Archive of SID

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۸ آذر و دی ۱۳۹۲، صفحات ۱۲۰ تا ۱۲۷

# فراوانی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک حامل ژن‌های *est A* و *elt B* در نمونه‌های اسهالی کودکان زیر پنج سال مراجعه کننده به بیمارستان‌های تبریز

**مهدی کاشفیه[۱]، دکتر حبیب ضیغمی[۲]، دکتر فخری حقی[۲]**

**نویسنده‌ی مسوول**: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروب شناسی zeighami@zums.ac.ir

دریافت: ۹۲/۱/۱۷ پذیرش: ۹۲/۵/۲۹

## چکیده

***زمینه و هدف:*** *اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) یکی از عوامل اصلی اسهال آبکی در کودکان زیر ۵ سال در کـشورهای در حـال توسـعه است. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک حامل ژن‌های eltB,estA در کودکـان اسـهالی زیـر ۵ سـال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر تبریز بود.*

***روش بررسی:*** *این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی و بر روی ٤٥٠ نمونه مدفوع اسهالی جمع‌آوری شده از کودکـان زیـر ۵ سـال در طـی مـدت هفت‌ماه انجام گرفت. پس از کشت و تایید ایزوله‌های اشریشیاکلی، DNA ایزوله‌ها استخراج و برای جستجوی حضور ژن‌های eltB, و estA و یافتن سویه‌های ETEC از روش Multiplex PCR استفاده شد.*

***یافته‌ها:*** *از مجموع ٤٥٠ نمونه‌ی مدفوع اسهالی، ۲۰۰ ایزوله اشریشیاکلی اسهال‌زا مورد شناسایی قرار گرفت. میزان فراوانی ایزوله‌های اشریشیاکلی اسهال‌زا ٤٤/٤٤ درصد بود. به منظور شناسایی ژن‌های eltB, estA به‌طور همزمان در یک واکنش PCR، مخلوطی از دو جفت پرایمر اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه‌ی حاضر از ۲۰۰ ایزولـه اشریـشیاکلی، ۷۵ ایزولـه (۳۷/۵ درصـد) ETEC مـورد شناسـایی قـرار گرفـت. از ایزوله‌های ETEC شناسایی شده، ٤۳ ایزوله (۲۱/۵ درصد) حامل ژن توکسین LT، ۲۱ ایزوله (۱۰/۵ درصد) حامل ژن توکسین ST و ۱۱ ایزوله (۵/۵ درصد) حامل ژن‌های هر دو توکسین بودند.*

***نتیجه‌گیری:*** *با توجه به توزیع فراوانی سویه‌های انتروتوکسیژنیک در شهر تبریز به خصوص در جمعیت کودکان زیر ۵ سال توصـیه مـی‌شـود در آزمایشگاه‌های تشخیصی از روش‌های مولکولی که در مقایسه با روش‌های کلاسیک (کشت و سرولوژی) سریع‌تر و مطمـئن‌تـر هـستند، اسـتفاده گردد.*

***واژگان کلیدی: اسهال، اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، eltB, estA***

## مقدمه

اسهال یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در بین نوزادان و کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد؛ به‌طـوری‌کـه سالانه حدود ۲ میلیـون مـورد مـرگ کودکـان در ایـن منـاطق گزارش می‌گـردد (۱،۲). سـازمان جهـانی بهداشـت (WHO) اسهال را به صورت دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل سه مرتبـه در یـک دوره ٢٤ سـاعته تعریـف کـرده اسـت. اسـهال حـاد

