

توزیع فراوانی اشرشیا کلی انترواگریگیتیو در موارد اسهالی شهر گرگان

چکیده

زمینه و هدف: اسهال یکی از علل عمده بیماری و مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه است. انترواگریگیتیو اشرشیا کلی (EAggEC) یکی از پاتوژنهای اسهال زا ست که با اسهال پایدار کودکان به خصوص در کشورهای در حال توسعه مرتبط است. هدف این مطالعه بررسی توزیع فراوانی سویه EAggEC در موارد اسهالی شهر گرگان به روش PCR (Polymerase Chain Reaction) است.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی - مقطعی به مدت یک سال (از تیرماه ۱۳۸۴ - تا خرداد ۱۳۸۵) بر روی موارد اسهالی شهر گرگان انجام یافت. ابتدا نمونه ها بر روی محیط مک کانکی و EMB کشت داده شدند، کانیهای مشکوک به E.coli انتخاب و DNA آنها به روش فنل کلروفرم استخراج و با استفاده از پرایمر اختصاصی به روش PCR شناسایی شدند.

یافته ها: از بین ۴۵۵ نمونه به دست آمده در طی یکسال، بیست نمونه ۴/۴٪ از نظر سویه EAggEC مثبت بود، که ۱۲ مورد زن، ۸ مورد مرد بودند. هفده مورد (۸۵٪) نمونه های مثبت در محدوده سنی زیر ۵ سال بودند که ۴۵٪ آنها در رده سنی زیر یک سال قرار داشتند. توزیع فراوانی این ژنوم در تابستان ۵/۳٪، در پاییز ۴/۲٪، در زمستان ۴/۱٪ و در بهار ۱/۸٪ بود.

نتیجه گیری: بر اساس توزیع فراوانی ۴/۴٪ اشرشیا کلی انترواگریگیتیو در موارد اسهالی شهر گرگان، توصیه می گردد که با استفاده از روشهای مولکولی که در مقایسه با روشهای کلاسیک راحت تر و ارزان تر می باشند بر شناسایی این میکروارگانیسم تاکید بیشتری صورت پذیرد.

واژه های کلیدی: اشرشیا کلی انترواگریگیتیو، اسهال، PCR، گرگان

هانیه باقری

کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد
لاهیجان

عزت ا... قائمی

دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه
علوم پزشکی گلستان

محمد مهدی اصلانی

دانشیار میکروبیولوژی انستیتو
پاستور ایران

نور امیر مظفری

دانشیار میکروب شناسی دانشگاه
علوم پزشکی ایران

صدیقه لیوانی

گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم
پزشکی گلستان

تینا دادگر

گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم
پزشکی گلستان

نویسنده مسئول: هانیه باقری

تلفن: ۰۹۱۱۳۷۵۶۶۱۸

پست الکترونیک:

chico_fo@yahoo.com

آدرس: گرگان خیابان ۵ آذر، آذر ۱۴،
پلاک ۱۵۲

وصول مقاله: ۸۶/۱۱/۳

اصلاح نهایی: ۸۷/۳/۲۲

پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۱۶

مقدمه

اسهال یکی از علل عمده بیماری و مرگ و میر کودکان در کشور های در حال توسعه است (۱). تخمین زده می شود بالای ۲ میلیون کودک در هر سال و روزانه بیش از ۶۰۰۰ کودک به علت اسهال در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین می میرند (۲). تعریفی که بیشتر برای اسهال مورد استفاده قرار می گیرد عبارت است از آبکی شدن مدفوع و دفع بیش از ۳ بار در روز. به طور متوسط هر کودک زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه، ۳/۳ بار در سال، و در برخی نقاط حتی ۹ بار در سال مبتلا به اسهال می شود (۳).

عوامل متعدد اپیدمیولوژیک از قبیل عوامل میزبانی، محیطی، تسهیلات بهداشتی و در شیوع عوامل بیماریزای روده ای موثر هستند (۴).

