شناسایی سویه‌های O157:H7 مولد شیگا توکسین اشریشیا کلی (STEC) جدا شده از نمونه‌های مدفوع وادرار بیماران به روش Multiplex PCR

سید محمد نایب آقایی[1]، دکتر شهلا منصوری[2]
۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه لرستان
۲- استاد، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

یافته / دوره هشتم / شماره ۱ / بهار ۸۵ / مسلسل ۲۷

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۶/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۴/۹/۱۹

★ **مقدمه:** عفونت با سویه‌های مولد شیگا توکسین اشریشیاکلی(STEC) علاوه بر ایجاد اسهال با عوارض وخیم ومرگ آوری چون سندروم اورمی‌همو لیتیک(HUS) همراه است. این در حالی است که روشهای تشخیصی این باکتریها مشکل بوده و اطلاع دقیقی از میزان بروز بیماری در ایران نیست.این مطالعه با هدف بررسی سویه‌های مولد شیگا توکسین اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های ادرار و مدفوع به روش PCR در مبتلایان، انجام گرفت.

★ **مواد و روش ها:** در این مطالعه که یک پژوهش بنیادی-کاربردی است، از بین ۵۰۰ نمونه‌های جمع آوری شده ۱۰۰ نمونه که با تستهای فیزیولوژیک بیشترین امکان وجود انواع O157:H7 درآنها وجود داشت، انتخاب شد وپس از استخراج DNA از کلنی های E.coliحاصل از کشت،واکنش *Multiplex PCR* برای ژنهای stx_2 وstx_1 انجام گرفت و محصول آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

★ **یافته ها:** در بین ۱۰۰ سویه جدا شده (مشکوک بهSTEC) تنها ۳ مورد (۳ درصد کل نمونه‌ها) از نظر ژن stx مثبت بودند که هر سه مورد مربوط به سویه‌های stx_2 بود. دو مورد آن مربوط به نمونه مدفوع ویک مورد مربوط به نمونه ادرار بود.

★ **نتیجه گیری:** اگر چه ظاهراً شیوع عفونت با سویه‌های STEC درایران بالا نیست؛ اما به دلیل بروز عوارض وخیمی چون HUS و کولیت هموراژیک از یک سو وعدم شناسایی این سویه‌ها با روش های مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور از سوی دیگر، بکارگیری روشهای مولکولی به منظور شناسایی موارد مشکوک، حداقل در مراکز طبی کودکان، ضروری به نظر می‌رسد.

★ **واژه های کلیدی:** اشریشیاکلی وروتوکسیژنیک، *Multiplex PCR*، سندروم اورمی همولیتیک

آدرس مکاتبه: خرم آباد، بدرآباد، دانشکده کشاورزی، مهمانسرای اساتید

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

مقدمه

سویه‌های اشریشیاکلی وروتوکسیژنیک (VTEC) توکسینی ترشح می‌کنند که به دلیل توانایی آن در کشتن سلولهای vero وروتوکسین و به دلیل شباهتش به نوروتوکسین شیگای مترشحه از شیگلا دیسانتری تیپ I، توکسین شبه شیگا[1] نامیده می‌شود و سویه‌های تولید کننده آن نیز بهSTEC[2] معروفند (۱). ژن تولید کننده وروتوکسین برروی ژنوم باکتریوفاژ معتدل[3] قرار دارد وتوسط تبدیل فاژی[4] به اشریشیا کلی وارد می‌گردد (۱). توکسین های ورو به دوگروه stx_2 وstx_1 تقسیم بندی می شوند، وروتوکسین با اثر بر روی RNA ریبوزومی سبب ممانعت از سنتز پروتئینها شده وانواعی از اشریشیا کلی که این سم را تولید می‌کنند موجب سندروم‌های خطرناکی از جمله کولیت هموراژیک (HC) و به دنبال آن نارسایی کلیوی خصوصاً در کودکان و پورپورای ترمبوتیک ترمبوسایتوپنیک[5] در انسان می‌گردند (۴-۲). شناسایی این سویه‌ها به طور روتین در آزمایشگاهها انجام نمی‌گیرد و پژوهشگران درصدد یافتن راههای ساده برای غربالگری این باکتریها هستند. یکی از روشهای استاندارد شناسایی توکسین ورو، کشت سلولی واثر سیتوتوکسیک توکسین برروی سلولهای ورو می‌باشد. این روش آهسته بوده،استاندارد کردن آن مشکل و نیاز به تجربه و مهارتهای خاصی دارد. علاوه بر آن به امکاناتی نظیر کشت سلولی وآنتی توکسین ورو جهت خنثی کردن آزمایش، تشخیص نوع توکسین نیاز دارد. سروتایپ های متعددی در ارتباط با تولید توکسین شناخته شده اند و از این جهت تستهای سرولوژیک نیز کمکی به تشخیص نمی‌کنند (۵، ۶). O157:H7 مهمترین سروتیپ درگروه ایشریشیاکلی انتروهموراژیک به شمار می‌رود و در بیشتر کشورها به عنوان عامل اصلی عفونت شناخته شده است (۷).

