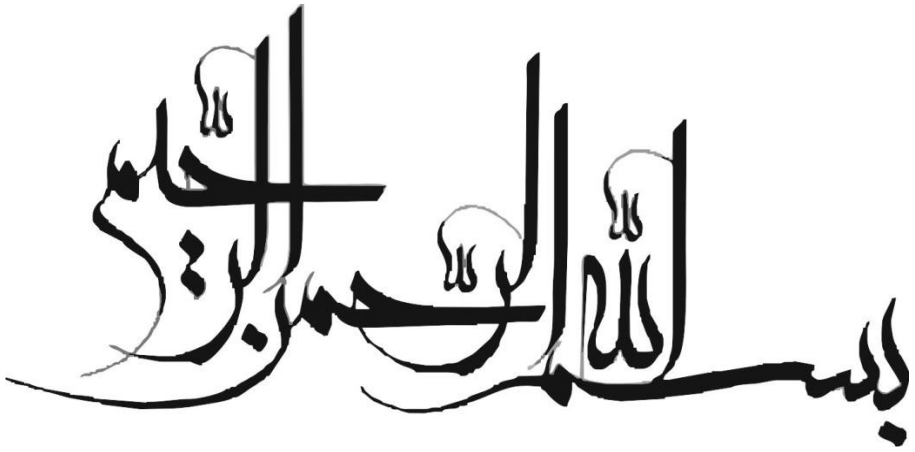
بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی

گروه زیست شناسی

پردیس خودگردان

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک

تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان زابل

استاد راهنما:

دکتر زهرا راشکی قلعه نو

اساتید مشاور:

دکتر احمد راشکی

دکتر مجید علیپور اسکندانی

تهیه و تدوین:

عالیه فیروزکوهی

آبان۱۳۹۳

پردیس خودگردان

مدیریت تحصیلات تکمیلی

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی *اشریشیاکلی* جداشده از نمونه مدفوع بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان زابل از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- ژنتیک توسط دانشجو عالیه فیروزکوهی تحت راهنمایی استاد پایان نامه خانم دکتر زهرا راشکی قلعه نو تهیه شده است. استفاده ازمطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضاء دانشجو

این پایان نامه ۶ واحد درسی شناخته میشود و درتاریخ توسط هیئت داوران بررسی و نمره و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی **امضاء** **تاریخ**

۱-استاد راهنمای اول: دکتر زهرا راشکی قلعه نو

۲-استاد راهنمای دوم: ----------

۳-استاد مشاور اول: دکتر احمد راشکی

۴-استاد مشاور دوم: دکتر مجید علیپور اسکندانی

۵-استاد داور:

۶- نماینده تحصیلات تکمیلی:

۷- مدیرگروه (مهر و امضاء): دکتر صدیقه اسمعیل زاده

تقدیم به :

روح پاک پدرم،

که به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی ،ایستادگی را تجربه نمایم.

مادر فداکارم،

که وجودش برایم همه عشق است و وجودم برایش همه رنج فرشته ای که دریای مهر و فداکاریش را کرانه ای نیست، هستی ام پیشکشش باد.

و تقدیم به همسر عزیزم

که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راهم بود.

سپاسگزاری:

در امتداد نگاه خیره بر افق خاطره ها نقشی از لبخند ها باقی مانده است و رنگی از تماشا و برقی از اشک ها، به دنبال ردپایش تا آغاز می روم. تا شروعی از فرداها دیر شده، تا آغاز دوستی ها و شوق به مکتب دانش نشستن ها، گفته ها، نکته ها و تجربه ها و من امروز در مقابل هزاران سطر نانوشته و هزاران حرف ناگفته، اینک به پاس هر قدمی که برای ساختن اندیشه های من برداشته شده، در ازای هر اشاره ای که مرا در رسیدن به پاسخ پرسش بودن یاری نموده است، تنها می توانم یاد کنم از نامشان تا خود بدانم که آموخته هایم در گرو حضور ایشان در زندگی ام بوده است.

سپاس بی پایان از استاد عزیزم سرکار خانم **دکتر زهرا راشکی قلعه نو** که همواره با دلسوزی و صبر در تمامی مراحل این پایان نامه مرا همراهی نمودند و همواره مدیون محبت هایشان خواهم بود.

