

The Molecular Prevalence of *stx1*, *stx2* and *eaeA* and *hly* Genes from *Escherichia Coli* Isolated from Fecal Specimens of Rafsanjan Health Centers Using Multiplex PCR

Venus Sadeghi¹, Kumarss Amini^{2*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

² Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Abstract

Introduction: *Escherichia coli* is a normal flora of warm-blood animals digestive tract. Most strains of bacteria are not pathogenic; however, some strains can cause a variety of diseases. Intestinal and extraintestinal human infections caused by the contaminated food and water. The present study aimed to investigate the molecular genes *stx1*, *stx2*, *eae A*, *hly* of *Escherichia coli* isolated from human sources by Multiplex PCR method.

Methods and Materials: 55 fecal samples were collected from patients having diarrhoea symptoms in Ali ibn Abitalib hospital and several private medical diagnostic laboratories in Rafsanjan. After enriching and isolating the bacteria and extracting DNA, *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *hly* genes were evaluated by multiplex PCR method.

Results: Based on the results of molecular analysis of 55 human samples, 10 samples (18.1%) *Stx2* gene and 4 (5.45%) *Stx1* gene were identified. Other genes of *eaeA* and *hly* were not detected in any of the samples.

Discussion and Conclusion: Detection of *Escherichia coli* strains using molecular methods can be accomplished quickly and accurately. Moreover, considering these genes and the profile of antibiotics is recommended in various other sources.

Keywords: *Escherichia coli*, Stool, Virulence genes, Multiplex PCR.

*(Corresponding Author) Kumarss Amini, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

شیوع مولکولی ژن های *stx1*, *stx2*, *eae A*, *hly* از اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های مدفوع مراکز درمانی شهر رفسنجان با روش MultiplexPCR

ونوس صادقی^۱، کیومرث امینی^{۲*}

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اشریشیاکلی فلورنرمال مجاری گوارشی بیشتر جانوران و نیز انسان است. اغلب سویه های باکتری، بیماری را نیستند اما بعضی سویه های پاتوژنیک می توانند موجب انواعی از بیماری های روده ای و خارج روده ای شوند، که عفونت های ایجاد شده ناشی از مصرف آب و غذای آلوده می باشد. هدف از این مطالعه با توجه به اهمیت بهداشت عمومی و شناسایی عوامل حداث باکتری اشریشیاکلی، ارزیابی شیوع ژن های *stx1* و *stx2* و *eaeA* و *hly* در نمونه های مدفوع انسانی ضروری می باشد. مواد و روش ها: در این پژوهش ۵۵ نمونه مدفوع انسانی دارای علائم اسهال، از بیمارستان علی بن ابیطالب (ع) رفسنجان و چند آزمایشگاه تشخیص طبی خصوصی این شهر جمع آوری شد و پس از غنی سازی و جداسازی باکتری و استخراج DNA ژن های *stx1* و *stx2* و *eaeA* و *hly* با روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. یافته ها: بر طبق نتایج آزمون مولکولی از مجموع ۵۵ نمونه انسانی، در ۱۰ نمونه (۱/۱۸٪) ژن *stx2* و ۳ نمونه (۵/۴۵٪) ژن *stx1* شناسایی شد. سایر ژن ها *eaeA*, *hly* در هیچ یک از نمونه ها ردیابی نگردید. نتیجه گیری: تشخیص سویه های اشریشیاکلی با روش های مولکولی بسیار دقیق و با سرعت انجام می گردد بررسی ژن های ذکر شده در منابع مختلف دیگر و بررسی پروفایل آنتی بیوتیکی پیشنهاد می گردد. واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، مدفوع، ژن های بیماری زا، Multiplex PCR

مقدمه

و دام متصل شوند و ایجاد ضایعاتی به نام A/E^۲ نمایند (۱). قابلیت ایجاد ضایعات A/E به وسیله ژن هایی کد می شود که این ژن ها در منطقه ژنی بیماری زایی باکتری قرار دارند. از جمله پاتوتیپ های خاص، پاتوتیپ های انتروپاتوژنیک می باشند که در منطقه ژنی LEE دارای ژن *eae* می باشند که پروتئین با وزن مولکولی ۹۴ کیلودالتون تولید می کنند که قابلیت اتصال به انتروسیت ها و ایجاد ضایعات A/E را دارد (۲). اشریشیاکلی O1۵۷: H۷ از مهم ترین سروتیپ سویه های اشریشیاکلی تولیدکننده شیگاتوکسین می باشد. آلودگی به این باکتری به دلیل مصرف مواد غذایی آلوده مثل انواع

