

جداسازی سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (EIEC) از اسهال کودکان با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

ابوالفضل اکبری^۱، دکتر محمد رضا پورمند^۲، دکتر محمد کاظم شریفی یزدی^۳،
دکتر مصطفی حسینی^۴، دکتر محمد مهدی سلطان دلال^{۵*}

چکیده

زمینه و هدف: بیماری قلبی عروقی اولین عامل مرگ و میر در بزرگسالان بوده و افزایش کلسترول خون زمینه ساز ابتلاء به این بیماریهاست. هدف اصلی این مطالعه بررسی میزان شیوع هیپرکلسترولمی و ارتباط آن با الگوی تغذیه‌ای، شیوه زندگی و شاخص‌های تن سنجی است. سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (EIEC; Enteroinvasive Escherichia coli) دسته‌ای از پاتوتایپ‌های اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) بوده و به عنوان عامل اسهال خونی شبه شیگلا در کودکان و بالغین شناخته شده‌اند. این سویه‌ها به سروتایپ‌های محدودی تعلق داشته و آنتی ژن‌های سوماتیک (O) آنها مشابه آنتی ژن‌های شیگلاها می‌باشند. سویه‌های EIEC را می‌توان با بررسی وجود ژن آنتی ژن تهاجمی پلاسمیدی (*invasive plasmid antigen H; ipaH*) با آزمون مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مورد شناسایی قرار داد. از آنجایی که در کشور ما مطالعات چندانی در رابطه با تعیین فراوانی این سویه‌ها و بررسی اهمیت آنها صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه شناسایی این سویه‌ها با آزمون PCR در اسهال کودکان زیر ۵ سال شهر تهران بود.

روش بررسی: طی یک مطالعه توصیفی، ۳۰۰ نمونه مدفوع اسهالی مربوط به کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان علی اصغر (ع) و مرکز طبی کودکان شهر تهران جمع‌آوری شده و پس از ارسال به آزمایشگاه میکروب شناسی، سویه‌های اشریشیاکلی با کشت بر روی محیط کشت هکتون انتریک آگار و انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی جداسازی شدند. وجود ژن آنتی ژن تهاجمی پلاسمیدی (*invasive plasmid antigen H; ipaH*) در موارد کنتی‌های تایید شده سویه‌های اشریشیاکلی با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان ۳۰۰ نمونه اسهالی مورد بررسی با استفاده از روش کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی، ۳۹ مورد (۱۳٪) سویه اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) جدا سازی شدند. از بین ۳۹ مورد مذکور، ۷ سویه (۲/۳٪) اشریشیاکلی حاوی ژن *ipaH* (EIEC) با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شناسایی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: جداسازی سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (EIEC) در این مطالعه حاکی از نقش آنها به عنوان یکی از عوامل باکتریایی در ایجاد اسهال بویژه در کودکان زیر یک سال در کشور ما می‌باشد. برای شناسایی دقیق آنها باید از تکنیک‌های نوین مولکولی بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی مهاجم (EIEC)، اسهال، کودکان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

* نویسنده مسئول :

محمد مهدی سلطان دلال ؛

بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی،

دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات

بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :Soltanirad34@ yahoo.com

مقدمه

اسهال به عنوان یک اختلال گوارشی و از عوامل رایج در مرگ و میر کودکان کشورهای در حال توسعه می‌باشد. برآورد می‌شود سالانه ۵-۳ میلیون از موارد

^۱ بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲ بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۴ گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵ بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

