

مقاله تحقیقی

بررسی وجود ژن شیگا توکسین و توکسین مقاوم به حرارت در *شریشیا کلی* های جدا شده از نمونه های بالینی

مهسا آقامرادلو^۱، فاطمه نوربخش^{۱*}، راحله صفایی جوان^۲

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

*مسئول مکاتبات: فاطمه نوربخش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، پست الکترونیکی:

niloofer_noorbakhsh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۶

چکیده

باکتری *شریشیا کلی* به عنوان فلور نرمال روده بطور طبیعی در ساخت ویتامین و همچنین جلوگیری از رشد میکروبهای مضر در روده انسان موثر است. بیماری‌هایی که توسط *شریشیا کلی* ایجاد می‌شود در دو دسته عفونت های روده‌ای و غیرروده‌ای قرار دارند. بیشتر موارد آلودگی به عفونت های غیرروده‌ای مشاهده شده است. تیپ‌های *شریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، توانایی تولید یک یا هر دو نوع توکسین مقاوم به حرارت و حساس به حرارت را دارند. تیپ‌های *شریشیا کلی* انتروهوموراژیک، توکسین *stx* را تولید می‌کنند که شباهت زیادی به توکسین شیگا دارد. هدف از مطالعه تعیین و بررسی شیوع و توزیع ژن های شیگاتوکسین و توکسین های حساس و مقاوم به حرارت جدا شده از *شریشیا کلی* در نمونه های بالینی است. نمونه های بالینی شامل خون، ادرار، زخم، واژن و غیره از بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان‌های مختلف تهران نمونه برداری شد و با استفاده از روش‌های تشخیصی معمول (تست های بیوشیمیایی و میکروسکوپی) باکتری *E. coli* جداسازی شد. پس از استخراج DNA از باکتری های جدا شده برای شناسایی ژن‌های *ST1, ST2, Stx1, Stx2, LT* Multiplex PCR انجام شد و ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از نمونه های بالینی ۱۰۳ باکتری *E. coli* جدا شده از بیماران ۷۲/۸۱٪ متعلق به زنان و ۲۷/۱۸٪ متعلق به مردان بودند. فراوانی هر کدام از ژن های *ST1* ۴۸٪/۵۰، *ST2* ۳۸٪/۱۸۶، *Stx1* ۴۹٪/۵۱، *Stx2* ۴۵٪/۶۳، *LT* و ۳۳٪ ارزیابی شدند. بیشترین فراوانی ژن های *Stx1* و *Stx2* در *شریشیا کلی* های جدا شده از نمونه خون مشاهده شد و در سایر نمونه‌های بالینی توزیع تقریباً یکسانی از وجود ژن‌های تولید کننده توکسین وجود داشت. بنابراین احتمال دارد *شریشیا کلی* های دارای ژن تولید کننده توکسین شیگا در ایجاد عفونت خون اهمیت بیشتری داشته باشند.

واژه های کلیدی: *شریشیا کلی*، ژن های *ST*، ژن های *Stx*، ژن *LT*، نمونه های بالینی

مقدمه

روده‌ای و خارج روده‌ای شامل اسهال، عفونت‌های مجرای ادراری، عفونت کیسه صفرا و مجاری صفراوی، عفونت‌های گوارش، باکتری، عفونت زخم، سپتی سمی و مننژیت

باکتری *شریشیا کلی* عضو خانواده انتروباکتریاسه است و سویه‌های بیماری‌زای آن عامل طیف گسترده‌ای از بیماری‌های

دارای دو زیر واحد A و B هستند. شیگاتوکسین ۲ و ۱ از بیماران مبتلا به کولیت هموراژیک جدا شده است، ولی شیگاتوکسین ۲ فراوانی بیشتری در بیماری های انسانی دارد (۹). هدف از این مطالعه تعیین و بررسی شیوع و توزیع ژن-های شیگاتوکسین (*Stx*) و توکسین های حساس و مقاوم به حرارت (*LT,ST*) در اشریشیا کلی جدا شده از نمونه های بالینی است.

مواد و روش ها

روش های تشخیصی بیوشیمیایی

در این تحقیق ۲۰۰ نمونه بالینی (ادرار، خون، زخم، کشت گلو، واژن، تراشه، آبسه، آسیت، و مایع شکمی) از بیماران سرپایی و بستری بیمارستان های منتخب طی مدت ۳ ماه (اردیبهشت تا تیر ۱۳۹۵) جمع آوری شدند. با استفاده از رنگ آمیزی گرم و محیط های کشت افتراقی E.M.B (اتوزین متیلن بلو)، سیمون سیترات، SIM، MR-VP، اوره و محیط TSI، ۱۰۳ باکتری اشریشیا کلی جدا شد.

