

## Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran

Adeli Z<sup>1</sup>, Firoozeh F<sup>2\*</sup>, Zibaei M<sup>3</sup>, Shakib P<sup>4</sup>

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, I. R. Iran.

2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorram Abad, I. R. Iran.

4- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorram Abad, I. R. Iran.

Received November 12, 2012; Accepted February 20, 2013

### Abstract:

**Background:** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), as one of the most important food-borne pathogen, in human may lead to deadly syndromes, like hemolytic–uremic syndrome (HUS). Occurrence of HUS following urinary tract infection (UTI) has been previously reported. The aim of this study was to identify *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes in *E. coli* strains isolated from urine samples in Alashtar (Lorestan, Iran)

**Materials and Methods:** A total number of 144 bacterial isolates were collected from three hospitals in Alashtar during a six-month period. One-hundred *E. coli* isolates were identified using the standard biochemical tests as well as the selective and differential media. The multiplex PCR method was used to evaluate the presence of *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes.

**Results:** Two out of 100 *E. coli* isolates carried both *stx2* and *eaeA* genes and one isolate (1%) only *stx1* gene. Moreover, the three genes were not found in any of the isolates tested.

**Conclusion:** Detection of Shiga toxin-producing *E. coli* (e.g. O157:H7 and non-O157:H7 serotypes), which may lead to life-threatening syndromes such as HUS, from urine samples is of great importance. Further research in this field using the fast and precise molecular methods is recommended.

**Keywords:** *E. coli*, Shiga toxin, Intimine, Urinary tract infection

\* Corresponding Author.

Email: ffiroozeh@ut.ac.ir

Tel: 0098 912 560 1989

Fax: 0098 361 555 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences May, 2013; Vol. 17, No 2, Pages 188-194

Please cite this article as: Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, Shakib P. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran. Feyz 2013; 17(2): 188-94.

بررسی شیوع ژن‌های شیکاتوکسین و اینتیمین در سویه‌های اشریشیاکلی مولد شیکاتوکسین چدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری در استان لرستان

زهرا عادلی ، فرزانه فیروزه ، محمد زیبایی ، پگاه شکیب  
۴ ۳ \*۲ ۱

خلاصه:

**سابقه و هدف:** اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین یکی از پاتوژن‌های مهم ایجاد کننده بیماری‌های متصل شونده از طریق مواد غذایی می‌باشد که ممکن است منجر به بروز سندروم‌های خطرناکی مانند سندروم اورمی همولیتیک در انسان گردد. تاکنون مواردی از بروز اورمی همولیتیک متعاقب عفونت‌های ادراری گزارش شده است. هدف از این پژوهش بررسی ژن‌های *eaeA*, *stx2*, *stx1* در سویه‌های اشریشیا کلی، جدا شده از نمونه‌های ادراری، در شهرستان الشتی، استان لرستان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۴۴ جدایه باکتریایی عامل عفونت ادراری در مدت شش ماه از سه بیمارستان در شهرستان الشتر جمع‌آوری گردید. پس از کشت نمونه‌های فوق در محیط‌های افتراقی، اختصاصی و استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، از میان آن‌ها، تعداد ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلی تعیین هویت گردید. با استفاده از روش Multiplex PCR و پرایمرهای اختصاصی حضور ژن‌های *stx1*, *stx2* و *eaeA* مورد ارزیابی، قرار گفت.

نتایج: از ۱۰۰ جدایه اشریشیا کلی مورد بررسی، تعداد ۲ جدایه (۲ درصد) دارای ژن‌های *stx*۲ و *eaeA* بودند. یک جدایه (۱ درصد) دارای ژن *stx*۱ بود و هیچ جدایه‌ای، با هر سه ژن مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** جداسازی اشریشیا کلی های تولیدکننده شیگاتوکسین مانند سروتیپ های H7 O157: H7 و غیر H7 O157: O157 از عفونت های ادراری به دلیل امکان ایجاد سنдрوم های کلینیکی خطرناک مانند سندروم اورمی همولیتیک از اهمیت زیادی برخوردار است و لزوم بررسی های بیشتر در این زمینه با استفاده از روش های سریع و دقیق مانند روش های مولکولی را نشان می دهد.

