

# جستجوی اشریشیاکلی‌های حامل ژن‌های کدکننده‌ی شیگاتوکسین به روش Multiplex Polymerase Chain Reaction در اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد سمانه مهراییان<sup>۱</sup>، حسین طهماسبی<sup>۲\*</sup>، حسن ممتاز<sup>۳</sup>، شرمین فرهمندی<sup>۱</sup>، هادی منجی<sup>۱</sup>، کیوان فرهمندی<sup>۴</sup>، زینت داوودی جونقانی<sup>۱</sup>

## چکیده

زمینه: اسهال در سراسر جهان ۴ درصد از تمام مرگ و میرها و ۵ درصد از موارد فقدان سلامتی که به از کار افتادگی منجر می‌شود را ایجاد می‌کند. اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین می‌توانند اسهال آبکی خفیف تا کمپلکس‌های جدی از قبیل کولیت هموراجیک و سندروم اورمی همولیتیک تا حتی مرگ ایجاد نمایند. این مطالعه به منظور ردیابی اشریشیاکلی‌های حامل ژن‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین (stx1 و stx2) در اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه‌کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد.

روش: ۱۱۰ جدایه‌ی اشریشیاکلی از بیماران مبتلا به اسهال در سال ۱۳۹۰ از نظر ژن‌های stx1، stx2 و eaeA به وسیله‌ی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: میزان ژن‌های stx1 و eaeA در جدایه‌های اشریشیاکلی به ترتیب ۲/۷ درصد (۳ از ۱۱۰) و ۱/۸ درصد (۲ از ۱۱۰) بود. ژن stx2 در هیچ کدام از جدایه‌ها یافت نشد. جدایه‌های اشریشیاکلی که واجد ژن stx1 بودند، حامل ژن eaeA نبودند. ژن‌های حدت در هیچکدام از اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از زنان یافت نشدند. در اشریشیاکلی‌های واجد ژن‌های حدت، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپیسیلین و تریمتوپریم و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و کلرامفنیکل وجود داشت.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که عوامل عفونی دیگری ممکن است نقش اصلی را در ایجاد اسهال در نمونه‌های مورد بررسی، خصوصاً در میان زنان ایفا کنند. مطالعات تکمیلی در مورد علل ایجاد اسهال توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: اسهال، اشریشیاکلی، شیگاتوکسین، ژن، PCR

۱- دانشجوی دکترای دامپزشکی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۳۸۸۵۴۳۵۵

SamanehMehrabiyani@yahoo.com

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۸۸۷۷۵۹۴۳

Sh.Farahmandi@yahoo.com

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۳۷۵۲۲۸۷۶۶

Hadi.Monji@yahoo.com

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۳۸۳۸۳۲۷۴۶

D.zinat@yahoo.com

۲- فارغ‌التحصیل دوره دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱

H.Tahmasby@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۳۳۸۱۲۵۷۴

HaMomtaz@yahoo.com

۴- فارغ‌التحصیل دوره دکترای عمومی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۲۶۰۵۷۲۵۰

Keyvan3066@yahoo.com

\*نویسنده‌ی مسؤول:

حسین طهماسبی؛ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام.

تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱

H.Tahmasby@yahoo.com

## مقدمه

و ایجاد آسیبهای خاصی به نام اتصال و محو شدن در سلولهای اپی تلیال روده می‌باشد. به همین دلیل به ژن کد کننده این پروتئین ( *eae* ) *E. coli attaching and effacing* می‌گویند (۱۵، ۱۶).

تحقیقات نشان می‌دهد سویه‌های تولیدکننده شیگاتوکسین در احشام نیز وجود داشته که ۴۰ درصد آنها برای انسان بیماری‌زا شناخته شده‌اند. این مسأله احشام را به عنوان مخزن مهم برای سویه‌ها مطرح می‌سازد (۱۷).

سروتیپ‌های شیگاتوکسین زای اشریشیاکلی (غیر از O157) عامل ایجاد ۶۰ درصد از عفونت‌های اشریشیاکلی شیگاتوکسین‌زا هستند و در بسیاری از نقاط دنیا از قبیل آرژانتین، استرالیا، اسپانیا، دانمارک، شیلی و آلمان شایع می‌باشند (۲۰).