و استاد فرهیخته جناب آقای **دکتر احمد راشکی** که افتخار شاگردی ایشان را داشتم.

و نیزاز جناب آقاب **دکتر غلامرضا مطلب** که زحمت داوری این پژوهش را متقبل شده اند کمال تشکر را دارم .

در پایان از تمامی دوستانم که در تمامی سال های بودنم با من بودند تشکر دارم و یادشان را که ره آورد گذر فصل های زندگیم بوده است را از نشستن غبار روزگاران بر دفتر خاطراتم مصون خواهم داشت. نام های زیر مجموعه ای قلم نوشته است که هیچ ترتیبی بر آن نمی توان نهاد، اگر نامی در آن نیست حکایت از نبودن یاد است و خورده بر قلم می رود نه بر کاتب.

و با تشکر از سرکار خانم خواجه، سرکار خانم شاهکرمی و جناب آقای عبدی.

چکیده

اشریشیاکلی یکی از شایع ترین گونه های باکتریایی است که عامل عفونت های گوارشی و خارج گوارشی در انسان و دام ها می باشد. توزیع گروههای فیلوژنتیکی ایزوله های *اشریشیاکلی* کامنسال میان جمعیت انسانی از لحاظ جغرافیایی متفاوت می باشد. هدف این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی وفیلوژنتیکی ایزوله های *اشریشیاکلی* جمع آوری شده ازنمونه های مدفوع د شهرستان زابل به ترتیب باروش RAPD و Triple-PCR بود. در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* با استفاده ازروش های رایج جدا گردیدند. ازمجموع ۱۰۰ ایزوله *اشریشیاکلی* ۲۸، ۷، ۴۸ و۱۷ درصد به ترتیب به گروه های فیلوژنتیکی A ، B1 ، B2 و D تعلق داشتند. نتایج RAPD شباهت ژنتیکی بین ۱۴ تا ۱۰۰ درصد را نشان داد.

در نتیجه،گروههای فیلوژنتیکی A و B2 در ایزوله ها ی مدفوعی بیشتر بود و درصدی از ایزوله های مدفوعی هم به گروههای B1 و D تعلق داشتند که به طور قابل توجهی کمتر از گروههای دیگر بودند.

کلمات کلیدی: *اشریشیاکلی* ،نمونه های مدفوع، تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیکی

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- خانواده انتروباکتریاسه ۳
۱-۳- *اشریشیاکلی*..... ۳
۱-۴- تاریخچه ۴
۱-۵- طبقه بندی ۵
۱-۶- خصوصیات مورفولوژی ۵
۱-۷- خصوصیات کشت و بیوشیمیایی ۶
۱-۸- ژنتیک ۸
۱-۹- ساختار آنتی ژنی *اشریشیاکلی* ۸
۱-۱۰- بیماری زایی *اشریشیاکلی* ۹
۱-۱۱- بیماری در انسان ۹
۱-۱۲- پاتوتیپ های *اشریشیاکلی* های پاتوژن روده ای ۹
۱-۱۲-۱- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* توکسین زای روده ای (ETEC) ۱۰
۱-۱۲-۲- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* بیماریزای روده ای (EPEC) ۱۰
۱-۱۲-۳- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* انترواگرگتیو (EAEC)..... ۱۱
۱-۱۲-۴- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (EHEC) ۱۲
۱-۱۲-۵- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* انتروااینوسیو(EIEC) ۱۳
۱-۱۳- تنوع ژنتیکی ۱۴
۱-۱۳-۱- اهمیت تنوع ژنتیکی..... ۱۵
۱-۱۴- انواع روشهای تعیین تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی..... ۱۵
۱-۱۴-۱- گروههای فیلوژنتیکی ۱۶
۱-۱۴-۲- Pulsed-Filed Gel Electrophoresis (PFGE) ۱۸
۱-۱۴-۳- تفاوت طول قطعه های حاصل از هضم (RFLP)..... ۱۹
۱-۱۴-۴- چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) ۲۰
۱-۱۵- مراحل روش RAPD..... ۲۱
۱-۱۵-۱- استخراجDNA..... ۲۱
۱-۱۵-۲- تخمین غلظت DNA ۲۱
۱-۱۵-۳- انجام واکنش RAPD..... ۲۲
۱-۱۵-۴- الکتروفورزمحصولات PCR ۲۲
۱-۱۵-۵- تجزیه ی داده های RAPD ۲۲
۱-۱۶- کاربرد RAPD ۲۳
۱-۱۷- مزایای تکنیک RAPD -PCR ۲۴
۱-۱۸-اهداف پژوهش..... ۲۴
۱-۱۹- فرضیه های پژوهش ۲۴
فصل دوم: مر وری بر منابع..... ۲۵
۲-۱- بررسی مطالعات ۲۶

