

The Frequency of Escherichia coli Pathotypes in Children with Acute Diarrhea Referred to Children's Teaching Hospital, 2014

Mohammad Aghaali¹, Hosein Heydari^{2*}

¹Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Department of Pediatrics, Faculty of Sciences, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

*Corresponding Author:
Hosein Heydari,
Department of Pediatrics,
Faculty of Sciences, Qom
University of Medical
Sciences, Qom, Iran.

Email:
hoseinheydari3375@yahoo.com

Received: 26 Dec, 2017

Accepted: 16 Apr, 2017

Abstract

Background and Objectives: *Escherichia coli* is among the most important causes of bacterial diarrhea, especially in children. The aim of this study was to investigate the frequency of *E. coli* pathotypes in children with acute diarrhea referred to Teaching and Treatment Center.

Methods: This study was performed as a cross-sectional study on febrile children with acute diarrhea aged 1 month to 5 years, who referred to Teaching and Treatment Center in 2014. Before starting antibiotics, stool samples of all patients, were sent to the hospital laboratory for culture. In case of positive culture, patients entered the study, then pathogenic types of *E. coli* were identified using multiplex PCR method. Patient information, such as age, gender, season, and stool test results of the obtained pathotypes, were analyzed by statistical tests of Chi-square, variance, Mann-Whitney, and t-test.

Results: A total of 51 children with *E. coli*-induced acute diarrhea, were studied. Eighteen children (35.3%) were male and 33 (64.7%) were female. There were no significant differences among different pathotypes of *E. coli* in terms of age and gender distribution. The frequency of RBC and WBC in stool was not significantly different among diarrhea induced by different pathotypes of *E. coli*.

Conclusion: The result of the current study showed that the most common pathotype in *E. coli*-induced diarrheas in children is EHEC. There was no significant difference among different strains of *E. coli* in terms of age, gender, season of hospitalization, and stool test result.

Keyword: Child; *Escherichia coli*; Stool test; Qom, Iran.

فراوانی پاتوتایپ‌های اشرشیاکلی در کودکان مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی کودکان، سال ۱۳۹۳

محمد آقاعلی^۱، حسین حیدری^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: در میان علل باکتریال اسهال، اشرشیاکلی از مهم ترین عوامل، به خصوص در کودکان است. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی پاتوتایپ‌های اشرشیاکلی در کودکان مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی کودکان انجام گرفت.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی کودکان تب دار سنین یک ماه تا ۵ ساله دارای اسهال حاد مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی کودکان در سال ۱۳۹۳ انجام شد. قبل از شروع آنتی بیوتیک، نمونه مدفوع تمامی بیماران برای کشت از نظر اشرشیاکلی به آزمایشگاه بیمارستان ارسال گردید. در صورت مثبت شدن کشت، بیماران وارد مطالعه شدند، سپس با روش Multiplex PCR، انواع اشرشیاکلی پاتوژن مشخص گردید. اطلاعات بیماران مانند سن، جنس، فصل، نتیجه آزمایش مدفوع بین پاتوتایپ‌های به دست آمده با استفاده از آزمون‌های آماری کای اسکوئر، واریانس، من ویتنی و تی تست تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در مجموع ۵۱ کودک مبتلا به اسهال حاد ناشی از اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۸ کودک (۳۵/۳٪) پسر و ۳۳ نفر (۶۴/۷٪) دختر بودند. از نظر توزیع سنی و جنسی اختلاف معنی داری بین پاتوتایپ‌های مختلف اشرشیاکلی وجود نداشت. فراوانی WBC و RBC در مدفوع در بین اسهال ناشی از پاتوتایپ‌های مختلف اشرشیاکلی، تفاوت معنی داری نداشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد شایع ترین پاتوتایپ در اسهال‌های ناشی از اشرشیاکلی کودکان، EHEC است و اختلاف معنی داری از نظر سن، جنس، فصل بستری و نتیجه آزمایش مدفوع بین سویه‌های مختلف اشرشیاکلی دیده نشد.

کلید واژه‌ها: کودک؛ اشرشیاکلی؛ آزمایش مدفوع؛ قم، ایران.

