تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

شیوع ژن های بیماریزای *اشریشیا کلی* O157: H7 جداسازی شده از بیماران با عفونت های مجاری ادراری در شهر شیراز

مهدی کارگر
دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

محمد کارگر
دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

محمد زارعیان جهرمی
کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

نویسنده مسئول: مهدی کارگر

پست الکترونیک: Kargarmehdi53@yahoo.com
تلفن :۰۹۳٦٤۱۸٦۸۳۳
آدرس: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

دریافت: ۹۳/۹/۱۹
ویرایش پایانی: ۹٤/۱/۲۰
پذیرش: ۹٤/۲/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیا کلی O157:H7 یکی از مهمترین باکتری های بیماری زا شناخته شده در جهان است و می تواند بیماری های شدیدی مانند بیماری سندرم همولیتیک اورومیک (HUS) را ایجاد کند. این پژوهش با هدف ارزیابی شیوع و پایش ژن های بیماری زایی اشریشیا کلی O157:H7 در افراد مشکوک به عفونت مجاری ادراری (UTIs) انجام گرفت.*

روش بررسی: *این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی بر روی ۱۰۳۷۲ نمونه جمع آوری شده از ادرار افراد مشکوک به عفونت مجرای ادراری از شش بیمارستان و آزمایشگاه بالینی در شهر شیراز انجام شد. از محیط CT-SMAC ، فعالیت بتاگلوکونیدازی (آزمون MUG)، آنتی سرم اختصاصی و وجود ژن های O157 و H7 با روش PCR برای تایید جدایه های اشریشیا کلی O157:H7 استفاده شد. سپس با استفاده از روش PCR چندگانه، وجود ژن های stx1، stx2، eaeA و hlyA ارزیابی گردید.*

یافته ها: *در این پژوهش ۱۶ (۰/۸٪) باکتری دارای ژن O157 و ۱۳ (۰/۶/۳٪) باکتری نیز دارای ژن H7 جداسازی گردید. بررسی ژن های بیماری زا نشان داد که ژن eaeA (۱۵/۴٪)، stx1 و eaeA (۱۵/۴٪)، stx2 (۷/۷٪) و ژن های stx2 و eaeA (۷/۷٪) بیشترین فراوانی را در باکتری های اشریشیا کلی O157:H7 دارا بودند.*

نتیجه گیری: *به دلیل شدت بیماری زایی، دوز عفونی اندک اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ و ژن های بیماری زایی انجام مطالعات گسترده تر و ژنوتایپینگ اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ در سایر مناطق کشور به منظور سنجش فراوانی در عفونت مجاری ادراری و کنترل آلودگی های ناشی از اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ پیشنهاد می گردد.*

واژه های کلیدی: *اشریشیا کلی O157: H7، ژن hlyA ، ژن eaeA، shiga toxin 1، shiga toxin 2*

آدرس مقاله
کارگر م، کارگر م، زارعیان جهرمی م" شیوع ژن های بیماری زای اشریشیا کلی O157: H7 جداسازی شده از بیماران با عفونت های مجاری ادراری در شهر شیراز مجله علوم آزمایشگاهی، مرداد و شهریور۹۴، دوره نهم (شماره ۳): ۹-۱۶

