مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

تشخیص ژن های Stx با استفاده از Multiplex PCR در نمونه های بالینی

عسکری احمدپور[۱]، جعفر امانی[۱*]، عباسعلی ایمانی فولادی[۱]، حمید صدیقیان راد[۱]، شهرام نظریان[۲]

۱. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۱/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۲/۱۲/۱۵

IJMM 1392; 7(2): P 40-50

نویسنده مسئول:

دکترجعفر امانی

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، بعد از خیابان شیخ بهایی، صندوق پستی ۵۴۸۷ – ۱۹۳۹۵

تلفن: ۰۲۱-۸۲۴۸۲۵۴۹

پست الکترونیک:

Jafar.amani@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: تاکنون روش های مختلف تشخیصی از جمله کشت سلولی، الایزا، *RFLP* برای شناسایی شیگاتوکسین ها بکار رفته ولی باتوجه به داشتن هزینه زیاد، صرف زمان زیاد وداشتن حساسیت پائین کمتر مورد توجه واقع شده اند دراین تحقیق برای شناسایی ژن stx و از روش Multiplex PCR استفاده شد.

مواد و روش کار: تاکنون روش های مختلف تشخیصی از جمله کشت سلولی، الایزا، *RFLP* برای شناسایی شیگاتوکسین ها بکار رفته ولی باتوجه به داشتن هزینه زیاد، صرف زمان زیاد وداشتن حساسیت پائین کمتر مورد توجه واقع شده اند دراین تحقیق برای شناسایی ژن *stx* و از روش *Multiplex PCR* استفاده شد.

یافته‌ها: هر جفت پرایمر به طور اختصاصی برای ژن های مورد نظر عمل نموده و قطعات مورد نظر از *PCR* بدست آمد. ازبین سویه های مثبت ۱۳ سویه حاوی ژن *Stx2*، ٤ سویه حاوی ژن *Stx1* و ٤ سویه حاوی *Stx1* و *Stx2* بوده است. در ژنوم تخلیص شده از دیگر باکتری های گرم منفی تکثیری مربوط به قطعات این توکسین صورت نگرفت. تعیین توالی انجام شده صحت قطعات تکثیرشده رامورد تائید قرار داد. حساسیت واکنش برای شناسایی ژن *Stx1*، ۱/۵٦ پیکوگرم در ماکرولیتر و*Stx2*، ۱/۰۸ پیکوگرم در ماکرولیتربود. سویه های مثبت همگی به پادزیست های سفکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتریاکسون، نیتروفورانتین حساس بودند.

نتیجه‌گیری: این روش یکی از روش های سریع و دقیق برای تشخیص انواع شیگاتوکسین ها می باشد و می توان ازآن درجهت شناسایی ژن های باکتری های تولید کننده شیگا توکسین استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سندرم اورمی همولتیک، *Shigella dysenteriae*، *E.coli O157:H7*، *Multiplex PCR*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

شیگاتوکسین ها متعلق به خانواده بزرگی از زهرابه های (توکسین) باکتری می‌باشند؛ که این زهرابه ها عمدتاً توسط باکتری *شیگلا دیسانتریه* (سروتیپ ۱) و پاتوتیپ STEC از قبیل E.coliO157 :H7 (شیگالایک زهرابه) تولید می‌شوند که قادر به ایجاد بیماری می‌باشند (۱). این سم های پروتئینی متعلق به خانواده AB زهرابه از زهرابه های پروتئینی می‌باشند. قسمت B زهرابه غیر توکسیک و به صورت پنتامریک بوده که به طور اختصاصی از طریق یک رسپتور گلیکولیپیدی به نام Gb3 به سطح سلول هدف متصل می‌شود با فعال شدن بخش کاتالیتیک این سم وارد سیتوزول می‌شود و با حذف یک آدنین از 28SrRNA زیر واحد ۶۰s ریبوزوم فرآیند پروتئین‌سازی را در سلول مهار کرده و بدین وسیله موجب مرگ سلولی می‌شود همچنین این زهرابه در بعضی از سلول‌ها باعث سنتز سایتوکاین ها و القا نمودن پدیده آپوپتوزیس به وسیله تنش های ریبوتوکسیک می‌شود (۲). علاوه بر آن شیگاتوکسین ها باعث افزایش فعالیت علامت‌دهی می‌شوند که به طور آبشاری افزایش می‌یابد. ژن های کد کننده این زهرابه در *شیگلادیسانتریه* بر روی ژن های کروموزومی و در STEC بر روی باکتریوفاژ معتدل قرار دارند (۴،۳) تاکنون انواع مختلفی از این زهرابه ها از جمله Stx2g ,Stx1c,Stx1 Stx2e, Stx2d, Stx2C, Stx2, Stx2f,

