Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 37, No. 3, Aug. – Sep. 2015, Pages: 50-55

Prevalence of Shiga Toxin-Producing Genes in Escherichia Coli Isolated From Patients with Urinary Tract Infections in Khorramabad

Fereydoun Mansouri*, Nemat Shams, Ehsan Rashidian

Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Lorestan, Iran

Received: 22 Apr , 2014 Accepted:14 Jul , 2014

Abstract

Background and Objectives: Shiga toxins (verotoxin) is one of the most important bacterial toxin produced by the *Escherichia coli* (O157: H7 and nonO157: H7), and is responsible for various diseases in humans and animals. Hemolytic uremic syndrome (HUS) is serious human diseases that occur because of these toxins. There is no comprehensive information in this regard, here will studied the prevalence of these genes among the *E- coli* isolated from urine samples in Khorramabad.

Material and Method*:* The study is based on 146 *Escherichia coli* isolates of Patients with symptoms of urinary tract infection referred to clinical laboratories in Khorramabad during 90-1389. We used we identified the isolates by biochemical tests .The Multiplex PCR Multiplex PCR method were used to presence of genes**.**

Results: A total of 117 (13/80%) of the women and 29 (86/19) of the men and none of them carried both *stx1*and *stx2*.

Conclusion: Shiga toxin-producing *E. coli* isn't responsible for urinary tract infection in KhorramabadAlthough the frequency of these genes in urine samples is low, but evaluation of the other human and animal samples in different parts of the country is essential.

Keywords: Shiga Toxin, Escherichia Coli, Verotoxin, Multiplex PCR, Hemolytic Uremic Syndrome

*Corresponding author:
E-mail: manesht_1100@yahoo.com

فراوانی ژن‌های تولیدکننده شیگاتوکسین در جدایه‌های *اشریشیا کلی* از بیماران مبتلا به عفونت‌های مجرای ادراری در خرم‌آباد

فریدون منصوری*، نعمت شمس، احسان رشیدیان

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

دریافت: ۹۳/۶/۲۴ پذیرش: ۹۳/۷/۱۹

چکیده

زمینه و اهداف: شیگاتوکسین‌ها (وروتوکسین) یکی از توکسین‌های باکتریایی مهم می‌باشد که توسط باکتری *اشریشیا کلی* (O157:H7 و nonO157:H7) تولید شده و مسئول ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و دام می باشد. سندرم اورمی همولیتیک (HUS) ناشی از این توکسین‌ها، یکی از بیماریهای قابل توجه در انسان است که در هر دو جنس ایجاد می‌شود که می تواند باعث عوارض کلیوی شدید، نیاز به پیوند کلیه و حتی مرگ شود. بدلیل اینکه اطلاعات جامعی از فراوانی ژنهای مذکور در ایران و استان لرستان در دسترس نیست، هدف این تحقیق تلاش در جهت شناسایی ژن‌های مذکور در نمونه‌های ادراری شهر خرم‌آباد است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بصورت تصادفی بر روی ۱۴۶ بیماری که با علائم عفونت مجرای ادراری در سال‌های ۱۳۹۰- ۱۳۸۹ به آزمایشگاههای تشخیص طبی شهر خرم‌آباد مراجعه کرده بودند، انجام شد. ابتدا جدایه‌ها با استفاده از محیطهای افتراقی، اختصاصی و انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد (ایندول، MRVP، سیترات، تولید ,SH2) شناسایی و تعیین هویت گردیدند. سپس از روش Multiplex PCR جهت ردیابی ژن‌های Stx_1 و Stx_2 که به ترتیب قطعات ۳۰۲ و ۵۱۶ جفت بازی تولید می‌کنند، بهره گرفته شد.

یافته‌ها: از تعداد ۱۴۶ نمونه بررسی شده تعداد ۱۱۷ نمونه (۸۰/۱۳٪) مربوط به زنان و تعداد ۲۹ نمونه (۱۹/۸۶) مربوط به مردان بود که هیچکدام آنها واجد ژن‌های Stx_1 و Stx_2 نبود.