به نظر می‌رسد که O157:H7 از یک کلن[6] سلولی بوجود آمده و در دنیا گسترش یافته است. هموژن بودن این سویه از نظر ژنتیکی سبب یافتن متدهای زیادی برای جداسازی این سویه‌ها نظیر عدم قدرت تخمیر سوربیتول و عدم تولید بتا. دی. گلوکورونیداز[7] است که بیشتر انواع *E.coli* قادر به انجام آن می‌باشند. از این جهت با ساختن محیط های انتخابی نظیر سوربیتول مکانکی آگار[8]، سفی کسیم پتاسیم تلوریت سوربیتول مکانکی آگار[9] و سفی کسیم پتاسیم تلوریت رامنوز سوربیتول مکانکی آگار[10] می‌توان این سویه‌ها را غربالگری کرد.رشد باکتری روی این محیط ها به خصوصیات فنوتیپی *E.coli O157:H7* نظیر عدم توانایی تخمیر رافینوز ومقاومت به تلوریت پتاسیم بستگی دارد(۸).

با توجه به مطالب فوق و این که مطالعات بر روی این سویه در ایران محدود بوده(۹) ودر آنها صرفا از روش کشت برای شناسایی استفاده شده است، لزوم کاربرد یک روش دقیق مولکولی (*Multiplex PCR*) جهت شناسایی و بررسی این باکتریهای مهم کلینیکی مشخص می‌شود. به همین منظور، این مطالعه با هدف بررسی سویه‌های مولد شیگا توکسین اشریشیا کلی جدا شده از نمونه‌های ادرار و مدفوع به روش PCR در مبتلایان انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه بنیادی ـ کاربردی بررسی بر روی تعداد ۵۰۰ نمونه اشریشیا کلی (شامل ۳۱۱ نمونه جدا شده از ادرار و ۱۸۹ نمونه جدا شده از مدفوع مبتلا به اسهال) در محیط TSB[11] حاوی ۴۰٪ گلیسرول و در دمای (۷۰-) درجه سانتی گراد که از اوایل اسفند ماه ۱۳۷۸ لغایت آخر تیر ماه ۱۳۷۹ جمع آوری شده بودند انجام گرفت. در این مطالعه ابتدا از بین نمونه‌های جمع آوری شده با توجه به خصوصیاتی از جمله واکنش سوربیتول منفی، همولیز بر روی خون گوسفند و واکنش دلسیتول و رافینوز مثبت که به عنوان

1. Shiga like toxin
2. Shiga Toxin Production Escherichia
3. Temperate Bacteriophag
4. Phage Conversion
5. Thrombotic Thrombocytopenic Purpurea
6. Clon
7. β.D.glucuronidase
8. SMAC
9. CT-SMAC
10. CTR-SMAC
11. Tripticase Soy Broth

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

روشهای شناسایی سویه‌های O157:H7 معرفی شده‌اند، یکصد نمونه اشریشیاکلی انتخاب شده و سپس DNA نمونه‌ها جدا سازی و تخلیص کرده و روی هر کدام از نمونه‌ها آزمایش PCR انجام شد.

استخراج و تخلیص DNA: استخراج DNA ژنومیک یکی از مراحل بنیادی در تشخیص مولکولی عوامل باکتریایی در نمونه‌های کلینیکی محسوب می‌گردد.روشهای متعددی جهت استخراج DNA ژنومیک باکتری مورد نظر مطرح بود که در شروع کار چندین روش مختلف برای استخراج DNA از نمونه ها مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفت.در نهایت جهت استخراج وتخلیص DNA از محلول *Lysis Buffe*r (شامل ساکارز ۰/۳۳ مولار، تریس بازی ۱۰ میلی مولار وکلرور منیزیم ۵ میلی مولار و یک درصد ترایتون X100) استفاده شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر UV و الکتروفورز، بررسی کمی وکیفی بر روی کلیه نمونه‌های استخراجی صورت گرفت. محصول استخراج در (۲۰-) درجه سانتیگراد تا زمان انجام PCR نگهداری گردید.

