مقاله تحقیقی

بررسی وجود ژن شیگا توکسین و توکسین مقاوم به حرارت در *اشریشیاکلی* 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: niloofar_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

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۱- بهار ۱۳۹۵

چکیده

باکتری *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی* ایجاد می شود در دو دسته عفونت های روده‌ای و غیرروده‌ای قرار دارند. بیشتر موارد آلودگی به عفونت های غیرروده‌ای مشاهده شده است. تیپ‌های *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک، توانایی تولید یک یا هردو نوع توکسین مقاوم به حرارت و حساس به حرارت را دارند. تیپ‌های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک، توکسین *stx* را تولید می‌کنند که شباهت زیادی به توکسین شیگا دارد. هدف از مطالعه تعیین و بررسی شیوع و توزیع ژن های شیگاتوکسین وتوکسین های حساس ومقاوم به حرارت جدا شده از *اشریشیاکلی* 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 ژن ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از نمونه های بالینی ۱۰۳ باکتری *E.coli* جدا شده از بیماران ۷۲/۸۱٪ متعلق به زنان و۲۷/۱۸٪ متعلق به مردان بودند. فراوانی هر کدام از ژن های *ST1* ۴۸٪، *ST2* ۵۰٪، *Stx1* ۳۸٪ ، *Stx2* ۴۹٪، ۵۱٪ ۴۵٪، ۶۳ و *LT* ۳۳٪ ارزیابی شدند. بیشترین فراوانی ژن های *Stx1* و *Stx2* در *اشریشیاکلی* های جدا شده از نمونه خون مشاهده شد و در سایر نمونه‌های بالینی توزیع تقریبا یکسانی از وجود ژن‌های تولید کننده توکسین وجود داشت. بنابراین احتمال دارد *اشریشیا کلی* های دارای ژن تولید کننده توکسین شیگا در ایجاد عفونت خون اهمیت بیشتری داشته باشند.

واژه های کلیدی : *اشریشیا کلی*، ژن‌های *ST*، ژن‌های *Stx*, ژن *LT* ، نمونه های بالینی

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی* عضو خانواده انتروباکتریاسه است و سویه‌های بیماریزای آن عامل طیف گسترده‌ای از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شامل اسهال، عفونت‌های مجرای ادراری، عفونت کیسه صفرا و مجاری صفراوی، عفونت‌های گوارش، باکتریمی، عفوت زخم، سپتی سمی و مننژیت

نوزادان هستند (۱،۲). حداقل ۱۰ تا ۲۰ درصد زنان یکبار عفونت حاد مجرای ادراری را تجربه می‌کنند. شدت عفونت به باکتری و حساسیت میزبان وابسته است (۳). *اشریشیا کلی* انتروتوکسیژنیک (ETEC) به سویه‌هایی 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 می‌باشند و *اشریشیا کلی*هایی که توکسین تولید می‌کنند، فاکتورهای کلونیزاسیون باکتری که باعث تسریع و افزایش چسبندگی باکتری به سلول های اپی‌تلیال روده کوچک می شود، را تشدید می‌کنند. دو نوع از ST (STa , STb) بر اساس ویژگی های شیمیایی و بیولوژیکی شناخته شده‌اند (۴،۵). *اشریشیا کلی* شیگاتوکسیژنیک (STEC) و انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (EHEC) توکسینی تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی روی سلول های ورو (vero) موثر است (۳). شیگاتوکسین و توکسین‌های شبیه شیگا (وروتوکسین‌ها) متعلق به خانواده بزرگی از توکسین‌های باکتریایی هستند که طی یک روند بیولوژیک باعث مرگ سلول‌ها 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 می‌دهد. بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه میلیون ها نفر ازجمعیت جهان به آن مبتلا هستند و بخشی نیز دچار مرگ و بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. انتروهموراژیک *اشرشیا کلی* (EHEC) O157: H7 به عنوان *اشرشیا کلی* تولید کننده شیگا توکسین ۲ (STEC) هم شناخته شده است. این سویه باکتریایی مسئول شیوع بیماری‌های منتقله از طریق غذا و اسهال های تک گیر است. مواجهه با STEC در برخی بیمارها بدلیل ایجاد کولیت هموراژیک وسندرم همولیتیک اورمیک (HUS) منجر به مرگ می‌شود. اکثریت طغیان‌های 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 . STECشیگاتوکسین ۱ و ۲ را تولید می کند که هر کدام 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 توکسین‌های حساس و مقاوم به حرارت (*LT,ST*) در اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های بالینی است.

