

بررسی نقش سویه‌های تیپیک اش‌ریشیا کلی انتروآگره گیتو (tEAEC) در اسهال کودکان

محمد مهدی اصلانی^۱، علی زواری^۲، محمد یوسف علیخانی^۳

۱- دانشیار گروه میکروبیشناسی، بخش میکروبیشناسی، انستیتویاستور ایران، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- دانشیار گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (مؤلف مسئول) تلفن: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۴ alikhani43@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های اش‌ریشیا کلی انتروآگره گیتو عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان می‌باشند. این سویه‌ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی آگره گیتو (stacked brick) به سلول‌های اپیتلیالی مانند HeLa و HEP-2 هستند. استفاده از تکنیک PCR بر اساس حضور ژنهای مرتبط با ویروولانس، تشخیص سویه‌های EAEC را تسهیل می‌نماید. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی روش PCR ژن *pCVD432* جهت شناسایی سویه‌های EAEC و وجود ژنهای ویروولانس *astA*، *aap*، *aafA*، *aggA*، *aggR* جهت افتراق سویه‌های تیپیک و آتیپیک EAEC می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق ۱۴۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از کودکان زیر ۱۲ سال دارای اسهال مراجعه‌کننده به بیمارستان بعثت همدان در سال ۸۷-۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از تلقیح نمونه‌ها به محیط مکانکی آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. بعد از شناسایی کلنی‌های اش‌ریشیا کلی با تستهای بیوشیمیایی، ابتدا با استفاده از پرایمر *pCVD432* که اختصاصی سویه‌های EAEC است، سویه‌های EAEC شناسایی و پس از آن فاکتورهای ویروولانس آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای ویروولانس *astA*، *aap*، *aafA*، *aggA*، *aggR* مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۴۰ بیمار مبتلا به اسهال ۱۵ (۱۰/۸٪) سویه اش‌ریشیا کلی دارای ژن *pCVD432* ایزوله گردید. ژن *aggR* در ۱۱ (۷۳/۳٪) سویه شناسایی گردید. ژنهای *aggA* و *aafA* به ترتیب در ۳ و ۴ ایزوله وجود داشت. ژن *aap* در ۹ سویه و ژن *astA* در ۷ سویه مثبت گزارش گردید. چندین ترکیب مختلف از شاخص‌های ژنتیکی در بین سویه‌های EAEC مشاهده شد و مشخص گردید که شایعترین الگوهای ژنومی *aggR-aap* با ۳/۵٪ و *aggR-aafA* با ۷/۲۶٪ بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در این منطقه سویه‌های EAEC یکی از شایعترین پاتوژنهای رودهای محسوب می‌گردند. PCR ژن *pCVD432* بعنوان معمول‌ترین هدف جهت شناسایی مولکولی این سویه‌ها می‌باشد. سویه‌های تیپیکال EAEC با دارا بودن ژن *aggR* شیوع بالایی در سویه‌های ایزوله شده در این منطقه را نشان داده‌اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویروولانس دارای هتروژنی هستند.

کلید واژه‌ها: اش‌ریشیا کلی انتروآگره گیتو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، کودکان

وصول مقاله: ۸۹/۱۰/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۴/۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۶/۱۵

مقدمه

از عوامل مهم مرگ و میر کودکان است به طوری که دومین عامل مرگ و میر بعد از عفونت‌های تنفسی در کودکان به شمار می‌آید (۱). سالیانه ۱/۴ بلیون مورد

اسهال از شایع‌ترین بیماری‌ها در دنیا است که بخصوص در کشورهای در حال توسعه شایع می‌باشد و