**واژگان کلیدی:** اشریشیا کلی، شیگاتوکسین، اینتیمین، عفونت ادراری

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فرض، دوره مقدمه، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۱۴۶-۱۸۸

سایر سروتیپ‌های تولیدکننده شیگاتوکسین مانند سروتیپ‌های غیر O157: H7 نیز در بسیاری از موارد تک‌گیر و یا طغیان عامل بیماری و نیز سندروم اورمی همولیتیک گزارش شده است. جداسازی سروتیپ‌های غیر O157: H7 از موارد بیماری یک روند رو به افزایش داشته است [۲]. اگرچه جداسازی STEC خارج روده‌ای کمتر گزارش شده است، اما مواردی از عفونت ادراری که منجر به سندروم اورمی همولیتیک شده است نیز گزارش گردیده است [۳]. سویه‌های اشریشیاکلی و روتوكسیزئنیک (VTEC) توکسینی ترشح می‌کنند که به دلیل توانایی آن در کشتن سلول‌های vero، وروتوکسین و بدلیل شباهت آن به نوروتوکسین شیگاکی مترشحه از شیگلا دیساتری تیپ I، توکسین شبیه شیگاتوکسین شده و سویه‌های تولیدکننده آن نیز به STEC معروف می‌نمایدند [۴]. ژن تولیدکننده وروتوکسین بر روی ژنوم باکتریوفاژ معمدل قرار دارد و توسط تبدیل فاژی به اشریشیاکلی وارد می‌گردد [۴]. توکسین‌های ورو به دو گروه *STX*<sub>1</sub>, *STX*<sub>2</sub> تقسیم‌بندی می‌شوند، وروتوکسین با اثر بر روی RNA ریبوزومی سبب میانعت از سنتز پروتئین‌ها می‌شود [۶,۵] توانایی باکتری اشریشیاکلی، O157:H7 در ایجاد بیماری‌های شدید برای انسان‌ها، بدلاً

مقدمه

سویه‌های اشريپسیاکلی مولد شیگاتوکسین (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) بیماری‌زای منتقل شونده به وسیله مواد غذایی هستند. این سویه‌ها می‌توانند علاوه بر ایجاد مسمومیت غذایی، عامل بیماری‌های شدیدی مانند اسهال خونی، کولیت خونریزی دهنده، و سندرروم اورمی همولیتیک باشند. بیشترین موارد کولیت خونریزی دهنده و سندرروم اورمی همولیتیک مربوط به سروتیپ HV ۰۱۵۷: Mی‌باشد که به عنوان مهم‌ترین سروتیپ این سویه در نظر گرفته می‌شود.<sup>[۱]</sup>

۱ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان  
۲ استادیار، گروه میکروب شناسی و اینمی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی  
کاشان

۳- استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی راستان  
 ۴- کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی راستان

\*شانل نویسنده مسئول؛ کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه

۱۹۴۸-۱۹۴۹ میلادی

سایت اکتمندی: [ffiroozeh@ut.ac.ir](mailto:ffiroozeh@ut.ac.ir)

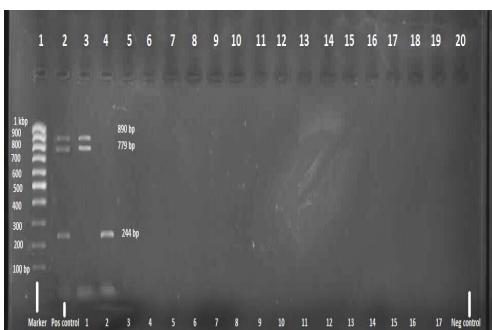
۹۱/۸/۲۳ تاریخ دریافت؛ ۹۱/۱۲/۳ تاریخ پذیرش نهادی؛

