مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۱ فروردین و اردیبهشت ۱۳۸۹ صفحات ۴۴- ۳۹

شناسایی ملکولی و سروتایپینگ O در سویه های اشریشیا کلی مولد ورو توکسین در عفونت های ادراری در شهر تهران

فرزانه حسینی: گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال: نویسنده رابط
E-mail: farzaneh953@yahoo.com
مرتضی مهاجری امیری: گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
بیژن بمبئی: گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی
سهیلا مرادی بید هندی: گروه میکروبیولوژی موسسه واکسن و سرم سازی رازی

دریافت: ۸۷/۷/ ۲۵ ، **پذیرش**: ۸۸/۲/۲

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری اشریشیا کلی مولد سم وروتوکسین عامل بیماری های مهمی در انسان می‌باشد. بررسی حضور و شیوع ژن‌های کد کننده سموم مذکور در سویه‌های جداشده از عفونت‌های ادراری با توجه به سرو تایپ O آنها از اهداف این بررسی بوده‌اند.

روش بررسی: از تعداد ۳۰۰ نمونه‌ی ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری، اشریشیا کلی از طریق کیت تشخیصی انتروباکتریاسه شناسایی گردید. برای سروتایپینگ، بترتیب سویه‌ها با آنتی سرم پلی‌والان و منووالان مورد آزمون قرار گرفتند. سویه‌های مول وروتوکسین از طریق PCR مشخص شدند و با کشت سویه‌ها در محیط سوربیتول مکانکی آگار، سرو تایپ‌های O157 از گروه‌های غیر O157 تفکیک شدند. برای نشان دادن بیان ژنهایvtx1 , vtx2 از روش آگلوتیناسیون سریع و پاسیو لاتکس استفاده گردید.

یافته ها: از کل نمونه های ادراری، ۱۸۰ مورد از نظر اشریشیاکلی کشت مثبت داشتند که از آنها ۱۵۸ مورد واحد ژنهایویروالانس بودند و همه آها بعد از کاربرد روش آگلوتیناسیون سریع و پاسیولاتکس، اثر سمی نشان دادند. ۲۴ درصد نمونه ها بصورت گروه O157 و ۷۶ درصد بصورت گروه غیر O157 طبقه بندی شدند. شایعترین ژنهای ویروالانس در سویه های O26 یافت شدند که واجد ژنهای vtx1 بودند.

نتیجه گیری: یافته‌های ما نشان داد که شیوع سویه‌های مولد سم ورو توکسین غیر O157 عامل عفونت ادراری جدا شده در شهر تهران بیشتر از سویه‌های O157 بوده است. استفاده از روش‌های PCR و ایمونولوژیک امکان شناسایی دقیقتر سویه‌های مولد ورو توکسیکوژنیک O157 از غیر O157 را میسر می‌سازد.

کلید واژه ها : اشریشیا کلی، ورو توکسین، PCR، سروتایپینگ

مقدمه

اشریشیاکلی مولد وروتوکسین یا شیگاتوکسین (VTEC یا STEC)، از مهمترین عوامل بیماری‌زای شناخته شده در سطح جهان است که بیماری‌های خطرناکی مثل سندرم همولیتیک- اورمیک و کولیت هموراژیک را موجب می‌شود (۱). در سندروم همولیتیک اورمیک، تداوم بیماری و اهمیت ندادن به درمان سریع و دقیق می‌تواند عوارضی مثل نارسایی کلیه‌ها، دیالیز دائم یا حتی نیاز به پیوند کلیه را داشته باشد (۲). عبور باکتری از دیوارهٔ روده‌ها در بیماری کولیت هموراژیک می‌تواند به عفونت صفاق و دیگر قسمت‌های داخلی حفره شکمی منجر شود (۳). چنین عوارض وخیم و جبران ناپذیری روش‌های سریع و قاطعی برای تشخیص این بیماری‌ها می‌طلبد. خانواده VTEC شامل سروتایپهای وسیعی از آنتیژن‌های O می‌باشند ولی سویههای *E.coli* عامل عفونت‌های ادراری متعلق به تعداد محدودی از سروتیپهای حاوی آنتی‌ژنهای O:H می‌باشند و کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۴). وروتوکسینهای *vtx1* و *vtx2* توسط سه فاژ کد کننده توکسین (H30, 933J, H19B) در باکتری اشریشیاکلی بیان می‌شوند. مکانیسم عمل توکسین‌های *vtx1* و *vtx2* مشابه هم است ولی سمیت نوع *vtx2*، ۴۰۰ برابر بیشتر از نوع *vtx1* است (۵). هر

