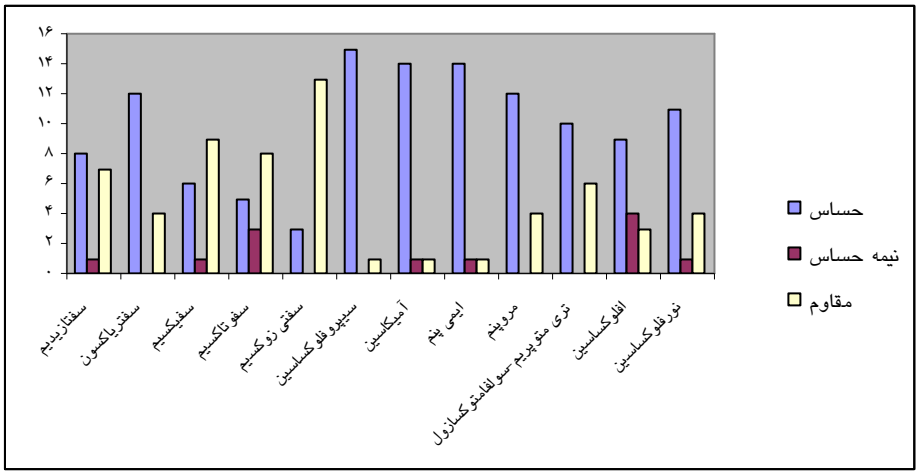
1-Clinical and Laboratory Standard Institute

مشخص شد که بین ماه‌های مورد پژوهش و فراوانی سویه‌های *اشریشیاکلی* مهاجم ارتباط معنی‌داری وجود ندارد(p=۰/۵۹). در کودکان مبتلا به *اشریشیاکلی* مهاجم؛ ۹ نفر(٤/٥ درصد) علایم اسهال خفیف، ۷ نفر (۳/٥ درصد) اسهال شدید، ۸ نفر استفراغ(٤ درصد) و ۹ نفر(٤/٥ درصد) نیز علامت تب را نشان دادند. فراوانی *اشریشیاکلی* مهاجم در جدایه‌های بیمارستانی ۱۰ مورد (٦٢/٥ درصد) و در آزمایشگاه‌های خصوصی ٦ مورد (۳۷/٥ درصد) بود. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که رابطه معنی‌دار بین مراکز درمانی و پاتوتیپ اشریشیاکلی مهاجم وجود ندارد(p=۰/۸۲).

ارزیابی حساسیت سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، نشان داد که بیش‌ترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و ایمی‌پنم وجود دارد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب مربوط به سفتی‌زوکسیم، سفوتاکسیم و سفیکسیم بود(نمودار ۱).

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	٦(٪۳)	٤(۲)	۱۰(٥)
۳-٥	۲۸(۱٤)	۲۰(۱۰)	٤۸(۲٤)
٦-۸	۲۷(۱۳/٥)	۱۸(۹)	٤٥(۲۲/٥)
۹-۱۱	۱٦(۸)	۹(٤/٥)	۲٥(۱۲/٥)
۱۲-۱۷	۱۷(۸/٥)	۱۷(۸/٥)	۳٤(۱۷)
۱۸-۲۳	٤(۲)	٤(۲)	۸(٤)
۲٤-۳٥	۹(٤/٥)	۷(۳/٥)	۱٦(۸)
۳٦-٤۷	۲(۱)	۲(۱)	٤(۲)
٤۸-۷۲	٥(۲/٥)	٥(۲/٥)	۱۰(٥)
جمع	۱۱٤(٥۷)	۸٦(٤۳)	۲۰۰(۱۰۰)



