DOI: 10.22122/jims.v39i609.13756 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۰۹/هفته‌ی اول فروردین ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱/۷

فراوانی سویه‌ی Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) و ژن‌های مهم ویرولانس جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال

طاهره علیپور[۱]، فرخنده پورسینا[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC)، به تازگی به عنوان علت اسهال آبکی مزمن به صورت اپیدمیک و اندمیک در تمام دنیا به خصوص در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی این سویه و ژن‌های مهم ویرولانس آن در نمونه‌های اسهال بود.

روش‌ها: این مطالعه بر روی ۸۰ ایزوله‌ی Escherichia coli جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان امام حسین (ع) شهر اصفهان صورت گرفت. برای تأیید باکتری، از روش‌های بیوشیمیایی و برای تشخیص سویه‌ی EAEC، از آزمایش Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) ژن‌های aggR/aap/aatA استفاده شد.

یافته‌ها: از ۸۰ ایزوله‌ی جدا شده از بیماران دچار اسهال، ۲۱ سویه (۲۶/۶ درصد) به عنوان EAEC شناسایی شد. طبق نتایج Multiplex PCR، ژن aggR در ۲۱ (۱۰۰ درصد)، aap در ۷ (۳۳/۳ درصد) و aatA در ۳ (۱۴/۳درصد) سویه شناسایی شد. همچنین، ۷ سویه (۳۳/۳درصد) حامل دو ژن aggR و aap، ۳ سویه (۱۴/۳درصد) ژن aatA و aggR و ۲ سویه (۹/۵ درصد) ژن aatA و aap همزمان بودند. در هیچ یک از سویه‌ها، سه ژن aggR، aatA و aap به طور همزمان ردیابی نشدند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر حاکی از فراوانی به نسبت بالای سویه‌ی EAEC تیپیک در کودکان زیر ۵ سال با ایجاد علایم اسهال و بیماری بود. بر اساس نتایج به دست آمده، فراوانی بالای ژن‌های بیماری‌زای مهم به ویژه aggR در ایزوله‌ها، نشان دهنده‌ی اهمیت شناسایی این سویه در بیماران با علایم اسهال حاد و مزمن بود؛ به خصوص که در کشور ما، به طور معمول جداسازی و تشخیص این عامل در آزمایشگاه بالینی انجام نمی‌گیرد.

واژگان کلیدی: کودکان؛ اسهال؛ ژن؛ Escherichia coli؛ Enteroaggregative Escherichia coli

ارجاع: علیپور طاهره، پورسینا فرخنده. **فراوانی سویه‌ی Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) و ژن‌های مهم ویرولانس جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۰۹): ۱۹-۱۳.

مقدمه

دربین عوامل باکتریایی، Escherichia coli یکی ازشایع ترین دلایل ایجاد اسهال است. انواع Escherichia coli عامل اسهال (Diarrheagenic Escherichia coli یا DEC)، مسؤول حدود ۴۰-۳۰ درصد از موارد اسهال حاد در کودکان کمتر از ۵ سال در کشورهای در حال توسعه هستند که هم در موارد تک‌گیر و هم در شیوع اسهال حایز اهمیت است. نقش سویه‌ی Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) در ایجاد اسهال به صورت اندمیک در کودکان در کشورهای صنعتی و در حال توسعه و همچنین، ایجاد اسهال مزمن در بین افراد آلوده به ویروس نقص ایمنی انسانی شناخته شده است (۱). اگر چه در مقایسه با سویه‌های مولد اسهال، تحقیقات درباره‌ی EAEC محدود است، اما برخی مطالعات در انگلیس، ایالات متحده‌ی امریکا، برزیل و هند نشان می‌دهند که شیوع EAEC از سایر سویه‌های DEC در کشورهای صنعتی و در حال توسعه بیشتر بوده است (۲). این گروه از باکتری‌های Escherichia coli مولد اسهال، بسیار هتروژن می‌باشند و مکانیسم دقیق بیماری‌زایی آن‌ها به طور کامل مشخص نشده است (۳). هتروژنیسیتی به این باکتری، این توانایی را می‌دهد که ژن‌های جدید را پذیرا باشد و بر توان بیماری‌زایی خود بیفزاید، اما آن چه روشن است، توانایی این پاتوتیپ برای پذیرش ژن‌های خارجی و حتی تبدیل شدن به باکتری خطرناک‌تر، زیاد می‌باشد. به همین دلیل، بررسی شیوع این پاتوتیپ چه در نمونه‌های اسهالی و چه در فلور روده در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فرخنده پورسینا؛ استادیار، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: poursina4040@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