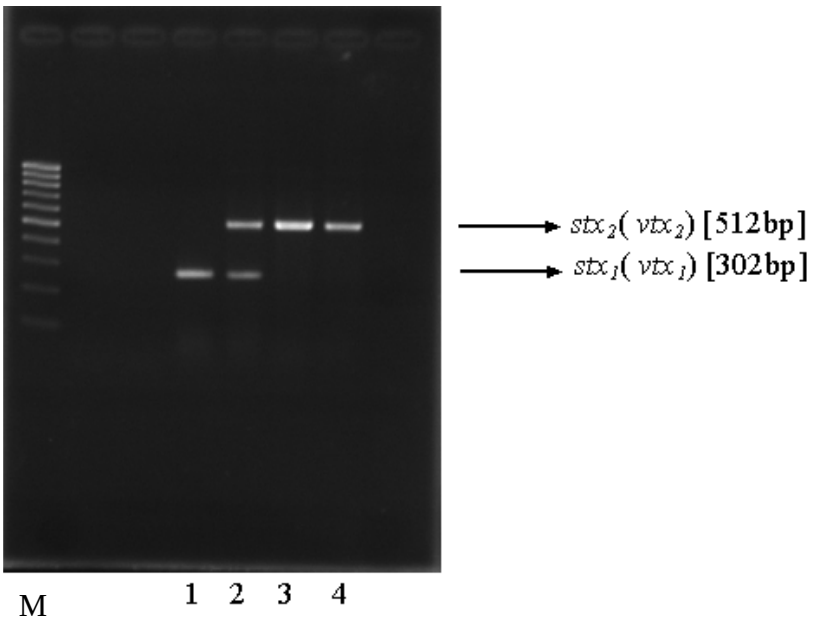
دو توکسین اگزوتوکسین‌های عملکردی و ساختاری هستند. بخش b از هر توکسین، با تمایل و ویژگی بالا عامل اتصال به گیرنده اختصاصی گلیکولیپیدی به نام Gb3 در سلول هدف می‌باشد که در غشای سلولهای پستانداران به میزان متفاوت حضور دارد. در نتیجه اتصال، یک سری واکنش‌های مولکولی رخ می‌دهد و از عملکرد فاکتور EF-2 که از فاکتورهای مهم در رونویسی ژن است جلوگیری می کند و پروتئین سازی دچار اختلال میشود (٦). یک سویه VTEC ممکن است *vtx1* یا *vtx2* و یا هر دو را تولید کند. گزارش های مختلف در مورد شیوع سرو تایپ‌های O مولد وروتوکسین در سایر کشورها نشان میدهد که عامل اغلب عفونت‌ها سویه O157:H7 اشریشیا کلی بوده است (۷). با این‌حال الگوی شیوع سروتایپ‌های O سویه های VTCE در کشور های مختلف متفاوت میباشد و هرجامعه ای با توجه به شرایط بهداشتی افراد باید اقدام به جمع آوری اطلاعات در این زمینه نماید (۸). با توجه به اهمیت پیشگیری و درمان به موقع به خصوص در بیماران مونث که به سهولت امکان مهاجرت رکتال – ژنیتال باکتری در آنها فراهم است، بهتراست مطالعات دقیق تر و کامل تری از میزان شیوع سروتایپ‌های هر جامعه در اختیار پزشکان و محققان قرار گیرد. در این بررسی سروتایپهای O شایع در عفونت های ادراری را مشخص نموده و سویه های شایع از نظر حضور ژن‌های *vtx1* و *vtx2* (*stx1, stx2*) از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن های مذکور توسط روش سرولوژیک نشان داده شدند.

