

# بررسی شیوع گروه‌های فیلوژنتیک و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی چسبنده روده‌ای (EAEC) جدا شده از کودکان اسهالی در مشهد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳

## خلاصه

### مقدمه

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی شیوع، گروه‌های فیلوژنتیک و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های EAEC جدا شده از کودکان اسهالی در شهر مشهد بود.

### روش کار

در مطالعه توصیفی-مقطعی حاضر به مدت یکسال، ۴۵۰ نمونه اسهال کودکان زیر ۱۰ سال از بیمارستان‌های تخصصی کودکان در شهر مشهد جمع آوری گردید. پس از جداسازی و شناسایی اولیه اشریشیاکلی، با استفاده از PCR جدایه‌های EAEC شناسایی شد. گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های EAEC با استفاده از روش اصلی و بهبود یافته در سال ۲۰۱۹ تعیین گردید. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار در مقابل ۱۲ آنتی بیوتیک انجام شد.

### نتایج

EAEC از مجموع (۹۳/۸)٪ ۴۲۲ جدایه اشریشیاکلی به وسیله PCR تشخیص داده شد. هفت فیلوگروه D (۴۰/۹)٪، unknown (۲۷/۳)٪، G (۱۱/۴)٪، B1 (۹/۱)٪، F (۴/۵)٪، B2 (۴/۵)٪ و A (۲/۳)٪ در بین جدایه‌های EAEC شناسایی شد. بیشترین تنوع الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به فیلوگروه D بود. جدایه‌های EAEC بیشترین مقاومت را نسبت به آموکسی سیلین و اریترومايسين ۱۰۰٪ نشان دادند. ۹۷/۷٪ جدایه‌های EAEC دارای مقاومت چندگانه بودند.

### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد درصد قابل توجهی از موارد اسهال کودکان با سویه‌های EAEC در ارتباط است. با توجه به نقش EAEC در اسهال و سندروم کاهش رشد کودکان پیشنهاد می‌گردد، شناسایی سویه‌های EAEC در آزمایشگاه‌های تشخیصی در موارد اسهال کودکان مورد توجه قرار گیرد. از طرفی، به دلیل شیوع مقاومت‌های چندگانه، انجام تست آنتی بیوگرام برای درمان اسهال کودکان ضروری به نظر می‌رسد.

### کلمات کلیدی

اشریشیاکلی چسبنده روده‌ای، فیلوژنتیک، مقاومت آنتی بیوتیکی، اسهال کودکان، مشهد

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

ز کیه ایمان پناه<sup>۱</sup>

مهدی عسکری بدوئی<sup>۲</sup>

غلامرضا هاشمی تبار<sup>۳\*</sup>

کیارش قزوینی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> استادیار باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

فردوسی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> استاد بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۴</sup> استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: askari.m@um.ac.ir



## مقدمه

بیماری‌های اسهالی یکی از عوامل مرگ و میر کودکان به شمار می‌روند، و سالانه حدود ۲/۵ میلیون مرگ و میر کودکان در سراسر جهان را به خود اختصاص می‌دهند (۱).  
 ۲. *اشریشیاکلی* چسبنده روده‌ای<sup>۱</sup> عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار و همچنین عامل ایجاد کاهش رشد و سوء تغذیه در کودکان تشخیص داده شده است (۳، ۴). بعد از *انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی* (EPEC) به عنوان دومین عامل اسهال مسافرتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد (۵، ۶). سویه‌های *E. coli* بیماری‌زا براساس نحوه ایجاد بیماری به دو گروه تقسیم بندی می‌شوند: سویه‌های که قادر به ایجاد بیماری در خارج از دستگاه گوارش<sup>۳</sup> ExPEC هستند و سویه‌های که قادر به ایجاد بیماری در داخل دستگاه گوارش<sup>۴</sup> IPEC می‌باشند. یکی از عوامل باکتریایی ایجادکننده اسهال، گروه *اشریشیاکلی* اسهال‌ز<sup>۵</sup> (DEC) در نظر گرفته می‌شود که به هفت پاتوتیپ<sup>۶</sup> مختلف قابل تقسیم بندی هستند: *انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی* (توکسین زای روده‌ای) (EPEC)، *انترواینویسیو اشریشیاکلی* (مهاجم روده‌ای) (EIEC)، دو زیر گروه تیپیکال<sup>۸</sup> و آتیپیکال<sup>۹</sup> شیگاتوکسین *اشریشیاکلی* (STEC)، *انتروپاتوژنیک اشریشیاکلی* (بیماری‌زای روده‌ای) (EPEC)، *انترواگریگتیو اشریشیاکلی* (چسبنده‌ای روده‌ای) (EAEC)، *دیفیوز ادرنت اشریشیاکلی* (با چسبندگی پراکنده<sup>۷</sup>) (DAEC)، *ادرنت‌ای‌نویزیو اشریشیاکلی* (چسبنده-مهاجم) (AIEC<sup>۷</sup>)-۷

۱۰. EAEC دارای الگوی اتصال تجمعی<sup>۱</sup> (AA) به سلول‌های اپی تلیال HEP-2 و HeLa در کشت سلولی و تشکیل الگوی چسبندگی (آجر انباشته)<sup>۲</sup> می‌باشد. اتصال و ایجاد التهاب در سطوح مخاطی روده و ترشح توکسین‌ها و سایتوتوکسین‌ها مکانیسمی است که EAEC برای ایجاد اسهال به کار می‌گیرد. تمامی این اعمال از سوی ژن‌های ویروالانسی انجام می‌شود که روی جزایر بیماری‌زایی، پلاسمید و ترانسپوزون‌ها قرار دارند. فیمبریه‌های اتصال تجمعی AAF باعث اتصال به سلول‌های HEP-2 می‌شوند، ولی در تعداد کمی از سویه‌ها وجود دارند. همچنین پروتئین ترشحي سطحی دیگری به نام دیسپرسین<sup>۳</sup> وجود دارد، که توسط ژن‌های پلاسمیدی کد می‌شود و باعث اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی می‌شود، که این پروتئین در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم شرکت دارد. یک توکسین موسیناز به نام Pic و یک *انتروتوکسین* به نام *انتروتوکسین شیگلا*<sup>۴</sup> ShET1<sup>۱۷</sup> که توسط کروموزوم سویه‌های EAEC کد می‌شود که نقش دقیق آنها در بیماری‌زایی مشخص نیست. همچنین EAEC سه توکسین تولید می‌کند که در بیماری‌زایی آن نقش دارد. یک *انتروتوکسین* به نام توکسین مقاوم به حرارت EAST1<sup>۵</sup> توسط پلاسمیدی به نام pAA کد می‌شود، EAST1 از نظر ترادف پروتئینی ۵۰ درصد با ژن *Sta* (سم مقاوم به حرارت EPEC) شباهت دارد. توکسین دوم به نام توکسین pet توسط پلاسمید کد می‌شود که یک پروتئین حساس به حرارت و در واقع یک

