

Determination of Adhesion Virulence Factors of Enteropathogenic *Escherichia coli* (*eaeA*⁻, *bfpA*⁻) Isolates from Asymptomatic Individuals Compared to those with Diarrhea

Marzieh Abbasi¹, Mohammad Mehdi Aslani^{2*}, Ehsan Mostafavi³, Mohammad Yousef Alikhani⁴, Vajihe Sadat Nikbin⁵

1- M.Sc., Department of Biology, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Epidemiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Associated Professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

5- M.Sc., Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: mmaslani@yahoo.com

Received: 24/Dec/2012, Accepted: 12/Feb/2013

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the prevalence of *toxB*, *paa*, *lpf* and *iha* adhesion genes in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates lacking in two important adhesion factors, the *eaeA* and *bfpA* genes.

Methods: We examined a total of 70 serologically confirmed EPEC (*eaeA*⁻, *bfpA*⁻) isolates. DNA from the isolates was extracted by the phenol-chloroform method. *toxB*, *paa*, *lpf* and *iha* adhesion genes in the EPEC isolates were detected by polymerase chain reaction. Data were analyzed by SPSS software and statistical analysis using the chi square test. P-values less than 0.05 were considered significant.

Results: PCR was positive for the *toxB* gene in 2 (2.85%), *paa* in 3 (4.28%), *lpf* in 32 (45.71%) and *iha* in 15 (21.42%) of the 70 strains. Statistically, none of the *toxB*, *paa*, and *lpf* genes were associated with diarrhea. However, the *iha* gene showed a weak significant relation to diarrhea (P=0.11).

Conclusion: The main mechanism of pathogenicity for EPEC is attachment and effacement. Therefore, EPEC (*eaeA*⁻, *bfpA*⁻) should have another adhesin factor, which should be investigated. EPEC strains (*eaeA*⁻, *bfpA*⁻) that possess the *lpf* gene are common. Further investigations of the virulence properties of these strains are necessary in order to elucidate the role of these virulence factors in diarrhea among Iranian children.

Keywords: Enteropathogenic *Escherichia coli*, Adhesion Virulence Factors, Diarrhea, Serology

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 99-108

بررسی عوامل بیماری‌زای چسبندگی جدایه‌های اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک $eaeA^-$ و $bfpA^-$ جدا شده از موارد اسهالی و افراد سالم

مرضیه عباسی^۱، محمدمهدی اصلانی^{۲*}، احسان مصطفوی^۳، محمدیوسف علیخانی^۴، وجیهه‌السادات نیک‌بین^۵

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۵- کارشناس ارشد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب‌شناسی

Email: mmaslani@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۴

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۰۴

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های lpf paa $tox B$ و iha و بررسی ارتباط آن‌ها با اسهال، در جدایه‌هایی از اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک جدا شده از موارد اسهالی و افراد سالم است که فاقد دو فاکتور مهم $eaeA$ و $bfpA$ هستند. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۷۰ جدایه اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک ($eaeA^-$ $bfpA^-$) جمع‌آوری شده که از نظر سرولوژیک تأیید شده بود، بررسی شد. DNA جدایه‌ها به روش فنل - کلروفرم استخراج شد و با استفاده از روش PCR حضور ژن‌های lpf paa $tox B$ و iha بررسی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون مربع کای با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵، ارتباط ژن‌ها با اسهال بررسی شد.

نتایج: ژن‌های lpf paa $tox B$ و iha به ترتیب در ۲/۸۵، ۴/۲۸، ۴۵/۷۱ و ۲۱/۴۲ درصد از جدایه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان داد که هیچ ارتباطی بین paa $tox B$ و lpf با اسهال وجود ندارد و ارتباط iha با اسهال از لحاظ آماری به طور ضعیف معنی‌دار است ($P=0/11$).

