Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲، شماره ۱۲، صفحات ۱۰۰۸ تا ۱۰۱۵ ، (۱۳۸۳)

فراوانی سویه‌های مولد شیگاتوکسین اشریشیاکلی در مدفوع بیماران اسهال خونی، به روش Multiplex PCR

دکتر اکبر میرصالحیان (دانشیار)*، رضا کمال‌خانی (کارشناسی ارشد)*، دکتر بهرام کاظمی (دانشیار)، دکتر بهرام فتح‌اله‌زاده (دانشیار)*، خانم مرضیه علی‌قلی (مربی)***

* گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

مقدمه: در سراسر جهان بیماری‌های حاد اسهالی یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر، بخصوص در گروه سنی اطفال محسوب می‌گردند. در این بین، مطالعه سویه‌های مولد شیگاتوکسین اشریشیاکلی **(STEC)** که علاوه بر ایجاد اسهال با عوارض وخیم و مرگ آوری چون سندرم اورمی همولیتیک **(HUS)** همراه است، ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهال خونی که در آزمایش میکروسکوپی از نظر آمیب آنتاموبا هیستولیتیکا منفی بودند مورد بررسی باکتریولوژیک قرار گرفتند. در مورد سویه‌های سوربیتول منفی آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس با آنتی سرم مونوالان **O157** انجام گرفت. پس از استخراج **DNA** ازکلنی‌های **E.coli** حاصل از کشت، واکنش **Multiplex PCR** برای ژن‌های **Stx,II** و **StxI** انجام پذیرفت و محصول آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در ٤٧ نمونه (۳۱/۳ درصد) عامل سببی اسهال (به غیر از **STEC**) گونه‌های مختلف شیگلا و بعضاً سالمونلا شناخته شد. در بین ۱۰۳ سویه **E.coli** جدا شده (مشکوک به **STEC**) تنها ۳ نمونه (۲ درصد کل نمونه‌ها) از نظر ژن‌های شیگاتوکسین مثبت بودند، که هر سه متعلق به سروتیپ **E.coli O157** می‌باشند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: اگرچه ظاهراً شیوع عفونت با سویه‌های **STEC** در ایران بالا نیست، اما به دلیل بروز عوارض وخیمی چون **HUS** از یک سو و عدم شناسایی این سویه‌ها با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور از سویی دیگر، بکارگیری روش‌های مولکولی و سرولوژی با سرعت، دقت و ویژگی بالا، به منظور شناسایی موارد مشکوک، حداقل در مراکز طبی کودکان، ضروری به نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سراسر جهان بیماری‌های حاد اسهالی یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر، بخصوص در گروه سنی اطفال محسوب می‌گردند (۱). این بیماریها در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین، مسئول ٤ تا ٦ میلیون مرگ و میر در سال، یا به عبارت هشدار دهنده‌ای ۱۲٦۰۰ مرگ در روز می‌باشند (۲،۳). بررسی‌های اپیدمیولوژیک در کشورهای پیشرفته از جمله آمریکا حاکی از آن است که در میان عوامل باکتریال مسبب اسهال حاد، اشریشیاکلی مولد شیگاتوکسین(STEC) پس از گونه‌های کمپیلوباکتر، سالمونلا و شیگلا در مقام چهارم قرار دارد (٤). مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های واگیر (CDC)، تخمین می‌زند که در آمریکا عفونت ناشی از اشریشیاکلی O157:H7 به بیش از ۲۰/۰۰۰ مورد در سال و مرگ و میر ناشی از آن به بیش از ۲۵۰ مورد می‌رسد (٤).

انتقال فرد به فرد به دلیل دوز عفونی بسیار پایین (صد تا چند صد عدد باکتری)، به آسانی صورت می‌گیرد (۵). هر ماده غذایی از گوشت و سبزیجات گرفته تا مواد لبنی و آب اشامیدنی می‌توانند عامل عفونت باشند (٦،٤). بیماری ابتدا با اسهال آبکی همراه بوده که اغلب پس از ۲ تا ۳ روز به اسهال خونی منتهی می‌گردد. علاوه بر این عفونت‌های ناشی از STEC در ۱۰-۵ درصد موارد به سندرم وخیم اورمی همولیتیک (HUS)، که با نارسایی حاد کلیوی، آنمی میکروآنژیوپاتی همولیتیک و ترومبوسیتوپنی همراه است، ختم می‌گردد (٤، ٦، ۷).