مناسبی نمی‌باشد. استفاده از تکنیک PCR بر اساس حضور ژنهای مرتبط با ویرولانسی، تشخیص سویه‌های EAEC را بهبود می‌بخشد. پاتوژن‌ها و نحوه بیماری‌زایی سویه‌های EAEC به طور کامل مشخص نشده است و بسیاری از ژن‌های کد کننده فاکتورهای ویرولانسی سویه‌های EAEC بر روی پلاسمید ۶۵-۶۰ مگا دالتونی باکتری (pAA) قرار دارند. فعالیت اکثر ژنهای کد کننده فاکتورهای ویرولانسی در سویه‌های EAEC توسط یک ژن تنظیم کننده اصلی به نام aggR کنترل می‌شود. ژن aggR بر روی پلاسمید اصلی ویرولانسی باکتری (pAA) که بسیاری از فاکتورهای ویرولانسی را کد می‌کند قرار دارد، سویه‌های دارای رگولون aggR بنام سویه‌های EAEC تپیک (Typical EAEC) نامگذاری شده‌اند و اعتقاد بر این است که سویه‌های بالقوه پاتوژن EAEC دارای ژن aggR می‌باشند (۸). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی روش PCR ژن *pCVD432* جهت شناسایی سویه‌های EAEC و وجود ژنهای ویرولانسی *aggR*، *aggA*، *aafA*، *aap*، *astA* جهت افتراق سویه‌های تپیک و آتپیک EAEC می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی (sectional Cross-), ۱۴۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از کودکان زیر ۱۲ سال (۸۳ پسر و ۵۷ دختر) دارای اسهال مراجعه کننده به بیمارستان بعثت همدان در سال ۸۷-۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌های مدفوع بوسیله محیط انتقالی کری بلیر به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان منتقل گردید و بر روی محیط مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار

اسهال فقط در کودکان زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد که از این تعداد ۱۲۶/۶ میلیون نفر نیاز به مراقبتهای پزشکی و ۹ میلیون نفر نیاز به بستری شدن در بیمارستان دارند و ۲ تا ۳/۵ میلیون نوزاد سالانه در این کشورها بر اثر اسهال تلف می‌شوند (۲). همچنین تخمین زده می‌شود که روزانه ۱۲۶۰۰ مورد مرگ در کودکان کمتر از ۵ سال در آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی اتفاق می‌افتد (۳).

معمولاً اسهال حاد علت عفونی دارد و توسط بسیاری از باکتریها، ویروس‌ها و انگل‌ها ایجاد می‌شود که این عوامل با ایجاد عفونت و تخریب سلولهای پوششی سطح روده و همچنین ترشح توکسین باعث ایجاد اسهال می‌شوند. اشریشیاکلی از مهمترین عوامل عفونی باکتریایی اتیولوژیک اسهال می‌باشد (۴). علاوه بر ایجاد عفونتهای خارج روده‌ای، شش دسته از اشریشیاکلی‌های بیماری‌زای روده‌ای شناسایی شده است که بیماری‌زایی پنج گونه از آنها برای انسان به اثبات رسیده است (۴)، که عبارتند از: اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC)، اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC)، اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC)، اشریشیاکلی دیفیوز ادهیرنت (DAEC)، اشریشیاکلی انترواینویسیو (EIEC)، و اشریشیاکلی انترواگره گیتو (EAEC).

سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتو عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان، می‌باشند. این سویه‌ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی اگره گیتو (stacked brick) به سلول‌های اپیتلیالی مانند HeLa و HEp-2 هستند (۷-۵). اگرچه چسبندگی بعنوان یک متد تشخیصی بدلیل پر زحمت بودن و نیاز به افراد با تجربه جهت تفسیر نتایج روش

۱/۵ از $MgCl_2(25mM)$ ، $۰/۵ \mu l$ از آنزیم تک پلیمراز (Fermentase $5u/\mu l$)، و $۱ \mu l$ از DNA الگو بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی در حین مراحل آزمایش یک میکروتیوپ فاقد DNA الگو بعنوان کنترل منفی استفاده گردید. از سویه اشیریشیا کلی E 17-2 بعنوان کنترل مثبت و از سویه E. coli K12 بعنوان سویه کنترل منفی در تمام مراحل آزمایش استفاده شده است. آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز $۱/۵\%$ انجام گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماري SPSS-13، و آزمون کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. p کوچکتر و مساوی $۰/۰۵$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه نمونه‌های مدفوع تهیه شده از کودکان دارای اسهال بستری یا مراجعه‌کننده به بیمارستان بعثت همدان از خرداد تا اسفند ماه ۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفت. ۴۹% نمونه‌ها در فصل تابستان و ۳۰% در فصل پائیز جمع‌آوری شده‌اند. مشخصات بیماران بر اساس گروه‌های سنی، و جنس در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج PCR ژن *pCVD432*

از ۱۴۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از کودکان مبتلا به اسهال در مجموع با استفاده از PCR ژن *pCVD432*، $۱۵ (۱۰/۷\%)$ سویه اشیریشیاکلی انترواگره گیتو شناسایی گردید. بیشترین سویه‌های اشیریشیاکلی انترواگره گیتو از کودکان زیر ۵ سال جدا گردید. بطوریکه ۱۲ سویه EAEC (۸۰%) از کودکان زیر ۵ سال جدا شد. بر اساس جنس نیز فراوانی سویه‌های EAEC جدا شده بین جنس مذکر و مؤنث تقریباً یکسان بود که

(EMB) کشت داده شد و بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، پلیت‌ها در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا تعداد نمونه‌ها کامل شوند.