Multiplex PCR: در این تحقیق از بافر و Tag DNA پلیمراز شرکت سیناژن (تهران) استفاده شد. آنزیم به صورت نوترکیب و از طریق بیان در E.coli تهیه شد. برای انجام PCR از دو جفت پرایمر اختصاصی به نامهای VT_{1a},VT_{1b} (stx_1) و VT_{2a},VT_{2b} (stx_2) استفاده گردید که این دو جفت به ژنهای تولید توکسین stx_1 و stx_2 متصل می‌شوند(۱۰). این پرایمر ها از شرکت آلمانی (Fermentas) توسط شرکت سیناژن سفارش داده شد که بر طبق دستورالعمل پروتکل (۱۰) به منظور داشتن غلظت ۱ میکرو مول ابتدا یک Stock ۱۰ میکرو مولار از هر کدام از پرایمرها تهیه وچون برای انجام PCR ما به ۱ میکرو مولار نیاز بود، ۵ میکرو مولار از استوک را برداشته و به ۵۰ میکرو مولار از محلول Master Mix اضافه شد. برای جلوگیری از انجماد و ذوب مکرر پرایمر ها که باعث خراب شدن بافر حاوی پرایمر می‌شود، محلول مادر ونمونه‌ها به صورت مقادیر کوچک تقسیم وسپس فریز شدند (جدول ۱ و ۲ توالیهای هدف و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در فرایند PCR را نشان می‌دهد). پس از تهیه Master Mix با غلظت‌های 10x PCR Buffer،dNTP (200µm)، MgCl (1.5µm)، Primers (each of) (1µm) و Tag DNA Polymerase (2.5U) به مقدار ۲ میکرولیتر DNA از DNA استخراجی از سویه‌های کنترل (E.coli ATCC 25923,VT_2,VT_1) و یا نمونه‌ها به هر یک از لوله‌ها افزوده و توسط دستگاه چرخان حرارت[1] مدل Tchne فرایند PCR انجام گردید. جهت کنترل محصول PCR[2] از الکتروفورز بر روی ژل آگارز (غلظت۲٪) حاوی اتیدیوم بروماید (0.1-0.5 mg/ml) همراه با معرف‌های کنترل منفی و مثبت و مارکر وزن مولکولی[3] استفاده گردید و ژل را بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور[4] (مدل UVP ساخت امریکا) قرار داده و تصویر ژل توسط دوربین پولاروید متصل به هود (مدلDoc-008-XD) بر روی صفحه نمایشگر نشان داده شد و با استفاده از دستگاه Black and white polariod photograph عکسبرداری و در نهایت باندها مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱ـ مشخصات پرایمرها

پرایمر	اندازه * (bp)	وزن مولکولی (bp)	مقیا س (µmol)	غلظت (µM)	موقعیت آن در ژن	اندازه محصول تکثیر شده(bp)
VT11(VT_{1a})	۲۰	۶۱۹۹	۰/۰۵	۶۰	۱۱۹۱ -۱۲۱۰	۱۳۰
VT12(VT_{1b})	۲۰	۶۱۲۶	۰/۰۵	۶۰	۱۱۹۱ -۱۲۱۰	
VT21(VT_{2a})	۲۰	۶۰۰۸	۰/۰۵	۶۰	۴۲۶ -۱۴۴۵	۳۴۶
VT22(VT_{2b})	۲۰	۶۰۹۲	۰/۰۵	۶۰	۷۵۲ -۲۷۱	