مقدمه

اشریشیا کلی های تولیدکنندهٔ سم شیگا (STEC) چهارمین بیماری زا شایع ناشی از غذا هستند که سالانه موجب بروز نزدیک به ۱۲۰۰ بیماری در بریتانیا می‌شوند (۱). *اشریشیا کلی* O157:H7 در بسیاری از کشورها جهان یک نگرانی شایع در زمینهٔ بهداشت و سلامت به شمار می‌رود (۲). *اشریشیا کلی* O157:H7 در انسان شدیداً بیماری زایک است، اما در گاو و حیوانات دیگر موجب بروز علائم بالینی جز اسهال نمی‌شود (۳). از مهمترین عوامل بیماری زا باکتری می توان به، شیگا توکسین، ژن *hly* (کدکننده انتروهمولیزین) و ژن *eae* (کدکننده اینتیمین) اشاره نمود (۴). درحال حاضر حداقل ۶ ویروتیپ *اشریشیا کلی*، انتروهموراژیک (EHEC)، انتروتوکسیژنیک (ETEC)، انتروبیماری زایک (EPEC)، انتروایناویسیو (EIEC)، انترواگریگیتیو (EaggEC) و چسبندهٔ منتشره (DEAC)، بر اساس بیماری‌زایی و تنوع در ویژگی های بیوشیمیایی شناخته شده است. از بین باکتری های یاد شده، ویروتیپ EHEC به دلیل ایجاد بیماری هایی حادی مانند، هموراژیک کولیتیس (HC) و ایجاد سندروم اورمی همولیتیک (HUS) به ویژه در اطفال مهم‌ترین مورد محسوب می‌شود (۲). بیماری HUS ارتباط زیادی با تولید شیگا توکسین به وسیله ی ویروتیپ انتروهموراژیک دارد (۵). شیگا توکسین دو زیرواحد به نام های «A» و «B» دارند. زیرواحد B به گیرندهٔ اختصاصی به ویژه به گلوبوتری اسیل سرامید (GB3) در سلول میزبان می‌چسبد. مقادیر بیشتری از GB3 در بافت‌های مخاطی کلیوی وجود دارد، لذا شیگا توکسین می‌تواند منجر به توکسیسیتهٔ کلیوی گردد (۱). سویه های *اشریشیا کلی* O157:H7 (EHEC) دو نوع شیگاتوکسین ۱ (Stx-1) و شیگا توکسین ۲ (Stx-2) منجر به بیماری ناشی از مصرف غذای آلوده می‌شوند همچنین به دلیل تاثیر سم های یاد شده بر روی رده سلولی ورو(Vero cell)به ترتیب به آن ها وروتوکسین ۱ (VT-1) و وروتوکسین ۲ (VT-2) نیز می گویند (۲). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 از نمونه‌های ادرار بیماران مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI) و ارزیابی ژن‌های بیماری زای *hly*، *eae* و *stx1* در باکتری های جداسازی شده بود.

روش بررسی

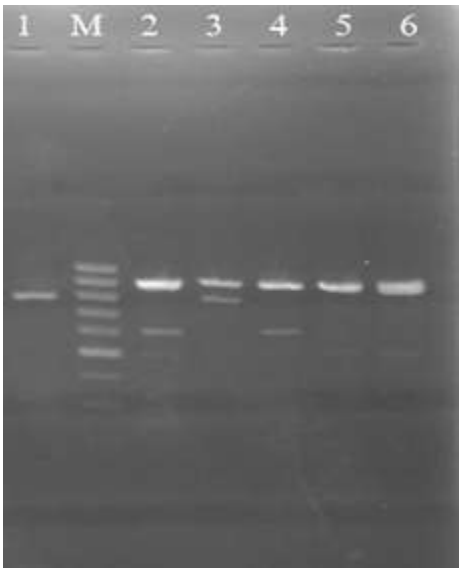
این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی، برروی ۱۰۳۷۲ نمونه ادرار جمع آوری شده از شش بیمارستان و آزمایشگاه بالینی مربوط به افراد مشکوک به عفونت مجرای ادراری در یک دورهٔ نه ماهه انجام شد. با کشت نمونه‌ها روی بلاد آگار و محیط EMB، تأیید وجود عفونت ادراری وآزمون های بیوشیمیایی، ۲۹۸ نمونهٔ مثبت جداسازی گردید. ابتدا باکتری‌های اشریشیا کلی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی سوربیتول مکانکی آگار حاوی تلورایت (CT-SMAC) (مرک- آلمان) کشت و انکوبه شد سپس باکتری‌های سوربیتول منفی شناسایی شدند (۶). باکتری‌های سوربیتول منفی روی کروم آگار O157 (های مدیا، هند) کشت شد. باکتری‌های MUG منفی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد روی نوترینت آگار (مرک-آلمان) انکوبه شدند. سپس با یک آزمایش در نرمال سالین باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند ثابت شود که جزء باکتری‌های با آگلوتیناسیون خودبه‌خودی نباشند. باکتری‌ها با آنتی-سرم اختصاصی اشریشیا کلی O157 آزمایش شدند. نمونه‌های آگلوتینه به عنوان نمونه‌های مثبت گزارش شدند (۷). باکتری‌هایی که آنتی‌سرم اختصاصی اشریشیا کلی O157:H7 در آنها مثبت بود در محیط لوریل برتانی براث (شارلو، اسپانیا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد کشت شدند. با استفاده از کیت استخراج DNP™ (سیناکلون، ایران)، DNA باکتری‌ها استخراج شد و غلظت‌های DNA به روش OD اندازه‌گیری شد. ژن های O157 و H7 با پرایمرهای خاص در سنجش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشخص شدند. دیگر ژن های بیماری زا نیز با پرایمر های اختصاصی بصورت مولتی پلکس انجام شد (۸). توالی پرایمر ها طبق جدول شماره ۱ می باشد. روش PCR در ژن های O157 و H7 در حجم نهایی µl50 انجام شد. ویال ها شامل حاوی ۲/۵ واحد از تک پلیمراز (فرمنتز- آلمان) ، mM 0.2 از dNTPs، mM 2.5 از MgCl2 و pmol۲۰ از پرایمرهای فلاژلی H7 یا سوماتیک O157 بودند(جدول۱). واکنش‌های PCR زن های O157 و H7 (تکنه، آلمان) طبق روش زیر انجام شدند: یک چرخه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ

سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت یک دقیقه، آنلینگ به مدت دو دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای H7، و در دمای ۵۹ درجهٔ سانتی‌گراد برای O157، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱.۵ درصد در بافر TAE همراه با اتیدیوم بروماید‌الکتروفورز شدند (شکل ۱).

مولتی‌پلکس PCR ژن های بیماری زای *stx1*، *stx2*، *eae*A و *hly*A مولتی پلکس PCR با ترموسایکلر (تکنه-آلمان) انجام گردید (۸). واکنش مولتی پلکس PCR حاوی ۲۰۰ mM dNTPs، غلظت تقریباً ۲۵۰ nM از هر پرایمر و یک واحد تک پلیمراز در ۱۰ mM از Tris- HCl ، ۵۰ mM از KCl و ۲ mM از $MgCl_2$ (فرمنتز-آلمان) انجام شد. شرایط PCR شامل مرحلهٔ اولیهٔ دناتوراسیون در درجهٔ ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخهٔ در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه. چرخهٔ طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ ٪ در بافر TAEانجام گردید. ژل‌ها الکتروفورز با ۰/۵ µl اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی زیر نور ماوراء بنفش مشاهده و عکس‌برداری شد. داده‌ها با SPSS نسخه ۱۵ تجزیه و تحلیل شدند. آزمون کای‌دو یا آزمون دقیق فیشر برای مقایسهٔ متغیرها تدارک دیده شد. ارزش احتمال (P value) ۰/۰۵ به لحاظ آماری در نظر گرفته شد.

جدول ۱ - والی پرایمر ها

نام ژن	توالی نوکئوتیدی پرایمر ('3-'5)	اندازه محصول
stx1	F: ACACTGGATGATCTCAGTGG R: CTGAATCCCCCTCCATTATG	614 bp
stx2	F: CCATGACAACGGACAGCAGTT R: CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	779 bp
*eae*A	F: GTGGCGAATACTGGCGAGACT R: CCCCATTCTTTTTCACCGTCG	890 bp
*hly*A	F: ACGATGTGGTTTATTCTGGA R: CTTCACGTGACCATACATAT	165 bp
H7	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAG R: CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625 bp
O157	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259 bp



شکل -۱ الکتروفورز ژل آگارز محصولات مولتی‌پلکس پی‌سی‌آر *اشریشیا کولی* O157:H7

شمارهٔ ۱: ایزولهٔ *اشریشیا کولی* O157:H7 با ژن *Stx2* با M.۷۹۰ bp : نشانگر 100 bp. شمارهٔ ۲:*اشریشیا کولی* O157:H7 با ژن *eae* 889bp و ژن *stx1* 614 bp. شمارهٔ ۳:*اشریشیا کولی* O157:H7 با ژن *eae* 889bp و ژن *stx2* 790 bp. شمارهٔ ۴:*اشریشیا کولی* O157:H7 با ژن *eae* 889bp و ژن *stx1* 614 bp. شمارهٔ ۵ و ۶:*اشریشیا کولی* O157:H7 با ژن *eae* 889bp.