گروه اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

حسین حیدری، گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
hoseinheydari3375@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Aghaali M, Heydari H. The Frequency of Escherichia coli pathotypes in children with acute diarrhea referred to children's teaching hospital, 2014. Qom Univ Med Sci J 2017;11(6):95-101. [Full Text in Persian]

مقدمه

اسهال هنوز یک مسئله بهداشتی مهم، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه بوده و یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال است (۱). در میان علل باکتریال اسهال، اشرشیاکلی از مهم‌ترین عوامل، به‌ویژه در کودکان می‌باشد (۲،۳). تشخیص این عامل، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه، محدود است؛ زیرا تست‌های معمولی که انجام می‌شود قابلیت افتراق گونه‌های پاتوژن از فلور طبیعی را ندارد (۴). تقسیم‌بندی اشرشیاکلی براساس حضور ژن‌های ویرولانسن بر روی پلاسمید و کروموزوم باکتری می‌باشد (۵).

در مطالعات مختلف، ۵ نوع اشرشیاکلی که می‌توانند اسهال ایجاد کنند مشخص شده است: اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک (*E. coli-EPEC Enteropathogenic*)، اشرشیاکلی انترواگرسیو (*Enteraggative E. coli-EAEC*)، اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (*Enterotoxigenic E. coli-ETEC*)، اشرشیاکلی انترواینوژیو (*Enteroinvasive E. coli-EIEC*) و اشرشیاکلی انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic E. coli-EHEC*) یا تولیدکننده سم شیکا (*Shiga toxin-producing E. Coli-STEC*) (۵). از آنجایی که سویه‌های اشرشیاکلی مولد اسهال از سویه‌های غیربیماری‌زا که به‌طور معمول در مدفوع انسان یافت می‌شوند، قابل تمیز و جداسازی نمی‌باشند، نمی‌توان تنها براساس معیارهای بیوشیمیایی و کشت، این سویه‌ها را شناسایی کرد. از این‌رو بایستی این سویه‌ها را به‌واسطه حضور ژن‌های کدکننده فاکتورهای مربوط به ویرولانسن باکتری که در سویه‌های غیرپاتوژن وجود ندارند، شناسایی کرد (۶). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از روش‌های رایج در تشخیص ارگانسیم‌ها است که نتایج صحیح و قابل‌اعتمادی را دربرداشته و حساسیت و ویژگی بالایی را نشان می‌دهد.

تحقیقات نشان داده‌اند بین مصرف آنتی‌بیوتیک در کودکان آلوده، با پاتوتایپ‌های EHEC و گسترش سندرم همولیتیک اورمیک ارتباط وجود دارد و دیده شده مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان اسهال ناشی از این باکتری، آزادسازی شیکاوتوکسین را افزایش می‌دهد.

به‌همین دلیل مصرف آنتی‌بیوتیک باید در بیماران مبتلا به اسهال با احتیاط انجام شود. با این حال هنوز هیچ راه تشخیصی در دسترس برای افتراق عوامل ایجادکننده اسهال وجود ندارد (۳)، و تنها امکانات تشخیصی موجود برای شروع درمان توسط پزشکان؛ آزمایش مدفوع و معاینه می‌باشد. به‌همین دلیل اطلاع از نتایج آزمایش هریک از پاتوتایپ‌های اشرشیاکلی می‌تواند برای تصمیم‌گیری پزشک، کمک‌کننده باشد. این مطالعه با هدف بررسی وضعیت فراوانی پاتوتایپ‌های اشرشیاکلی در کودکان مبتلا به اسهال حاد مراجعه‌کننده به بیمارستان آموزشی کودکان به‌وسیله روش Multiplex PCR صورت گرفت.

روش بررسی

مطالعه به‌صورت مقطعی در سال ۱۳۹۳ انجام شد. جامعه آماری را تمامی کودکان تب‌دار در سنین یک‌ماهگی تا ۵ سالگی که با اسهال حاد به بیمارستان آموزشی کودکان، مراجعه و یا در بخش‌های مختلف بیمارستان بستری بودند، تشکیل می‌دادند. بیمارانی که آنتی‌بیوتیک گرفته بودند از مطالعه حذف شدند. نمونه مدفوع تمامی بیماران قبل از شروع آنتی‌بیوتیک از نظر کشت اشرشیاکلی به آزمایشگاه بیمارستان ارسال گردید و نمونه‌ها روی محیط‌های سلنیت F، مک‌کانکی آگار و اتوزین متیلن بلو در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند، سپس برای تعیین هویت روی محیط‌های افتراقی کشت شدند. برای جستجو و شناسایی سویه‌های اشرشیاکلی از روش‌های استاندارد استفاده گردید. در صورت مثبت شدن کشت، بیماران وارد طرح شدند، سپس محیط‌های کشت به مرکز تحقیقات عفونی بیمارستان، ارسال و با روش مولتی PCR انواع اشرشیاکلی، پاتوژن آن مشخص شد. برای استخراج DNA نیز از روش جوشاندن استفاده گردید. محصول استخراج در ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام PCR نگهداری شد. از بافر و Tag DNA پلیمرز شرکت سیناژن و پرایمرهای شرکت Fermentas استفاده گردید (جدول شماره ۱). برای شناسایی سویه‌های ETEC، EPEC، EHEC، EIEC و EAggEC، به‌ترتیب از ژن‌های هدف *stx1-stx2*، *eae*، *LT-ST*، *aggR-astA* و *Inv* استفاده شد. سایر اطلاعات بیماران به‌وسیله چک‌لیستی که حاوی اطلاعات فردی، سن، جنس، فصل و نتیجه