شیگاتوکسین‌های StxII و StxI تولید شده توسط این دسته از باکتری‌ها که به بیش از ۱۰۰ سروتیپ می‌رسند (٤و٦)، عامل اصلی پاتوژنز و عوارض ناشی از عفونت هستند (۵، ٦). طی تحقیقات منتشر شده در آمریکا ۵۰ درصد مبتلایان به HUS نیاز به دیالیز پیدا می‌کنند، هرچند طی دو دهه اخیر میزان مرگ و میر مبتلایان به HUS از ۵۰ درصد به ۱۰ درصد کاهش یافته است با این حال تعداد قابل توجهی از بازماندگان (حدود ۳۰ درصد) از ناتوانی‌های دائمی شامل نارسائی مزمن کلیوی، فشار خون بالا و ناراحتی‌های عصبی رنج می‌برند (٤،٦،۸).

ابتلاء درصدی از بیماران به سندرم‌های وخیم و مرگ‌آور مثل HUS ازیک سوم و عدم افتراق سویه‌های مسئول عفونت از اشریشیاکلی فلور روده‌ای با روش‌های مرسوم (به غیر از E.ocli O157 که در محیط سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC) قابل افتراق است که استفاده از آن هم در آزمایشگاه‌های کشور معمول نیست) از طرف دیگر، اهمیت بررسی عفونت ناشی از این گروه باکتری‌ها را دو چندان می‌گرداند.

شناسایی سویه‌های مولد شیگاتوکسین با روش‌های مختلفی مانند: کشت در محیط سوربیتول- مک کانکی آگار (تنها برای سروتیپ O157:H7)، ELISA، استفاده از کشت سلولی Vero، جداسازی به روش ایمونومگنتیک، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، هیبریدیزاسیون DNA و PCR صورت می‌گیرد (٤،۵،۹،۱۰،۱۱)؛ در میان روش‌های تشخیص عفونت‌های STEC، تکنیک PCR یکی از روش‌های مناسب جهت شناسایی سویه های مولد شیگاتوکسین اشریشیاکلی است، در این میان روش Multiplex PCR که در آن چند ژن شاخص (از جمله ژن‌های StxII و Stx I) به طور همزمان مورد بررسی قرار می‌گیرند، از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است (۵،٦،۱۲،۱۳) در این مطالعه از تکنیک Multiplex PCR بر روی کلنی‌های حاصل از محیط کشت استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و کشت

تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به اسهال خونی (که یا خون مشهود داشتند و یا تست Occult Blood (OB) در آنها 3^+ بود، و در ضمن در آزمایش میکروسکوپی از نظر آمیب آنتاموبا هیستولیتیکا منفی بودند) طی مدت زمان ۸ ماه از اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۲ الی آذرماه همان سال از چهار مرکز جمع‌آوری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از انتقال نمونه‌ها در محیط انتقالی **Cary- Blair** به آزمایشگاه بر روی دو محیط انوزین متیلن بلو **(EMB)** و سوربیتول مک کانکی آگار حاوی مکمل‌های سفیکسیم و تلوریت **(CT-SMAC)** تلقیح شدند، در محیط **CT-SMAC**، سوربیتول جایگزین لاکتوز شده است. اغلب سویه‌های **E.coli** به غیر از **E.coli O157** سوربیتول را تخمیر می‌کنند، کلنی‌های این سویه بر روی این محیط بی‌رنگ تا صورتی کم رنگ هستند، در ضمن وجود مکمل‌های تلوریت و سفیکسیم تا حدود زیادی از رشد بسیاری از گرم منفی‌های روده‌ای از جمله **E.coli** کومنسال جلوگیری می‌نماید.

کلنی‌های بی رنگ (سوربیتول منفی) بر روی محیط **CT-SMAC** و همچنین کلنی‌های دارای جلای فلزی بر روی محیط **EMB**، با محیط‌ها و تست‌های افتراقی آنتروباکتریاسیه مورد آزمایش قرار گرفتند.

بر روی سویه‌های سوربیتول منفی با استفاده از آنتی سرم مونووالان **E.coli O157** (کمپانی **MAST** انگلستان) آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس انجام گرفت.

