شناسایی مولکولی اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک(EPEC) جدا شده از کودکان زیر ۵ سال به روش Multiplex PCR در شهر کرمانشاه

زهرا نظری[۱]، غلامعلی مرادلی[*۱]، بیتا بخشی[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

۲) گروه باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/۳ تاریخ پذیرش: ۹٤/٦/۲

چکیده

مقدمه: عفونت اسهالی یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در کودکان است. هر ساله تقریباً حدود دو میلیون نفر در اثر اسهال در جهان جان خود را از دست می دهند. اشریشیاکلی پاتوژنیک عامل مهم اسهال حاد و مزمن در کودکان کشورهای در حال توسعه است. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع ژن های انتروپاتوژنیک EPEC و مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه ها در بین کودکان زیر ۵ سال مشکوک به اسهال در شهر کرمانشاه می باشد.

مواد و روش ها: با جمع آوری ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی از کودکان مراجعه کننده به مرکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه در طول مدت ۵ ماه، در نهایت ۵۵ نمونه اشریشیاکلی شناسایی و با آزمون های مختلف میکروبی و بیوشیمیایی تایید گردیده و سپس آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI با آنتی بیوتیک هایی از گروه های مختلف انجام گردید. جهت شناسایی ژن های eae و bfp پاتوتیپ از آزمون PCR چندگانه‌ای استفاده شد.

یافته های پژوهش: اشریشیاکلی جدا شده نسبت به ایمی پنم(۱۰۰ درصد) و تتراسایکلین(۷۳/۳۴ درصد) مقاوم و میزان حساسیت به سیپروفلوکساسین(۱۰۰ درصد) و جنتامایسین(۹۶/۶۶ درصد) گزارش شد. نتایج Multiplex-PCR نشان داد که ۳ نمونه(۵/۴ درصد) دارای ژن eae بودند.

بحث و نتیجه گیری: به دلیل اهمیت E.coli به عنوان مهم ترین عامل اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه و با توجه به افزایش روزافزون مصرف و مقاومت نسبت به عوامل آنتی باکتریال، خطر جدی بیماران را تهدید می نماید. مطالعه حاضر نشان می دهد میزان شیوع اشریشیاکلی آتیپیک از تیپیک متداول تر است و عوامل گوناگونی در فراوانی گروه اشریشیاکلی آتیپیک نقش دارند.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، دیسک دیفیوژن، EPEC، Multiplex PCR