این بیماری در سرتاسر جهان به مرگ منجر می‌شود. وقوع موارد مرگ و میر بویژه در کودکان زیر ۵ سال قابل توجه می‌باشد. عوامل اتیولوژیک اسهال شامل طیف وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها می‌باشند (۱ و ۲). از بین عوامل باکتریایی، اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می‌باشد. سویه‌های DEC براساس معیارهایی نظیر خصوصیات اپیدمیولوژیک و ویروالانس به شش پاتوتایپ عمده دسته بندی می‌شوند (۱). سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (Escherichia coli; EIEC Enteroinvasive) یکی از این پاتوتایپ‌ها بوده و به عنوان عامل ایجاد کننده اسهال خونی شبه شیگلوز در کودکان و بالغین شناخته شده‌اند (۸-۳). بیماران دارای تب، کرامپ و مدفوع خونی بوده و علائم بیماری مربوط به توانایی باکتری در اتصال اختصاصی و تهاجم به سلول‌های مخاط روده بزرگ می‌باشد. باکتری از طریق اندوسیتوز وارد سلول میزبان شده، واکوئل اندوسیتیک را لیز کرده و در داخل سلول‌های اپیتلیال و گلبول‌های قرمز تکثیر یافته، سپس منتشر شده و سلول‌های دیگر را نیز آلوده می‌کند (۱ و ۵). از نظر مکانیسم بیماری‌زایی، ژن‌ها و عوامل متعددی در اشریشیا کلی‌های مهاجم وجود دارد. یک پلاسمید بزرگ در سویه‌های EIEC دارای ژن‌هایی است که پروتئین‌های خارجی زیادی را رمزدهی می‌نماید که در بیماری‌زایی این سویه‌ها دخیل می‌باشند. این پروتئین‌های خارجی مسئول تهاجم اشریشیاکلی به سلول‌های اپیتلیال روده می‌باشند.

روش بررسی

این بیماری در سرتاسر جهان به مرگ منجر می‌شود. وقوع موارد مرگ و میر بویژه در کودکان زیر ۵ سال قابل توجه می‌باشد. عوامل اتیولوژیک اسهال شامل طیف وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها می‌باشند (۱ و ۲). از بین عوامل باکتریایی، اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می‌باشد. سویه‌های DEC براساس معیارهایی نظیر خصوصیات اپیدمیولوژیک و ویروالانس به شش پاتوتایپ عمده دسته بندی می‌شوند (۱). سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (Escherichia coli; EIEC Enteroinvasive) یکی از این پاتوتایپ‌ها بوده و به عنوان عامل ایجاد کننده اسهال خونی شبه شیگلوز در کودکان و بالغین شناخته شده‌اند (۸-۳). بیماران دارای تب، کرامپ و مدفوع خونی بوده و علائم بیماری مربوط به توانایی باکتری در اتصال اختصاصی و تهاجم به سلول‌های مخاط روده بزرگ می‌باشد. باکتری از طریق اندوسیتوز وارد سلول میزبان شده، واکوئل اندوسیتیک را لیز کرده و در داخل سلول‌های اپیتلیال و گلبول‌های قرمز تکثیر یافته، سپس منتشر شده و سلول‌های دیگر را نیز آلوده می‌کند (۱ و ۵). از نظر مکانیسم بیماری‌زایی، ژن‌ها و عوامل متعددی در اشریشیا کلی‌های مهاجم وجود دارد. یک پلاسمید بزرگ در سویه‌های EIEC دارای ژن‌هایی است که پروتئین‌های خارجی زیادی را رمزدهی می‌نماید که در بیماری‌زایی این سویه‌ها دخیل می‌باشند. این پروتئین‌های خارجی مسئول تهاجم اشریشیاکلی به سلول‌های اپیتلیال روده می‌باشند.

در یک مطالعه توصیفی طی مدت ۴ ماه (از فروردین تا تیرماه ۱۳۸۷)، ۳۰۰ نمونه مدفوع از اسهال کودکان زیر ۵ سال از بیمارستان علی اصغر (ع) و مرکز طبی کودکان شهر تهران جمع آوری شده و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال شدند. سپس جهت ایزوله سازی سویه‌های اشریشیاکلی، نمونه‌ها بر روی محیط هکتون انتریک آگار (MERCK) کشت داده شدند. پس از انکوبه گذاری به مدت ۲۴ ساعت، کلونی‌های خالص تخمیر کننده لاکتوز که بر روی محیط هکتون انتریک آگار به رنگ زرد می‌باشند، با تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های افتراقی نظیر MR/VP, TSI, SIM, اوره،