آزمایش مدفوع بود، جمع‌آوری شدند. اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون‌های آماری کای اسکوئر، واریانس، من‌ویتنی و تی تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هزینه آزمایشها بر بیمار تحمیل نشد و افراد غیرداوطلب از مطالعه حذف شدند. و سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. در این طرح،

جدول شماره ۱: پرایمرهای ژن‌های سویه‌های اشرشیاکلی

Target gene	Sequense (5' to 3')	(bp) Size Amplication
<i>Stx1</i>	AGTTAATGTGGTGGCGAA GACTCTCCATCTGCCG	817
<i>Stx2</i>	TTCGGTATCCTATTCCCG TCTCTGGTCATTGTATTA	474
<i>EaeA</i>	AAACAGGTGAAACTGTTGCC CTCTGCAGATTAACCTCTGC	454
<i>InvE</i>	ATATCTCTTATTTCCAATGCGT ATGGCGAGAAATTATATCCCG	382
<i>AggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254
<i>STh</i>	CCCTCAGGATGCTAAACCAG TTAATAGCACCCGGTACAAGC	166
<i>LT</i>	AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	130
<i>astA</i>	GCCATCAACACAGTATATCC GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	106

یافته‌ها

بهار، تابستان، پاییز و زمستان بود. میانگین سنی بیماران، ۲۱/۷۶ ماه و بیشتر بیماران (۵۱٪) بین ۱-۲ سال سن داشتند. از نظر توزیع جنسی، اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های مختلف اشرشیاکلی ($p=0/480$) وجود نداشت (جدول شماره ۲).

در مجموع از ۳۸۳ نمونه مورد بررسی، ۵۱ کودک مبتلا به اسهال حاد ناشی از اشرشیاکلی بودند. ۱۸ کودک (۳/۳۵٪) پسر و ۳۳ نفر (۶۴/۷٪) دختر بودند. فصل ابتلا به بیماری در ۹ (۱۷/۶٪)، ۱۴ (۲۷/۵٪)، ۹ (۱۷/۶٪) و ۱۹ (۳۷/۳٪) نفر از کودکان به ترتیب

جدول شماره ۲: توزیع جنسی بیماران مورد مطالعه بر اساس سویه اشرشیاکلی عامل اسهال

مجموع	جنس		سویه اشرشیاکلی عامل اسهال
	دختر	پسر	
۵	۰	۵	<i>Enterotoxigenic E. coli (ETEC)</i>
۸	۵	۳	<i>Enterohaemorrhagic E. coli (EHEC)</i>
۲	۲	۰	<i>Enteroaggregative E. coli (EAEC)</i>
۱۸	۱۳	۵	<i>ETEC+ EHEC</i>
۱۱	۵	۶	<i>ETEC+ EAEC</i>
۷	۵	۲	<i>EHEC+ EAEC</i>
۵۱	۳۰	۲۱	مجموع

($p=0/155$)، اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۳).

میانگین سنی بیماران در بین سویه‌های مختلف اشرشیاکلی

جدول شماره ۳: توزیع سنی بیماران مورد مطالعه براساس سویه/اشرشیاکلی عامل اسهال

سویه اشرشیاکلی عامل اسهال	تعداد	میانگین \pm انحراف معیار (ماه)	کمترین	بیشترین
<i>ETEC</i>	۵	۱۲/۶ \pm ۴/۹	۹	۱۸
<i>EHEC</i>	۸	۹/۷ \pm ۵/۷	۳	۱۸
<i>EAGG</i>	۲	۱۸ \pm ۰	۱۸	۱۸
<i>EHEC+ETEC</i>	۱۸	۲۹/۵ \pm ۲۲/۸	۳	۶۰
<i>EAGH+ETEC</i>	۱۱	۲۵/۹ \pm ۲۲/۶	۳	۶۰
<i>EAGH+EHEC</i>	۷	۳۰ \pm ۲۰/۵	۱۸	۶۰
مجموع	۵۱	۲۳/۶ \pm ۲۰	۳	۶۰