PCR

استخراج DNA:

در مورد کلنی‌های سوربیتول منفی چهار تا پنج کلنی را در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل کردیم تا شیرابه نسبتاً غلیظی به دست آید. در مورد کلنی‌های با جلای فلزی بر روی **EMB** ابتدا چندین کلنی (حداقل ۱۰ عدد) به صورت متراکم روی یک ژلوز پایه کشت داده شد و سپس از آن برای تهیه شیرابه استفاده گردید. در ادامه حدود ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد تا پیکر سلول لیز شده و **DNA** آن خارج شود. سپس با استفاده از میکروفیوژ نمونه را در ۱۲/۰۰۰ دور برای ۵ دقیقه سانتریفوژ کردیم. پس از این مرحله محلول رویی که حاوی **DNA** بود برای واکنش **PCR** مورد استفاده قرار می‌گرفت.

واکنش PCR:

درا ین مطالعه پرایمرهای

Stx1F-5 – ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC – 3

Stx1R- 5´ – AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC- 3´

که تعداد ۱۸۲ جفت باز از ژن **Sxt I** و پرایمرهای

Stx 2F- 5´- GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC – 3´

Stx2R- 5´ – TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G – 3´

که تعداد ۲۵۶ جفت باز از ژن **StxII** را **Amplify** می‌کنند، مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرها جهت سنتزبه کمپانی **fermentas** سفارش داده شدند. طراحی پرایمرها به نحوی بود که علاوه بر اختصاصیت، دمای **Annealing** برابری داشته باشند تا در واکنش **Multiplex PCR** مشکلی ایجاد نگردد. پس از استخراج **DNA** از سوش استاندارد ، **PCR** های جداگانه برای ژن‌های**Stx II** و **Stx I** و با شرایط زیر انجام گرفت (شکل ۱).

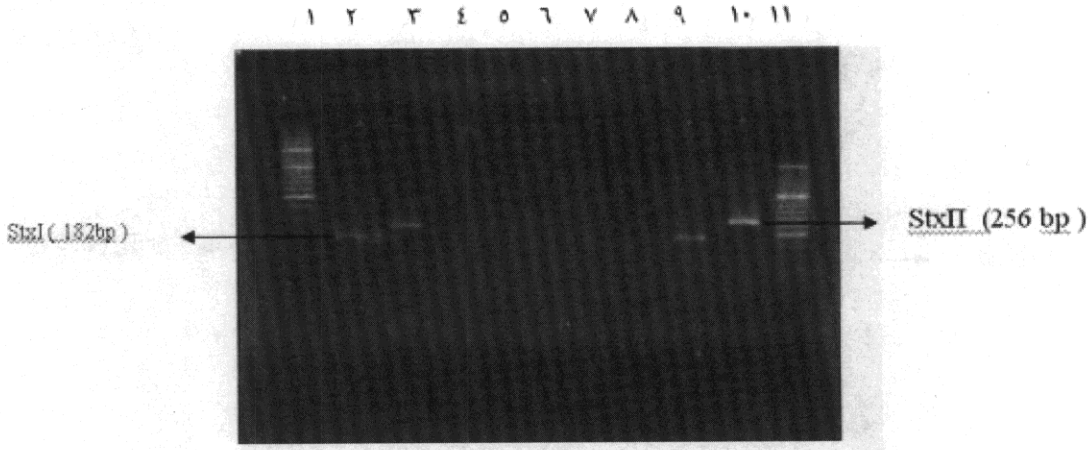
DNA	**1µg**
$MgCl_2$	**1mM**
dNTP	**0.2mM**
Primers (StxI, StxII)	**20pM**
Taq DNA poly.	**2.5U**
10X PCR Buffer	**5µl**

با آب مقطر حجم واکنش به ۵۰ میکرولیتر رسید و با ترموسایکلراپندورف واکنش **Amplification** به ترتیب زیر، شامل**Denaturation** در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، **Annealing** در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و **Extension** در ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. این مراحل ۳۰ دفعه تکرار شدند و قبل از این مراحل **Pre Denaturation** به مدت ۵ دقیقه و بعد از مراحل فوق نیز **Post Extension** به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای انجام واکنش **Multiplex PCR** از کلریدمنیزیوم با غلظت ۱/۵ میلی مولار و **dNTP** با غلظت ۰/۳ میلی‌مولار استفاده گردید.