توصیه می‌گردد [۱۵]. با توجه به نکات اشاره شده فوق و این که مطالعات بر روی فراوانی این سویه‌ها در ایران محدود بوده و در اکثر آنها صرفاً از روش کشت برای شناسایی استفاده شده است [۱۶]، هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوه ژن‌های *stx1*, *stx2*, *eaeA* در سویه‌های /شريشيا/ کلی مولد شیگا توکسین جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری در استان لرستان می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطوعی تعداد ۱۴۴ نمونه عفونت ادراری باکتریایی از بیمارستان امام خمینی و درمانگاه شهید ابراهیم حسنوند در شهرستان الشتر به مدت شش ماه (اسفند ۱۳۹۰-لغایت مرداد ۱۳۹۱) جمع آوری شد. پس از کشت نمونه‌های فوق در محیط‌های افتراقی، اختصاصی و استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، تعداد ۱۰۰ جدایه /شريشيا/ کلی تعیین هویت گردید [۱۷]. جهت انجام مراحل بعدی مطالعه، سویه‌های جدا شده در محیط تریپتوکسیس سوی براث (TSB) حاوی ۴۰ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج و تخلیص DNA: جهت استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج DNA شرکت تکاپو زیست استفاده شد. پس از استخراج با دستگاه اسپکتروفتومتر، UV و الکتروفورز، بررسی کمی و کیفی بر روی کلیه نمونه‌های استخراجی صورت گرفت. محصول استخراج تا زمان انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آزمون PCR چند گانه: در این تحقیق از بافر و PCR Taq DNA پلیمراز شرکت سیناژن استفاده شد. برای انجام PCR از دو جفت پرایمر اختصاصی به ژن‌های شیگاتوكسین‌ها به نام‌های PCR VT1a, VT1b و VT2a, VT2b (stx1) و نیز پرایمر اختصاصی به ژن /یتیمین (eae) استفاده گردید. پرایمرها توسط شرکت سینا ژن تهیه شده و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده آماده‌سازی گردید. جدول شماره ۱ توالی الیکونوکلئوتیدی سه جفت پرایمر مورد استفاده برای ژن‌های هدف و اندازه محصولات PCR تقویت شده، را نشان می‌دهد [۱۸]. جهت انجام آزمون PCR چند گانه، حجم نهایی واکنش PCR ۵۰ میکرولیتر تهیه گردید و شامل موارد زیر بود: ۱۰ میلی‌مolar بافر Tris-HCL، ۳ میلی‌مolar Taq DNA کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مolar dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۴ میکرولیتر DNA الگو. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne, Initial UK) با شرایط: حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه (denaturation) ۳۰ سیکل شامل: حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۴ دقیقه (Denaturation)، حرارت ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه (Annealing)، حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه (extension).