مطالعات عمده‌ای که در زمینه بررسی بیماران مبتلا به اسهال از نظر آلودگی به ژن‌های حدت اشریشیاکلی در نقاط مختلف کشور و دنیا انجام شده است. در گزارش‌هایی که در سال ۲۰۱۲ از بنگلادش، آرژانتین و هندوستان ارائه شده به ترتیب: ۰، ۴/۱ و ۳/۴ درصد آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین گزارش شده است (۲۱-۲۳). مطالعات صورت گرفته در ایران نیز از شیوع متفاوت اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین از ۲ درصد تا ۴۴/۷ درصد در نقاط مختلف حکایت می‌کنند (۲۴-۳۱).

از نتایج مطالعاتی که در زمینه‌ی کسب اطلاع بیشتر و دقیق‌تر از وضعیت انتشار و تعیین میزان بیماری در جمعیت‌های انسانی انجام می‌شوند، در جهت شناسایی فاکتورهای ایجادکننده بیماری، درمان، کنترل بهینه بیماری‌ها و حل مشکلات بهداشتی استفاده می‌شود. از آنجایی که یک منطقه با منطقه‌ی دیگر از نظر وضعیت انتشار، نوع و میزان فاکتورهای ایجادکننده بیماری ممکن است متفاوت باشد،

اسهال در سراسر جهان ۴ درصد از تمام مرگ و میرها و ۵ درصد از موارد فقدان سلامتی که به از کار افتادگی منجر می‌شود را ایجاد می‌کند. تخمین زده می‌شود که در سال ۱۹۹۸، حدود ۲/۲ میلیون نفر به علت ابتلا به اسهال از بین رفتند (۱). در ایران اسهال منجر به ۱۸ میلیون مورد بیماری، ۱۲ میلیون ویزیت پزشکی، ۱ میلیون پذیرش در بیمارستان و ۵۱۶ مورد مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال می‌شود. اسهال حاد عفونی پنجمین عامل منجر شونده به مرگ و علت ۱۶/۲ درصد از بیماری‌های عفونی در ایران را به خود اختصاص داده است (۲-۸).

اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین به وسیله‌ی کونووالکوک و همکاران در اواخر دهه ۱۹۷۰ در کانادا به عنوان یک عامل اتیولوژیک اسهال شناسایی شدند (۹).

سویه‌های اشریشیاکلی وروتوکسیژنیک توکسینی ترشح م‌کنند که به دلیل توانایی آن در کشتن سلولهای Vero وروتوکسین و به دلیل شباهتش به نوروکسین شیگای مترشحه از شیگلا دیسانتری تیپ یک، توکسین شبه شیگای نامیده می‌شود و سویه‌های تولیدکننده‌ی آن به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین نیز معروفند. توکسین‌های ورو به دو گروه *stx1* و *stx2* تقسیم بندی می‌شوند. *stx2* از نظر عمل، ساختار و رفتار بیوشیمیایی، بسیار شبیه *stx1* است، با این وجود هیچ اثر خنثی سازی متقاطع بین این دو توکسین وجود ندارد. بروز کلینیکی عفونت با اشریشیاکلی‌های شیگاتوکسین‌زا می‌تواند از اسهال آبکی خفیف تا کمپلکس‌های جدی از قبیل کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک تا حتی مرگ باشد (۱۰-۱۹).

از دیگر عوامل بیماری‌زای این سویه‌ها، پروتئینی به نام اینتیمین (Intimin) است که مسؤول اتصال باکتری به روده

پاییز سال ۱۳۹۰ به بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه کرده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. جزئیات نمونه‌های مورد بررسی از قبیل تعداد کودکان زیر ۱۰ سال، مردان، زنان و افراد بستری در چند بازه‌ی سنی مختلف به تفکیک در جدول ۱ ذکر شده است.

جدایه‌های اشریشیاکلی پس از استخراج DNA، به وسیله‌ی PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده توسط ویدال (Vidal) و همکاران (۳۲) مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۲). مواد PCR از شرکت سیناژن ساخت ایران تهیه شد و واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۰/۵ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام گردید. برنامه دمایی مورد استفاده به ترتیب واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل از قرار ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت سیناژن، ایران) ۱/۵ درصد الکتروفورز (Biorad، ساخت آمریکا) گردید.