طی دوره‌های زمانی مختلف و مناطق مختلف ضروری به نظر می‌رسد و آن چه می‌تواند به شناخت بیشتر آن کمک کند، بررسی حضور ژن‌های بیماری‌زای این پاتوتیپ است.

ژن‌های بیماری‌زایی سویه‌ی EAEC، مانند انتروتوکسین‌ها، فیمبریه، aggR، aap و aatA بیشتر روی پلاسمید 55,989bp یا pAA واقع شده‌اند. برآوردها نشان می‌دهد که ۱۰۰-۵۰ درصد باکتری‌های EAEC حامل پلاسمید pAA هستند (۴). مکانیسم اسهال‌زایی EAEC به این صورت است که باکتری با کلونیزه شدن در مخاط روده و تشکیل بیوفیلم مخاطی و در نهایت با ترشح انتروتوکسین‌ها و سیتوتوکسین‌ها، منجر به ایجاد بیماری می‌شود (۵).

عامل بیماری‌زایی مهم این سویه عبارت از aggR ژن تنظیم کننده‌ی اصلی و نشانگر تشخیصی در سویه‌ی EAEC در تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) است. EAEC بر اساس وجود aggR، به دو گروه تیپیک (+aggR) و آتیپیک (-aggR) تقسیم می‌شوند. aggR، یک عامل پراکندگی فیمبریه چسبندگی (Aggregative adherence fimbria یا AAF) در سطح باکتری را کد می‌کند (۶). یکی دیگر از عوامل مهم ویرولانس مرتبط با بیماری‌زایی EAEC، پروتئین ترشحی دیسپرسین (AAP) است که توسط ژن aap بر روی پلاسمید PAA کد می شود و باعث انتشار باکتری‌ها در اپی‌تلیوم روده می گردد و ترشح آن وابسته به حضور کمپلکس انتقالی ABC (ABC transporter complex) است (۷). چندین مطالعه بر روی ایزوله‌های EAEC نشان داده است که ژن aap نشانگر ویرولانس بسیار شایع و مرتبط با موارد اسهالی است (۸). ژن aatA، یک ژن مهم و کلیدی در سویه‌ی EAEC است که امروزه به عنوان یکی از نشانگرهای شناسایی EAEC در PCR برای تشخیص می‌باشد و بخشی از یک سیستم انتقالی در غشای خارجی را کد می‌کند که در انتقال پروتئین دیسپرسین نقش دارد. دیسپرسین و کمپلکس aatA تحت کنترل aggR هستند (۹).

با توجه به مطالب پیش گفته و عدم وجود اطلاعات دقیق از وجود این عامل در منطقه‌ی خود، می‌توان اظهار داشت که EAEC به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی اسهال کودکان در منطقه‌ی ما می‌باشد. متأسفانه، گزارش‌های محدودی در مورد ارزیابی EAEC در ایران وجود دارد. در بررسی انجام شده توسط سلمانی و همکاران در تهران، میزان EAEC در کودکان مبتلا به اسهال را نسبت به پاتوتایپ‌های شناسایی شده ۲۴ درصد گزارش کردند (۱۰). در بررسی انجام شده توسط زرین‌قلم و همکاران در تبریز، در مجموع ۱۴۷ نمونه‌ی اسهال کودکان با عامل Escherichia coli جدا شد که از این تعداد، ۲۰ نمونه (۱۳/۶ درصد) مربوط به گروه EAEC شناسایی شد (۱۱). از آن جایی که EAEC اغلب از افراد بدون نشانه‌ی بالینی بیماری جدا می‌گردد، جدا کردن آن در افراد دچار اسهال، کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد. به هر حال، در غیاب دیگر پاتوژن‌های عمده‌ی روده‌ای، به خصوص در مورد اسهال مزمن و مواقعی که EAEC برای چندمین بار جدا می‌شود، انگاشتن EAEC به عنوان عامل بیماری بسیار با اهمیت است.