مواد و روش‌ها

روش‌های 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 (ائوزین 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 براث 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.

.

انجام **Multiplex PCR**

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

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

Primer name	Seq.(5-3)
ST1-F	TCCGTGAAACAACATGACGG
ST1-R	ATAACATCCAGCACAGGCAG
ST2-F	GCCTATGCATCTACACAATC
ST2-R	TGAGAAATGGACAATGTCCG
Stx1-F	AGCTGAAGCTTTACGTTTTCGG
Stx1-R	TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA
Stx2-F	TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT
Stx2-R	ATCCTCATTATACTTGGAAAACTCA
LT-F	CCGTATTACAGAAATCTGA
LT-R	GTGCATGATGAATCCAGGGT

جهت واکنش PCR برای پرایمرSTx1,STx2,LT از ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix حاوی بافر ۱۰X،(2Mm) $MgCL_2$،(10mM) dNTP و Taq DNA Polymerase(1.5mM) و پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام 1 µM وDNA 2µM 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 ۳ و ۲) برای ژن های مورد نظر انجام گردید و در نهایت محصول واکنش PCR با استفاده از ژل ۲ درصد و بافر TBE الکتروفورز گردید.

نتایج

فراوانی *اشریشیاکلی* در نمونه های بالینی مختلف

باکتری 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 آبسه، ۱/۹۴٪ نمونه تراشه، ۱/۹۴٪ نمونه آسیت ۱٪/۹۴ نمونه مایع شکمی می باشند (نمودار ۱). از میا 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 م گیرد.

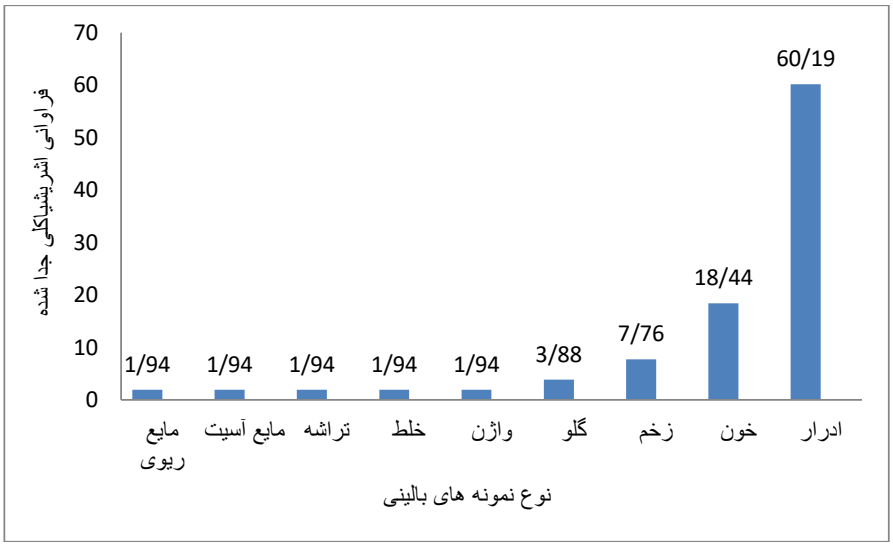
جدول ۲: سیکل دمایی PCR برای دو جفت پرایمر ST1,ST2.