جدایه‌های اشریشیاکلی واجد ژن‌های حدت فوق، از نظر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، تریمتوپریم، آمپیسیلین مورد آزمون قرار گرفتند. نهایتاً نتایج با استفاده از نسخه ۱۵ نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

لازم و ضروری است که چنین مطالعاتی در هر منطقه‌ای به صورت جداگانه و چند وقت یکبار انجام و همچنین تکرار شوند.

تست‌های مولکولی جهت تشخیص دقیق بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به کار گرفته شده و در نتایج تست‌های مولکولی خطای کمتری وجود دارد. روش PCR به عنوان یک روش اختصاصی، دقیق و حساس جهت شناسایی اختصاصی اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین با به کار گرفته شده است (۳۲).

با توجه به اینکه در سال‌های اخیر در ایران و خصوصاً منطقه شهرکرد در زمینه‌ی بررسی عوامل ایجاد کننده اسهال خصوصاً اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین چندان مطالعه‌ای صورت نگرفته، در مطالعه‌ی حاضر با توجه به اهمیت بیماری‌زایی اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین، به جست‌وجوی ژن‌های stx1، stx2 و eaeA در اشریشیاکلی‌های جداسازی شده از بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد به روش Multiplex PCR پرداخته شد.

## روش

جامعه‌ی پژوهش را کودکان، زنان و مردان مبتلا به اسهال که توسط پزشک جهت انجام آزمایش به بیمارستان هاجر شهرکرد ارجاع داده شده بودند، تشکیل داده‌اند که از بین آنها ۱۱۰ نفر واجد شرایط ورود به مطالعه بوده‌اند و مورد بررسی قرار گرفتند. معیار و شاخص اصلی ورود به مطالعه برای افراد مورد بررسی، آلودگی مدفوع (نمونه‌های اسهال) به اشریشیاکلی بود. در این مطالعه ۱۱۰ جدایه‌ی اشریشیاکلی جمع‌آوری شده از افراد مبتلا به اسهال که در

جدول ۱: جدایه های اشریشیاکلی مورد بررسی (با تفکیک جنسیت در بازه های سنی مختلف)

	۱۰ >		۱۱-۲۰		۲۱-۳۰		۳۱-۴۰		۴۰ <		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کودک	۴۷/۱۱۰	%۴۲/۷۲	-	-	-	-	-	-	-	-	۴۷/۱۱۰	%۴۲/۷۲
مرد	-	-	۱۲/۳۷	%۳۲/۴۳	۱۶/۱۷	%۹۴/۱۱	۶/۷	%۸۵/۷۱	۱/۲	%۵۰	۳۵/۱۱۰	%۳۱/۸۱
زن	-	-	۲۵/۳۷	%۶۷/۵۶	۱/۱۷	%۵/۸۸	۱/۷	%۱۴/۲۸	۱/۲	%۵۰	۲۸/۱۱۰	%۲۵/۴۵
بستری	۱۱/۴۷	%۲۳/۴	۱۰/۳۷	%۲۷/۰۲	۳/۱۷	%۱۷/۶۴	۳/۷	%۴۲/۸۵	-	-	۲۷/۱۱۰	%۲۴/۵۴
کل (کودک، مرد و زن)	۴۷/۱۱۰	%۴۲/۷۲	۳۷/۱۱۰	%۳۳/۶۳	۱۷/۱۱۰	%۱۷/۴۵	۷/۱۱۰	%۶/۳۶	۲/۱۱۰	%۱/۸۱	۱۱۰/۱۱۰	%۱۰۰