ترشح شیگاتوكسین‌های *stx1* و *stx2* یا وروتوکسین‌ها (VT1, VT2) و واریته‌های این توکسین‌ها است [۷]. یکی دیگر از عوامل بیماریزای این سویه، پروتئینی به نام ایتیمین (Intimin) است که یک پروتئین ۹۴ kDa غشای خارجی بوده و به‌وسیله ژن *eae* کد می‌شود. این پروتئین مسئول اتصال نزدیک باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده و ایجاد آسیب طی مکانیسم‌های خاصی به نام اتصال و محو شدن است [۷]. آلدگی با باکتری /شريشيا/ کلی H7: O157: اغلب بدليل مصرف مواد غذایی آلدوده مانند انواع گوشت و گوشت چرخ کرده، ساندویچ‌های گوشتی، شیر خام و پاستوریزه آلدوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، سبزیجات و آب میوه‌ها ایجاد می‌شود [۸]. شناسایی این سویه‌ها به‌طور معمول در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌شود و پژوهشگران در صدد یافتن راه‌های ساده برای غربالگری این باکتری هستند. یکی از روش‌های استاندارد شناسایی توکسین ورو، کشت سلولی و اثر سیتو توکسیک توکسین بر روی سلول‌های ورو می‌باشد. این روش آهسته بوده، استاندارد کردن آن مشکل است و نیاز به تجربه و مهارت‌های خاصی دارد. علاوه بر آن به امکاناتی نظری کشت سلولی، آنتی-توکسین ورو جهت خشی کردن و تشخیص نوع توکسین نیاز دارد. سروتیپ‌های متعددی در ارتباط با تولید توکسین شناخته شده‌اند و بهره‌گیری از تست‌های سرولوژیک جهت تعیین هویت سروتیپ‌ها فرآیندهای زمان‌بر است و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نمی‌باشد [۱۰,۹]. سروتیپ H7: O157: مهم‌ترین سروتیپ در گروه /شريشيا/ کلی انتروهموراژیک به شمار می‌رود و در بیشتر کشورها به عنوان عامل اصلی عفونت شناخته شده است [۱۱]. جداسازی اشیشیا کلی در آزمایشگاه بر اساس دو ویژگی عدم تخمیر سریع سوربیتول و عدم توانایی تولید بتاگلوکورونیداز انجام می‌شود که به جداسازی فتوتیپی /شريشيا/ کلی H7: O157 از سویه‌های دیگر کمک می‌کند. بر همین اساس می‌توان از محیط‌های سوربیتول مک کانکی آگار و کروم آگار اختصاصی O157 به منظور شناسایی باکتری استفاده نمود [۸]. بهمنظور ژنتیک پینگ و بررسی هم‌زمان ژن‌های بیماری زای این باکتری، برخی محققین با استفاده از روش Multiplex PCR پرایمرهای مختلفی را برای تشخیص این ژن‌ها پیشنهاد نموده‌اند [۱۲-۱۴]. جداسازی سروتیپ‌های غیر H7: O157: از موارد اورمی همولیتیک روند رو به افزایش داشته است [۱۵]. بررسی شیوع بیماری‌های ایجاد شده به‌وسیله سروتیپ‌های غیر H7: O157: دشوار بوده زیرا این سروتیپ‌ها سوربیتول مثبت می‌باشند و محیط‌های اختصاصی جهت تعیین هویت آنها وجود ندارد، لذا جهت تعیین هویت آنها بهره‌گیری از روش‌های مولکولی بر اساس ژن‌های ویرولاس نظری *stx*



شکل شماره ۱- نمایش باندهای مربوط به ژن‌های شیگاتوکسین و ایتیمین تعیین شده با روش PCR Multiplex با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز. ردیف ۱: مارکر ۱۰۰ bp. ردیف ۲: کنترل مثبت دارای هر سه ژن *stx1*, *eaeA*, *stx2*, *stx2* با اندازه‌های به ترتیب ۲۴۴، ۷۷۹ و ۸۹۰ جفت باز. ردیف ۳: جدایه/اشتریشیا کلی که دارای ژن *stx1*, *stx2*, *eaeA* است. ردیف ۴: جدایه/اشتریشیا کلی که دارای ژن *stx1* است. ردیف‌های ۵ تا ۱۹: جدایه‌های/اشتریشیا کلی بیماران با عفونت ادراری که فاقد ژن-های مورد بررسی می‌باشند. ردیف ۲۰: کنترل منفی.

