

Frequency of Enteroaggregative Escherichia coli isolates among patients with diarrhea referred to Tehran hospitals

M. Mohammadzadeh, H. Goudarzi*, H. Dabiri, F. Fallah

1. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2016/06/29

Accept: 2015/09/28)

Abstract

Background: Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), after enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) is the leading cause of traveler's diarrhea in developing and developed countries. According to importance of chronic diarrhea, especially in children, and inappropriate traditional methods, and insufficient information about frequency of EAEC, molecular techniques can be very helpful. In the current study, EAEC frequency were evaluated among *E. coli* isolates among patients with and without diarrhea, which were referred to selected hospitals of Tehran using PCR.

Materials and Methods: In this case-control study, 165 diarrheal and 165 non-diarrheal samples were tested for *E. coli* using culture methods. Then DNA of isolates was extracted by the boiling method. All *E. coli* isolates were investigated for the presence of *uidA* gene. EAEC pathotypes were identified by amplification of the *aggR* gene using PCR. The statistical analysis was performed by chi-square and fisher tests.

Results: By culture methods, among 165 diarrheal and 165 non-diarrheal samples, 154 and 146 *E. coli* isolates were detected, respectively. According to *uidA* gene PCR results, 140 of diarrheal and 136 of non-diarrheal *E. coli* isolates were confirmed and others were excluded. The *aggR* gene was detected in 6 (4.28%) *E. coli* isolates of diarrheal and not found in non-diarrheal isolates.

Conclusion: The results showed that EAEC pathotypes have remarkable role in diarrhea, which is usually ignored due to weakness of culture methods. According to importance of diarrhea, especially in infants and immune compromised patients, applying molecular methods such as PCR can be helpful for diagnosis and treatment of acute and life-threatening cases.

Keywords: Diarrhea, Polymerase chain reaction, Enteroaggregative Escherichia coli

* Corresponding author: Hossein Goudarzi
E-mail: Hgod100@yahoo.com

فراوانی ایزوله‌های انترواگریگیتو اشريشياکلی در بیماران مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران

محمد محمدزاده، حسین گودرزی*، حسین دبیری، فاطمه فلاح

۱- گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۴/۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۷

چکیده:

سابقه و هدف: انترواگریگیتو اشريشياکلی (EAEC) بعد از انتروتوکسیژنیک اشريشياکلی (ETEC) به عنوان دومین عامل اسهال مسافرتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. با توجه به اهمیت تشخیص اسهال مزمن به خصوص در کودکان و نامناسب بودن روش‌های سنتی در تشخیص EAEC و اطلاعات ناکافی از شیوع اسهال به واسطه EAEC، استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند بسیار مفید باشد. در این مطالعه می‌خواهیم با استفاده از روش PCR، فراوانی پاتوتایپ‌های EAEC در میان باکتری‌های اشريشياکلیای که از نمونه‌های بیماران مبتلا به اسهال مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران جدا شده‌اند، بررسی شود.

روش بررسی: در این مطالعه موردی شاهدهی، ۱۶۵ نمونه اسهالی و ۱۶۵ نمونه غیراسهالی از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های منتخب تهران با استفاده از روش‌های کشت برای جداسازی اشريشياکلی بررسی شدند. سپس با استفاده از روش جوشاندن DNA ایزوله‌های اشريشياکلی استخراج شد. تمامی ایزوله‌ها از نظر وجود ژن *uidA* و سپس از نظر وجود ژن *aggR* برای شناسایی EAEC با روش PCR بررسی شدند. نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری کای ۲ و فیشر ارزیابی شد.

یافته‌ها: از میان ۱۶۵ نمونه اسهالی و ۱۶۵ نمونه غیر اسهالی براساس نتایج آزمایش‌های کشت، به ترتیب ۱۵۴ و ۱۴۶ ایزوله اشريشياکلی شناسایی شد. طبق نتایج PCR برای ژن *uidA* جهت تایید مولکولی ایزوله‌های اشريشياکلی، ۱۴۰ ایزوله از نمونه‌های اسهالی و ۱۳۶ ایزوله از نمونه‌های غیراسهالی دارای این ژن بودند و ایزوله‌های فاقد این ژن از مطالعه خارج شدند. ژن *aggR* در شش ایزوله (۴/۲۸ درصد) از نمونه‌های اسهالی شناسایی شد و در نمونه‌های غیراسهالی یافت نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پاتوتایپ‌های EAEC از عوامل فعال در بیماری اسهال هستند که به طور معمول به دلیل ضعف تشخیصی در روش‌های کشت نادیده گرفته می‌شوند. با توجه به اهمیت این بیماری به خصوص در کودکان و بیماران دچار نقص ایمنی، استفاده از روش‌هایی مثل PCR برای تشخیص و درمان به موقع موارد حاد و تهدید کننده حیات می‌تواند بسیار مفید باشد.