استخراج ژنوم

استخراج DNA به روش جوشاندن صورت گرفت، به این صورت که نمونه ها در محیط کشت نوترینت برات کشت داده شدند، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه هر نمونه را به میکروتیوپ انتقال داده و در شرایط ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت یا محلول رویی را دور ریخته و رسوب هر میکروتیوپ را با آب مقطر استریل مخلوط کرده، سپس سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب حاصل در بافر TE حل شد. سپس میکروتیوپ های حاوی نمونه های مورد نظر را در دستگاه ترموبلاک با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده و برای شکستن دیواره باکتری، میکروتیوپ ها بلافاصله بر روی یخ در فریزر قرار داده شدند. میکروتیوپ های حاوی نمونه را سانتریفیوژ کرده و محلول رویی بدست آمده را که حاوی DNA ژنومیک باکتری مورد نظر است به یک میکروتیوپ جدید منتقل گردید و جهت تایید نهایی الکتروفورز گردید.

نوزادان هستند (۱،۲). حداقل ۱۰ تا ۲۰ درصد زنان یکبار عفونت حاد مجرای ادراری را تجربه می کنند. شدت عفونت به باکتری و حساسیت میزبان وابسته است (۳). اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) به سویه هایی از اشریشیا کلی اطلاق می گردد که قابلیت تولید حداقل یکی از دو نوع انتروتوکسین حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) که از جنس پروتئین است را دارا می باشند و اشریشیا کلی هایی که توکسین تولید می کنند، فاکتورهای کلونیزاسیون باکتری که باعث تسریع و افزایش چسبندگی باکتری به سلول های اپی تلیال روده کوچک می شود، را تشدید می کنند. دو نوع از ST (STa, STb) بر اساس ویژگی های شیمیایی و بیولوژیکی شناخته شده اند (۴،۵). اشریشیا کلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) و انتروهوموراژیک اشریشیا کلی (EHEC) توکسینی تولید می کند که در شرایط آزمایشگاهی روی سلول های ورو (vero) موثر است (۳). شیگاتوکسین و توکسین های شبیه شیگا (وروتوکسین ها) متعلق به خانواده بزرگی از توکسین های باکتریایی هستند که طی یک روند بیولوژیک باعث مرگ سلول ها می شوند (۶،۷). شیگا توکسین (*stx*) توسط شیگلا دیسانتری تولید می شود (۸) که به دو گروه *STX1* و *STX2* تقسیم می شوند و شدت بیماری حاصل از این باکتری را افزایش می دهد. بیماری های منتقله از راه غذا معضل اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می شوند که سالانه میلیون ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند و بخشی نیز دچار مرگ و بستری شدن در بیمارستان ها می شوند. انتروهوموراژیک اشریشیا کلی O157: H7 (EHEC) به عنوان اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین ۲ (STEC) هم شناخته شده است. این سویه باکتریایی مسئول شیوع بیماری های منتقله از طریق غذا و اسهال های تک گیر است. مواجهه با STEC در برخی بیمارها بدلیل ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) منجر به مرگ می شود. اکثریت طغیان های نسبت داده شده به E.coli O157: H7 از طریق آب و غذا بوده است. شیگا توکسین از سموم باکتریایی بسیار قوی است که از سنتز پروتئین در سلول های یوکاریوتی ممانعت می کند و در ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک نقش دارد. STEC شیگاتوکسین ۱ و ۲ را تولید می کند که هر کدام

مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱). پرایمرها جهت بررسی ا لحاظ اختصاصیت در سایت NCBI با استفاده از نرم افزا Blast بررسی شد پس از بررسی های بیوانفورماتیکی پرایمرهای طراحی شده مناسب جهت انجام پروژه انتخاب برای سنتز به شرکت سینا ژن سفارش داده شدند.

انجام Multiplex PCR

پرایمرهای ST1,ST2,Stx1,Stx2 و LT توسط نرم افزار OligoAnalyzer، از لحاظ دمای ذوب و ساختارهای ثانویه

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده جهت انجام Multiplex PCR.