اشریشیاکلی یکی از مهم ترین باکتری های فلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات خونگرم و انسان می باشد. عامل های بیماری زای اشریشیاکلی بر اساس خواص و عوامل حداث به چند پاتوتایپ تقسیم می شوند که یکی از آن ها اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین (STEC) که از مدفوع طیور و حیوانات سالم به محیط، آب و غذا منتقل شده و باعث بیماری در انسان می گردند. سویه های STEC قادرند دو نوع شیگاتوکسین *stx1* و *stx2* را تولید نمایند. پاتوتیپ های خاصی از اشریشیاکلی قادرند به پرزهای سلول های انتروسیت انسان

* (نویسنده مسئول) کیومرث امینی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
آدرس الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com همراه: ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴ تلفن: ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

و کاهش زمان بررسی های ژنتیکی و الگوهای مورد نیاز با چند جفت آغازگر به صورت عمومی و اختصاصی و با قابلیت اعتماد و سرعت بالا برای شناسایی مولکولی پاتووارهای اشریشیاکلی به کار می رود (۷). هدف از انجام تحقیق بررسی مولکولی ژن های *stx1*, *eae hly*, *stx2* از اشریشیاکلی جدا شده از منابع انسانی با روش Multiplex PCR می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪، با استفاده از فرمول $n = Z^2 P(1-P) / d^2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، نمونه های مدفوع مورد نیاز برای انجام این بررسی از مرکز درمانی بیمارستان علی بن ابیطالب (ع) رفسنجان و چند آزمایشگاه تشخیص طبی خصوصی در سه ماه اول سال ۱۳۹۵ جمع آوری گردید. پس از کشت نمونه ها بر روی محیط های مک کانکی آگار و استفاده از محیط های افتراقی مانند TSI, SIM, MRVP, سیمون سیترات، اوره آگار، طبق جدول تشخیص میکروب شناسی در نهایت از مجموع ۳۰۰ نمونه جمع آوری شده (نمونه های مدفوع) ۵۵ نمونه اشریشیاکلی تشخیص داده شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت استخراج باکتری های گرم منفی شرکت سیناژن (CinnaPure DNAKIT-PR/۸۸۱۶۱۳) استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده است (۱۸). برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه می باشد. مخلوط های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می باشد: آب مقطر ۱۲/۷ میکرولیتر، PCR buffer ۱X، به میزان ۲ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۰/۵ میکرولیتر، dNTP mix (۵Mm) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به میزان ۰/۳ میکرولیتر، نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید (۱۸). بعد از انجام آزمون Multiplex-PCR در دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی محصول نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و با

گوشت چرخ کرده، ساندویچ، شیر خام، سوسیس، کالباس، میوه و سبزیجات می باشد که گاو مخزن اصلی این باکتری می باشد (۴)، (۳). فاکتورهای بیماریزایی سویه های STEC شامل دو سیتوتوکسین قوی به نامهای *stx1* و *stx2* که توسط فاژ کدگذاری می شوند. ژن *stx2* دارای چندین نوع است که عبارت اند از *stx2C* و *stx2d* که توسط ایزوله های STEC انسانی تولید می شوند و *stx2e* در STEC خوکی و *stx2f* در STEC کبوتر وحشی دیده شده است (۵). عوامل بیماریزای دیگر شامل پروتئینی به نام اینتیمین *intimin* که مسئول اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال روده است و باعث آسیب های اتصال/محو شدن در مخاط روده می شود که توسط ژن *eae* کدگذاری می شود و عامل همولیزین که توسط ژن *hly* کدگذاری می شود (۶). گاستروانتریت ایجاد شده توسط گروه ETEC به واسطه تولید انتروتوکسین های حساس به حرارت ($LT_{a,b}$) و مقاوم به حرارت ($ST_{a,b}$) می باشد. پاتوتیپ اشریشیاکلی انترواگریگیتیو (*enteroaggregative E. coli*) عامل اسهال مزمن و حاد در کشورهای در حال توسعه می باشد و بیشترین موارد اسهال ایجاد شده توسط این سویه در جنوب آسیا اتفاق می افتد. سروتیپ خاصی از EAEC در آزمایشگاه قادر به تشکیل میکروکلنی های چسبنده روی سلول های *human laryngeal epithelium* = HLE بوده و با اسهال غیر خونی حاد مرتبط است و بنام *Localized adherent E. coli* مشهور است. همچنین EAEC به سلول های HEP اپیتلیال کولون وصل شده و این عمل در روده از طریق فیمبری صورت می گیرد. این ارگانسیم ژن ها *eae* را ندارد و ضایعات اتصال شونده- پاک کننده *attaching and effacing lesion* را ایجاد نمی کند (۶). باکتری های گروه EIEC به طور اساسی در کشورهای در حال توسعه و به صورت نادر در آمریکا دیده می شود و بچه ها و مسافران را در این کشور بیمار می کند (۱۰). اسهال آبکی ایجاد شده معمولاً خود محدوده شونده است ولی می تواند تحت شرایطی مزمن شود. این سروتیپ در روده افراد طبیعی وجود ندارد ولی در مبتلایان زیاد دیده می شود (۸). تاکنون بیش از ۲۰۰ تیپ مختلف اشریشیاکلی گزارش شده اند که شیگاتوکسین تولید می کنند و تعداد زیادی از آن ها با بیماری های انسان ارتباط دارند (۹). در روش مولتی پلکس PCR به دلیل استفاده از چند آغازگر توانایی ازدیاد و شناسایی چندین ژن هم زمان با هم وجود دارد، صرفه جویی در مواد لازم، ویژگی و حساسیت