واژگان کلیدی: اسهال، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، انترواگریگیتو اشريشياکلی

مقدمه:

انترواگریگیتو اشريشياکلی (EAEC) یکی از شش پاتوتایپ شناخته شده اشريشياکلی است و بعد از انتروتوکسیژنیک اشريشياکلی (ETEC) به عنوان دومین عامل اسهال مسافرتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شناخته می‌شود. (۱) پاتوتایپ EAEC باعث به وجود آمدن اسهال مزمن در کودکان و بزرگسالان می‌شود که می‌تواند از یک اسهال آبکی تا اسهال شدید با دفع خون و موکوس متغیر باشد. (۱،۲) سوبه‌های EAEC به دلیل ایجاد گوی اتصال تجمعی (Aggregation adherence)

اسهال یکی از عوامل اصلی مرگ در کشورهای در حال توسعه و دومین عامل مرگ کودکان در سراسر دنیا است. از دست دادن مایعات در اثر اسهال می‌تواند باعث از دست رفتن آب بدن و به هم خوردن تعادل الکترولیت‌ها در بدن شود. در سال ۲۰۰۹ تخمین زده شد که اسهال باعث مرگ ۱٫۱ میلیون نفر در افراد پنج ساله و بالاتر و ۱٫۵ میلیون نفر کودکان زیر پنج سال شده است. (۱)

نویسنده مسئول: حسین گودرزی

پست الکترونیک: Hgod100@yahoo.com

سانتریفیوژ شد. مایع رویی به طور کامل تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه به میکروتیوب‌ها اضافه شد و با استفاده از شیکر به مدت چند ثانیه یکنواخت شد. میکروتیوب‌ها ۱۰ دقیقه در بین ماری جوش با دمای ۹۵ درجه قرار گرفتند و سپس پنج دقیقه روی یخ گذاشته شدند. نمونه‌ها دوباره در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت دودقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حاوی DNA برای انجام PCR به میکروتیوب دیگری منتقل شد. تمامی نمونه‌های استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد تا از وجود DNA اطمینان حاصل شود (۱۵).

تایید مولکولی ایزوله‌های اشریشیاکلی: تمامی ایزوله‌ها با استفاده از PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (تگ کوپنهاگن، دانمارک) مندرج در جدول ۱ و طبق شرایط واکنش مندرج در جدول ۲ از نظر وجود بر ژن uidA تایید شدند. ایزوله‌هایی که از نظر وجود این ژن منفی بودند، به عنوان باکتری‌های غیر اشریشیاکلی در نظر گرفته شدند و از مطالعه حذف شدند. سویه‌ی اشریشیاکلی K1۲ (گروه میکروپشناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) به عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی برای انجام PCR

ژن هدف	شرایط دمایی واکنش
uidA	0۹۵ (۵ دقیقه)، 0۹۵ (۳۰ ثانیه)، 0۶۵ (۳۰ ثانیه)، 0۷۲ (۳۰ ثانیه)، 0۷۲ (۵ دقیقه)
aggR	0۹۵ (۵ دقیقه)، 0۹۵ (۳۰ ثانیه)، 0۶۰ (۳۰ ثانیه)، 0۷۲ (۳۰ ثانیه)، 0۷۲ (۵ دقیقه)

جدول ۲- شرایط دمایی PCR

ژن هدف	توالی پرایمر	سایز محصول (Kb)	مرجع
uidA	5-GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG-3	۵۰۳	۱۶
	5- GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT-3		
aggR	5-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3	۲۵۴	۱۷
	5-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3		

شناسایی پاتوتایپ‌های EAEC: ایزوله‌های اشریشیاکلی تایید شده به روش مولکولی از نظر وجود ژن aggR برای شناسایی EAEC با روش PCR بررسی شدند. پرایمرهای اختصاصی و شرایط واکنش به ترتیب در جدول‌های فوق ذکر شده است. سویه EAEC17-26 (انستیتو پاستور، ایران) به عنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.