این مطالعه، با هدف تعیین فراوانی سویه‌های EAEC و ژن‌های مهم ویرولانس در بین نمونه‌های مدفوع کودکان کمتر از ۵ سال انجام گردید.

روش‌ها

این تحقیق بر روی ۸۰ ایزوله‌ی Escherichia coli جدا شده از کودکان کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال که به بیمارستان امام حسین (ع) شهر اصفهان در فاصله‌ی زمانی مرداد ۱۳۹۸ تا دی ۱۳۹۸ مراجعه کرده بودند، انجام شد. ایزوله‌ها در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان از نظر صحت هویت مورد بررسی قرار داده شدند و در محیط Eosin methylene blue (EMB) برای به دست آوردن کلنی خالص و مشاهده‌ی جلای سبز فلزی، کشت و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و سپس، جهت تعیین هویت قطعی و تأیید تشخیص، از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند IMViC (Indole، Methyl red، Voges-Proskauer و Citrate) و TSI (Triple sugar iron) استفاده شد. ایزوله‌های Escherichia coli در محیط Brain heart infusion (BHI) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای شناسایی مولکولی سویه‌ی EAEC نگهداری شدند (۱۲).

استخراج DNA. برای استخراج DNA ایزوله‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد. در ابتدا، به طور تقریبی ۱۰-۵ کلنی Escherichia coli که یک شبانه‌روز در محیط BHI گلیسرول رشد داده شده بودند، به یک لوله‌ی اپندورف حاوی ۳۰۰ میکرولیتر Lysis Buffer منتقل شدند و در معرض جوشیدن قرار گرفتند. پس از ۱۰ دقیقه جوشیدن، میکروتیوپ در ۱۲۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد. ماده‌ی رویی حاوی DNA برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. غلظت DNA استخراج شده (نانوگرم/میکرولیتر) با استفاده از نانودروپ اسپکتروفوتومتر در 260A اندازه‌گیری شد (۱۳).

ردیابی ژن‌های بیماری‌زایی سویه‌ی EAEC. تمام ۸۰ ایزوله‌ی Escherichia coli برای حضور ژن‌های بیماری‌زای aap، aggR و aatA به روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند. این برنامه، شامل مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن، ۳۰ چرخه‌ی دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی سنتز DNA در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتز نهایی DNA در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه می باشد (۱۵-۱۴). پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی ژن‌های مختلف مرتبط با ویرولانس پاتوتایپ Escherichia coli Enteroaggregative (EAEC)

EAEC virulence genes profile.	Primer sequence (5'-3')	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	اندازه‌ی محصول (جفت‌باز)	شماره‌ی رفرنس
aap	F-CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC R-GCTTCCTTCTTTTGTGTAT	۵۴	۱۰۰	(۲۷)
aatA	F-CTTGGGTATCAGCCTGAATG R-AACCCATTCGGTTAGAGCAC	۵۴	۳۱۰	(۲۷)
aap و aggR	F-CTGGCGAAAGACTGTATCAT R-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	۵۴	۶۳۰	(۲۷)

سرانجام ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. ژل آگارز با محلول Green viewer، رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و باندهای DNA در نهایت مورد تجزیه وتحلیل و ثبت قرار گرفتند.