یافته ها

در بین ۲۹۸ ایزولهٔ مثبت در بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری، ۲۰۶ نمونه حاوی *اشریشیا کلی* جداسازی شد. پس از کشت روی محیط سوربتول مکانکی آگار (SMAC)، باکتری‌های سوربیتول - منفی روی محیط حاوی MUG کشت شد. سپس ۶۳ نمونه باکتری MUG مثبت برای تست‌های آنتی سرم انتخاب شدند. این نمونه‌ها با آنتی‌سرم مخصوص *اشریشیا کلی* O157 ارزیابی شدند، و ۲۹ باکتری *ای‌کولای* مثبت بود. با استفاده از PCR روی ژن‌های O157 و H7، ۱۶ نمونه O157 مثبت بودند. ۱۳ مورد از آنها :O157 H7 مثبت و سه نمونه H7 منفی بود. همچنین ۱۳ نمونه از بین ۲۹ مورد که در آنها ژن‌های فوق مشاهده نشده بود آنتی‌سرم مثبت بود. این نشان می‌داد آزمون آنتی‌سرم در مقایسه با روش PCR برای تشخیص *اشریشیا کلی* O157:H7 روش ارزشمندی نیست. تجزیه و تحلیل آماری ۲۹۸ ایزولهٔ باکتریایی از نمونه‌های مشکوک به عفونت مجرای ادراری حاکی از آن بود که ۲۰۶ مورد (۶۹/۱٪) از ایزوله‌های باکتریایی عفونت مجرای ادراری به باکتری *اشریشیا کلی* ، باکتری *کلبسیلا با* ۳۶ مورد (۱۲/۱ ٪) ایزوله‌ها را تشکیل می دادند. داده‌ها گویای آن است که ۲۰۱ نفر از افراد مراجعه کننده دارای عفونت‌های مجرای ادراری در زنان با فراوانی ۶۷/۴ درصد تشکیل می دهند. در حالی که ۹۷ نفر از این افراد مردان با فراوانی ۳۲/۶ می باشند. پس از کشت روی میحط سوربیتول مکانکی آگار (CT-SMAC)، و انتقال *اشریشیا کلی* سوربیتول منفی به محیط کروم آگار و انجام آزمایش‌های سرم شناختی در مجموع ۱۴/۱ درصد از ایزوله‌های *اشریشیا کلی* آنتی سرم مثبت بودند. تنها ۷/۸ درصد از ایزوله‌های *اشریشیا کلی* ژن O157 و ۶/۳ درصد از آنها ژن O157 و ژن H7 را باهم دارا بودند. ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eae* و *hly* این باکتری ها با روش مولتی‌پلکس PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مولتی‌پلکس PCR نشان داد که درصد فراوانی ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eae* و *hly* در بین این ایزوله‌ها به این ترتیب *eae* به تنهایی (۱۵/۴٪)، *stx1* و *eae* با هم (۱۵/۴٪)، *stx2* به تنهایی (۷/۷٪) و *Stx2* و *eae* با هم (۷/۷٪). این مسئله قابل توجه است که ژن *hly* در هیچ یک از ایزوله‌ها شناسایی نشد.