جهت مشاهده قطعات **DNA** تکثیر شده، محصولات **PCR** روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای **DNA** تکثیر یافته ، توسط دستگاه **UV Transluminator** قابل مشاهده شده و از آنها عکس گرفته شد. (شکل‌های ۲ و ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تصویر ژل محصول PCR ژن StxI و StxII . مربوط به Set up آزمایش PCR .

ردیف ۱: سایز مارکر **100 bp** می باشد، که از **1500 bp** شروع شده است باند های **1000 bp** و **500 bp** آن نیز شارپ می باشد.

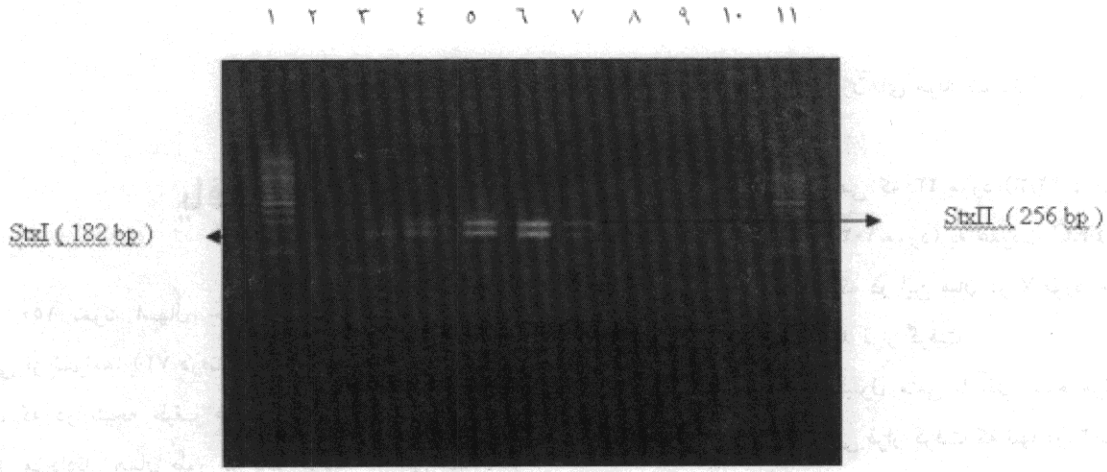
ردیف ۲ و ۹: کنترل مثبت ژن **StxI** . قطعه تکثیر یافته این ژن **182 bp** می‌باشد.

ردیف ۳ و ۱۰ : کنترل مثبت ژن **StxII**. قطعه تکثیر یافته این ژن **256 bp** می‌باشد.

ردیف٤ و ٥ : کنترل منفی واکنش، به ترتیب برای ژنهای **StxI** و **StxII**.

ردیف ٦ و ۷ : شاهد واکنش – که به جای **DNA** الگو حاوی آب است- به ترتیب برای ژنهای **StxI** و **StxII**.

ردیف ۱۱ : سایز مارکر **50 bp** می باشد، که از **1000 bp** شروع شده است باند های **500 bp** و **200 bp** آن نیز شارپ می باشد.



شکل۲- تصویر ژل محصول PCR با غلظتهای مختلف $MgCl_2$.

ردیف ۱ و ۱۱: سایز مارکر **100 bp** می باشد.

ردیف ۲: غلظت $MgCl_2$ ۰/۵ میلی مولار.

ردیف ۳: غلظت $MgCl_2$ ۰/۷۵ میلی مولار.

ردیف ٤: غلظت $MgCl_2$ ۱ میلی مولار.

ردیف ٥: غلظت $MgCl_2$ ۱/۲۵ میلی مولار.