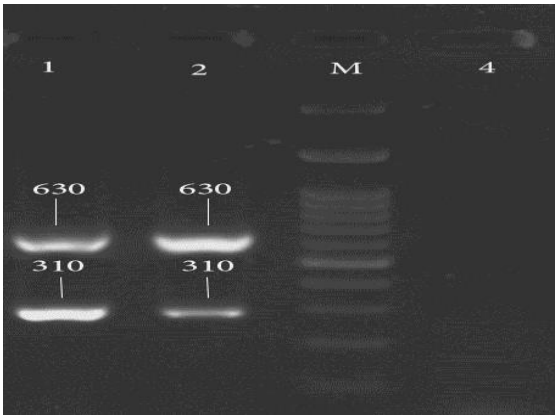
سکانس توالی DNA: برای تأیید حضور ژن‌های ویرولانس aggR، aap و aatA در سویه‌ی EAEC، آمپلیکون‌های PCR خالص شده به شرکت نیاژن نور (تهران) ارسال شدند. توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) آنلاین در پایگاه داده‌ی National Center for Biotechnology Information (NCBI) مورد بررسی قرار گرفت و از سویه‌ی توالی شده به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

یافته‌ها

از ۸۰ ایزوله‌ی جمع‌آوری شده، فراوانی سویه‌ی EAEC بر اساس ژن aggR ۲۱ سویه (۲۶/۶درصد) گزارش شد و توزیع فراوانی ژن‌های مهم ویرولانس آن در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج حاصل از شناسایی مولکولی پاتوتایپ EAEC با استفاده از روش Multiplex PCR از مجموع ۲۱ سویه‌ی مورد بررسی ژن aap در ۷ سویه (۳۳/۳ درصد)، ژن aatA در ۳ سویه (۱۴/۳ درصد) و ژن aggR در ۲۱ سویه (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید (شکل‌های ۳-۱). درهیچ یک از سویه‌ها، هر سه ژن aggR، aatA و aap به طور هم‌زمان ردیابی نشدند.

جدول ۲. توزیع فراوانی ژن‌های مهم بیماری‌زایی سویه‌ی Escherichia coli Enteroaggregative (EAEC)

EAEC virulence genes profile	درصد	فرکانس (تناوب)
aggR	۱۰۰	۲۱
aap	۳۳/۳	۷
aatA	۱۴/۳	۳
aap و aggR	۳۳/۳	۷
aatA و aggR	۱۴/۳	۳
aatA و aap	۹/۵	۲



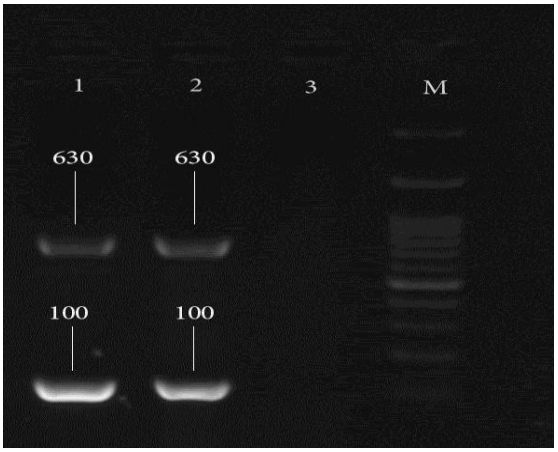
شکل ۱. الکتروفورز محصول Multiplex PCR ژن aap و aatA در ژل آگارز Escherichia coli

چاهک ۱: شاهد مثبت، چاهک ۲: نمونه‌ی بالینی، M-Ladder: ۱۰۰ جفت‌باز، چاهک ۴: شاهد منفی