نتیجه‌گیری: از آنجایی که مکانیسم اصلی بیماری‌زایی اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک، اتصال و تخریب است؛ بنابراین جدایه‌های اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک ($eaeA^-$ $bfpA^-$) باید از نظر سایر عوامل چسبندگی بررسی شود. نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین ژن حاضر در جدایه‌های اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک ($eaeA^-$ $bfpA^-$)، عامل lpf است. تحقیقات بیشتر روی خصوصیات بیماری‌زایی این جدایه‌ها برای روشن شدن نقش این عوامل بیماری‌زا در اسهال کودکان ایرانی لازم است.

کلیدواژگان: اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک، عوامل بیماری‌زای چسبندگی، اسهال، سرولوژی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۹۹-۱۰۸

مقدمه

EPEC (*coli*)، یکی از عمده‌ترین عوامل اسهال کودکان در

سراسر جهان است. از زمانی که مکانیسم‌های مختلف ایجاد

اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (*Enteropathogenic Escherichia*)

پروتئین مرتبط با آسیب اتصال- تخریب خوکی و درگیر در اتصال اولیه سویه‌های اشریشیاکلی انتروهموراژیک خوکی [۷]، ToxB (EHEC pO157 plasmid-encoded protein)، پروتئین کد شونده توسط پلاسمید pO157 اشریشیاکلی انتروهموراژیک و Iha (IrgA homologue adhesion) عامل چسبندگی مشابه با IrgA ویرئو کلرا [۸]. همچنین در این مطالعه ارتباط این عوامل با اسهال بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه ۷۰ جدایه EPEC فاقد ژن‌های *eaeA* و *bfpA* که از ۳۴ کودک اسهالی و ۳۶ کودک غیراسهالی جدا شده بودند، استفاده شد. این نمونه‌ها مربوط به مطالعات اپیدمیولوژیکی است که بین سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۱ در انستیتو پاستور ایران به منظور بررسی بیماری‌زاهای باکتریایی اسهال کودکان صورت گرفته است. در این مطالعه نمونه‌های مدفوع کودکان سالم و اسهالی از استان‌های تهران، مازندران و ایلام جمع‌آوری شد و به انستیتو پاستور ایران انتقال یافت (اسهال در این مطالعه طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی [۹]، دفع مدفوع شل یا آبکی سه بار یا بیشتر در یک دوره ۲۴ ساعته در نظر گرفته شد). کلیه بیماری‌زاهای باکتریایی روده‌ای توسط آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند [۱۰]. برای شناسایی جدایه‌های اشریشیا کلی نمونه‌ها روی مک‌کانگی آگار (MacConkey Agar) و اتوزین متیلن بلو (Eosin Methylene Blue) کشت داده شد و هم برای لاکتوز مثبت‌ها و هم برای لاکتوز منفی‌ها چهار آزمون IMViC انجام شد و آزمون‌های بیوشیمیایی LDC (Lysine Decarboxylase) و ODC (Ornithine Decarboxylase) نیز انجام شد و در مواردی نیز برای تأیید از کیت E ۲۰ API استفاده شد و جدایه‌های EPEC توسط روش سرولوژی و تشخیص گروه‌های سرولوژی کلاسیک با استفاده از آنتی‌سرم‌های مربوط شناسایی شدند [۱۱، ۱۲]. همچنین برای شناسایی مولکولی *stx* [۱۳]،