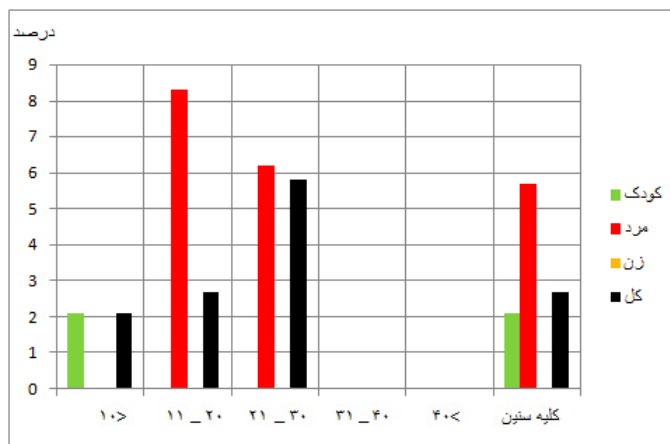
جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمرها	توالی پرایمرها	اندازه محصول
Stx1	F: 5' CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG 3' R: 5' CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG 3'	348 bp
Stx2	F: 5' ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G 3' R: 5' GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C 3'	584 bp
eaeA	F: 5' TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT 3' R: 5' GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG 3'	482 bp

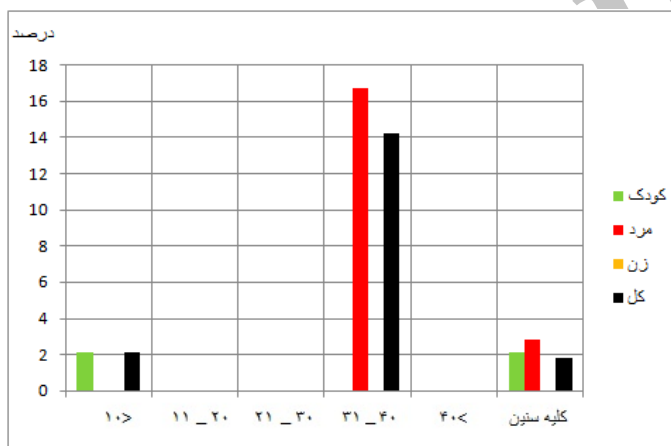
## نتایج

مورد بررسی، واجد ژن های حدت ذکر شده نبودند. در گروه مردان درصد اشریشیاکلی های واجد ژن *stx1* و ژن *eaeA* به ترتیب در بازه های سنی ۱۱-۲۰ سال و ۳۱-۴۰ سال به میزان قابل ملاحظه ای نسبت به سایر بازه های سنی بیشتر بود (شکل های ۱ و ۲). پنج جدایه ی واجد ژن های حدت، کمترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و کلرامفنیکل از خود نشان دادند و بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به تریمتوپریم و آمپیسیلین دارا بودند (شکل ۳).

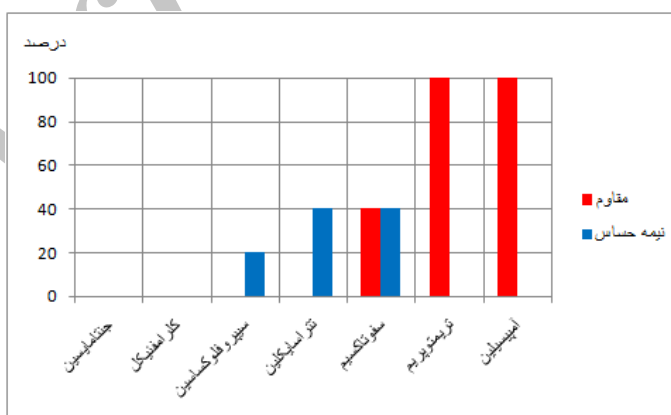
میزان ژن های *stx1* و *eaeA* در جدایه های اشریشیاکلی به ترتیب ۲/۷ درصد (۳ از ۱۱۰) و ۱/۸ درصد (۲ از ۱۱۰) بود. ژن *stx2* در هیچ کدام از جدایه ها یافت نشد. جدایه های اشریشیاکلی که واجد ژن *stx1* بودند، هیچ کدام حامل ژن *eaeA* نبودند. از ۵ جدایه ی واجد ژن های حدت، ۲ جدایه (یک *stx1* و یک *eaeA*) معلق به کودکان زیر ۱۰ سال و ۳ جدایه (دو *stx1* و یک *eaeA*) متعلق به مردان بود. از پنج نفری که آلوده به اشریشیاکلی های واجد ژن حدت بودند یک نفر بستری (کودک) و سایرین به صورت سرپایی بودند. در گروه زنان، هیچ کدام از اشریشیاکلی های