Primer name	Seq.(5-3)
ST1-F	TCCGTGAAACAACATGACGG
ST1-R	ATAACATCCAGCACAGGCG
ST2-F	GCCTATGCATCTACACAATC
ST2-R	TGAGAAATGGACAATGTCCG
Stx1-F	AGCTGAAGCTTTACGTTTTCCGG
Stx1-R	TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA
Stx2-F	TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT
Stx2-R	ATCCTCATTATACTTGAAAACTCA
LT-F	CCGTATTACAGAAATCTGA
LT-R	GTGCATGATGAATCCAGGGT

نتایج

فراوانی/اشریشیاکلی در نمونه های بالینی مختلف

بakterی های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی شامل: ۶۰/۱۹٪ نمونه ادرار، ۱۸/۴۴٪ نمونه خون، ۷/۷۶٪ نمونه زخم، ۱/۹۴٪ نمونه واژن، ۳/۸۸٪ نمونه گلو، ۱/۹۴٪ نمونه آسبه، ۱/۹۴٪ نمونه تراشه، ۱/۹۴٪ نمونه آسیت، ۱/۹۴٪ نمونه مایع شکمی می باشند (نمودار ۱). از میان نمونه های مورد مطالعه ۷۲/۸۱٪ مربوط به زنان و ۲۷/۱۸٪ را آقایان تشکیل دادند که بیشترین فراوانی در نمونه ها جمع آوری شده در فاصله سنی ۸۰-۶۰ سال را در بر می گیرد.

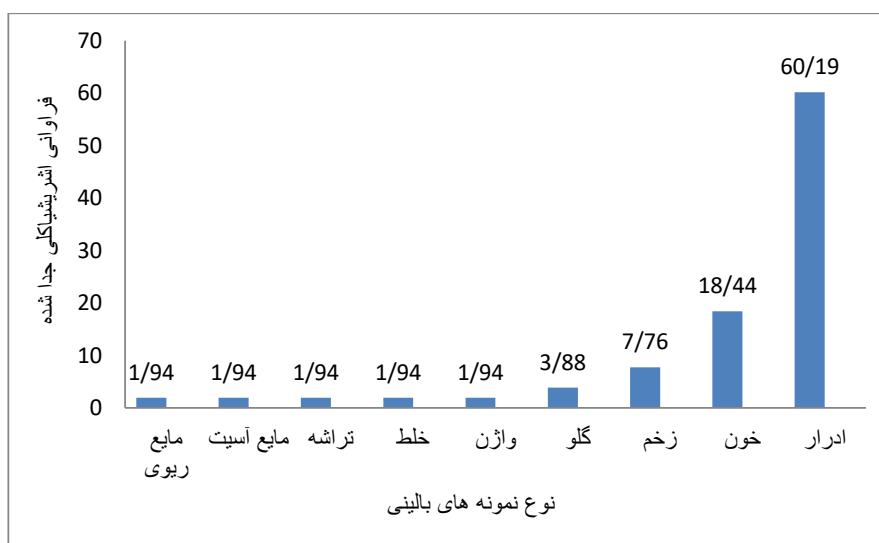
جهت واکنش PCR برای پرایمر STx1,STx2,LT از ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix حاوی بافر ۱۰X (2Mm)، Taq DNA و dNTP (10mM)، MgCL₂ و Polymerase (1.5mM) پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام ۱ μM و DNA 2 μM به همراه 4/5 μM آب مقطر برای شناسایی ژن های مورد نظر استفاده شد. همان مقادیر ذکر شده برای دو ژن ST1 و ST2 نیز استفاده گردید با این تفاوت که مقدار آب مقطر برابر 6/5 μM اضافه شد سپس واکنش PCR با ۳۵ سیکل در دماهای ذکر شده در (جدول ۲ و ۳) برای ژن های مورد نظر انجام گردید و در نهایت محصول واکنش PCR با استفاده از ژل ۲ درصد و بافر TBE الکتروفورز گردید.

جدول ۲: سیکل دمایی PCR برای دو جفت پرایمر ST1,ST2.