شناسایی شده‌اند عفونت‌هایی که به وسیله شیگاتوکسین ایجاد می‌شود انتشار جهانی داشته و عموماً در کشورهای در حال توسعه مانند جنوب شرقی آسیا، شبه‌قاره هند، آفریقای جنوبی، آسیای مرکزی، بنگلادش مشاهده می‌شود (۵)، در ایران نیز این باکتری گزارش شده است. آلودگی با باکتری‌های تولیدکننده شیگا زهرابه یک تهدیدی جدی برای سلامت در کشورهای دنیا حتی در کشورهایی با سطح بهداشت مناسب محسوب می‌شود. باکتری های تولیدکننده شیگا زهرابه عامل اسهال، اسهال خونی کولیت هموراژیک، و HUS (Hemolytic Uremic Syndrome) می‌باشند (۶،۷)؛ که این ناهنجاری در بچه‌های زیر ۵ سال و افراد بالای ۶۰ سال می‌تواند منجر به نارسایی کلیه شود و در ۱۰-۵٪ افراد مبتلا، به مرگ منتهی می‌شود (۸). استفاده از آب، شیر، آب سیب و سبزی‌های آلوده مهم‌ترین منابع باکتری های تولیدکننده شیگاتوکسین محسوب می‌شوند (۹) گله گاوها، بز و دیگر حیوانات به طور طبیعی می‌توانند مخزن باکتری *E.coli* تولیدکننده شیگاتوکسین باشند همچنین جانوران دریایی مانند خرچنگ نیز در انتقال نقش دارند همچنین انتقال شخص به شخص هم می‌تواند اتفاق بیفتد (۱۰،۱۱). شیگاتوکسین ها همچنان که به عنوان خطر جدی برای سلامتی انسان محسوب می شوند از آنها می‌توان برای اهداف درمانی مانند درمان انواع سرطان‌ها و تصویربرداری در جهت شناسایی محل تومورها و صنایع واکسن‌سازی استفاده‌های مفید نمود تاکنون روش‌های مختلفی از جمله کشت سلولی، سرولوژی و مولکولی برای شناسایی شیگاتوکسین ها و یا ژن آنها استفاده شده است روش کشت سلولی مستلزم صرف زمان و در روش سرم‌شناسی علاوه بر صرف زمان قدرت تفکیک بین انواع شیگاتوکسین ها وجود ندارد (۱۱) در سال ۱۹۸۹ H.Karch و T.Meyer جهت شناسایی شیگاتوکسین از تکنیک PCR با استفاده از یک جفت پرایمر و برای شناسایی محصول PCR از ژل الکتروفورز و اتیدیوم بروماید و همچنین برای تأیید محصولات نیز از دو پروب الیگونوکلوتیدی ۲۰ bp استفاده نمودند چون این زهرابه دارای تنوع ژنتیکی می‌باشد شناسایی آن طی یک واکنش PCR مشکل می‌باشد (۱۲). از سپتامبر ۲۰۰۰ تا می ۲۰۱۳ توسط Margot و همکارانش مطالعات متعددی در مورد جداسازی شیگا زهرابه ها با استفاده از روش Real time PCR صورت گرفته است اما با وجود اختصاصیت ۱۰۰ درصدی و حساسیت بالا به دلیل ناتوانی این تکنیک در تکثیر محصول در اندازه مورد نظر و استفاده از پروب های فلورسنس دار مخصوص که مستلزم هزینه بالا می‌باشد، این روش کمتر مورد توجه واقع شده است (۱۳). در این مطالعه باهدف رفع نقایص موجود در روش های شناسایی شیگاتوکسین ها و به دلیل داشتن فاکتورهای ویرولانس متعدد و تنوع ژنتیکی و همچنین کاربرد بیشتر و دقیق تر تکنیک PCR در تشخیص از روش Multiplex PCR با دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی‌شده استفاده شد تا بتوان نسبت به شناسایی باکتری‌های تولیدکننده شیگاتوکسین با استفاده از ژن های هدف که همان ژن های کد کننده شیگاتوکسین می‌باشند اقدام گردد.

مواد و روش‌ها:

سویه‌های باکتری:

سویه‌های استاندارد *شیگلا دیسانتریه* با شناسه بین‌المللی RITCC1875 از دانشگاه تربیت مدرس و *E.coli* O157:H7 از دانشگاه شاهد و سویه‌های استاندارد *سالمونلا تیفی موریوم*، *کلبسیلا پنومونیه*، *ویبریوکلرا*، *سودومونا آئروژینوزا*، از مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهیه و با استفاده از روش های کشت، تست های بیوشیمیایی وایمونولوژیکی مورد تأیید مجدد قرار گرفتند.

مواد مورد استفاده:

آنزیم Taq DNA polymerase و Ladder 100bp از شرکت فرمنتاز و MgCl2، dNTP، Lysozyme، RnaseA، Proteinase K واگاروز از شرکت سینا کلون خریداری شد همچنین پرایمرهای مورد استفاده توسط سینا ژن سنتز شد.

تهیه DNA ژنومی باکتری

جهت استخراج DNA ژنومی، از باکتری شیگلا دیسانتریه بیوتایپ یک و *E.coli* O157:H7، ابتدا باکتری ها به محیط کشت LB مایع تلقیح و جهت تکثیر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از رسیدن باکتری‌ها به فاز رشد لگاریتمی گرمادهی متوقف و ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت باکتری‌ها به میکروتیوپ های ۲ ml منتقل و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ. محلول رویی خارج و به رسوب سلولی حاصل، مقدار ۳۰۰ میکرولیترازبافر TE اضافه و با ورتکس مخلوط گردید سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از لیزوزیم (۱۰mg/ml)، ۲۰۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ و ۳ میکرولیتر آنزیم

پروتئیناز K به آرامی به هر نمونه اضافه، به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده. در مرحله بعدی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه، سلسیوس قرار داده‌شده سپس به مدت ۷ دقیقه با دور rpm7000 سانتریفیوژ شدند. با دور ریختن محلول رویی و جمع‌آوری رسوب، ۱۰ میکرولیتر استات سدیم (۳ مولار) به هر یک از میکروتیوب ها اضافه‌شده و برای ترسیب DNA,۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه و میکروتیوب ها به مدت ۱۳ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm7000 سانتریفیوژ شدند تا DNA رسوب کند سپس محلول رویی بطورکامل خارج و به میکروتیوب ها اجازه داده شد تا به طور کامل در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شوند. در مرحله بعدی رسوب DNA در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TEحل و برای حذف RNA احتمالی، ۳ میکرولیتر آنزیم RnaseA به میکروتیوب ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.

اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک استخراج‌شده

برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. به این منظور ابتدا با الکل نانودراپ را تمیز کرده و سپس با توجه به روش استخراج DNA از آب مقطر و یا بافر TEبه عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه نانودراپ استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه استخراج‌شده را بر روی دستگاه قرار داده و غلظت آن در طول موج ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده

برای طراحی پرایمر در این تحقیق قسمت میانی ژن های کد کننده شیگاتوکسین از باکتری‌های *shigella dysenteriae* و E.*coli* O157:H7 به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد. بعد از به دست آوردن توالی ژن مورد نظر از بانک ژنی اقدام به طراحی دو جفت پرایمر جهت تکثیر *stx1* و *stx2* گردید. با استفاده از نرم-افزارهای Oligo Analyzer و DNASIS برخی ویژگی پرایمرها مانند درصد GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ، دلتا G (ΔG) و جفت شدگی پرایمرها در هر یک از جفت پرایمرهای پیشرو و معکوس، به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرها (جدول ۱) توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