مواد و روش ها

تعداد ۳۰۰ نمونه‌ی ادرار از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری از چهار مرکز بهداشتی و درمانی در سطح شهر تهران طی مدت یک سال (از شهریور سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷) جمع آوری گردید. نمونه‌ها ی جمع آوری شده کشت ادرار از نظر وجود باکتری اشریشیاکلی از طریق کیت تشخیصی Hi25 *Entrobacteriacea* Identification kit ساخت شرکت Hi media مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تعیین هویت کشت های بدست آمده، جهت جداسازی سویههای O157 از غیر O157 آن‌ها در محیط سوربیتول مکانکی آگار (SMAC) (Hi Media) تلقیح شدند. جهت سروتایپینگ آنتی ژن O سویه های مورد آزمون در محیط تریپتیک سوی براث (شرکت Difco) در ۳۷ درجه به مدت ۱۰ ساعت گرما گذاری شدند. سلول‌های باکتریایی را از طریق سانتریفیوژ جدا نموده و در سرم فیزیولوژی از آن ها سوسپانسیون تهیه گردید. سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت $56^{\circ}C$ قرار گرفتند. نمونه‌ها ابتدا با آنتیسرم پلی‌والان سرو تیپ های O و سپس با آنتی سرم منووالان (شرکت MAST) تحت آزمون قرار گرفتند. سویه کنترل مورد استفاده *E.coli* O157:H7 ATCC43895 (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) بوده است. سویه های مورد آزمون جهت نشان دادن تولید وروتوکسین در محیط CAYE (۲٪ کازامینو اسید، ۰/۶٪ عصارهی مخمر ، ۰/۲۵٪ NaCl ، ۰/۸۷٪ K_2HPO_4 ، ۰/۰۰۰۵٪ $MgSo_4$ ، ۰/۰۰۰۵٪ $FeCl_3$) در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۱۸ ساعت گرما گذاری شدند. سپس محیط‌های کشت را سانتریفیوژ نموده، مایع رویی آن ها در تست آگلوتیناسیون لاتکس پاسیو (reverse passive latex agglutination assay) (در کیت تجاری Verotox-F SEIKEN,Japan) مورد آزمون قرار گرفت. برای نشان دادن حضور ژن های *vtx1* و *vtx2* از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با سویه های کنترل: KS7/KS8 for VT1 (Russmann et al., 1995), VT2c/VT2d (Tyler et al., 1991) for VT2 (شرکت آرمین طب نوین) استفاده شد. جهت استخراج DNA ابتدا سویه های مورد آزمون و کنترل در ۱۱میلی لیتر محیط LB broth به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ همراه با تکان دادن گرما گذاری شدند و سپس از کیت Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) Pure Gene استفاده گردید. در این مطالعه از DNAی ژنومی باکتری برای انجام PCR استفاده گردید. DNAی مورد نظر تا حد امکان خالص شده برای حذف RNA به آن محلول RNaseI به همراه محلول رسوب دهنده پروتئین اضافه شد. بعد از دو بار سانتریفیوژ کردن، رسوب DNA خشک شده در ۱۰۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل حل گردید. برای اطمینان از خلوص DNA جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. در این بررسی از بافر آنزیم Taq DNA polymerase با تراکم ۱۰ بار تغلیظ شده به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq به میزان ۰/۲ میکرولیتر، داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) (شرکت Metabion) به میزان ۲/۵ میکرولیتر و بافر PCR مخلوط با $Mgcl_2$ به میزان ۲/۵ میکرولیتر استفاده گردید. مشخصات پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول ۱ آمده است (شرکت آرمین طب نوین). مقادیر مورد استفاده ۱ میکرولیتر برای هر پرایمر بوده است. حجم نهایی با آب فاقد DNase به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط PCR به ترتیب زیر بوده است: ۳۵ سیکل یک دقیقه ای در $94^{\circ}C$ درجه برای مرحلهٔ دناتوریشن، ۱ دقیقه در $55^{\circ}C$ برای مرحلهٔ آنیلینگ و ۱ دقیقه در $72^{\circ}C$ درجه برای مرحلهٔ ستز DNA که در دستگاه ترموسایکلر (Model) PCR Ependolf انجام پذیرفت. محصولات PCR از طریق الکتروفورز برروی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفتند و وزن ملکولی باند های بدست آمده از طریق مارکر لدر bp ۱۰۰ (شرکت Metabion) محاسبه گردید. رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۸ میکرو گرم در میلی لیتر به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. ژل مورد نظر بعد از رنگ زدایی بر روی دستگاه UV منتقل شد و عکس برداری گردید.