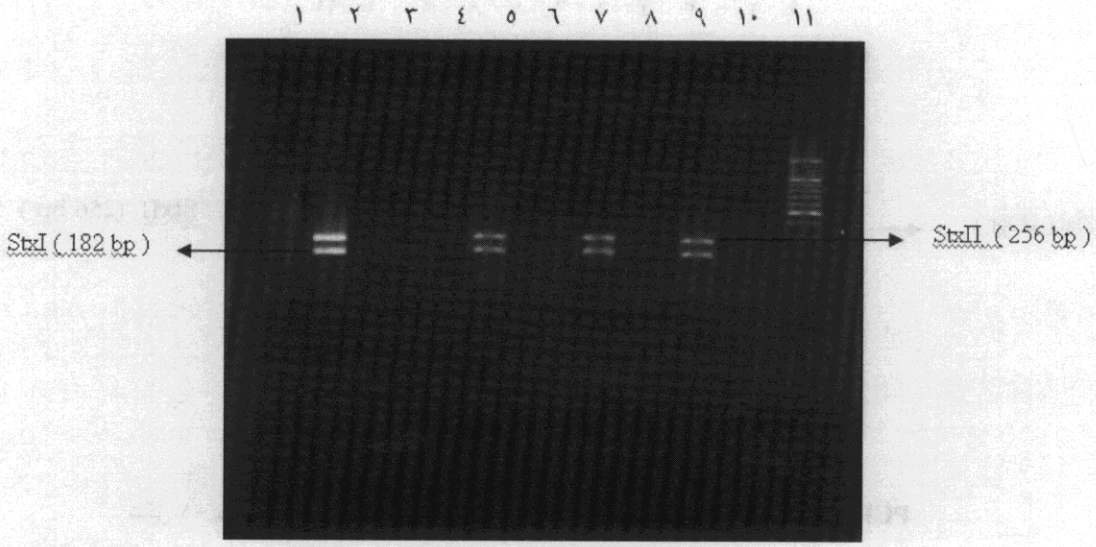
ردیف ٦: غلظت $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار.

ردیف۷: غلظت $MgCl_2$ ۱/۷۵ میلی مولار.

ردیف ۸: غلظت $MgCl_2$ ۲ میلی مولار

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- تصویر ژل محصولات **PCR** در نمونه های بالینی.

ردیف ۱ و ۱۱: سایز مارکر **100 bp**.

ریف ۲: کنترل مثبت

ردیف۳ : کنترل منفی.

ردیف ٤: شاهد واکنش (آب مقطر).

ردیف ٦، ۸ و ۱۰ : نمونه های منفی.

ردیف ٥، ۷ و ۹ : نمونه های مثبت.

یافته‌ها

از ۱۵۰ نمونه اسهال خونی بررسی شده، درصد قابل توجهی از نمونه‌ها (۷۲ درصد) مربوط به مرکز طبی کودکان بودند، که در نتیجه طیف غالب را در این مطالعه کودکان تشکیل می‌دادند. همان طور که ذکر گردید در این مطالعه از نمونه‌های اسهال خونی استفاده شد که در بدو امر از نظر آمیب آنتاموبا هیستولیتیکا منفی گزارش شده بودند. در این میان در ٤۷ نمونه (۳۱/۳ درصد) عامل سببی اسهال (به غیر از **STEC**) گونه‌های شیگلا و بعضاً سالمونلا شناخته شد. بر روی **E.coli** های جدا شده از ۱۰۳ (٦۸/۷ درصد) نمونه باقیمانده مشکوک به عفونت با **STEC** (سوربیتول منفی یا مثبت) آزمایش **Multiplex PCR** برای ژن‌های مولد شیگاتوکسین (**StxI, StxII**) انجام گرفت.

کلنی‌های سوربیتول منفی که ۲۳ مورد (۲۲/۳ درصد) در میان نمونه‌های مشکوک (۱۰۳ مورد) به عفونت **STEC** بود، مورد ارزیابی قرار گرفت که در این میان در ۷ مورد جنس و گونه اشریشیاکلی مورد تأیید قرار گرفت.

تمامی ۲۳ نمونه سوربیتول منفی با آنتی سرم مونووالان **E.coli O157** مورد ارزیابی قرار گرفت که تنها در ۳ مورد آن هم در میان همان ۷ مورد اشریشیاکلی تأیید شده توسط تست‌های بیوشیمیایی، مثبت بود. همانطوری که ذکر شد آزمایش **Multiplex PCR** بر روی کلیه **E.coli**های جدا شده از ۱۰۳ نمونه مشکوک به عفونت با **STEC** انجام گرفت، که تنها همان سه سویه تأیید شده توسط آنتی سرم مثبت بودند، که ۲ درصد کل نمونه‌های مورد بررسی (۱۵۰ مورد) را شامل

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. هر سه نمونه دارای هر دو ژن **StxI, StxII** بودند. نمونه‌های مثبت متعلق به ۲ پسر ١٤ و ١٨ ماهه و یک دختر ٤ ساله بودند. به علاوه در هر سه مورد سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک وجود داشت.