این بیماری در سرتاسر جهان به مرگ منجر می‌شود. وقوع موارد مرگ و میر بویژه در کودکان زیر ۵ سال قابل توجه می‌باشد. عوامل اتیولوژیک اسهال شامل طیف وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها می‌باشند (۱ و ۲). از بین عوامل باکتریایی، اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می‌باشد. سویه‌های DEC براساس معیارهایی نظیر خصوصیات اپیدمیولوژیک و ویروالانس به شش پاتوتایپ عمده دسته بندی می‌شوند (۱). سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (Escherichia coli; EIEC Enteroinvasive) یکی از این پاتوتایپ‌ها بوده و به عنوان عامل ایجاد کننده اسهال خونی شبه شیگلوز در کودکان و بالغین شناخته شده‌اند (۸-۳). بیماران دارای تب، کرامپ و مدفوع خونی بوده و علائم بیماری مربوط به توانایی باکتری در اتصال اختصاصی و تهاجم به سلول‌های مخاط روده بزرگ می‌باشد. باکتری از طریق اندوسیتوز وارد سلول میزبان شده، واکوئل اندوسیتیک را لیز کرده و در داخل سلول‌های اپیتلیال و گلبول‌های قرمز تکثیر یافته، سپس منتشر شده و سلول‌های دیگر را نیز آلوده می‌کند (۱ و ۵). از نظر مکانیسم بیماری‌زایی، ژن‌ها و عوامل متعددی در اشریشیا کلی‌های مهاجم وجود دارد. یک پلاسمید بزرگ در سویه‌های EIEC دارای ژن‌هایی است که پروتئین‌های خارجی زیادی را رمزدهی می‌نماید که در بیماری‌زایی این سویه‌ها دخیل می‌باشند. این پروتئین‌های خارجی مسئول تهاجم اشریشیاکلی به سلول‌های اپیتلیال روده می‌باشند.

یکی از این ژن‌ها، ژن مربوط به آنتی ژن تهاجمی پلاسمیدی (ipaH; invasive plasmid antigen) می‌باشد که در بین اشریشیاکلی‌های مولد اسهال (DEC) تنها بر روی کروموزوم و پلاسمید ویروالانس سویه‌های EIEC قرار گرفته و در شناسایی این سویه‌ها

DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (فوروارد و ریورز) بود.

مراحل برنامه تکثیر ژن ipaH در دستگاه ترموسایکلر (PaQlab) شامل واسرشت اولیه (denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، و پس از آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال (annealing) در ۶۲ 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.

به منظور اطمینان از صحت روند کار و مواد واکنشگر و نیز بررسی ویژگی PCR، از سویه استاندارد Shigella sonnei ATCC 9290 (حاوی ژن ipaH) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل برای کنترل منفی استفاده شد.

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 کیلوباز انجام شد.

تهیه عکس از ژل با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور (GelDoc 1000 fluorescent imaging system, Bio-Rad) در مجاورت نور ماورای بنفش صورت گرفت (تصویر ۱).

از آنجایی که مطالعات گذشته در سرتاسر نقاط دنیا حاکی از شیوع ۴۰-۱۰ درصدی سویه های اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) در اسهال کودکان زیر ۵ سال می باشند، در این مطالعه جهت تعیین حجم نمونه گیری از معادله زیر استفاده و (با پیش بینی شیوع ۲۵ درصدی سویه های DCE) تا ۳۰۰ نمونه مدفوع جمع آوری شد:

سیمون سترات و لیزین دکربوکسیلاز به عنوان سویه های اشریشیاکلی مورد تایید واقع شدند.