جدول۱: مشخصات پرایمر های مورد استفاده در PCR (۱۶)

ژن	توالی الیگونوکلئوتید('3–'5)	پرایمر
Vtx1	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	R
Vtx1	CGTGGTATAGCTACTGTCACC	F
Vtx2	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	R
Vtx2	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	F



تصویر۱، نتیجه‌ی الکتروفورز محصولات PCR *E.coli* O157 برروی ژل آگارز ۱٪ (ردیف۱: وروتوکسین۱، ردیف۲: وروتوکسین ۱و۲، ردیف ۴ و ۳: وروتوکسین۲ ، مارکر در سمت چپ تصویر مشخص شده است) اندازه ملکولی هر یک برروی تصویر مشخص شده است.

جدول۲: نتایج سروتایپینگ آنتی ژنO و PCR ژن های وروتوکسین در سویه های VTEC

سرو تایپ O	تعداد سویه های جدا شده	تعداد سویه های حاوی ژن*vtx1*	تعداد سویه های حاوی ژن*vtx2*	تعداد سویه های حاوی ژن*vtx1,vtx2*
O26	۳۱	٪۹۸	٪۱/۳	_
O41	۹	_	٪۹۹/۹	_
O46	۱۰	_	٪۹۹/۹	_

نتایج

از کل ۳۰۰ نمونه ی ادرار جمع آوری شده حدود ۱۸۰ کشت مثبت *E.coli* با شاخص های بیوشیمیایی لاکتوز (+)، سیترات (–)، اندول (+) و لیزین دکربوکسیلاز (+) مشاهده گردید. ۱۵۸ سویه‌ی VTEC مثبت از طریق PCR مشخص گردید. ۸۶٪ سویه‌های VTEC مثبت متعلق به زنان در سنین بین ۴۰ تا ۷۰ سال بودند و در آزمون آگلوتیناسیون لاتکس پاسیو (RPLA) اثر سمی داشتند. نتایج حاصل از کشت در SMAC نشان داد که حدود ۷۶٪ سویه های VTEC از نظر سروتایپینگ متعلق به گروه های غیرO157 و تنها ۲۴٪ شامل گروه O157 بودند. نتایج سروتایپینگ آنتی ژن O و حضور ژن های *vtx1* و *vtx2* در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. مقایسه‌ی نتایج حاصل از سروتایپینگ سویه‌های VTEC بدست آمده نشان داد که در عفونت های ادراری شیوع سروتایپ‌های O26 و O144 شامل بیش از ۵۰٪ سایر سروتایپهایO می‌باشد.در محصول PCR سرو تایپ O26 ژن *vtx1* در اغلب سویه‌های جدا شده مشاهده گردید. در حالیکه در مورد O144 حضور هر دو ژن *vtx1*و*vtx2* **در** نیمی از سویه‌ها به اثبات رسید. تقریبا در تمام سویه های مورد آزمون حضور ژن *stx2* و بیان آن در آزمون RPLA مشخص گردید. در سرو تایپ های O111، O128، O144، O146 و O157 هر دو ژن کد کننده وروتوکسین مشاهده شدند. تقریبا تمام ۳۷ سویه ی O157

جدا شده از طریق تخمیر سوربیتول در محیط SMAC حاوی دو ژن *vtx1* و *vtx2* بودند. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می گردد اندازه ملکولی ژن *stx1* حدود ۳۰۲ جفت باز و ژن *stx2* حدود ۵۱۲ جفت باز می باشد.