بحث

Su و **Brandt** در سال ١٩٩٥ در گزارشی **E.coli O157: H7** را مسئول ٠/٦ تا ٢/٤ درصد کل موارد اسهالی در آمریکا تخمین زدند و این آمار را در میان اسهال های خونی در حدود ١٥ تا ٣٦ درصد اعلام کردند (٤). برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که اشریشیاکلی **O157:H7** مسئول ٥٠ تا ٨٠ درصد عفونت‌های **STEC** می‌باشد که البته این تخمین تحت تأثیر این مطلب قرار می‌گیرد که دیگر سویه‌های **STEC** به طور روتین پیگیری نمی‌شوند، کما اینکه در کشورهای زیر خط استوا از جمله آرژانتین، استرالیا، شیلی و آفریقای جنوبی، سروتیپ‌های **non-O157** اغلب از اهمیت بالاتری برخوردارند (٤،٥).

مرکز ارائه آمار و فوریت‌های بیماریهای عفونی در آمریکا در سال ١٩٩٢ **E.coli O157:H7** را عامل باکتریال غالب در اسهال‌های خونی اعلام کرده است (٤) ایزولاسیون ساده این سروتیپ بر مبنای عدم توانایی در تخمیر سوربیتول احتمالاً باعث تخمین بالای شیوع این سروتیپ شده است.

Dylla و همکاران در سال ١٩٩٥ در آمریکا با روش **ELISA** شیوع سروتیپ **O157** را ٥/٩ درصد گزارش کردند (١٤).

در مطالعه‌ای دیگر، **Ritcheie** و همکاران در کانادا با بررسی ٩٤٤٩ نمونه مدفوع (با یا بدون علامت) با استفاده از کشت سلولی **Vero**، شیوع سروتیپ‌های **STEC** را ٠/٨٥ درصد گزارش کردند (١٥). در مطالعه **Park** و همکاران در آمریکا بر روی ٣٣٦ نمونه مدفوع به روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، فراوانی سروتیپ **O157** ٣/٥ درصد گزارش شده است (١١).در بررسی **Chapman** و **Siddons** باروش جداسازی ایمونومگنتیک، فراوانی سروتیپ **O157** در بین نمونه‌های اسهال خونی ٣/٧ درصد و در بین اسهالهای آبکی ٠/٨ درصد گزارش شده است (٩). در مطالعه **Ramotar** و همکاران درکانادا در سال ١٩٩٥ با استفاده از تکنیک **PCR** فراوانی سروتیپ‌های **STEC** ، ١/٣ درصد در بین اسهالهای آبکی اعلام شد (١٦). در بررسی **Paton** در استرالیا در سال ٢٠٠٢ با استفاده از تکنیک **Multiplex PCR** فراوانی سروتیپ‌های **STEC** ٠/٩ درصد در بین اسهالهای آبکی و ٦/٧ درصد در بین اسهالهای خونی اعلام شد (١٢).

در این مطالعه در مجموع سه نمونه (٢ درصد) مثبت به دست آمد، که همگی متعلق به سروتیپ **O157** بودند. نمونه‌های مثبت متعلق به ٢ پسر ١٤ و ١٨ ماهه و یک دختر ٤ ساله بودند که به ترتیب ساکن جاده ساوه، شهریار و زاهدان می‌باشند. با توجه به سن کم مبتلایان و محل سکونت آنها می توان تماس با محیط آلودهٔ به مدفوع دامهای اهلی از جمله گاو (به عنوان منبع **STEC**) را در کسب عفونت محتمل دانست. البته باید این نکته را هم در نظر گرفت که آب مصرفی دو بیمار اول، آب چاه بوده است.