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ایران

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

مقدمه

اشریشیاکلی به عنوان باکتری بی هوازی در فلور روده انسان است و معمولاً بدون ایجاد آسیب محدود به لومن روده باقی می ماند، اما در شرایط ناتوانی یا ضعف سیستم ایمنی میزبان یا وقتی موانع طبیعی دستگاه گوارش آسیب ببیند باعث ایجاد بیماری می شود. عفونت های اسهالی یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در کودکان می باشد هر ساله تقریباً دو میلیون نفر در اثر اسهال جان خود را از دست می دهند. اکثریت موارد اسهالی حاد در کودکان ساکن در کشورهای در حال توسعه مشاهده می شود. اشریشیاکلی دارای فاکتورهای حدت مهمی است که توسط ژن های مختلفی رمزدهی می شوند، از جمله آدزین های فیمبریه ای، آنتروتوکسین ها، سایتوتوکسین ها، کپسول و لیپوپلی ساکارید می باشد(۱). از خصوصیات اعضاء پاتوتیپ انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی(EPEC) ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در اپی تلیوم روده می باشد که به یاخته های روده کوچک میزبان متصل شده و قادر به تولید سموم شیگا نمی باشند. در اثر تخریب میکروویلی های موجود در سطح سلول های اپتیلیال، اسهال آبکی حادث می شود. سویه های EPEC به دو دسته تیپیکال و آتیپیکال تقسیم بندی می شوند. سویه تیپیکال EPEC علاوه بر ژن eae (ژن کدکننده اینتیمین که برای تولید زخم ها لازم می باشد) دارای ژن bfp(Bundle Forming Pilus) که در پلاسمید واقع شده است، نیز می باشد ولی سویه های آتیپیکال EPEC تنها حاوی ژن eae هستند. مطالعات نشان داده در کشورهای در حال توسعه سویه های تیپیکال EPEC بیش از سویه های آتیپیکال EPEC از مدفوع کودکان مبتلا به اسهال جدا می شوند. در حالی که شرایط در کشورهای توسعه نیافته عکس این موضوع می باشد(۲). یکی از مسائل مهم در درمان بیماری های عفونی، مقاومت باکتری های پاتوژن نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد. مقاومت دارویی مفهوم پیچیده ای است که در آن چندین فاکتور از جمله نوع میکروارگانیسم عفونت زا، محل میکروب در داخل بدن، توزیع میکروارگانیسم در بدن، غلظت دارو در محل عفونت و وضعیت ایمنی بیمار دخالت داشته و بر یکدیگر تاثیر می گذارند(۳). بروز پدیده مقاومت به علت مصرف بالای آنتی بیوتیک در بیماران درکرمانشاه موجب بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های مصرفی شده که در سایر نقاط این نوع مقاومت ها کمتر گزارش شده است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی پاتوتیپ EPEC جدا شده از اسهال کودکان زیر ۵ سال شهر کرمانشاه و تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها انجام شده است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و جدا سازی: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از فرمول n=z2P(1-P)/d2 و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۵۰ نمونه اسهالی از کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان فوق تخصصی اطفال استان کرمانشاه از اردیبهشت ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۳ جمع آوری شد. این نمونه ها جهت کشت بر روی محیط های کشت باکتریایی از جمله مک کانکی آگار، EMB آگار و کروم آگار E.coli انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تایید حضور باکتری E.coli، آزمون های بیوشیمیایی IMViC، TSI (Triple Sugar Iron Agar) جهت تشخیص نهایی انجام شد. در نهایت تعداد ۵۵ نمونه باکتری اشریشیاکلی شناسایی و تایید گردید.

آنتی بیوگرام: بعد از تعیین گونه های باکتری E.coli، با آزمون های بیوشیمیایی، جهت انجام آزمون آنتی بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute) استفاده گردید(۴). تعدادی از کلونی باکتری را به وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد. سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیده و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید(۴). جهت انجام این مطالعه دیسک های آنتی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

بیوتیک ایمی پنم(۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین(۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون(۲ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفتازیدیم(۵ میکروگرم)، ، جنتامایسین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(۲ میکروگرم)، از شرکت HIMEDIA Himedia Laboratories (Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد اشریشیاکلی ۳۵۲۱۸ ATCC تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه تربیت مدرس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آزمون Multiplex-PCR: برای استخراج DNA از کیت باکتری های گرم منفی سیناژن(Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده شامل eae و bfp در این آزمون در جدول شماره ۱ ذکر شده است(۵،۶). برنامه زمان بندی آزمون Multiplex-PCR که مطابق با منابع اشاره شده در بخش پرایمرها مورد استفاده قرار گرفته بود در جدول شماره ۲ بیان شده است. مخلوط مواد مورد استفاده در واکنش، شامل این ترکیبات می باشد: آب مقطر ۱۷/۳ میکرولیتر، 1X. PCR buffer به میزان ۲ میکرولیتر، 1.5mM MgCl2 به میزان ۰/۷ میکرولیتر، (dNTP mix (5Mm به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده با غلظت 0.5 µM هر کدام ۰/۶ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase با غلظت ۲/۵ unit به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر، نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد.

جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده های آماری با نرم افزار SPSS vol.19 و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته های پژوهش

تحقیق بر روی ۵۵ جدایه جدا سازی شده از بیماران با علائم بالینی اسهال نشان داد که میزان حساسیت سویه های مختلف به آنتی بیوتیک های مورد استفاده متفاوت بوده که در جدول شماره ۲ ذکر شده است. همان گونه که نتایج نشان داد بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی) گزارش شد. هم چنین جدایه ای که به همه داروها مقاوم باشد و هم چنین جدایه ای که به کل داروهای مورد استفاده حساس باشند، در بین جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق یافت نگردید. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی EPEC با استفاده از روش Multiplex PCR در جدول شماره ۳ گزارش شده است. در هیچ یک از نمونه ها، ژن bfp مربوط به پاتوتیپ EPEC با قطعه ای به وزن ۳۲۶ جفت باز مشاهده نشد. هم چنین ژن eae با قطعه ای به وزن ۹۱۷ جفت باز در ۳ (۵/۴ درصد) نمونه مشاهده گردید(شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chain reaction)