بیماری شناخته شده است، طبقه‌بندی EPEC براساس حضور ژن‌های خاص انجام می‌گیرد. ژن *eae* (ژن کدکننده ایتیمین: Gene Encoding Intimin) واقع در ناحیه‌ای از کروموزوم باکتری به نام جزیره بیماری‌زایی تخریب انتروسیت (Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island) و ژن *bfp* [کدکننده پیلی تشکیل دهنده کلاف (Bundle Forming Pilus: BFP)] واقع در پلاسمید EAF (EPEC Adherence Factor) هر دو برای طبقه‌بندی EPEC و تقسیم آن‌ها به دو زیرگروه تیپیک (Typical) و غیر تیپیک (Atypical) استفاده می‌شود. سویه‌هایی از EPEC که دارای هر دو ژن *eae* و *bfpA* باشند به عنوان تیپیک و سویه‌هایی از EPEC که فقط دارای *eae* باشند به عنوان غیر تیپیک شناخته می‌شوند [۱، ۲]. مکانیسم اصلی بیماری‌زایی EPEC ایجاد آسیب‌های اتصال- تخریب (Attaching and Effacing) است. در این آسیب باکتری‌ها به غشای سلول میزبان متصل می‌شوند، میکروویلی انتروسیت را تخریب می‌کنند و موجب بازآرایی اسکلت سلولی در ناحیه اتصال باکتری به سلول میزبان می‌شوند [۳]. BFP در اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان و همچنین در تشکیل میکروکلونی نقش مستقیم دارد و ایتیمین در اتصال نزدیک باکتری به سلول میزبان نقش مهمی ایفا می‌کند [۴، ۵].

سویه‌هایی از اشریشیاکلی شناسایی شده که از لحاظ سرولوژی در گروه EPEC قرار می‌گیرند ولی فاقد ژن‌های *eae* و *bfp* هستند، در هیچ‌کدام از گروه‌های اشریشیا کلی تیپیک و غیر تیپیک قرار نمی‌گیرند. بنابراین این سؤال پیش می‌آید که این جدایه‌ها برای شروع ایجاد عفونت خود که نیاز به چسبندگی است از چه عاملی برای چسبندگی استفاده می‌کنند؟ در این مطالعه وجود ژن‌های مربوط به چهار عامل چسبندگی توصیف شده در سویه‌های اشریشیاکلی‌های تولیدکننده سم شیکا (*Shiga Toxin-Producing E. coli: STEC*) بررسی شد که عبارتند از *Lpf* (Long polar fimbriae)، فیمبریای قطبی بزرگ عامل چسبندگی یافت شده در اشریشیاکلی‌های انتروهموراژیک و دیگر اشریشیاکلی‌های بیماری‌زا [۶]، Paa (Porcine A/E-associated adhesin)

eaeA [۱۴] و *bfpA* [۱۵] از روش PCR استفاده شد. در نهایت جدایه‌هایی که از لحاظ سروژنیک جزء دسته EPEC قرار می‌گرفتند ولی از لحاظ مولکولی در این دسته قرار نمی‌گرفتند، در این مطالعه بررسی شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌ها از فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد خارج و روی محیط مک‌کانگی آگار کشت داده شدند و دوباره احیا شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA به روش فنل - کلروفرم ابتدا لیز باکتری انجام شد. برای این منظور باکتری به محیط مایع BHI (Heart Infusion Broth Brain) (Merck، آلمان) تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (Shaker Incubator) قرار داده شد. سوسپانسیون میکروبی به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g سانتریفوژ شد و سپس به رسوب حاصل ۶۰۰ ماکرولیتر بافر لیز کننده [شامل EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) ۰/۵ مولار، Tris-HCl ۱ مولار، NaCl ۱ مولار]، ۲۶ میکرولیتر SDS ۲۵ درصد (Sodium Dododecyl Sulfate) و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد و سپس در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت

یک ساعت قرار داده شد. باکتری لیز شده برای استخراج DNA استفاده شد. برای این منظور ۶۲۰ میکرولیتر از مخلوط فنل - کلروفرم - الکل ایزومیلیک (۱:۲۴:۲۵) به باکتری لیز شده اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰×g سانتریفوژ شد. این مرحله دوبار تکرار شد و در مرحله سوم از کلروفرم به تنهایی استفاده شد. سپس به مایع رویی اتانل سرد اضافه شد و ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰×g سانتریفوژ شد. بعد از خشک شدن رسوب DNA، به آن بافر TE- RNase اضافه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۱۶].