نتیجه‌گیری: سروتیپ‌های *اشریشیا کلی* مولد شیگاتوکسین، عامل عفونت مجرای ادراری در خرم‌آباد نیست، وجود فراوانی این ژن ها در ایران، شیوع آنها در نمونه‌های ادراری پایین است، اما باتوجه عوارض شدید شیگاتوکسین‌ها، بررسی مکرر نمونه‌های ادراری بیماران متبلا به عفونت های مجرای ادراری در نقاط مختلف کشور با اهمیت تلقی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اشریشیاکلی، شیگاتوکسین، وروتوکسین PCR، چندگانه، سندرم اورمی همولیتیک

***ایمیل نویسنده رابط**: manesht_1100@yahoo.com

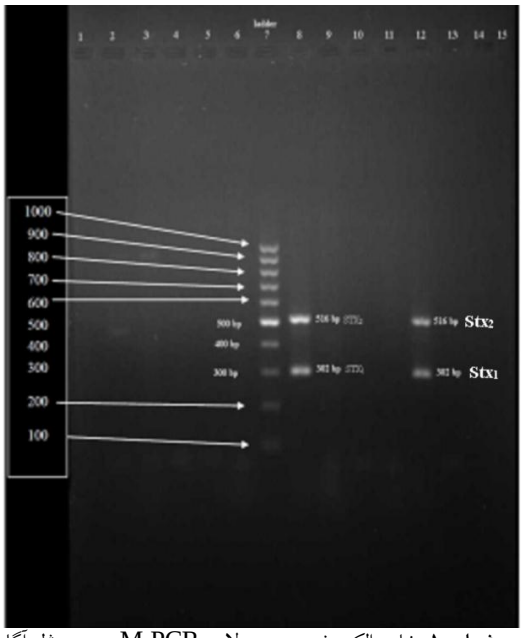
مقدمه

سویه‌های بیماریزای *اشریشیا کلی* عامل طیف گسترده‌ای از بیماریهای روده‌ای و خارج روده‌ای شامل اسهال، عفونت‌های مجرای ادراری، سپتی سمی و مننژیت نوزادان هستند (۱). حداقل ۱۰ تا ۲۰ درصد زنان یکبار عفونت حاد مجرای ادراری را تجربه می کنند. شدت عفونت به حدت باکتری و حساسیت میزبان وابسته است (۲). *اشریشیا کلی* وروتوکسیژنیک (Verotoxigenic *Escherichia coli*, VTEC) یا شیگاتوکسیژنیک (Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*, STEC)و انتروهموراژیک

