



شناسایی سویه‌های اشریشیاکلی حاوی ژن توکسین شیگا در نمونه‌های اسهال کودکان زیر ۵ سال

ابوالفضل اکبری^۱، دکتر محمدرضا پورمند^۲، فاطمه فرد صانعی^۳، نادیا مردانی^۴، دکتر محمد مهدی سلطان دلال^{۵*}

۳-۱- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴-۲- کارشناس میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- استاد میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۱۲

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی تولید کننده توکسین شیگا (STEC) از باکتری های نوظهور در کشورهای در حال توسعه می باشد که طیف متنوعی از بیماری ها از اسهال تا سندرم اورمی همولیتیک (HUS) را سبب می شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی این سویه ها در اسهال کودکان و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها بود.

روش بررسی: ۳۰۰ نمونه مدفوع از اسهال کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان علی اصغر (ع) شهر تهران جمع آوری و با کمک تست های باکتری شناسی گونه های اشریشیاکلی جداسازی شدند. وجود ژن های توکسین شیگا (stx1/2) با تکنیک PCR (Qiagen) مورد بررسی قرار گرفت. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک ۱۶ آنتی بیوتیک مختلف (MAST) صورت گرفت.

نتایج: از ۳۹ مورد اشریشیاکلی جدا شده، ۹ سویه (۲۳/۱٪) حاوی ژن توکسین شیگا بودند. ۴ (۴۴/۴٪) سویه الگوی مقاومت به چند دارو را نشان دادند و ۶ سویه (۶۶/۶٪) حداقل به یکی از آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند. سویه های اخیر همگی به کوتریموکسازول (SxT) مقاوم بودند.

نتیجه گیری: اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین (STEC) از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد اسهال بویژه در کودکان در کشور ما مطرح بوده و در عین نوظهور بودن این سویه ها، پیدایش سریع و روز افزون سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های کلاسیک نظیر کوتریموکسازول چندان دور از انتظار نمی باشد. لذا تشخیص دقیق این سویه ها و اصلاح برنامه تجویز آنتی بیوتیک ها در درمان اسهال ناشی از اشریشیاکلی پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی تولید کننده توکسین شیگا (STEC)، اسهال، کودکان، مقاومت آنتی بیوتیکی

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱۸۸۹۹۲۹۷۱؛ آدرس الکترونیکی: soltanirad34@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) که گاهی از آن تحت عنوان اشریشیاکلی تولید کننده توکسین شیکا (STEC) و یا اشریشیاکلی تولید کننده ورو توکسین (VTEC) یاد می‌شود به عنوان عامل اسهال خونی، کولیت هموراژیک (HC)، میکروآزتیوپاتی ترومبوتیک یا سندرم اورمیک هموراژیک (HUS) و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (TTP)، بویژه در بین کودکان، شناخته شده است. این عوارض در موارد شدیدتر می‌توانند حتی به مرگ منجر شوند (۱). از خصوصیات اصلی سویه‌های STEC، تولید توکسین‌های شیکای نوع یک یا دو STX1 و STX2 (یا وروتوکسین‌های VT1 و VT2) می‌باشد که مهمترین عامل در بیماری زایی شناخته شده‌اند. این توکسین‌ها به ترتیب توسط ژن‌های stx1 و stx2 رمزدهی می‌شوند (۱،۲). عفونت‌های انسانی STEC بعلت توانایی در ایجاد بیماری شدید در بسیاری از کشورها بعنوان مشکل بهداشت عمومی مد نظر قرار گرفته است، از این رو به پیشگیری از شیوع و گسترش این پاتوژن‌ها توجه ویژه‌ای معطوف داشته‌اند (۳).

یکی از عمده‌ترین مشکلات شناسایی EHEC این است که این سویه‌ها در بسیاری از خصوصیات مشابه سویه‌های کومنسال اشریشیاکلی (E.coli) می‌باشند. علاوه بر این، سویه‌های EHEC اغلب تعداد اندکی از کلی فرم‌های موجود در فلور طبیعی مدفوع بیماران را شامل می‌شوند (۳،۴). این ویژگی‌ها و در کنار آن عدم وجود تست‌های تشخیصی مناسب در آزمایشگاه‌ها موجب شده تا این سویه‌ها اغلب از نظر دور بمانند. تنها روش شناسایی دقیق تمام انواع سویه‌های EHEC، شناسایی ژن‌های رمزدهنده STX1 و STX2 یا ژن‌های دخیل در تولید آنها می‌باشد (۴،۵). اکثر روش‌های متداول جهت بررسی وجود سویه‌های EHEC در نمونه‌های غذایی و مدفوع شامل تکنیک‌های مبتنی بر DNA می‌باشند. تکنیک PCR بطور روز افزون و بعنوان یک روش بسیار حساس جهت شناسایی سویه‌های EHEC در نمونه‌های غذایی و مدفوع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵).