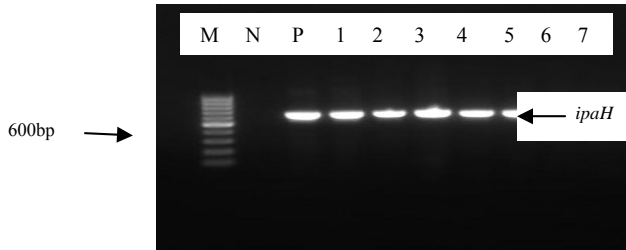
کلونی های مشکوک حدود ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گذاری شده و در صورت تخمیر لاکتوز انتخاب می شدند. کلونی های لاکتوز منفی در صورتی که خصوصیات افتراقی رایج اشریشیاکلی (تولید اندول و مصرف قندها) را نداشتند از مطالعه حذف می شدند.

سویه های تایید شده اشریشیاکلی در محیط ذخیره skim milk (در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری گردید تا در آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گیرند. ۸-۵ کلونی از کشت ۲۴ ساعته (و انکوبه گذاری شده در ۳۷ درجه سانتی گراد) سویه های اشریشیاکلی بر روی محیط نوترینت آگار، با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در میکروتیوب مخلوط شده و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با کمک اولترا سانتریفیوژ و در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. از مایع رویی (supernatant) برداشته و در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره شد تا از آن (۳ میکرولیتر) به عنوان DNA الگو در آزمون PCR استفاده شود.

تکثیر ژن ipaH با استفاده از جفت پرایمرهای زیر (۲) صورت گرفت. محصول PCR ژن مورد نظر با این پرایمر، ۶۰۰ جفت باز بود. توالی جفت پرایمر مورد استفاده در آزمون PCR:

ipaH F:
GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC
ipaH R :
GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC
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 DNase free (شرکت کیاژن)، ۳ میکرولیتر از

بودند. در ۵ مورد از این ۷ مورد اسهال خونی مشاهده شد که ۴ مورد مربوط به کودکان پسر و یک مورد مربوط به کودکان دختر بود (جدول ۱).



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن ipaH (600bp)

شماره M مارکر وزن مولکولی (ladder) ۱۰۰۰ bp،
شماره N کنترل منفی، شماره P *Shigella sonnei*
ATCC 9290 (کنترل مثبت)، و شماره های ۱-۷
نمونه‌های بالینی EIEC

$$n = \frac{(t)^2(p)(q)}{d^2} = \frac{(1.96)^2(0.25)(0.75)}{(0.05)^2} = 288$$

برای تحلیل داده‌های بدست آمده از تست آماری خاصی استفاده نشد.

یافته‌ها

از میان ۳۰۰ نمونه اسهالی مورد بررسی با استفاده از روش کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی، ۳۹ مورد (۱۳٪) سویه اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) جداسازی شدند. از بین ۳۹ مورد DEC جدا شده، ۷ سویه (۱۷/۹٪) اشریشیاکلی حاوی ژن ipaH با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به عنوان سویه‌های EIEC مورد تایید واقع شدند. تمامی سویه‌های EIEC از کودکان یک سال و زیر یک سال جدا شدند. از این ۷ سویه، ۴ سویه متعلق به کودکان پسر و ۳ سویه متعلق به کودکان دختر

جدول ۱: مشخصات مربوط به کودکانی که سویه‌های EIEC از مدفوع آنها جدا شد.

جنس بیمار	سن بیمار	وجود اسهال خونی
دختر	۱ سال	+
پسر	۱ سال	+
دختر	۱ سال	-
پسر	۱۱ ماه	+
پسر	۹ ماه	+
دختر	۱ سال	-
پسر	۱ سال	+

جدید و مبتنی بر DNA بهره گرفت. بدلیل عدم وجود تکنیک‌های تشخیصی مناسب جهت شناسایی دقیق این سویه‌ها، تمایز آنها از میکروفلور غیر بیماری‌زای مدفوع و در نتیجه عدم توجه کافی به آنها و از طرفی ایجاد اسهال خونی بویژه در طیف سنی کودکان،