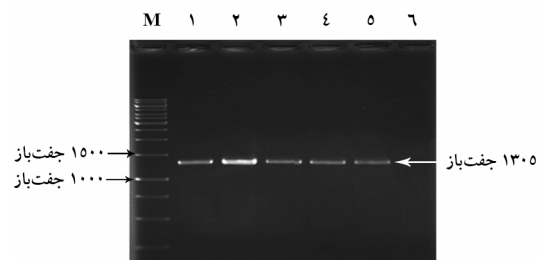
انجام PCR

برای انجام PCR مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر و با مقادیر زیر تهیه شد:

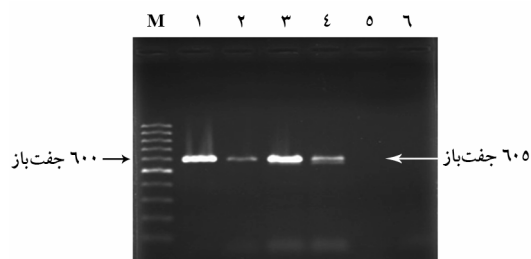
۱۸/۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر (-Deuterium Genet)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰× (Genet Bio، کره)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار (Genet Bio، کره)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار (Bioneer، آمریکا)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (Primers) با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر (شرکت تکاپوزیست، ایران)، ۰/۲ میکرولیتر از DNA polymerase *Taq* ۵ واحد در میکرولیتر (Genet Bio، کره) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو.

جدول ۱ توالی آغازگرها و شرایط PCR و اندازه ژن‌ها

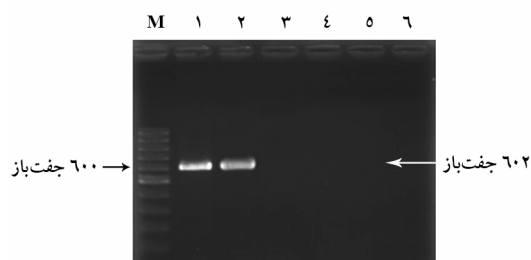
هدف	توالی آغازگر جلویی	توالی آغازگر پشتی	چرخه حرارتی	اندازه ژن (جفت‌باز)	کنترل مثبت	منبع
<i>lpf</i>	GAAGTGTAGATGGGTAC	AGCAGGCATAACGCAAG	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۴۸ درجه سانتی‌گراد: ۵۰ ثانیه، ۷۲ سانتی‌گراد: ۱ دقیقه	۷۹۸	EH41	۶
<i>paa</i>	GGATCCATGAGGAACATAA	CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه	۶۰۵	EDL933	۷
<i>toxB</i>	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱/۵ دقیقه	۶۰۲	EDL933	۸
<i>iha</i>	CAGTTCAGTTTCGATTACAC	GTATGGCTCTGATGCGATG	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱/۵ دقیقه	۱۳۰۵	EDL933	۸



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR ژن *ihA* در چاهک M نشانگر ۲۵۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی قرار دارد. چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت (سویه EDL933)، چاهک ۲-۵ مربوط به نمونه‌های مثبت و چاهک ۶ مربوط به کنترل منفی (آب) است.



شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR ژن *paa* در چاهک M نشانگر ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی قرار دارد. چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت (سویه EDL933)، چاهک ۲-۴ مربوط به نمونه‌های مثبت، چاهک ۵ مربوط به نمونه منفی و چاهک ۶ مربوط به کنترل منفی (آب) است.



شکل ۴ الکتروفورز محصول PCR ژن *toxB* در چاهک M نشانگر ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی قرار دارد. چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت (سویه EDL933)، چاهک ۲ مربوط به نمونه مثبت، چاهک ۳-۵ مربوط به نمونه‌های منفی و چاهک ۶ مربوط به کنترل منفی (آب) است.

نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان داد که هیچ ارتباطی بین *toxB*، *paa* و *lpf* (با سطح معنی‌داری ۰/۹۶، ۰/۵۲ و ۰/۶۲) و اسهال وجود ندارد و ارتباط *ihA* با اسهال از لحاظ

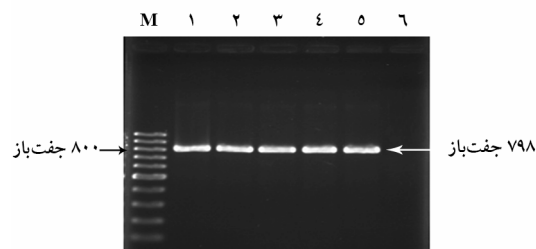
توالی آغازگرها و چرخه‌های حرارتی در جدول ۱ آمده است. برای تمام ژن‌ها واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و تکثیر نهایی (Final Extention) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد؛ همچنین تعداد چرخه‌ها برای PCR کلیه ژن‌ها ۳۰ چرخه در نظر گرفته شد [۱۷].

آزمون‌های آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون مربع کای (Chi-Square Test) داده‌ها تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و ارتباط بین عوامل چسبندگی و اسهال بررسی شد.

نتایج

نتایج حاصل از PCR فراوانی ژن *lpf* را در ۳۲ جدایه (۴۵/۷۱ درصد) (شکل ۱)، *ihA* را در ۱۵ جدایه (۲۱/۴۲ درصد) (شکل ۲)، *paa* را در سه جدایه (۴/۲۸ درصد) (شکل ۳) و *toxB* را در دو جدایه (۲/۸۵ درصد) (شکل ۴) نشان داد. پنج جدایه دارای دو عامل *lpf* و *ihA* بودند. یک جدایه دارای *lpf* و *paa* یک جدایه دارای *ihA* و *toxB* و یک جدایه دارای سه عامل *lpf*، *ihA* و *paa* بود. ۲۷ جدایه از کل ۷۰ جدایه فاقد هر چهار عامل چسبندگی بودند که ۱۰ مورد آن مربوط به افراد اسهالی و ۱۷ مورد آن مربوط به افراد سالم بود (جدول ۲).



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن *lpf* در چاهک M نشانگر ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت‌بازی قرار دارد. چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت، چاهک ۲-۵ مربوط به نمونه‌های مثبت و چاهک ۶ مربوط به کنترل منفی (آب) است.

آماري به طور ضعيف معنی دار است ($P=0/11$). همچنین از آنجایی که بعضی جدایه‌ها دارای دو یا سه ژن چسبندگی بودند، ارتباط دو ژن و سه ژن با اسهال از لحاظ آماری بررسی شد که هیچ ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۲ فراوانی ژن‌های چسبندگی در میان جدایه‌های EPEC فاقد ژن‌های *eaeA* و *bfpA*

ژن (های) چسبندگی	فراوانی در موارد اسهالی	فراوانی در موارد سالم	فراوانی در کل افراد مورد مطالعه	مقدار P
<i>lpf</i>	۱۵ (۴۴/۱۲ درصد)	۱۷ (۴۷/۲۲ درصد)	۳۲ (۴۵/۷۱ درصد)	۰/۶۲
<i>iha</i>	۱۰ (۲۹/۴۱ درصد)	۵ (۱۳/۸۸ درصد)	۱۵ (۲۱/۴۲ درصد)	۰/۱۱
<i>paa</i>	۲ (۵/۸۸ درصد)	۱ (۲/۷۸ درصد)	۳ (۴/۲۸ درصد)	۰/۵۲
<i>toxB</i>	۲ (۵/۸۸ درصد)	۰ (درصد)	۲ (۲/۸۵ درصد)	۰/۹۶
<i>iha lpf</i>	۲ (۵/۸۸ درصد)	۳ (۸/۳۳ درصد)	۵ (۷/۱۴ درصد)	۰/۹۴
<i>paa lpf</i>	۰ (درصد)	۱ (۲/۷۸ درصد)	۱ (۱/۴۳ درصد)	۰/۳
<i>toxB iha</i>	۱ (۲/۹۴ درصد)	۰ (درصد)	۱ (۱/۴۳ درصد)	۰/۳
<i>paa iha lpf</i>	۱ (۲/۹۴ درصد)	۰ (درصد)	۱ (۱/۴۳ درصد)	۰/۳
فاقد ژن چسبندگی	۱۰ (۲۹/۴۱ درصد)	۱۷ (۴۷/۲۲ درصد)	۲۷ (۳۸/۵۷ درصد)	---