جدول ۱: *اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده*

پرایمر	سکانس پرایمر	جایگاه بر روی ژن کد کننده سم	اندازه قطعه
Ah stx1F	TTGTTTGCAGTTGATGTCAGAGG	۲۳۳-۲۱۰	۲۷۵ bp
Ah stx1R	CAGGCAGGACACTACTCAACCTTC	۷۰۰-۶۷۶	
Ah stx2F	TTGCTGTGGATATACGAGGGC	۲۳۵-۲۱۴	۴۹۰bp
Ah stx2R	CGCCAGATATGATGAAACCAGTG	۴۸۹-۴۶۶	

جداسازی و تکثیر ژن stx با واکنش PCR

اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو, ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/µl)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر pmol/ (10µl)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱۰ X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر سترون با یکدیگر مخلوط شدند. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی مطابق با جدول ۲ انجام گرفت. جهت بررسی محصول PCR، ۵ ماکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول لودینگ توسط ژل اگاروز یک درصد به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۸۵ الکتروفورز شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز زیر نور UV مشاهده و تصویری از ژل با استفاده از دستگاه Gel document تهیه گردید.

جدول ۲: *نحوه اجرای واکنش PCR جهت تکثیر ژن* stx1 و stx2

مرحله		درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
۱	دناتوره شدن اولیه	۹۴ درجه	۳ دقیقه	۱ سیکل
۲	دناتوره شدن ثانویه اتصال تکثیر	۹۴ درجه ۵۹ درجه ۷۲ درجه	۴۵ ثانیه ۴۵ ثانیه ۱ دقیقه	۳۲ سیکل
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۷ دقیقه	۱ سیکل

تأیید محصولات واکنش

برای تعیین توالی و تأیید محصول PCR، هر یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ pmol/ µl و ۲ میکروگرم از محصولات PCR به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد.

تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش

برای این منظور واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده باکتری های زیر انجام شد, *Klebsiella pneumonia*، *Pesudomonase aeruginosa, Salmonella typhi, Salmonella para typhi,* Vibrio cholera که پس از انجام واکنش محصول با ژل آگاروز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین میزان حساسیت واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی

به منظور تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی *Shigella dysenteriae* و *E.coli* O157:H7 که می‌تواند توسط این روش شناسایی گردد، ژنوم باکتری با غلظت ۱۰۰ نانوگرم توسط بافر TE (PH=8) رقیق‌شده و به عنوان الگو جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش توسط ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز گردید.

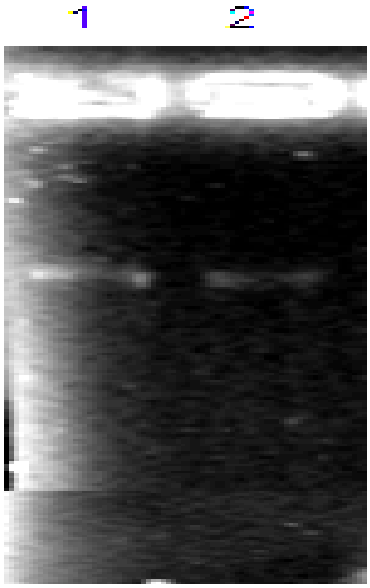
بررسی نمونه‌های بالینی

در این پژوهش تعداد ۶۳ نمونه بالینی مثبت حاصل از کشت مدفوع با هویت *شیگلا دیسانتریه* و *E.coli O157:H7* مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه بیمارستان های کودکان امیرکلا، شهید یحیی نژاد، شهید بهشتی، رازی در سطح شهرهای قائم‌شهر، بابل و بابلسر از استان مازندران بود. جمع‌آوری نمونه‌ها در طی ۳ ماه از بهمن ۹۱ الی فروردین ۹۲ انجام گردید. گروه‌های سنی مورد مطالعه شامل بچه‌های ۸ ماهه تا ۱۰ سال، بالغین ۲۰ تا ۳۰ سال و ۵۰ تا ۹۰ سال بود. مشخصات افراد شامل سن، جنس، نوع پذیرش و گزارش آنتی بیوگرام ثبت گردید. با انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی نمونه‌ها به محیط LB مایع تلقیح و به انکوباتورشیکردار جهت رشد منتقل گردید. پس از رشد برای تعیین هویت مجدد بر روی محیط های افتراقی و اختصاصی کشت داده‌شده و با آنتی سرم های اختصاصی مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. پس از استخراج DNA به روش جوشاندن، واکنش PCR انجام شد. در مرحله بعد مقاومت و حساسیت پادزیستی نمونه‌های شیگاتوکسین مثبت حاصل از واکنش PCR با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار تعیین گردید. دیسکهای پادزیستی مورد استفاده شامل کوتریماکسازول، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، کوآموکسی کلاو، سفکسیم، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون بوده است سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS10 انجام شد.

یافته‌ها

پس از کشت باکتری در محیط LBمایع سوسپانسیون حاوی تعداد مشخص باکتری تحت جداسازی DNA کروموزومی قرار گرفت و سپس کیفیت DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد همان طور که در شکل یک مشاهده

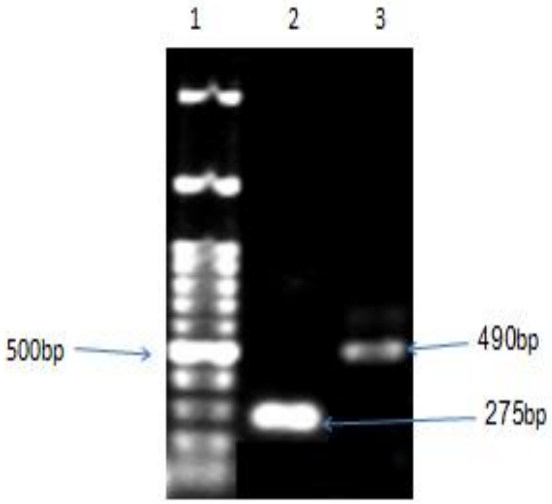
می‌شود DNA استخراج‌شده و از کیفیت مناسبی جهت انجام PCR برخوردار می‌باشد.