بحث

آزمایش طلایی برای شناسایی EAEC، کشت باکتری روی رده‌ی سلولی Hep-2 و یا HeLa و بررسی ایجاد الگوی آجرهای انباشته شده (Stacked brick arrangement) می‌باشد؛ البته این آزمایش، توانایی تمایز سویه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا را ندارد و به همین دلیل، امروزه روش‌های مولکولی جایگزین این روش شده‌اند (۱۶). به دلیل عدم دسترسی به یک روش ساده و مقرون به صرفه برای تشخیص این سویه، اطلاعات کمی در مورد تشخیص این عامل بیماری زا در ایران وجود دارد. بنابراین، از چند مقاله‌ای که به Escherichia coli اسهال‌زا پرداخته‌اند، به طور تقریبی همه از PCR برای تشخیص EAEC استفاده کرده‌اند که توالی‌های AA یا aggR را هدف قرار داده‌اند.

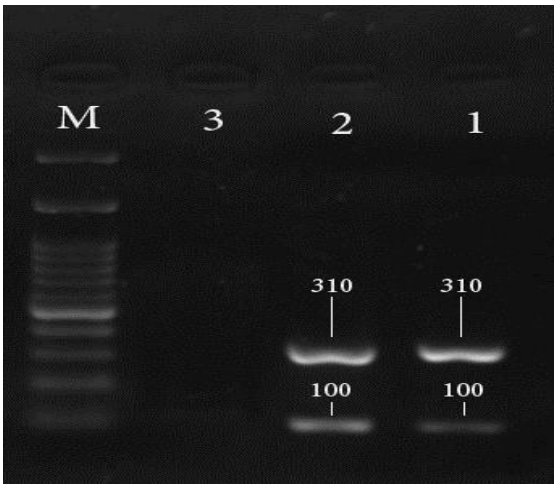
در مطالعه‌ی Zhang و همکاران، برای تشخیص پاتوتایپ EAEC از multiplexPCR ژن aggR استفاده کردند که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد (۶). در مطالعه‌ی Acosta و همکاران، توزیع پاتوتایپ‌های مختلف Escherichia coli در کودکان (۱۳-۶ ماهه) نشان داده است که EAEC به عنوان شایع‌ترین پاتوتایپ با شیوع ۲۰/۴ درصد است که با مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد (۱۷).



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR Multiplex ژن aggR و aatA در ژل آگارز Escherichia coli

چاهک ۱: شاهد مثبت، چاهک ۲: نمونه‌ی بالینی، **M-Ladder**: ۱۰۰ جفت‌باز، چاهک ۳: شاهد منفی

در مطالعه‌ی آهنگرزاده‌ی رضایی و همکاران، شیوع سویه‌ی EAEC در کودکان زیر ۱۰ سال با تشخیص گاستروانتریت (۱/۲ درصد) گزارش شده است (۱۸) و همچنین، در مطالعه ی Sang و همکاران، شیوع پاتوتایپ EAEC در کودکان کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال (۸/۹ درصد) گزارش شد که این دو مطالعه، با نتایج مطالعه ی حاضر تفاوت دارد (۱۹). به نظر می رسد تفاوت فراوانی مربوط به حجم نمونه‌ها و همچنین، منطقه‌ی جغرافیایی و روش کار باشد.



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR Multiplex ژن aggR و aap در ژل آگارز Escherichia coli

چاهک ۱: شاهد مثبت، چاهک ۲: نمونه‌ی بالینی، **M-Ladder**: ۱۰۰ جفت‌باز، چاهک ۳: شاهد منفی