نظر به گسترش عفونت‌های انسانی ناشی از انواع سروتایپ‌های EHEC در کشورهای در حال توسعه و افزایش احتمالی مقاومت

آنتی‌بیوتیکی آنها، در راستای افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی سایر باکتری‌های بیماری‌زا و با توجه به عوارض شدیدی که این سویه‌ها در انسان بویژه کودکان موجب می‌شوند، اهمیت غربالگری آنها در اسهال و سایر عفونت‌های گوارشی واضح می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی این سویه‌ها در اسهال کودکان و انجام آزمون تعیین حساسیت آنتی‌میکروبی آنها در جهت درمان بموقع و مناسب بیماری و عدم پیشرفت عوارض آن انجام گرفت.

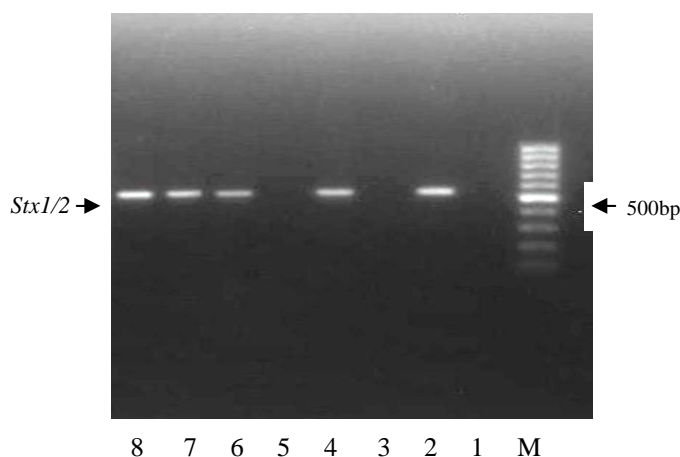
روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی طی مدت ۴ ماه (از فروردین تا تیرماه ۱۳۸۷)، ۳۰۰ نمونه مدفوع از اسهال کودکان زیر ۵ سال اعم از پسر یا دختر از بیمارستان علی اصغر (ع) شهر تهران به کمک سواب در محیط انتقالی کری-بلر جمع آوری و پس از ارسال به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، گونه‌های اشریشیاکلی با کمک کشت بر روی محیط هکتون انتریک آگار (MERCK) و انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد، جداسازی شدند. با توجه به شیوع ۴۰-۱۰ درصدی سویه‌های اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) در اسهال کودکان زیر ۵ سال در سرتاسر جهان، جهت تعیین حجم نمونه‌گیری در این مطالعه از معادله زیر استفاده و با پیش بینی شیوع ۲۵ درصدی سویه‌های اشریشیاکلی تا ۳۰۰ نمونه مدفوع جمع آوری شد:

$$n = \frac{(t) \cdot 2 \cdot (p)(q)}{d \cdot 2} = \frac{(1,96) \cdot 2 \cdot (0,25)(0,75)}{(0,05)^2} = 288$$

استخراج DNA از سویه‌های E.coli: ۵ کلونی از کشت ۲۰ ساعته اشریشیاکلی بر روی محیط نوترینت آگار، با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در میکروتیوب مخلوط شده و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۳ میکرولیتر از مایع رویی (Supernatant) سوسپانسیون اولتراسانتریفیوژ شده در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، به عنوان DNA الگو در آزمون PCR استفاده شد.

انتخاب جفت پرایمرها: در این مطالعه برای تکثیر ژن stx1/2 از جفت پرایمرهای Katia و همکاران (۶) استفاده شد تا در



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *stx1/2* (518bp)

شماره M مارکر وزن مولکولی (ladder) ۱۰۰۰ bp، شماره ۱ کنترل منفی، شماره ۲ E.coli ATCC 35218 کنترل مثبت و شماره‌های ۴ و ۶ و ۷ و ۸ نمونه‌های بالینی STEC در نهایت، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های STEC با تست آنتی‌بیوگرام و با استفاده از روش انتشار در دیسک کربی-بایر (براساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی) در مورد ۱۶ دیسک آنتی‌بیوتیکی مختلف (MAST) صورت گرفت (۷).