بحث

نتایج بدست آمده از چهار مرکز بهداشتی در طی مدت یک سال در شهر تهران نشان داد که بیش از ۸۰٪ علت عفونت های ادراری در زنان بین سنین ۴۰ تا ۷۰ سال باکتری گرم منفی اشریشیا کلی است. این یافته در مقایسه با نتایج محققان سایر کشورها قابل توجه می باشد (۹). Heuvelink و همکاران در آلمان نشان دادند که سویه هایVTEC O157: H7 مولد وروتوکسین عامل بیش از ۷۰٪ سندرم اورمیک همولیتیک به ویژه در زنان مسن می باشد (۱۱و۱۰). اهمیت اشریشیا کلی در اتیولوژی عفونت های ادراری همواره مورد توجه بوده است. Jennifer و همکاران عنوان نمودند که حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد زنان ایالات متحده حداقل یک بار در عمر خود دچار عفونت های ادراری اشریشیا کلی می شوند (۱۲). محققان زیادی جهت جداسازی و شناسایی سویه های اشریشیا کلی O157 از آزمون تخمیر سوربیتول استفاده نموده اند (۱۳،۱۴و۱۵). در این آزمون به جای ۱٪ لاکتوز، ۱٪ سوربیتول در محیطMAC بکار میرود و کلنی های *E.coli* در محیط SMAC که نمایانگر عدم تخمیر سوربیتول بودند مربوط به سویه‌های O157 می‌باشند (۱۶). در این پژوهش با کاربرد این روش مشخص گردید که بیش از ۷۰٪ سویه هایVTEC عامل عفونت ادراری متعلق به گروه غیر از O157 می باشند و تمام ۲۴ سویه جدا شده گروهO157 سوربیتول منفی بودند. در سال ۱۹۹۸ جیمز و جانسون طی پژوهشی سروگروه های O باکتری اشرشیا کلی مولد عفونت ادراری را در کشور آمریکا O1, O2, O4, O6, O8, O16, O18, O25, O75 گزارش نمودند. این دو محقق در سال ۲۰۰۰ میلادی سروگروه های O جدا شده از این باکتری را O1 ,O2 ,O4 ,O6 ,O12, O84 , O77 ,O64 , O15 , O7 , O18 ,O16, گزارش نمودند(۸). Blanco و همکاران نشان دادند که در کشور اسپانیا عفونت های سویه های VTECغیر از گروه O157 متداول تر از گروهO157 می‌باشد (۱۶). طبق گزارشات Gunzer و همکاران در آلمان شیوع سویه‌های غیر از گروه O157 تقریبا دو برابر گروهO157 است (۱۷). همچنین گزارشات از کشورهای آرژانتین، استرالیا، شیلی و افریقای جنوبی حاکی از نقش مهم سویه های VTECغیر از گروه O157 نسبت به گروهO157 می باشد (۱۸). در حالیکه در کشورهای کانادا، ایالات متحده، ژاپن، انگلستان و اسکاتلند میزان شیوع سویه های غیر گروه O157 بسیار کمتر از گروه O157 است. با وجود این در سال ۲۰۰۲ مرکز میکروبیولوژیک ایالات متحده پیشنهاد بررسی مواد غذایی از نظر حضور سویه های غیر گروه O157 را داد (۱۹). طبق گزارشات Blanco و همکاران شیوع سروتایپ O26:H 11 در عفونت های سویه های VTEC از سایر گروه های غیر O157 بیشتر بوده است(۱۶). در گزارش دیگری محققان عنوان نمودند که سرو تایپهای O22, O77, O113, O126، O8, O20 و O162شامل بیش از ٤٦٪ عفونت های ایجاد شده در احشام می‌باشند (۲۰). Paciorek عنوان نمود که سروتایپ‌های شایع در اسهال کودکان متعلق به گروه های O18،O26، O44 ،O 126 و O127 بوده است (۲۱). در نتایج بدست آمده در این بررسی مشابه گزارشات Blanco و Paciorek سویه ی O26 از شیوع بالایی برخوردار بوده است. این محققان آنتی ژن های O را در سویهها ی جدا شده از مدفوع انسان و یا حیوانات سروتایپینگ کرده‌اند و بررسی در نمونه های ادراری انجام نشده است در حالیکه در پژوهش حاضر این روش در مورد نمونه های ادرار انجام گرفته است. از آنجایی‌که ترشح سموم ورو توکسین از مهمترین عوامل بیماریزا در سویه های *E.coli* می‌باشد، شناسایی و جداسازی آن ها نقش مهمی در تشخیص صحیح و درمان بموقع عفونت ها خواهد داشت. جهت شناسایی سویه های VTEC از روش های مختلفی می توان استفاده کرد. سمیت این سموم برروی سلولهای Vero ثابت شده است. عصاره ی مورد آزمون همراه سلول های مذکور مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرما گذاری می شود و از این طریق نیز می توان بیان ژن های *vtx1* و *vtx2* را شناسایی نمود (۱).

