مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ پائیز ۱۳۹۰/ ۴۷-۳۹

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

محمد مهدی اصلانی[۱]، علی زواری[۲]، محمد یوسف علیخانی[۳]

۱- دانشیار گروه میکروبشناسی، بخش میکروبشناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

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

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

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتیو عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان می‌باشند. این سویه‌ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی آگره گیتیو (stacked brick) به سلول‌های اپیتلیالی مانند HeLa و HEp-2 هستند. استفاده از تکنیک PCR بر اساس حضور ژنهای مرتبط با ویرولانس، تشخیص سویه‌های EAEC را تسهیل می‌نماید. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی روش PCR ژن *pCVD432* جهت شناسائی سویه‌های EAEC و وجود ژنهای ویرولانس 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 شناسائی کلنی‌های اشریشیاکلی با تستهای بیوشیمیائی، ابتدا با استفاده از پرایمر pCVD432 که اختصاصی سویه‌های EAEC است، سویه‌های EAEC شناسایی و پس از آن فاکتورهای ویرولانس آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ویرولانس aggR ، aggA ، aafA ، aaP و astA 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 شناسائی 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 ۵۳/۳٪ و aggR-aafA با ۲۶/۷٪ 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 شناسائی مولکولی این سویه‌ها می‌باشد. سویه‌های تیپیکال EAEC با دارا بودن ژن aggR شیوع بالائی در سویه‌های ایزوله شده دراین منطقه را نشان داده‌اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویرولانس دارای هتروژنی هستند.

کلید واژه‌ها: اشریشیا کلی انتروآگره گیتیو، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، کودکان

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

مقدمه

اسهال از شایع‌ترین بیماری‌ها در دنیا است که بخصوص در کشورهای درحال توسعه شایع می‌باشد و 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 بیلیون مورد

Archive of SID

www.SID.ir

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 سالیانه 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 گیتیو (EAEC).

سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتیو عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان، می‌باشند. این سویه‌ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی اگره گیتیو (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 مناسبی نمی‌باشد. استفاده از تکنیک PCR بر اساس حضور ژنهای مرتبط با ویرولانس، تشخیص سویه‌های EAEC را بهبود می‌بخشد. پاتوژنز و نحوه بیماریزایی سویه‌های EAEC به طور کامل مشخص نشده است و بسیاری از ژن‌های کد کننده فاکتورهای ویرولانس سویه‌های EAEC بر روی پلاسمید ۶۵-۶۰ مگا دالتونی باکتری (pAA) قرار دارند. فعالیت اکثر ژنهای کدکننده فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های EAEC توسط یک ژن تنظیم‌کننده اصلی به نام aggR کنترل می‌شود. ژن aggR بر روی پلاسمید اصلی ویرولانس باکتری (pAA) که بسیاری از فاکتورهای ویرولانس را کد می‌کند قرار دارد، سویه‌های دارای رگولون aggR بنام سویه‌های EAEC تیپیک (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 شناسائی سویه‌های EAEC و وجود ژنهای ویرولانس astA, aap, aafA, aggA, aggR جهت افتراق سویه‌های تیپیک و آتیپیک EAEC می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی (Cross-sectional)، ۱۴۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از کودکان زیر ۱۲ سال (۸۳ پسر و ۵۷ دختر) دارای اسهال مراجعه‌کننده 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

Archive of SID

www.SID.ir

(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 شناسائی و تعیین فاکتورهای ویرولانس سویه‌های اشریشیا کلی انتروآگره گیتیو استفاده شد (۱۴-۹). مشخصات و توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ ذکر شده است.

بعد از شناسائی کلنی‌های اشریشیا کلی با تست‌های بیوشیمیائی، ابتدا با استفاده از پرایمر*pCVD432* که اختصاصی سویه‌های EAEC است، سویه‌های EAEC شناسایی و پس از آن فاکتورهای ویرولانس آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ویرولانس *aggR* ، *aggA* ، *aafA* ، *aaP* و *astA* 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 براث کشت داده و در دمای ^{o}C ۳۷ بمدت ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از حرارت دادن این سوسپانسیون در دمای ^{o}C۱۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ نمودن آن در g ۱۴۰۰۰، مایع روئی آن جمع‌آوری و بعنوان DNA الگو استفاده شد.