یکی از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال/شرشیا کلی است. این باکتری را اولین بار در سال ۱۸۸۵ تنودور اشریش (Theodor Escherich) شناسایی کرد. (۵) سویه های بیماریزای روده ای/شرشیا کلی باعث بیماریهای گوارشی در انسان و حیوانات می شوند که براساس تفاوت های آنتی ژنی و مکانیسم بیماریزایی به ۶ دسته مختلف تقسیم بندی شده اند:

- 1) Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)
- 2) Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)
- 3) Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)
- 4) Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)
- 5) Enteroaggregative Escherichia coli (EAggEC)
- 6) Enteroadherent E.coli (EAEC) یا [diffuse-adhering E.coli (DAEC)] (۶)

EAggEC اولین بار در سال ۱۹۸۷ به وسیله چسبیدن به سلول های HEP-2 در کشت سلولی شناخته شد و مشخصاً با اسهال پایدار (بیش از ۱۴ روز) بین کودکان به خصوص در کشورهای در حال توسعه در ارتباط است. (۷) EAggEC همچنین به عنوان یک عامل بالقوه برای فعالیت های بیوتروریستی نیز مطرح شده است (۸).

EAggEC سه نوع توکسین تولید می کند که در

بیماریزایی آن نقش دارد:

1- EAST1 (Enterotoxigenic heat-stable toxin 1)

یک پروتئین مقاوم به حرارت است که توسط ژن ast A کد می شود و از نظر ترادف پروتئینی ۵۰٪ با ژن STa (سم مقاوم به حرارت ETEC) شباهت دارد (۱۰).

۲-pet (plasmid-encoded toxin) - که یک پروتئین

حساس به حرارت است، توسط پلاسمید کد می شود. در واقع یک سیتوتوکسین است (۹).

۳- پروتئین حساس به حرارت که عامل بالا رفتن میزان کلسیم درون سلولی شده و با این مکانیزم سبب از بین رفتن پرزهای روده می شود (۱۰).

شایعترین علائم بالینی گزارش شده برای اسهال ناشی از EAggEC، اسهال آبکی، با یا بدون خون و مخاط، دردهای شکمی، تهوع، استفراغ و تب پایین است (۸).

فراوانی اشرشیا کلی های اسهال زا بویژه انترواگریگیتیو اشرشیا کلی در موارد اسهالی در منطقه ما مشخص نبوده و این بررسی به منظور تعیین توزیع فراوانی این ارگانیسم بر اساس فصل، سن و جنس در موارد اسهالی شهر گرگان اجرا شده است.

روش بررسی

جمع آوری نمونه - این پژوهش یک مطالعه توصیفی -

مقطعی است. نمونه های مدفوع ۴۵۵ نفر از بیماران اسهالی مراجعه کننده به مراکز درمانی و آزمایشگاه های تشخیص طبی شهر گرگان از اول تابستان ۱۳۸۴ تا اول تابستان ۱۳۸۵ جمع آوری گردید. به همراه نمونه اسهالی برای هر فرد یک پرسشنامه حاوی اطلاعات دموگرافیک و نیز علائم بالینی تکمیل و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی گرگان ارسال شد. نمونه ها پس از بررسی ماکروسکوپی با روش های استاندارد در محیط مک کانکی آگار و EMB آگار کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیتها از نظر وجود کلنی های مشکوک به E.coli مورد بررسی و انواع تست های بیوشیمیایی برای شناسایی اشرشیا کلی صورت گرفت. سپس برای استخراج DNA به محیط TSB انتقال داده شدند.

استخراج DNA - به روش فنل کلروفرم استاندارد

DNA استخراج و مورد استفاده قرار گرفت. به اختصار در این روش از بافر لیز، SDS و پروتئیناز K برای لیز باکتری و سپس از فنل کلروفرم، اتانل خالص سرد و بافر TE برای استخراج DNA استفاده شد (۱۱). DNA استخراج شده برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت و تا زمان اجرای آزمایش در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

یافته ها

از میان ۴۵۵ نمونه اسهالی مورد بررسی، ۲۵۵ نفر مذکر و ۲۰۰ نفر مونث بودند، محدوده سنی آنها از یک ماه تا ۶۶ سال ($5/07 \pm 8$ سال میانگین) متغیر بود.