(Enterohaemorrhagic Escherichia coli, EHEC)، توکسینی تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی بر روی سلول‌های ورو (Vero) موثر است. *اشریشیا کلی*‌های VTEC یا EHEC از انسانها و گونه‌های مختلف حیوانی، عمدتا نشخوارکنندگان و خوک جدا شده است (۳). سویه‌های STEC یک یا هر دو توکسین را تولید می‌کند که Stx_1 و Stx_2 نامگذاری شده است، بوسیله باکتریوفاژهای لیزوژنیک کد می‌شوند. وروتوکسین‌ها که شیگاتوکسین نیز نامیده می‌شوند، بر سلول‌های اندوتلیال عروق خونی دستگاه گوارش، کلیه، مغز، و دیگر بافت‌های و منجر به خروج مایعات یا اسهال خونی می‌شود (۴و۳). این توکسین‌ها عامل عمده گاستروآنتریت است که ممکن است با کولیت هموراژیک (Hemorrhagic Colitis, HC) یا سندرم اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome, HUS) که دلیل اصلی نارسایی حاد کلیه در کودکان است همراه باشد (۵). *اشریشیا کلی* O157:H7 مهمترین عامل بیماریزایی در بین اشریشیاکلی‌های تولید کننده شیگاتوکسین است، اما اخیرا" عفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های non-O157 در بسیاری از کشورها در حال افزایش است (۶). Stx_1 بیشترین تشابه را با شیگاتوسین سروتیپ ۱ شیگلا دیسانتری (سیتوتوکسین اصلی خارج سلولی) دارند. اعضای گروه Stx_2 تشابه کمتری با توالی Stx دارند. Stx_2 ۵۶٪ با Stx_1 همسانی دارد (۸و۷). شیگاتوسین‌ها به صورت سموم AB5 هستند که واجد یک زیر واحد A با خاصیت آنزیماتیک و ۵ کپی همسان زیر واحد B می‌باشد که زیر واحدهای پنتامری B بصورت یک ساختمان قرینه اطراف یک مارپیچ آلفا هلیکس مرکزی در طرف دیگر زیر واحد A قرار گرفته‌اند. مکانیسم خسارت به دنبال اتصال زیر واحد B به گیرنده‌های گلوبوتری آسیل سرامید (Globotriaosylceramide Gb3) واقع در سطح سلول‌های اندوتلیال و ورود زیرواحد A آغاز می‌شود (۱۰و۹). زیر واحد A با اتصال به قسمت ۲۸ S rRNA و حذف آدنین، ریبوزوم را غیرفعال و سنتز پروتئین را مختل می‌کند (۱۲و۱۱).

مواد و روش‌ها

این مطالعه بصورت تصادفی بر روی ۱۴۶ بیماری که با علائم عفونت مجرای ادراری در طی سالهای ۱۳۹۰- ۱۳۸۹ به آزمایشگاههای تشخیص طبی سطح شهر خرم آباد مراجعه کرده بودند، انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده در محیط EMB Agar کشت داده شد. کلنی‌های تشکیل شده بر روی این محیط کشت بررسی گردید و سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند IMViC و TSI ایزوله‌های اشرشیا کلی مورد تایید قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در محیط TSB حاوی گلیسرول ۴۰ درصد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. باکتری‌های ذخیره شده در دمای ۲۰- سانتیگراد، در محیط کشت لوریا برتانی آگار به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد. لوریا برتانی بدلیل نداشتن ممانعت‌کننده محیط مناسبی برای افزایش تعداد باکتری‌ها و انجام PCR است. جهت استخراج DNA از روش جوشاندن (Boiling) بهره گرفته