<sup>1</sup> Shiga toxin-producing *E. coli*<sup>0</sup>

<sup>1</sup> Enteropathogenic *E. coli* 1

<sup>1</sup> Diffusely adherent *E. coli* 2

<sup>1</sup> Adherent-invasive *E. coli* 3

<sup>1</sup> Aggregative Adherence 4

<sup>1</sup> Stacked-brick 5

<sup>1</sup> Dispersin 6

<sup>1</sup> *Shigella* Enterotoxin 1 7

<sup>1</sup> EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1

<sup>1</sup> Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC)

<sup>2</sup> Enterotoxigenic *E. coli*

<sup>3</sup> Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*

<sup>4</sup> Intestinal Pathogenic *Escherichiacoli*

<sup>5</sup> Diarrheagenic *E. coli*

<sup>6</sup> Pathotypes

<sup>7</sup> Enteroinvasive *E. coli*

<sup>8</sup> Typical

<sup>9</sup> Atypical

با توجه به اهمیت بالای EAEC در ایجاد بیماری اسهال در کودکان و عدم شناسایی آن در آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های کشور، این پاتوتیپ کمتر مورد توجه قرار گرفته است و اطلاعات همه‌گیری شناسی در مورد آن اندک است. در این مطالعه میزان شیوع این پاتوتیپ برای نخستین بار طی یک سال در مشهد مورد بررسی قرار گرفت، که می‌تواند اهمیت تشخیص این پاتوتیپ را در کودکان بیش از پیش مورد توجه قرار دهد. همچنین با توجه به گسترش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط آن با گروه‌های فیلوژنتیک، در مطالعه حاضر فیلوگروه‌های جدایه‌های EAEC با استفاده از آخرین روش پیشنهاد شده توسط Clermont و همکاران (۲۰۱۹) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

### روش کار

**جمع آوری نمونه:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی ۴۵۰ نمونه اسهال کودکان زیر ۱۰ سال به مدت یکسال (از مهرماه ۱۳۹۸ تا شهریورماه ۱۳۹۹) از بیمارستان (های) تخصصی کودکان در مشهد جمع آوری شدند. آزمایش‌های تشخیصی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شدند.

**کشت و جداسازی/شریشیالکی:** نمونه‌های اسهال بر روی محیط انتخابی و افتراقی مک کانگی آگار کشت داده شدند، و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های لاکتوز مثبت (صورتی رنگ) برای تأیید جدایه‌های/شریشیالکی جداسازی گردید، که از میان ۴۵۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۴۲۲ جدایه/شریشیالکی به دست آمد و با انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی

سیتوتوکسین است. سومین توکسین، پروتئین حساس به حرارت که عامل بالا رفتن میزان کلسیم درون سلولی شده و با این مکانیسم سبب از بین رفتن پرزهای روده می‌شود. پلاسمید *pAA* دارای یک تنظیم‌کننده به نام *aggR* است، که به طور تقریبی بیشتر فاکتورهای بیماری‌زایی EAEC را کنترل می‌کند. این باکتری با استفاده از فاکتورهای ویروالانس خود به سلول‌های بافت مخاطی روده متصل شده و با ترشح توکسین‌ها و سیتوتوکسین‌ها باعث ایجاد اسهال می‌شود (۱۱). EAEC‌های دارای ژن تنظیم‌کننده *aggR*/شریشیالکی چسبنده روده‌ای تیبیکال tEAEC نام گذاری می‌شوند و اعتقاد بر این است که سویه‌های tEAEC بالقوه پاتوژن هستند (۱۲). جهت تشخیص EAEC از دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده می‌گردد. در روش فنوتیپی از روش کشت سلولی (سلول‌های اپی تلیال HEP-2) استفاده می‌گردد. و در روش ژنوتیپی از روش تشخیصی PCR جهت شناسایی ژن‌های شاخص EAEC استفاده می‌شود (۱۳).

بررسی‌های فیلوژنتیکی بر روی باکتری/شریشیالکی نشان دادند که می‌توان جدایه‌های این باکتری را براساس حضور ژن‌های *TspE4.C2*, *yjaA*, *chuA* به چهار فیلوگروه A, B1, B2, D تقسیم نمود (۱۴). این فیلوگروه‌ها از نظر خصوصیات زیست محیطی، سرعت رشد، توانایی متفاوت در استفاده از قندها و الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از یکدیگر متمایز هستند (۱۵, ۱۶). به منظور تعیین فیلوگروه‌های بیشتر شامل C, E, F, I و Clade در سال ۲۰۱۳، Clermont و همکاران ژن *arpa* را به سه ژن قبلی اضافه کردند (۱۷). در سال ۲۰۱۹، با بررسی کل ژنوم و توالی‌یابی اطلاعات ژنومی به این نتیجه رسیدند که بین فیلوگروه‌های F و B2 فیلوگروه جدید G قرار دارد (۱۸).

<sup>2</sup>Mac Conkey agar

<sup>1</sup>Typical EAEC

**استخراج DNA و انجام آزمون PCR چندگانه جهت غربالگری و شناسایی مولکولی EAEC: DNA**  
 جدایه‌های اشریشیاکلی با کمک روش جوشاندن استخراج گردید (۲۰). پس از استخراج DNA، تمامی جدایه‌های اشریشیاکلی با استفاده از روش PCR چندگانه<sup>۴</sup> و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *aggR*, *PCVD432* مندرج در جدول ۱ جهت شناسایی سویه‌های EAEC مورد بررسی قرار گرفتند.

مانند (متیل رد/وژپروسکوئر) MR/VP، (تریپل شوگرایرون آگار) TSI، (سولفید اندول موتیلیتی) SIM<sup>۳</sup>، سیمون سترات و اوره آز مورد تأیید نهایی قرار گرفت (۱۹). تمام جدایه‌های اشریشیاکلی در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری حاوی محیط BHI براث استریل حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعدی ذخیره گردید.