*bp= base pairs

1. Thermal Cycler
2. Amplicons
3. DNA Ladder
4. Transilluminator

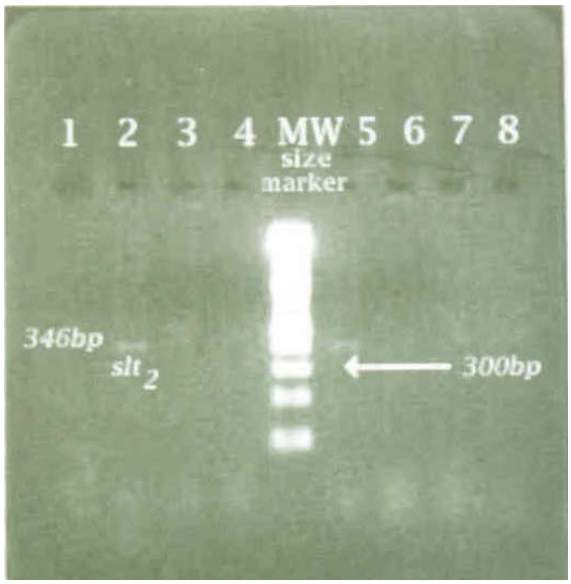
Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

جدول ۲- توالیهای هدف و پرایمرهای مورد ا ستفاده در فرایند واکنش زنجیره ای پلیمراز

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتید
VT_{1a}	5′-GAA-GAG-TCC-GTG-GGA-TTA-CG-3′
VT_{1b}	5′-AGC-GAT-GCA-GCT-ATT-AAT-AA-3′
VT_{2a}	5′-TTA-ACC-ACA-CCC-ACG-GCA-GT-3′
VT_{2b}	5′-GCT-CTG-GAT-GCA-TCT-CTG-GT-3′

یافته ها

نتایج انجام PCR: در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دو نمونه کنترل مثبت VT_1و VT_2 و یک نمونه کنترل منفی *(E.coli ATCC 25922)* استفاده شد که پس از انجام روشهای مختلف این نتایج بدست آمد از بین نمونه‌های مورد آزمایش فقط ۳ نمونه (با شماره‌های ۴۴۰،۱۷۲،۲۶۳) مثبت شد که جزء سویه‌های مثبت با روش آگلوتیناسیون و کشت سلولی گزارش شده بودند (۹) دو مورد آن مربوط به نمونه مدفوع ویک مورد آن مربوط به نمونه ادراری بود. در این بررسی قادر به شناسایی سویه‌های وروتوکسیژنیک از نوع VT_1 نبودیم و کنترل نیز ایجاد باند نکرد و سه مورد مثبت مربوط به VT_2 بود (شکل۱).



شکل شماره ۱ــ آگارز ژل الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده توسط PCR از نمونه کنترل و نمونه‌های اسهالی.

MW –استاندارد وزن مولکولی (100bp)
شماره ۱-کنترل مثبت VT_2
شماره ۵-اشریشیاکلی با کد ۱۷۲

بحث

در باره شیوع سروگروپ‌های VTEC بخصوص O157:H7 در بیماران اسهالی اطلاعات کمی وجود دارد. اگر چه اثبات شده است که باکتریهای فوق در تمامی نواحی جغرافیایی یافت می‌شود؛ ولی میزان جداسازی آن در مناطق مختلف از ۰/۰۴درصد تا ۲/۱۳ درصد متفاوت گزارش شده است که این امر بسته به حیوانات ناقل، نحوه طبخ غذا، مصرف گوشت و نحوه زندگی مناطق مختلف، متفاوت بوده است(۱۱،۱۲). یکی از روشهای پیشنهادی جهت شناسایی انواع *E.coli* وروتوکسیژنیک روش PCR است. در این بررسی با هدف راه‌اندازی روش PCR برای جداسازی سویه‌های وروتوکسیژنیک آزمایش PCR بر روی ۱۰۰ نمونه اشریشیاکلی که با تست‌های فیزیولوژیک بیشترین امکان وجود انواعO157:H7 در آنها وجود داشت، انجام شد. روشهای متعددی به منظور شناسایی STEC وجود دارد، یکی از ابتدایی‌ترین روشهای PCR برای تشخیص STEC توسط کاری[1] و مایر[2] توصیف شدند و شامل یک جفت پرایمر از یک منطقه حفاظت شدهstx_1 و stx_2 در ژنهای stx_2 همولوگ است افتراق بین ژنهای توکسین از طریق هیبرید کردن محصول PCR با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی امکان پذیر است. پولارد[3] و همکاران وی روشی از PCR را توصیف کردند که در آن یک مجموعه ۴ پرایمری از توالی های ژنهای stx_1و stx_2 به طور همزمان بکار گرفته می‌شد. این گروه مناطق مختلفی از ژنهای توکسین را مورد هدف قرار دادند تا