شد و بدین منظور مقدار یک لوپ کامل از کلنی باکتری در یک میکروتیوب حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری (مدل پارس آزما) و در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. میکروتیوب در سانتریفیوژ یخچالدار (مدل اپندورف) به مدت ۱۰ دقیقه (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ گردید. سپس مایع سطحی بعنوان DNA استخراج شده، جهت انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- ذخیره گردید. از کیت بافر مستر میکس شرکت سیناژن و پرایمرهای مورد (۵) نیاز برای ژن Stx_1 به اندازه bp۳۰۲ و با توالی F: cgctgaatgtcattcgctctgc و R: cgtggtatagctactgtcacc و برای ژن Stx_2 به اندازه ۵۱۶ bp و با توالی F: cttcggtatcctattcccgg و R: ctgctgtgacagtgacaaaacgc که توسط شرکت سیناژن آماده گردید، استفاده شد. جهت انجام آزمون PCR چندگانه، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید که شامل موارد زیر بود: ۱۲/۵ میکرولیتر بافر مسترمیکس،۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۳/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۵ میکرولیتر آب مقطر. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (PeQlab مدل Primus 96) به تعداد ۳۵ سیکل و با شرایط زیر انجام شد: Initial Denaturation: حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه. Denaturation: حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه. Annealing: حرارت ۶۱ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه. Extension: حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه. Final Extensio: حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه. جهت انجام الکتروفورز محصول PCR بدست آمده برای انجام این مرحله از ژل آگارز (شرکت Sigma) ۱/۲ ٪ و بافر TBE 1x استفاده شد. جهت رنگ آمیزی ژل آگارز به میزان ۷۰ میلی‌لیتر (حجم قاب مورد استفاده)، میزان ۲ میکرولیتر رنگ Safe Stain (شرکت سیناژن) اضافه شد. همچنین از Ladder 100bp (شرکت سیناژن) به عنوان مارکر استفاده شد. میزان ولتاژ استفاده شده جهت الکتروفورز ۹۰ ولت در مدن زمان ۱۳۰ دقیقه بود. برای عکسبرداری از دستگاه ژل داک (SYNGEN، انگلیس) و امواج UV استفاده گردید. ضمنا" از *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که دارای هر دو ژن فوق بود بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت کنترل منفی از میکروتیوبی که دارای تمام عوامل و محلول‌ها بجز نمونه بود، بهره گرفته شد. نمونه‌های ادراری ۱۴۶ بیمار با علائم عفونت مجرای ادراری مورد بررسی قرار گرفت که تعداد ۱۱۷ (۸۰/۱۳ ٪) جدایه مربوط به زنان و تعداد ۲۹ (۱۹/۸۶٪) جدایه مربوط به مردان بود. آزمون PCR چندگانه نشان داد که هیچکدام از جدایه‌ها واجد ژن‌های Stx_1 و Stx_2 نیستند. بررسی نمونه کنترل مثبت وجود ژن‌های Stx_1 و Stx_2 بصورت باندهای با اندازه bp ۳۰۲ و bp ۵۱۶ را نشان داد (شکل شماره ۱).