شکل ۱: استخراج DNA ژنومی *E.coli O157:H7* و *شیگلا دیسانتری* با استفاده از ژل آگاروز یک درصد: ستون ۱) DNA ژنوم استخراج‌شده از باکتری *E.coli O157:H7*، ستون ۲)DNA ژنوم استخراج‌شده از کشت باکتری *Shigella dysenteriae*

واکنش PCR

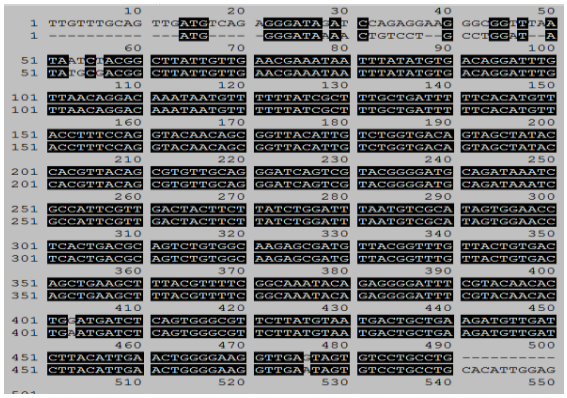
واکنش PCR با DNA ژنومیک استخراج‌شده هر سویه به طور جداگانه باپرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (شکل ۲) در PCR قطعه ۲۷۵ و ۴۹۰ جفت بازی به ترتیب مربوط به ژن *stx 2* و ژن *stx 1* می‌باشد.



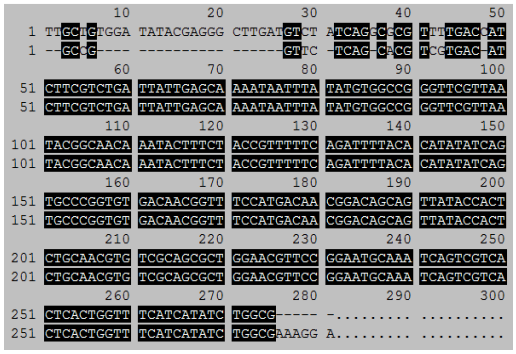
شکل ۲: واکنش PCR با محصولات ژنومیک

ستون ۱) نشانگر اندازه DNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲) محصول PCR از ژنوم *E.coli O157:H7* (قطعه ۲۷۵bp مربوط به ژن stx2 است)، ستون ۳) محصول PCR از ژنوم *Shigella dysenteriae* (قطعه ۴۹۰bp مربوط به ژن stx1 است)

پس از ارسال محصولات PCR ژن های Stx1 و Stx2 به شرکت ژن فن‌آوران با مقایسه توالی قطعات تکثیرشده و توالی قطعات که از بانک ژنی استخراج شده بود، صحت ژن‌های تکثیرشده مورد تأیید واقع شد که در شکل های ۳ و ۴ نشان داده شده است.



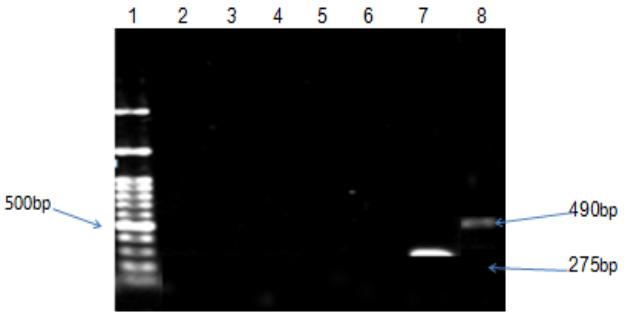
شکل ۳ –تأییدیه سکانس ژنی Stx1



شکل ۴ –تأییدیه سکانس ژنی Stx2:

میزان اختصاصی بودن واکنش PCR

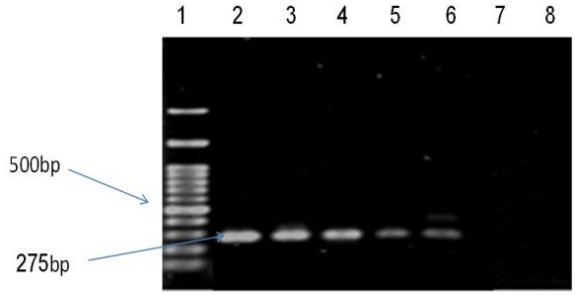
پس از تأیید محصولات PCR، میزان اختصاصی بودن واکنش با استفاده از باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلاپاراتیفی* C، *سودوموناس آئروژینوزا*، *ویبریوکلرا* انجام گرفت. همان طور که در شکل ۵ دیده می‌شود تمامی واکنش‌ها منفی بودند که اختصاصی بودن تست مورد نظر را مشخص می‌کند.



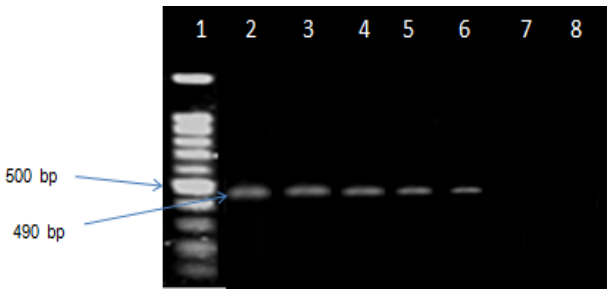
شکل ۵: میزان اختصاصی بودن واکنش PCR ستون ۱) نشانگر اندازهDNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲) *سودوموناس آئروژینوزا*، ستون ۳) *کلبسیلا پنومونیه*، ستون ۴) *ویبریوکلرا*، ستون ۵) *سالمونلاتیفی موریوم*، ستون ۶) *سالمونلا پاراتیفی* C، ستون ۷ و ۸) *E.coli* O157:H7 و *شیگلا دیسانتری* به عنوان کنترل مثبت

میزان حساسیت واکنش PCR

پس از تهیه رقت از ژنوم *E.coli* O157:H7 با غلظت ۱۰۸ نانوگرم در میکرولیتر وشیگلا دیسانتریه با غلظت ۱۵۶ نانوگرم در میکرولیتر واکنش برای هر یک از رقت‌ها همان طور که در شکل ۶ و ۷ مشاهده می‌شود تا رقت 10^{-7} از DNA ژنومیک انجام شد (ستون ۶). با توجه به اینکه غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه *E.coli* O157:H7، ۱۰۸ نانوگرم در میکرولیترو در *شیگلا دیسانتریه* ۱۵۶ نانوگرم در میکرولیتر بوده پس حساسیت واکنش برای *E.coli* O157:H7 برابر ۱/۰۸ پیگوگرم در میکرولیتر و برای *شیگلا دیسانتریه* ۱/۵۶ نانوگرم در میکرولیتر خواهد بود.