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان اظهار داشت که اشریشیاکلی‌های مهاجم (EIEC) به عنوان یکی از عوامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال کودکان در کشور ما مطرح بوده و برای شناسایی آنها باید از تکنیک‌های

Bui Thi Thu Hien و همکاران در ویتنام در ۰/۸٪ موارد اسهال کودکان زیر ۵ سال، EIEC را نشان دادند (۱۲). تفاوت در گزارش سویه‌های EIEC در مطالعات مختلف، حاکی از توزیع جغرافیایی متنوع این سویه‌ها در زمان‌ها و مکان‌های مختلف می‌باشد. آنچه از نتایج مطالعات در سرتاسر جهان استنتاج می‌شود این است که سویه‌های EIEC در ایجاد اسهال کودکان نقش داشته و لازم است تا در کنار سایر عوامل باکتریایی، تست‌های تشخیصی دقیق برای آنها طراحی و به کار گرفته شود.

نتیجه گیری

با توجه به ماهیت بیماریزای سویه‌های اشریشیاکلی مهاجم (EIEC) و اهمیت آنها در ایجاد اسهال خونی در کودکان بایستی برای شناسایی دقیق و تمییز آنها از فلور طبیعی روده از تکنیک‌های نوین مولکولی مبتنی بر مارکرهای ژنتیکی بهره گرفت، چرا که به علت شباهت این سویه‌ها در بسیاری از خصوصیات با سویه‌های کومنسال اشریشیاکلی (E.coli) و نیز عدم وجود تست‌های تشخیصی مناسب در آزمایشگاه‌ها، این سویه‌ها اغلب از نظر دور می‌مانند. جداسازی این سویه‌ها در این مطالعه حاکی از نقش آنها به عنوان یکی از عوامل باکتریایی در ایجاد اسهال بویژه در کودکان زیر یک سال در کشور ما می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مجربان طرح لازم می‌دانند تا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌های 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 می‌باشد.

شناسایی آنها در موارد اسهال باکتریایی در جهت درمان بموقع و مناسب حایز اهمیت می‌باشد (۵۱). از آنجایی که در کشور ما داده‌های چندانی در مورد این سویه‌ها وجود ندارد، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی این سویه‌ها در اسهال کودکان زیر ۵ سال مراجعه کننده به بیمارستان علی اصغر (ع) و مرکز طبی کودکان شهر تهران انجام گرفت.

در مطالعه حاضر فراوانی سویه‌های EIEC در اسهال کودکان ۲/۳٪ مشاهده شد. تمامی این سویه‌ها از کودکان یک سال و زیر یک سال جدا شدند که به دلیل ماهیت تهاجمی این سویه‌ها در این طیف سنی حساس و آسیب پذیر، می‌تواند نگران کننده باشد. در یک مطالعه قبلی توسط جواد زاده و همکاران (۷۸-۱۳۷۷) شیوع EIEC در اسهال کودکان زیر ۶ سال در شهر زاهدان ۱۳٪ گزارش گردید (۱۳). این اختلاف در فراوانی سویه‌ها می‌تواند در نتیجه اختلاف در مکان و زمان مطالعه باشد که پس از گذشت ۱۰ سال و احتمالاً با رعایت بیشتر اصول بهداشتی، کاهش قابل توجهی در شیوع این سویه‌ها مشاهده می‌شود. علاوه بر این، تفاوت‌های مذکور می‌تواند تا حدی ناشی از تکنیک‌های تشخیصی مورد استفاده نیز باشد. با این حال هنوز این سویه‌ها بایستی در کشور ما به عنوان عامل ایجاد اسهال مدنظر قرار گیرند. در برخی از کشورهای در حال توسعه و حتی توسعه یافته که اسهال بویژه در کودکان به عنوان یک مشکل رایج بهداشتی تلقی می‌شود، تست‌های تشخیصی سویه‌های EIEC در کنار سایر عوامل باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در مطالعه Ji-Rong Yang در تایوان (۲۰۰۷)، شیوع EIEC در اسهال کودکان ۲۰٪ گزارش شد (۱۱). در مقابل، Katia R.S Aranda و همکاران (۲۰۰۴) در یک مطالعه در برزیل، تنها در ۱/۳٪ موارد اسهال کودکان، EIEC را با تکنیک PCR شناسایی کردند (۲).