پائین بودن میزان شیوع **STEC** در این مطالعه، در وهله اول می‌تواند بیانگر پائین بودن فراوانی آن در ایران باشد، اما نمی‌توان این نکته را نیز نادیده گرفت که در این مطالعه آزمون **PCR** بر روی کلنی‌های حاصل از محیط کشت صورت گرفته است، که به دلیل وجود اشریشیاکلی فلور روده‌ای و شباهت ظاهری و بیوشیمیایی آنها با سویه‌های **STEC**، احتمال از دست رفتن تعدادی از سویه‌های **(non-O157) STEC** وجود داشته است . اگرچه در بین نمونه‌های بالینی، انجام مستقیم **PCR** بر روی نمونه مدفوع، بدلیل وجود ممانعت کننده‌های فراوان و در نتیجه کاهش حساسیت **PCR**، مشکل می‌باشد؛ ولی می توان با روشهایی از جمله کشت کوتاه مدت (٤ ساعته) در یک محیط مایع مناسب به منظور کاهش رقت ممانعت کننده‌ها از یک طرف و افزایش تعداد ارگانیسم‌های هدف از طرف دیگر، تا حدی این مشکل را برطرف نمود (٥٨).

با توجه به اینکه هر سه نمونه مثبت متعلق به بیمارانی است که سابقهٔ مصرف آنتی‌بیوتیک (یک دوز سفتریاکسون- شربت آموکسی سیلین- کوتریموکسازول بعلاوهٔ فورازولیدون) داشتند، می‌بایست مسأله مقاومت‌های دارویی را در برنامه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

درمانی در نظر گرفت، چرا که درمان تجربی با یک داروی نامناسب با کاهش میزان فلور روده‌ای شرایط بقاء و تکثیر **STEC** را فراهم نموده و به پیشرفت بیماری کمک می‌کند. بدلیل اینکه در شرایط **In vitro** استفاده از آنتی‌بیوتیک با لیز دیواره سلولی باعث آزادسازی یکباره شیگاتوکسین می‌گردد، بعلاوه تیمار **E.coli O157:H7** با دوزی کمتر از دوز مهار کننده **(Subinhibitory)** آنتی‌بیوتیک‌ها میزان شیگاتوکسین را به طور فاحشی (تا ۵۰ برابر) در محیط کشت افزایش می‌دهد، که این تأثیر اغلب با آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کوتریموکسازول و سیپروفلوکسازین که با سنتز **DNA** باکتریال تداخل دارند صورت می‌پذیرد، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت **STEC** در هاله‌ای از ابهام قرار دارد (۵ و ۸) . بدین ترتیب امروزه راهکارهای درمانی بر ضد شیگاتوکسین در الویت قرار دارند. با توجه به اینکه اکثر علائم و عوارض عفونت ناشی از **STEC** وابسته به شیگاتوکسین آن است، می‌توان با مهار و بلوکه کردن آن در زمان مناسب به طور قابل توجهی از عوارض آن کاست. یکی از این روشها مهار توکسین در لومن روده با استفاده از گیرنده سنتتیک اختصاصی آن است. بر این اساس الیگوسکارید **Gb3** (گیرنده اختصاصی شیگاتوکسین) به طور مصنوعی در آزمایشگاه سنتز شده و با پیوند کووالان به ذرات سیلیسی بدست آمده از بقایای فسیلی دیاتومه‌ها **(Diatomaceous earth)** متصل می‌شوند. این ترکیب به بیمار خورانده می‌شود، که در لومن روده به شیگاتوکسین آزاد متصل شده و سپس دفع می‌گردد (۵).

در مطالعه ما هر سه نمونه مثبت حاوی هر دو ژن **Stx2** و **Stx1** بودند. بدلیل افزایش حدت بیماری توسط سویه‌هایی که هر دو ژن را حمل می‌کنند و احتمال پیشرفت بیماری به سمت سندرم اورمی همولیتیک (٤٨)، شناسایی و کنترل این عفونت‌ها اهمیتی دو چندان می‌یابد.

در این مطالعه بدلیل آنکه نتایج حاصل از کشت (جداسازی سه سویه **E.coli O157**) با نتایج حاصل از **PCR** بر روی کلنی‌های حاصل از کشت یکسان است در وهله اول می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که تنها از محیط **CT-SMAC** برای تشخیص استفاده شود، اما این نتیجه‌گیری بدلیل وجود احتمالی سویه‌های **non-O157** قابل تعمیم نیست.