**جدول ۱. پرایمرهای مرتبط با شناسایی جدایه‌های EAEC و فیلو گروه‌ها**

اندازه محصول (bp)	غلظت پرایمر (μM)	زمان Ta	توالی از چپ به راست (5' به 3')	جفت پرایمر	سری	رفرنس
EAEC های اختصاصی برای شناسایی مولکولی سویه‌های پرایمر						
۲۵۴	۰/۴	۵۶°C	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>	شناسایی EAEC	Toma et al. (2003)
۱۹۴		۶۰ ثانیه	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	<i>CVD432</i>	Multiplex PCR	Ronal (2002)
پرایمرهای مرتبط به فیلو گروه‌های A, B1, B2, D, C, E ارائه شده توسط clermont و همکاران (۲۰۱۳) (۱۷)						
۲۸۸	۱		ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	<i>chuA</i>		
۲۱۱	۱	۵۹°C	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	<i>yjaA</i>		
۱۵۲	۱	۲۰ ثانیه	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	<i>tspE4.C2</i>	PCR چهارگانه	Clermont et al. (2013)
۴۰۰	۰/۵		AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	<i>arpA</i>		
۳۰۱	۱	۵۷°C	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	<i>arpA.gE</i>	E گروه	
۲۱۹	۱	۵۹°C ۲۰ ثانیه	AGTTTATGCCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCCC	<i>trpAgpC</i>	C گروه	
پرایمرهای مرتبط به فیلو گروه‌های F, G و کنترل داخلی ارائه شده توسط clermont و همکاران (۲۰۱۹) (۱۸)						
۱۷۷			TATGCGGCTGATGAAGGATC GTTGACTAAGCGCAGGTCGA	<i>ybgD</i>		
۳۸۴	۰/۷۵	۵۹°C ۲۰ ثانیه	CTAACGTTGATGCTGCTCTG TGCTAACTACGCCACGGTAG	<i>cfaB</i>	PCR	Clermont et al. (2019)
۴۸۹			CGGCGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	<i>trpBA</i>	کنترل داخلی	

<sup>۳</sup>Sulfide Indol Motility Agar  
<sup>۴</sup>Multiplex PCR

<sup>۱</sup>Methyl Red/Voges Proskauer  
<sup>۲</sup>Triple Sugar Iron Agar

**تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های EAEC با روش کربی-بائر<sup>۹</sup> صورت پذیرفت (۲۱). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف، آزترونام (۳۰μ)، سفازولین (۳۰μ)، کوتریموکسازول (۲۵/۱۰، ۲۳/۷۵μ)، کلستین (۱۰μ)، سیروفلوکساسین (۱۵μ)، تتراسایکلین (۳۰μ)، کلرامفنیکل (۳۰μ)، جنتامایسین (۱۰μ)، اریترومایسین (۱۵μ)، انزوفلوکساسین (۱۵μ)، آموکسی‌سیلین (۳۰μ) و سفتریاکسون (۳۰μ) (ساخت شرکت Mast انگلستان) استفاده شد. نتایج با استانداردهای ارائه شده در (2021) CLSI نرم افزار WHONET 2021، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و به صورت حساس<sup>۱</sup>، مقاوم<sup>۲</sup> و نیمه حساس<sup>۳</sup> گزارش گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری به واسطه نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون آماری Chi Square و Mann-whitney test با سطح اطمینان ۹۵٪ و میزان معنی داری (P<۰/۰۵) انجام پذیرفت.

### نتایج

**بررسی فراوانی جدایه‌های EAEC بر حسب فصل، سن و جنس:** از مجموع ۴۵۰ نمونه اسهال، براساس نتایج آزمایش‌های ایمویک، (۹۳/۸٪، ۴۲۲٪) جدایه اشریشیاکلی شناسایی گردید. طبق نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *aggR*, *PCVD432* (۹/۸٪، ۴۴٪) جدایه EAEC جداسازی گردید (شکل ۱). ۳۸ نمونه دارای ژن *aggR* تیسپیکال EAEC و ۶ نمونه فاقد *aggR* آتیسپیکال EAEC بودند. به جهت دست یافتن به الگوی سنی شیوع EAEC، کودکان مبتلا به اسهال به سه گروه سنی مختلف زیر یکسال، ۵-۲ سال

واکنش PCR چندگانه در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰مستر میکس<sup>۱</sup> آماده مصرف، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴ میکرومول) از هر کدام پرایمرهای فوروارد<sup>۲</sup> و ریورس<sup>۳</sup>، ۲ میکرولیتر از DNA الگو و ۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام شد. از سویه بالینی EAEC (کلکسیون آزمایشگاه میکروب شناسی) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برنامه‌ی دمایی عبارت بود از: واسرشت اولیه ۹۴° درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل واسرشت ۹۴° درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۶° درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش ۷۲° درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل‌ها گسترش نهایی ۷۲° درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله‌ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد. آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز صورت گرفت. ۱۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با گرین و یوور (ساخت‌ای‌ران) انجام شد.

### تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های EAEC:

با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چهارگانه Quadruplex PCR و با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده توسط Clermont و همکاران (۲۰۱۳) (جدول ۱) گروه بندی فیلوژنتیکی A, B1, B2, D, C, E, F مورد شناسایی قرار گرفت (۱۷). با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه و با استفاده از پرایمرهای ارائه شده روش جدید (۲۰۱۹) (جدول ۱) فیلو گروه‌های F و B2 و فیلو گروه جدید G از یکدیگر متمایز گردید (۱۸).