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

شدیدترین نوع اسهال بوده و توسط بسیاری از عوامل ویروسی، باکتریایی و انگلی ایجاد می‌شود (۳). در کشورهای در حال توسعه، سویه‌های *اشریشیاکلی* اسهال‌زا عامل اصلی اسهال باکتریایی در بین کودکان بوده، به‌عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در این جوامع به‌شمار می‌آید (٤). با توجه به‌اینکه سویه‌های *اشریشیاکلی* یکی از اجزای اصلی میکروفلور نرمال روده هستند، شناسایی سویه‌های اسهال‌زا از میکروفلور نرمال نیازمند انجام تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بر اساس شاخص‌های بیماریزایی می‌باشد (۵). سویه‌های *اشریشیاکلی اسهال‌زا* (DEC) بر اساس ویژگی‌های کلینیکی، اپیدمیولوژیکی و شاخص‌های بیماریزایی به شش دسته تقسیم شده‌اند که شامل انتروتوکسیژنیک (ETEC)، انتروپاتوژنیک (EPEC)، انتروواینویزیو (EIEC)، انتروهموراژیک (EHEC)، انترواگریگیتیو (EAEC) و دیفیوزلی ادهرنت (DAEC) می‌باشد (۷و ٦). *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC)، سویه‌هایی هستند که قابلیت تولید حداقل یکی از دو نوع انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) یا مقاوم به حرارت (ST) را دارند (۸). این سویه‌ها، عامل شایع اسهال آبکی در نوزادان مبتلا به سوء تغذیه و مسافران بوده، اغلب از طریق مصرف آب یا غذاهای آلوده به مدفوع کسب می‌شوند. شروع علایم به‌صورت ناگهانی و معمولا به شکل اسهال آبکی بدون وجود خون و مخاط می باشد و در اکثر موارد تب مشاهده نمی‌شود. باکتری‌ها با واسطه‌ی پیلی در ابتدای روده باریک کلونیزه شده و توکسین‌های LT یا ST و یا هر دو را تولید می‌کنند. توکسین‌ها با افزایش دفع مایعات و الکترولیت‌ها، اسهال آبکی ایجاد می‌کنند (۱۲-۹). در کشورهای در حال توسعه، *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC)، به‌عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد کننده‌ی اسهال عفونی در نوزادان و کودکان کمتر از ۵ سال در نظر گرفته می‌شود (۳). امروزه با مجهز شدن آزمایشگاه‌ها حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد عوامل اتیولوژیک اسهال قابل شناسایی بوده و با بهبود امکانات بهداشتی و مراقبتی و هم‌چنین تشخیص به هنگام می‌توان تا حد زیادی از شیوع همه‌گیری‌ها جلوگیری نمود. با توجه به اختصاصیت روش PCR، راه اندازی روش‌های مولکولی در جهت شناسایی میکروارگانیسم‌های بیماریزا در نمونه‌های بالینی و محیطی منجر به اطمینان از تشخیص و افزایش سطح بهداشت عمومی جامعه می‌گردد (۱۳). هدف از این تحقیق، شناسایی سویه‌های *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک حامل ژن‌های *eltB* و *estA* از نمونه‌های مدفوع کودکان زیر پنج سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی و درمانی شهر تبریز بود.

## روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی نمونه‌های مدفوع ٤٥٠ نفر از کودکان مبتلا به اسهال زیر پنج سال مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر تبریز از فروردین تا آخر مهرماه سال ۹۱ به مدت هفت ماه جمع‌آوری گردید. برای هر فرد، پرسشنامه‌ای حاوی اطلاعات شخصی و سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک تکمیل شد. نمونه‌های مدفوع پس از بررسی میکروسکوپی، در محیط‌های مک‌کانکی و EMB آگار کشت داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت پلیت‌ها از نظر وجود کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* مورد بررسی و جهت تایید قطعی ایزوله‌ها، تست‌های افتراقی (تست‌های تولید اندول، TSI، MR، VP و سیترات) انجام شد. سویه‌های جمع‌آوری شده تا زمان انجام PCR در محیط TSB حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و در۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج DNA و انجام PCR برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ابتدا DNA ایزوله‌های *اشریشیاکلی* با روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید. از سویه‌ی *اشریشیاکلی* حامل ژن‌های *eltB, estA* تهیه شده از گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.


www.SID.ir

Archive of SID

توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۳ میکرولیتر Complete Buffer 10x، ۱/۵ میکرولیتر dNTP۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر۱۰ پیکومول از هرکدام (F,R)، ٤ میکرولیترآنزیم Taq DNA Polymerase (۰/۵U/µl)، ۷ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت Pmol/µl ۵۰ و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در طی ۳۰ سیکل، تحت برنامه‌ی زمانی ترموسایکلر زیر انجام شد: مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه بود. پس از انجام PCR، ژل آگارز ۱/۵ درصد جهت الکتروفورز محصول PCR مورد استفاده قرار گرفت و قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از مارکر ۱۰۰bp Ladder Fermentase ارزیابی شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون T-Test استفاده شد.