فصل سوم: مواد و روش ها ۳۰
۳-۱ - دستگاه های مورد استفاده ۳۱
۳-۲- مواد مورد استفاده ۳۲
۳-۳- نمونه گیری ۳۲
۳- ۴- نحوه بدست آوردن کلونی خالص به روش کشت خطی ۳۳
۳-۵- طرز تهیه محیط کشت های مکانکی وEMB ۳۳
۳-۶- تست های تشخیصی افتراقی ۳۳
۳-۶-۱- تست MR-VP ۳۳
۳-۶-۲- تست اندول ۳۴
۳-۶-۳- تست مصرف سیترات ۳۳
۳-۶-۴- کشت در محیط TSI ۳۴
۳-۷- استخراج DNA ژنومی با استفاده ا ز روش جوشاندن ۳۴
۳-۸- تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراجی به روش اسپکتروفتومتری ۳۵
۳-۹- ژل های مورد استفاده برای الکتروفورز ۳۵
۳-۱۰- انتخاب و بررسی پرایمر ها ۳۵
۳-۱۰-۱- آماده سازی پرایمرها ۳۶
۳-۱۱- گروه بندی فیلوژنتیکی ۳۶
۳-۱۲- روش کار RAPD- PCR ۳۸
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۰
۴-۱- نتایج تست های افتراقی ۴۱
۴-۲ - نتایج ارزیابی گروههای فیلوژنتیک در سویه های *اشریشیاکلی* ۴۱
۴-۲-۱- نتایج Triplex-PCR ۴۱
۴-۳-تجزیه خوشه ای داده های مولکولی با نرم افزارNTSYS ۴۳
۴-۴- بحث ۴۶
۴-۵- نتیجه گیری ۴۹
۴-۶-پیشنهادات ۵۰
منابع و مآخذ ۵۱
پیوست ها ۶۰

فهرست جداول

عنوان.....صفحه

جدول۱-۳- دستگاه های مورد استفاده ۳۱
جدول۲- ۳- مواد و وسایل مورد استفاده ۳۲
جدول ۳-۳- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه آنالیز فیلوژنتیک ۳۶
جدول ۴-۳-نحوه گروه بندی فیلوژنتیکی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ۳۷
جدول۵-۳- شرایط PCR برای RAPD- PCR ۳۹
جدول۶- ۳ - مواد و نسبت های به کار گرفته شده در واکنش PCR..... ۳۹
جدول ۱-۴- توزیع ژن های مارکر برای تعیین گروه های فیلوژنتیکی ۴۲

فهرست اشکال

عنوان.....صفحه

شکل۱-۳- دیاگرام تعیین گروههای فیلوژنتیکی ۳۸
شکل ۱-۴- تصویر ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن های *yjaA، chuA* و قطعه TSPE4.C2 . ..... ۴۱
شکل ۲-۴ - تصویر ژل الکتروفورز ۴۳
شکل ۳-۴ - درخت فیلوژنی رسم شده با استفاده از نرم افزار NTSYS..... ۴۵

فهرست نمودار

عنوان.....صفحه

نمودار ۱-۴ - نمودارتوزیع گروههای فیلوژنیک سویه های*E. Coli* (درصد گروههای فیلوژنی) ۴۲

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

اشریشیاکلی یکی از بیش ترین گونه های باکتریایی است که از عفونت های انسانی جدا شده و یکی از مهمترین دلایل ایجاد کننده عفونت های گوارشی و خارج گوارشی در انسان و دام ها می باشد. این بیماری ها شامل عفونت های کلیه، مثانه، ریه و مننژ می باشند که به نوبه خود ممکن است منجر به بروز سپسیس گردند و یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده حیات انسان محسوب می شوند (Johann, 2012).