نمودار ۱: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی* مهاجم جدا شده از کودکان زیر ٥ 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 PCR ، ۱/۳ درصد گزارش شد(۲۲). هم‌چنین مولکولی پژوهش انجام گرفته در ویتنام نیز به جداسازی و تشخیص سویه *اشریشیاکلی* مهاجم در کودکان زیر ۵ سال پرداخت که شیوع آن ۰/۸ درصد گزارش شد(۲۳). از مجموع ۵۲۰ نمونه جدا شده، *اشریشیاکلی* با ۱۰۲ مورد دارای بیش‌ترین شیوع بود. شیوع پاتوتیپ *اشریشیاکلی* مهاجم ۱٤/۷۱ درصد گزارش شد(۲٤). 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 (۲۳و۲۲). 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 ۱۳۷۷و سال در اسهال مبتلا به کودکان ٦ ماهه تا ٦ ساله از مدفوع بررسی مورد پسر را ۱۰۳ و دختر ۵۲ شامل خونی ۱۳ درصد شیگلا و ۲۸ درصد نهایت در دادند. قرار گردید(۲٦). 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 بیوشیمیایی های‌تست از با استفاده و آوری مورد(۱۳ درصد) سویه ۳۹ جداسازی به موفق شدند. از بین *اشریشیاکلی*های جداسازی *اشریشیاکلی* شده ۷ مورد (۲/۳ درصد) *اشریشیاکلی* مهاجم با شناسایی شد(۲۷). در بررسی PCRاستفاده از تکنیک صورت گرفته در تایوان (۲۰۰۷)، شیوع سویه‌ی با استفاده از روش‌های *اشریشیاکلی* مهاجم ، ۲۰ درصد گزارش Real-TimePCR سرولوژی و تکنیک شد(۲۸). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۲ و در ویتنام به بررسی شیوع پاتوژن‌های سبب‌زای اسهال و دات Multiplex PCRبا استفاده از روش‌های مولکولی بلات هیبریدیزاسیون پرداخته شد. بیش‌ترین شیوع مربوط به *شیگلا* بود و *اشریشیاکلی* ۲۷/۵ درصد از شیوع را به خود اختصاص داد. فراوانی *اشریشیاکلی* مهاجم، ۰/۸ درصد گزارش شد (۲۹). تفاوت در

اشریشیاکلی 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 *اشریشیاکلی* 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 جداشده *اشریشیاکلی* 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 تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می دارند.

REFERENCES

1.ReyesD. Diarrheagenic*Escherichiacoli* 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 ClinMicrobiol 2000; 38: 3550-3554.
3.Van den Beld MJC, Reubsaet FAG. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive*Escherichiacoli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*.Eur J ClinMicrobiol Infect Dis 2012; 31: 899-904.
4.Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic*Escherichia coli*. ClinMicrobiol Rev1998; 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 MicrobiolLett 2005; 252: 11-18.
8.Silva RM, Toledo MR, Trabulsi LR. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*.J ClinMicrobiol 1980; 11: 441-444.
9.SansonettiPJ. *Escherichia coli*, *Shigella*, antibioticassociated diarrhea, and prevention and treatment of gastroenteritis.CurrOpin Infect Dis 1992; 5: 66-73.
10.Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*.MicrobiolMolBiol Rev2009; 73: 750-774.
11.Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval D, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, LevineMM, 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*flexneriipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella*spp and enteroinvasive*Escherichia coli*.J ClinMicrobiol 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, MlejnkovaH, Mlejnek P. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting4 genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta galactosidase. J ApplMicrobiol 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 ApplMicrobiol 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, HogeCW, Bodhidatta L,Pitarangsi C. Detection of *Shigella* and enteroinvasive*Escherichia coli*by PCR in the stools of patients with dysentery in Thailand.J Diarrhoeal1994:12: 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.KatiaRsa, Sandra H. Singlemultiplex assay to identify simultaneously, enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing *coli* strains in Brazilian children. FEMS MicrobiolLett 2007; 267(6): 145–150.

23.BuiThi Thu H, Flemming S, PhungDac 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 ClinMicrobiol 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 Sci2009;4:173-179.
25.Vieira N. High Prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coatalEciador. Am JHyg 2005; 76: 528-533.
26.JavadzadehM.Role of Shigella, Entroinvasive*Escherichia coli* (EIEC) and *EntamoebaHsitolytica* in causing dysentry in children. J Mazandaran University of Medical Sciense2003; 39(13):29-35.
27.Akbari A, PourmandMr, SharifiYazdi Mk, Hosseini M, SoltanDallal Mm. Isolation of enteroinvasive*Escherichia coli* (EIEC) from diarrhea in children by PCR technique PayavardSalamat, 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-TimePCR 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 Clini Microbiol 2008: 996–1004.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

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

Aein V[1*], Kargar M[2], Doosti A[3], Gholami M[2]

[1]Clinical Microbiology Research Center, Yasuj University Of Medical Science,Yasuj, Iran, [2]Department of Microbiology, Islamic Azad University Jahrom Branch ,Jahrom, Iran, [3]Biotechnology Research Center, Islamic Azad University Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Received:5 Jan 2014 Accepted: 24 April 2014

Abstract:

Background & aim: EnteroinvasiveEscherichia coliis one of the important agents of invasion to intestinal epithelial cells, damage and cell death which due to dysentery. The aim of this study wastoDetection of EnteroinvasiveEscherichia coli by PCR technique from Children's Diarrheain 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 technicque 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 hase been proposed in other regions of country.

KeyWords: EnteroinvasiveE.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.