فراوانی RBC ($p=0/835$) و WBC ($p=0/634$)، در مدفوع در بین اسهال ناشی از سویه‌های مختلف اشرشیاکلی، تفاوت معنی داری نداشت (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: مقایسه فراوانی RBC و WBC در مدفوع در بین اسهال ناشی از سویه‌های مختلف اشرشیاکلی

سویه اشرشیاکلی عامل اسهال	وجود RBC در مدفوع تعداد (درصد)	وجود WBC در مدفوع تعداد (درصد)	مجموع
Enterotoxigenic E. coli (ETEC)	۲(۴۰)	۰	۵
Enterohaemorrhagic E. coli (EHEC)	۲(۲۵)	۲(۲۵)	۸
Enterotoxigenic E. coli (EAEC)	۰	۰	۲
ETEC+ EHEC	۶(۳۳/۳)	۷(۳۸/۹)	۱۸
ETEC+ EAEC	۳(۲۷/۳)	۸(۷۲/۷)	۱۱
EHEC+ EAEC	۱(۱۴/۳)	۰	۷
مجموع	۱۴(۲۷/۵)	۳۷(۷۲/۵)	۵۱

بحث

اسهال هنوز یکی از علل مهم مرگ و میر در کشورهای درحال توسعه بوده و اطلاع از وضعیت پاتوژن‌های عامل اسهال برای بهبود بهداشت عمومی و کنترل این بیماری‌ها، ضروری است (۳). بجز پاتوژن‌هایی مانند شیگلا، سالمونلا، یرسینیا، ویبروکلرا و کمپیلوباکتر؛ حداقل ۵ گروه از انواع اشرشیاکلی در سراسر جهان باعث اسهال می‌شوند. این ۵ گروه شامل: اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک، اشرشیاکلی انترواگرسیو، اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، اشرشیاکلی انترواینویزیو و اشرشیاکلی انتروهموراژیک می‌باشد (۷). تظاهر بالینی در اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، اسهال کودکان و مسافران؛ در اشرشیاکلی انتروهموراژیک، اسهال خونی و سندرم همولیتیک اورمیک؛ در اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک، اسهال شیرخواران؛ در اشرشیاکلی انترواینویزیو، اسهال خونی شبه باسیلاری و در اشرشیاکلی انترواگرسیو، اسهال حاد و مزمن کودکان و بزرگسالان است (۸-۱۰).

با این وجود هر یک از این سویه‌ها می‌توانند تظاهرات بالینی متفاوتی داشته باشند. در مطالعه حاضر از ۵۱ کودک مورد بررسی، در ۱۵ بیمار فقط یک سویه اشرشیاکلی شناسایی شد که بیشترین مورد آن مربوط به اشرشیاکلی انتروهموراژیک (۱۵/۶٪) بود و در ۳۶ مورد (۷۰/۵٪) نیز دو سویه از اشرشیاکلی گزارش شد که بیشتر مورد آن ترکیب حضور اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک و انترواگرسیو (۲۱/۶٪) بود. عفونت‌های ترکیبی با سویه‌های مختلف اشرشیاکلی، شایع هستند و در مطالعات مختلف تا ۴۰٪ نیز ذکر شده است (۱۴-۱۱).

در مطالعه حاضر، اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک با ۶۶/۶٪، بیشترین علت اسهال بود. در مطالعه‌ای که در گابون انجام شد از ۷۲۵ کلونی اشرشیاکلی در کودکان یک‌ماه تا ۱۱ سال مبتلا به اسهال، ۵۷ مورد EAEC و ۷ مورد ETEC به دست آمد (۷). در مطالعه‌ای که در همدان بر روی نمونه مدفوع بیماران مبتلا به اسهال انجام شده بود از ۳۷ بیمار مبتلا به اسهال اشرشیاکلی، ۲۲ مورد ETEC و ۱۵ مورد EHEC جدا شد (۱۵).

در مطالعه دیگری که بین EAEC و ETEC مقایسه‌ای انجام شده بود، اختلاف سنی و جنسی بین بیماران مبتلا به این دو سویه دیده نشد (۷).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، همچنان شایع‌ترین سویه اسهال کودکان؛ EHEC است و اکثر موارد عفونت‌ها ترکیبی می‌باشد. مطالعه حاضر نتوانست اختلاف معنی‌داری را از نظر سن، جنس، فصل بستری و نتیجه آزمایش مدفوع بین سویه‌های مختلف اشرشیاکلی نشان دهد. لذا مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت همکاران محترم بیمارستان کودکان قم تشکر و قدردانی می‌نمایم.