بحث

مطالعات نشان داده است که نژاد VTEC معمولاً در همولیتیک کولیتیس و سندروم همولیتیک اورمیک متعلق به سروگروه O157:H7 جداسازی می‌شوند (۹). در رابطه با نقش ژن های شیگا توکسین در ایجاد بیماری اطلاعات بسیاری موجود می باشد و تولید شیگا توکسین ها مهم ترین عامل بیماری زایی سویه های STEC برای انسان ها به شمار می آید. این توکسین علاوه بر *اشریشیاکلی* در *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ نیز وجود دارد. این توکسین ها نقش مهمی را در بیماری های کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک ایفا می کنند و اثر سمی بر روی سلول های کلیه ، روده ، سیستم عصبی مرکزی و دیگر اندام ها دارند. به نظر می رسد. شیگا توکسین ها باعث ایجاد آسیب اندوتلیال در بیماران مبتلا به کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک می شوند. در سرم بیماران مبتلا به HUS ناشی از این باکتری ، شیگا توکسین ها ردیابی شده اند و این توکسین ها در ایجاد بیماری شدیدتر نقش دارند (۳). ژن *eaeA* نیز یک پروتئین به نام اینتیمین را کد می کند ، که برای ایجاد آسیب های A/E ضروری است. این ژن و پروتئین اینتیمین علاوه بر سویه های EHEC، یکی از عوامل بیماری زایی اصلی در سویه های EPEC نیز محسوب می شود. محصول ژن *hly* یا انتروهمولیزین نیز یکی از عواملی است ، که می تواند بر روی افزایش بیماری زایی سویه های STEC اثر بگذارد. در نتیجه ما تصمیم گرفتیم وجود این ژن ها را همزمان در سویه های به دست آمده مورد ارزیابی قرار دهیم (۱۰). از آنجا که اکثر عفونت‌های مجرای ادرار از نژادهای مختلف *اشریشیا کلی* ناشی می‌شود، احتمال بروز بیماری به علت وجود نژادهای مختلف O157: H7 مورد توجه است. این باکتری از مهم ترین بیماری زا های انسانی است زیرا باعث درگیری تمام گروه های سنی می شود، دوز آلوده کننده بسیار پایینی دارد، قادر به تحمل شرایط اسیدی است و به ویژه راه های انتقال فراوانی دارد که باعث انتقال باکتری از طریق مختلف به انسان ها می شود (۶). به دلیل مراحل طولانی تعیین هویت سویه O157:H7، ضرورت شناسایی و به کار گیری