Number	Status	Temprature	Time
1	Initial denaturation	94° C	5 minute
2	Denaturation	94° C	1 minute
3	Anneling	58° C	1 minute
4	Extention	72° C	1 minute
5	Final extention	72° C	5 minute
6	Hold	4° C	∞

جدول ۳: برنامه PCR برای سه جفت پرایمر STx1, STx2, LT

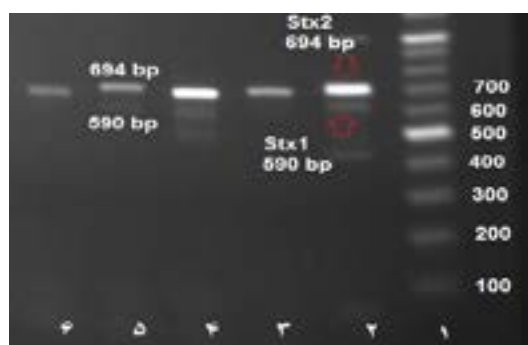
Number	Status	Temperature	Time
1	Initial denaturation	94° C	5 minute
2	Denaturation	94° C	30 second
3	Anneling	60° C	45 second
4	Extention	72° C	30 second
5	Final extention	72° C	2 minute
6	Hold	4° C	∞

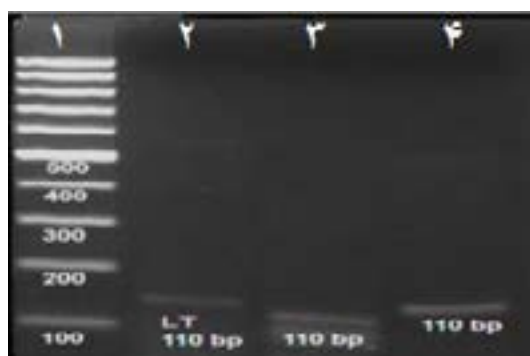


نمودار ۱: فراوانی اشریشیا کلی بر حسب نمونه بالینی

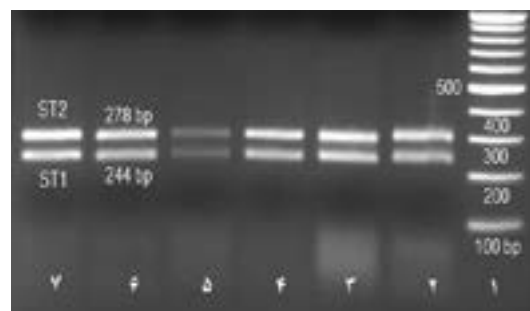
۵۹۰، ۶۹۴bp و ۱۱۰bp می باشند که در شکل ۱-۳ نشان داده شده اند.

نتایج الکتروفورز محصولات Multiplex PCR در این مطالعه اندازه قطعات ژن های مورد استفاده *ST1, ST2, Stx1, Stx2* و *LT* به ترتیب ۲۴۴bp، ۲۷۸bp،

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *stx1, stx2* ستون ۱: مارکر 100bp، ستون ۲-۶: نمونه ها.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR، تکثیر ژن *LT* باکتری *اشریشیاکلی* در اندازه 110 bp. ستون ۱: مارکر 100bp، ستون ۲-۴: نمونه ها.



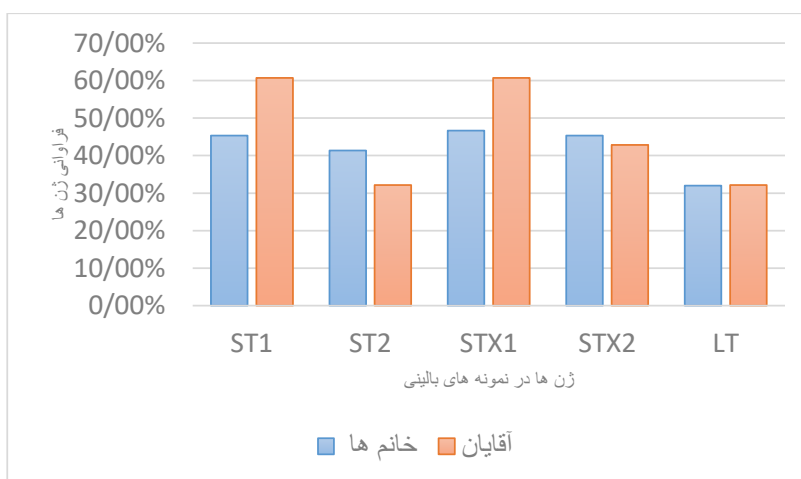
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR ژن *ST1* و *ST2*. ستون ۱: ladder 100bp، ستون ۲-۷: نمونه ها.