### بحث

خانواده انتروباکتریاسه به ویژه اشتریشیا کلی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت ادراری می‌باشد [۱۹]. در مطالعه حاضر بیشترین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری، باکتری اشتریشیا کلی با فراوانی ۶۹/۴ درصد بوده و سایر عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری به ترتیب فراوانی شامل کلیسیلا پنومونیه (۱۶/۷ درصد)، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی (۹/۱ درصد)، انترو باکتر ۳/۲ درصد، گونه‌های پروتئوس (۰/۸ درصد) و سودومونناس اثروژنیوزا (۰/۸ درصد) می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط کلانتر و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۴۳۸ نمونه عفونت ادراری کودکان با کشت مثبت که در ۱۲ استان ایران انجام پذیرفته است، اشتریشیا کلی بیشترین پاتوزن جدا شده با میزان ۵۴/۸ درصد و پس از آن کلیسیلا پنومونیه با ۱۶ درصد، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی با ۱۱/۶ درصد، گونه‌های انتروباکتر با ۹/۶ درصد، گونه‌های پروتئوس با (۱/۴ درصد) و سودومونناس اثروژنیوزا با فراوانی ۱/۴ درصد) گزارش شده است [۱۹]. نتایج بدست آمده از نظر اولویت جداسازی عامل عفونت ادراری با نتایج مطالعات فوق هماهنگی دارد. فراوانی بیشتر مربوط به اشتریشیا کلی می‌تواند مربوط به این باشد که مطالعه فوق تنها بر روی گروه سنی کودکان انجام پذیرفته اما مطالعه حاضر تمامی گروه‌های سنی را در بر می‌گیرد. جداسازی اشتریشیا کلی تولیدکننده شیگاتوکسین از عفونت‌های ادراری در موارد اندکی صورت می‌پذیرد، اما مطالعات انجام شده در مناطق مختلف دنیا نشان دهنده مواردی از بروز سندروم‌های

(Annealing) ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (Final extension) انجام پذیرفت. جهت مشاهده باندهای PCR مربوط به ژن‌های تکثیر شده، ۱۰ میکرولیتر از محصول در چاهک‌های تعییه شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال داده شد و پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط دستگاه Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش واکنش زنجیره پلیمراز از DNA سویه استاندارد اشتریشیا کلی O157:H7 که از انتستیتو پاستور ایران تهیه گردیده بود و دارای هر سه ژن ویرولانس *eaeA*, *stx2*, *stx1* بود به عنوان کنترل مثبت و همچنین از ترکیبات PCR بدون افزودن DNA الکو به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

### نتایج

نتایج بررسی فراوانی عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری باکتریال در این مطالعه نشان داد از مجموع ۱۴۴ جدایه باکتری عامل عفونت ادراری ۱۰۰ جدایه اشتریشیا کلی، ۲۴ جدایه کلیسیلا پنومونیه، ۱۳ جدایه استافیلوکوک کواگولاز منفی، ۵ جدایه گونه‌های انترو باکتر و گونه‌های پروتئوس و سودومونناس اثروژنیوزا هریک یک جدایه تشخیص داده شدند. نتایج آزمون PCR چند گانه جهت بررسی ژن‌های *stx1*, *stx2*, *eaeA* روی جدایه‌ای اشتریشیا کلی نشان داد که از بین ۱۰۰ جدایه مورد آزمایش، ۲ جدایه به صورت همزمان دارای هر دو ژن *stx2* و *eaeA* بودند و یک جدایه دارای ژن *stx1* بود؛ به طوری که ژن‌های *stx2* و ژن *stx1* با فراوانی ۱ درصد یک دارای فراوانی ۲ درصد بوده و ژن *stx1* با فراوانی ۱ درصد شناسایی گردید. همچنین، هیچ جدایه‌ای که هر سه ژن مورد بررسی را به صورت همزمان دارا باشد، به دست نیامد. بررسی نمونه کنترل مثبت باندهای با اندازه‌های *eaeA*, *stx2*, *stx1* را ۸۹۰ bp, ۷۷۹ bp, ۲۴۴ bp پس از ترتیب مربوط به ژن‌های *eaeA*, *stx2*, *stx1* می‌باشد (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱- توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده در

### Multiplex PCR

نام پرایمر	توالی الگونوکلئیدی	اندازه محصول
stx1-F	CGATGTTACGGTTGTACTGTGACAGC	۲۴۴ bp
stx1-R	AATGCCACGCTTCCAGAATTG	۲۴۴ bp
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	۷۷۹ bp
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	۷۷۹ bp
<i>eaeA</i> -F	GTGGCGAATACTGGCGAGACT	۸۹۰ bp
<i>eaeA</i> -R	CCCCATTCTTTCACCGTCG	۸۹۰ bp