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون Multiplex-PCR (۱۸)

پرایمر	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن هدف	طول محصول (bp)
AE۲۲	ATTACCATCCACACAGACGGT	eaeA	۳۹۷
AE۲۰-۲	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	eaeA	
MFS۱-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	hly	۱۶۶
MFS۱-R	CTTCACGTCACCATACATAT		
SLT۱-F	TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACA	Stx _۱	۲۱۰
SLT۱-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC		
SLT۱۱-F	GTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	Stx _۲	۴۸۴
SLT۱۱-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC		

اندول مثبت، می‌باشد. بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژن stx_۲ با ۱۸/۱ درصد در ۱۰ نمونه بوده است. در صورتی که ژن stx_۱ در ۳ نمونه به میزان ۵/۴۵ درصد گزارش گردید. همچنین نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ژن‌های eaeA و hly نشان داد که در هیچ یک از نمونه‌ها ژن eaeA با اندازه ۸۹۰ جفت باز و ژن hly با اندازه ۱۶۵ جفت باز شناسایی نگردید (تصویر ۱).

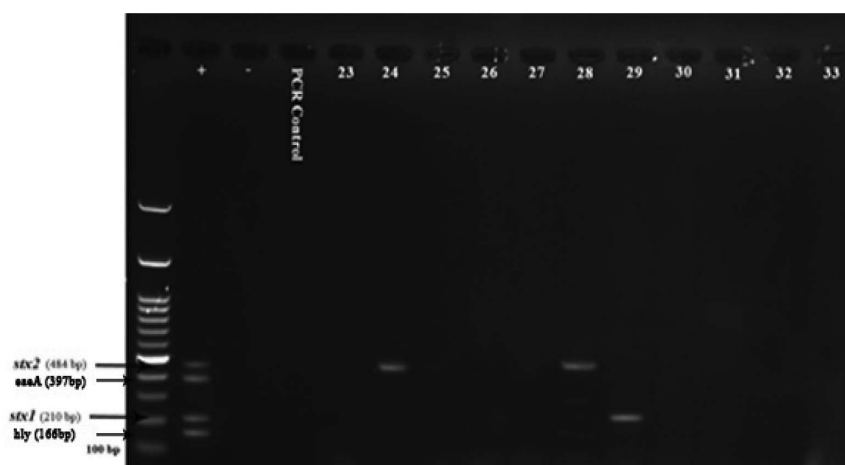
بحث

باکتری اشریشیاکلی از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. ساکن روده بوده و بخشی از فلور طبیعی روده است. و گاهی هم ایجاد بیماری می‌کند. بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک

رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج از میان ۵۵ نمونه باکتری اشریشیاکلی جداسازی از نمونه‌هایی مدفع، پس از تأیید تست‌های بیوشیمیایی، نمونه‌های تأیید شده جهت آزمایش Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفت. معیار جداسازی و تأیید جدایه‌های اشریشیاکلی، ویژگی‌های بیوشیمیایی این باکتری بود. جهت تأیید تشخیص از تست‌های IMVIC استفاده شد. نتایج این تست‌ها بدین شرح است: سیترات منفی، تولید H₂S منفی، نیترات مثبت، MR مثبت، VP منفی، اوره آزمون منفی،