به منظور دست یافتن به الگوی شیوع باکتری در منطقه در موارد اسهالی، افراد مبتلا به اسهال به گروههای سنی مختلف کمتر از یکسال، ۲-۵ سال، ۶-۱۲ سال و بالاتر از ۱۲ سال تقسیم گردیدند.

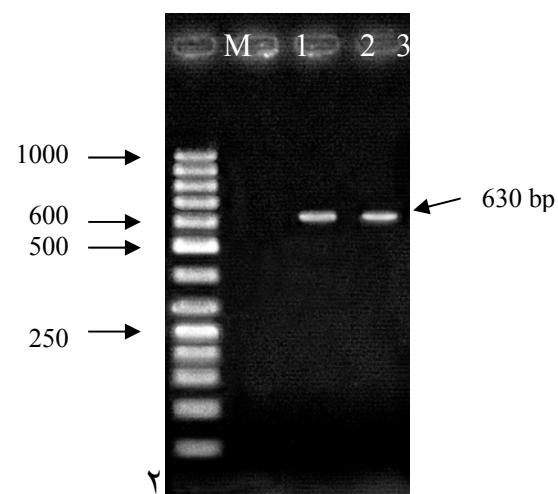
اکثر بیماران در محدوده سنی ۲-۵ سال قرار داشتند. بیشترین میزان مراجعین ($45/3\%$) در فصل تابستان و کمترین آن ($12/1\%$) در فصل بهار بوده است.

نمونه های مدفوع $20 (4/4\%)$ نفر از بیماران، حاوی ژنوم پلاسمید سویه EAggEC بود، از این میان ۱۲ مورد (60%) دختر و ۸ مورد (40%) پسر و نیز ۱۷ نفر (85%) در محدوده سنی زیر ۵ سال قرار داشتند که 45% آنها را کودکان زیر یک سال تشکیل می دادند. فراوانی این ژنوم در فصول تابستان، پاییز، زمستان و بهار به ترتیب $3/5\%$ ، $2/4\%$ ، $1/4\%$ و $1/8\%$ می باشد (جدول ۲) با توجه به نتایج به دست آمده، در تابستان بیشترین شیوع این ژن را شاهد هستیم.

بارزترین نشانه های بالینی در بین افراد مبتلا به اسهال توسط سویه های اشرشیاکولی انترواگریگیتیو عبارت بودند از: تب ($60/12\%$)، دلپیچه ($50/10\%$)، استفراغ ($25/5\%$)، تهوع ($10/2\%$)، سرگیجه ($5/1\%$)، و لی فراوانی این علائم در افراد مبتلا به EAggEC با سایر افراد مبتلا به اسهال تفاوت معنی داری نداشت. (جدول ۳) بررسی یافته های ماکروسکوپی در این پژوهش بیانگر آن است که در نمونه های اسهالی ناشی از سویه EAggEC در اکثر موارد فرم مدفوع شل و آبکی و از نظر رنگ نیز زرد یا قهوه ای بودند. فقط در ۳ نمونه خون دیده شد (15%)، در هیچ کدام از

روش PCR _ مخلوطی از بافر ($10 \times$)، $2/5 \mu l$ ، $1/5$ میکرولیتر از $dNTPs (10Mmol)$ ، $0/5 \mu l$ ، $10/5 \mu l$ پرایمرهای ۱ و ۲ ($20Pmol$)، $0/2 \mu l$ Taq ($5u$) و $1 \mu l$ از نمونه DNA استخراج شده را با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رساندیم.