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول (SxT)، آموکسی سیلین (A)، تراسایکلین (TET)، سیروفلوکساسین (CIPR)، استرپتومايسين (S)، نالیدیکسیک اسید (NAL)، کلیستین سولفات (C)، سفوتاکسیم (CTX)، ایمی پنم (IMI)، مروپنم (MRP)، سفالکسین (CFX)، سفنازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CTR)، جنتامایسین (GEN) کلرامفنیکل (CO) و نیتروفورانئوئین (NI) بودند.

نتایج

۹ سویه از ۳۹ ایزوله اشیریشیاکلی (۲۳/۱٪) دارای ژن توکسین شیگا بودند و با تکنیک PCR به عنوان سویه‌های STEC مورد تأیید واقع شدند. ۵ سویه متعلق به پسر بچه‌ها و ۴ سویه متعلق به دختر بچه‌های زیر ۵ سال بودند که از این میان ۳ سویه مربوط به کودکان زیر ۱ سال و ۶ سویه مربوط به کودکان بالای ۱ سال بود.

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که یک سویه (۱/۱٪) به طور

صورت وجود یکی از توکسین‌های نوع یک یا دو، بتوان آنها را تنها در یک واکنش شناسایی کرد. محصول PCR ژن مورد نظر با این پرایمر، ۵۱۸ جفت باز بود. توالی جفت پرایمر مورد استفاده:

Stx1/stx2 F: 5-GAGCGAAATAATTTATATGTG-3

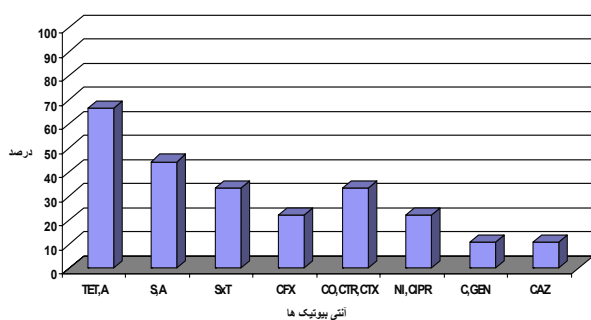
stx1/stx2 R: 5- TGATGATGGCAATTCAGTAT -3

تکنیک PCR: واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (حاوی ۴ میکرولیتر DNTP، ۳ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر MgCl₂ و ۰/۱ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase)، ۲/۵ میکرولیتر از Coral Load، ۵ میکرولیتر از آب مقطر free DNase (Qiagen)، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (فوروارد و ریورز) بود. مراحل برنامه تکثیر ژن *Stx1/2* در دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشت اولیه (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۵ چرخه شامل سه مرحله انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و بسط (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت.

در هر سری آزمایش، به منظور اطمینان از صحت روند کار و مواد واکنشگر و نیز بررسی ویژگی PCR، از سویه استاندارد E.coli ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل برای کنترل منفی استفاده شد.

الکتروفورز محصول PCR: ۵ میکرولیتر از محصول PCR

با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی ۵ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید در بافر تریس بورات-EDTA (TBE) ۰/۵X و با جریان ۸۰ ولت آشکارسازی شد. تعیین هویت باندهای حاصل به کمک مقایسه با مارکر وزن مولکولی (Ladder) یک کیلو باز انجام شد. تهیه عکس از ژل با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور (GelDoc 1000) در مجاورت نور (fluorescent imaging Bio-Rad system) صورت گرفت.



نمودار ۱: درصد سویه‌های STEC مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

کامل به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها حساس می‌باشد. این سویه از یک دختر بچه یک ساله جدا شد. تمامی سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم (IMI)، مروپنم (MRP)، نیتروفورانتوئین (NI) و جنتامایسین (GEN) حساس بودند. ۴ (۴۴/۴٪) سویه الگوی مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک را نشان دادند. سویه‌های اخیر همگی به کوتری موکسازول (SxT) مقاوم بودند. مشخصات این سویه‌ها در جدول ۱ آمده است. همچنین مشخص شد که ۶ سویه (۶۶/۶٪) حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند (نمودار ۱).

جدول ۱: مشخصات سویه‌های STEC مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک

شماره	جنس	سن	آنتی‌بیوتیک‌ها
۱	دختر	۱۰ ماه	SxT, C, NAL
۲	دختر	۲ سال	SxT, S, TET, CTX, CTR, CFX, A, CAZ
۳	دختر	۵ ماه	SxT, A, C, S
۴	پسر	۲ سال	SxT, NAL, S, CIP

بحث

کودکان زیر ۵ سال شهر تهران و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به منظور پیشگیری، اتخاذ برنامه‌های درمانی مناسب و تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر صورت گرفت.