## یافته‌ها

از بین ٤۵۰ نمونه‌ی مدفوع اسهالی، ۲۸۳ (۶۲/۸ درصد) نمونه از کودکان پسر و ۱۶۷ (۳۷/۲ درصد) نمونه از کودکان دختر زیر ۵ سال جمع‌آوری شد. از مجموع ٤۵۰ نمونه، ۲۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* اسهال‌زا مورد شناسایی قرار گرفت. میزان فراوانی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* اسهال‌زا ٤٤/٤٤ درصد بود. به‌منظور دست یافتن به الگوی شیوع باکتری در منطقه براساس سن، کودکان اسهالی به گروه‌های سنی ۱۲-۰ ماه، ۲٤-۱۳ ماه، ۳۶-۲۵ ماه، ٤۸-۳۷ ماه و ۶۰-٤۹ ماهه تقسیم گردیدند. فراوانی *اشریشیاکلی* اسهال زا در گروه‌های سنی فوق، به ترتیب ۲۱، ۲۷، ۱۸/۵۶، ۱۱/٤٤ و ۲۲ درصد بود. به منظور شناسایی ژن‌های ***eltB, estA*** به‌طور همزمان در یک واکنش PCR مخلوطی از دو جفت پرایمر اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت.

*جدول ۱:* ***پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص ژن‌های eltB و estA***

| ***نام ژن*** | توالی نوکلئوتیدی | اندازه محصول |
|---|---|---|
| *eltB* (F) | 5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3' | ۳۲۲ bp |
| *eltB* (R) | 5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3' | |
| *estA* (F) | 5'-GTCAAACCAGTA(G/A)GGTCTTCAAAA-3' | ۱٤۷ bp |
| *estA* (R) | ۵'-CCCGGTACA(G/A)GGAGGATTACAACA-۳' | |

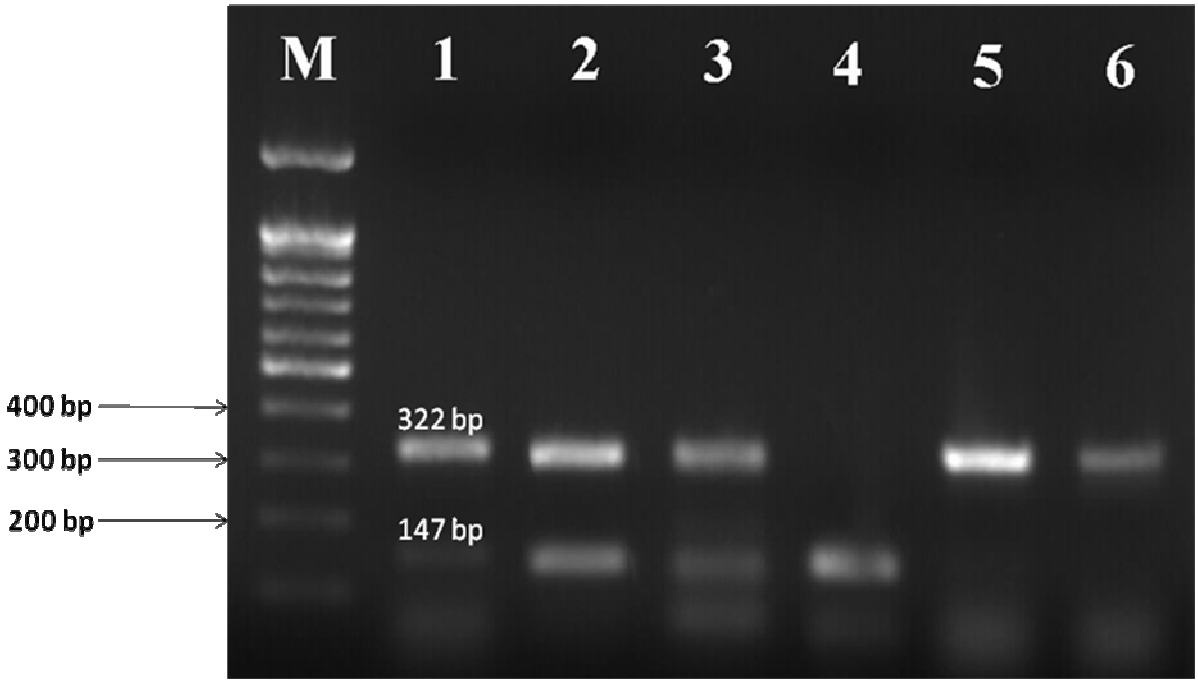
***جدول ۲: فراوانی ایزوله‌های ETEC حامل ژن‌های eltB و estA در گروه‌های سنی مختلف***