شکل ۶: میزان حساسیت واکنش PCR : نشانگر اندازهDNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲) رقت 10^{-1}، ستون ۳) رقت 10^{-2}، ستون ۴) رقت 10^{-3}، ستون ۵) رقت 10^{-4} ستون ۶) رقت 10^{-5}، ستون ۷) رقت 10^{-6}، ستون ۸) رقت 10^{-7} می‌باشد که در رقت انتهایی غلظت DNA برابر ۱/۰۸ پیکوگرم در میکرولیتر می‌باشد.



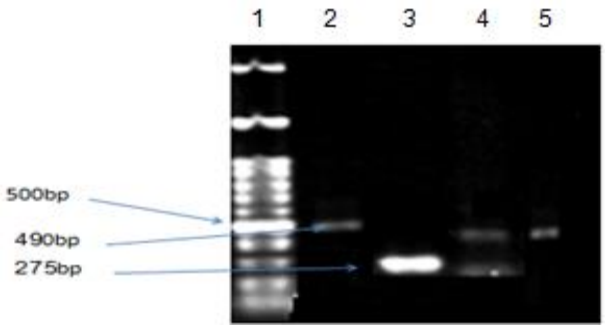
شکل ۷ تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومیک شیگلا دیسانتریه: ستون ۱) نشانگر اندازهDNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲) رقت 10^{-1}، ستون ۳) رقت 10^{-2}، ستون ۴) رقت 10^{-3}، ستون ۵) رقت 10^{-4} ستون ۶) رقت 10^{-5}، ستون ۷) رقت 10^{-6}، ستون ۸) رقت 10^{-7} می‌باشد که در رقت انتهایی غلظت DNA برابر ۱/۵۶ پیکوگرم در میکرولیتر می‌باشد.

به منظور شناسایی هردو ژن *stx1* و stx2 واکنش PCR به صورت مجزا و Multiplex PCRانجام شد که نتیجه آن در شکل ۵ آورده شده است. در واکنش PCR جداگانه برای هر ژن قطعات ۴۹۰ و ۲۷۵ جفت باز به ترتیب مربوط به stx1 و stx2 از باکتری شیگلا دیسانتری و *E.coli* O157:H7 می‌باشد (ستون ۲ و ۳). جهت تسریع شناسایی واکنش Multiplex PCR برای هر دو ژن

(*stx1* و stx2) همان طور که در ستون (۴ و ۵) مشاهده می شود انجام گرفت هر دو قطعه *stx1* و *stx2* در مورد *E.coli* O157:H7 تکثیر شده است (ستون ۴) ودرمورد گونه *شیگلا دیسانتریه* تنها قطعه stx1 تکثیر شده است.

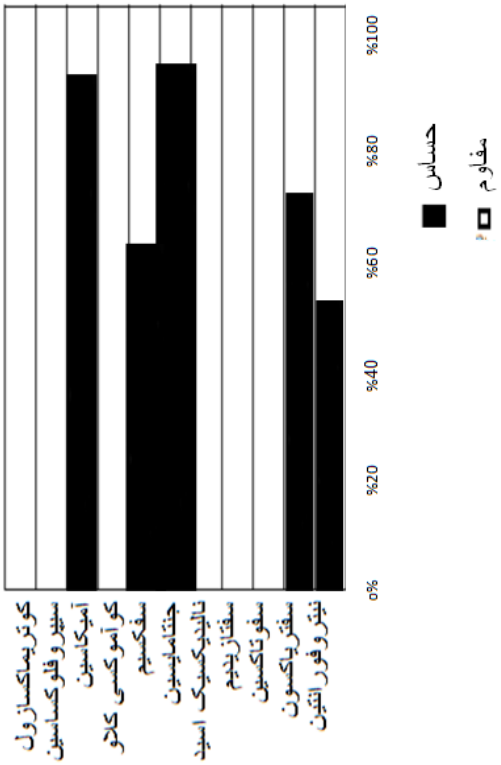
نتایج نمونه‌های بالینی:

نتایج حاصل از بررسی حساسیت نمونه‌های شیگاتوکسین مثبت در برابر پادزیست های مورد بررسی نشان دهنده حساسیت آنها در برابر پادزیست های سفکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتریاکسون، نیتروفورانتئین و مقاومت در برابر پادزیست های سیپروفلوکساسین، کوتریماکسازول، کوآموکسی کلاو، نالیدیکسیک اسید، سفوتاکسیم، سفتازیدیم بود (نمودار ۱). ازمجموع ۶۳ نمونه انتخابی ازسه گروه سنی ۳۵ نمونه (۵۵/۵٪) مربوط به کودکان زیر ۱۰ سال, ۸ نمونه (۲۲/۸٪) مربوط به گروه سنی ۲۰-۳۰ سال و ۲۰ نمونه (۳۱/۷٪) مربوط به گروه سنی ۵۰ تا ۹۰ بوده است.