تمامی واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ μ l شامل ۱۲/۵ μ l Mastermix آماده مصرف (فرمنتاس، آلمان)، ۱ μ l از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse و ۹/۵ μ l آب مقطر دیونیزه و ۱ μ l از DNA الگو انجام شد. برای هر دو ژن از ۳۰ سیکل استفاده شد.

محاسبات آماری: آزمون فیشر و کای ۲ با استفاده از نرم‌افزار آنلاین graphpad انجام شد و P value کمتر از ۰٫۰۵ (p < ۰٫۰۵) به عنوان ارتباط معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

از میان ۱۶۵ نمونه اسهالی کشت شده و براساس نتایج آزمایش‌های IMViC، ۱۵۴ ایزوله (۹۳٫۳ درصد) و از میان ۱۶۵ نمونه غیراسهالی، ۱۴۶ ایزوله (۸۸٫۵ درصد) اشریشیاکلی شناسایی شد. همچنین طبق نتایج PCR برای ژن uidA که برای تایید مولکولی ایزوله‌های اشریشیاکلی انجام شد نشان داده شد که ۱۴۰ ایزوله اشریشیاکلی (۸۴٫۸ درصد) به دست آمده از نمونه‌های اسهالی و ۱۳۶ ایزوله (۸۲٫۴ درصد) به دست آمده از نمونه‌های غیراسهالی دارای این ژن بودند. ایزوله‌های دارای ژن uidA برای بررسی از نظر حضور ژن aggR آزمایش شدند و ایزوله‌های فاقد این ژن از مطالعه خارج شدند (تصویر ۱).

به شکل آجر انباشته (Stacked break) روی سلول‌های رده HEP-2 شناخته می‌شود. (۳) اتصال و ایجاد التهاب در سطوح مخاطی روده و ترشح توکسین‌ها و سایتوتوکسین‌ها مکانیسمی است که EAEC برای ایجاد اسهال به کار می‌گیرد. (۴،۵) تمامی این اعمال از سوی ژن‌های ویرولاسنی انجام می‌شود که روی جزایر بیماری‌زایی، پلاسمید و ترانسپوزون‌ها قرار دارند. (۶) فیمبریه‌های اتصال تجمعی (AAFs) باعث اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی نوع ۲ (HEp2) می‌شوند، ولی در تعداد کمی از سویه‌ها وجود دارند. همچنین پروتئین سطحی دیگری به نام دیسپرسین وجود دارد که باعث اتصالات مستحکم تجمعی باکتری و نفوذ به بافت مخاطی می‌شود. (۷) یک توکسین موسیناز به نام Pic و یک انتروتوکسین به نام انتروتوکسین ۱ شینگلا (ShET1) از سوی کروموزوم باکتری کد می‌شود که نقش دقیق آن‌ها در بیماری‌زایی باکتری به طور دقیق مشخص نیست. (۸،۹) همچنین EAEC دارای پلاسمیدی به نام pAA است که یک انتروتوکسین به نام توکسین مقاوم به حرارت EAEC (EAST-1) و یک توکسین به نام توکسین کد شونده به واسطه پلاسمید (Pet) را کد می‌کند. (۱۰) پلاسمید pAA دارای یک تنظیم کننده به نام aggR است که به طور تقریبی بیشتر فاکتورهای بیماری‌زایی EAEC را کنترل

می‌کند. (۷) این باکتری با استفاده از فاکتورهای ویرولاسن خود به سلول‌های بافت مخاطی روده متصل شده و با ترشح توکسین‌ها و سایتوتوکسین‌ها باعث ایجاد اسهال می‌شود. (۱۱) روش‌های تشخیصی برای EAEC مانند بقیه پاتوتایپ‌های دیگر اشریشیاکلی بسیار محدود هستند و احتیاج به صرف هزینه و وقت زیادی دارند. طور معمول این روش‌ها فقط در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و مرجع انجام می‌شود. از آنجا که نمونه‌های اسهالی بیماران کمتر