در مطالعه‌ی Lara و همکاران در کنهاگ دانمارک، فراوانی پاتوتایپ EAEC فقط در ۳/۴ درصد از ایزوله ها گزارش شده است (۲۰). همچنین، در مطالعه‌ای که در مصر توسط Ali و همکاران صورت گرفت، بیشترین پاتوتایپ مربوط به EAEC (۳۰/۷ درصد) بود و بیش از ۹۵ درصد از این ایزوله ها دارای ژن aggR بودندکه با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد (۲۱). شیوع پاتوتایپ EAEC در موقعیت جغرافیایی مختلف بیماران متفاوت است. به طور مثال، این شیوع در تبریز (۲۸/۳ درصد)، در زنجان (۲۵/۶ درصد) و در تهران (۲۰/۰ درصد) گزارش شد که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد (۲۳-۲۲، ۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی پاتوتایپ EAEC (۲۶/۶ درصد) گزارش شد. سایر مطالعات صورت گرفته بر روی EAEC جدا شده از کودکان در کشورهای در حال توسعه و صنعتی، نشان داده است که ژن aap در بیشتر بررسی‌ها از درصد حضور بالایی در بین نمونه‌ها برخوردار است. در مطالعه ی Boisen و همکاران در کشور دانمارک، از بین ۹۷ سویه ی EAEC فراوانی ژن aap ۸۴/۲ درصد، ژن aggR ۷۸/۹ درصد و ژن aatA ۷۰/۲ درصد گزارش شده است که ژن aap بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود (۲۴).

درمطالعه‌ی Eltai و همکاران در کشور قطر، فراوانی سه ژن بیماری‌زا شامل aap، aatA و aggR به ترتیب (۶۵، ۶۰ و ۵۵ درصد) در ایزوله‌های EAEC گزارش شده است (۲۵). در مطالعه‌ی اصلانی و همکاران که در همدان صورت گرفت، میزان شیوع ژن aap (۶۰ درصد) اعلام شد که بعد از ژن aggR بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود و همچنین، در این مطالعه از بین ۱۴۰ بیمار مبتلا به اسهال با استفاده از PCR ژن aatA در ۱۵ مورد (۱۰/۸ درصد) ایزوله‌ی EAEC شناسایی شد که بیشتر این ایزوله‌ها در کودکان زیر ۵ سال شناسایی شدند که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر، ژن aggR در همه‌ی پاتوتایپ‌های EAEC مثبت شد، در نتیجه، فراوانی ۱۰۰ درصد گزارش شد و سپس، ژن aap با (۳۳/۳ درصد) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و فراوانی ژن aatA ۱۴/۳ درصد گزارش شد. طبق مطالعات اپیدمیولوژیکی، اختلاف در شیوع این پاتوتایپ و ژن‌های بیماری‌زایی آن، به دلیل تفاوت در مناطق مختلف جغرافیایی و دامنه‌ی سنی است که تفاوت بین نتایج مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات را توضیح می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پاتوتایپ EAEC از عوامل مهم ابتلا به اسهال در کودکان می‌باشد. پاتوتایپ EAEC بیشترین شیوع را در بین پاتوتایپ‌های مختلف Escherichia coli مولد اسهال دارد؛ به طوری

که با توجه به نتایج به دست آمده در شیوع پاتوتایپ EAEC در بین کودکان شهر اصفهان، نیاز به بررسی بیشتر این پاتوتایپ در دیگر مناطق ایران است و باید برای شناسایی آن‌ها از روش‌های نوینی بهره گرفت. روش Multiplex PCR برای شناسایی جایگاه‌های ژنی متفاوت مرتبط با پاتوتایپ‌های مختلف Escherichia coli مولد اسهال، در تشخیص جدایه‌های هدف در مدفوع، معتبر و سریع است. به دلیل اهمیت موضوع، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های مرتبط در این زمینه به صورت وسیع‌تری انجام گیرد و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری ها و عوامل مختلف ویرولانس آن در کشور بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد با شناسه‌ی اخلاق IR.MUI.MED.REC.1398.304 می‌باشد. نویسندگان این مقاله، مراتب قدردانی و تشکر خود را از گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اعلام می‌دارند.