روش انجام PCR: جهت شناسائی سویه‌های EAEC و تعیین ژنهای ویرولانس از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید. واکنش مخلوط PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید که شامل ۱µl از غلظت ۱۰pmol هر کدام از پرایمرها، ۴ µl از (dNTPs(2mM، ۲/۵ µl PCR buffer (10X)، ۱/۵ از MgCl2(25mM)، ۰/۵ µl از آنزیم تک پلیمراز (Fermentase5u/µ l)، و۱ µ l ۱ 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 اشریشیا 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 فزار آماری 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 اشریشیاکلی انترواگره گیتیو شناسایی گردید. بیشترین سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتیو 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 تقریبا یکسان بود که

Archive of SID

www.SID.ir

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

نتایج PCR ژن های ویرولانس

۱۵ سویه EAEC جدا شده از بیماران از نظر وجود ژن‌های ویرولانس aggR ، aggA ، aafA ،aaP و astA 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 گیتیو 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 گیتیو شناسایی گردید که فراوانی آن برابر ۱۰/۷ درصد می‌باشد. شیوع سویه‌های اشرشیاکلی 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 گیتیو 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 اگره گیتیو 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 درکشور سوئد می‌بینیم که فراوانی سویه‌های EAEC دراین 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 ۱۹/۶درصد (۲۲) است که نشاندهنده شیوع کمتر در کشورهای صنعتی نسبت به کشورهای در حال توسعه، می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعه ۸۶/۷ درصد سویه‌های جدا شده حداقل یکی از فاکتورهای ویرولانس aggR، aggA، aafA، aap و astA را دارا بودند. فقط دو سویه (۱۳/۳٪) ایزوله شده هیچکدام از فاکتورهای ویرولانس را نداشتند. در مقابل یکی از سویه‌های ایزوله شده دارای تمامی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس (۶/۷٪)، دو سویه دارای چهار ژن کدکننده فاکتورهای ویرولانس (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 ویرولانس بودند (۲۶/۷٪). با توجه به این نکته که سویه‌های اشریشیاکلی انترواگره گیتیو 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 کد کننده 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 گیتیو تیپیک 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 EAEC فاقد ژن aggR سویه‌های آتیپیک 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 امریکایی دارای اسهال مسافرتی مشاهده کردند، در سویه‌های EAEC جدا شده از این بیماران پس از ژن aggA شیوع ژن aggR از سایر فاکتورهای ویرولانس 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 ژن ها به تنهایی سویه های پاتوژن می باشند (۲۵). در مطالعه Mohamed و همکاران (۲۶)، سویه‌های EAEC دارای ژن aggR به تنهایی یا همراه با سایر ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس ارتباط پیوسته‌ای با تشکیل بیوفیلم داشتند. همچنین سویه‌هایی که علاوه بر ژن aggR دارای ژن‌های, aaP, astA, irp2 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

Archive of SID

www.SID.ir

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

در این مطالعه ژن aggR بیشترین فراوانی را در میان فاکتورهای ویرولانس 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 ویرولانس نیز بودند (جدول ۴) که در این میان ژن aaP بیشترین فاکتور ویرولانس 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.

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 ویرولانس بررسی شده و یک سویه EAEC فقط دارای توکسین EAST1 و سویه EAEC دیگر هم فقط دارای پروتئین دیسپرسین بودند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Gene	Primers	Size bp	Annealing temperature	Reference
pCVD432	F-5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3' R-5'-AATGTATAGAAATCCGCTGTT-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

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

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

جدول ۴: نتایج PCR ژن‌های ویرولانس 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 شناسائی مولکولی این سویه‌ها می‌باشد. سویه‌های تیپیکال EAEC با دارا بودن ژن aggR شیوع بالائی را نشان داده‌اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویرولانس دارای هتروژنی هستند. ضمناً، نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌های EAEC فاقد ژن aggR نیز بیماریزا هستند و احتمالاً فاکتورهای ویرولانس دیگری در بیماریزایی این سویه‌ها نقش دارند که تاکنون شناسایی نشده‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی همدان و و همکاران آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده پزشکی و آزمایشگاه بیمارستان بعثت همدان که در انجام این تحقیق ما را یاری رسانده اند کمال تشکر و امتنان را داریم.

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. Czeczulin 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, Farhoudi-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

Archive of SID
www.SID.ir

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 (EAggEC) 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-Espuẽs TR, Rosario C,EslavaC: 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.

Archive of SID

www.SID.ir