| ***ژن توکسین*** | ***گروه ۱۲-۰ ماه*** | ***گروه ۲٤-۱۳ ماه*** | ***گروه ۳۶-۲۵ ماه*** | ***گروه ٤۸-۳۷ ماه*** | ***گروه ۶۰-٤۹ ماه*** |
|---|---|---|---|---|---|
| *فقط ژن eltB* | ۹ | ۱٤ | ۸ | ۵ | ۷ |
| *فقط ژنestA* | ۲ | ۱۱ | ٤ | ۱ | ۳ |
| *estA+eltB* | ۲ | ۵ | ۱ | ۱ | ۲ |


www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱ نشان دهنده‌ی تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر در واکنش Multiplex PCR می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر از ۲۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی*، ۷۵ ایزوله (۳۷/۵ درصد) ETEC مورد شناسایی قرار گرفت. از ایزوله‌های ETEC شناسایی شده، ۴۳ (۲۱/۵ درصد) ایزوله حامل ژن توکسین LT، ۲۱ (۱۰/۵ درصد) ایزوله حامل ژن توکسین ST و ۱۱ (۵/۵ درصد) ایزوله حامل ژن‌های هر دو توکسین بودند. فراوانی ایزوله‌های ETEC حامل ژن‌های *eltB* و *estA* در گروه‌های سنی مختلف، در جدول ۲ آورده شده است.




***شکل ۱: محصول Multiplex PCR سویه استاندارد و ایزوله‌های بالینی بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون M: مارکر DNA (۱۰۰ bp). ستون ۲: سویه استاندارد واجد هر دو ژن elt B و est A . ستون‌های ۱ و ۳: ایزوله‌های واجد هر دو ژن elt B و est A . ستون ٤: ایزوله واجد ژن est A و ستون‌های ٥ و ٦: ایزوله‌های واجد ژن elt B.***

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر، با راه اندازی روش Multiplex PCR و استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی ژن‌های *eltB* و *estA*، تشخیص سریع و همزمان ژن توکسین‌های LT و ST فراهم شد. فراوانی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* اسهال‌زا، ٤٤/٤٤ درصد بود. بیشترین شیوع ETEC درمیان کودکان زیر ۵ سال مربوط به گروه ٢٤-١٣ ماهه (۲۷ درصد) بود. بارزترین علایم بالینی در این مطالعه شامل دل‌پیچه و استفراغ و در تعداد کمی از مراجعه‌کنندگان تب نیز وجود داشت. هم‌چنین در تمامی موارد نمونه‌ی مدفوع به‌صورت اسهال آبکی بود. نتایج این مطالعه نشان داد، سهم باکتری *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک در مبتلایان به اسهال در شهر تبریز برای توکسین LT ۳۳ درصد (٦٦ مورد)، ST ١٦/٥ درصد (۳۳ مورد) و برای LT+ST ۱۲درصد (٢٤ مورد) است. شیوع *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک در مناطق مختلف جهان متفاوت می‌باشد در بسیاری از مطالعات انجام شده در کشورهای در حال توسعه،