از سویه اشرشیا کلی ATCC 35401 تهیه شده از انستیتو پاستور تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از آب مقطر برای کنترل منفی استفاده گردید. پروتکل PCR شامل مراحل دناتوراسیون اولیه در $96^\circ C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل انکوباسیون در $94^\circ C$ به مدت ۲۰ ثانیه، $55^\circ C$ برای ۲۰ ثانیه و $70^\circ C$ برای ۱۰ ثانیه، سپس Extention نهایی در $72^\circ C$ به مدت ۷ دقیقه بود. در این پژوهش پرایمرها با توالیهای زیر مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز 10 میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز 2% و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. (شکل ۱)



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR سویه EAggEC 630 bp _
M: مارکر ۱- کنترل منفی ۲- کنترل مثبت ۳- نمونه مثبت بیمار

جدول ۱: توالی و سایز پرایمرهای مورد استفاده

Category	Target	Primer Pairs 5'__3'	Amplicon Size(bp)	Reffrence
EAggEC	-a	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	12

a-Primers amplify a fragment of the plasmid pCVD 432

جدول ۲ - توزیع فراوانی اشرشیا کلی انترواگریگیتیو در مدفوع بیماران مورد مطالعه بر حسب فصل، سن و جنس

ژنوم EAggEC			مثبت	منفی
			(درصد) تعداد	(درصد) تعداد
عوامل مورد بررسی				
فصل	Pvalue =0.7	بهار	۱(۱/۸٪)	۵۴(۹۸/۳٪)
		تابستان	۱۱(۵/۳٪)	۱۹۶(۹۴/۷٪)
		پاییز	۴(۴/۳٪)	۹۲(۹۵/۸٪)
		زمستان	۴(۴/۱٪)	۹۴(۹۵/۹٪)
سن	Pvalue =0.26	≤۱	۹(۴۵٪)	۱۱۰(۲۵/۳٪)
		۲-۵	۸(۴۰٪)	۲۱۵(۴۹/۴٪)
		۶-۱۲	۲(۱۰٪)	۶۹(۱۵/۹٪)
		≥۱۲	۱(۵٪)	۴۱(۹/۴٪)
جنس	Pvalue =0.1	مذکر	۸(۴۰٪)	۲۴۷(۵۶/۸٪)
		مونث	۱۲(۶۰٪)	۱۸۸(۴۳/۲٪)

جدول ۳ - توزیع فراوانی برخی از علائم بالینی در افراد مبتلا به EAggEC و افراد غیر مبتلا

علائم	تب		دل پیچه		استفراغ		تهوع		سرگیجه	
	دارد	ندارد	دارد	ندارد	دارد	ندارد	دارد	ندارد	دارد	ندارد
ژنوم EAggEC	۱۲	۸	۱۰	۱۰	۵	۱۵	۲	۱۸	۱	۱۹
مثبت	(۶۰٪)	(۴۰٪)	(۵۰٪)	(۵۰٪)	(۲۵٪)	(۷۵٪)	(۱۰٪)	(۹۰٪)	(۵٪)	(۹۵٪)
منفی	۲۸۵	۱۵۰	۲۷۰	۱۶۵	۱۰۷	۳۲۸	۱۲۵	۳۱۰	۳۴	۴۰۱
	(۶۵/۵٪)	(۳۴/۵٪)	(۶۳٪)	(۳۸٪)	(۲۴/۶٪)	(۷۵/۴٪)	(۲۸/۷٪)	(۷۱/۳٪)	(۷/۸٪)	(۹۲/۳٪)
جمع	۲۹۷	۱۵۸	۲۸۰	۱۷۵	۱۱۲	۳۴۳	۱۲۷	۳۲۸	۳۵	۴۲۰
	(۶۵/۳٪)	(۳۴/۷٪)	(۶۱/۵٪)	(۳۸/۵٪)	(۲۴/۶٪)	(۷۵/۴٪)	(۲۷/۹٪)	(۷۲/۱٪)	(۷/۷٪)	(۹۲/۳٪)
Pvalue	۰/۳		۰/۴		۰/۵		۰/۰۶		۰/۵	

۴/۴٪ است. در حالی که شیوع EAggEC در کودکان با اسهال حاد در فلانند ۱/۱٪ (۱۳)، در سوئد ۲٪ و در انگلستان ۲/۷٪ بوده است (۱۲-۱۴). مطالعه ای در تابستان ۱۳۸۲ در شهر همدان نشان داد که از ۱۴۴ مورد اسهالی، ۱۰ بیمار (۷٪) و در تایوان از ۱۵۰ سوش E.coli جدا شده از کودکان اسهالی زیر ۵ سال، ۱۳ بیمار (۸/۷٪) مبتلا به EAggEC بودند (۱۵، ۱۶).