فراوانی تکثیر ژن ها در نمونه های بالینی

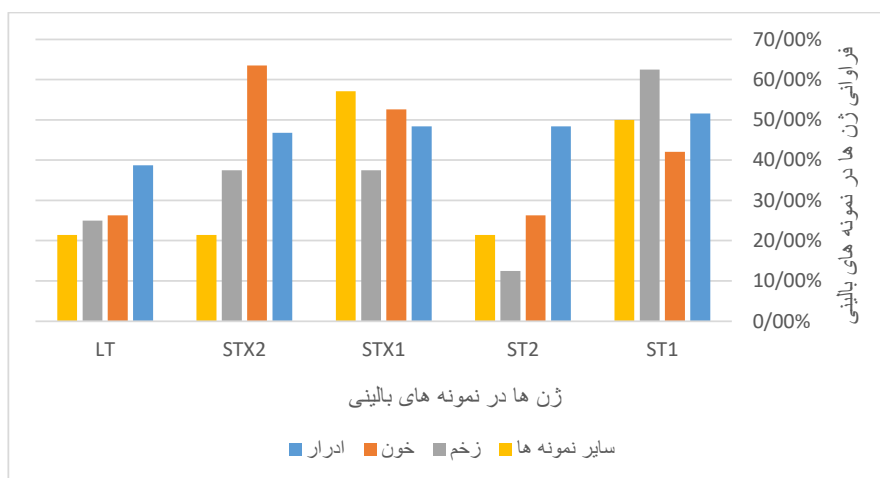
پس از الکتروفورز نمونه ها و آنالیز داده های بدست آمده مشخص گردید که ژن های مورد مطالعه *ST2*، *Stx1*، *Stx2*، *ST1* و *LT* هر کدام به ترتیب با فراوانی ۴۹/۵۱، ۴۵/۶۳، ۳۷/۸۶ و ۵۰/۴۸ درصد تکثیر شده اند (نمودار ۲)، که بیشترین تعداد مربوط به ژن مقاوم به حرارت *ST1* می باشد که بیشترین تکثیر را داشته است، در درجه دوم ژن تولید کننده شیگا توکسین *Stx2* سپس ژن *ST2*، *Stx1* و *LT* می باشد. فراوانی ژن ها در زنان به ترتیب ۴۵/۳۳، ۴۱/۳۳، ۴۶/۶۶ و ۳۲ درصد، در مردان ۶۰/۷۱، ۲۸/۵۷، ۶۰/۷۱ و ۴۲/۸۵ درصد مشاهده گردید (نمودار ۲). در ۶۲ نمونه ادراری مورد مطالعه فراوانی ژن های *ST1*، *ST2*، *Stx1* و *Stx2* به ترتیب ۵۱/۶۱، ۴۸/۳۸، ۴۸/۳۸ و ۴۶/۷۷ درصد، در ۱۹ نمونه کشت خون به ترتیب ۴۲/۱۰، ۲۶/۳۱، ۵۲/۶۳ و ۶۳/۵ درصد، در ۸ نمونه

مربوط به کشت زخم ۶۲/۵، ۱۲/۵، ۳۷/۵، ۳۷/۵ و ۲۵ درصد، در ۱۴ نمونه (واژن، کشت گلو، آبسه، تراشه، آسیت، مایع شکمی) ژن ها ۵۰، ۲۱/۴۲، ۵۷/۱۴، ۲۱/۴۲ و ۲۱/۴۲ درصد مشاهده شد (نمودار ۳). در نهایت فراوانی ژن های مورد مطالعه در نمونه های مختلف به صورت جداگانه در خانم ها و آقایان مورد بررسی قرار گرفتند به این صورت که در نمونه های ادراری جدا شده از خانم ها فراوانی ژن های *ST1*، *ST2*، *Stx1*، *Stx2* و *LT* هر کدام به ترتیب ۳۸/۷۰، ۴۱/۹۳، ۳۳/۸۷، ۳۷/۰۹ و ۲۹/۰۳ (نمودار ۲) در آقایان ۱۲/۹۰، ۶/۴۵، ۱۴/۵۱ و ۹/۶۷ درصد (نمودار ۳) مشاهده گردید. از نمونه های خون جدا شده در خانم ها ۲۱/۰۵، ۱۵/۷۸، ۴۲/۱۰ و ۴۲/۱۰ درصد، در آقایان ۲۱/۰۵، ۱۰/۵۲، ۱۰/۵۲ و ۲۱/۰۵ درصد، از نمونه های زخم جدا شده در خانم ها ۳۷/۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۱۲/۵ درصد، در آقایان ۰، ۱۲/۵، ۱۲/۵ و ۱۲/۵ درصد، از سایر نمونه های جدا

شده در خانم ها فراوانی ژن ها ۲۱/۴۲، ۷/۱۴، ۲۸/۵۷، ۱۴/۲۸ و ۱۴/۲۸ در آقایان ۲۸/۵۷، ۱۴/۲۸، ۲۸/۵۷، ۷/۱۴ و ۷/۱۴ درصد مشاهده شدند.