www.SID.ir

Archive of SID

ETEC مهم‌ترین عامل اسهال حاد در بین کودکان زیر ۵ سال می‌باشد (۸). مشابه مطالعه‌ی انجام شده در برزیل و بسیاری از کشورهای دیگر، ETEC فراوان‌ترین پاتوتیپ ایزوله شده در کودکان اسهالی می‌باشد (۱٤، ۲). فراوانی ETEC (۳۷/۵ درصد) در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با مطالعات انجام شده توسط مایاتپک و همکارانش (۲۸ درصد)، نویز و همکارانش (۲۱/٦ درصد) و ویلچز و همکارانش (۲۰ درصد) بالاتر می‌باشد (۱۵و ۲). در مطالعه‌ای مشابه در کشور نیکاراگوآ ۳۸ درصد از ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مورد بررسی حامل ژن توکسین‌های مربوط به ETEC بودند که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی ما همخوانی داشت (۱٦). الیزابت و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ در گابن، از میان ۱۵۰ نمونه اسهالی مورد بررسی، ۷ (٤/٦٦ درصد) ایزوله ETEC شناسایی کردند که در مقایسه با مطالعه حاضر فراوانی ایزوله‌ها بسیار کمتر می‌باشد (۱۷). نگوین و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای از میان۱۳۲مورد اسهال ناشی از سویه‌های *اشریشیاکلی در بین کودکان زیر پنج سال در ویتنام*، نشان دادند که ۱۳ مورد (۲/۲ درصد) مربوط به سویه‌های ETEC می‌باشد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین فراوانی ETEC در گروه سنی ۱۳ تا ۲٤ ماهه از کودکان اسهالی دیده شد، هر چند ایزوله‌های ETEC در سایر گروه‌های سنی نیز با اختلاف کمتر شناسایی شدند. بهر حال در مطالعه‌ی انجام شده در کشور ویتنام، فراوانی ETEC در کودکان زیر یک‌سال بسیار بیشتر از کودکان بزرگتر بود (۱۸). هم‌چنین نتایج مطالعاتی که در کشور مصر بروی ۲۰۰ نمونه‌ی مدفوع اسهالی انجام گرفت، نشان داد ۸ درصد (۱٦ مورد) از ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداشده مربوط به ETEC می باشد (۱۹). در مطالعه‌ای در کشور تایوان، از ۲٦۱ نمونه‌ی اسهالی مورد بررسی، ٦٦/۷ درصد ایزوله‌ها حامل ژن توکسین‌های مربوط به ETEC بودند که نشان دهنده‌ی فراوانی بالای توکسین‌های فوق در این کشور می‌باشد (۲۰). در تونس از ۱۱۵ مورد اسهالی ۳۲/۳ درصد حامل ژن مربوط به توکسین‌های ETEC بود که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه ما همخوانی داشت (۲۱). سهند و همکارانش در کشور عراق نشان دادند از ۵۰ نمونه اسهالی مورد مطالعه ۲٦/۳ درصد (۵ مورد) حامل ژن توکسین‌های ETEC بود (۲۲).

یکی از نکاتی که در مورد بیماری‌زاییETEC هنوز اختلاف نظر وجود دارد حضور سویه‌هایی است که منجر به بروز بیماری نمی‌شوند. عده‌ای از محققین براین باورند که این سویه‌ها ممکن است از افراد سالم نیز جدا گردند. همان‌طور که در مطالعه‌ی انجام شده در نیکاراگوآ، ۲۰/۵ درصد از افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل نیز حامل ژن‌های مربوط به *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک بودند (۲)؛ در حالی‌که در مطالعات دیگر میزان حامل بودن افراد سالم با *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک صفر یا بسیار پایین‌تر می‌باشد (۲٤، ۲۳، ۱۸). در مورد علل بیماری‌های اسهالی در بین کشورهای در حال توسعه مخصوصا در بین کودکان با سنین پایین می‌توان کمبود دسترسی به امکانات بهداشتی و درمانی، عدم توجه به بهداشت دست‌ها و مواد غذایی، نبود سیستم صحیح تصفیه آب و فاضلاب شهری و روستایی و نبود امکانات آموزشی مناسب در این زمینه را نام برد (۲٦ و ۲۵).

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد میزان فراوانی *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک ۳۷/۵ درصد بود که از این میان ٦٦ ایزوله حامل ژن توکسین LT، ۳۳ ایزوله حامل ژن توکسین ST و ۲٤ ایزوله حامل ژن‌های هر دو توکسین بودند. با توجه به شیوع بالای موارد اسهال در بین کودکان، پیشنهاد می‌شود پزشکان و به‌ویژه مسوولین محترم آزمایشگاه‌ها از روش PCR جهت شناسایی پاتوتایپ‌های *اشریشیاکلی* و تشخیص سریع توکسین‌های این سویه‌ها، استفاده نمایند.


www.SID.ir

Archive of SID

## References


1- Mary A, Chikwelu L, Sandeep D, Kamaldeen AB. Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathog*. 2011; 3: 3-9.

2- Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintrau A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Leo´n, Nicaragua. *J Med Microbiol*. 2009; 58: 630-637.

3- Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2008; 86: 710-7.

4- Nataro JP, Mai A. Diarrheagenic *Eschcrichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and Newhaven, Connecticut. *Clin Infect Dis*. 2006; 43:402-407.

5- Taniuchi M, Walters CC, Gratz J, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella spp.* and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 73: 121-128.

6- Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 755-760.

7- Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 15: 155-68.

8- Dutta S, Guin S, Ghosh S, et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *PLOS ONE.* 2013; 8: e56068.

9- Okeke IN. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 3: 817-842.

10- Kagambèga A, Martikainen O, Lienemann T, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. *Int J Food Microbiol*. 2012; 153: 154-158.