در این تحقیق از شش جفت پرایمر اختصاصی به منظور شناسایی و تعیین فاکتورهای ویروالانس سویه‌های اشیریشیا کلی انترواگره گیتو استفاده شد ($۹-۱۴$). مشخصات و توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ ذکر شده است.

بعد از شناسایی کلنی‌های اشیریشیا کلی با تست‌های بیوشیمیایی، ابتدا با استفاده از پرایمر *pCVD432* که اختصاصی سویه‌های EAEC است، سویه‌های EAEC شناسایی و پس از آن فاکتورهای ویروالانس آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ویروالانس *astA* و *aaP*، *aafA*، *aggA*، *aggR* مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه DNA باکتری: به منظور استخراج DNA باکتری از روش حرارت دادن (boiling) استفاده گردید. بطور خلاصه، یک لوپ کامل از قسمت اول پلیت تلقیح شده با نمونه مدفوع برداشت نموده و در ۲ سی سی نوترینت برات کشت داده و در دمای ۳۷ °C بمدت ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از حرارت دادن این سوسپانسیون در دمای ۱۰۰ °C بمدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ نمودن آن در g ۱۴۰۰۰ ، مایع روئی آن جمع‌آوری و بعنوان DNA الگو استفاده شد.

روش انجام PCR: جهت شناسایی سویه‌های EAEC و تعیین ژنهای ویروالانس از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید. واکنش مخلوط PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید که شامل $۱ \mu l$ از غلظت $۱۰ pmol$ هر کدام از پرایمرها، $۴ \mu l$ از $dNTPs(2mM)$ ، $۲/۵ \mu l$ PCR buffer (10X) از

مشخصات کامل سویه‌های جدا شده بر حسب سن و جنس در جدول ۳ ارائه شده است.

نتایج PCR ژن‌های ویروالانس

۱۵ سویه EAEC جدا شده از بیماران از نظر وجود ژن‌های ویروالانس *astA*، *aaP*، *aafA*، *aggA*، *aggR* بوسیله PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۴ مشخص شده است.

بحث

اسهال یکی از شایع‌ترین بیماری‌های کودکان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد، بطوریکه سالیانه ۲ تا ۳/۵ میلیون کودک در این کشورها بر اثر اسهال تلف می‌شوند. سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتو عامل ایجاد اسهال مداوم کودکان در کشورهای صنعتی و در حال توسعه، اسهال مسافران، اسهال مداوم در افراد مبتلا به ایدز و همچنین عفونت‌های منتقله از راه غذا می‌باشند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اشریشیاکلی EAEC دومین عامل ایجاد اسهال مسافران پس از اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) می‌باشد (۸).

بوسیله تکنیک PCR تعداد ۱۵ سویه اشریشیاکلی انترواگره گیتو شناسایی گردید که فراوانی آن برابر ۱۰/۷ درصد می‌باشد. شیوع سویه‌های اشریشیاکلی EAEC در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت گزارش شده است اما متوسط شیوع آن در دنیا تقریباً حدود ۱۰ درصد می‌باشد. از ۱۵ سویه اشریشیاکلی انترواگره گیتو جدا شده در این مطالعه، ۲ سویه (۱۳/۳٪) از کودکان زیر یکسال، ۱۰ سویه (۶۶/۷٪) از کودکان یک تا ۵ سال جدا گردید. در حالیکه نمونه‌های مدفوع از کودکان با سنین متفاوت گرفته شده بود و نمونه‌های جمع‌آوری

شده از کودکان دارای سن زیر ۱۰ سال از نظر تعداد متناسب با گروه سنی زیر ۵ سال بود ولی فقط سه سویه EAEC از این گروه سنی جدا گردید، در مقابل ۱۲ سویه EAEC (۸۰٪) از کودکان زیر ۵ سال جدا شد که نشان دهنده حساسیت بیشتر کودکان زیر ۵ سال به عفونت ناشی از سویه‌های EAEC می‌باشد.