<sup>8</sup>Final extension

<sup>9</sup>Kirby-Bauer

<sup>1</sup> Clinical laboratory standard institute

<sup>1</sup> Sensitive 1

<sup>1</sup> Resistance 2

<sup>1</sup> Intermediate 3

<sup>1</sup>Mastermix

<sup>2</sup>Forward

<sup>3</sup>Reverse

<sup>4</sup>Initial denaturation

<sup>5</sup>Denaturation

<sup>6</sup>Annealing

<sup>7</sup>Extension

## جدول ۲. توزیع فراوانی EAEC در نمونه اسهال کودکان

زیر ده سال بر حسب فصل، سن و جنس		EAEC	
های جدایه EAEC (درصد) تعداد	مجموع های جدایه اشریشیا کلی	عوامل مورد بررسی	فصل
۷۳(۹۳٪/۶)	۵(۶٪/۴)	بهار	فصل
۱۱۰(۸۸٪/۰)	۱۵(۱۲٪)	تابستان	
۱۰۸(۹۰٪/۸)	۱۱(۹٪/۲)	پاییز	
۱۱۵(۸۹٪/۸)	۱۳(۱۰٪/۲)	زمستان	
۱۵۲(۸۷٪/۹)	۲۱(۱۲٪/۱)	۱	سن
۱۴۸(۹۰٪/۸)	۱۵(۹٪/۲)	۵-۲	
۱۰۶(۹۳٪)	۸(۷٪)	۱۰-۶	
۲۳۸(۹۰٪/۸)	۲۴(۹٪/۲)	مذکر	جنس
۱۶۸(۸۹٪/۴)	۲۰(۱۰٪/۶)	مونث	

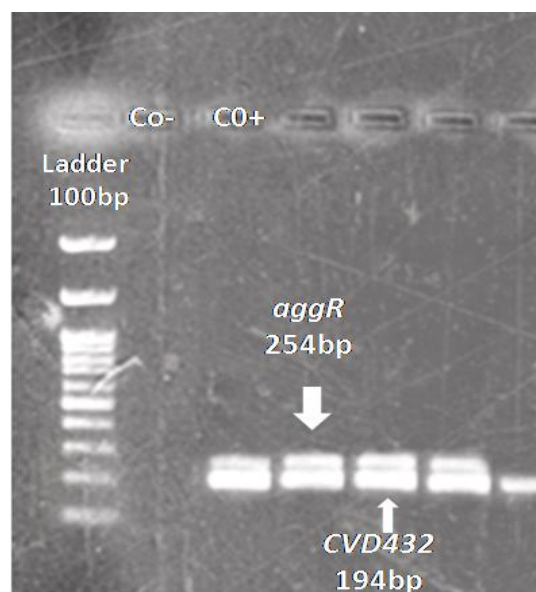
## ارزیابی گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های EAEC:

ارزیابی گروه‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های EAEC نشان داد که به ترتیب بیشترین میزان فراوانی مربوط به فیلوگروه D (۱۸٪/۴۰/۹)، unknown (۱۲٪/۲۷/۳)، G (۵٪/۱۱/۴)، B1 (۴٪/۹/۱)، F (۲٪/۴/۵)، B2 (۲٪/۴/۵) و A (۲٪/۲/۳) بود (شکل ۲). در مجموع ۲۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه در هفت گروه فیلوژنتیکی شناسایی گردید که بیشترین تنوع الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به فیلوگروه D بود. ۹۷٪ جدایه‌های EAEC دارای مقاومت چندگانه بودند (جدول ۳).

## جدول ۳. پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی و الگوی توزیع در فیلوگروه‌ها جدایه‌های EAEC

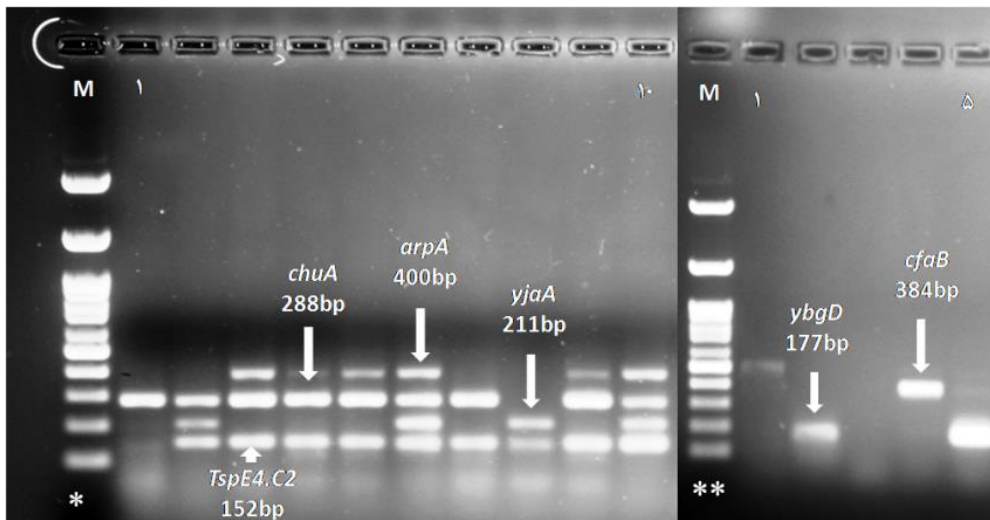
مجموع	فیلوگروپ (تعداد)	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی
1	F(1)	ERY, AMX
1	B1(1)	ERY, CZO, AMX, CRO
1	D(1)	ERY, TCY, CZO, AMX
1	Unknown(1)	ERY, SXT, CZO, AMX
1	D(1)	ERY, TCY, CZO, AMX, CRO
1	B1(1), D(1)	ERY, TCY, SXT, CZO, AMX
2	Unknown(2), D(1)	ERY, SXT, CZO, AMX, CRO
1	Unknown(1)	ERY, TCY, SXT, CZO, CRO
1	D(1)	ERY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
2	Unknown(1), A(1)	ERY, TCY, SXT, CZO, AMX, CRO

و ۱۰-۶ سال تقسیم گردیدند. توزیع فراوانی EAEC در نمونه اسهال کودکان بر حسب فصل، سن و جنس بررسی شد. از نظر آنالیز آماری اختلاف معنی داری بین توزیع فراوانی EAEC بر حسب جنس، سن و فصل مشاهده نشد (جدول ۲).