پروتکل های سریع تشخیصی وجود دارد. همچنین ارزیابی دقیق تر فیزیولوژی، متابولیسم و ژنتیک باکتری به فهم بهتر بیماری زایی آن کمک می نماید . نتایج این پژوهش با یافته‌های بعضی پژوهش‌های دیگر مطابقت ندارد. Starr و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Tarrr و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز نشان دادند که O157: H7 می‌تواند منجر به بروز عفونت‌های مجاری ادراری شوند (۱۲،۱۱). Khan و همکاران در سال ۲۰۱۱ آزمایش‌هایی روی غیر O157: H7 و O157: H7 انجام دادند که منجر به بروز بیماری در اطفال می‌شود و نشان دادند که این باکتری‌ها می‌توانند مسبب بروز بیماری‌های بسیاری شوند (۵). در این مطالعه با مولتی‌پلکس PCR که روی ژن‌های *eaeA*، *stx2*، *stx1* و *hlyA* انجام شد، شش سویه از باکتری‌های *اشریشیا کلی* O157:H7 از نمونه‌های ژن‌های عفونت مجرای ادراری که دربردارندهٔ ژن‌های *eaeA*، *stx2* و *stx1* بودند ایزوله شد، اما هیچ ژن *hly* در بین آنها نبود. این داده‌ها پیشتر با کشت باکتری‌ها روی آگار خونی تأیید شده بود که به خاطر عدم وجود ژن *hlyA* هیچ اثری از همولیز نشان نداده بود. اشمید (Schmidt) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز نتیجی مشابه تحقیق حاضر یافتند (۱۳). جانسون (Jonson) و همکاران در سال ۲۰۰۲ در سنجش شیوع *اشریشیا کلی* تولیدکنندهٔ stx در آمریکای شمالی، ۵۹۷ نمونهٔ ادرار را بررسی کرد و نشان داد که باکتری‌های STEC از نمونه‌های ادرار ایزوله نشده بودند (۱۴). Starr و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای که روی نمونه‌های ادرار و مدفوع نوزادان شش هفته‌ای داشتند، نشان دادند که ژن‌های *stx1* و *stx2* از *اشریشیا کلی* در ادرار این بیماران وجود دارد، ولیکن ژن *stx* در مدفوعشان یافت نشد (۱۱). نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که باکتری‌های *اشریشیا کلی* O157: H7 همچنین می‌توانند منجر به بروز بیماری در مجرای ادرار شوند، لذا احتمال دارد که این باکتری‌ها از طریق آلودگی مدفوع به مجرای ادرار منتقل شده باشند. با این حال در مطالعاتی Starr و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Tarrr و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام دادند هیچ‌گونه شواهدی برای پشتیبانی از این فرضیه یافت نشد (۱۱ ، ۱۲). در پروژه‌های تحقیقاتی دیگر، رابطه‌ای میان عفونت‌های مجرای ادرار و عفونت‌های معده و روده (گاستروانتستینال) گزارش شد (۱۵). در بعضی از مطالعات، *اشریشیا کلی* های O157: H7 که جداسازی شده بود حاوی ژن‌های *stx1* و *stx2* بودند؛ در مطالعات دیگر ایزوله‌ها حاوی ژن‌های *vtx* بودند. این می‌تواند بیماری‌زایی *اشریشیا کلی* O157: H7 را در مجرای ادرار توجیه کند (۱۶). نویدی‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۲ از بین ۱۲۵۷۲ نمونه از اطفال، ۳۷۸ نمونه را جداسازی کردند ۹ نمونه حاوی EHEC بود و ۵ مورد از نمونه‌های EHEC مثبت حاوی ژن‌های *vtx* بودند (۹). Tarrr و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که نژادهای *اشریشیا کلی* O103:H2 تولیدکنندهٔ شیگا توکسین از نمونه‌های ادرار دختران شش ساله مبتلا به عفونت مجرای ادرار ایزوله شد، در حالی که هیچ اثری از اسهال در این اطفال نبود (۱۲). در سال ۱۹۹۳ در دانمارک دو عفونت مجرای ادرار که ناشی از *اشریشیا کلی* بود تشخیص داده شد. پژوهشگران این موضوع را مطرح کردند که ممکن است نژادهای *اشریشیا کلی* که از عفونت مجرای ادرار ایزوله شده است تولید کنندهٔ وروتوکسین باشد، خصوصاً وقتی شیوع HUS به شکل بالینی است (۱۵). مطالعات دیگری که دانشمندان روی *اشریشیا کلی* O103:H2 در غذا انجام داده‌اند نیز حاکی از اهمیت این میکروارگانیسم است. اما در مطالعات پیشین درصد *اشریشیا کلی* O103:H2 در عفونت‌های مجرای ادرار پایین بود و این درصد پایین بسیار حائز اهمیت است، چراکه ممکن است عفونت حاد ایجاد کند و کلیه‌ها را نیز درگیر سازد (۱۶). بنیادیان و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به اسهال داشتند، ۵۸ نمونه را ایزوله کردند و پی بردند که ۱۶ نمونه حاوی ژن‌های *stx1*، ۴ نمونه حاوی ژن‌های *stx2* و ۸ نمونه حاوی هر دو نوع ژن بوده است (۲۰). همچنین معلوم شد که ۱۲ نمونه حاوی ژن‌های *hly* بوده است. هیچ یک از باکتری‌های *اشریشیا کلی* که جداسازی شدند حاوی ژن‌های *eae* نبودند. آنها نشان دادند که STEC در این مطالعه می‌تواند دلیل اصلی بروز عفونت‌ها باشد (۱۷). این باکتری‌ها دهانی- مدفوعی هستند، لذا می‌توان گفت که بین مسمومیت غذایی و عفونت‌های مجرای ادرار ناشی از

اشـریشیا کلی O157: H7 رابطه‌ای وجود دارد (۲). در پژوهشی که تهمـتن و همکاران در سال ۲۰۱۰ و مظاهری و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام دادند، ارتباط میان *اشریشیا کلی* O157: H7 در نوشیدن آب و بروز عفونت‌های گاستروانتستینال در گاوها ارزیابی شد (۱۸،۱۹). این باکتری می‌تواند از طریق غذا، آب آلـوده، سبـزیجات و مـدفوع به افـراد دیـگر انتقـال یابـد (۲۰،۲۱). یکی از ویژگی های باکتری *اشریشیا کلی*O157:H7 تـفاوت در فـاکتـورهای ویـرولانـس سویه های مختلف آن می باشد. با اینکه وجود تمامی ژن های بیـمـاری زای مـورد بررسی در یک سویه می تواند دلیلی بر بیماری زایی محسوب شـود، اما شـباهت فـاکـتورهـای ویـرولانـس در سـویه هـای جـدا شـده مـناطق مـختلـف می تـواند نـشان دهـنده شیـوع یـک سـویه در مـکان مورد پژوهش و معیاری برای اندازه گـیری شدت بیماری زایی باکتری های در حال چرخش باشد.