اگرچه ظاهراً شیوع عفونت با سویه‌های **STEC** در ایران بالا نیست، اما به دلیل بروز عواقب وخیمی چون سندرم اورمی همولیتیک **(HUS)** از یک سو و عدم شناسایی این سویه‌ها با روش‌های کلاسیک و مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور از سوی دیگر، بکارگیری روش‌های مولکولی و سرولوژی با سرعت ، دقت و ویژگی بالا به منظور شناسایی موارد مشکوک، حداقل در مراکز طبی کودکان، ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نگارندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به مساعدت و همکاری جناب آقای دکتر حقی آشتیانی، ریاست محترم آزمایشگاه مرکز طبی کودکان و کارکنان محترم بخش میکروب شناسی این مرکز بویژه سرکار خانم کاشی و جناب آقای عرفانی اعلام می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. حاجی کریم، بهرام- یلدا، علیرضا؛ ترجمه مبانی طب داخلی سیسیل – بیماریهای عفونی ۲۰۰۱؛ تهران: انتشارات تیموورزاده: ۱۳۸۱.

۲. بنی فضل، محمد- رمضانی، آمیتیس- ولایتی، علی اکبر؛ ترجمه بیماریهای عفونی کودکان، نلسون ۲۰۰۰؛ تهران: انتشارات تیموورزاده: ۱۳۷۹.

۳. شهابی، کاملیا- نیک نفس، فریس- یلدا، علیرضا؛ ترجمه طب داخلی هاریسون- بیماریهای باکتریال ۲۰۰۱؛ تهران. انتشارات پورسینا: ۱۳۸۱.

4. Janda JM, Abbott SL. The Enterobacteria First ed. New york: Lippincott, 1998: 13-60.

5. paton, A.W. and paton, J.C Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin – producing Escherichia coli infection. Clin Microb Rev.1998; 11:450-479.

6. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, et al. Escherichia , Shigella and Salmonella. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al . eds. Manual of clinical Microbiology. 8th ed. Washington: ASM press, 2003: 654-659.

7. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al. Medical Microbiology. 4th ed. Missouri: Mosby, 2002: 232-244.

8. Nataro, J.P.,and kaper, J.B.Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microb. Rev.1998; 11: 142-201.

9. Chapman PA, Siddons CA. A compersion of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin – producing Escherichia Coli O_{157} from cases of bloody diarrhoea, non bllody diarrhoea and asymptomatic contacts. J Med Microbiol. 1996; 44: 264 – 271.

10. karch H,Janetzki – Mittmann C,Aleksic S,et al. Isolation of Enterohemorrhagic Escherichia coli O_{157} strains from patients with Hemolytic – Uremic Syndrome by using Immunomagnetic separation, DNA – based methods, and direct culture. J Clin Microbiol. 1996 ; 34 : 516-519.

11. Park CH, Hixon DL, Morrison WL, et al. Rapid diagmosis of Enterohemorrhagic Escherichia coli O_{157}: H7 directly from fecal specimens using immuno fluorescence stain. Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 101: 91-94.

12. Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of shiga toxigenic Escherichia coli by Muttiplex PCR for stx1, stx2 , eae, ehx A, and saa. J clin Microbiol. 2002 ; 40 : 271-274.

13. Paton AW, Paton JC. Direct detection of Shiga toxigenic Escherichia coli strains belonging to serogroups O_{111}, O_{157} and O_{113} by Multiplex PCR.J Clin Microbiol. 1999; 37: 3362-3365.

14. Dylla BL, Vetter EA, Hughes JG, et al. Evaluation of an immunoassay for direct detection of Escherichia coli O_{157} in stool specimens. J clin Microbiol. 1995 ; 33 : 222-224.

15. Ritchie M.Partingtone S,JessopJ, et al. Compersion of a direct facal shiga – like toxin assay and sorbitol – Mac Conkey Agar Culture for Laboratory diagnosis of Enterohemorrhagic Escherichia coli infection. J. clin Microbiol. 1992 : 30 : 461-464.

16. Romotar k , Waldhart B,church D,et al. Direct detection of Verotoxin – producing Escherichia coli in stool samples by PCR. J Clin Microbiol. 1995 ; 33 : 519-524.

www.SID.ir