در مطالعه‌ای که حدود ۲۵ سال قبل در تهران و سندج بر روی شیرخواران و کودکان مبتلا به اسهال انجام گرفت، شایع‌ترین پاتوژن EPEC گزارش شد و بعد از آن به ترتیب ETEC و EHEC، عوامل شایع بعدی بودند (۱۶)؛ در صورتی که در مطالعه حاضر، EPEC از هیچ بیماری جدا نشد.

در مطالعه حاضر در زمینه EIEC نیز هیچ موردی به دست نیامد. مطالعات مشابه انجام‌شده بر روی کودکان، EIEC را مشاهده نکردند یا شیوع آن را بسیار کم گزارش کردند (۲۰-۱۷)، که نشان‌دهنده کم‌اهمیت بودن این نوع اشرشیاکلی در اسهال کودکان است. سن، جنس و فصل بستری بیماران، همچنین نتیجه آزمایش مدفوع آنها در بیماران مبتلا به سویه‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشت که ممکن است به دلیل دخالت بیش از یک سویه از اشرشیاکلی در درصد بالایی از عفونت‌ها باشد. برخی مطالعات قبلی نشان دادند EPEC و EHEC در سنین پایین‌تر، شیوع بیشتری دارد (۲۱، ۲۲)؛ ولی مطالعه حاضر نتوانست ارتباطی را نشان دهد.

References:

- Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: A ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992;70(6):705-14.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(1):142-201.
- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque A, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(3):465-83.
- Vieira N, Bates SJ, Solberg OD, Ponce K, Howsmon R, Cevallos W, et al. High prevalence of enteroinvasive escherichia coli isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76(3):528-33.
- Rappelli P, Maddau G, Mannu F, Colombo MM, Fiori PL, Cappuccinelli P. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive Escherichia coli. *New Microbiol* 2001;24(1):77-83.
- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin 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;102(7):839-44.
- Presterl E, Zwick RH, Reichmann S, Aichelburg A, Winkler S, Kreamsner 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.
- Presterl E, Nadrchal R, Wolf D, Rotter M, Hirschl AM. Enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli among isolates from patients with diarrhea in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(3):209-12.
- Gascon J, Vargas M, Quinto L, Corachan M, Jimenez de Anta MT, Vila J. Enterotoxigenic Escherichia coli strains as a cause of traveler's diarrhea: A case-control study. *J Infect Dis* 1998;177(5):1409-12.

10. Oberhelman RA, Laborde D, Mera R, Starszak E, Saunders P, Mirza A, et al. Colonization with enteroadherent, enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* among day-care center attendees in New Orleans, Louisiana. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17(12):1159-62.
11. Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3458-64.
12. Peltola H, Siitonen A, Kyronseppa H, Simula I, Mattila L, Oksanen P, et al. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet* 1991;338(8778):1285-9.
13. Qadri F, Giron JA, Helander A, Begum YA, Asaduzzaman M, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Human antibody response to longus type IV pilus and study of its prevalence among enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladesh by using monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 2000;181(6):2071-4.
14. Rao MR, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Naficy AB, Wierzbza TF, Abdel-Messih I, et al. High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* among rural Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4862-4.
15. Alizadeh AH, Behrouz N, Salmazadeh S, Ranjbar M, Azimian MH, Habibi E, et al. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* species in acute diarrhoea in Hamedan, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2007;13(2):243-9.
16. Katouli M, Jaafari A, Farhoudi-Moghaddam AA, Ketabi GR. Aetiological studies of diarrhoeal diseases in infants and young children in Iran. *J Trop Med Hyg* 1990;93(1):22-7.
17. Orlandi PP, Silva T, Magalhaes GF, Alves F, de Almeida Cunha RP, Durlacher R, et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondonia: A preliminary study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(5):621-5.
18. Kim KH, Suh IS, Kim JM, Kim CW, Cho YJ. Etiology of childhood diarrhea in Korea. *J Clin Microbiol* 1989;27(6):1192-6.
19. 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(1):7-12.
20. Rappelli P, Folgosa E, Solinas ML, Dacosta JL, Pisanu C, Sidat M, et al. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43(1):67-72.
21. Rajendran P, Ajjampur SS, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, et al. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68(2):117-22.
22. Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol* 2008;104(2):403-10.