شکل ۱. ژل الکتروفورز محصول Multiplex PCR، جهت شناسایی ژن‌های *aggR*، *CVD432* در اشریشیا کلی جدا شده از کودکان اسهالی. از سمت چپ نخستین چاهک مارکر، دومین چاهک نمونه کنترل منفی، سومین چاهک نمونه کنترل مثبت و چاهک‌های بعدی جدایه‌های EAEC از نمونه‌های اسهالی

1	B2(1)	ERY, TCY, SXT, CIP, GEN, AMX
1	D(1)	ERY, TCY, CIP, CZO, AMX, CRO
1	Unknown(1)	ENR, ERY, TCY, SXT, CZO, AMX
1	D(1)	ERY, TCY, SXT, CZO, GEN, AMX, CRO
1	B2(1)	ANC, ERY, SXT, CZO, GEN, AMX, CRO
2	B1(1), Unknown(1)	ANC, ERY, TCY, SXT, CZO, AMX, CRO
1	G(1)	CHL, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
2	G(1), D(1)	ANC, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
2	Unknown(1), F(1)	ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
1	D(1)	ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, GEN, AMX, CRO
2	G(1), D(1)	ANC, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, GEN, AMX, CRO
3	Unknown(1), G(2)	ANC, ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
1	Unknown(1)	ANC, ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
4	D(4)	ANC, CHL, ENR, ERY, SXT, CIP, CZO, GEN, AMX, CRO
4	B(1), Unknown(1), D(2)	ANC, ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, GEN, AMX, CRO
1	Unknown(1)	ANC, COL, ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, AMX, CRO
2	D(2)	ANC, CHL, ENR, ERY, TCY, SXT, CIP, CZO, GEN, AMX, CRO



شکل ۲. \*ژل الکتروفورز محصول Quadroplex PCR، جهت شناسایی ژن‌های فیلوگروه‌های مختلف جدایه‌های EAEC به روش Clermont و همکاران (۲۰۱۳)، M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱ فیلوگروه F، چاهک ۲، ۴ و ۷ فیلوگروه B2، چاهک ۳، ۵ و ۹ فیلوگروه D یا E و چاهک ۶، ۸ و ۱۰ فیلوگروه Unknown (۱۷).

\*\*ژل الکتروفورز محصول Multiplex PCR، جهت شناسایی فیلوگروه‌های G, F جدایه‌های EAEC به روش Clermont و همکاران (۲۰۱۹)، M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ و ۵ فیلوگروه G، چاهک ۴ فیلوگروه F (۱۸).

سفازولین نشان داد. و بین دو فیلوگروه G و B1 ( $p= /۰۲۵$ ) مقاومت گروه فیلوژنتیک G در آنتی بیوتیک سیروفلوکساسین به صورت معنی داری مقاومت بیشتری مشاهده شد. همچنین در مقایسه گروه unknown با فیلوگروه‌های B2 (سفازولین  $p=۰/۰۱۴$ ) و جنتامایسین ( $p=۰/۰۰۵$ )، F (سفازولین  $p=۰/۰۱۴$ ) و

در جدول ۴ مقایسه گروه‌های فیلوژنتیک و مقاومت آنتی بیوتیکی مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت و از نظر آماری مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی بین فیلوگروه‌ها بررسی شد که در مجموع مقایسه بین ۲۱ دو فیلوگروه مختلف انجام شد. و در نهایت از نظر آماری، فیلوگروه D در مقایسه با گروه‌های B2 ( $p= /۰۰۳$ )، F ( $p= /۰۰۳$ ) مقاومت بیشتری رانست به



آزترونام (۵۰٪/۲۲)، انروفلوکساسین (۴۳/۲/۱۹) نشان دادند و کمترین مقاومت در مقابل کلستین (۳/۳/۲)، کلرامفنیکل (۱۵/۹/۷) و جنتامایسین (۳۶/۴/۱۶) مشاهده شد (نمودار ۱). آنالیز آماری ارتباط معنی داری بین جنس و مقاومت آنتی بیوتیکی های سفازولین، سفتری اکسون و جنتامایسین نشان داد و مقاومت آنتی بیوتیکی های سفازولین، سفتری اکسون و جنتامایسین در جنس مذکر بیشتر از جنس مونث بود.

کوتریموکسازول ( $p=0.014$ ) ارتباط معنی داری وجود داشت و گروه unknown در مقایسه با آنتی بیوتیکی های مذکور از مقاومت بیشتری برخوردار بود.

### مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها:

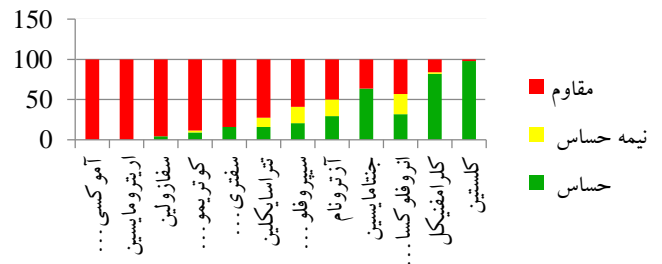
جدایه‌های EAEC به ترتیب بیشترین مقاومت را به آموکسی سیلین و اریترومایسین (۱۰۰٪/۴۴)، سفازولین (۹۵/۵/۴۲)، کوتریموکسازول (۸۸/۶/۳۹)، سفتری آکسون (۸۴/۱/۳۷)، تتراسایکلین (۷۲/۷/۳۲)، سیپروفلوکساسین (۵۹/۱/۲۶)،

**جدول ۴- توزیع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین گروه‌های فیلوژنتیک جدایه‌های EAEC**

گروه‌های فیلوژنتیک							آنتی بیوتیک
A	F	B2	B1	G	Unknown	D	
n=۱(۲/۳)	n=۲(۴/۵)	n=۲(۴/۵)	n=۴(۹/۱)	n=۵(۱۱/۴)	n=۱۲(۲۷/۳)	n=۱۸(۴۰/۹)	
۱(۱۰۰٪)	۲(۱۰۰٪)	۲(۱۰۰٪)	۴(۱۰۰٪)	۵(۱۰۰٪)	۱۲(۱۰۰٪)	۱۸(۱۰۰٪)	آموکسی سیلین
۱(۱۰۰٪)	۲(۱۰۰٪)	۲(۱۰۰٪)	۴(۱۰۰٪)	۵(۱۰۰٪)	۱۲(۱۰۰٪)	۱۸(۱۰۰٪)	اریترومایسین
۱(۱۰۰٪)	۱(۵۰٪)	۱(۵۰٪)	۴(۱۰۰٪)	۵(۱۰۰٪)	۱۲(۱۰۰٪)	۱۸(۱۰۰٪)	سفازولین
۱(۱۰۰٪)	۱(۵۰٪)	۲(۱۰۰٪)	۳(۷۵٪)	۵(۱۰۰٪)	۱۲(۱۰۰٪)	۱۵(۸۳/۳)	کوتریموکسازول
۱(۱۰۰٪)	۱(۵۰٪)	۱(۵۰٪)	۳(۷۵٪)	۵(۱۰۰٪)	۱۰(۸۳/۳)	۱۶(۸۸/۹)	سفتری آکسون
۱(۱۰۰٪)	۱(۵۰٪)	۱(۵۰٪)	۳(۷۵٪)	۵(۱۰۰٪)	۹(۷۵٪)	۱۲(۶۶/۷)	تتراسایکلین
۰	۰	۱(۵۰٪)	۲(۵۰٪)	۴(۸۰٪)	۵(۴۱/۷)	۱۰(۵۵/۵)	آزترونام
۰	۱(۵۰٪)	۱(۵۰٪)	۱(۲۵٪)	۵(۱۰۰٪)	۵(۴۱/۷)	۱۳(۷۲/۲)	سیپروفلوکساسین
۰	۰	۲(۱۰۰٪)	۱(۲۵٪)	۱(۲۰٪)	۱(۸/۳)	۱۱(۶۱/۱)	جنتامایسین
۰	۱(۵۰٪)	۰	۱(۲۵٪)	۲(۴۰٪)	۶(۵۰٪)	۹(۵۰٪)	انروفلوکساسین
۰	۰	۰	۰	۱(۲۰٪)	۰	۶(۳۳/۳)	کلرامفنیکل
۰	۰	۰	۰	۰	۱(۸/۳)	۰	کلستین