همچنین شناسایی از طریق تست های ELISA، آنتی بادی های پلی کلونال و آزمون RPLA می‌تواند انجام پذیرد (۲۳). در این بررسی با استفاده از آزمون RPLA سویه های VTEC مشخص گردیدند که دارای دقت و حساسیت بالایی بوده، زمان کمتری را لازم دارد و کاربرد آن توسط محققان توصیه شده است (۱۶و۲۵). برای شناسایی دقیق تر ژن کد کننده ی هر یک از سموم وروسایتو توکسین (VT1 وVT2) استفاده از PCR توصیه شده است (۱۷،۱۶ ۲۲و۲۳). البته روش های دقیقتری مثل تلفیق PCR با روش‌های دیگر وجود دارد که موجب طراحی روش‌های جدیدی مثل Automated 5' Nuclease PCR ، شده است که از PCRدقیقتر، حساس‌تر و اختصاصی‌تر هستند ولی به علت قیمت بالایی که دارند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشند (۲۳). Jenkins و همکاران از طریق PCR حضور ژن *vtx1* درسروتایپ های O26، ژن *vtx 2* در سروتایپ های O128 و O145 و در۶۰٪ سروتایپ های O111 ژن *vtx 2* و در ۲۸٪ آن ها ژن *vtx1* را نشان دادند (۲۴). Wani طی گزارشی عنوان نمود که فقط ۱۹٪ سویه‌های STEC واجد ژن *v tx 2* می باشند و در ۴۴/۵٪ هر دو ژن *v tx1* و*vtx 2* مشاهده می‌شود (۲۳). طبق گزارشات Blanco و همکاران ٣٤٪ کل سویه های STEC واجد ژن *vtx1*، ۳۶٪ واجد ژن *vtx 2* و ۳۰٪ آن ها واجد هر دو ژن می‌باشند (۱۶). این بررسی نشان داد که سروتایپ O26 شایعترین سروتایپ در بین گروه های غیر O157 جدا شده از عفونت های ادراری است و اغلب آن ها فقط واجد ژن *vtx1* می باشند و اکثر

سویه های VTEC O157 جدا شده حاوی دو ژن *vtx1* و *vtx2* بودند نتایج این بررسی اهمیت شیوع سروتایپ های غیر O157 و بیان ژن *vtx1* بخصوص در سویه های جدا شده از زنان مبتلا به عفونت های ادراری را بخوبی نشان داد. بدین ترتیب اهمیت تشخیص بموقع این سویه های باکتریایی با توجه به میزان شیوع آن ها لزوم کاربرد روش های مولکولی در این زمینه را روشن میسازد.

