مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۷، شماره۴
مهر-آبان۱۴۰۳ صفحه ۱۱۹۲-۱۱۸۴

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 67, No.4, P: 1184-1192
Sep-Nov2024

مقاله اصلی

آنالیز مولکولی ژن های حدت جدایه های انترواگریگیتیو *اشریشیاکلی* (چسبنده ی روده ای)جدا شده از کودکان اسهالی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰

زکیه ایمان پناه[1*]
غلامرضا هاشمی تبار[2]
مهدی عسکری[3]

[1] *میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد مشهد، ایران*
[2] *گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد*
[3] *پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد*

Email: golkar34@gmail.com

خلاصه

مقدمه: *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای دارای ژن های حدت فراوانی است که با بیماریزای آن مرتبط می باشد. هدف از انجام این مطالعه آنالیز مولکولی ژن های حدت جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای جداشده از کودکان اسهالی بود.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی پس از جمع آوری ۴۱۰ نمونه مدفوع از کودکان اسهالی با استفاده از تست های بیو شیمیایی ۳۵۲ جدایه *اشریشیاکلی* جدا سازی و با استفاده از روش مولکولی **PCR** و پرایمر های ***CVD432, aggR***، ۳۹ جدایه **EAEC** جداسازی گردید و بررسی ژن های حدت ***fimA ،aap ،astA ،aafA ،cdt*** در جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای به روش مولکولی **PCR** انجام شد.

نتایج: بر طبق نتایج روش مولکولی از مجموع ۳۹ جدایه EAEC، به ترتیب بیشترین جدایه مربوط به ۳۷ (۹۴/۸۷٪) ژن *fimA*، ۳۵ (۸۹/۷۴٪) ژن *aap* ، ۱۱ (۲۸/۲۰٪) ژن *astA*، ۳ (۷/۶۹٪) ژن *aafA* و ژن *cdt* در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که در جدایه های **EAEC** بیشترین فراوانی مربوط به ژن حدت ***aap*** و ***fimA*** می باشد و این ژن ها در اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی و تجمع درون سلولی جدایه ها و در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نقش دارند. از طرفی حضور انواع ژن های بیماریزا در جدایه های **EAEC** نشانگر دخالت مستقیم این ژن ها در بیماریزایی باکتری است.

کلمات کلیدی: "*اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای "، "ژن های حدت"، "اسهال کودکان"، "آنالیز مولکولی"

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

Doi: 10.22038/MJMS.2024.73759.4364

مقدمه

اسهال دومین عامل مرگ و میر کودکان در سراسر دنیا است. *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای (EAEC[۱]) یکی از هفت پاتوتیپ شناخته شده *اشریشیاکلی* های مولد اسهال است و بعد از انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (ETEC[۲]) به عنوان دومین عامل اسهال مسافرتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می باشد (۲, ۱). EAEC عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار و همچنین عامل ایجاد کاهش رشد و سوء تغذیه در کودکان می باشد (۴, ۳). سویه های *E. coli* بیماریزا براساس نحوه ایجاد بیماری به دو گروه تقسیم بندی می شوند: سویه های که قادر به ایجاد بیماری در خارج از دستگاه گوارش ExPEC[۳] هستند و سویه های که قادر به ایجاد بیماری در داخل دستگاه گوارش IPEC[۴] هستند. یکی از عوامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال، گروه *اشریشیاکلی* اسهال زا(DEC[۵]) در نظر گرفته می شوند، که خود به هفت پاتوتیپ[۶] مختلف قابل تقسیم بندی هستند: انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* (توکسین زای روده ای)(ETEC)، انتروانیویسیو *اشریشیاکلی* (مهاجم روده ای)(EIEC[۷])، دو زیر گروه تیپیکال[۸] و آتیپیکال[۹] شیگاتوکسین *اشریشیاکلی* (STEC[۱۰])، انتروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* (بیماریزای روده ای)(EPEC[۱۱])، انترواگریگیتیو *اشریشیاکلی* (چسبنده ی روده ای)(EAEC[۱۲])، دیفیوز ادهرنت *اشریشیاکلی* (با چسبندگی پراکنده)(DAEC[۱۳])، ادهرنت اینویزیو *اشریشیاکلی* (چسبنده-مهاجم)AIEC[۱۴] (۸-۵). EAEC دارای الگوی اتصال تجمعی (AA[۱۵]) به سلول های اپی تلیال HEP-2 و Hela در کشت سلولی و تشکیل الگوی چسبندگی (آجر انباشته[۱۶]) می باشد. اتصال و ایجاد التهاب در سطوح مخاطی روده و ترشح توکسین ها و سایتوتوکسین ها مکانیسمی است که EAEC برای ایجاد اسهال به کار می گیرد. تمامی این اعمال از سوی ژن های ویرولانسی انجام می شود که روی جزایر بیماریزایی، پلاسمید و ترانسپوزون ها قرار دارند. فیمبریه های اتصال تجمعی AAF باعث اتصال به سلول های HEp-2می شوند، ولی در تعداد کمی از سویه ها وجود دارند. همچنین پروتئین ترشحی سطحی دیگری به نام دیسپرسین[۱۷] وجود دارد، که توسط ژن های پلاسمیدی کد می شود و باعث اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی می شود، که این پروتئین در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم شرکت دارد. *fimA* پیلی که توسط کروموزوم کد می شود و باعث اتصال تجمعی درون سلولی نقش دارد و حساس به مانوز است. یک توکسین موسیناز به نام Pic و یک انتروتوکسین به نام انتروتوکسین شیگلا ShET1[۱۸] که توسط کروموزوم سویه های EAEC کد می شود که نقش دقیق آنها در بیماریزایی مشخص نیست. همچنینEAEC سه توکسین تولید می کند که در بیماریزایی آن نقش دارد. یک انتروتوکسین به نام توکسین مقاوم به حرارت EAST1[۱۹] توسط پلاسمیدی به نام *pAA* کد می شود، EAST1از نظر ترادف پروتئینی ۵۰ درصد با ژن *astA*(سم مقاوم به حرارتETEC) شباهت دارد. توکسین دوم به نام توکسین pet توسط پلاسمید کد می شود که یک پروتئین حساس به حرارت و در واقع یک سیتوتوکسین است. سومین توکسین، پروتئین حساس به حرارت که عامل بالا رفتن میزان