شکل ۱: درصد آلودگی با اشریشیاکلی‌های کدکنده‌ی ژن stx1 با تفکیک جنسیت و در بازه‌های سنی مختلف



شکل ۲: درصد آلودگی با اشریشیاکلی‌های کدکنده‌ی ژن eaeA با تفکیک جنسیت و در بازه‌های سنی مختلف



شکل ۳: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های واجد ژن‌های حدت

## بحث

دادند که در هیچ یک از جدایه‌ها، اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین یافت نشده است (۲۱). طی مطالعه‌ای در آرژانتین (۲۰۱۲) در نمونه‌های اسهال آبکی یا خونی در کوکان ۶ ماهه تا ۱۵ سال، ۴/۱ درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین بودند (۲۲). در مطالعه‌ی شتی (Shetty) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در هندوستان که به بررسی اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین در بیماران مبتلا به اسهال حاد پرداخته شد، اعلام گردید که ۳/۴ درصد از جدایه‌های اشریشیاکلی- شیگاتوکسین تولید می‌کنند (۲۳).

در ایران نیز در مورد بررسی اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین و نقش آنها در ایجاد اسهال مطالعاتی صورت گرفته است که از شیوع متفاوت اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین در نقاط مختلف حکایت می‌کنند. در تعدادی از مطالعات مشابه با مطالعه‌ی ما، میزان بسیار پایینی از آلودگی گزارش شده است. در یک بررسی که در مدفوع بیماران مبتلا به اسهال خونی در تهران صورت گرفت، میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین ۲ درصد گزارش گردید (۲۴). نایب آقایی و منصور (Nayeb Aghaei and Mansouri) نیز در بررسی اشریشیاکلی‌های مولد شیگا توکسین در نمونه‌های مدفوع با روش Multiplex PCR اعلام نمودند که ۲ درصد از نمونه‌های مدفوعی بیماران آلوده به اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین بودند (۲۵). در مطالعه‌ی دیگر در مورد فراوانی اشریشیاکلی تولید کننده شیگاتوکسین در بیماران با کولیت هموراژیک مراجعه کننده به بیمارستانهای تهران میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین ۲/۵ درصد گزارش گردید (۲۶). در مطالعه‌ای که در گرگان صورت گرفت، میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های انتروهموراژیک ۵ درصد اعلام شد (۲۷).

نشخوارکنندگان به عنوان مخزن اصلی اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین محسوب می‌شوند و ممکن است از طریق این حیوانات، عوامل عفونت‌زا به انسان منتقل شوند. نوشیدن آب از منابعی از قبیل چشمه‌ها و چاه‌های آلوده که عمدتاً در روستاها مورد استفاده قرار می‌گیرند، از عوامل مهم آلودگی تلقی می‌شوند. منبع عفونت می‌تواند آغشته شدن به گل و لای آلوده به مدفوع گاو و تماس مستقیم با حیوان باشد. استفاده از کودهای حیوانی برای پرورش سبزیجات و میوه‌ها می‌تواند به آلوده شدن این محصولات در هنگام پرورش و یا برداشت محصول منجر شود و نهایتاً باعث بروز بیماری گردد. انتقال اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین از طریق تماس انسان‌های آلوده با افراد سالم و غیر آلوده نیز ممکن است رخ دهد. عادات غذایی از قبیل مصرف گوشت‌های نیم‌پز و خام و لبنیات غیرپاستوریزه که با زندگی روستایی ارتباط نزدیکی دارند را نیز به عنوان عوامل مؤثر در ابتلای به این عوامل می‌توان ذکر کرد. شرایط آب و هوایی معتدل نیز بر افزایش میزان آلودگی بسیار مؤثر است (۳۳-۳۵). بنابراین فاکتورها و عوامل متعددی بر میزان آلودگی می‌توانند تأثیرگذار باشند.

غیر از سروتپ اشریشیاکلی O157، سایر سروتپ‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین عامل ایجاد ۶۰ درصد از عفونت‌های اشریشیاکلی شیگاتوکسین‌زا هستند و در بسیاری از نقاط دنیا از قبیل آرژانتین، استرالیا، اسپانیا، دانمارک، شیلی و آلمان شایع می‌باشند (۲۰).