شکل ۸: ررسی واکنش PCR و Multiplex PCR از ژن های *stx1* و stx2 از باکتری شیگلا دیسانتریه و*E.coli* O157:H7 . ستون ۱) نشانگراندازهDNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲) محصول PCR از DNA ژنومیک شیگلا دیسانتریه ستون ۳) محصول PCR ازDNA ژنومیک *E.coli* O157:H7 ستون ۴) محصول Multiplex PCR ازDNA ژنومیک *E.coli* O157:H7 ستون ۵) محصول Multiplex PCR ازDNA ژنومیک شیگلا دیسانتریه

درمورد جداسازی شیگاتوکسین ها از جمعیت مورد مطالعه از مجموع ۶۳ نمونه ۱۷ سویه مثبت (۲۶/۹٪) حاوی ژن stx بودند که ازاین تعداد ۱۳ نمونه (۷۶/۵٪) دارای ژن stx2, ۴ نمونه (۲۳/۵٪) دارای ژن stx1 و ازبین اینها ۴ مورد دارای هر دو ژن stx1 و stx2 بودند. درگروه سنی اول از ۸ نمونه مثبت (۴۷٪), ۶ نمونه مثبت (۷۵٪) مربوط به دختر بچه ها و ۲ نمونه مثبت (۲۵٪) مربوط به پسر بچه ها بوده است. درگروه سنی دوم ۲ نمونه مثبت که هردوی آنها مربوط به خانم های باردار بوده است ودر گروه سوم سنی از ۷ نمونه مثبت (۴۱/۷٪) ۴ نمونه مثبت (۵۷/۱٪) مربوط به پیرمردها و ۳ نمونه مثبت (۴۲/۹٪) مربوط به خانم هایی با سن بالای ۵۰ سال بوده است. نتایج حاصل ازبررسی حساسیت نمونه های شیگاتوکسین مثبت در برابر پادزیست های مورد بررسی نشان دهنده حساسیت آنها در برابرپادزیست های سفکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتریاکسون، نیتروفورانتین ومقاومت در برابر پادزیست های سیپروفلوکساسین، کوتریماکسازول، کوآموکسی کلاو، نالیدیکسیک اسید، سفوتاکسیم، سفتازیدیم بود (شکل ۶)



نمودار ۱: بررسی آنتی بیوگرام نمونه های بالینی

نتیجه گیری و بحث

آلودگی با باکتریهای تولیدکننده شیگا توکسین یک تهدیدی جدی برای سلامت در کشورهای دنیا حتی پیشرفته محسوب می شود. باتوجه به اینکه عوامل ایجاد کننده شیگاتوکسین ها که عموما باکتری های شیگلادیسانتریه و پاتوتیپ STEC می باشند،

از اهمیت بالایی برخوردار می باشند لذا روش های شناسایی این عوامل ونحوه پیشگیری ودرمان آنها تحقیقات وسیعی را می طلبد (۷،۸) که مطالعه ما نیز در راستای تحقق بخشی از این اهداف بوده است. تا به امروز روشهای متعددی جهت شناسایی شیگاتوکسینها ویا ژن مربوط به آن انجام گرفته است اما شناسایی این سویه ها به طور روتین در آزمایشگاههای طبی انجام نمی گیرد لذا پژوهشگران درصدد یافتن راههای ساده برای غربالگری این باکتری ها هستند. یکی از این روش ها کشت سلولی است که در آن از سلولهایی که دارای گیرنده اختصاصی برای این توکسین هستند استفاده می شود. اگرچه حساسیت این روش شناسایی توکسین بالا می‌باشد، دارای معایبی از جمله وقت گیر و زمانبر بودن، دشواری استاندارد کردن آن، نیاز به تجربه ومهارتهای خاص و نیازمند بودن به امکاناتی نظیرکشت سلولی وآنتی توکسین مخصوص جهت خنثی سازی می‌باشد (۱۴) در چند سال گذشته آزمایش الایزا برای شناسائی مستقیم شیگاتوکیسن در نمونه های مدفوع طراحی شده است این آزمایش ها نیز دارای نقش بالقوه ای در تشخیص شیگاتوکیسن هستند چرا که می توانند حضور STEC و یا دیگر باکتری های تولیدکننده این توکسین را تشخیص دهند. علیرغم اینکه این آزمایش بسیار سریع بوده ودر هر آزمایشگاهی قابل انجام و نتیجه آن در کمتر از یک روز مشخص می شود اما با این وجود بدلیل عدم تفکیک بین انواع شیگاتوکسین ها ونیاز به آنتی بادی های مونوو پلی کلونال ضد توکسین و صرف هزینه زیاد استفاده چندانی از این روش نمی شود درروش RPLA از آنتی بادی مونوکلونال به همراه ذرات لاتکس استفاده می شود علیرغم حساسیت بالای این روش بدلیل استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و اینکه بعضی ازسویه های تولیدکننده *Stx2* قابل شناسائی نمی باشند کمتر موردتوجه واقع شده است (۱۵). درروش دورگه سازی که یک تکنیک مولکولی موثر و بسیارحساس واختصاصی در شناسایی دقیق شیگاتوکسین میباشد از مواد غیر رادیواکتیو مانند دیگوسی ژنین وبیوتین استفاده می شوداما به دلیل عدم کارایی آن درمورد تعداد زیاد نمونه های بالینی در آزمایشگاههای تشخیص طبی مورد توجه واقع نشده است (۱۷،۱۶). از سپتامبر ۲۰۰۰ تا حال مطالعات متعددی در مورد جدا سازی شیگاتوکسین ها با استفاده از روش Real time PCR صورت گرفته است اما با توجه به داشتن اختصاصیت ۱۰۰ درصدی وحساسیت بالای واکنش به دلیل ناتوانی این تکنیک در برآورد اندازه محصول تکثیر شده واستفاده از پروب های فلورسنس دار مخصوص وهزینه بالاوکمبود افراد ماهر وبا تجربه این روش را بامحدود یت مواجه نموده است (۱۸). تکنیک PCR درحال حاضر با توجه به اینکه یک روش ساده، حساس واختصاصی وبه صرفه برای شناسایی انواع ژن وعوامل بیولوژیک می باشد وضمن سادگی محدودیت های روش های گفته شده را نداشته ازآن به طورگسترده درآزمایشگاههای تشخیص طبی جهت شناسایی عوامل بیماریزا می توان استفاده نمود این تکنیک اولین بار توسط کاری و مایر توصیف شد و شامل یک جفت پرایمر از یک منطقه حفاظت شده *Stx1* و *Stx2* درژن های همولوگ بود که عمده ترین عیب آن پائین بودن Tm و عدم کارایی در انواع شیگاتوکسین بود (۱۲). باعنایت به موارد یاد شده جهت شناسایی انواع شیگاتوکسین طراحی یک واکنش Multiplex PCR که در آن حداقل از دوجفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شود ضروری می باشد. اولین مطالعه انجام گرفته شیگاتوکسین با روش Multiplex PCR در سال ۱۹۹۵ توسط Cebulaوهمکارانش جهت شناسایی شیگاتوکسین ها باطراحی پرایمر های اختصاصی واستفاده از یک قطعه به عنوان کنترل داخلی مثبت صورت گرفت اما پرایمرهای طراحی شده فقط قادر به شناسایی *Stx2* بود (۱۹). مطالعات بعدی توسط Belanger وهمکارانشان با این روش برای شناسایی شیگاتوکسین ها صورت گرفت عیب عمده آن دراین بود که همه قطعات طراحی شده دارای اندازه کوچک و تفکیک آنها برروی ژل آگارز مشکل بود (۲۰). پرایمرهایی که مادراین تحقیق طراحی نمودیم با بررسی های انجام شده و استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنوم ونرم افزارهای تائیدی وکار بر روی نمونه های بالینی ثابت نمود که معایب گفته شده بالا را نداشته وقادر به تکثیر انواع ژن های شیگاتوکسین می باشد وقطعات تکثیری برروی ژل آگارز براحتی تفکیک شده وقابلیت شناسایی هردوژن Stx1 و Stx2 را به طور همزمان درنمونه های بالینی داراست. یکی از معایب احتمالی درواکنش PCR وجود مهارکننده هایی است که می تواند باعث ایجاد خطا درحین واکنش گردد در باکتریهای گرم منفی بدلیل وجود دیواره سلولی پیچیده که متشکل از انواع لیپید، کربوهیدرات وپروتئین می باشد به عنوان مهار کننده عمل کرده که به کاهش حساسیت واکنش کمک می کند جهت حذف این مواد وبالا بردن حساسیت واکنش ژنوم باکتری قبل از واکنش باید تخلیص شود. Frank وهمکارانش درسال ۱۷۹۷ از روش