تصویر شماره ۱ : نتایج الکتروفورز محصولات M-PCR بر روی ژل آگارز : ستون ۱ : خالی، ستون ۷: ladder 100bp، ستون ۸: کنترل مثبت (O157 : H7)، ستون ۱۵: کنترل منفی ستون۱۲: کنترل مثبت (O157 : H7)، ستون‌های ۱۴،۱۳،۱۱،۱۰،۹،۶،۵،۴،۳،۲ : جدایه‌های منفی فاقد ژنهای شیگاتوکسین

بحث

نشخوارکنندگان به عنوان مخزن اصلی *اشریشیاکلی*های تولید کننده شیگاتوکسین محسوب می‌شوند و مصرف فرآورده‌های با منشاء دامی در انتقال آلودگی به انسان اهمیت دارند و همچنین با توجه به انتقال مدفوعی-دهانی این سویه‌ها، احتمال وجود آنها در نمونه‌های مدفوعی بیشتر از نمونه‌های ادراری است و فراوانی این ژن‌ها باتوجه به اطلاعات موجود در نمونه‌های ادراری پایین است. نتیجه تحقیق حاضر با مطالعات انجام شده بر روی نمونه‌های ادراری، همسان یا دارای اختلاف اندک است. لذا بررسی سایر منابع احتمالی انسانی و دامی در نقاط مختلف کشور با اهمیت تلقی می‌شود. Ateba و همکاران سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای در افریقای جنوبی بر روی ۸۰۰ نمونه مختلف انجام دادند که نتایج آن با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۳). Siegfried و همکاران در سال ۲۰۰۴ نمونه‌های مدفوعی ۲۴ بیمار مبتلا به HUS و ۱۴۳ بیمار مبتلا به انتریت در اسلواکی را بررسی کردند که میزان ژنهای شیگاتوکسین در بیماران مبتلا HUS با مطالعه حاضر مطابقت داشت اما با میزان ژنهای مذکور در بیماران مبتلا انتریت که ۱۲ مورد بود، دارای اختلاف است (۱۴). Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۱ با مطالعه ۵۹۷ نمونه ادراری به روش EIA در شمال امریکا، تمام جدایه‌های مورد مطالعه را از نظر Stx_1 و Stx_2 منفی اعلام نمودند (۱۵). مطالعات Asadi Karam و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی تعداد ۳۲۱ بیمار کمتر از ۵ سال که با علائم اسهال در بیمارستان‌های سطح شهر تهران بستری شده بودند، وجود ژن-های تولید کننده شیگاتوکسین را منفی نشان داد (۱۶). اما مواردی از تحقیقات وجود دارد که با مطالعه حاضر دارای اختلاف است که عواملی مانند نوع نمونه مورد مطالعه، منطقه جغرافیایی و تعداد نمونه مورد بررسی در ایجاد آن دخیل است از جمله مطالعه ناظمی و همکاران که در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران انجام دادند، به ترتیب فراوانی ژن‌ها را ۱۰ و ۶ مورد به ترتیب برای ژنهای Stx_1 و Stx_2 گزارش نمودند (۱۷). Navidinia و همکاران سال۲۰۱۲ با مطالعه ۱۲۵۷۲ نمونه ادرار که از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در تهران از کودکان یک تا ۱۲ ساله مبتلا به عفونت مجرای ادراری، تعداد ۳۷۸ مورد را آلوده به *اشرشیا کلی* تشخیص دادند و فراوانی ژن‌های Stx_1 و Stx_2، برای هرکدام ۳ جدایه بود (۱۸) که تعداد زیاد نمونه‌های بررسی شده عامل مهمی برای وجود اختلاف نتایج با مطالعه حاضر تلقی می-شود. همچنین Adeli و همکاران در سال ۱۳۹۱ از تعداد ۱۴۴ نمونه بیمار مبتلا به عفونت ادراری در الشتر، تعداد ۱۰۰ نمونه *اشرشیاکلی* تعیین هویت نمودند که در این بررسی که تعداد ۲ جدایه به صورت همزمان دارای هر دو ژن *eae* A و Stx_2 بودند و یک جدایه دارای ژن Stx_1 بود (۱۹) بدلیل اینکه سطح بهداشتی و اقتصادی شهر الشتر از خرم‌آباد پایین‌تر است لذا وجود ژن‌های مذکور در نمونه‌های الشتر قابل انتظار بود. Muller و همکاران سال ۲۰۰۶ نمونه های مدفوعی گرفته شده از ۲۸۵ بیمار مبتلا به HUS و اسهال را در آلمان مطالعه و بررسی کردند که میزان ژن-های Stx_1 و Stx_2 را به ترتیب ۱۳ و ۶۰ مورد اعلام کردند (۱). همچنین Sugishita و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۲۸۱۸ مورد ابتلا به عفونت EHEC در ژاپن، از مجموع متبلایان فوق تعداد ۹۴ مورد به HUS گزارش شد که از این تعداد، ۲۷ جدایه از آنها واجد Stx_2 و ۲۹ جدایه دارای هر دو ژن Stx_1 و Stx_2 بودند و هیچکدام از جدایه به تنهایی واجد ژن Stx_1 نبودند (۲۰). با نظر به اینکه فراوانی ژن‌های مذکور در نمونه‌های مدفوعی بالاست لذا اختلاف نتایج این دو مطالعه با مطالعه حاضر قابل انتظار است.

نتیجه‌گیری

فراوانی ژن‌های شیگاتوکسین در نمونه‌های ادراری پایین است و اگرچه وجود ژن‌های شیگاتوکسین در جدایه مورد بررسی اثبات نشد اما نباید خطر بالقوه و عوارض ناشی از آنها را نادیده گرفت و بدین منظور باید عوامل احتمالی انتقال مانند دام‌ها، گوشت مصرفی، لبنیات و نمونه‌های مدفوعی بیماران مبتلا به اسهال را بررسی نمود.