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	∞

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۱- بهار ۱۳۹۵

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

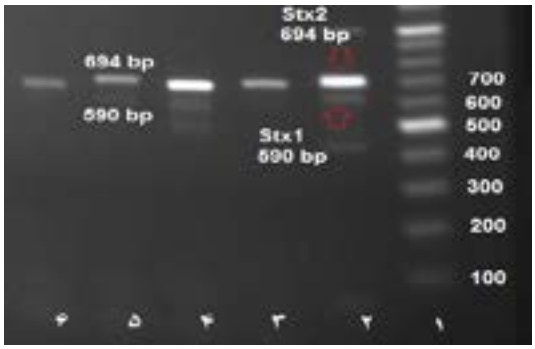
Number	Status	Temprature	Time
1	Initial denaturation	94° C	5 minute
2	Denaturation	94° C	30 second
3	Anneling	60° C	45 second
4	Extention	72° C	30 second
5	Final extention	72° C	2 minute
6	Hold	4° C	∞



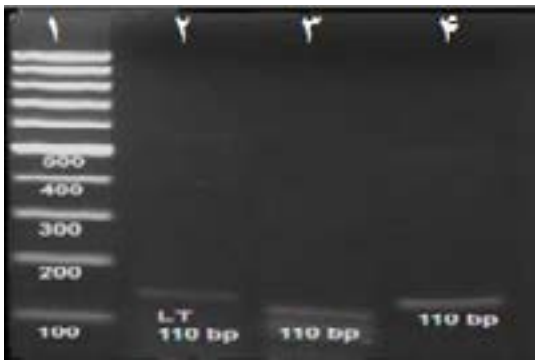
نمودار ۱: فراوانی *اشریشیا کلی* بر حسب نمونه بالینی

نتایج الکتروفورز محصولات Multiplex PCR

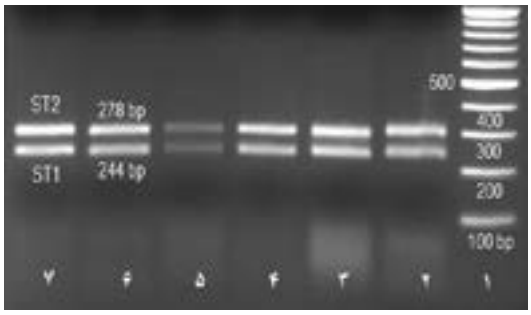
در این مطالعه اندازه قطعات ژن های مورد استفاده *Stx2,Stx1,ST2,ST1* و*LT* به ترتیب ۲۴۴bp، bp۲۷۸ ، ۵۹۰، ۶۹۴bp و ۱۱۰bp می باشند که در شکل۳-۱ نشان داده شده اند.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *stx1,stx2* ستون ۱: مارکر bp100، ستون ۶-۲ : نمونه ها.



شکل۲: الکتروفورز محصول PCR ، تکثیر ژن *LT* باکتری *اشریشیاکلی* در اندازه 110 bp. ستون ۱: مارکر bp100، ستون ۴-۲ : نمونه ها.



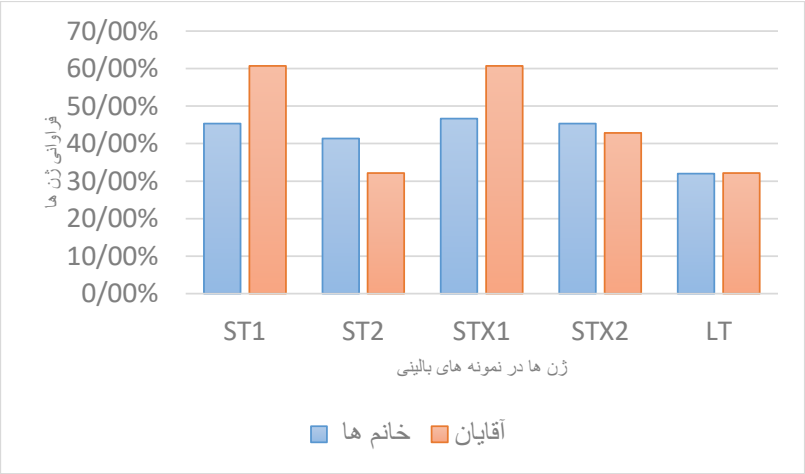
شکل ۳ : الکتروفورز محصول PCR ژن *ST1* و *ST2* . ستون۱ :ladder100bp ، ستون ۷-۲ نمونه ها.