بحث

بیماری اسهال توسط دامنه وسیعی از عوامل شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها ایجاد می‌شود [۱۸]. در میان بیماری‌زاهای باکتریایی، اشریشیاکلی‌های اسهال‌زا یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال هستند. سویه‌های EPEC عامل شیوع گسترده اسهال کودکان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند [۱۹، ۲۰]. مطالعات در ایران نیز نشان داد که اشریشیاکلی‌های اسهال‌زا از قبیل STEC و EPEC از شایع‌ترین عوامل اسهال مخصوصاً در کودکان هستند [۲۰]. بنابراین دانستن وضعیت اتروپاتوژن‌های ایجاد کننده اسهال در جمعیت‌های ایرانی برای اقدامات پیشگیرانه مناسب به منظور کنترل بیماری ضروری است [۲۰].

سنجش‌های فنوتیپی از قبیل گروه‌بندی سرولوژی با آنتی‌سرم‌های سنتی روش‌هایی معمول هستند که در آزمایشگاه‌های بالینی به طور گسترده استفاده می‌شود [۱۸، ۲۱]. نشان داده شده است که اساساً سرورگروپینگ برای تشخیص سویه‌های EPEC حقیقی ناکافی است زیرا گاهی اوقات نشانگرهای سوماتیکی (آنتی ژن O) با بیماری‌زایی یک جدایه مرتبط نیست [۲۱، ۲۲]. برای مثال جیامانکو (Giammanco)

و همکاران [۲۳] نشان دادند که شیوع ژن‌های بیماری‌زا در سویه‌های EPEC شناسایی شده با روش سرورگروپینگ ۷۵ درصد است و بوزری و همکاران [۲۴] نشان دادند که تنها ۶۵ درصد از سویه‌های EPEC شناسایی شده با روش سرورگروپینگ ژن‌های بیماری‌زای مرتبط را حمل می‌کنند. بنابراین روش‌های مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های بیماری‌زای ایزوله‌ها شیوه قابل اطمینانی برای تشخیص سویه‌های EPEC است [۲۱، ۲۲].

در مطالعه حاضر جدایه‌هایی از اشریشیا کلی بررسی شد که از لحاظ سرولوژیکی در دسته EPEC قرار می‌گرفتند ولی از لحاظ ژن‌های *eaeA* و *bfpA* که برای تشخیص مولکولی EPEC مورد استفاده قرار می‌گیرند، منفی بودند؛ در واقع از لحاظ روش‌های مولکولی جزء دسته EPEC قرار نمی‌گرفتند. به منظور شناسایی عوامل چسبندگی این ایزوله‌ها، حضور چهار ژن چسبندگی (*iha* *lpfA* *paa* *toxB*) موجود در ایزوله‌های اشریشیا کلی بررسی شد.

ژن *iha* کد کننده پروتئینی است که در چسبندگی باکتری به سلول میزبان درگیر می‌شود. در مطالعه انجام شده روی سویه‌های aEPEC توسط اسکالتسکی (Scaletsky) و همکاران در سال ۲۰۰۹ [۱۷]، میزان حضور فاکتور *iha* ۲۱ درصد

مصرف گوشت خوک و عدم پرورش خوک احتمال آلودگی افراد با EPEC خوکی و در نتیجه آن انتقال ژن *paa* به EPEC انسانی انتظار نمی‌رود و بنابراین محققان حاضر انتظار به‌دست آوردن جدایه مثبت از لحاظ *paa* را نداشتند ولی این سه جدایه حامل ژن *paa* مربوط به استان‌های ایلام و مازندران هستند که در این مناطق جنگل‌هایی وجود دارد که زیستگاه طبیعی گرازهای وحشی است؛ بنابراین ساکنان این مناطق در معرض آلودگی با EPEC خوکی هستند و با این شرایط جدا کردن EPEC انسانی حامل ژن *paa* در این مناطق نباید دور از انتظار باشد.