1. Karey
2. Mayer
3. Pollard

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

آمپلیکونهایی با اندازه‌های مختلف ایجاد کنند و امکان افتراق گذاشتن بین آنها با الکتروفورز ژل آگارز امکان پذیر باشد. جهت راه‌اندازی روش PCR اولین اقدام جداسازی DNA بود. بدین منظور چندین فاکتور برای انتخاب متد استخراج مد نظر قرار گرفت از جمله: حجم نمونه، حساسیت متد، سمیت مواد، مدت زمان استخراج و وسایل اختصاصی مورد نیاز و در دسترس. با توجه به این موارد به بررسی مقالات و روشهای موجود برای استخراج DNA پرداختیم تا با استفاده از آن روشی ساده ومقرون به صرفه طراحی و بهینه نماییم. در بیشتر مقالات از محلول لیزات به صورت کیت‌های تجارتی مانند (Iso Quick Nucleic Acid Extraction) یا Acid Nuclisens kit استفاده شده است که برای ما امکان دستیابی به آنها وجود نداشت. بعد از استخراج DNA برای رسیدن به اهداف پژوهشی و راه‌اندازی روش PCR نیاز به پرایمرهای مناسب و اختصاصی داشتیم. بدین منظور از پرایمرهای پولارد و همکارانش در انجام تحقیق استفاده شد (۱۰). این پرایمرها علاوه بر پولارد و همکاران توسط محققین دیگر نیز استفاده شده است که این مطلب نیز بر اعتبار پرایمرهای انتخاب شده می‌افزود. این محققان با انجام آزمایشات متعدد بر روی این پرایمرها با استفاده از ویژگی و حساسیت،این پرایمرها را دقیقاً کنترل کرده و در هیچیک از موارد بررسی شده به وجود واکنش متقاطع برخورد نکرده‌اند (۱۰، ۱۳).

پرایمرهای انتخاب شده VT_{1a} و VT_{2a} مربوط به ژن shiga toxin1A می‌باشند. این ژن با شماره AF461172 در بانک ژن امریکا (www.ncbi.nlm.nih.gov)،سایت اینترنتی (Nation Center for Biotechnology Information) یا مرکز ملی بیوتکنولوژی آمریکا پذیرش شده است. این پرایمر ها تعداد bp ۱۳۰ را از ژن مذکور تکثیر[1] می‌کنند و پرایمرهای VT_{2a} وVT_{2b} مربوط به ژن shiga $toxin_{2A}$ می‌باشند. این ژن با شماره ABO48233 در بانک ژن امریکا پذیرش شده است. این پرایمرها تعداد bp ۳۴۶ را از ژن مذکور تکثیر می‌کنند. توالی های مربوط به پرایمرها در جدول ۲ آمده است. بعد از مطلوب کردن روش و انجام آزمایش ما موفق به شناسایی ۳ سویه وروتوکسیژنیک شدیم (۰/۳درصد) که جزء سویه‌های مثبت با روشهای آگلوتیناسیون و کشت سلولی بودند (۹)، که دو مورد آن مربوط به نمونه مدفوع و یک مورد مربوط به نمونه ادراری می‌باشد. از سویه‌های VT_1 و VT_2 به عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد *E.coli* ATCC25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمایش PCR بر روی نمونه‌ها به صورت Blind و بدون آگاهی از نتیجه تستهای دیگر انجام گرفت و در هیچکدام از ۱۰۰ ایزوله مورد بررسی باندهای مورد نظر را مشاهده نشد.

در تحقیقاتی که بلانکو[2] و همکارانش انجام دادند از بین ۴۸۲ نمونه اسهالی متعلق به بچه‌ها توانستند ۳ مورد (۰/۶ درصد) اشریشیاکلی سویه وروتوکسیژنیک را جداسازی کنند. همچنین راجری[3] و همکارانش در بررسی که بر روی نمونه‌های حیوانی انجام دادند از ۱۷۰۲ نمونه جمع‌آوری شده از ۷ کشتارگاه با بکار بردن روش PCR جهت ژنهای stx موفق به ایزوله کردن ۵ نمونه STEC شدند. با توجه به اطلاعات و همچنین نتایج بدست آمده اختلاف واضحی بین نتایج PCR درشناسایی *E.coli* مولد وروتوکسین با نتایج حاصل از روش کشت سلولی و روش آگلوتیناسیون می‌باشدکه این مطلب می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. از آنجاییکه در سویه‌های مولد وروتوکسین، دو توکسین عمده stx_1 و stx_2 وجود دارد که ژنهای مرتبط به آنها بر روی باکتریوفاژ لیزوژنیک قرار دارند، یک سوش خاص ممکن است هر دو توکسین و یا فقط یکی از دو را بیان نمایند. دراین مطالعه قادر به شناسایی سویه‌های وروتوکسیژنیک از نوع VT_1 نبودیم و سویه VT_1 کنترل مثبت نیز ایجاد باند نکرد و سه مورد مثبت مربوط به سویه‌های VT_2