بوذری و همکاران در سال ۱۹۹۴ چسبندگی سویه‌های جدا شده از بیماران دارای اسهال را بررسی کردند (۱۵) که ۳۲ درصد این سویه‌ها اتصال آگره گیتو به سلول‌های HeLa داشتند که به عنوان فراوانی این سویه‌ها در ایران (تهران) گزارش گردید. اما در مطالعه بعدی در سال ۲۰۰۱ که بر روی همین سویه‌ها انجام گرفته است فقط ۴۶/۹ درصد این سویه‌ها با پروب اختصاصی سویه‌های EAEC واکنش دادند (۱۶). اگر روش هیبریدیزاسیون در این مورد ملاک قرار گیرد میزان شیوع حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد خواهد بود که نزدیک به میزان فراوانی سویه‌های EAEC در این مطالعه می‌باشد. با توجه به اقلیم آب و هوایی شهر همدان که جزو مناطق سردسیر است و مقایسه آن با کشورهای سردسیر مانند مطالعه انجام گرفته در کشور سوئد می‌بینیم که فراوانی سویه‌های EAEC در این دو ناحیه تقریباً یکسان می‌باشد. البته فراوانی سویه‌های EAEC در مناطق مختلف جغرافیایی بسیار متفاوت است. بطوریکه فراوانی آن در شیلی ۳۳ درصد، هند ۲۰ درصد، برزیل ۶۹ درصد، آلمان ۲ درصد (۱۷)، سوئد ۱۲ درصد (۱۸)، استرالیا ۶/۵ درصد (۱۹)، نیجریه ۳۹ درصد (۲۰)، ژاپن ۳۷/۳ درصد (۲۱) و افریقای جنوبی ۱۹/۶ درصد (۲۲) است که نشان‌دهنده شیوع کمتر در کشورهای صنعتی نسبت به کشورهای در حال توسعه، می‌باشد.

EAEC فاقد ژن *aggR* سویه‌های آنتی‌بیک بوده و اهمیت بیماری‌زایی کمتری دارند یا اینکه غیر بیماری‌زا می‌باشند. ژن *aggR* ابتدا به عنوان فاکتور مورد نیاز جهت بیان فیمبریه AAF/I توصیف شد. سپس مشخص شد که بیان فیمبریه AAF/II و AAF/III نیز تحت تنظیم ژن *aggR* می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان داده که ژن *aggR* برای بیان پروتئین دی‌سپرسین و توکسین EAST1 نیز ضروری می‌باشد، بنابراین Nataro پیشنهاد کرده است که از رگولون *aggR* می‌توان به عنوان مارکری جهت شناسایی سویه‌های بیماری‌زای EAEC استفاده کرد (۲۴). از طرفی Jiang و همکاران در بررسی بیماران آمریکایی دارای اسهال مسافرتی مشاهده کردند، در سویه‌های EAEC جدا شده از این بیماران پس از ژن *aggA* شیوع ژن *aggR* از سایر فاکتورهای ویروالانس بیشتر است. همچنین مشاهده کردند که سیتوکین‌های اینترلوکین ۸ و اینترفرون گاما در مدفوع افراد مبتلا به سویه‌های EAEC دارای رگولون *aggR* بسیار بالاتر از افرادی است که مبتلا به عفونت سویه‌های EAEC فاقد ژن *aggR* می‌باشند. به همین جهت پیشنهاد کردند که سویه‌های EAEC دارای هر دو ژن *aggR* و *aafA* یا هر کدام از این ژن‌ها به تنهایی سویه‌های پاتوژن می‌باشند (۲۵). در مطالعه Mohamed و همکاران (۲۶)، سویه‌های EAEC دارای ژن *aggR* به تنهایی یا همراه با سایر ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس ارتباط پیوسته‌ای با تشکیل بیوفیلم داشتند. همچنین سویه‌هایی که علاوه بر ژن *aggR* دارای ژن‌های *astA*, *irp2*, *aaP* و *pet* بودند، بیوفیلم بیشتری تولید کردند. با توجه به این مشاهدات این محققین پیشنهاد کردند که تولید بیوفیلم باعث کلونیزاسیون مداوم این سویه‌ها در روده انسان می‌شود و