تصویر ۱- نتایج Multiplex PCR از سمت چپ: + کنترل مثبت، - کنترل منفی، ۲۳-۳۳ نمونه‌های مجهول. نمونه‌های شماره ۲۹ واجد ژن stx_۲ ۴۸۴bp، نمونه شماره ۲۸ و ۲۴ واجد ژن stx_۱ ۲۱۰ bp

eaeA-stx1 را نشان دادند (۱۳). در بررسی سال ۲۰۰۳ در آمریکا از ۵۷ سویه اشریشیاکلی O157:H7 جداسازی شده ۳۹ سویه ژن‌های hly, stx1, ۲ و eaeA، سویه ژن‌های hly و eaeA، stx1، ۲ و hly و eaeA، stx2، ۳ سویه هم ژن‌های hly و eaeA، stx1، ۲ را داشتند (۱۱). در بررسی سال ۲۰۰۳ در اسپانیا از مجموع ۳۸۴ سویه STEC شناسایی شده ۵۵ درصد دارای ژن‌های stx1 و stx2، ۶ درصد eae و ۲۸ درصد دارای ژن hly بودند (۱۱). در پژوهش دیگری که در پاکستان در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت از میان ۲۰۰ کودک با انجام مولتی پلکس PCR مشخص شد که ۵۷/۱ درصد دارای ژن‌های hly، ۲۱/۴ درصد گزارش گردیده است (۹). در بررسی سال ۲۰۱۲ در برزیل به روی ۱۵۶ نمونه مدفوع دامی با استفاده از M-PCR به این نتیجه رسیدند که ۸۲/۸ درصد ژن stx1، ۲۴/۳ درصد ژن eae و ۴ درصد ژن stx2، ۱۱/۴ درصد ژن F42، ۱۰ درصد ژن F5 و ۴/۲۸ درصد ژن sta (۱۶). در بررسی سال ۲۰۱۰ در عراق بر روی ۵۰ نمونه مدفوعی جمع آوری شده از کودکان مبتلا به اسهال خونی با استفاده از M-PCR گزارش نمودند، ۲۶/۳ درصد ژن‌های LT یا ST، ۶۳/۱ درصد ژن‌های eae یا bfp و ۲۱ درصد سویه‌های به عنوان EAEC شناسایی شدند و ۱۰/۵ درصد سویه‌ها مخلوطی از EPEC، EAEC و ETEC را نشان دادند و ژن‌های مربوط به EHEC در هیچ کدام از نمونه‌ها شناسایی نشدند (۱۷). در سال ۱۳۹۰ در شیراز، با استفاده از روش M-PCR ژن‌های hly، ۲ و eae و hly را در ۳۲۰ نمونه همبرگر بررسی کردند و مشخص شد ۳ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های hly، ۲ و eaeA، stx1 و ۱ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های hly، ۲ و eaeA، stx1 و ۱ سویه نیز دارای ژن hly بود (۳). در سال ۱۳۹۲ در ایران با روش M-PCR ژن‌های hly، ۲ و eaeA، stx1 و hly را در ۴۲۸ نمونه همبرگر بررسی کردند در مجموع ۲ نمونه دارای ژن‌های hly و stx1 و eae بودند و ژن‌های hly و stx2 و hly در هیچ یک مشاهده نگردید (۲) این نتایج با نتایج مطالعه حاضر تا حدودی همخوانی دارد. در بررسی سال ۱۳۸۸ در مرودشت با استفاده از روش M-PCR ژن‌های hly و eaeA، stx2 و hly نمونه‌های اسهال کودکان را در ارزیابی کردند که نتایج آن به این صورت می‌باشد: از ۶۱۵ کودک مورد بررسی از ۷ کودک باکتری اشریشیاکلی O157:H7 جداسازی گردید که تنها در یک سویه نه‌ای stx1 و eaeA شناسایی گردید اما ژن‌های