نمونه های مدفوع افرادی که در آن ژنوم EAggEC وجود داشت، سالمونلا و شیگلا یافت نشد. (نتایج ارائه نشده است)

بحث

این تحقیق نشان داد که سهم باکتری E.coli اسهال را انترواگریگیتیو در مبتلایان به اسهال حاد، در شهر گرگان

مطالعات صورت گرفته نشان می دهند که، تفاوت های زیادی در شیوع EAggEC بین گروه های سنی مختلف وجود دارد.

در گابن نیز محدوده سنی نمونه های مثبت بین ۶ ماه تا ۲ سال بود (۲۱). بررسی ما مشابه سایر تحقیقات، تفاوت معنی داری را در توزیع EAggEC بین دو جنس مرد و زن نشان نداد. اگرچه در این مطالعه دختران بیش از پسران با این بیماری درگیر بودند. بیشترین شیوع اشرشیا کلی انترواگریگیتو در فصل تابستان دیده شد که با مطالعه صورت گرفته در همدان همخوانی دارد (۱۵).

بارزترین علائم بالینی در این مطالعه به ترتیب، تب، دل پیچه و استفراغ بود. همچنین نوع مدفوع شل و آبکی، که در ۱۵٪ موارد خون نیز در آن مشاهده شد. در ورامین بیشترین علائم رایج ضعف و درد شکم بود و بعد از آن تب، تهوع و استفراغ آمار بالایی داشتند. نوع اسهال نیز در ۵۶٪ آبکی و در ۱۱٪ نیز خونی بود (۲۱). در مطالعه ای هم که در ونزوئلا اجرا شد، بارزترین علائم، مربوط به استفراغ و تب بود (۲۷). همچنین در سوئیس، استفراغ در بیش از نیمی از مبتلایان به EAggEC مشاهده شد (۱۷).

نتیجه گیری

بر اساس یافته های این تحقیق مشخص گردید که اشرشیا کلی انترواگریگیتو در ۴/۴٪ از موارد اسهالی در شهر گرگان وجود دارد، شیوع آن در تابستان و در کودکان زیر ۵ سال بیشتر است. به همین دلیل پیشنهاد می شود پزشکان و بویژه مسئولین آزمایشگاهها نسبت به تشخیص آن با روش PCR بویژه در مواردی که عامل بیماریزای دیگری جدا نمی شود توجه بیشتری مبذول دارند.

شیوع EAggEC در کودکان با اسهال حاد در مطالعه ای در سوئیس ۱۰/۲ درصد گزارش شده است (۱۷). همچنین نتایج مطالعاتی که در تایلند بر روی ۲۱۰۰ کودک کمتر از ۱۲ سال با اسهال حاد و در تانزانیا بر روی ۲۸۰ کودک زیر ۵ سال انجام شده است به ترتیب جداسازی ۱۰/۲ و ۱۴/۶ درصد EAggEC را نشان می دهد (۱۸ و ۱۹). بررسی هایی در تهران در سالهای ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ بر روی ۱۰۸۵ نمونه اسهالی با روش مولکولی نشان داد که، ۱۶/۳٪ افراد واجد سویه مورد نظر بودند (۱۹). همچنین یک بررسی در شهر ورامین طی یک سال، شیوع ۱۶٪ EAggEC را نشان داد (۲۰). از طرفی در مطالعاتی که در کشورهای گابن، مکزیک و برزیل صورت گرفت این میزان به ترتیب ۳۸، ۲۰ و ۲۰ درصد گزارش شد که حکایت از شیوع بیشتر این میکروارگانیسم در کشورهای در حال توسعه دارد (۲۰ و ۲۲ و ۲۳). این مطالعات نشان می دهد که توزیع سویه انترواگریگیتو در نقاط مختلف جهان متفاوت بوده و در شهر گرگان میزان شیوع آن پایین است. وجود تفاوت های بهداشتی، فرهنگی، شرایط اجتماعی، اقتصادی و موقعیت جغرافیایی از دلایل این تفاوت در نقاط مختلف دنیا می تواند باشد (۴). یکی از نکاتی که در مورد بیماریزایی EAggEC هنوز اختلاف نظر در آن وجود دارد، وجود سویه هایی است که منجر به بروز بیماری نمی شوند، عده ای از محققین معتقدند ممکن است از افراد سالم نیز این باکتری جدا شود. مثلاً در مکزیک، ۵۱٪ از افراد اسهالی به این باکتری آلوده بوده، در مقابل، ۵٪ از افراد سالم نیز ناقل این باکتری بودند (۲۴). مطالعه ما نشان داد که در ۴ مورد از بیماران علاوه بر ژنوم EAggEC، سویه انتروتوکسیژنیک نیز یافت شد (نتایج ارائه نشده) ولی در بقیه موارد، عفونت با سایر پاتوژنها مشاهده نگردید.