[1] Enteroaggregative *Escherichia coli*
[2] Enterotoxigenic *Escherichia coli*
[3] Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*
[4] Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*
[5] Diarrheagenic *Escherichia coli*
[6] Pathotypes
[7] Enteroinvasive *Escherichia coli*
[8] Typical
[9] Atypical
[10] Shiga toxinproducing *Escherichia coli*
[11] Enteropathogenic *Escherichia coli*
[12] Enteroaggregative *Escherichia coli*
[13] Diffusely adherent *Escherichia coli*
[14] Adherent-invasive *Escherichia coli*
[15] Aggregative Adherence
[16] Stacked-brick
[17] Dispersin
[18] *Shigella* Enterotoxin 1
[19] EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1

کلسیم درون سلولی شده و با این مکانیسم سبب از بین رفتن پرزهای روده می شود.پلاسمید *pAA* دارای یک تنظیم کننده به نام *aggR* است، که به طور تقریبی بیشتر فاکتورهای بیماریزایی EAEC را کنترل می کند. این باکتری با استفاده از فاکتورهای ویرولانس خود به سلول های بافت مخاطی روده متصل شده و باترشح توکسین ها و سیتوتوکسین ها باعث ایجاد اسهال می شود (جدول-۱) (۱۰و۹). EAEC دارای تنظیم کننده aggR به نام EAECتیپیکال tEAEC[1] نام گذاری شدند و اعتقاد بر این است که tEAEC بالقوه پاتوژن هستند (۱۱). جهت تشخیص EAEC از دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده می گردد. در روش فنوتیپی از روش کشت سلولی(سلول های اپی تلیال HEP-2) استفاده می گردد. و در روش ژنوتیپی از روش تشخیصی PCR جهت شناسایی مولکولی EAEC استفاده می شود و در برخی مطالعات ژن *aggR* به عنوان توالی هدف برای تشخیص EAEC استفاده می شود (۱۲).

جدول۱- برخی ژن های حدت *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای (۱۳).