ترومبوسیتوپنی پورپورآ، سندرم اورمی همولیتیک، در موارد شدید مرگ می‌باشد، اشریشیاکلی به عنوان یکی از مهمترین باکتری‌ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی نقش حائز اهمیتی را در بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی بر عهده دارد (۱). اسهال یکی از عوامل بیماری‌زایی و مرگ و میر در میان کودکان زیر ۵ سال در جهان سوم محسوب می‌شود. علیرغم کاهش مرگ و میر اسهال هنوز یکی از عوامل اصلی بیماری‌زایی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. علل اسهال دامنه وسیعی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها را دربر می‌گیرد. از جمله عوامل باکتریایی، اشریشیاکلی عامل اسهال (DEC) است که مهم‌ترین عامل اتیولوژیک اسهال کودکان و نشان دهنده یک مسئله جدی در بهداشت عمومی کشورهای در حال توسعه است (۸). شناسایی سویه‌های DEC نیاز به این دارد که این ارگانیزم‌ها از انحصاری غیر پاتوژنی که معمولاً فلور روده‌ای محسوب می‌شوند جدا گردند. شناسایی و طبقه بندی مولکولی DEC مبتنی بر وجود ژن‌های بیماری‌زای کروموزومی یا پلاسمیدی مختلفی است که در اشریشیاکلی همزیست وجود ندارد. شناسایی انواع مختلف DEC شامل واکنش‌های بیوشیمیایی، سروتایپینگ، سنجش‌های فتوتیپی براساس خصوصیات ویروالانس و روش‌های تشخیص مولکولی می‌باشد. از این میان تشخیص ژن‌های بیماری‌زایی اختصاصی با PCR غالباً مورد استفاده قرار می‌گیرد. زیرا این روش نتایج سریع و مطمئن با حساسیت و تخصص عمل بالا می‌دهد. (۶). در طول یکصد سال گذشته اشریشیاکلی مورد مطالعه وسیعی قرار گرفته است بطوری که در حال حاضر مشخص شده است که این ارگانیزم بطور طبیعی بر روی زمین می‌باشد و حضور همیشگی در فلور طبیعی مدفوع باعث شده است که اشریشیاکلی بعنوان یک پاتوژن فرصت طلب مطرح شود که توانایی ایجاد عفونت‌های خطرناکی را در صورت جایگزین شدن به غیر از محل طبیعی خود دارا می‌باشد بطوری که اشریشیاکلی بعنوان یک عامل عفونی در لوله ادراری زخم‌های عفونی التهاب صفاق، التهاب پرده مغز (مننژیت)، پنومونی گرم منفی، سپتی سمی شناخته شده است (۴). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در مکزیک انجام شد از ۲۲ سویه STEC جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال اکثر سویه‌ها ژن stx2 یا ترکیبی از ژن‌های stx1 و eaeA را داشته‌اند به طوری که ۹ سویه ژن stx2، ۹ سویه ژن‌های eaeA-stx1، ۳ سویه ژن stx1 و ۱ سویه هم ژن‌های hly

در کانادا جهت جداسازی سویه‌های اشریشیاکلی از روش‌های اثر سیتوتوکسیتی در کشت سلولی، ایمونواسی و PCR بر روی ۸۷۶ نمونه مدفوع کودکان استفاده گردید نتایج نشان داد که روش‌های مولکولی دارای توانایی بالا جهت تشخیص سویه‌های STEC در نمونه‌های بالینی می‌باشند (۱۵).

نتیجه‌گیری

تشخیص سویه‌های STEC بسیار حائز اهمیت است زیرا این سویه‌ها می‌توانند منجر به سندروم‌های اورمی همولیتیک، کولیت هموراژیک و حتی مرگ شود بنابراین پیشگیری مناسب در برابر این عوارض بستگی به تشخیص سریع این پاتوژن با بهره‌گیری از روش دقیق و سریع دارد با کمک روش مولتی پلکس PCR می‌توان در کوتاه‌ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن‌های بیماری‌زای باکتری پی برد و با درمان مناسب و به موقع از به وجود آمدن سویه‌های مقاوم و انتقال این ژن‌ها در جمعیت انسانی و حیوانی جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی با کد ۴۵۳۶۱ مصوب تاریخ اسفند ماه ۱۳۹۴ می‌باشد. نگارنده کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد اعلام می‌دارد.