References

1. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, et al. Genomic characterization of enteroaggregative Escherichia coli from children in Mali. J Infect Dis 2012; 205(3): 431-44.
2. Helalat H, Rezatofighi SE, Roayaei AM, Dos Santos LF, Askari BM. Genotypic and phenotypic characterization of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) isolates from diarrheic children: An unresolved diagnostic paradigm exists. Iran J Basic Med Sci 2020; 23(7): 915-21.
3. Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative Escherichia coli pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 66(3): 281-98.
4. Nazemi A, Mirinargasi M, Merikhi N, Sharifi SH. Distribution of pathogenic Genes aatA, aap, aggR, among Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and Their Linkage with StbA Gene. Indian J Microbiol 2011; 51(3): 355-8.
5. Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. Enteroaggregative Escherichia coli, a heterogenous, underestimated and under-diagnosed E. coli pathotype in Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013; 6(2): 71-9.
6. Zhang J, Xu Y, Ling X, Zhou Y, Lin Z, Huang Z, et al. Identification of diarrheagenic Escherichia coli by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis. Mol Cell Probes 2020; 49: 101477.
7. Dias RCB, Tanabe RHS, Vieira MA, Cergole-Novella MC, Dos Santos LF, Gomes TAT, et al. Analysis of the virulence profile and phenotypic features of typical and atypical enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) isolated from diarrheal patients in Brazil. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10: 144.
8. Joffre E, Iniguez R, V. Molecular epidemiology of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) isolates of hospitalized children from Bolivia reveal high heterogeneity and multidrug-resistance. Int J Mol Sci 2020; 21(24).
9. Hebbelstrup JB, Poulsen A, Hebbelstrup Rye RS, Struve C, Engberg JH, Friis-Moller A, et al. Genetic virulence profile of enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from Danish children with either acute or persistent diarrhea. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 230.
10. Salmani H, Azarnezhad A, Fayazi MR, Hosseini A. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic Escherichia coli and uropathogenic E. coli Using multiplex polymerase chain reaction. Jundishapur J Microbiol 2016; 9(2): e28331.
11. Zarringhalam M, Goudarzi H, Nahaei M. R, Bandehpour M, Shahbazi G. Detection of Escherichia coli pathotypes from the cases of diarrhea. Biosci Biotech Res Asia 2016;13(1): 247-55.
12. Mohebi S, Hossieni Nave H, Norouzi A, Kandehkar Gharaman M, Taati Moghadam M. Detection of extended spectrum beta lactamases on class I integron in Escherichia coli isolated from clinical samples. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 66-76.
13. Hadizadeh M, Norouzi A, Taghadosi R, Mohebi S, Mohammadi M, Hasanzade A, et al. Prevalence of qnr, intI, and intII genes in extendedspectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolated from clinical samples in Iran. Trop J Pharm Res 2017; 16(1): 141-7.
14. Hosseini Nave H, Mansouri S, Taati Moghadam M, Moradi M. Virulence gene profile and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) of Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) isolates from patients with diarrhea in Kerman, Iran, Jundishapur J Microbiol 2016; 9(6): e33529.
15. Shahbazi S, Asadi Karam MR, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum beta-lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic Escherichia coli isolates in Tehran, Iran. J Glob Antimicrob Resist 2018; 14: 118-25.
16. Zhang R, Gu DX, Huang YL, Chan EW, Chen GX, Chen S. Comparative genetic characterization of enteroaggregative Escherichia coli strains recovered from clinical and non-clinical settings. Sci Rep 2016; 6: 24321.
17. Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M, et al. Diarrheagenic Escherichia coli: Prevalence and pathotype distribution in children from Peruvian rural communities. Am J Trop Med Hyg 2016; 95(3): 574-9.
18. Ahangarzadeh Rezaee m, Shahbazi G, Hasani A, Asgharzadeh M, Rahim-Rahimi AA, Alebouyeh M. Prevalence of enteroaggregative Escherichia coli among children with gastroenteritis in the northwest of Iran. J Anal Res Clin Med 2015; 3(3): 183-9.
19. Sang WK, Oundo V, Schnabel D. Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhoea in four provinces of Kenya. J Infect Dev Ctries 2012; 6(7): 572-8.
20. Lara FB, Nery DR, de Oliveira PM, Araujo ML, Carvalho FR, Messias-Silva LC, et al. Virulence