از لحاظ سنی بیشترین شیوع این سویه در کودکان زیر ۵ سال بود که در بین آنها کودکان زیر یکسال بیشترین آمار (۴۵٪) را به خود اختصاص دادند، اما از نظر آنالیز های آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در تایلند، بیشترین فراوانی بیماری در کودکان زیر یکسال (۳۷/۵٪) گزارش شد (۱۸)، که به نتایج ما بسیار نزدیک است. در نیجریه و کلکته نیز مطالعاتی بر روی کودکان زیر ۵ سال اجرا شده بود که بیشترین توزیع فراوانی به ترتیب مربوط به کودکان بالای ۵ ماه و زیر ۳ سال بوده است (۲۵ و ۲۶).

References

- 1- Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Longeland N. *Identification of diarrheagenic Escherichia coli isolated from Infants and children in Dar es salam, Tanzania*. BMC Infectious Diseases. 2007; 7:(92). 1471-2334.
- 2- Guerrant R L, Steiner T S. *Principles and Syndromes of Enteric infection*. Chapter 89. *Gastrointestinal infection and food poisoning*. Section. Mandell GL, Benney JE, Dolin R: Principles and practice of infectious diseases. Vol 2. 6th Edition. ELSEVIER Churchill Livingstone. 2005. 1215_1231.
- 3- Abbasi A, Yoosefi MR. *The study of effective factors on persisted diarrhea in under five year old children Gorgan and Agh-Ghala health center*. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2002;10(4): 41-36
- 4- Borjian S. *The common causes of bacterial diarrhea in children aged below 2 years in Borujen Hospital*. Shahrekord University of Medical Sciences Journal. 1999; 1(1): 20-13
- 5- Wani SA, Pandit F, Samanta I, Bhat MA, and Buchh AS. *Molecular epidemiology of shiga toxin- producing Escherichia coli in India*. Current science Review article. 2004; Vol 87:25(10). 1345- 1353.
- 6- Feng P, Lampel K A. *Genetic analysis of uid A expression in Enterohemorrhagic Escherichia coli serotype O157: H7*. Microbiology, 1994; 140: 2101-2107.
- 7- Czczulin JR, Whittam TS, Handerson IR, Nawarro Garcia F, and Nataro J P. *Phylogenetic analysis of Enteraggregative and diffusely adherent Escherichia coli*. J Infect and Immun, 1999; 67(6) : 2692-99.
- 8- Huang DB, Mohanty A, DuPont H L, Okhuysen P C and Chiang T. *A review an emerging enteric pathogen : enteraggregative Escherichia coli*. Jurnal of Medicin Microbiology. 2006; 55: 1303-1311.
- 9- Nataro JP, Steiner T and Guerrant RL. *Enteraggregative Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 1998; 4(2): 251-261.
- 10- Sears CL and Kaper JB. *Enteric Bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. Microbiol Rev 1992; 167-215.
- 11- Miller SA, Dykes DD, Polsky HF. *A simply salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acid Res. 1988: 1215-16.
- 12- Bo S, Asa L, Erik E, Birgitta E, Kjell OH, Anders K, Sven L, Lennart S, and Andrej W. *Enteropathogens in adult patient with diarrhea and healthy control subject : A 1-year prospective in Swedish for infectious diseases*. Clinical Infectious Disease. 2000; 30: 770-78.
- 13- Keskimäki M, Eklund M, Pesonen H, Heiskanen T, Siitonen A. *EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates*. Diag. Microbiol Infect Dis. 2001; 40(4): 151-6.