نقش در پاتوژن	موقعیت	عملکرد	ژن(ها) حدت
چسبندگی	پلاسمید	فعال کننده نسخه برداری از ژن(های) حدت	*aggR*
چسبندگی	پلاسمید	فیمبریه ادهسین(اتصال تجمعی)	*aaf*
چسبندگی	پلاسمید	پروتئین ترشحی Dispersin	*aap*
تشکیل بیوفیلم	پلاسمید	پروتئین ترشحی Dispersin	*aatA*
توکسین	پلاسمید	انتروتوکسین مقاوم به حرارت EAST1	*astA*
چسبندگی	کروموزومی	پیلی حساس به مانوز(اتصال تجمعی)	*fim A*

یکی از تهدیدات جدی *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای، بیماریزای آن بخصوص در کودکان و افراد دارای نقص ایمنی اکتسابی است و در این تهدید جدی فاکتورهای حدت زا نقش اساسی دارند. بخصوص اینکه این ژن ها حدت اکثرا پلاسمیدی هستند و به راحتی به باکتری غیر بیماریزا منتقل می شوند و آنها را بیماریزا می کنند. شناسایی و جداسازی آن عوامل حدت در شناسایی شدت بیماریزایی *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای اهمیت دارد. هدف از انجام این مطالعه آنالیز ملکولی ژن های حدت در جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای جداشده از نمونه های اسهال می باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی۴۱۰ نمونه اسهال کودکان از بیمارستان های تخصصی کودکان در شهر مشهد جمع آوری گردید. پس از جداسازی و شناسایی ۳۵۲ جدایه ی *اشریشیاکلی*، با استفاده از PCR، ۳۹ جدایه ی EAEC شناسایی شد. تمام جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده روده ای در میکروتیوب های ۲ میلی لیتری حاوی محیط BHI براث استریل حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعدی ذخیره گردید. آزمایش های تشخیصی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شدند.

شناسایی مولکولی ژن های حدت جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای EAEC

[1]Typical EAEC

جدایه های EAEC از لحاظ حضور ژن های حدت *fimA, aap, astA, aafA, cdt* مورد بررسی قرار گرفتند (جدول۲).

جدول ۲- مشخصات پرایمر های مورد استفاده برای شناسایی ژن های *fimA, aap, astA, aafA, cdt*

نام	توالی (′۵ به ′۳)	هدف	اندازه ی محصول(bp)	دمای اتصال	رفرانس
aaF-F	TGCGATTGCTACTTTATTAT	*aaF*	۲۴۲	۵۵ ºC	۱٤
aaF-R	ATTGACCGTGATTGGCTTCC				
aaP-F	CTTGGGTATCAGCCT GAATG	*aaP*	۳۱۰	۵۵ ºC	۱۵
aaP-R	AACCCATTCGGTTAGAGCAC				
EAST11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	*astA*	۱۱۱	۵۵ ºC	۱٦
EAST11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT				
fimA-R	GCT TCG GCG TTG TCT TTA TC	*fimA*	۴۳۶	۵۸ºC	۱۰
fimA-F	CGG AC G GTA CGC TGT ATT TT				
cdt-R	TAAATGGAATATAAATGTCCG	*Cdt*	۵۹۰	۵۰ ºC	۱۷
cdt-F	CGTTTCCTGCTACTGCATAAT				

جهت شناسایی ژن های *fimA, aap, astA, aafA, cdt* از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول ۲ استفاده گردید. حجم واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۰/۵ میکرومولار پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA، ۱۰ میکرولیتر Master mix PCR 2X(سیناکلون ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. برنامه ی دمایی عبارت بود از: واسرشت اولیه[1] ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه،۳۰ سیکل دمایی شامل واسرشت[2] ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال[3] بسته به هر پرایمر برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش[4] ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل ها گسترش نهایی[5] ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد. آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز صورت گرفت. ۱۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با گرین ویوور (ساخت ایران) انجام شد.

[1]Initial denaturation
[2]Denaturation
[3]Annealing
[4]Extension
[5]Final extension

نتایج

نتایج آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های حدت در جدایه های EAEC

نتایج نشان داد که در جدایه های EAEC بیشترین فراوانی مربوط به.ژن حدت *fimA* (۹۴/۸۷٪)۳۷ و *aap* (۸۹/۷۴٪) ۳۵ بود که عملکرد ژن *fimA* باعث تجمع داخل سلولی (پیلی اتصال تجمعی) توسط ژن های کروموزومی کد می شود و عملکرد ژن *aap* پروتئین ترشحی سطحی به نام دیسپرسین[1] نامیده می شود که توسط ژن های پلاسمیدی کد می شود و باعث اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی می شود که این پروتئین در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم شرکت دارد. بیشترین فراوانی سایر ژن های حدت به ترتیب *astA* (۲۸/۲۰٪)۱۱، *aafA* (۷/۶۹٪)۳ و ژن حدت *cdt* در جدایه های EAEC یافت نشد (جدول-۴).