به این آزمایشگاه‌ها ارجاع داده می‌شوند، پاتوتایپ‌های EAEC به طور معمول نادیده گرفته می‌شوند. با این وجود استفاده از روش‌های مولکولی مثل PCR برای تشخیص این باکتری‌ها در حال گسترش است و در برخی مطالعه‌ها برای تشخیص EAEC استفاده شده است. ژن aggR اغلب به عنوان توالی هدف برای تشخیص این پاتوتایپ استفاده می‌شود. (۱۵-۱۲) همچنین از ژن uidA برای تایید مولکولی ایزوله‌های اشریشیاکلی استفاده می‌شود. این ژن کدکننده آنزیم بتا-D-گلوکورونیداز است که در باکتری اشریشیاکلی یک ژن House keeping است. (۱۶) با توجه به اهمیت بیماری اسهال که گاهی در موارد شدید تهدیدکننده حیات است و نقش EAEC در ایجاد این بیماری که به طور معمول کمتر شناسایی می‌شود، در این مطالعه می‌خواهیم با استفاده از روش PCR در کنار روش‌های کشت، فراوانی پاتوتایپ‌های EAEC در باکتری‌های اشریشیاکلی‌ای که از نمونه‌های بیماران مبتلا به اسهال مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران در سال ۱۳۹۳ جدا شده‌اند، بررسی شود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه موردی-شاهدی، ۱۶۵ نمونه اسهالی و ۱۶۵ نمونه غیراسهالی از بیماران سرپایی و بستری مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزشی امام حسین (ع)، لقمان حکیم و آیت الله طالقانی بررسی شد. آزمایش‌های تشخیصی در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه میکروپشناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی انجام شد.

روش‌های کشت: تمامی ۳۳۰ نمونه اسهالی و غیراسهالی روی محیط‌های EMB و مک کانکی (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شد. کلونی‌های لاکتوز مثبت با استفاده از آزمایش‌های IMViC برای تایید ایزوله‌های اشریشیاکلی روی محیط‌های سیترات، MR، VP، SIM و TSI کشت داده شد و م دوباره ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و ایزوله‌های اشریشیاکلی شناسایی شده در محیط لوریا برتانی LB (مرک، آلمان) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل مولکولی ذخیره شد.

استخراج DNA: ایزوله‌های اشریشیاکلی در میکروتیوب‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری از محیط LB کشت داده شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. میکروتیوب‌ها در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت سه دقیقه

جدول ۴- سن و جنس بیماران مبتلا و غیرمبتلا به اسهال براساس ایزوله‌های مورد مطالعه

EAEC	میانگین سن بیماران	جنسیت بیماران	جمعیت ایزوله‌های مورد مطالعه
۴ ایزوله	۳۰±۲۹	مرد n=۷۶	ایزوله اشریشیاکلی تایید شده از نمونه اسهال n=۱۴۰
۲ ایزوله	۲۹±۲۷	زن n=۶۴	
یک ایزوله	۲۶±۲۴	مرد n=۶۹	ایزوله اشریشیاکلی تایید شده از نمونه غیراسهال n=۱۳۶
.	۲۷±۲۶	زن n=۶۵	

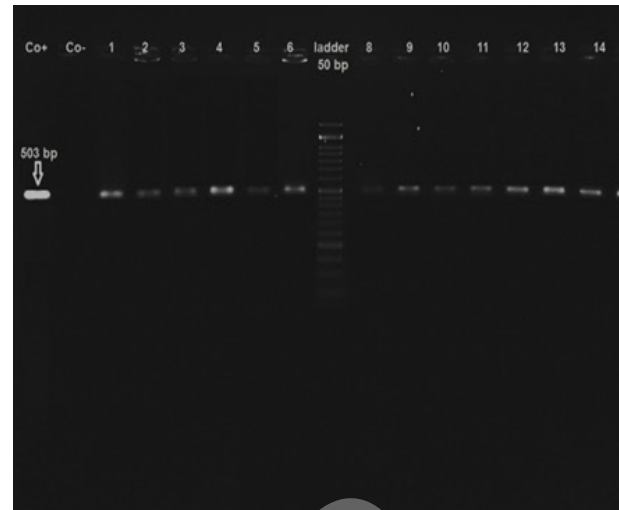
بحث:

مطالعه حاضر نشان داد که حداقل ۴/۲۸ درصد از ایزوله‌های اشریشیاکلی‌ای که به صورت روتین به‌عنوان ایزوله‌های غیربیماری‌زا گزارش می‌شوند می‌توانند به صورت بالقوه بیماری‌زا باشند. در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۱۰، اصلانی و همکاران مابین ۱۴۰ ایزوله اشریشیاکلی از کودکان زیر ۱۲ سال مبتلا به اسهال در بیمارستان بعثت همدان، EAEC را در ۱۰/۷ درصد از موارد گزارش کردند. در این مطالعه علاوه بر ژن aggR از ژن‌های aap و astA نیز استفاده شد. (۱۸) در این مطالعه فراوانی بالاتری نسبت به مطالعه حاضر گزارش شده است که تفاوت زمانی و مکانی مطالعه و جمعیت مورد بررسی که شامل فقط کودکان است، در این اختلاف می‌تواند دخیل باشد.