فراوانی تکثیر ژن ها در نمونه های بالینی

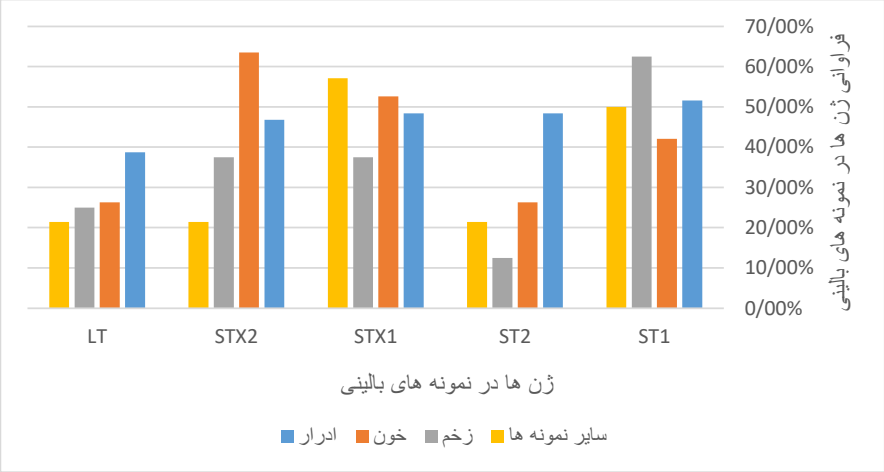
پس از الکتروفورز نمونه ها و آنالیز داده های بدست آمده مشخص گردید که ژن های مورد مطالعه Stx2, *Stx1, ST2, ST1*و*LT*, هر کدام به ترتیب با فراوانی ۴۹/۵۱، ۴۵/۶۳، ۳۷/۸۶، ۵۰/۴۸ و ۳۳ درصد تکثیر شده‌اند (نمودار ۲)، که بیشترین تعداد مربوط به ژن مقاوم به حرارت *ST1* می باشد که بیشترین تکثیر را داشته است، در درجه دوم ژن تولید کننده شیگا توکسین *Stx2* سپس ژن *Stx1, ST2* و*LT* می باشد. فراوانی ژن ها در زنان به ترتیب ۴۵/۳۳، ۴۱/۳۳، ۴۶/۶۶، ۴۵/۳۳ و ۳۲ درصد، در مردان ۶۰/۷۱، ۲۸/۵۷، ۶۰/۷۱، ۴۲/۸۵ و ۳۲/۱۴ درصد مشاهده گردید (نمودار ۲). در ۶۲ نمونه ادراری مورد مطالعه فراوانی ژن های *Stx2,Stx1,ST2,ST1*و *LT* به ترتیب ۵۱/۶۱، ۴۸/۳۸، ۴۸/۳۸، ۴۶/۷۷ و ۳۸/۷۰ درصد ، در ۱۹ نمونه کشت خون به ترتیب ۴۲/۱۰، ۲۶/۳۱، ۵۲/۶۳، ۶۳/۵ و ۲۶/۳۱ درصد ، در ۸ نمونه مربوط به کشت زخم ۶۲/۵، ۱۲/۵، ۳۷/۵ ، ۳۷/۵ و۲۵ درصد ، در ۱۴نمونه (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 *Stx2,Stx1,ST2,ST1* 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، ۹/۶۷ و ۹/۶۷ درصد (نمودار ۳) مشاهده گردید. از نمونه های خون جدا شده در خانم ها ۲۱/۰۵، ۱۵/۷۸، ۴۲/۱۰، ۴۲/۱۰ و ۱۵/۷۸ در آقایان ۲۱/۰۵، ۱۰/۵۲، ۱۰/۵۲، ۲۱/۰۵ و ۱۰/۵۲ درصد، از نمونه های زخم جدا شده در خانم ها ۳۷/۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۲۵و ۱۲/۵ ، در آقایان ۲۵، ۰، ۱۲/۵، ۱۲/۵و ۱۲/۵ درصد، از سایر نمونه های جدا