نتیجه گیری

با توجه به فراوانی اشریشیا کلی O157:H7 در عفونت مجاری ادراری پژوهش حاضر، به دلیل شدت بیماری زایی، دوز عفونی اندک اشریشیا کلی O157:H7 و ژن های بیماری زایی انجام مطالعات گسترده تر و ژنوتایپینگ اشریشیا کلی O157:H7در سایر مناطق کشور به منظور سنجش فراوانی در عفونت مجاری ادراری و کنترل آلودگی های ناشی از اشریشیا کلی O157:H7را طلب می کند. بر همین اساس پیشنهاد می گردد پژوهش بر روی نمونه های کلینیکی و مواد غذایی به طور همزمان در نقاط مختلف کشور انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت مالی و امکانات از طرح پژوهشی به شماره ۹۳۱۶۲ کمال تشکر را دارند.

References

1. Tran SL, Billoud L, Lewis SB, Phillips AD, Schüller S. *Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin producing E. coli O157:H7 and O104:H4.* Cellular Microbiology. 2014; 16(8):1255-66. doi:10.1111/cmi.12281.

2. Kiranmayi CB, Krishnaiah N, Naga EM. *Escherichia coli O157:H7 - An emerging pathogen in foods of animal origin.* Veterinary World. 2010; 3(8): 382-389.

3. Ateba CN, Mbewe M. *Genotypic Characterization of Escherichia coli O157:H7 Isolates from Different Sources in the North-West Province, South Africa, Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Analysis.* International Journal of Molecular Sciences. 2014; 15(6): 9735-9747. doi:10.3390/ijms15069735.

4. Manna SK, Brahmane MP, Das R, Manna C, Batabyal S. *Detection of Escherichia coli O157 in foods of animal origin by culture and multiplex polymerase chain reaction.* J Food Sci Technol. 2006; 43(1): 77-79.

5. Khan AB, Naim A. *Virulence traits of Shiga toxin producing Escherichia coli*. The Health. 2011; 2(4): 119-127.

6. Carlson BA, Nightingale KK, Mason GL, Ruby JR, Choat WT, Loneragan GH, et al. *Escherichia coli O157:H7 strains that persist in feedlot cattle are genetically related and demonstrate an enhanced ability to adhere to intestinal epithelial cells.* Appl Environ Microbiol. 2009; 75(18): 5927-5937.

7. Hepburn NF, Macrae M, Johnston M, Mooney J, Ogden ID. *Optimizing enrichment conditions for the isolation of Escherichia coli O157 in soils by immunomagnetic separation*. Letters in Applied Microbiology. 2002; 34(5): 365-9.

8. Paton AW, Paton JC. *Detection and characterization of shiga toxigenic Escherichia coli by using Multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic hlyA, rfb O111 and rfbO157.* J Clin Microbiol. 1998; 36(2): 598-602.

9. Navidinia M, Karimi A, Rahbar M, Fallah F, Radmanesh AR, Malekan MA, et al. *Study prevalence of verotoxigenic E.coli isolated from urinary tract infections (UTIs) in an Iranian children hospital*. The Open Micro Journal. 2012; 6(2): 1-4.

10. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Okott ES, Johnson LM, Hargratt NT, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E.coli* serotype. N Engl J Med. 1983; 308(12): 681-685.

11. Starr M, Bennett-Wood V, Bigham AK, Koning-Ward TF, Bordun AMD, Lightfoot KA, et al. *Hemolytic-Uremic Syndrome following urinary tract infection with Enterohemorrhagic Escherichia coli: case report and review*. J Clin Infect Dis. 1998; 27(3): 310-5.

12. Tarr PI, Laurie SF, Ann ES, Richard A, Wilson HH. *Hemolytic–Uremic Syndrome in a Six-Year-Old Girl after a Urinary Tract Infection with Shiga-Toxin–Producing Escherichia coli O103:H2.* N Engl J Med. 1996; 335(4): 635-638.

13. Schmidt H, Scheef HIJ, Huppertz M, Karch H. *Escherichia coli O157:H7 and O157:H2 strains that do not produce Shiga toxin: Phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome.* J Clin Microbiol. 1999; 37(11): 3491-3496.