عفونت های ادراری از لحاظ شیوع، رتبه دوم را پس از عفونت های تنفسی داشته و در بزرگسالان رتبه اول بیماری های عفونی بزرگسالان را از نظر مراجعه به پزشک تشکیل می دهند. اهمیت عفونت های ادراری از نظر عوارض بسیار جدی که درنتیجه عدم تشخیص درمان مناسب بر جای می گذارد برکسی پوشیده نیست. در ارزیابی تکامل ژنتیکی *اشریشیاکلی*، بررسی های فیلوژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. شناسایی گروه فیلوژنتیکی سویه های *اشریشیاکلی* به روش PCR بواسطه تعیین حضور ژن های *chuA*، *yjaA* همچنین قطعه ای از DNA تحت عنوان TSPE4.C2 امکان پذیر می گردد. ارتباط فیلوژنتیکی سویه های ECOR collection[1] (مجموعه سویه های رفرانس *اشریشیاکلی*) نشان می دهد سویه های *اشریشیاکلی* در چهار گروه اصلی فیلوژنی A ، B1 ، B2 و D قرار می گیرند (Escobar *et al*., 2006) . از آنجایی که شناخت تنوع ژنتیکی موجود درنمونه های مختلف کلینیکی می تواند برای راهکار های درمانی آن مناسب باشد، لذا این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه های مدفوع بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان زابل با استفاده ازتکنیک RAPD انجام شد.

1 *E. coli* Reference (ECOR) collection

۲-۱- خانواده انتروباکتریاسه

خانواده انتروباکتریاسه بزرگترین و ناهمگون ترین مجموعه ی باسیل های گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند. حداقل ۲۸ جنس و ۷ گروه روده ای با بیش از ۸۰ سویه شناخته شده است (دیویدسون, ۱۳۸۳). جنس های این خانواده بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار آنتی ژنی و ترادف یابی اسیدهای نوکلئیک طبقه بندی شده اند. باکتری های متعلق به انتروباکتریاسه گسترش جهانی داشته و ساکن روده حیوانات و انسان ها هستند و گیاهان، خاک و آب را آلوده می سازند. و بسیاری از بیماری های بالینی از قبیل آبسه، پنومونی[1]، مننژیت، سپتی سمی و عفونت های ادارای را باعث می شوند (دیویدسون, ۱۳۸۳).

باکتری های خانواده انتروباکتریاسه را به دو دسته باکتری های فرصت طلب و بیماریزای روده ای تقسیم می کنند که برخی از جنس های این خانواده مثل سالمونلا، شیگلا و یرسینا همیشه مرتبط با بیماری هستند و جز پاتوژن های روده ای می باشند ولی برخی دیگر مانند *اشریشیاکلی*، کلبسیلا و پروتئوس به عنوان فلور طبیعی روده بوده و با ایجاد شرایطی مانند کسب ژن های بیماریزایی از طریق پلاسمید و باکتریوفاژ، به هم خوردگی فلور میکروبی، جابجایی فلور میکروبی و غیره، قدرت بیماری زایی را به دست آورده و سبب ایجاد عفونت های فرصت طلب می شوند (SuwanichKul *et al*., 1987).

۳-۱- *اشریشیاکلی*

اشریشیاکلی شایعترین و مهمترین جنس در خانواده انتروباکتریاسه می باشد که در پزشکی اهمیت دارد. باکتری بی هوازی اختیاری و بخشی از فلور فیزیولوژیک روده ای در انسان وحیوانات خونگرم است. اما در برخی از سویه ها سبب بیماری هایی مثل پنومونی، گاستروانتریت[2]، بیماری های ادراری-تناسلی و سپتی سمی می شوند. حضور *اشریشیاکلی* در آب دلالت برآلودگی آب با

1 Pneumonia
2 Gasteroentritis

مدفوع دارد. چندین واریانت پاتوژن اجباری و اختیاری از *اشریشیاکلی* وجود داردکه باعث انواع مختلفی ازعفونت های روده ای وخارج روده ای در انسان وحیوانات می شود (تاج بخش،۱۳۸۰). در سال های اخیر سویه O157:H/*شریشیاکلی* به عنوان پاتوژن مهم مشترک بین انسان و دام مطرح گردیده، که از طریق غذا منتقل می شود. این سویه عامل سندرم اورمی همولیتیک-کولیت خونریزی دهنده [1] در انسان است (کویین وهمکاران , ۱۳۸۶).