نام پرایمر	توالی پرایمر (5’ to 3’)	ژن هدف	اندازه باند(bp)	شماره رفرانس
eae-f	CTGAACGGCGATTACGCGAA	eae	۹۱۷	۵
eae-r	CCAGACGATACGATCCAG	eae	۹۱۷	۵
BFP-f	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	bfPA	۳۲۶	۶
BFP-r	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	bfPA	۳۲۶	۶

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

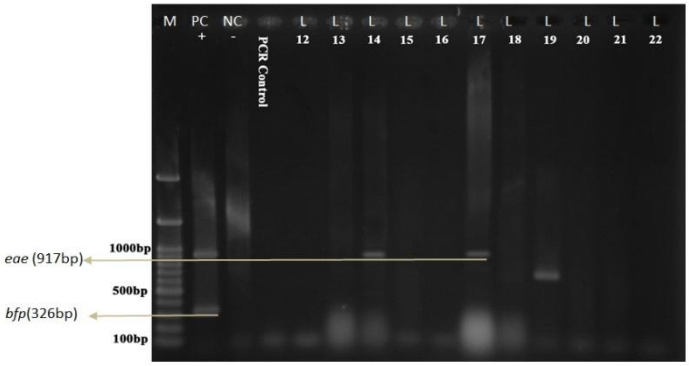
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

جدول شماره ۲. برنامه زمان بندی حرارتی مورد استفاده در این تحقیق برای انجام واکنش Multiplex-PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان(دقیقه)	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۵	۱
دناتوراسیون	۹۴	۳	
اتصال	۶۱	۴	۳۵
بسط	۷۲	۲	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

جدول شماره ۳. میزان حساسیت سویه های جدا سازی شده به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

نوع انتی بیوتیک	میزان حساسیت (٪) Sensitive	حساسیت متوسط(٪) Intermediate	میزان مقاومت (٪) Resistance
جنتامایسین	۹۶/۶۶	–	۳/۳۴
ایمی‌پنم	–	–	۱۰۰
سیپروفلوکساسین	۱۰۰	–	–
تتراسایکلین	۲۶/۶۶	–	۷۳/۳۴
سفتریاکسون	۴۳/۳۴	–	۵۶/۶۶
سفتازیدیم	۴۳/۳۴	۳/۳۳	۵۳/۳۳
اوفلوکساسین	۶۶/۶۶	۱۶/۶۷	۱۶/۶۷



شکل شماره ۱. محصول PCR بر روی ژل مربوط به ژن eae و bfp، به ترتیب از چپ به راست، کنترل مثبت (PC)، کنترل منفی (NC)، نمونه های ۱۲-۲۲ نمونه های E.coli بالینی جدا شده از نمونه های اسهالی، نمونه ١٤ و ۱۷ دارای ژن eae با طول bp ۹۱۷ می باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری های ایجاد شده توسط باکتری اشریشیاکلی شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورآ، سندرم اورمی همولتیک و در موارد شدید مرگ می باشد. انسان مخزن اصلی پاتوتیپ EPEC بوده و در سال ۱۹۹۵ این سویه ها به دو دسته مجزا تقسیم شدند:

سویه های انتروپاتوژنیک تیپیک: سویه هایی که دارای دو ژن eae (ژن کدکننده پروتئین خارجی) و bfp (ژن کدکننده پیلی) باشند.