نمودار ۲: فراوانی ژن های مورد مطالعه در خانم ها و آقایان.



نمودار ۳: فراوانی تکثیر ژن های ST1, ST2, Stx1, Stx2 و LT در نمونه های بالینی.

پژوهش های انجام شده نشان دهنده حضور موارد تک گ باکتری می باشد (۱۱). اما در کشورهای توسعه یافته توج بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتاً واضحی از شیو آن وجود دارد. به عنوان نمونه بروز STEC در استرالیا ۱/۶ گزارش شده که این میزان در نمونه های مدفوع حاوی خو ۲/۵ برابر بیشتر بوده است. میزان شیوع STEC در سا

بحث

خانواده انتروباکتریاسه به ویژه /شربیشیاکلی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت ادراری می باشند (۱۰). در مورد فراوانی شیوع /شربیشیاکلی در ایران اطلاعات محدودی وجود دارد، زیرا اغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی به صورت روزمره این ارگانسیم را ردیابی نمی کنند و نتایج اغلب

آن را دارا نمی باشند. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه تقریباً شرایط لازم جهت شناسایی دو نوع توکسین را دارا می باشند، چراکه با بررسی های انجام شده و اطلاعات موجود در بانک ژنوم مشخص شد که این پرایمرها قادر به تکثیر انواع ژن شیگا توکسین می باشند، ضمن اینکه اندازه قطعات جهت تفکیک و هضم آنزیمی مناسب می باشند. با انجام واکنش PCR مشخص شد که بین دو ژن تولید کننده شیگا توکسین (*stx1, stx2*) هم در زنان و همچنین در مردان تقریباً از نظر آماری به یک نسبت تکثیر یافته اند. در پژوهش Mohsin و همکاران در پاکستان در سال ۲۰۰۵، از میان ۲۰۰ کودک مورد بررسی با Multiplex PCR، در مجموع ۲۲ نفر دارای یک یا هر دو ژن شیگاتوکسین بودند، به طوری که فراوانی بیماران دارای ژن های *stx1, stx2* با هم ۵۷/۱٪ گزارش گردید (۱۲). کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۴ در جهرم از روش PCR برای ردیابی شیگا توکسین استفاده کردند که از ۱۷ نمونه مثبت با آنتی سرم تنها در یک سویه ژن شیگاتوکسین *stx2* را مشاهده نمودند (۱۹). در مطالعه محمدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ در شهر خرم آباد بر روی ۵۲۲ نمونه ادرار از بیماران بستری در بیمارستان نشان می دهد که شایع ترین عامل اشریشیا کلی با ۸۵ مورد ۷۳/۹٪ بوده و عفونت در زنان ۷۹/۱٪ در مقایسه با ۲۰/۹٪ در مرد ها شایع تر بوده است (۲۰). در مطالعه حاضر ۱۰۳ نمونه مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ۷۲/۸۱٪ نمونه های زنان و ۲۷/۱۸٪ نمونه های مرد بودند که این تعداد شیوع باکتری اشریشیاکلی را در جامعه زنان نشان می دهد که این آمار با مطالعات انجام شده مشابهت دارند. حضور ژن های *ST1, ST2, Stx1, Stx2* و *LT* در این نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند که حضور ژن های تولید کننده شیگاتوکسین تقریباً با مطالعات ذکر شده همخوانی دارند و ژن مقاوم به حرارت *STI* در اشریشیاکلی تولید کننده توکسین بیشترین درصد را در نمونه های بالینی داشته است. ناظمی ۱۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری را بررسی کرد و فراوانی ژن ها را ۶۱۰ مورد به ترتیب برای ژن های *stx1* و *stx2* گزارش نمودند (۲۱). Navidinia و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه ۱۲۵۷۲ نمونه ادرار که از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در تهران از کودکان یک تا ۱۲ ساله مبتلا به عفونت مجرای ادراری بودند، تعداد ۳۷۸ مورد را