۴-۱- تاریخچه

اشریشیاکلی اولین بار به وسیله ی پزشکی آلمانی به نام تئودراشریش[2]شناسایی شد (موری, ۱۳۸۹). او در سال۱۸۸۵ این ارگانیسم را *باکتریوم کلی*[3] نامید و آن را به عنوان عامل بیماری زای اصلی عفونت های روده ای و برخی ازعفونت های خارج روده ای معرفی کرد. نام *باکتریوم کلی* به طور وسیع تا سال۱۹۱۹ استفاده می شد تا وقتی که کاستلانی[4] و کالمرز[5] جنس اشریشیا را تعریف کردند و نام*اشریشیاکلی* را پایه نهادند. *اشریشیاکلی* ارگانیسمی است که از جنبه های مختلف مورد مطالعه قرارگرفته است. درباکتریولوژی عمومی به عنوان ارگانیسم مدل برای مطالعه ی ساختارسلولی، رشد و متابولیسم استفاده می شود، همچنین ابزاری بسیار مهم برای کلونینگ ژن ها درسلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی و بیان محصولات ژن ها شناخته شده است. *اشریشیاکلی* به عنوان ارگانیسم کنترلی جهت انجام آزمایش های کنترلی، موثر بودن عوامل ضد میکروبی و مواد ضدعفونی کننده استفاده می شود و به عنوان ارگانیسم اندیکاتور جهت تعیین آلودگی مدفوعی مواد غذایی، آب و محیط مطرح می باشد. این باکتری نقش مهمی را به عنوان فلور میکروبی روده ی

1 Haemorrhagic colitis- haemolytic ureamic syndrome
2 Escherich
3 *Bacterium coli*
4 Castellani
5 Calmers

انسان وحیوانات خونگرم ایفا می کند. کم و بیش برخی از سویه ها پاتوژن های مهم برای میزبان هایشان هستند (Kayser *et al*., 2005) .

۵-۱- طبقه بندی

برای اولین بار دسته بندی *اشریشیاکلی* بر اساس تیپ های متنوعی ازآنتی ژن سوماتیکO، توسط کائوفمن انجام گرفت. برخی محققین چندین گونه برای آن قائل اند: *اشریشیاهرمانی*[۱]، *اشریشیادکربوکسیلاتا*[۲]، *اشریشیاولنر*[۳]، *اشریشیافرگوسنی*[۴]، *اشریشیاکلی*[۵] و *اشریشیابلاته*[۶] . (Johann, 2012)

۶-۱- خصوصیات مورفولوژی

اشریشیاکلی سلول های میله ای شکل با ۱/۵-۱/۱ میکرومترعرض و۴-۲میکرومتر طول هستند که انتهای گرد دارند و به صورت منفرد، زنجیره دوتایی و یا چندتایی قرار می گیرد. جدارسلولی این باکتریها شامل مورئین ،لیپوپروتئین[۷]، فسفولیپید[۸]و لیپوپلی ساکارید[۹]می باشدکه درواقع ساختمان جدارباکتری های گرم منفی است. لیپوپلی ساکاریددارای زنجیراختصاصی پلی ساکاریدی است که عهده داربروزخصوصیات پادگنی درگونه های مختلف است(Kayser *et al*., 2005).

اشریشیاکلی توانایی تشکیل اسپوررا ندارد ، بعضی نیز زمانی که در محیط واجد قند و در دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتی گراد کشت داده شوند لایه لعابی در اطراف خود ایجاد می کنند. حدود ۸۰ درصد سویه های باکتری متحرکند که این امر بواسطه وجود تاژکهای اطرافی امکان پذیر می گردد. کپسول یا میکروکپسول های ساخته شده از پلی ساکارید های اسیدی تولید می کنند

---

1 *Escherichia hermanii*
2 *Escherichia decarboxyla*
3 *Escherichia vulneri*
4 *Escherichia fergusoni*
5 *Escherichia coli*
6 *Escherichia blattae*
7 Morein- Lipoprotein
8 Phospholipid
9 Lipopolysacharid (LPS)

(کیانی،۱۳۹۰). *اشریشیاکلی* انواع متفاوتی از پیلی را تولید می کندکه از نظر ساختمانی و خصوصیات آنتی ژنی متفاوت هستند و رشته های پروتئینی مو شکلی هستند که دور تا دور باکتری را احاطه کرده اند. تقریبا ۸۰ درصد سویه ها دارای فیمبریه می باشند، که اغلب از نوع فیمبریه تیپ یک است،که توان هماگلوتیناسیون و اتصال به سلول های اپیتلیال را داشته و حساس به مانوز هستند (نوروزی, ۱۳۸۹؛ موری, ۱۳۸۹).