در این مطالعه ۸۶/۷ درصد سویه‌های جدا شده حداقل یکی از فاکتورهای ویروالانس *aggR*, *aggA*, *aafA*, *aap* و *astA* را دارا بودند. فقط دو سویه (۱۳/۳٪) ایزوله شده هیچکدام از فاکتورهای ویروالانس را نداشتند. در مقابل یکی از سویه‌های ایزوله شده دارای تمامی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس (۶/۷٪)، دو سویه دارای چهار ژن کدکننده فاکتورهای ویروالانس (۱۳/۳٪)، پنج سویه هم دارای سه ژن (۳۳/۳٪)، یک سویه دارای دو ژن (۶/۷٪) و چهار سویه ایزوله شده نیز دارای فقط یک ژن کدکننده فاکتورهای ویروالانس بودند (۲۶/۷٪). با توجه به این نکته که سویه‌های اش‌ریشیاکلی انترواگره گیتو علاوه بر افراد بیمار دارای اسهال در افراد سالم نیز یافت می‌شوند، به همین دلیل محققین جهت شناسایی سویه‌های بیماری‌زای EAEC فاکتورهای خاصی را به عنوان فاکتورهای اصلی بیماری‌زایی این سویه‌ها پیشنهاد داده‌اند (۲۳).

Okeke (۲۰) و همکاران نشان دادند که سویه‌های EAEC دارای فیمبریه AAF/II ارتباط مستقیم با ایجاد اسهال در کودکان نیجریه دارند و اکثر سویه‌های جدا شده از کودکان ژن کدکننده فیمبریه AAF/II (*aafA*) را دارا بودند. بر این اساس پیشنهاد کردند که سویه‌های EAEC دارای ژن کدکننده فیمبریه AAF/II پاتوژن حقیقی می‌باشند، اما در سایر مطالعات انجام شده مشخص شد که در تعداد کمی از سویه‌های EAEC جدا شده از بیماران ژن *aafA* قابل شناسایی است. Nataro مشابه با سویه‌های اش‌ریشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC) واژه سویه‌های اش‌ریشیاکلی انترواگره گیتو تپیک را برای سویه‌هایی که دارای ژن *aggR* می‌باشند، پیشنهاد کرده است و معتقد است سویه‌های EAEC دارای این ژن پاتوژن حقیقی هستند. بر این اساس سویه‌های

میزان بروز ژن aggR در مناطق جغرافیایی مختلف بسیار متنوع است، به طور مثال در امریکا در ۴۱ درصد سویه‌ها (۲۵)، انگلستان در ۶۴ درصد سویه‌ها (۲۷)، هند در ۶۵/۳ درصد سویه‌ها (۲۸) و کره جنوبی (۲۹) و نیجریه (۲۰) در ۱۰۰ درصد سویه‌های EAEC ایزوله شده از بیماران، ژن aggR شناسایی شده است. بوذری و همکاران (۳۰) در ۶۶ درصد سویه‌های EAEC جدا شده از بیماران این ژن را شناسایی کردند که تقریباً مشابه نتیجه بدست آمده در این تحقیق می‌باشد. از طرفی در این مطالعه ۴ سویه EAEC جدا شده از بیماران دارای اسهال فاقد ژن aggR بودند که دو سویه فاقد تمامی فاکتورهای ویروالانس بررسی شده و یک سویه EAEC فقط دارای توکسین EAST1 و سویه EAEC دیگر هم فقط دارای پروتئین دیسپرسین بودند.

ارتباط نزدیکی با رگولون aggR و ژن‌های تحت تنظیم آن دارد.

در این مطالعه ژن aggR بیشترین فراوانی را در میان فاکتورهای ویروالانس بررسی شده در سویه‌های EAEC بررسی شده داشتند و در ۷۳/۳ درصد سویه‌های EAEC جدا شده شناسایی گردید که به عنوان سویه‌های EAEC تیپیک شناخته می‌شوند. همچنین ۶۰ درصد سویه‌های ایزوله شده علاوه بر ژن aggR دارای یک یا چند فاکتور دیگر ویروالانس نیز بودند (جدول ۴) که در این میان ژن aaP بیشترین فاکتور ویروالانس همراه با ژن aggR بود. با توجه به اینکه اکثریت سویه‌های ایزوله شده در این تحقیق دارای ژن aggR بودند می‌توان چنین نتیجه گرفت که اکثر سویه‌های اشریشیاکلی ایزوله شده از کودکان شهر همدان تیپیک و پاتوژن حقیقی هستند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Gene	Primers	Size bp	Annealing temperature	Reference
pCVD432	F-5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3' R-5'-AATGTATAGAAAATCCGCTGTT-3'	630	53°C	12
aggR	F-5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3' R-5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'	254	53°C	13
aggA	F-5'-TTAGTCTTCTATCTAGGG-3' R-5'-AAATTAATTCCGGCATGG-3'	457	46°C	8
aafA	F-5'-TGCGATTGCTACTTTATTAT-3' R-5'-ATTGACCGTGATTGGCTTCC-3'	242	55°C	15
aaP	F-5'-CTTGGGTATCAGCCTGAATG-3' R-5'-AACCCATTCGGTTAGAGCAC-3'	310	52°C	16
astA	F-5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3' R-5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3'	111	55°C	17