1. Vanessa B, Marcelo Palma S, Carla Romano T, Maurilio FS, Marcia Regina F, Marina Baquerizo M, Suzana Ramos F. Diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Nov; 102(7): 839-44.
2. Katia RS A and Sandra H. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267(6): 145-150.
3. Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, Ho SW, Tsai JC. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37(28): 327-334.
4. Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect* 2004; 48(12): 161-167.
5. Nataro JP, and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev* 1998; 58(11): 142-201.
6. Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, and Echeverria P. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect Dis* 1993 Feb; 167(2): 458-61.
7. Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, Varlea G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Mendez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuna AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39(14): 2134-2139.
8. Okeke IN, Lamikanra A, Steinruck H, Kaper JB. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol* 2000; 38(19): 7-12.
9. Maurizio F, Bianca C, Gianni P, Gioacchino M and Claudio O.G. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *The EMBO Journal* 1998; 17(23): 7033-7043.
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, Steve Hsu-Sung K, Chuen-Sheue C and Ho-Sheng W. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2007 November; 459(11): 3620-3625.
12. Bui Thi Thu H, Flemming S, Phung Dac C, Oralak S, Tran Thu H, Tran Minh T, and Anders D. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2008 Mar; 46(3): 996-1004.
13. Javadzadeh M, Dabiri S, Zangiabadi M. Role of *Shigella*, Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Entamoeba Histolytica* in causing dysentery in children and antibiotic sensitivity testing. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2003; 39(13): 29-35.

Isolation of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) from diarrhea in children by polymerase chain reaction (PCR) technique

Akbari A¹ (BSc.) - Pourmand MR² (Ph.D.) - Sharifi Yazdi MK³ (Ph.D.) - Hosseini M⁴ (Ph.D.) - Soltan Dallal MM^{5*} (Ph.D.)

1 Division of Microbiology, Pathobiology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

2 Division of Microbiology, Pathobiology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

3 Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Epidemiology and Biostatistics Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

5 Division of Microbiology, Pathobiology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract

Received : Jul 2009

Accepted : Jan 2010

Background and Aim: Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) strains include a group of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) and are known to cause shigellosis-like symptoms in both adults and children. They belong to a limited number of serotypes and their somatic (O) antigens are identical with, or related to, certain *Shigella* antigens. EIEC strains are confirmed by demonstration of invasiveness by polymerase chain reaction (PCR) for detection of the ipaH (invasive plasmid antigen H) gene that is specific for these strains among DEC. Since in our country, Iran study for detection of these strains has not been carried out therefore the aim of this study was detection of EIEC in diarrheal under 5 year old children in Tehran.

Materials and Methods: During the descriptive study, 300 stool samples were collected from children with diarrhea in Ali Asghar Hospital and children medicinal center of Tehran during 4 months (April-Jul 2008). *E. coli* species were isolated by standard bacteriological and biochemical tests. Presence of invasive plasmid antigen H (ipaH) gene in confirmed colonies was investigated by PCR technique.

Results: Among 300 stool specimens studied using culture method and biochemical tests, 39 (13%) *E. coli* species were isolated. Among these 39 strains, 7 (2.3%) strains containing ipaH gene (EIEC) were detected by PCR technique.

Discussion and Conclusion: Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) in our country, Iran, may be as bacterial pathogen causing childhood diarrhea. Therefore we should apply new techniques for investigation of these strains.

Key words: Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), Diarrhea, Children, Polymerase Chain Reaction (PCR)

* Corresponding author :
Soltan Dallal MM ;
e-mail : Soltanirad34@yahoo.
com