markers and phylogenetic analysis of Escherichia coli strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. Front Microbiol 2017; 8: 146.
21. Ali MM, Ahmed SF, Klena JD, Mohamed ZK, Moussa TA, Ghenghesh KS. Enteroaggregative Escherichia coli in diarrheic children in Egypt: Molecular characterization and antimicrobial susceptibility. J Infect Dev Ctries 2014; 8(5): 589-96.
22. Bafandeh S, Haghi F, Zeighami H. Prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative Escherichia coli in a case-control study among patients from Iran. J Med Microbiol 2015; 64(Pt 5): 519-24.
23. Bouzari S, Jafari A, Zarepoor M. Distribution of genes encoding toxins and antibiotic resistance patterns in diarrhoeagenic Escherichia coli isolates in Tehran. East Mediterr Health J 2007; 13(2): 287-93.
24. Boisen N, Osterlund MT, Joensen KG, Santiago AE, Mandomando I, Cravioto A, et al. Redefining enteroaggregative Escherichia coli (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. PLoS Negl Trop Dis 2020; 14(9): e0008613.
25. Eltai NO, Al Thani AA, Al Hadidi SH, Al AK, Yassine HM. Antibiotic resistance and virulence patterns of pathogenic Escherichia coli strains associated with acute gastroenteritis among children in Qatar. BMC Microbiol 2020; 20(1): 54.
26. Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. Int J Infect Dis 2011; 15(2): e136-e139.
27. Riveros M, Garcia W, Garcia C, Durand D, Mercado E, Ruiz J, et al. Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from bacteremic children. Am J Trop Med Hyg 2017; 97(5): 1329-36.
28. Havt A, Lima IF, Medeiros PH, Clementino MA, Santos AK, Amaral MS, et al. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative Escherichia coli in malnourished and nourished Brazilian children. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 89(2): 98-105.

DOI: *10.22122/jims.v39i609.13756* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 609, 1st Week, April 2021**

Received: 09.12.2020 Accepted: 26.01.2021 Published: 05.04.2021

The Frequency of Enteroaggregative Escherichia Coli and Important Virulence Genes Isolated from Children with Diarrhea

Tahereh Alipour[1], Farkhondeh Poursina[2]

Original Article

Abstract

Background: Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) has recently been identified as the cause of epidemic and endemic chronic watery diarrhea worldwide, especially in developing countries. The aim of this study was to determine the frequency of this strain and its important virulence genes in diarrhea samples.

Methods: This study was performed on 80 Escherichia coli isolates from children with diarrhea referred to Imam Hossein hospital, Isfahan, Iran. The bacteria were confirmed using biochemical tests and multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) was performed to detect aggR, aap, aatA genes in EAEC strains.

Findings: The frequency of EAEC was 21 (26.6%). According to multiplex PCR results, the aggR, aap, and aatA genes were detected in 21 (100%), 7 (33%), and 3 (14.3%) of strains, respectively. Moreover, 7 strains (33.3%) harbored two aggR and aap genes, 3 (14.3%) carried the aatA and aggR genes, and aatA and aap genes were presented in 2 strains (9.5%). None of the strains had 3 genes simultaneously.

Conclusion: This study provides the first report of a relatively high frequency of typical EAEC strains in children under 5 years of age with symptoms of diarrheal disease in Isfahan. Moreover, we found that the EAEC strains not only exhibited high frequency, but also showed a high frequency of carrying virulence genes especially aggR that indicated the importance of identifying this strain in patients showing the symptoms of acute and chronic diarrhea, especially in our country, as the diagnosis of this strain is not done routinely.

Keywords: Children; Diarrhea; Enteroaggregative Escherichia coli; Genes; Multiplex polymerase chain reaction

Citation: Alipour T, Poursina F. **The Frequency of Enteroaggregative Escherichia Coli and Important Virulence Genes Isolated from Children with Diarrhea.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(609): 13-9.

1- MSc Student, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Farkhondeh Poursina, Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: poursina4040@gmail.com