### بحث

اشریشیاکلی چسبنده روده‌ای باعث ایجاد اسهال حاد و مزمن کودکان می‌شود و همچنین با سندروم کاهش رشد و سوء تغذیه در کودکان در ارتباط است که به علت ضعف روش‌های تشخیصی در آزمایشگاه‌های بالینی نادیده گرفته می‌شود. در مطالعه حاضر از ۴۵۰ نمونه اسهال کودکان زیر ۱۰ سال (۹/۸/۴۴) جدایه‌ی EAEC جداسازی شد.



نمودار ۱. فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ۴۴ جدایه EAEC از کودکان اسهالی

۲۰۲۰ در عربستان انجام پذیرفت. از (۳۵/۵۵/۶) سویه EAEC، (۱۹/۵۴/۳) جدایه دارای ژن *aggR* بود (۲۷). در مطالعه حاضر و سایر مطالعات مذکور به جزء مطالعه محمدزاده و همکاران جهت تشخیص EAEC از ژن *CVD432* استفاده گردید. در مطالعه محمدزاده و همکاران درصد جداسازی EAEC پایین بود که به نظر می‌رسد به خاطر عدم استفاده از ژن *CVD432* جهت تشخیص EAEC می‌باشد. در مطالعه حاضر و دو مطالعه اخیر از هر دو ژن *CVD432* و *aggR* استفاده گردید. در این مطالعات درصد پایین جداسازی براساس ژن *aggR* مشاهده شد. در نتیجه طبق مطالعات انجام شده در شناسایی EAEC ژن *CVD432* ارجح تر از *aggR* به نظر می‌رسد.

نتایج مختلفی در مورد شیوع EAEC در سایر کشورها به دست آمده است. Lima و همکاران (سال ۲۰۱۳) در برزیل از ۸۳ نمونه کودکان درگیر با اسهال، ۱۴۱٪ سویه EAEC شناسایی کردند (۲۸). Ali و همکاران (سال ۲۰۱۴) در مصر از ۶۲ کودک مبتلا به اسهال، (۱۹/۳۰/۷) سویه EAEC جداسازی کردند (۲۹). Elhadi و همکاران (۲۰۲۰) در عربستان از ۱۶۳٪ سویه EAEC شناسایی کردند (۲۷). در مطالعات سایر کشورها درصد قابل توجهی از سویه‌های EAEC گزارش شد که حاکی از اهمیت بالایی این سویه در موارد اسهالی بخصوص موارد اسهالی کودکان می‌باشد.

اشریشیاکلی زیر ساختارهای فیلوژنتیکی گسترده‌ای دارد. فیلوگروه‌های F، B2، D، سویه‌های بیمارزای خارج روده‌ای را در بر می‌گیرند و سویه‌های مسئول بیمارزای شدید روده‌ای مانند سندرم همولیتیک و اورمیک و اسهال خونی متعلق به فیلوگروه G می‌باشد و این به نقش زمینه ژنتیک بیمارزای اشاره می‌کند و نیاز به شناسایی فیلوگروه‌ها را

سلمانزاده احرابی و همکاران (۲۰۰۳) در تهران از ۲۰۰ نمونه کودکان مبتلا به اسهال زیر ۵ سال، (۴۸/۲۴/۰) جدایه EAEC گزارش کردند (۲۲). عزیززاده و همکاران (سال ۲۰۰۷) در همدان از ۱۴۴ نمونه بیماران مبتلا به اسهال، (۱۰/۷/۰) پاتوتیپ EAEC را شناسایی کردند (۲۳). محمدزاده و همکاران (سال ۲۰۱۶) در تهران ژن *aggR* در (۶/۴/۲۸) ایزوله از ۱۶۵ نمونه بیماران مبتلا به اسهال شناسایی کردند (۱۱). باقری و همکاران (سال ۲۰۰۸) در گرگان از بین ۴۵۵ مورد اسهالی، (۴/۴/۰) ایزوله EAEC را جداسازی کردند که ۱۲ مورد زن و ۸ مورد مرد بودند. در حدود نیمی از آنها در رده سنی زیر یک سال قرار داشتند و از نظر توزیع فراوانی بر اساس فصل، جنس و سن با EAEC ارتباط معنی داری گزارش نشد که نتایج مطالعه با مطالعه حاضر همخوانی کامل دارد (۲۴). نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد سویه‌های EAEC از اهمیت قابل توجهی در ارتباط با اسهال عفونی برخوردار است و با توجه به فراوانی قابل توجه جدایه‌های EAEC در نمونه‌های اسهال کودکان زیر یکسال پیشنهاد می‌گردد شناسایی سویه‌های EAEC در آزمایشگاه‌های تشخیصی در موارد اسهال، بویژه در کودکان زیر یکسال مورد توجه قرار گیرد.