گومز در سال ۲۰۱۱ [۲۵] مطالعه‌ای برای تعیین عوامل چسبندگی سویه‌های aEPEC انجام داد و در آن چهار عامل چسبندگی *lpfA*، *paa*، *iha* و *tox*B را بررسی کرد. در این مطالعه مشخص شد که بیشترین فراوانی مربوط به *lpfA* و کمترین فراوانی مربوط به *tox*B است که این نتایج با نتایج به‌دست آمده مطالعه حاضر تطابق دارد. در این مطالعه ارتباط هیچ‌یک از این عوامل با اسهال اثبات نشد و تنها ارتباط *paa* با اسهال از لحاظ آماری قابل توجه بود. در مطالعه حاضر نیز هیچ ارتباطی بین *lpfA*، *tox*B و *paa* با اسهال اثبات نشد ولی در مورد *iha* همان‌طور که اشاره شد از لحاظ آماری قابل توجه بود.

در مطالعه‌ای که آفست (Afest) در سال ۲۰۰۶ [۲۶] انجام داد، ارتباط *lpfA* با اسهال مشخص شد اما در مطالعه اسکالتسکی چنین ارتباطی مشخص نشد. علت این اختلاف در نتایج شاید به دلیل اختلاف در جدایه‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه و تفاوت جغرافیایی این جمعیت‌ها و همچنین تفاوت در حجم نمونه‌های مورد مطالعه باشد.

هر چند در این مطالعه ارتباط عوامل چسبندگی با اسهال معلوم نشد ولی قسمتی از ژنوتیپ سویه‌های مورد مطالعه مشخص شد و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده الگوی چسبندگی سویه‌ها و نقش عوامل اتصال در چسبندگی سویه‌های دارنده آن‌ها بررسی شود و همچنین حضور دیگر

گزارش شد که اولین گزارش از کشف *iha* در سویه‌های aEPEC بود. با وجود تفاوت اصلی در جدایه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر با جدایه‌های مورد مطالعه اسکالتسکی، درصد به‌دست آمده (۲۱ درصد) در مطالعه حاضر کاملاً مشابه نتیجه به‌دست آمده توسط اسکالتسکی بود. در مطالعه‌ای که گومز (Gomes) در سال ۲۰۱۱ انجام داد، نشان داد که *iha* فراوانی بیشتری در aEPEC نسبت به tEPEC دارد؛ ولی در این مطالعات هیچ ارتباطی بین *iha* و اسهال کشف نشد [۲۵]. در مطالعه حاضر *iha* در ۱۵ جدایه از مجموع ۷۰ جدایه مشاهده شد که ۱۰ مورد آن مربوط به جدایه‌های جدا شده از افراد اسهالی و ۵ مورد آن مربوط به جدایه‌های جدا شده از افراد سالم بود که ارتباط آن با اسهال از لحاظ آماری به طور ضعیف معنی‌دار بود و احتمال این‌که *iha* با اسهال ارتباط داشته باشد وجود دارد که این مسئله لزوم بررسی‌های بیشتر با حجم نمونه بالاتر را ایجاب می‌نماید.