boiling جهت استخراج DNA ژنومی استفاده نمودند که در این روش مهارکنندگان واکنش حذف نخواهند شد (۲۱). Wangو همکارانش درسال ۲۰۰۲ از SDS، Lysozyme، Tris، گلوکزو EDTA برای استخراج استفاده که حساسیت واکنش ۱۰۰ پیکومول در ماکرولیتر بود (۲۲). همچنین درسال ۲۰۰۴ Keihan و همکارانش با استفاده از ماده ای به نام CTAB به همراه NaCl غلیظ (۵ M) با حذف مهارکننده های واکنش و استخراج DNA ژنومی حساسیت واکنش را تا ۲/۱ پیکوگرم گزارش کردند (۲۳). در این تحقیق با استفاده ازبافرTE, Lysozyme, %20 SDS, Proteinase K, RNase A واستات سدیم ۳ مولار و ایزوپروپانول سرد مهارکننده های واکنش به طور موثر از بین رفته که نتیجه آن افزایش حساسیت واکنش تا ۱/۰۸ پیکوگرم در میکرولیتر می باشد. واکنش PCR اولیه با DNA ژنومی و نمونه های بالینی استخراج شده با موفقیت انجام گرفت در این واکنش باکتری *شیگلا دیسانتری* قادر به تکثیرقطعه 490bp می باشد که با توجه به توضیحات گفته شده در مورد این باکتری تطابق کامل وجود دارد. درمورد *E.coli* O157:H7 تکثیر هر دوقطعه ۲۷۵ و ۴۹۰ جفت باز مشاهده شد که این امر نشان دهنده این است که باکتری قادر به تولید هر دو نوع توکسین می باشد. امروزه افزایش مقاومت پادزیستی درنقاط مختلف دنیا به عنوان یک مشکل اساسی مطرح است و اطلاع از حساسیت و مقاومت پادزیستی در درمان از اهمیت بسزایی برخوردار است. درکشورهای درحال توسعه و در کشور ما در زمینه تعیین الگوی مقاومت درمورد سویه های تولید کننده شیگاتوکسین ها در جمعیت کودکان وافراد سالمند که اغلب حساس به شیگاتوکسین ها می باشند به خاطر پیدایش سروتایپ های بیماریزای جدید و در راستای آن مقاومت روز افزون این سویه ها به پادزیست های کلاسیک و عدم وجود تکنیک های تشخیصی مناسب و متداول جهت شناسایی دقیق سویه های تولید کننده توکسین وتمایز آنها از میکروفلور طبیعی مدفوع و در نتیجه عدم توجه کافی به آنها و ایجاد طیف گسترده ای از بیماری ها و عفونت ها و پیشرفت آنها به عوارض شدیدی مثل سندروم اورمیک همولیتیک، کم خونی، درگیری CNS و نارسایی حاد کلیوی و مرگ دارای اهمیت می باشد (۲۴). نتایج تحقیقات نشان می دهد که بین مصرف پادزیست در افراد آلوده به شیگاتوکسین (*E.coli*O157:H7) وگسترش بیماری HUS ارتباط وجود دارد مصرف پادزیست ها در درمان عفونت های ناشی از این باکتری آزادسازی شیگاتوکسین هارا افزایش می دهد ژن های شیگاتوکسین برروی باکتریوفاژ قرار داشته وپادزیست هایی که باعث رها شدن باکتریوفاژ می شوند بیان شیگاتوکسین ها را افزایش می دهند (۲۵). با توجه به اینکه مصرف پادزیست ها باعث تشدید علائم بالینی می شود استفاده از این پادزیست در موارد ثابت شده یا مشکوک می تواند آسیب های جدی را در این بیماران داشته باشد به همین دلیل ضرورت توجه دقیق به مصرف پادزیست ها در موارد شیوع بیماری وجود دارد. Aslani و همکارانش با بررسی بر روی باکتری های مولد شیگاتوکسین در مازندران به این نتیجه رسیدند که کودکان زیر ۶ سال از بالاترین میزان شیوع باکتری های مولد شیگاتوکسین برخوردار می باشند. نتایج پژوهش های این گروه حاکی از فراوانی ۲/۵٪ شیگاتوکسین هادرکودکان زیر ۶ سال بود (۲۶). درتحقیقی که توسط Kargar و همکارانش انجام شد سویه های مولد شیگاتوکسین جدا شده به پادزیست های پنی سیلین، کلیندامایسین، نووبیوسین، سفکسیم، اریترومایسین مقاوم و به پادزیست های تتراسایکلین، تری متوپریم، سولفومتوکسازول وکلرامفنیکل حساسیت نشان دادند (۲۷). در این تحقیق از مجموع ۶۳ نمونه از سه جمعیت بررسی شده ۱۷ سویه مثبت جداسازی شده که ۴۷٪ مربوط به گروه کودکان زیر ۱۰ سال و ۴۱٪ به افراد بالای ۵۰ سال اختصاص داشت. در پژوهش ما تمام سویه های مثبت جدا شده به پادزیست های سفکسیم، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتریاکسون، نیتروفورنتین حساسیت و به پادزیست های سیپروفلوکسازین، کوتریماکسازول، کوآموکسی کلاو، نالیدیکسیک اسید، سفوتاکسیم و سفتازیدیم مقاومت نشان دادند.