۷-۱- خصوصیات کشت و بیوشیمیایی

اشریشیاکلی به خوبی روی محیط های معمولی آزمایشگاهی حاوی یک درصد پپتون به عنوان منبع کربن ونیتروژن رشد می کند. آن ها کموارگانوتروف[1] هستند. دو نوع متابولیسم تخمیری و تنفسی دارند و در طیف وسیعی از دما رشد می کنند. اما دمای مناسب برای رشد آن ها ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد. با توجه به کیفیت لیپوپلی ساکارید موجود در غشای خارجی، رشد بر روی محیط جامد به ترتیب به وسیله ی کلنی های صاف[2] و براق یا خشک وچین وچروک دار یا خشن[3] مشخص می شود. پرگنه های آن در محیط آگار مغذی صاف بوده، تحدب کمی داشته و خاکستری رنگ و شفاف است . پرگنه های نوع خشن این باکتری، خشک بوده و براحتی در سرم فیزیولوژی پخش نمی شود(Kayser *et al*., 2005) . *اشریشیاکلی* کلنی های مدور، درشت، محدب و بدون پیگمان در سطح نوترینت آگار و بلاد آگار تولید می کند و بعضی از سویه ها، به ویژه سویه های مرتبط با بیماری های مجاری ادراری، در محیط ژلوز خون همولیز نوع بتا ایجاد می کنند. سویه های *اشریشیاکلی* در غلظت های پایین نمک های صفراوی (۵ درصد سدیم دی اکسی کلات) باقی می مانند و در محیط مک کانکی، به علت تولید لاکتوز به صورت پرگنه های صاف، شفاف، براق و صورتی رنگ رشد می کنند. اکثر موارد جدا شده متحرکند و پیگمان تولید نمی کنند. پرگنه های

1 Chemoorganotrohpic
2 Smooth
3 Rough

این باکتری در محیط دزاکسی کلات سیترات آگار[1]، کوچک، صورتی و کدر است. این باکتری در محیط براث کدورت ایجاد می کند (موری, ۱۳۸۹). از نظر بیوشیمیایی طیف وسیعی از قندها را تخمیر کرده و فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیداز بوده و تست اکسیداز آن منفی است. باکتری های کاتالاز مثبت، احیاء کننده نیترات (به جز اروینیا)[2] بی هوازی اختیاری و غیر هاگدارند. در جدا سازی اولیه از نمونه های درمانگاهی تخمیر و یا عدم تخمیر گلوکز توسط این باکتری ها اهمیت دارد و به همین علت به دو گروه لاکتوز مثبت ولاکتوز منفی تقسیم می شوند. *اشریشیاکلی* قادر است از استات[3] به عنوان منبع کربن استفاده کند، اما قادر به استفاده از سیترات[4] نیست، لذا از محیط سیمون سیترات برای شناسایی آن استفاده می شود. این باکتری گلوکز و سایر کربوهیدرات را تخمیر کرده و پیرووات تولید می کند سپس آن را به اسیدهای لاکتیک، استیک و فرمیک تبدیل می کند. قسمتی از اسیدفرمیک تولید شده طی سیستم پیچیده هیدروژن لیاز[5] به مقادیر مساوی از H_2 ، CO_2 تبدیل می شود (بروکس و همکاران، ۱۳۸۳). *اشریشیاکلی* ژلاتین را ذوب کرده و معمولا آنزیم تریپتوفاناز داشته و به همین دلیل اندول تولید می کند. VP[6] آن منفی و MR[7] آن مثبت است که این آزمایش در تمایز این باکتری از *انتروباکترآئروژنز* اهمیت فراوان دارد. همچنین این باکتری قادر به تجزیه اوره نمی باشد. بطور کلی برای تمایز باکتریهای روده ای از تست IMViCاستفاده می شود که بدین ترتیب می توان این باکتری را از کلبسیلا، انتروباکترها و سایر کلی فرمهای خاک و گیاهان متمایز نمود (Tetsuro & Tetsuro, 2004) .