عباسی و همکاران در سال ۲۰۱۴ فراوانی EAEC را در نمونه‌های اسهال ۰/۷ درصد گزارش کردند. این مطالعه در نواحی جنوب ایران و با استفاده از ژن aggR انجام شد. (۱۹) در این مطالعه EAEC روی تمام نمونه‌های اسهال انجام شده است، در حالی که در مطالعه حاضر ایزوله‌های اشریشیاکلی از نمونه‌های اسهال از نظر وجود EAEC بررسی شده‌اند.

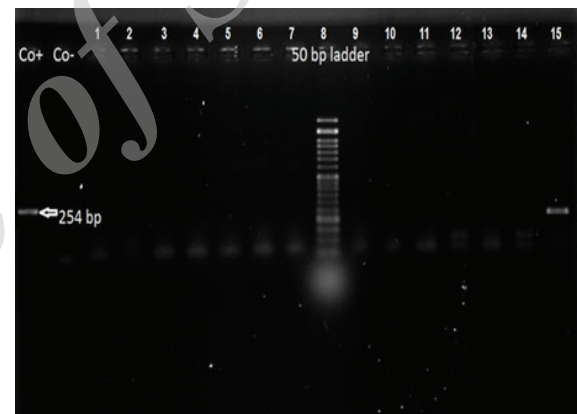
همچنین مصطفی و همکارانش مطالعه‌ای را در سال ۲۰۱۳ در بین کودکان مصری مبتلا و غیرمبتلا به اسهال انجام دادند که EAEC در ۳۰/۷ درصد از موارد اشریشیاکلی جدا شده از این کودکان گزارش شد. همچنین ارتباط معناداری بین حضور EAEC در موارد اسهالی و غیراسهالی مشاهده کردند. (۲۰) این مطالعه از نظر متدولوژی بسیار به مطالعه حاضر شباهت دارد. با این تفاوت که جمعیت کودکان مطالعه شده است. تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین ایزولاسیون EAEC در این مطالعه و مطالعه ما وجود دارد که می‌تواند دلیلی بر اهمیت تفاوت بهداشتی و تفاوت جغرافیایی و محدوده سنی در شیوع EAEC داشته باشد.

در سال ۲۰۰۹، اوسین و همکارانش فراوانی پاتوتایپ‌های مولد اسهال را مابین اشریشیاکلی‌های جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال در رومانی مطالعه کردند. در این مطالعه از روش‌های سرولوژی و مولکولی استفاده شد و EAEC با ۱۱/۶ درصد بیشترین فراوانی را در بین پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی جدا شده داشت. (۲۱) مقایسه مطالعه حاضر و بقیه مطالعه‌ها حاکی از تفاوت در فراوانی EAEC در نواحی جغرافیایی مختلف است که این اختلاف می‌تواند عوامل مختلفی داشته باشد. شرایط اقلیمی، بهداشتی و سنی جمعیت مورد بررسی و روش‌های استفاده شده در مطالعه و تفاوت زمانی می‌توانند از عوامل دخیل در گزارش‌های متفاوت باشند. همچنین در مطالعه‌هایی که روی کودکان انجام شده، فراوانی بالاتری از



تصویر ۱- نتایج PCR برای شناسایی ژن uidA. از سمت چپ نخستین چاهک نمونه کنترل مثبت (سویه E.coli k12)، دومین چاهک کنترل منفی و چاهک‌های یک تا ۱۵ نمونه‌های مثبت از نظر وجود ژن uidA.

ژن aggR در ۶ ایزوله (۴/۲۸ درصد) در میان ۱۴۰ ایزوله اشریشیاکلی به دست آمده از نمونه‌های اسهالی یافت شد در حالی که همه نمونه‌های غیراسهالی فاقد این ژن بودند.



تصویر ۲- نتایج PCR برای شناسایی ژن aggR. از سمت چپ نخستین چاهک نمونه کنترل مثبت (سویه EAEC17-26)، دومین چاهک کنترل منفی و آخرین چاهک نمونه مثبت برای ژن aggR است.