11- Al- Kaissi EN, Makki M, Al-khoja M. Etiology and epidemiology of sever infantile diarrhea in Baghdad, Iraq. *Eur J Sci Res.* 2006; 14: 359-371.

12- Kyu-Heon K, Joon-IC, Chi-Yeun Ch, JongMi L. Development of Multiplex PCR assays to identify *Escherichia Coli* pathogenic genes in food. *Food sci Biotechnol.* 2010; 19: 1205-1210.

13- Tobias J, Vutukuru SR. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli. Microbiol Res*. 2012; 167: 564-570.

14- Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JRC, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect.* 2004; 48: 161-167.



www.SID.ir

Archive of SID

15- Nweze EI. Virulence properties of diarrheagenic *E. coli* and etiology of diarrhea in infants, young children and other age groups in southeast, nigeria. *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2009; 4: 173-179.

16- Paniagua M, Espinoza F, Ringman M, et al. Analysis of incidence of infection with entrotoxigenic *Escheriachia coli* in a prospective cohort study of Infant diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1404-10.

17- Elisabeth P, Palph HZ, Sonja R, et al. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69: 406-410.

18- Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 755-760.

19- Hala AR, Metwally E, Hoda AH, Marwa N, Athamna El and Maysa AA. Multiplex PCR for detection of diarrheagenic *Escherchia coli* in Egyptian children. *J Med Sci*. 2007; 2: 255-262.

20- Rong Yang J, Fang Tzy W, LaiTsai J, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real- time PCR to identify diarrheagenic *Escheriachia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3620-5.

21- Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Ben Haasen A, Ben Aissa R. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escheriachia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemilogy. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77: 571-582.

22- Sehand K, Arif Layla I, Salih F. Identification of different categories of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool sample by using multiples PCR technique. *Asian J Med Sci*. 2010; 2: 237-243.

23- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 839-844.

24- Fujihara S, Arikawa K, Aota T, Tanaka H, Nakamura H, Wada T, Hase A, Nishikaw Y. Prevalence and properties of DEC among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2009; 62: 318-323.

25- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, et al. Diarrhea in american infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25: 1-7.

26- Bii CC, Taguchi H, Ouko TT, Muita LW, Wamae N and Kamiya S. Detection of vivulence-related genes by multiplex PCR in multidrag-resistant diarrheagenic *Escheriachia coli* isolates from Kenya and Japan. *Epidemiol Infect*. 2005; 133: 627-633.


www.SID.ir

Archive of SID

# Frequency of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates Harboring *eltB* and *eltA* Genes in Diarrheal Specimens among Children Younger than 5 Years in Tabriz Hospitals

Kashefiyeh M[1], Zeighami H[2], Haghi F[2]

[1]Dept. of Microbiology, Faculty of Basic and Medical Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Iran

[2]Dept. of Microbiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

***Corresponding Author***: Zeighami H, Dept. of Microbiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

***E-mail:*** zeighami@zums.ac.ir

**Received:** 6 Apr 2013 **Accepted:** 20 Aug 2013

***Background and Objective:*** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) have been recognized as the most common cause of infectious diarrhea in infants and children less than five years in developing countries. The aim of the present study was to determine the frequency of ETEC isolates harboring *eltB* and *estA* genes among diarrheal children admitted to hospitals in Tabriz, Iran.

***Materials and Methods:*** In this cross sectional study, during the 7 month, a total of 450 stool samples of children younger than 5 years of age were studied. After culture and confirming, the DNA of *Escherichia coli* isolates were extracted by boiling method and multiplex PCR was done for detection of *estA*, *eltB* genes.

***Results:*** A total of 200 diarrheagenic *E. coli* strains were isolated from 450 stool samples from children with diarrhea. The prevalence of diarrheagenic *E. coli* isolated from stool samples was 44.44%. In order to detect *eltB*, *estA* genes simultaneously, a mixture of two primer pairs specific for the target genes was used in a single PCR. In our study, PCR assays detected 75 (37.5%) ETEC isolates. Of the ETEC strains isolated, 43 (21.5%) isolates produced heat labile toxin only, 11 (5.5%) produced heat-labile toxin and heat-stable toxin, and 21 (10.5%) produced heat stable toxin only.

***Conclusion:*** Due to the frequency distribution of enterotoxigenic isolates in Tabriz, particularly in children younger than 5 years of age, the use of molecular methods in diagnostic laboratories is recommended.

***Keywords: Diarrhea, Enterotoxigenic Escherichia coli, eltB, estA, PCR***


www.SID.ir