References

1. Muller D, Hagedorn P, Brast S, Heusipp G, Bielaszewska M, Friedrich A, et.al. Rapid Identification and Differentiation of Clinical Isolates of Enter pathogenic Escherichia coli (EPEC), Atypical EPEC, and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli by a One-Step Multiplex PCR Method. *JCM* 2006; **44**(7): 2626-2629.
2. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; **48**(4): 185-188.
3. Mainil J.G. Daube G. Verotoxigenic Escherichia coli from animals, humans and foods: who's who?, Journal of Applied Microbiology 2005; **98**(6): 1332-1344.
4. Starr M, Bennett-Wood V, Bigham AK, de Koning-Ward TF, Bordun AM, Lightfoot D, et.al. Hemolytic-Uremic Syndrome Following Urinary Tract Infection with Enter hemorrhagic Escherichia coli: Case Report and Review. *Clin Infect Dis* 1998; **27**(2): 310-315.
5. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et.al. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli Isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(4): 1351-1356.
6. Herbert S, Caren G, Phillip IT, Matthias F, Helge K. Non-O157: H7 Pathogenic Shiga Toxin-Producing Escherichia coli: Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence for Clonality. *JID* 1999; **179**(1): 115-123.
7. Nurmohammad S, Phillip IT. Escherichia coli O157:H7 Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages: Integrations, Excisions, Truncations, and Evolutionary Implications. *J Bacteriol* 2003; **185**(12): 3596-3605.
8. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, et.al. Shiga Toxin–Producing Escherichia coli in Montana: Bacterial Genotypes and Clinical Profiles. *J Infect Dis* 2003; **188**(5): 719-729.
9. Karmali MA., Prospects for Preventing Serious Systemic Toxemic Complications of Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Infections Using Shiga Toxin Receptor Analogues. *J Infect Dis* 2004; **189**(3): 355-359.
10. Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM. Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7. *J Biol Chem* 2004; **279**(26): 27511-27517.
11. Jose BS, Jinmei L, David BH. The MAP kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to the Shiga toxin-induced inflammatory response. *Cell Microbiol* 2010; **12**(4): 516-529.
12. Naoko M, Kinnosuke Y, Gen M, Masaharu W, Fumio N, Masatoshi N, et.al. Two Distinct Cytotoxic Activities of Subtilase Cytotoxin Produced by Shiga-Toxigenic Escherichia coli. *Infection and Immunity* 2007; **75**(1): 488-496.
13. Ateba CN, Bezuidenhout CC. Characterization of Escherichia coli O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. *International Journal of Food Microbiology* 2008; **128**(2): 181-188.
14. Siegfried L, Liptakova A, Kmetova M, Birosova E, Rosocha, J, Sehnalkova, et.al. Characterization of selected virulence markers in clinical Escherichia coli strains associated with hemolytic uremic syndrome and enteritis. *Biologia* 2004; **59**(3): 333-338.
15. Johnson JR, Jerome C, Boster DR, Stapleton AE, Tarr PI. Analysis of Urinary Escherichia coli Isolates for Ability to Produce Shiga Toxin. *J Clin Microbiol* 2002; **40**(6): 2247–2248.
16. Asadi Karam MR, Bouzari S, Oloomi M, Aslani MM, Jafari A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) strains in Tehran, Iran. *IRAN. J. Microbiol* 2010; **2**(1): 3-7.
17. Nazemi A, Mirinargasi M, Khataminezhad MR, Shokouhi Mostafavi SK, Sharifi SH. Detection of stx1, stx2, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic Escherichia coli isolates from Iran. *Afr J Microbiol Res* 2012; **6**(5): 867-869.

18. Navidinia M, Karimi A, Rahbar M, Fallah F, Radmanesh Ahsani R, et.al. Study Prevalence of Verotoxigenic E.coli Isolated from Urinary Tract Infections (UTIs) in an Iranian Children Hospital. *Open Microbiol J* 2012; **6**: 1-4.
19. 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. *Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2013; **17**(2): 188-194.
20. Sugishita Y, Shimada T, Sunagawa T, Saitoh T, Tada Y, Okabe N, et.al. Characteristics of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) Associated with Enter hemorrhagic Escherichia coli. *Zoonoses and Public Health* 2008; **59**(1): 51-58.