ایزوله‌هایی که از نظر حضور ژن aggR مثبت بودند به عنوان پاتوتایپ EAEC در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل ارتباط معنادار مابین وجود EAEC و بیماری اسهال را تایید کرد (P: ۰/۰۲) (جدول ۳). اطلاعات تکمیلی بیماران مورد مطالعه که باکتری اشریشیاکلی از نمونه مدفوع‌شان ایزوله شده بود در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- ارتباط ژن aggR با بیماری اسهال

نوع اسهال	ژن aggR	مثبت	منفی	مجموع
اسهالی	۱۳۴ (۹۵/۷۲ درصد)	۶ (۴/۲۸ درصد)	۱۴۰	
غیر اسهالی	۱۳۶ (۱۰۰ درصد)	۰	۱۳۶	
P value: 0.02				

بیماران مبتلا باشد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به هزینه‌های سنگین و زمانبر روش‌هایی مثل کشت سلولی، استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص و تعیین فراوانی و متعاقبا درمان به موقع موارد حاد و تهدیدکننده حیات می‌تواند بسیار مفید باشد.

تشکر و قدردانی:

از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دلیل حمایت‌های صورت گرفته در انجام این مطالعه کمال سپاسگزاری را داریم.

EAEC را نشان می‌دهد که تاییدکننده اهمیت آن در بیماری اسهال کودکان است، اما در نهایت تمام مطالعه‌ها نشان دادند که پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی و به خصوص EAEC که از عوامل فعال در بیماری اسهال هستند، به طور معمول به دلیل ضعف در تشخیص نادیده گرفته می‌شوند. به همین دلیل مطالعه‌های متعددی مانند مطالعه حاضر برای شناسایی این پاتوتایپ‌ها در نواحی مختلف جهان انجام می‌شود که با به کارگیری روش‌های مولکولی اطلاعاتی از فراوانی این عوامل ایجادکننده اسهال ارائه کنند. بسیاری از این موارد اسهال خود محدودشونده هستند، اما با توجه به فراوانی EAEC و با توجه به اهمیت این بیماری به‌خصوص در کودکان و بیماران دچار نقص ایمنی، عدم تشخیص به موقع می‌تواند تهدیدکننده حیات

منابع:

- Croxen M, Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 26-38.
- Jafari A, Aslani M, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J microbiol* 2012; 4 (3): 102-117.
- Ron E. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 367-370.
- Estrada G, Navarro G. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66: 1-18.
- Navarro G, Elias W. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E.coli*. *Gut Microbes* 2011; 2: 13-24.
- Jafari A, Aslani M, Bouzari S. Enteroaggregative *Escherichia coli*, a heterogenous, underestimated and under-diagnosed *E. coli* pathotype in Iran. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* 2013; 6(2):71-79.
- Monteiro B, Campos L, Sircili M, and et al. The dispersin-encoding gene (*aap*) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 65: 81-84.
- Coombs B, Gilmour M, Goodman C. The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* doi:10.3389/fmicb.2011.00090.
- Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, and et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 2011; 193: 883-891.
- Chaudhuri R, Sebahia M, Hobman J, and et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042.. *PLoS ONE* 2010; 5: e8801.
- Boisen N, RuizPerez F, Scheutz F, and et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of Enteraggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 80: 294-301.
- Salmanzadeh-Ahrabi S, Habibi E, Jaafari F, and et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* diarrhoea in children in Tehran. *Ann Trop Med* 2011; 25: 35-39.
- Aslani M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Alikhani M, and et al. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. *Saudi Med J* 2012; 29: 388-92.
- Jaafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, and et al. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. *Jpn J Infect Dis* 2011; 61: 269-73.
- Jaafari F, Hamidian M, Rezaeebakhshi M, and et al. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2010; 20: e56-62.
- Mohammadzadeh M, Goudarzi H, Dabiri H, and et al. Distribution of Enterotoxigenic *Escherichia coli* among *E.coli* isolates from diarrheal samples referred to educational hospitals in Tehran-Iran. *Novelty in Biomedicine* 2015; 3: 144-147.
- Oscar G, Gomez D, Octavio A, and et al. Detection of *Escherichia coli* Enteropathogens by Multiplex Polymerase Chain Reaction from Children's Diarrheal Stools in Two Caribbean-Colombian Cities. *Foodborn pathogens and diseases* 2010; Vol 7: N2.
- Aslani M, Alikhani M, Zavari A, and et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis* 2011; 15: 136-139.
- Abbasi P, Kargar M, Doosti A, and et al. Enteraggregative *Escherichia Coli* (EAEC) in South of Iran. *Int J Pediatrics* 2014; Vol:2, No:2.
- Mostafa M, Salwa F, Klen J, and et al. Enteraggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(5):589-596.
- Usein C, Chitoiu D, Ciontea S, and et al. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 289-293.