1 Deoxycholate citrate agar
2 Erwinia
3 Acetate
4 Citrate
5 Hydrogen lyase
6 Voges Proskauer
7 Methyl Red

۸-۱- ژنتیک

برای چندین دهه *اشریشیاکلی* به عنوان ارگانیسم مدل برای مطالعه ژنتیک باکتری ها به دلیل نداشتن احتیاجات غذایی و رشد اختصاصی، در دسترس بودن، آسانی استفاده و غیر بیماری زا بودن وتکثیر سریع و زمان کوتاه دو برابر شدن که حدود ۲۰ دقیقه می باشد استفاده می شود.

ژنوم *اشریشیاکلی* یک تک کروموزم حلقوی DNA به طول ۵/۵-۴/۵ mb می باشد. بنابراین این ارگانیسم هاپلوئید است، هر چند یک کپی از بخشی از کرموزوم آن می می تواند بر روی پلاسمید های آن حمل شود. این باکتری معمولا دارای تعدادی DNA ی حلقوی خارج کروموزومی به نام پلاسمید می باشد. بسیاری از سویه های *اشریشیاکلی* پلاسمید های خارج کرموزومی را حمل می کنند که می توانند کونژوگاتیو وانتقال پذیر یا غیر قابل انتقال باشند. تیپ دیگری از پلاسمید ها که در حدود ۳۰ درصد از تیپ های وحشی *اشریشیاکلی* یافت می شود، فاکتورکلیسین[1] است. کلیسین هاتوکسین هایی هستند که توسط یک باکتری تولید شده وباکتری های دیگررا می کشند. حداقل۲۰ تیپ مجزا ازپلاسمید های کلیسین که برخی ازآن ها انتقال پذیر هستند،درسویه های *اشریشیاکلی* یافت شده است (Schaechter & Lederberg, 2004; Birong *et al*., 2010) .

۹-۱- ساختار آنتی ژنی *اشریشیاکلی*

آنتی ژن های سطحی در *اشریشیاکلی* را می توان به وسیله آزمایش هماگلوتیناسیون نشان داد. سه نوع آنتی ژن سطحی بطور گسترده برای تعیین سروتیپ ارگانیسم های انتریک استفاده می شوند که شامل آنتی ژن های سوماتیک[2](آنتی ژن O) ,آنتی ژن کپسولی (آنتی ژنK) و آنتی ژن تاژکی(آنتی ژن H) می باشند، آنتی ژنF یا فیمبریه ای، نیز جزء آنتی ژن های سطحی است که در برخی از سروتیپ ها یافت می شود (واکر, ۱۳۸۶).

---

1 Colicin
2 Somatic

۱۰-۱- بیماری زایی *اشریشیاکلی*

اکثر سویه های *اشریشیاکلی* به صورت کامنسال در دستگاه گوارشی انسان و دام ها حضور دارند. اما برخی از آن ها بیماری زا بوده و قادرند بیماریهای گوارشی و غیر گوارشی ایجاد نمایند. سویه های بیماری زا قابلیت تولید و نمو طیف وسیعی از عوامل حدت را دارند که بر این اساس به پاتوتیپ های مختلفی تقسیم می شوند (Stephen *et al*., 2006) .

۱۱-۱- بیماری در انسان

سویه های *اشریشیاکلی* می توانند سبب انواع مختلفی ازبیماری ها مانند سپتی سمی[1]، پنومونی، مننژیت[2]، عفونت های کلیه و مثانه[3]، سندرم اورمی همولیتیک (HUS)[4]و اسهال در انسان گردند. بر اساس ظهو علائم کلینیکی *اشریشیاکلی* های پاتوژن به دو گروه *اشریشیاکلی* های پاتوژن روده ای و *اشریشیاکلی* های پاتوژن خارج روده ای تقسیم می شوند(Kayser *et al*.,2005) .

۱۲-۱- پاتوتیپ های *اشریشیاکلی* های پاتوژن روده ای

تاکنون چندین پاتوتیپ *اشریشیاکلی* اسهال زا در انسان و دام ها شناخته شده است.که شامل *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک[5](ETEC)، *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک[6](EPEC) ،*اشریشیاکلی* انترواگرگتیو[7] (EAEC)، *اشریشیاکلی*انتروهموراژیک[8](EHEC) و*اشریشیاکلی* انتروانیواسیو[9](EIEC) می باشد (Li *et al*., 2008) .