سویه های انتروپاتوژنیک آتیپیک: سویه هایی که دارای ژن eae بوده و فاقد ژن bfp باشند(۱). در این مطالعه، نتایج حاصل از تحقیق نشان می دهد که از ۵۵ جدایه E.Coli جدا سازی شده از هر مدفوع اسهالی تعداد ۳ جدایه متعلق به پاتوتیپ EPEC از نوع آتیپیک بود یعنی شامل ژن eae مثبت و فاقد ژن bfp بودند در نتیجه از ۵۵ سویه E.Coli حدود ۵/۴ درصد متعلق به پاتوتیپ EPEC از گروه آتیپیک بوده است. در مطالعه Borjian و همکاران(۱۹۹۸) میزان شیوع EPEC در کودکان زیر ۲ سال ۵/۴ درصد گزارش شده که با نتایج

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

به دست آمده از این مطالعه هم خوانی دارد(۷). در مطالعه Asadi Karam و همکاران(۲۰۰۹) از ۳۲۱ ایزوله E.Coli جدا شده از اسهال کودکان ۱۷ سویه یعنی ۵/۳ درصد به پاتوتیپ EPEC تعلق داشته است، که نتایج با مطالعه حاضر هم خوانی دارد(۸). در بررسی Blanco (۲۰۰۶) در اروگوئه از ۷۱ سویه EPEC ۵۷ سویه متعلق به گروه تیپیک و ۱۴ مورد متعلق به گروه آتیپیک بوده در صورتی که در تحقیق حاضر فقط سه مورد متعلق به گروه آتیپیک بوده و نمونه در گروه تیپیک شناسایی نگردید(۹). مطالعات مختلفی در مورد شناسایی مولکولی پاتوتیپ های اشریشیاکلی با استفاده از روش M-PCR در کشورهای مختلف انجام شده است، Aranda در سال ۲۰۰۴ از روش Multiplex-PCR جهت شناسایی پاتوتیپ های EPEC (تیپیک و آتیپک)، EAEC، ETEC، EIEC، STEC و شیگلا در نمونه های مدفوعی به دست آمده از افراد مبتلا به اسهال خونی حاد استفاده کردند و میزان EPEC تیپیک و آتیپیک در ۶ درصد موارد، EAEC ۴/۷ درصد، EIEC ۲ درصد، گونه های شیگلا ۲ درصد، سویه STEC ۰/۷ درصد مشاهده شد(۵). Vilchez در سال ۲۰۰۴ روش Multiplex PCR را با استفاده از ۸ جفت پرایمر اختصاصی به منظور شناسایی پاتوتیپ های EAEC، EIEC، EHEC، EPEC و ETEC به کار برده و ۶۸ نمونه(۱۱/۶ درصد) شامل EAEC، ۱۲ نمونه(۲ درصد) EIEC، ۳۹ نمونه(۶/۶ درصد) EPEC و ۱۳ نمونه(۲/۲ درصد) شامل ETEC بودند(۱۳). Moyo و همکاران در تانزانیا در سال ۲۰۰۷، از روش Multiplex PCR به منظور شناسایی پاتوتیپ های EAEC، EPEC، ETEC، EIEC و EHEC استفاده کردند. ۲۲/۹ درصد از کودکان مبتلا به اسهال ناشی از اشریشیاکلی بودند، ۱۴/۶ درصد از سویه ها به عنوان پاتوتیپ EAEC شناسایی شدند که حامل ژن aggR و ژن aat بودند. ۴/۶ درصد از سویه ها به عنوان پاتوتیپ EPEC شناسایی و در ۹۲/۳ درصد از پاتوتیپ های EPEC، به عنوان EPEC تیپیک حامل هر دو ژن eae و bfPA شناسایی گردیدند. EAEC تیپیک و EPEC تیپیک به عنوان شایع ترین عامل اسهال خونی در کودکان تانزانیا شناسایی گردیدند(۶). این که چرا در دهه اخیر شیوع اسهال های ناشی از سویه های آتیپیک بیش از تیپیک می باشد دقیقاً مشخص نبوده، لیکن به دلیل این که سویه های آتیپیک کمتر ایجاد عفونت های شدید می کنند و بیشتر به صورت مزمن می باشند از ماندگاری بیشتری در محیط برخوردار بوده و هم چنین حیوانات می توانند به عنوان مخزن سویه های آتیپیک باشند که حذف این سویه ها از سویه های تیپیک که مخزن آن تنها انسان است در محیط مشکل تر می باشد(۹،۱۴،۱۵). یکی دیگر از دلایل، صنعتی شدن کشورها می باشد که جدایه‌های آتیپیک در کشورهای صنعتی شایع بوده و علت بالا بودن میزان شیوع این پاتوتیپ را می توان صنعتی شدن کشور دانست(۲). شرایط اقلیمی و آب و هوایی نیز می تواند دلیل دیگری بر افزایش شیوع سویه آتیپیک باشد و با توجه به این که در استان کرمانشاه مراجعه کنندگان به بیمارستان از روستاهای اطراف جهت اسهال کودکان خود مراجعه کرده اند می توان یکی از علل شیوع گروه آتیپیک را تماس با حیوانات اهلی دانست که مخزن این گروه از اشریشیاکلی می باشند که از طریق آن ها باعث انتقال عامل اسهال به کودکان زیر ۵ سال شده است(۹،۱۴،۱۵). از عوامل اسهال در کودکان زیر ۵ سال اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک از گروه آتیپیکال می باشد و اسهال های ناشی از سویه آتیپیک از فراوانی بیشتری برخوردار است. هم چنین عوامل مختلفی در ایجاد عفونت های ناشی از EPEC نقش دارند از جمله صنعتی شدن کشورها باعث افزایش فراوانی سویه آتیپیک نسبت به تیپیک شده است. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می باشد. در مقاومت ذاتی سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی بیوتیک ها بوده در حالی که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و سویه های حساس به مقاوم ناشی می شود(۳). در مطالعه حاضر که بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوتیپ های جداسازی شده نسبت به ایمی پنم(۱۰۰ درصد) و تتراسایکلین(۷۳/۳۴ درصد) گزارش شد که با نتایج مطالعات سایر محققان در نقاط مختلف دنیا هم خوانی دارد. در مطالعه Tankhiwale و همکاران بر روی اشریشیاکلی در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