در مطالعات خارجی گزارشات مختلفی وجود دارد که از شیوع متفاوت اشریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین از صفر تا درصدهای بالاتر در نقاط مختلف حکایت می‌کنند. کبیر (Kabir) و همکاران در بررسی خود در سال ۲۰۱۲ در بنگلادش روی بیماران مبتلا به اسهال حاد گزارش

میزان پایین آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین مؤثر بوده باشد. همان‌طور که ذکر گردید، شرایط آب و هوایی نیز بر میزان آلودگی بسیار مؤثر است. آب و هوای شهرکرد سرد و خشک است و همچنین این مطالعه در فصل پاییز انجام شده است. این مسائل می‌توانند بر بقا و رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌های محیط اثر منفی بگذارد و روی میزان پایین آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین در این مطالعه تأثیرگذار باشد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان محدودیت در زمینه‌ی نمونه‌گیری را ذکر کرد. همچنین در شرایط محدودی دسترسی به سابقه‌های قبلی برای پی‌گیری وجود دارد. بنابراین مطالعه مزبور نمی‌تواند به کل بیماران مبتلا به اسهال در شهرکرد عمومیت یابد. البته با نمونه‌گیری‌های گسترده‌تر و در فصول مختلف به تعمیم‌پذیری این یافته‌ها می‌توان بیشتر تحقیق بخشید. بی‌شک تلفیق رویکردهای کمی و کیفی نیز می‌تواند در تکمیل مطالعات تکمیلی ارزشمند باشد.

### نتیجه‌گیری

اگرچه میزان عفونت با اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین در این مطالعه چندان بالا نبود، اما به دلیل رخداد بالقوه و احتمال بروز عوارض وخیمی همچون سندروم اورمی همولیتیک و عدم شناسایی این سویه‌ها با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور، به‌کارگیری روش‌های مولکولی با سرعت، دقت و ویژگی بالا، به منظور شناسایی موارد مشکوک، خصوصاً در مراکز طبی کودکان ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به یافته‌ها مطالعه‌ی بیشتر در این زمینه‌ی بررسی سایر عوامل تأثیرگذار در اسهال که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته‌اند، توصیه می‌گردد.

اما در تعدادی از مطالعات دیگر میزان نسبتاً بالایی از آلودگی گزارش شده است. طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ در تهران صورت گرفت، اعلام گردید که در موارد اسهال حاد میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین ۴۴/۷ درصد بوده است (۲۸). در بررسی اصلانی (Aslani) و همکاران نیز در بیماران مبتلا به اسهال میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین ۴۴/۵ درصد اعلام گردید (۲۹). در مطالعه‌ی بنیادیان (Bonyadian) و همکاران در بیماران مبتلا به اسهال میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین ۳۶ درصد گزارش گردید (۳۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ در تهران صورت گرفت، اعلام شد که در موارد اسهال حاد میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های مولد شیگاتوکسین ۳۴/۵ درصد بوده است (۳۱).

اگرچه نتایج این مطالعه نشان داد که بیماران مبتلا به اسهال، با اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین می‌توانند آلوده شوند، اما با توجه به میزان پایین آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین، به نظر می‌رسد که عوامل عفونی دیگری ممکن است، نقش اصلی را در ایجاد اسهال در نمونه‌های مورد بررسی ایفا کنند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. از نظر میزان آلودگی، این مطالعه با چندین مطالعه‌ی صورت گرفته در کشور (۲۶-۲۴) و بعضی از مطالعات خارجی (۲۳، ۲۲) تشابه دارد. از آنجایی که افرادی که در روستا زندگی می‌کنند، دامپروران، قصابان، دامپزشکان و ... در ارتباط و تماس بیشتری با دام‌ها هستند، میزان آلودگی به اشریشیاکلی‌های تولیدکننده‌ی شیگاتوکسین می‌تواند در آن‌ها بیشتر باشد. این مطالعه روی بیماران مبتلا به اسهال حاد مراجعه‌کننده در یکی از بیمارستان‌های مرکز استان (شهرکرد) انجام شده است و مردم شهرکرد نسبت به سایر نقاط استان، کمتر به دامپروری و ارتباط با دام‌ها مشغول هستند، ممکن است این مسأله بر

مسأله باشد که ژن *stx2* در ایجاد اسهال های این منطقه چندان نقشی ندارد.