۱۹۹۷ در قاره اروپا، در سال ۱۹۹۷ در آمریکا، در سال ۱۹۹۹ در ولز و در سال ۲۰۰۱ در آرژانتین به ترتیب، کمتر از ۱، ۲/۷، ۸/۸، و ۱۰/۴ در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر جمعیت گزارش شده است (۱۲، ۱۳). به طور کلی در برخی از نواحی جغرافیایی و بعضی از گروه های سنی، فراوانی شیوع این باکتری بالاتر از دیگر پاتوژن های روده ای می باشد. اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین یکی از عوامل بیماری زای تولید شده توسط شیگلا و اشریشیاکلی می باشد که برای اولین بار در بیوتا پ ۱ شیگلا دیسانتری مورد شناسایی قرار گرفت که علاوه بر اثرات مخرب بر دستگاه گوارش خصوصاً روده از طریق خون به سیستم عصبی مرکزی نیز انتقال یافته و اثرات مخربی را ایجاد می کند (۶). برای شناسایی این ژن ها از تکنیک PCR که امروزه از آن به طور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده ای از عوامل بیولوژیک استفاده می شود. از این تکنیک اولین بار در سال ۱۹۸۹ جهت شناسایی ژن شیگا توکسین استفاده شد (۱۴). در این مطالعه از یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگا توکسین استفاده شد. روش ارائه شده در آن سال دارای معایبی بود که شامل پایین بودن T_m و عدم کارایی آن در شناسایی انواع شیگا توکسین بود. با توجه به مواردی که ذکر شد جهت شناسایی انواع شیگا توکسین طراحی یک واکنش Multiplex PCR که در آن حداقل از دو جفت پرایمر جهت شناسایی ژن های شیگا توکسین استفاده شود مد نظر قرار گرفت (۱۵). ضمن اینکه وجود یک قطعه کنترل مثبت داخلی می تواند به افزایش دقت و صحت انجام واکنش کمک فراوانی کند. پرایمرهای ارائه شده توسط M. A. Pass و همکاران (۱۶) نیز قادر به شناسایی هر دو نوع توکسین می باشند اما قطعات حاصل به راحتی روی ژل آگارز از هم تفکیک نمی شوند و جهت شناسایی *stx2* نیز باید از یک جفت پرایمر دیگر استفاده نمود. پرایمرهای ارائه شده توسط Belanger و همکاران (۱۷) نیز توانایی تفکیک دو نوع ژن را دارا هستند اما به علت اینکه قطعات تکثیر شده از نظر اندازه به یکدیگر نزدیک هستند در نتیجه تفکیک آنها بر روی ژل آگارز مشکل خواهد بود. یک جفت پرایمر ارائه شده توسط Philpot و همکاران (۱۸) نیز برای جستجوی شیگا توکسین در یک نمونه مناسب می باشد اما توانایی تفکیک بین انواع

نتایج سایر محققان می باشد و بیشترین ژن در نمونه های ادراری *STI* مشاهده شد. پس از نمونه های ادراری، خون بالاترین آلودگی با *E. coli* را نشان داد که حضور ژن های *Stx1* و *Stx2* بالاتر از ژن های دیگر بوده و نشان دهنده این مطلب است که باکتری *E. coli* پاتوژن که قابلیت تولید توکسین شبه شیگا را دارد در ایجاد عفونت در نمونه های بالینی خون توان بیشتری را دارد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از زحمات کلیه پرسنل آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که ما را مورد لطف قرار داده و در انجام این پروژه همکاری نموده صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایم.

آلوده به *اشریشیاکلی* تشخیص دادند و فراوانی ژن های *stx1* و *stx2* برای هر کدام از ۳ جدایه گزارش نمود (۲۲). در مطالعه شکوهی و همکاران با هدف بررسی ژن های توکسین های *stx1*، *stx2*، *ST* و *LT* در بین ۱۰۰ نمونه ادراری، ۱۰ نمونه از نظر ژن *Stx1*، ۶ نمونه از نظر حضور ژن *Stx2*، ۲ نمونه ژن *LT* مثبت بودند و هیچ کدام از نمونه ها حاوی ژن *ST* نبودند (۲۳). نمازی نشان داد *اشریشیاکلی* دارای ژن های *stx1*، *stx2* و *LT* از نمونه های ادراری قابل جدا سازی است و سویه های *ETEC* و *STEC* با ذخیره ژنتیکی محافظت شده قادر است عفونت مجاری ادراری ایجاد کند (۲۴).