14. Johnson JR, Catherine J, Daniel R, Boster A, Stapleton E, Phillip IT. *Analysis of urinary Escherichia coli isolates for ability to produce shiga toxin.* J Clin Microbiol. 2002; 40(6): 2247-2248. doi: 10.1128/JCM.40.6.2247-2248.2002.

15. Flemming S, Bente O, Annette N. *Two cases of human urinary tract infection complicated by Hemolytic Uremic*

Syndrome caused by verotoxin-producing Escherichia coli. Clin Infect Dis. 2000; 31(3): 815-6.

16. Hermos CR, Janineh M, Han LL, McAdam AJ. *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Children: Diagnosis and Clinical Manife stations of O157:H7 and Non-O157:H7 Infection*. J Clin Microbiol. 2011; 49(3): 955-959.

17. Bonyadian M, Momtaz H, Rahimi E, Habibian R, Yazdani A, Zamani M. *Identification & characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from patients with diarrhoea in Iran.* Indian J Med Res. 2010; 132(4): 328-331.

18. Tahamtan Y, Hayati M, Namavari MM. *Prevalence and distribution of the stx_1, stx_2 genes in Shiga toxin producing E. coli (STEC) isolates from cattle*. Ira J Microbiol. 2010; 2(1): 8-13.

19. MazhaheriNejadFard R, BehzadianNezhad G, ZahraeiSalehi T, AtashParvar N. *Evaluation of ehxA, stx_1, and stx_2 Virulence Gene Prevalence in Cattle Escherichia Coli Isolates by Multiplex PCR.* Arch Razi Ins. 2005; 60(2): 55-66.

20. Cooley M, Carychao D, Crawford-Miksza L, Jay MT, Myers C, Rose C, et al. *Incidence and tracking of Escherichia coli O157:H7 in a major produce production region in California.* Plos One. 2007; 2(11): e1159.

21. Kodaka H, Uesaka Y, Kashitani F. *Nissui Glucose fermentative gram-negative rod identification system EB-20 gives a unique profile for typical non-sorbitol-fermenting Escherichia coli O157:H7*. J Clin Microbiol. 2004; 42(1): 354-8.

Prevalence of Virulence Genes of Escherichia Coli O157:H7 Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Shiraz, Iran

Kargar, M. (BSc)
MSc Student of Microbiology, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Kargar, M. (PhD)
Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Zareian Jahromi, M. (MSC)
MSc of Immunology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Corresponding Author: Kargar, M.

Email: Kargarmehdi53@yahoo.com

Received: 10 Dec 2014
Revised: 9 Apr 2015
Accepted: 17 May 2015

Abstract

Background and Objective: Escherichia coli O157:H7 is one of the most well-known pathogenic bacteria worldwide that can develop severe diseases such as hemolytic uremic syndrome (HUS). This study aimed to assess the prevalence of virulence genes of E. coli O157:H7 in patients with suspected urinary tract infections (UTIs).

Material and Methods: This cross-sectional study was conducted on 10,372 urine samples collected from patients with suspected UTI from six hospitals and clinical laboratories in Shiraz city. CT-SMAC medium, β-glucosidase activity test (MUG), specific antiserum, and the presence of O157 and H7 genes by PCR were used to confirm E. coli O157:H7 isolates. Then, stx1, stx2, eaeA, and hlyA genes were evaluated using multiplex PCR.

Results: In this study, 16 (7.8%) and 13 (6.3%) bacteria had O157 and H7 genes, respectively. Evaluation of virulence genes showed that genes eaeA (15.4%), stx1 and eaeA (15.4%), stx2 (7.7%), and stx2 and eaeA (7.7%) had the highest frequency in E. coli O157:H7.

Conclusion: Due to the severity of pathogenicity, low infectious dose of E. coli O157: H7, and its pathogenic genes, more extensive studies and genotyping of E. coli O157: H7 are required to be conducted in other areas of Iran in order to measure the frequency in UTIs and control the infections caused by E. coli O157: H7.

Keywords: Escherichia coli O157:H7; Urinary Tract Infections; Shiga Toxin 1; Shiga Toxin 2.

This paper should be cited as: Kargar M, Kargar M, Zareian Jahromi M. [Prevalence of Virulence Genes of Escherichia Coli O157:H7 Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Shiraz, Iran]mljgoums. 2015; 9(3): 9-16[Article in Persian]