همچنین با توجه به نتایج به نظر می رسد که ژن *stx2* در این منطقه چندان شایع نیست که ممکن است بیانگر این

## References

- 1-World Health Organization. Water sanitation and health. Geneva: World Health Organization; 2006.
- 2-Barahona F. Epidemiology and family health survey, Honduras, 1987, final report. Tegucigalpa, Honduras: Honduran Ministry of Public Health, Association For Family Planning in Honduras, Management Sciences for Health, and Family Health International; 1989. P. 140.
- 3-Kalantar E, Soheili F, Salimi H, Soltan Dallal M M. Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. *Jundishapur J Microbiol* 2011; 4(1): 23-8.
- 4-El-Gilany AH, Hammad S. Epidemiology of diarrhoeal diseases among children under age 5 years in Dakahlia, Egypt. *East Mediterr Health J* 2005;11(4):762-75.
- 5-The Ministry of Health and Medical Education of the Islamic Republic of Iran. Vice-chancellor for health. Tehran: Diseases Management Center; 2000.
- 6-Naghavi, M. Mortality pattern in 23 provinces of Iran, 2003. Tehran: Ministry of Health and Medical Education; 2005.
- 7-Statistical Center of Iran. National Census of Population and Housing 1996: 22 municipal districts. Tehran: Statistical Center of Iran; 1999.
- 8-Ministry of Health and Medical Education and UNICEF. Population and health in the Islamic Republic of Iran-DHS. Tehran: Ministry of Health and Medical Education; 2000. P. 90.
- 9-Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991;13:60-98.
- 10-Walker TS. Microbiology. Philadelphia:W.B. Sanders; 1998. P. 20-30.
- 11-Adwan k, Abu-Hassan N, Essawi T, Bdir M. Isolation and characterization of shiga toxicogenic *Escherichia coli* strains from northern Palestine. *J Med Microbiol* 2002;51(4):332-5.
- 12-Chart H, Perry NT, Cheasty T, Wright PA. The kinetics of antibody production to antigens of *Escherichia coli* O157 in a pregnant woman with haemolytic uraemic syndrome. *J Med Microbiol* 2002;51(6):522-5.
- 13-Tsuji T, Watanabe K, Miyama A. Monomer of the B subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* has little ability to bind to GM1 ganglioside compared to its coligenoid. *Microbiol Immunol* 1995;39(10):817-9.
- 14-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.
- 15-Donnenberg MS. *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press, San Diego, California, U.S.A 2002.
- 16-Wales AD, Woodward MJ, Pearson GR. Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* 2005;132(1):1-26.
- 17-Montenegro MA, Bülte M, Trumpf T, Aleksić S, Reuter G, Bulling E, et al. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clinl Microbiol* 1990;28(6):1417-21.
- 18-Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 2007;85(13 Suppl):E45-62.
- 19-Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, et al. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987;156(1):175-82.
- 20-Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2006;43(12):1587-95.
- 21-Kabir MR, Hossain MA, Paul SK, Mahmud C, Sultana S, Yesmin T, et al. Multiplex polymerase chain reaction for rapid identification of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Mymensingh Med J* 2012;21(3):404-10.
- 22-López EL, Contrini MM, Glatstein E, Ayala SG, Santoro R, Ezcurra G, et al. An epidemiologic surveillance of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* infection in Argentinean children: risk factors and serum Shiga-like toxin 2 values. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(1):20-4.
- 23-Shetty VA, Kumar SH, Shetty AK, Karunasagar I, Karunasagar I. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *J Lab Physicians* 2012;4(1):24-9.
- 24-Mirsalehian A, Kamalkhani R, Kazemi B, Fathelahzadeh B, Ali Gholi M, Khalkhali M. Frequency of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* by multiplex PCR in patients with bloody diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2005;62(12):1008-15. [In Persian]