بوده، همچنین، یک روند رو به افزایش داشته است [۲۴]. تخمین زدن شیوع بیماری ناشی از سویه‌هایی مانند Non-O157:H7 STEC بسیار پیچیده می‌باشد و نیاز به بررسی مولکولی حضور ژن‌هایی نظری *stx1* و *stx2* دارد، زیرا این سروتیپ‌ها معمولاً سورپریبول مثبت می‌باشند، از طرفی محیط‌هایی مانند مک کانکی سورپریبول آگار جهت تعیین هویت آنها موجود نمی‌باشد [۲۴]. تخمین زده شده است که بین ۲۰ تا ۲۵ درصد از موارد HUS در آمریکای شمالی ناشی از سروتیپ‌های غیر O157:H7 باشد [۲۴]. در یک مطالعه در بلژیک، ۶۲ درصد اشتباهیکلی مولد شیگاتوکسین مربوط به سروتیپ Non-O157:H7 بوده‌اند [۲۵]. در بررسی که در تهران بر روی نمونه‌های عفونت ادراری با استفاده از روش PCR انجام شده است، نتایج نشان داد از ۱۸۰ ژن‌دایه *E. coli* ۲۴ درصد نمونه‌ها متعلق به سروتیپ O157 و ۷۶ درصد مربوط به سروتیپ غیر O157 بوده‌اند [۲۱]. در یک مطالعه‌ی دیگر که در اسپانیا انجام گرفت، شیوع سروتیپ‌های Non-O157:H7 جدا شده از دام بسیار بالاتر از سروتیپ‌های O157:H7 بودست آمد [۲۴]. از فاکتورهای ویرولانس دیگر جهت تشخیص سویه‌های پاتوژنیک تولید/یتیمین می‌باشد که از طریق بررسی ژن *eaeA* امکان‌پذیر است. در یک مطالعه در ژاپن تقریباً تمامی جدایه‌های اشتباهیکلی تولیدکننده شیگاتوکسین، سروتیپ‌های O157 و غیر O157 جدا شده از گاو دارای ژن *stx* بودند. همچنین، اکثریت آنها حامل ژن *eaeA* تشخیص داده شدند که نشان‌دهنده آن می‌باشد که سروتیپ‌های O157 و غیر O157 جدا شده از گاو می‌توانند برای انسان پاتوژنیک باشند [۲۶]. در بررسی انجام شده در اسپانیا شیوع ژن *stx1* (۹/۷ درصد) و شیوع ژن *stx2* (۴۸/۴ درصد) بودست آمد و ۴۱/۹ درصد از جدایه‌ها دارای هردو ژن *stx1*, *stx2* بودند. همچنین، ژن *stx2* در تمامی سویه‌های اشتباهیکلی O157:H7 و در ۸۸ درصد از سویه‌های O157:H7 یافت گردید و تمامی سروتیپ‌های O157:H7 به غیر از دو جدایه حامل ژن *eaeA* نیز بودند [۲۴]. جداسازی جدایه‌های STEC تولیدکننده *eaeA* همراه با بیماری شدیدی گزارش گردیده است [۲۷]، بنابراین جداسازی ژن *eaeA* به ویژه همراه با ژن *stx2* در مطالعه حاضر حائز اهمیت است.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی جداسازی سویه‌های اشتباهیکلی STEC از نمونه‌های عفونت ادراری در استان لرستان نشان‌دهنده حضور سروتیپ‌های O157: H7 و غیر O157: H7 در این منطقه می‌باشد. جداسازی سویه‌های فوق به دلیل امکان ایجاد عوارض