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۱- بهار ۱۳۹۵

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



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



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

بحث

خانواده انترو‌باکتریاسه به ویژه *اشریشیاکلی* از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت ادراری می باشند (۱۰). در مورد فراوانی شیوع *اشریشیاکلی* در ایران اطلاعات محدودی وجود دارد، زیرا اغلب آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به صورت روزمره این ارگانیسم را ردیابی نمی‌کنند و نتایج اغلب پژوهش‌های انجام شده نشان دهنده حضور موارد تک گ باکتری می باشد (۱۱). اما درکشورهای توسعه یافته توج بیشتری به این باکتری شده و تصویر نسبتا 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

۱۹۹۷ در قاره اروپا ، در سال ۱۹۹۷ در امریکا ، 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 ازگروه های سنی ، فراوانی شیوع این باکتری بالاتر از دیگر پاتوژن های روده‌ای می باشد. *اشریشیاکلی* تولید کننده شیگاتوکسین یکی از عوامل بیماری‌زای تولید شده توسط شیگلا و اشریشیاکلی می باشد که برای اولین بار در بیوتایپ ۱ *شیگلا دیسانتری* مورد شناسایی قرار گرفت که علاوه بر اثرات مخرب بر دستگاه گوارش خصوصا روده از طریق خون به سیستم عصبی مرکزی نیز انتقال یافته و اثرات مخربی را ایجاد می‌کند (۶). برای شناسایی این ژن‌ها از تکنیک PCR که امروزه از آن به طور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده‌ای 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 Tm 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 آن را دارا نمی باشند. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه تقریبا 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 تقریبا از نظرآماری 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 سال۱۳۸۷ 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٪ نمونه‌های زنان و ۲۷/۱۸٪ نمونه‌های 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 نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که حضور ژن های تولید کننده شیگاتوکسین تقریبا با مطالعات ذکر شده همخوانی دارند و ژن مقاوم به حرارت *ST1* در *اشریشیاکلی* تولید کننده توکسین بیشترین درصد را در نمونه‌های بالینی داشته است. ناظمی ۱۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری را بررسی کرد و فراوانی ژن ها را ۱۰و۶ 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

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 *stx2*، stx1 و*LT* از نمونه های ادرار قابل جدا سازی است و سویه های ETEC و STEC با زخیره 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 نتایج سایر محققان می باشد و بیشترین ژن در نمونه های ادراری *ST1* 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 ژن‌های 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 ودر انجام این پروژه همکاری نموده صمیمانه تقدیر و تشکرمی نمایم.

منابع مورد استفاده

1. 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 373: 5-50.
2. 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.
3. Mainil, J., Daube, G., 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods :who's who? Journal of Applied Microbiology 98(6): 1332-44.
4. 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.
5. 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.
6. Paton, J. C., Paton, A. W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clinical Microbiology Reviews 11(3): 450-79.
7. Sandvig, K., 2001. Shiga toxins. Toxicon 39(11): 1629-35.
8. 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.
9. Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Tauxe, R. V., Greene, K. D., Wells, J. G., Lewis, J. H., 1998. Illnesses associated with Escherichia coli 0157: H7 infections: a broad clinical spectrum. Annals of Internal Medicine 109(9): 705-12.
10. 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.
11. 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 Micribiology 1(3): 39-46.
12. 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 Ecoli 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 0157 antigenes in urine *E. coli* isolated of Tehran. The First International Congress of Medical Bacteriology. Tabtiz 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.