۲۰۰۴، بیشترین مقاومت نسبت به کوتریموکسازول (۸۲ درصد) و آمپی سیلین(۷۹/۹ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین(۳۸ درصد) و سفتی زوکسیم(۴۱/۳ درصد) گزارش شد(۱۰). در صورتی که Zamanzad و همکاران در سال ۱۳۸۳ در شهرکرد، بالاترین مقاومت ها را نسبت به آمپی سیلین و کوتریماکسازول گزارش نمودند(۱۱). Bouzari و همکاران در مطالعه ای بر روی ۲۰۴ ایزوله EAEC جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال در سال ۲۰۰۱، بیشترین درصد مقاومت را به آمپی سیلین، و بیشترین حساسیت را به آنتی بیوتیک های نالیدکسیک اسید، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین گزارش نمودند(۱۲). کرمی و همکاران سال ۱۳۹۱ در بررسی مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیاکلی انتروپاتوژن ایزوله شده از اسهال کودکان در همدان به این نتیجه رسیدند که بیشترین مقاومت جدایه ها به آنتی بیوتیک های سفپودوکسیم(۹۷ درصد)، تری متوپریم(۶۰/۷ درصد)، تتراسایکلین(۵۸/۴ درصد) و آمپی سیلین(۴۵/۸ درصد) بوده و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین وجود دارد(۱۶). مقایسه با نتایج تحقیقات ما نشان می دهد که الگـــــوی مقـــاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی کاملاً متفاوت بوده و در مطالعه ما ایمی پنم و سفتریاکسون برخلاف مطالعه کرمی بیشترین مقاومت را نشان داده است. بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوتیپ های جدا سازی شده نشان می دهد که نوع آنتی بیوتیک های تجویز شده بر اساس میزان مصرف در بین بیماران در میزان شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک تاثیر داشته، به طوری که با توجه به مصرف بالای آنتی بیوتیک های کارباپنم ها در بیماران کرمانشاه مقاومت به این نوع آنتی بیوتیک ها بیشتر مشاهده شده و در سایر نقاط این نوع مقاومت ها کمتر گزارش شده است. با استفاده از روش Multiplex PCR می توان در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن های بیماری زا پی برد. جهت کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی باید دو فاکتور عمده یعنی استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت.

سپاسگزاری

نگارنده کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد به ویژه جناب آقای دکتر کیومرث امینی، مهندس ابوالفضل مقدم و رامین خاکی جوان که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد.