خطرناکی مانند اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک متعاقب عفونت ادراری می‌باشد [۲۰]. همچنین، موارد بروز عفونت ادراری ناشی از سویه‌های اشتباهیکلی شیگاتوکسین را به افزایش می‌باشد [۲۱]. تشخیص سویه‌های STEC بسیار حائز اهمیت می‌باشد، زیرا می‌تواند منجر به بروز سندروم‌های خطرناکی مانند اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک گردد. بنابراین پیشگیری مناسب در برابر این عفونت بستگی به تشخیص سریع این پاتوژن با بهره‌گیری از روش دقیق و سریع دارد. در مطالعه حاضر از روش Multiplex PCR جهت بررسی ژن‌های ویرولانس نظری تولید شیگاتوکسین و ایتیمین جهت تشخیص سویه‌های تولیدکننده شیگاتوکسین استفاده گردیده است. در مطالعات مختلف از روش‌های متفاوتی جهت تشخیص سویه‌های STEC در نمونه‌های Johnson و بالینی استفاده گردیده است. در بررسی که توسط همکاران در سال ۲۰۰۲ در آمریکا بر روی ۵۹۷ ژن‌دایه اشتباهیکلی جدا شده از عفونت ادراری جهت توانایی تولید شیگاتوکسین‌ها به روش ایمیونواسی انجام شده است، هیچ‌یک از جدایه‌های اشتباهیکلی تولیدکننده شیگاتوکسین یافته نگردیده است [۳]. در مطالعه‌ای که توسط Pulz و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی ۲۹۵ نمونه مدفوع جهت بررسی سویه‌های تولیدکننده *stx*/اشتباهیکلی PCR و ELISA و PCR انجام شده است، روش با روش‌های ایمیونواسی و روش PCR مناسب و مفیدی جهت تشخیص سریع سویه‌های STEC در نمونه‌های کلینیکی معرفی گردیده است [۲۲]. در یک تحقیق دیگر که در سال ۲۰۰۹ در کانادا توسط Gilmour و همکاران جهت جداسازی سویه‌های اشتباهیکلی از روش‌های بررسی اثر سیتوکسیستی در کشت سلولی، ایمیونواسی و روش PCR جهت دست‌یابی به شاخص‌های تولید شیگاتوکسین بر روی ۸۷۶ نمونه مدفوع کودکان استفاده گردیده است، نتایج نشان داده است که روش‌های مولکولی دارای توانایی بالا جهت تشخیص سویه‌های STEC در نمونه‌های بالینی می‌باشند [۲۳]. نتایج مطالعه ما نشان داد که از میان ۱۰۰ ژن‌دایه اشتباهیکلی وارد شده در این بررسی، ۳ ژن‌دایه دارای ژن‌های *stx1*, *stx2* و نیز *eaeA* بوده و به عنوان سویه‌های STEC تعیین هویت گردیدند. از میان آنها یک ژن‌دایه دارای ژن *stx1* و دو ژن‌دایه حضور هم‌زمان ژن‌های *stx2* و *eaeA* را نشان دادند. طبق بررسی‌های انجام شده حضور هریک از ژن‌های *stx1* و یا *stx2* به همراه *eaeA* نشان‌دهنده سروتیپ O157:H7 می‌باشد [۱۲]. بیشتر طغیان‌های بیماری ناشی از سروتیپ‌های O157:H7 بوده است، اما در بسیاری از گزارشات نیز موارد تک گیر و یا طغیان بیماری ناشی از سایر سروتیپ‌های تولیدکننده STEC و سروتیپ‌های غیر O157:H7 عامل بیماری

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد میکروب شناسی می‌باشد. پژوهشگران از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان و کلیهی عزیزانی که در انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند، قدردانی به عمل می‌آورند.

کلینیکی مخاطره‌آمیز مانند سندروم اورومی همولیتیک از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات بیشتر با بهره‌گیری از روش‌های دقیق مولکولی در مناطق مختلف ایران منجر به بالا بردن آگاهی ما از شیوع سروتیپ‌های پر اهمیت فوق گردیده و در مدیریت بیماری و جلوگیری از بروز سندروم‌های خطرناک کلینیکی موثر می‌باشد.