در مطالعه اسکالتسکی [۱۷] عامل *paa* مرتبط با اسهال شناخته شد و در این مطالعه پیشنهاد شد که این نشانگر بیماری‌زا می‌تواند در تشخیص aEPEC مفید باشد. در مطالعاتی که روی aEPEC های جدا شده از کودکان نروژی و برزیلی انجام شد [۱۷، ۲۵]، ارتباط *paa* با اسهال مشخص شد. در مطالعه گومز *paa* در aEPEC جدا شده از بیماران با فراوانی بیشتری در مقایسه با جدایه‌های کنترل‌ها یافت شد ولی به طور قطع ارتباط آن با اسهال مشخص نشد؛ هر چند از لحاظ آماری قابل توجه بود [۲۵]. در جدایه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر از ۷۰ سویه تنها سه جدایه دارای *paa* بودند که دو مورد آن مربوط به جدایه‌های جدا شده از افراد اسهالی و یک مورد آن مربوط به جدایه‌های جدا شده از افراد سالم بود که به دلیل فراوانی محدود آن، از لحاظ آماری ارتباط آن با اسهال اثبات نمی‌شود. *paa* ژن کدکننده چسبندگی (Adhesion) مرتبط با A/E خوکی است و در جوامعی که از گوشت خوک به فراوانی استفاده می‌شود، احتمال آلودگی افراد با EPEC خوکی وجود دارد و در نتیجه، انتقال افقی این ژن می‌تواند به سویه‌های EPEC انسانی صورت گیرد. در ایران به دلیل عدم

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی است که با حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران انجام گرفته است و بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاری‌های صورت گرفته برای انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

عوامل بیماری‌زا در این سویه‌ها بررسی شود تا در نهایت مشخص شود که این سویه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی به کدام گروه از اشریشیاکلی‌های اسهال‌زا تعلق دارند؟ آیا این سویه‌ها سویه‌هایی از aEPEC هستند که ژن *eaeA* را از دست داده‌اند یا گروهی مستقل با خصوصیات بیماری‌زایی متفاوت هستند؟

منابع

- [1] Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008; 102(9): 852-6.
- [2] Schmidt MA. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. Cell Microbiol 2010; 12(11): 1544-52.
- [3] Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol 1998; 30(5): 911-21.
- [4] Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. Cell Microbiol 2003; 5(6): 359-72.
- [5] Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology 2004; 150(Pt 3): 527-38.
- [6] Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 2002; 70(12): 6761-9.
- [7] Batisson I, Guimond MP, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, Fairbrother JM, Jacques M, Harel J. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect Immun 2003; 71(8): 4516-25.
- [8] Toma C, Martínez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 4937-46.
- [9] Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. Mol Microbiol 2011; 80(6): 1420-38.
- [10] Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 9): 1159-63.

- [11] Baron EJ, Finegold M. Diagnostic microbiology. Toronto: Mosby, 1990; p: 363-85.
- [12] Edwards PR, Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier, 1986; 536 p.
- [13] Lin Z, Kurazono H, Yamasaki S, Takeda Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 1993; 37(7): 543-8.
- [14] Beaudry M, Zhu C, Fairbrother JM, Harel J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. J Clin Microbiol 1996; 34(1): 144-8.
- [15] Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1375-7.
- [16] Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist 2009; 15(1): 37-9.
- [17] Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP, Morais MB. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2009; 47(11): 3756-9.
- [18] Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis 2007; 7: 92.
- [19] Gärtner JF, Schmidt MA. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 2004; 72(11): 6722-8.
- [20] Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juárez A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Int Microbiol 2006; 9(2): 103-10.
- [21] Yang JR, Wu FT, Tsai JL, Mu JJ, Lin LF, Chen KL, Kuo SH, Chiang CS, Wu HS. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3620-5.
- [22] Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Iwanaga M. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. Jpn J Infect Dis 2005; 58(2): 65-9.
- [23] Giammanco A, Maggio M, Giammanco G, Morelli R, Minelli F, Scheutz F, Caprioli A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. J Clin Microbiol 1996; 34(3): 689-94.
- [24] Bouzari S, Jafari MN, Shokouhi F, Parsi M, Jafari A. Virulence-related DNA sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2000; 185(1): 89-93.
- [25] Gomes TA, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BE, Vaz TM, Irino K, Silva RM, Vieira MA. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical

- enteropathogenic *E. coli*. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3334-7.
- [26] Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, Bergh K. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3703-11.