به طورکلی جداسازی عوامل ایجاد کننده شیگاتوکسین ها از نمونه های بالینی کاری دشوار می باشد که بایستی برای شناسایی آنها از تکنیک های جدید مولکولی که دربرگیرنده کمترین هزینه و داشتن بالاترین حساسیت و کمترین زمان جواب دهی بهره گرفت روش مولکولی Multiplex PCR باتوجه به داشتن حساسیت و ویژگی مناسب و قابلیت شناسایی بالای سویه های تولید کننده شیگاتوکسین و امکان کاربرد مستقیم بر روی نمونه های بالینی به نظرمی رسد می تواند به عنوان یک روش روتین در آزمایشگاه های طبی به منظور شناسایی موارد مشکوک مورد استفاده قرارگیرد. همچنین در عین نوظهور بودن عوامل تولید کننده شیگاتوکسین پیدایش سریع وروزافزون سویه

های مقاوم به پادزیست های درمانی رایج وکلاسیک دور از انتظار نمی باشد از این رو تعیین الگوی مقاومت پادزیستی عوامل ایجادکننده شیگاتوکسین در برنامه درمان و تجویز پادزیست و بالطبع عدم پیدایش سویه های مقاوم درآینده بسیار کارآمد خواهد بود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می باشد که بدینوسیله از مسئولین به جهت تهیه امکانات و بودجه طرح تقدیر و قدر دانی می شود.

References:

1. Karmali MA. Prospects for preventing serious systemictoxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections sing Shiga toxin receptor analogues. J *Infect Dis* 2004; 189: 355–359.
2. Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH, Thorpe CM. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003;71: 1497–1504.
3. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon* 2001; 39: 1629-1635.
4. Huang A, Friesen J, Brunton JL. Characterization of bacteriophage that carries the genes for production of shiga-like toxin 1 in Escherichia coli. *J Bacteriol* 1987; 169: 4308-4312.
5. Gobius KS, Higgs GM, Desmarchelier PM. Presence of activable shiga toxin genotype (Stx2d) in shigtoxigenic Escherichia coli from livestock sources. *J Clin Micob* 2003; 41: 3777-3783.
6. MoezArdalan K, Zali MR, Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of Shigella species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. *J Health Popul Nutr* 2003; 21:96-102.
7. Siegler RL. Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic uremic syndrome, *J Pediatr* 1994; 125: 511–518.
8. Siegler RL. Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *JAMA* 2003; 290: 1379–1381
9. Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I, Teizou T, Shima K, Yamasaki S. Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233: 173–178.
10. Urdahl AM, Beutin L, Skjerve E, Zimmermann S, Wasteson Y. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from sheep and cattle on the same farm. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 92–101.
11. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig, K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. Microb *Echnol* 2011; 4: 32–46.
12. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1989; 27:2751-2757
13. Margot H, Cernela N, Iversen C, Zweifel C, Stephan R. Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of shiga toxin 1 and 2 gene subtypes. J *Food Prot* 2013; 76(5):871-3.
14. March SB, Ratnam S. Sorbitol–MacConkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5): 869-72.
15. Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, Shakib P. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from urine samples in Lorestan, Iran. *Feyz* 2013; 17(2): 188-94.
16. He X, McMahon S, Skinner C, Merrill P, Scotcher MC et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against Shiga toxin 2 and their application for toxin detection in milk. *J Immunol Methods*, 2013; 389: 18–28.
17. Jakson MP. Detection of Shiga toxin-producing Shigella dysenteriae type1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of Digoxigenin-11-dutp. *J chin Microb* 1991; 29: 1910-1914.
18. Margot,Heike.Cernela, Nicole Iversen,Carol Zweifel,Claudio Stephan,Roger.Evaluation of Seven Different Commercially Available Real-

Time PCR Assay for Detection of Shiga toxin 1and2 Gene Subtypes. *J Food Protect*, 2013 (5): 744-913.

19. Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simulataneous identification of Strain of Escherichia coli Serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microb* 1995; 33: 248-250.
20. Belanger SD, Biossinot M, Menard C, Picard FJ, Bergeron GM. Rapid detection of Shiga toxin – Producing acteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J Clin Microb* 2002; 20:1436-1440
21. Frank SM, Bos worth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin –producing Escherichia *coli* strains from calves. J Clin Microb 1998; 36:1795-1797.
22. Wang G, Clark GC, Rodgers FG. Detection in *Escheria coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157;H7 serotype, and components of the type2 shiga toxin family by multiplex PCR. J *Clin Microb* 2002; 40: 3913-3619.
23. Keihan AH, Saadati M, Kamali M, Detection of shiga toxin genes by multiplex PCR. *African J Microb Res* 2011 5(14): 1794-1800.
24. Momtaz H, Jamshidi A (2013) Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from chicken meat in Iran: Serogroups, virulence factors, and antimicrobial resistance properties. Poult Sci 92: 1305-1313.
25. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 2000; 342: 1930-36.
26. Aslani MM, Bouzari S. An epidemiological study on verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection among population of northern region of Iran (Mazandaran and Golestan provinces). Eur *J Epidemiol* 2003; 18: 345-49
27. Kargar M, Homayoon M, Yaghoobi R. Prevalence of Virulence Genes stx1, stx2,hly and eaeA with Multiplex PCR from *E.coli* O157:H7 Strains among Children with Acute Gastroenteritis in Marvdasht. Iran *J Infect Dis Trop Med* 2009; 44: 7-12.