### References:

- [1] Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, et al. Serotypes, virulence genes and *intimin* types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo(Spain) from1995 through 2003. *BMC Microbiol* 2007; 1(7): 1-9.
- [2] Goldwater PN, Bettelheim KA. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med* 2012; 10(12): 1-8.
- [3] Johnson JR, Jerome C, Boster DR, Stapleton AE, Tarr PI. Analysis of urinary *Escherichia coli* isolates for ability to produce shiga toxin. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2247-8.
- [4] Obrig TG. *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. *Toxins* 2010; 2(12): 2769-94.
- [5] Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA. Clonal relationship among *E. coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 1993; 61(5): 1619-29.
- [6] Chart H, Perry NT, Cheasty T, Wright PA. The kinetics of antibody production to antigens of *Escherichia coli* O157 with hemolytic uremic syndrome. *J Med Microbiol* 2002; 51(6): 522-5.
- [7] Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol* 2008; 8(46): 1-8.
- [8] Kim JY, Kim S, Kwon N, Bae WK, Lim JY, Koo HC, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *J Vet Sci* 2005; 6(1): 7-19.
- [9] March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5): 869-72.
- [10] Feng P, Robin C, Choong H, Richard A, Wilson N. Identification of rough strain of *Escherichia coli* O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. *J Clin Microbiol* 1998; 36(8): 2339-41.
- [11] Chahed A, China B, Mainil J, Daube G. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. *J Appl Microbiol* 2006; 101(2): 361-8.
- [12] Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* *hlyA*, *rfbO111*, *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 598-602.
- [13] Pradel N, Liverlli V, Champs CD, Palcoun J, Reynaud A, Scheutz F, et al. Prevalence and characterization of shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1023-31.
- [14] Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in spain. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1351-6.
- [15] Eklund M, Scheutz F, Sitonen A. Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2829-34.
- [16] Sharifi T. Some physiological properties of *Escherichia coli* isolated from urine and feces for detection of enterohemorrhagic strain 7H157O, along with the pattern of antimicrobial resistance of bacteria isolated [Thesis]. Kerman. Kerman University of Medical Sciences. 2001.
- [17] Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Text book of diagnostic microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier; 2006. p. 430-5.
- [18] Santaniello A, Gargiulo A, Borrelli L, Dipinetto L, Cuomo A, Sensale M, et al. Survey of shiga-toxin producing *Escherichia coli* in urban pigeons (*Columba Livia*) in the city of Napoli, Italy. *Ital J Anim Sci* 2007; 6(2): 313-16.
- [19] Kalantar E, Motlagh ME, Lornejad H, Reshadmanesh N. Prevalence of urinary tract pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in children at hospitals in Iran. *Iran J Clin Infect Dis* 2008; 3(3): 149-53.
- [20] Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. 10<sup>th</sup> ed. Hodder Arnold, ASM Press; 2005. p. 1360-85.
- [21] Navidinia M, Karimi A, Rahbar M, Fallah F, Radmanesh Ahsani R, Malekan MA, et al. Study

- prevalence of verotoxigenic *E. coli* isolated from urinary tract infections (UTIs) in an Iranian Children Hospital. *Open Microbiol J* 2012; 6: 1-4.
- [22] Pulz M, MatussekA, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, et al. Comparison of a shiga toxin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4671-5
- [23] Gilmour MW, Chui L, Chiu T, Tracz DM, Hagedorn K, Tschetter L, et al. Isolation and detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in clinical stool samples using conventional and molecular methods. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 7): 905-11.
- [24] Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A. *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain. *Zoonoses Public Hlth* 2008; 55(2): 73-81.
- [25] Pierard D, van Etterijck R, Breynaert J, Moriau L, Lauwers S. Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9(3): 198-201.
- [26] Sasaki Y, Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S, Yamada Y. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. *Vet Microbiol* 2011; 150(1-2): 140-5.
- [27] Fernandez D, Rodriguez EM, Arroyo GH, Padola NL, Parma AE. Seasonal variation of shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J Appl Microbiol* 2009; 106(4): 1260-7.