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از

بیماران بر حسب سن و جنس

تعداد کل	مؤنث	مذکر	گروه‌های سنی
تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	
۱۸ (۱۲/۸)	۸ (۵/۷)	۱۰ (۷/۱)	زیر ۱ سال
۶۴ (۴۵/۷)	۲۵ (۱۷/۸)	۳۹ (۲۷/۸)	۱-۵ سال
۵۸ (۴۱/۴)	۲۴ (۱۷/۱)	۳۴ (۲۴/۲)	۶-۱۲ سال
۱۴۰ (۱۰۰)	۵۷ (۴۰/۷)	۸۳ (۵۹/۳)	جمع کل

جدول ۳: توزیع فراوانی سویه‌های اشریشیا کلی انترواگره گیتیبو جدا شده از کودکان دارای اسهال با روش PCR به تفکیک سن و جنس

تعداد کل	مؤنث	مذکر	گروه‌های سنی
تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	
۲ (۱۳/۳)	۰ (۰)	۲ (۱۳/۳)	زیر یک سال
۱۰ (۶۶/۷)	۴ (۲۶/۷)	۶ (۴۰)	۱-۵ سال
۳ (۲۰)	۳ (۲۰)	۰ (۰)	۶-۱۲ سال
۱۵ (۱۰۰)	۷ (۴۶/۷)	۸ (۵۳/۳)	جمع کل

جدول ۴: نتایج PCR ژن‌های ویروالانس در سویه‌های EAEC جدا شده

EAEC strains	aggR	aggA	aafA	aaP	astA
EAEC1	+	-	-	+	+
EAEC2	+	+	-	+	-
EAEC3	-	-	-	-	-
EAEC4	+	-	-	+	+
EAEC5	-	-	-	-	-
EAEC6	-	-	-	+	-
EAEC7	+	-	-	-	-
EAEC8	+	-	-	+	+
EAEC9	-	-	-	-	+
EAEC10	+	-	-	-	-
EAEC11	+	-	-	+	-
EAEC12	+	+	+	-	+
EAEC13	+	+	+	+	+
EAEC14	+	-	+	+	+
EAEC15	+	-	+	+	-
Total	11	3	4	9	7
%	73.3	20	26.7	60	46.7

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که در این منطقه سویه‌های EAEC یکی از شایعترین پاتوژنهای روده‌ای محسوب می‌گردند و PCR ژن *pCVD432* بعنوان معمول‌ترین هدف جهت شناسایی مولکولی این سویه‌ها می‌باشد. سویه‌های تپیکال

EAEC با دارا بودن ژن *aggR* شیوع بالایی را نشان داده‌اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویروالانس دارای هتروژنی هستند. ضمناً، نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌های EAEC فاقد ژن *aggR* نیز بیماریزا هستند و احتمالاً فاکتورهای ویروالانس دیگری در بیماریزایی این سویه‌ها نقش دارند که تاکنون شناسایی نشده‌اند.

تشکر و قدردانی

بیمارستان بعثت همدان که در انجام این تحقیق ما را یاری رسانده اند کمال تشکر و امتنان را داریم.

از معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان و و همکاران آزمایشگاه میکروبیشناسی دانشکده پزشکی و آزمایشگاه

References

1. Sengupta A, Mannan M. Diarrheal disease in children. *Quarterly Medical Rev.* 2005; 56: 2-35.
2. Miguel O'Ryan, Valeria Prado, and Larry K. Pickering, FAAP. A. Millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Pediatric Infect Dis* 2005; 16: 125-136.
3. Trung Vu Nguyen, Phung Le Van, Chinh Le Huy, Khanh Nguyen Gia, and Andrej Weintraub. Detection and characterization of diarrheagenic escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* .2004;57:2204-5.
4. Nataro JP, and JB Kaper. Diarrheagenic escherichia coli *Clin.Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
5. Cravioto A, A Tello A Navarro, J Ruiz, H Viliafan, F Uribe, and C Eslava. Association of Escherichia coli HEp-2 cell adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991; 337: 262-264.
6. Nataro JP, JB. Kaper, R Robins-Browne, V Prado and MM Levine. Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 829-831.
7. Savarino SJ. Enteroadherent Escherichia coli: a heteroge-neous group of E. coli associated with diarrhoeal diseases. *Trans Soc Trop Med. Hyg* 1993; 87:S49-53.
8. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New adhesin of enteroaggregative Escherichia coli related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* 2008; 76: 3281- 92.
9. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J & Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 701-705.
10. Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, Miyajima Y, Amano K, Enomoto K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative Escherichia coli isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 294-7.
11. Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Navarro-Garcia F, and et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative Escherichia coli. *Infect Immun* 1997; 65: 4135-45.
12. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascón J, Nataro JP. Enteroaggregative escherichia coli virulence factors in traveler's diarrhea strains. *J Infect Dis* 2000; 182:1780-3.
13. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of thre plasmid borne genes of enteroaggregative Escherichia coli strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2138-40.
14. Monteiro-Neto V, Campos LC, Ferreira AJ, Gomes TA, Trabulsi LR. Virulence properties of Escherichia coli O111:H12 strains. *FEMS Microbiol Lett.* Jan 1997; 146:123-8.
15. Bouzari S, Jafari A, Farhodi-Moghaddam AA, Shokouhi F, Parsi M. Adherence of non - enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *J Med Microbiol.* 1994; 40:95-7
16. Bouzari S, A Jafari, A Azizi M. Oloomi & JP Nataro. Short report: characterization of enteroaggregative Escherichia coli isolates from Iranian children. *J. Trop Med Hyg* 2001; 65: 13-14.
17. James P. Nataro, Theodore Steiner, and L Guerrant. Enteroaggregative Escherichia coli. *Emerging Infectious Diseases*, 1998; 4: 251-261.
18. Pabst WL, Altwegg M, Kind C, Mirjanic S, Hardegger D, Nadal D. Prevalence of enteroaggregative Escherichia coli among children with and without diarrhea in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2289-93.
19. Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett - Wood VR, Russell J, and et al. Escherichia coli and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis*

- 2004; 10: 1797-805.
20. Okeke IN, Lamikanra A, Czeczulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J Infect Dis* 2000; 181: 252-60.
21. Yamazaki Mitsugu, Inuzuka Kazuhisa, Matsumoto Masakado, Sakae Kenji, Kimura Takashi, Miyazaki Yutaka. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* (EA_gEC) among diarrheal patients attended in one general hospital in Aichi Prefecture, Japan- Detection rate, O-serogroups, age of the patients, and seasonally. Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health. 2006; 56: 1-8.
22. Samie A, Obi CL, Dillingham R, Pinkerton RC, Guerrant RL: Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV- negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 142-50.
23. Villaseca JM, Hernandez U, Sainz-Espués TR, Rosario C, Eslava C: Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev Latinoam Microbiol* 2005; 47: 140-159.
24. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, and et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children *J Clin Microbiol* 2004; 42: 133-9.
25. Zhi-Dong Jiang, David Greenberg, James P, Nataro. Robert Steffen, and Herbert L DuPont Rate of Occurrence and Pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers *JCM*. 2002; 40: 4185-4190.
26. Mohamed JA, Huang DB, Jiang ZD, DuPont HL, Nataro JP, Belkind-Gerson J, Okhuysen PC. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin. Microbiol* 2007; 45: 121-6.
27. C Jenkins¹, H Chart GA, Willshaw T, Cheasty and DS Tompkins. Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative *Escherichia coli* for patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. Springer Verlag 2007; 26: 901-6.
28. Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Yamasaki S, Nandy RK, Bhattacharya SK, Ramamurthy T: Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4111-20.
29. Ji Young Moon a, Jae Hong Park b, Yung Bu Kim. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E.coli*, *FEMS Microbiology Letters* 2005; 253: 215-220.
30. Bouzari S, Jafari A, and Zarepour M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 79-83.