جدول ٤- توزیع فراوانی ژن های حدت در جدایه های EAEC

ژن حدت	عملکرد	جدایه های اسهالی				جمع	
		تیپیکال-EAEC (تعداد=۳۳)		آتیپیکال-EAEC (تعداد=۶)			
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
aap	پروتئین ترشحی دیسپرسین	۳۳	۱۰۰	۲	۳۳/۳۳	۳۵	۸۹/۷۴
astA	انتروتوکسین مقاوم به حرارت EAST1	۹	۲۷/۲۷	۲	۳۳/۳۳	۱۱	۲۸/۲۰
aafA	فیمبریه ادهسین(اتصال تجمعی)	۳	۹/۰۹	۰	۰	۳	۷/۶۹
Cdt	پروتئین ترشحی	۰	۰	۰	۰	۰	۰
fimA	پیلی (اتصال تجمعی)	۳۳	۱۰۰	۴	۶۶/۶۷	۳۷	۹۴/۸۷

جدول ٥- الگوی ژنی ژن های حدت EAEC

الگوی ژنی	جدایه های اسهالی		جمع(تعداد=۳۹)
	تیپیکال- EAEC (تعداد=۳۸)	آتیپیکال-EAEC (تعداد=۶)	
	تعداد	تعداد	تعداد
بدون ژن های حدت	۰	۱	۱
Aap	۳	۰	۳
fimA	۰	۳	۳
fimA, aap	۲۱	۰	۲۱
aap, astA	۱	۱	۲
aap, astA, fimA	۳	۰	۳

[1] Dispersin

aap, astA, aafA	۱	۰	۱
aap, astA, aafA , fimA,	۲	۰	۲
aap, astA,cnf, tos, fimA	۱	۰	۱

جدول۵ الگوی ژنی ژن های حدت EAEC را نشان می دهد که بیشترین جدایه ها دارای الگوی ژنی *fimA, aap* می باشد. که باعث اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی می شود که باعث تخریب و آسیب بافت مخاطی و بیماریزایی می گردد.

بحث

اشریشیاکلی چسبنده ی روده ای عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار و همچنین عامل ایجاد کاهش رشد و سوء تغذیه در کودکان می باشد. عوامل زیادی در بیماریزایی آن دخیل است. که یکی از عوامل حضور ژن های حدت است که باعث افزایش شدت بیماری و تهدیدی جدی برای سلامت افراد در جامعه می شوند.در این مطالعه آنالیز مولکولی برخی ژن های حدت در جدایه های EAEC مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به.ژن حدت *fimA* (۹۴/۸۷٪)۳۷ و *aap* (۸۹/۷۴٪) ۳۵ بود و بیشترین فراوانی سایر ژن های حدت به ترتیب *astA* (۲۸/۲۰٪)۱۱، *aafA* (۷/۶۹٪)۳ و ژن حدت *cdt* در جدایه های EAEC یافت نشد. در مورد آنالیز مولکولی ژن های حدت *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای در نمونه های اسهالی در ایران گزارشی وجود ندارد و در مطالعه ی که جمشیدیان مجاور و همکارانش در سال ۱۴۰۱ جهت بررسی شیوع *اشریشیاکلی* جدا شده از شتر مرغ و عفونت ادراری انسان انجام دادند میزان فراوانی ژن *astA* در سویه های APEC ۱۶/۶۶٪ و در سویه های UPEC ۲۰٪ گزارش شد(۱۸). شکوهی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی میزان شیوع ژن های *cvaA/B، astA, tsh, iss* در ۱۰۰ جدایه بدست آمده از عفونت ادراری پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میزان فراوانی ژن *astA* ۲۹٪ بود(۱۹). مشایخی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران به بررسی شیوع ژن های حدت *astA, tsh, iss, irp2, va*t در ۱۲۱ بیمار مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میزان فراوانی ژن *astA* ۶٪ بود(۲۰).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که در جدایه های EAEC بیشترین فراوانی مربوط به ژن حدت *aap* و *fimA* می باشد و این ژن ها در اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی و تجمع درون سلولی جدایه ها و در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نقش دارند باعث تخریب و آسیب بافت مخاطی و بیماریزایی می گردد و از طرفی حضور انواع ژن های بیماریزا در جدایه های EAEC نشانگر دخالت مستقیم این ژن ها در بیماریزایی باکتری است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از عزیزانی که در انجام آزمایشات همکاری کردند، کمال تشکر را دارم.

References

1. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. 2010; 8(1): 26-38.

2. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. Journal of applied microbiology. 2017; 123(3): 570-81.
3. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw-Hill Education; 2015.
4. Roche JK, Cabel A, Sevilleja J, Nataro J, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growth while malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. The Journal of infectious diseases. 2010; 202(4): 506-14.
5. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews. 2013; 26(4): 822-80.
6. Gomes T, Elias W, Scaletsky I, Guth B, Rodrigues J, Piazza R, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. brazilian journal of microbiology. 2016: 47.
7. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews microbiology. 2004; 2(2): 123-40.
8. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E.coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. Between pathogenicity and commensalism. 2013: 3-32.
9. Mohammadzadeh M, Goudarzi H, Dabiri H, Fallah F. Frequency of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates among patients with diarrhea referred to Tehran hospitals. Research in Medicine. 2016; 40(2): 68-72.
10. Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of Klebsiella pneumoniae. Journal Bacteriology 1989; 171(3): 1262-70.
11. DuPont HL, Mathewson JJ. *Escherichia coli* diarrhea. Bacterial infections of humans: Springer; 1998: 269-83.
12. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. FEMS microbiology letters. 8-12: 254(1); 2006.
13. Estrada-Garcia T, Perez-Martinez I, Bernal-Reynaga R, Zaidi B. Enteroaggregative *Escherichia coli* A Pathogen Bridging the North and South. Currently Tropical Medicine Reports. 2014; 1: 88–96.
14. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascon J, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. The Journal of infectious diseases. 2000; 182(6): 1780-1783.
15. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains. Journal of clinical microbiology. 2003; 41(5): 2138-40.
16. Monteiro-Neto V, Campos LC, Ferreira AJ, Gomes TA, Trabulsi LR. Virulence properties of *Escherichia coli* O111:H12 strains. FEMS Microbiology letters.1997; 146: 123-8.
17. Hinenoya A, Naigita A, Ninomiya K, Asakura M, Shima K, Seto K, Tsukamoto T, Ramamurthy T, Faruque SM, Yamasaki S. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxinproducing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan. Microbiology Immunology. 2009; 53: 206-215.
18. Jamshidian Mojaver M, Ghaniei A, Farzin HR, Amir M. Investigation of the prevalence of virulence and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from ostriches and human urinary tract infections. Veterinary Researches & Biological Products. 2021; 134: 92-100.
19. Shookohi M, Rashki A. Prevalence of toxigenic genes in *Escherichia Coli* isolates from hospitalized patients in Zabol, Iran. International Journal Enteric Pathogenic. 2016; 4: 1-5.

20. Mashayekhi F, Moghny M, Faramarzpoor M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, Tarhriz V, Dormanesh B. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. Iranian Journal of Biotechnology. 2014; 12: 32-40.

Orginal Article

Molecular Analyze of Virulence Genes in Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolates Isolated from Diarrheic Children

Received: 15/07/2023 - Accepted: 10/08/2024

Zakiyeh Imanpanah[1*]
Gholamreza Hashemi Tabar[2]
Mahdi Askari Badouei[3]

1 microbiology ferdowsi university of mashhad mashhad iran
2 1. Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3 Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Email: golkar34@gmail.com

Abstract

Background: Enteroaggregative *Escherichia coli* has many virulence genes that are related to its pathogenicity. The main purpose of this study was the molecular analysis of virulence genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates isolated from diarrhea children.

Materials and Methods: In this cross-sectional descriptive study, after collecting 410 stool samples from diarrheic children, 352 *Escherichia coli* isolates were isolated using biochemical tests, and 39 EAEC isolates were isolated using the molecular PCR method and *CVD432*, *aggR* primers, and virulence genes were investigated. *fimA*, *aap*, *astA*, *aafA*, *cdt* primers in Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates was performed by molecular PCR method.

Results: According to the results of the molecular method, out of a total of 39 EAEC isolates, the most isolates related to 37 (94.87%) *fimA* gene, 35 (89.74%) *aap* gene, 11 (20.28%) *astA* gene, 3 (69 (7%) *aafA* gene and *cdt* gene were not found in any of the isolates.

Conclusion: The results showed that in EAEC isolates, the most frequent virulence genes are related to *aap* and *fimA*, and these genes play a role in bacterial aggregation and penetration into mucous tissue and intracellular accumulation of isolates, and in adhesion and biofilm formation. On the other hand, the presence of various pathogenic genes in EAEC isolates indicates the direct involvement of these genes in bacterial pathogenicity.

Keywords: "EAEC", **"**virulence genes", "Children's diarrhea", "Molecular Analyze**"**

Acknowledgement: There is no conflict of interest