References

1.Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM. Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. J Infecti Dis 1985;152:560-5.
2.Holmes B, Groos R. Coliform bacteria; various other members of the Enterobacteriaceae. J Med Microbial 1997;33:234-8.
3.Fluit AC, Visser MR, Schmitz F-J. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001;14:836-71.
4.Goldstein EJ, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. Anaerobe2008;14:68-72.
5.Aranda K, Fagundesneto U, Scaletsky I. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. J Clin Microbiol 2004;42:5849-53.
6.Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic Escherichia coli isolated from infants and children in dares Salaam Tanzania. BMC Infect Dis 2007;7:92-7.
7.Borjian BS. [Antibiotic sensitivity of Shigella spp and Escherichia coli isolated from children with diarrhea Enteropathogenic referred to Vali-Asr Hospital Borujen]. Zanjan Med Uni Sci 1998;7:48-55. (Persian)
8.Karam MA, Bouzari S, Oloomi M, Aslani M, Jafari A. [Phenotypic and Genotypic characterization of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) strains in Tehran Iran]. Iranian J Microbiol 2010;2:3-10. (Persian)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

9.Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, et al. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants. J Med Microbiol 2006;55:1165-74.
10.Tankhiwale SS, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. Indian J Med Res 2004;120:553-6.
11.Zamanzad B, Naseri F. [Comparison of the causative bacteria and antibacterial susceptibility pattern of nosocomial and community-acquired urinary tract pathogens in 13-35 years old women, Shahrekord, 2004]. Arak Med Uni J 2005;8:23-30.(Persian)
12.Bouzari S, Jafari A, Azizi A, Oloomi M, Nataro J. Short report characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children. Am J Trop Med Hygiene2001;65:13-24.
13.Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from Leon Nicaragua. J Med Microbiol2009;58:630-7.
14.Rappelli P, Folgosa E, Solinas ML, DaCosta JL, Pisanu C, Sidat M, et al. Pathogenic enteric Escherichia coli in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. FEMS Immunol Med Microbiol 2005;43:67-72.
15.Clarke SC. Diarrhoeagenic Escherichia coli an emerging problem. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;41:93-8.
16.Karami P, Aslani MM, Najafi Mosleh M, Alikhani MY. [Determine the pattern of antibiotic resistance of Escherichia coli strains Entropathogen isolated from children with diarrhea]. Hamadan Med Uni J 2012;1:27-31.(Persian)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]

Molecular Identification of Escherichia coli EPEC Isolated from Children Under the Age of 5 Years by Multiplex PCR in Kermanshah

*Nazari Z[1], Moradli G[*1], Bakhshi B[2]*

(Received: June 24, 2015 Accepted: August 24, 2015)

Abstract

Introduction: Infection Diarrhea is one of the most common causes of death in children. Each year, approximately two million people die worldwide of diarrhea. Entropathogenic E. coli is the most common cause of the acute and chronic diarrhea in children in developing countries. The aim of this study was to evaluate the prevalence of the EPEC pathotype genes and their antibiotic resistance among isolated bacteria from suspected cases of diarrhea children under age of 5 years.

Materials & methods: A total of 150 fecal samples of diarrheic children referred to Kermanshah hospital were collected during 5 months. 55 isolates were confirmed as E.coli by biochemical and microbiological tests. Antimicrobial susceptibility were tested by disk diffusion method according to CLSI guidelines. Multiple PCR assay was used to identify pathotype geneseae and BFP.

Findings: E.coli isolates were reported resistant to imipenem (100%) and tetracycline (73.34%) and were sensitive to ciprofloxacin (100%) and gentamicin (96.66 %). Results of M-PCR showed that three isolated (5.4%) have eae gene.

*Discussion & Conclusion*s: Because of the importance of E.Coli as the main cause of diarrhea in children in developing countries, and due to increasing consumption and resistance to antibacterial agents, it is a threat for the health of patients. This study shows that the incidence of Atypical E.coli is more than typical prevalence.

Keywords: Escherichia coli, Disk diffusion, EPEC, Multiplex PCR

1. Dept of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2. Dept of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
**Corresponding author Email: Moradli.mic@gmail.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-01]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.1.154]