- 14- Law D, and Chart H. *Enteraggregative Escherichia coli* (Review). Jurnal of Applied Microbiology 1998; 84: 685-697.
- 15- Alizadeh A H M, Behrouz N, Salmazadeh S, Ranjbar M, Azimian M H, Habibi E et al. *Escherichia coli, Shigella and Salmonella species in acute diarrhoea in Hamedan, Islamic Republic of Iran*. East Mediterr Health J. ;13 (2):243-9
- 16- Teng LJ, Hsueh PR, Liaw S, Ho S, Tsai J. *Genetic detection of diarrheagenic Escherichia coli isolated from children with sporadic diarrhea*. J Microbiol Immunol Infect. 2004; 37: 327-334
- 17- Porat WL, Altwegg M, Kind C, Mirianic S, Hardegger D, Nadal D. *Prevalence of enteroaggregative Escherichia coli among children with and without diarrhea in Switzerland*. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2289-93.
- 18- Rotchtrachenchia O A, Subpasu S, Hayashi H. *Prevalence of childhood diarrhea- associated Escherichia coli in Thailand*. Gmed Microbiol. 2004.(53) : 237-243 .
- 19- Jafari F, Salmazadeh Ahrabi S, M Aslani M, Baghbani- Arani F, Azimi-rad M, Zali MR. *Molecular epidemiology of diarrheagenic E.coli in children acute diarrhea in Tehran, Iran and the antibiotic susceptibility of isolated*. 16th European congress of clinical microbiology and infectious diseases, Nice, France, April 1-4 2006. www.blackwell publishing .com/eccmid 16/abstract. Asp?id=50479.
- 20- Rezaie Homani M, Salmazadeh Ahrabi S, Moez Ardalan K, Habibi E, Edalatkhah H, Jafari F, et al. *Epidemiology of bacterial-induced acute diarrhea in Varamin*. Pejouhandeh Quarterly Research Journal. 2004;7(8): 474-467
- 21- Presterl E, Zwick RH, Reichman S, Aichelburg A, Winkler S, Kremsner PG et al. *Frequency and virulence properties of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Gabon*. Am J Trop Med Hyg. 2003; 69(4) : 406-10 .
- 22- Mothewson JJ, Oberhelman RA, Dupont HL, Garibay EV. *Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico*. J Clin Microbiol. 1987; 25(10) :1917- 19 .
- 23- Tornieporth NG, John J, Salgado K, De Jesus P, et al. *Differentiation of pathogenic Escherichia coli strains in Brazilian children by PCR*. J Clin Microbiol, 1995; 33(5) : 1371-4 .
- 24- Smith HR, Cheasty T. *Diarrheal Diseases due to E.coli and Aeromonas*. Chapter 27. In Topoley and Wilson's microbiology and microbial infections. Vol3 9th edition by Collier L, Balows A. Sussman M. Pub by Arnold 1998; P: 522-523.
- 25- Dutta S, Pal S, Chakrabarti S, Dutta P and Manna B. *Use of PCR to identify enteroaggregative Escherichia coli as an important cause of acute diarrhea among children in Calcutta, India*. J of Medicin Microbiology. 48; 11: 1011-1016.
- 26- Okeke IN, Lamikanra A, Czczulin J, Dubovsky F, Kaper J B, and Nataro J P. *Heterogenous virulence of enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from children in south west Nigeria*. Journal Infect Dis. 2000; 181: 252-260 .
- 27- Huang DB, Mohanty A, DuPont H L, Okhuysen P C and Chiang T. *A review an emerging enteric pathogen : enteraggregative Escherichia coli*. of Medicin Microbiology. 2006; 55: 1303-1311.