- 25-Nayeb Aghaei SM, Mansouri SH. Detection of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* (O157:H7) isolated from of urinary and stool specimens by multiplex-PCR. *Yaft-e* 2006; 8(27):21-8. [In Persian]
- 26-Aslani MM, Sheshpoli AS, Sadeghiyan S, Alikhani MY. Frequency of Shiga-toxin producing *E.coli* (STEC) in patients with hemorrhagic colitis referring to Tehran hospitals. *J Gorgan Univ Med Sci* 2008;9(2):17-23. [In Persian]
- 27-Dadgar T, Ghaemi E, Aslani M, Moradi M. Prevalence and characteristics of enterohaemorrhagic *E. coli* in diarrhoeal samples in North of Iran by PCR method. *Trav Med Infect Dis* 2007;5(6):412.
- 28-Jafari F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali MR. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. *JPN J Infect Dis* 2008;61(4):269-73.
- 29-Aslani MM, Ahrabi SS, Alikhani YM, Jafari F, Zali RM, Mani M. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. *Saudi Med J* 2008;29(3):388-92.
- 30-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;132:328-31.
- 31-Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Derakhshan F, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009;20(3):e56-62.
- 32-Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clinl Microbiol* 2004;42(4):1787-9.
- 33-Beutin L, Bülte M, Weber A, Zimmermann S, Gleier K. Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect* 2000;125(1):47-54.
- 34-Beutin L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006;53(7):299-305.
- 35-Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 2005;36(3):289-311.

Archive of SID

## «Original Article»

## Multiplex PCR detection of *Escherichia coli* carrying Shiga toxin genes in *E. coli* isolated from patients with diarrhea in Hajar hospital, Shahrekord, Iran

Samaneh Mehrabiyan<sup>1</sup>, Hossein Tahmasby<sup>2\*</sup>, Hassan Momtaz<sup>3</sup>, Sharmin Farahmandi<sup>1</sup>, Hadi Monji<sup>1</sup>, Keyvan Farahmandi<sup>4</sup>, Zinat Davoudi Jouneghani<sup>1</sup>

1-Student of Veterinary Medicine, Research Institute of Zoonotic Diseases, School of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

2-Graduated Student of Veterinary Medicine, Research Institute of Zoonotic Diseases, School of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

3-Associate professor, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch of Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4-Graduated Student of Medicine, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\*Corresponding author:  
Hossein Tahmasby; Research Institute of Zoonotic Diseases School of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.  
Tel: 09137325071  
E-mail: H.Tahmasby@Yahoo.com

### Abstract

**Background:** Diarrhea causes 4% of all deaths and 5% of health loss lead to disability world-wide. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* can cause mild watery diarrhea to more serious complications from hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome to even death. Present study was conducted to detect *E. coli* carrying Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) in *E. coli* isolated from patients with diarrhea in Hajar Hospital, Shahrekord, Iran.

**Methods:** A total of 110 *E. coli* isolates collected from patients with diarrhea in 2011 were evaluated to investigate *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes by multiplex PCR.

**Results:** The rate of *stx1* and *eaeA*-positive *E. coli* isolates were 2.7% (3/110) and 1.8% (2/110), respectively. However, *stx2* gene was not found in any isolate, *eaeA* was not also present in *stx1*-positive *E. coli* isolates. Virulence Genes were not found in *E. coli* isolated from Women. The most antibiotic resistance rates of isolated virulence genes-positive *E. coli* were to Ampicillin and Trimethoprim and lowest antibiotic resistance was observed against Gentamicin and Chloramphenicol.

**Conclusion:** The present study indicates that other infectious agents may play major role in the cause of diarrhea in the tested samples, especially in the women. Further studies on the causes of diarrhea are recommended.

**Keywords:** diarrhea, *Escherichia coli*, Shiga toxin, gene, PCR.

► Please cite this paper as:

Mehrabiyan S, Tahmasby H, Momtaz H, Farahmandi S, Monji H, Farahmandi K, Davoudi Jouneghani Z. Multiplex PCR detection of *Escherichia coli* carrying Shiga toxin genes in *E. coli* isolated from patients with diarrhea in Hajar hospital, Shahrekord, Iran. *Jentashapir* 2013;4(3):193-202

Received: 14.11.2012

Accepted: 16.03.2012

دو ماهنامه علمی - پژوهشی جنتاشاپیر، دوره ی چهارم، شماره ی ۳، سال ۱۳۹۲

<http://journals.ajums.ac.ir/jentashapir>

[www.SID.ir](http://www.SID.ir)