نتیجه گیری

فراوانی *اشریشیاکلی* در نمونه های بالینی جدا شده بیشتر در نمونه های ادراری مشاهده می شود که مطابق با

منابع مورد استفاده

- Mansouri, F., Shams, N., Rashidian, E., 2015. Prevalence of shiga toxin-producing genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in Khorramabad. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services* 37(3): 5-50.
- Brooks, G., Butel, J., Morse, A., 2004. *Microbial genetics*. Jawetz, Melnick, and Adelberg's review of medical microbiology 23rd edition New York: McGraw-Hill. pp. 96-118.
- Mainil, J., Daube, G., 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* 98(6): 1332-44.
- Farina, C., Goglio, A., Conedera, G., Minelli, F., Caprioli, A., 1996. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15(4): 351-3.
- Kim, H. H., Samadpour, M., Grimm, L., Clausen, C. R., Besser, T. E., Baylor, M., 1994. Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157: H7 in Washington State, 1984-1991. *Journal of Infectious Diseases*. 170(6):1606-9.
- Paton, J. C., Paton, A. W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 450-79.
- Sandvig, K., 2001. Shiga toxins. *Toxicon* 39(11): 1629-35.
- Fukushima, H., Hashizume, T., Morita, Y., Tanaka, J., Azuma, K., Mizumoto, Y., 1999. Clinical experiences in sakai city hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in sakai city, 1996. *Pediatrics International* 41(2): 2-10.
- Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Tauxe, R. V., Greene, K. D., Wells, J. G., Lewis, J. H., 1998. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157: H7 infections: a broad clinical spectrum. *Annals of Internal Medicine* 109(9): 705-12.
- Kalantar, E., Motlagh M. E., Lornejad, H., Reshadmanesh, N., 2008. Prevalence of urinary tract pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in children at hospitals in Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases* 3(3): 149-153.
- Nahaei, M. R., Akbari Davari, M., Sadeghi, J., Nikvash, S., 2007. Frequency of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Tabriz hospitals. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 1(3): 39-46.
- Mohsin, M., Hussain, A., Butt, M. A., Bashir, S., Tariq, A., Babar, S., 2007. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal

- patients in faisalabad region of pakistan as determined by multiplex PCR. *Journal Infect Developing Countries* 1(2): 164-9.
13. Chalmers, R. M., Parry, S. M., Salmon, R. L., Smith, R., Willshaw, G. A., Cheasty, T., 1999. The surveillance of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Wales, 1990. *Emerging Infectious Diseases* 5(4): 566-572.
 14. Karch, H., Meyer, T., 1998. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27(12): 2751-7.
 15. Cebula, T. A., Payne, W. L., Feng, P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33(1): 248-50.
 16. Pass, M., Odedra, R., Batt, R., 2000. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology* 38(5): 2001-4.
 17. Bélanger, S. D., Boissinot, M., Ménard, C., Picard, F. J., Bergeron, M. G., 2002. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *Journal of Clinical Microbiology* 40(4): 1436-40.
 18. Keyhani, A., Saadati, M., Kamali, M., 2006. Detection of Shiga toxin genes by multiplex PCR. *Journal Mil Med* 7(4): 321-9.
 19. Kargar, M., Heidari, S., Abbasian, F., Shekar Forosh, Sh., 2008. Evaluating different methods, the incidence of enrichment and antibiotic resistance *E. coli* O157 : H7 raw milk cows in jahrom township . *Iranian Journal Infectious Disease and Tropical Medicine* 34: 7-11.
 20. Mohammadi, M., Ghasemi, E., Mokhayeri, H., Pournia, Y., Boroun, H., 2010. Antimicrobial resistance patterns of *E. coli* detected from hospitalized urine culture samples. *Asian Journal of Biological Sciences* 3(4): 195-201.
 21. Nazemi, A., Mirinargasi, M., Khataminezhad, M., Sharifi, S., 2011. Detection of stx1, stx2, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iran. *African Journal of Microbiology Research* 6(5): 867-9.
 22. Navidinia, M., Karimi, A., Rahbar, M., Fallah, F., Ahsani, R. R., Malekan, M. A., 2012. Study prevalence of verotoxigenic *E. coli* isolated from urinary tract infections (UTIs) in an Iranian children hospital. *The Open Microbiology Journal* 6: 1-4.
 23. Shokohi Mostafavi, Kh., Nazemi, A., Memariani, M., Kazemi Noori, M., 2011. Study the distribution of stx1, stx2, LT and ST genes and H7 and O157 antigens in urine *E. coli* isolated of Tehran. *The First International Congress of Medical Bacteriology*. Tabriz University of Medical Sciences. pp. 87.
 24. Nazemi, A., Mirinargasi, M., Khataminezhad, M. R., Shokouhi Mostafavi, S. K., Sharifi, S. H., 2012. Detection of stx1, stx2, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iran. *African Journal of Microbiology Research* 6(5): 867-869.