با توجه به نتایج این مطالعه فراوانی STEC به عنوان عامل اسهال کودکان، ۳/۲٪ (۹/۲۷۸) گزارش گردید. به عبارت دیگر، از ۳۹ ایزوله باکتری اشریشیاکلی، ۹ سویه (۲۳/۱٪) STEC با تست PCR شناسایی شدند که از این ۹ سویه، ۶ سویه از کودکان دختر و ۳ سویه از کودکان پسر جدا شدند.

در ایران، در مطالعه نهائی و همکاران در تبریز فراوانی اشریشیاکلی انتروهموژنیک ۳/۳٪ گزارش شد (۸) که با مطالعه ما (۳/۲٪) همخوانی دارد. صادقی فرد و همکاران در ایلام فراوانی این سویه‌ها را ۱/۷٪ گزارش نمودند (۹). اکثر مطالعات کشورهای دیگر نیز حاکی از فراوانی اندک این سویه‌ها نسبت به سایر عوامل اسهال می‌باشند (۱۱، ۱۰). در مطالعه Bahia (۱۲) و Prerea (۱۳) فراوانی این سویه‌ها در کودکان به ترتیب ۰/۶٪ و ۱/۸٪ گزارش شد. با این حال به علت اهمیت بالینی این سویه‌ها و ظهور سویه‌های بیماری‌زای جدید بایستی مدنظر قرار گیرند.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اشریشیاکلی تولیدکننده شینگاتوکسین (STEC) می‌تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد اسهال بویژه در کودکان در کشور ما مطرح باشد که بایستی برای شناسایی آنها از تکنیک‌های جدید و مبتنی بر DNA بهره گرفت. شناسایی سویه‌های STEC در موارد اسهال باکتریایی و متعاقب آن، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها در کشور ما بویژه در جمعیت کودکان به چند دلیل ذیل می‌تواند حایز اهمیت زیادی باشد: ۱- پیدایش سروتایپ‌های بیماری‌زای جدید و در راستای آن مقاومت روزافزون این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک، ۲- عدم وجود تکنیک‌های تشخیصی مناسب و متداول جهت شناسایی دقیق سویه‌های تولیدکننده توکسین شینگا و تمایز آنها از میکروفلور طبیعی مدفوع و در نتیجه عدم توجه کافی به آنها، ۳- ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و عفونت‌ها و پیشرفت آنها به عوارض شدید سندرم اورمیک همولیتیک، کم‌خونی، نارسایی حاد کلیوی و حتی مرگ (۱).

در این راستا مطالعه ما با هدف شناسایی این سویه‌ها در

آنتی بیوتیک ها در تجویز آنها بیشتر مشخص می شود. با توجه به الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بدست آمده در این مطالعه به نظر می رسد برنامه درمان آنتی بیوتیکی در موارد اسهال ناشی از STEC بایستی اصلاح شود. بدیهی است که تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مستلزم بررسی سویه های بیشتری می باشد تا بتوان در این مورد به طور مطمئن تری قضاوت نمود که این مسئله انجام مطالعات گسترده تری را در سرتاسر کشور می طلبد.

نتیجه گیری

اشریشیا کلی تولیدکننده شیکاتوکسین (STEC) می تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در ایجاد اسهال بویژه در کودکان در کشور ما مطرح باشد که بایستی برای شناسایی آنها از تکنیک های نوینی بهره گرفت. همچنین در عین نوظهور بودن این سویه ها، پیدایش سریع و روز افزون سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های درمانی رایج و کلاسیک نظیر کوتری موکسازول چندان دور از انتظار نمی باشد. از این رو تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها در برنامه درمان و تجویز آنتی بیوتیک ها و بالطبع عدم پیدایش سویه های مقاوم در آینده بسیار کارآمد خواهد بود.

سپاسگزاری

مجریان طرح لازم می دانند تا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه های طرح را فراهم نمودند صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی شود. ضمناً این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۷۷۴۹ مورخ ۱۳۸۷/۱۱/۱۰ می باشد.

در کشور ما مطالعات معدودی در زمینه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های تولید کننده توکسین شیکا صورت گرفته است. در مطالعه نهائی حساسیت سویه های STEC به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفالکسین و سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ گزارش شد (۷). در حالیکه در مطالعه ما یک سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین و دو سویه مقاوم به سفالکسین مشاهده شدند که می تواند هشدار برای افزایش تدریجی این سویه ها به آنتی بیوتیک های جدید باشد. در مطالعه حاضر یک سویه مقاوم به سفنازیدیم، یک سویه مقاوم به سفتریاکسون و یک سویه مقاوم به سفوتاکسیم مشاهده شدند. از این رو می توان انتظار داشت تا در آینده ای نزدیک درصد سویه های مقاوم به این آنتی بیوتیک ها نیز افزایش یابد.