References:

1. Blanco JM, Blanco JE, Blanco A, Mora MP, Alonso EA , Gonza´lez MI. Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants *Verocytotoxigenic Escherichia coli. Food and Nutrition Press's.* USA, Trumbull, 2001; PP: 113–148.
2. 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**: 1930–1936.
3. Maxwell SC. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemor-rhagic *Escherichia coli* infections. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2711–2715.
4. Banatvala NPM, Griffin KD, Greene TJ, Barrett WF, Bibb JH, Green JG. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* 2001; **183**: 1063–1070.
5. Bitzan MM, Wang Y, Lin J, Marsden PA. Verotoxin and niacin have novel effects on Preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide syntheses (ecNOS) expression and NO pro-duction in vascular endothelium. *J Clin Invest* 1998; **101**: 372–382.
6. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 450–479.
7. Dundas S, Todd WT, Stewart AI, Murdoch PS, Chaudhuri AK, Hutchinson SJ. The central Scotland Escherichia coli O157:H7 outbreak: Risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis 2001*; **33**: 923–931.
8. James R, Johson L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patient with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host compromise. *J Infect Dis* 2000; **181**: 261-272.
9. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli. Clin Microbiol Rev* 1989, **2**: 5–38.
10. Heuvelink AE, Biggelaar FL, Zwartkruis-Nahuis JTM, Boe E. Occurrence of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 on Dutch Dairy Farms. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(12): 3480–3487.
11. Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. Virulence factors and phonotypical straits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol* 1994; **183**: 13–21.
12. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, et al. Transcriptome of Uropathogenic *Escherichia coli* during Urinary Tract Infection. *Infect Immune* 2004; **72**(11): 6373-6381.
13. Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, et al. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 662–668.
14. Bielaszewska M , Schmidt H, Karmali MA, Khakhria R, Janda J, Bláhová K, et al. Isolation and Characterization of Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* O157: Hßtrains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(7): 2135-2137.
15. Pai CH, Ahmed N , Lior H , Johnson M , Sims HV, Woods DE. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia col*i: a two-year prospective study. *J Infect Dis* 1988; **157**: 1054–1057.
16. Blanco JE, Alonso MP, Mora A. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin micribiol* 2004; **42**(1): 311–319.
17. Gunzer F , Böhm H, Rüssmann H, Bitzan M, Aleksic S, Karch H, et al. Molecular Detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 in patient with hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 1807-1810.
18. Hiroshi F, Hoshina K, Gomyoda M. Selective Isolation of *eae*-Positive Strains of shiga toxin producing *Escherichia coli. J Clin Microbiol* 2000; **38** (4): 1684-1687.
19. Parck CH, Kim HJ, Hixon DL. Importance of testing stool specimens for Shiga toxins. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3542–3543.
20. Bonardi S, Maggi E, Bottarelli A, Pacciarini ML, Ansuini A, Vellini G, et al. Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 from cattle at slaughter In Italy. *Veterinary Microbiology* 1999; **67**: 203-211.
21. Paciorek J. Virulence properties of Escherichia coli faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhea. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 548–556.
22. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shigatoxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 450–479.

23. Wani SA, Pandit F, Samanta I, Buchh AS. Molecular epidemiology of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in India. *Cur Sci* 2004; **10**(10): 1345-1353.
24. Jenkins C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, et al. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *Med Microbial* 2003; **52**: 941-947.
25. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid Detection and Isolation of Shiga-Like Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* by Direct Testing of Individual nterohemolytic Colonies from Washed Sheep Blood Agar Plates in the VTEC-RPLA Assay. *J Clin Microbial* 1996; **38**: 2812-2814.