1. Amplify
2. Blanco
3. Rogerie

می‌باشد، که احتمال دارد به خاطر پاساژ دادن مکرر کشت‌ها و یا به علت موتاسیون در ژن مولد وروتوکسین را در نمونه استاندارد و یا سایر نمونه‌ها از دست داده باشیم و یا این که شرایط برای VT_1 مناسب نبوده و هنوز باید در این مورد تحقیقات بیشتری انجام گیرد

نتیجه گیری

روش PCR درتشخیص سویه‌های وروتوکسیژنیک با توجه به پرهزینه بودن در آزمایشگاه های روتین مناسب نمی‌باشد. از اینرو با توجه به حساسیت و ویژگی مناسب روش PCR در تشخیص باکتری اشریشیاکلی O157:H7 و تعیین نوع توکسین تولید کننده توسط هر سویه و امکان کاربرد مستقیم آن بر روی نمونه‌های کلینیکی به نظر می‌رسد روش Multiplex PCR می‌تواند به عنوان یک روش روتین در آزمایشگاه‌های رفرانس مورد استفاده قرار گیرد، همچنین از این روش به منظور شناسایی موارد مشکوک، حداقل در مراکز طبی کودکان، ضروری بنظر می‌رسد.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 8:01 +0330 on Monday September 25th 2017

References

1. Walker TS. *Microbiology*. Philadelphia, W.B.Sanders Company, 1998: 20-30
2. Whittam TS, Wolfe ML, Selander RK, Dyer DW, Loos BG. Clonal relationship among *E.coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 1993; 61: 1619-1629
3. Adwank Abu-Hassan N, Essawi T, Bdir M. Isolation and characterization of shiga toxigenic Escherichia coli strains from northern Palestine. *J Med Microbiol* 2002; 51: 332-5
4. Chart H, Perry NT, Cheasty T, Wright PA. The kinetics of antibody production to antigens of Escherichia coli O157 with hemolytic uremic syndrome. *J Med Microbiology* 2002; 51: 522-525
5. March SB, Ratnam S. Sorbitol–MacConkey medium for detection of Escherichia Coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1996; 23: 869-827
6. Feng P, Robin C, Choong H, Richard A, Wilson N. Identification of rough strain of Escherichia Coli O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. *J Clin microbiol* 1998; 36(8): 2339-2341
7. Melton-Celsa AR, Alison D. O'Brien. Structure, biology, and relative toxicity of shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper JB, O'Brien AD.Escherichia Coli O157:H7 and other shiga toxin–producing E.coli strains. 1st ed. *American society for microbiology*, Washington, 1998:121-128
8. Kerr G. Infections associated with shiga toxin-producing Escherichia coli: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. Department of microbiology, University of leeds, *The infections disease review* 1989; 1(1): 9-14

۹- شریفی ث. بررسی پاره ای از خصوصیات فیزیولوژیک اشریشیاکلی های جداشده از نمونه های ادرار و مدفوع جهت شناسایی سویه انتروهموراژیک O157:H7، همراه با تعیین الگوی مقاومت میکروبی باکتریهای جداشده، پایان نامه، دانشکده پزشکی کرمان، بهمن ماه ۸۰، با شماره ثبت۲۲۷۷

10. Pollard DR, Tyler SD, Rozee KR, Johnson MW, Lior H. Rapid and specific detection of verotoxin genes in Escherichia coli by the polymerase chain reaction. *J Clin microbiol* 1990: 540-545
11. Slutsker L, Allen A, Katherine D, Joy G, Lori H, Patrica M. Escherichia coli O157:H7 diarrhea in the United States:Clinical and Epidemiologic Features. *Annals of Internal Medicine*, 1997; 126: 505-513
12. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, MCocaig LF, Bresee JS, Shapiro C. Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5: 607-625
13. Ramotan K, Waldhart B. Direct detection of verotoxin-producing Escherichia coli in stool samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995 Mar: 519-524