هر چند یک سویه (۱/۱۱٪) به طور کامل به تمامی آنتی بیوتیک ها و تمامی سویه ها به آنتی بیوتیک های ایمی پنم (IMI)، مروپنم (MRP)، نیتروفورانئوئین (NI) و جنتامایسین (GEN) حساس بودند اما (۴/۴۴٪) سویه، الگوی مقاومت به چند آنتی بیوتیک را نشان دادند. سویه های اخیر همگی به کوتری موکسازول (SXT) مقاوم بودند. از آنجایی که کوتری موکسازول از آنتی بیوتیک هایی می باشد که تا کنون به طور رایج جهت درمان عفونت های گوارشی ناشی از اکثر انتروباکتریاسه تجویز می شده است (۱۴)، نگرانی هایی در برنامه تجویز این آنتی بیوتیک در آینده پیش بینی می شود. همچنین گزارش شده است که این آنتی بیوتیک می تواند موجب افزایش تولید توکسین برخی سویه های STEC نظیر سروتایپ O157 شود، بنابراین استفاده از این آنتی بیوتیک در چنین مواردی می تواند حتی موجب تشدید بیماری شود (۱۴، ۱۵). از این رو ضرورت تست تعیین مقاومت به

منابع:

- 1- Christian WO, Bertil K. *Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)*. Scandinavian J Infec Dise 2005; 37: 405-16.
- 2- Nataro JP, Kaper JB. *Diarrhoeagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev . 1998;11:142-201.

- 3- Paton JC, Paton AW. *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 450-79.
- 4- Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, et al. *Comparison of a Shiga toxin enzyme linked immunosorbent assay and 2 types of PCR for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli in human stool specimens*. J Clin Microbiol 2003; 41:4671-5.
- 5- Welinder-Olsson C, Badenfors M, Cheasty T, Kjellin E, Kaijser B. *Genetic profiling of enter hemorrhagic Escherichia coli strains in relation to clonality and clinical signs of infection*. J Clin Microbiol 2002; 40: 959-64.
- 6- Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. *Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing Escherichia coli strains in Brazilian children*. FEMS Microbiol Lett 2007 Feb;267(2):145-50
- 7- Skov R, Frimodt-Moller N, Menday P, Espersen F. *Susceptibility testing of urinary isolates of Escherichia coli to mecillinam using NCCLS methodology*. Int J Antimicrob Agents 2005 Mar;25(3):198-204.
- 8- Nahaei MR, Akbari Dibavar M, Sadeghi J, Nikvash S. *Frequency of enterohaemorrhagic Escherichia coli isolated from patients with acute diarrhea in Tabriz hospitals*. Iranian J Medi Microbiol 2007; 1(3):39-46(Persian).
- 9- Sadeghifard NK, Aslani MM, Azizi Jalilian F, Sheikhian A. *Isolation, Verotoxin assay and serogrouping of Enterohemorrhagic E.coli (EHEC) strains in Ilam province*. J Shahid Sadoughi Uni Medi Sci Health Services 2002;10(1):48-53(Persian).
- 10- Olesen B, Neimann J, Bottiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, et al. *Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study*. J Clin Microbiol 2005; 43(8):3636-41.
- 11 Ji-Rong Y, Fang-Tzy W, Jin-Lai T, Jung-Jung M, Ling-Fen L, Kuang-Lo C, et al. *Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR to Identify Diarrheagenic Escherichia coli in Taiwan*. J Clin Microbiology 2007 Nov; 45(11):3620-5.
- 12- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franolin MR, Martinez MB et al. *Detection of diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007 Nov; 102(7):839-44.
- 13- Prerea MF, Cohen Bacriea S, Barona O. *Bacterial etiology of diarrhea in young children: high prevalence of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups*. Patho Bio 2006; 54: 600-2.
- 14- Strockbine NA, Margues LR, Holmes RK, Brien AD. *Characterization of monoclonal antibodies against shigalike toxin from Escherichia coli*. Infec and Immunity 1985; 50:695-700.

- 15- Karch H, Strockbine NA, O'Brien AD. *Growth of Escherichia coli in the presence of trimethoprim-sulphamethoxazole facilitates detection of shiga like toxin producing strains by colony blot assay*. FEMS Microbiol Letters 1986; 35:141-5.