مهم‌ترین شاخص‌های مولکولی جهت تشخیص سویه‌های EAEC در مطالعات مختلف شناسایی دو ژن پلاسمیدی *CVD432* و *aggR* می‌باشد (۲۵). در مطالعه حاضر جهت شناسایی EAEC از ژن‌های *CVD432* و *aggR* استفاده گردید. از ۴۴ جدایه EAEC، ۳۸ مورد دارای ژن *aggR* بود. اصلانی و همکاران (سال ۲۰۱۰) در همدان از ۱۴۰٪ سویه اشریشیاکلی از کودکان زیر ۱۲ سال مبتلا به اسهال (۱۵/۱۰/۷) سویه EAEC جداسازی کردند که ۱۱ مورد دارای ژن *aggR* بود (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای که در سال

در مطالعه‌ی حاضر جدایه‌های EAEC به ترتیب بیشترین مقاومت را به آموکسی سیلین و اریترومايسين ۱۰۰٪، سفازولین ۹۵/۵٪، کوتریموکسازول ۸۸/۶٪، سفتری آکسون ۸۴/۱٪، تتراسایکلین ۷۲/۷٪، سیپروفلوکساسین ۵۹/۱٪، آزترونام ۵۰٪، و کمترین مقاومت را به کلستین ۲/۳٪، کلرامفنیکل ۱۵/۹٪، جنتامایسین ۳۶/۴٪، وانروفلوکساسین ۴۳/۲٪ نشان دادند. و ۹۷/۷٪ جدایه‌ها EAEC دارای مقاومت چندگانه می‌باشند و مقاومت آنتی بیوتیکی‌های سفازولین، سفتری اکسون و جنتامایسین در جنس مذکر بیشتر از جنس مونث بود. اصلاحی و همکاران (سال ۲۰۱۰) بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به آمپی سیلین و اریترومايسين ۱۰۰٪ و کمترین مقاومت را به آنتی بیوتیکی انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین ۰٪ نشان دادند (۲۶). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که جدایه‌های EAEC نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین مقاومت پیدا کردند می‌تواند هشدار می‌باشد که در تجویز آنتی بیوتیکی دقت بیشتر به کار رود و قبل از تجویز آنتی بیوتیک تست حساسیت آنتی بیوگرام انجام گیرد. همچنین، در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های EAEC در سایر کشورها مورد بررسی قرار گرفت. Elhadi و همکاران (۲۰۲۰) به منظور بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های EAEC از بیماران مبتلا به اسهال بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به تتراسایکلین ۶۸/۶٪ و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آمیکاسین ۰٪ گزارش دادند (۲۷). Modgil و همکاران (۲۰۲۱) در سال ۲۰۲۱ بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آمپی سیلین (۸۷/۰٪)، سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول (۷۲/۵٪)، سفتری آکسون (۶۶/۱٪) و لوفلوکساسین (۵۴/۸٪) نشان دادند. ۷۳/۸٪ جدایه‌های EAEC مقاومت چندگانه دارویی

توجه می‌نماید. ۷۰٪ در صد سویه‌های فیلو گروه G، یک یا چند ژن مقاومت آنتی بیوتیکی را کد می‌کنند و ۵۳٪ درصد از سویه‌های فیلو گروه G مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه دارند (۱۸). به طور کلی اطلاعات اندکی در مورد گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های EAEC به طور اختصاصی در دسترس است و بر اساس بررسی‌های انجام شده، فیلو گروه G تا کنون در این سویه‌ها مورد بررسی قرار نگرفته است. برای اولین بار در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. درصد قابل توجهی در مطالعه گزارش شد. و از طرفی یکی از معایب اصلی روش تعیین فیلو گروه وجود گروهی از جدایه‌های /شیشیاکلی است که قابل دسته بندی نمی‌باشند (اصطلاحاً unknown یا ناشناخته هستند) و این میزان در این مطالعه درصد قابل توجهی ۲۷/۳٪ را به خود اختصاص داده است. در مطالعه حاضر به ترتیب بیشترین میزان فراوانی مربوط به فیلو گروه D (۴۰/۹٪)، ۱۸، unknown (۲۷/۳٪)، ۱۲، G (۱۱/۴٪)، ۵، B1 (۹/۱٪)، ۴، F (۴/۵٪)، ۲، B2 (۴/۵٪) و A (۲/۳٪) بود. در مجموع ۲۷ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه در هفت گروه فیلوژنتیکی شناسایی گردید که بیشترین تنوع الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به فیلو گروه D بود. در مقایسه فیلو گروه‌ها ارتباط معنی داری با مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داده شد. در تنها مطالعه Mosquito و همکاران (۲۰۱۵) به منظور ارتباط دادن بین فیلو گروه‌های /شیشیاکلی اسهال زا با مقاومت آنتی بیوتیک ۷۰٪ی زوله EAEC از موارد اسهالی شناسایی کردند که به ترتیب به فیلوژنتیک D (۴۱٪)، A (۲۸٪)، B1 (۲۰٪)، B2 (۱۰٪) تعلق داشت (۳۱). D بیشترین فراوانی فیلوژنتیکی در این مطالعه را نشان می‌داد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

فیلوگروه وجود گروهی از جدایه‌های EAEC است که قابل دسته‌بندی نمی‌باشند (اصطلاحاً unknown یا ناشناخته هستند) و این میزان در این مطالعه درصد قابل توجهی ۲۷/۳٪ را به خود اختصاص داده است. برای حل این مشکل Clermont و همکارانش در سال ۲۰۱۳ تکنیک MLST را پیشنهاد دادند. از طرفی، به دلیل شیوع بالای مقاومت‌های چند گانه در سویه‌های EAEC، انجام تست آنتی‌بیوگرام برای درمان اسهال کودکان ضروری به نظر می‌رسد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از عزیزانی که در جهت هماهنگی و جمع‌آوری نمونه در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌شود.

داشتند (۳۲). در مقایسه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های EAEC در سایر کشورها با مطالعه حاضر تفاوت دارد که می‌تواند حاکی از تفاوت جغرافیایی و اپیدمیولوژی این سویه‌ها باشد. بنابر فراوانی بالای مقاومت سویه‌های EAEC و تنوع آنها لازم است که در هر منطقه مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت درمان موثر بررسی شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع بالای این پاتوتیپ در کودکان زیر یک سال و نقش آن در سندروم کاهش رشد کودکان، پیشنهاد می‌گردد، غربالگری سالانه کودکانی که از کاهش رشد رنج می‌برند انجام گیرد و فراوانی EAEC در هر منطقه مورد بررسی قرار گیرد. که این مساله به ویژه در کودکان زیر یک سال حائز اهمیت است. یکی از معایب اصلی روش تعیین

### References

1. Azevedo Feitosa Ferro T, Costa Moraes F, Meneses da Silva A, Porcy C, Amorim Soares L, Andrade Monteiro C, et al. Characterization of virulence factors in Enteroaggregative and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea. *Advances in Infectious Diseases*. 2012;2(4):135-142.
2. Haghi F, Zeighami H, Hajiahmadi F, Khoshvaght H, Bayat M. Frequency and antimicrobial resistance of diarrhoeagenic *Escherichia coli* from young children in Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(3):427-432.
3. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw-Hill Education; 2015.
4. Roche JK, Cabel A, Sevilleja J, Nataro J, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growth while malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(4):506-14.
5. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(1):26-38.
6. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. *Journal of applied microbiology*. 2017;123(3):570-81.
7. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(4):822-80.
8. Gomes T, Elias W, Scaletsky I, Guth B, Rodrigues J, Piazza R, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology* 47. 2016.
9. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*. 2004;2(2):123-40.
10. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Between pathogenicity and commensalism*. 2013:3-32.
11. Mohammadzadeh M, Goudarzi H, Dabiri H, Fallah F. Frequency of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates among patients with diarrhea referred to Tehran hospitals. *Research in Medicine*. 2016;40(2):68-72.
12. DuPont HL, Mathewson JJ. *Escherichia coli* diarrhea. *Bacterial infections of humans*: Springer; 1998. p. 269-83.
13. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*. 8-12:254(1);2006.

14. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4555-8.
15. Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TA, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*. 2010;10(1):1-10.
16. Gordon DM. The influence of ecological factors on the distribution and the genetic structure of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2004;1(1).
17. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The C lermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*. 2013;5(1):58-65.
18. Clermont O, Dixit OV, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, BridierNahmias A, et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*. 2019;21(8):3107-17.
19. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Enterobacteriaceae. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Londo: Elsevier Health Sciences; 2013. P. 239-74.
20. Iwu CJ, Jaja IF, Iweriebor BC, Obi LC, Okoh AI. Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O26, O145, and O157: H7 isolated from swine in the Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2017;7(9):5.3-9
21. Biemer JJ. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1973;3(2):135-40.
22. Salmanzadeh-Ahrabi S, Habibi E, Jaafari F, Zali M-R. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* diarrhoea in children in Tehran. *Annals of tropical paediatrics*. 2005;25(1):35-9.
23. Alizadeh A, Behrouz N, Salmanzadeh S, Ranjbar M, Azimian M, Habibi E, et al. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* species in acute diarrhoea in Hamedan, Islamic Republic of Iran. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 13 (2), 243-249, 2007. 2007.
24. Bagheri H, Ghaemi A, Aslani M, Mozafari N, Livani S, Dadgar T. The Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* in cases of Diarrhea in Gorgan, IRAN. *Medical Laboratory Journal*. 2008;2(1):0.
25. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(5):2138-40.
26. Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(2):e136-e9.
27. Elhadi N, Aljindan, Reem, Alsamman, Khaldoon, Alomar, Amer, Aljeldah, Mohammed. Antibiotic resistance and molecular characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Heliyon*. 2020;6(4).
28. Lima IFN, Boisen N, da Silva Quetz J, Havt A, de Carvalho EB, Soares AM, et al. Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 5):683.
29. Ali MMM, Ahmed SF, Klana JD, Mohamed ZK, Moussa TA, Ghenghesh KS. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014;8(05):589-96.
30. Kmetova M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet Journal of food safety*. 2009;11:19-23.
31. Mosquito S, PonsMJ, Riveros M, Ruiz J, Ochoa TJ. Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. *The Scientific World Journal*. 2015;2015.
32. Modgil V, Chaudhary P, Bharti B, Mahindroo J, Yousuf M, Koundal M, et al. Prevalence, Virulence Gene Profiling, and Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* from Children with Acute Diarrhea, Asymptomatic Nourished, and Malnourished Children Younger Than 5 Years of Age in India. *The Journal of pediatrics*. 2021.

## Original Article

# Investigation of Prevalence, Phylogenetic Groups and Antibiotic Resistance Patterns of Enteraggregative *Escherichia coli*(EAEC) Isolated from Diarrheic children in Mashhad

Received: 23/12/2021 - Accepted: 04/07/2022

zakiyeh Imanpanah<sup>1</sup>  
Mehdi Askari Bedoui<sup>2</sup>  
Gholamreza Hashemi Tabar<sup>\*3</sup>  
Kiarash Ghazvini<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Phd student of bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>3</sup>Professor of Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (Corresponding Author)

<sup>4</sup> Professor of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Mashhad University of Medical, Mashhad, Iran

SciencesEmail:  
ahmadpourfatimaa@gmail.com

### Abstract

#### Introduction

Purpose of this study was to investigate of prevalence, phylogenetic groups and antibiotic resistance pattern EAEC isolated from diarrheic children in Mashhad city.

#### Material and Method

This cross-sectional study conducted for one year. In total, 450 diarrhea samples of children under 10 years of age were collected from children's specialized hospital in Mashhad. After isolation of *Escherichia coli*, EAEC isolates were identified by PCR molcular method. Phylogenetic groups of EAEC isolates were determined using the original and updated 2019 method. Antimicrobial susceptibility test was performed using disc diffusion methods(Kirby-Bauer method) against 12 antibiotics.

#### Results

44(9.8%) EAEC isolates were identified from 422(93.8%) *Escherichia coli* isolates by PCR. Seven phylogroups including D(40.9%), unknown(27.3%), G(11.4%), B1(9.1%), F(4.5%), B2(4.5%) and A(2.3%) were detected among EAEC isolates.The highest diversity of antibiotic resistance patterns was related to Phylogroup D. EAEC isolates showed the highest resistance to amoxicillin and erythromycin 100%. Overall, 97.7% of EAEC isolates were with multiple drug resistance(MDR).

#### Conclusion

The present study showed a significant presence of EAEC strains. Considering the role of EAEC in chronic diarrhea and growth retardation syndrome in children, it is suggested that the identification of EAEC strains to be considered in diagnostic laboratories in cases of children's diarrhea. on the other hand, due to the high prevalence of multiple resistances, antibiogram test is required to treat diarrhea in children.

#### Key words

EAEC, phylogenetic, Antibiotic Resistance, Children's diarrhea, Mashhad

**Acknowledgement:** There is no conflict of interest