stx2 و hly در هیچ کدام از سویه‌ها مشاهده نگردید نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج کار ما همخوانی دارد (۱۴). در بررسی سال ۱۳۸۹ در شیراز با روش M-PCR وجود ژن‌های stx1, stx2, eaeA و hly در ۵۰۴ نمونه گوشت چرخ کرده مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به صورت زیر می‌باشد، ژن‌های stx1 و eaeA در یک سویه، ژن‌های stx1 و stx2 و eaeA نیز در یک سویه. اما ژن hly در هیچ کدام از سویه‌های مشاهده نگردید (۱۶) نتایج حاصل از این کار با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در بررسی سال ۲۰۱۱ در تهران به روی ۲۰۰ نمونه سبزیجات و آبمیوه ژن‌های شینگاتوکسین ارزیابی شدند نتایج نشان داد که ژن stx1 در ۷ نمونه و stx1 و eae در ۱ نمونه مشاهده شده است (۱۷). در بررسی سال ۱۳۸۹ در شیراز به روی ۸۹ نمونه آب میوه و سبزیجات ژن‌های شینگاتوکسین ارزیابی شدند نتایج نشان داد که در ۳ نمونه ژن stx1 و در یک نمونه ژن‌های stx1 و eae شناسایی شد (۱۶). تفاوت در میزان شیوع هریک از ژن‌های مورد بررسی با سایر مطالعات ناشی از سن افراد، نوع نمونه، محل جغرافیایی، نوع رژیم غذایی، روش‌های شناسایی و جداسازی باکتری، وضعیت بهداشت فردی و حتی فصول سال نیز می‌تواند باشد. در مطالعات مختلف از روش‌های متفاوتی جهت تشخیص سویه‌های STEC در نمونه‌های بالینی استفاده گردیده است در بررسی که در سال ۲۰۰۳ به روی ۲۹۵ نمونه مدفوعی جهت بررسی سویه‌های تولید کننده stx اشریشیاکلی با روش‌های ELISA و PCR انجام شده است روش PCR روش مناسب و مفیدی معرفی گردیده است (۱۲). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۹

References

- 1- Heiman KE, Mody RK, Johnson SD, Griffin PM, Gould LH. Escherichia coli O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerg Infect Dis*. 2015 Aug;21(8):1293.
- 2- Loukiadis E, Kérouredan M, Beutin L, Oswald E, Brugère H. Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive Escherichia coli isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(5):3245-51.
- 3- Kesava Naidu G, RGN GSM SC. Detection of Shiga toxin genes (stx1 & stx2) and molecular characterization of shigatoxigenic escherichia coli isolated from divers sources in Gulbarga region, India. *India. Pharmacophore*. 2011;2(5):253-65.
- 4- Martínez-Castillo A, Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Front cell Infect Microbiol*. 2014;4.
- 5- Al-Dragy WA, Baqer AA. Detection of Escherichia coli O157: H7 in human patients stool and food by using multiplex PCR assays targeting the rfbE and the eaeA genes compared with detection by biochemical test and serological assay. *J Al-Nahrain Uni*. 2014;17(3):124-31.
- 6- Helmy O, Ragab Y, Hussein M. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) for the detection of diarrheagenic Escherichia coli and Shigella directly from stool. *StA*. 2013;190:M25607.
- 7- Nakhjavani FA, Emameini M, Hosseini H, Iman-Eini H,

- Aligholi M, Jabalameli F, Haghi-Ashtiani MT, Taherikalani M, Mirsalehian A. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol*. 2013 Feb 1;62(2):191-5.
- 8- Vasco K, Graham JP, Trueba G. Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in ecuador. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jul 15;82(14):4218-24.
 - 9- Acheson DW, Keusch GT. Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important. *Asm News*. 1996;62(6):302-6.
 - 10- Najafi R, Mukherjee S, Hudson J, Sharma A, Banerjee P. Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering. *Int J Food Microbiol*. 2014 Oct 17;189:89-97.
 - 11- Blanco M, Blanco J, Mora A, Rey J, Alonso J, 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.
 - 12- Cobbold R, Desmarchelier P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet Microbiol*. 2000;71(1):125-37.
 - 13- Goldwater P, Bettelheim K. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol*. 1998;47(12):1039-45.
 - 14- Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun*. 2001;69(10):6148-55.
 - 15- Kariyawasam S, Scaccianoce JA, Nolan LK. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiol*. 2007;7(1):1.
 - 16- Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL, Parma AE. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Letters Appl Microbiol*. 2010 Oct 1;51(4):377-82.
 - 17- Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nature Med*. 2000;6(3):265-70.
 - 18- Gannon V, D'souza S, Graham T, King R, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):656-62.