---

1 Septicemia
2 Meningitis
3 Bladder and kidney infection
4 Hemolytic Urmy Syndrom
5 Enterotoxigenic *Escherichia coli*
6 Enteropathogenic *Escherichia coli*
7 Enteroaggregative *Escherichia coli*
8 Enterohemorragic *Escherichia coli*
9 Enteroinvasive *Escherichia coli*

۱-۱۲-۱- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* توکسین زای روده ای (ETEC)

اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) به سویه هایی از *اشریشیاکلی* اطلاق می گردد که قابلیت تولید حداقل یکی از دو نوع انتروتوکسین حساس به حرارت (ST) و مقاوم به حرارت (LT) را دارا می باشند. سویه های ETEC توسط پیلی های خاص به دیواره روده می چسبند و سپس باعث ایجاد اسهال می شوند. سویه های ETEC اولین بار در اسهال حیوانات و ازطریق توکسین سپس در انسان نیز مشاهده شدند. این ارگانیسم تولید دو نوع انتروتوکسین می نماید که توسط ژن های موجود بر روی پلاسمید کد می شود و می تواند با تولید این انتروتوکسین باعث ترشح مایعات به داخل روده شده و اسهال آبکی ایجاد نماید. این سویه ها یکی از اصلی ترین عوامل اسهال در مسافران می باشد(واکر،۱۳۸۶).

سویه های ETEC هم در بزرگسالان و هم درکودکان بویژه شیرخواران اسهال وبایی شکل به صورت اسپورادیک و اپیدمیک به وجود می آورد ولی شدت بیماری از وبا کمتر است. آب و مواد غذایی آلوده از مهمترین عوامل انتقال بیماری می باشد. اسهال ایجاد شده توسط ETEC خود محدود کننده می باشد و پس از دو یا سه روز بهبودی حاصل می گردد و موارد مرگ و میر صرفا در کودکان شیر خوار در کشورهای در حال توسعه مشاهده می شود (جاکلیک وهمکاران, ۱۳۸۷).

۲-۱۲-۱- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* بیماریزای روده ای (EPEC)

اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک عامل بیماری اسهال نوزادان در کشورهای در حال توسعه بوده و از قدیمی ترین پاتوتیپ های شناسائی شده *اشریشیاکلی* می باشند که در روده کوچک تکثیر یافته و اساسا باعث اسهال حاد و غیرخونی می گردند. اغلب عفونت های EPEC در طول سه سال اول زندگی رخ می دهد. سویه های EPEC به ندرت باعث اسهال بعد از یک سالگی می شود و تقریبا همه بیماران ۶ ماهه و یا کوچکتر می باشد. سویه های EPEC قبلا با شیوع اسهال درشیرخواران کشورهای توسعه یافته در ارتباط بوده است. این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث بهم

ریختگی ساختار در سلول گردیده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک A&E[1] در سطح روده می شود و با این عمل پدیده جذب و دفع روده مختل می گردد (Cabral *et al* ., 2002).

شایعترین گروههایEPEC که عامل اصلی اسهال در انسان شناخته شده اند شاملO114، O128، O126، O127، O55، O125ac، O119، O111ab، O86، O85 وO142 می شود. انسان مخزن اصلی این پاتوتیپ ها بوده و در سال ۱۹۹۵ این سویه ها به دو دسته ی مجزا تقسیم شدند: سویه اول سویه های انتروپاتوژنیک تیپیک به سویه هایی از سروگروپ های بالا گفته می شودکه دارای دو ژن به نام های*eae*[2] (ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی) و *bfp*[3] (ژن کد کننده پیلی) می باشند. سویه دوم سویه های انتروپاتوژنیک آتیپیک به سویه هایی ازسروگروپ های بالا اطلاق می شودکه دارای ژن *eae* بوده و فاقد ژن*bfp* باشند. مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر این امر می باشندکه سویه های آتیپیک[4] درکشور های پیشرفته وصنعتی شایع هستند. درحالیکه سویه های تیپیک درکشور های درحال توسعه شیوع دارند. درکشورما ایران مطالعات موجود نشان می دهدکه هم سویه های تیپیک وهم آتیپیک از موارد اسهال جدا می شوند

(Kayser *et al*., 2005; Goldman & Green, 2009).

۳-۱۲-۱- پاتوتیپ *اشریشیاکلی* انترواگرگتیو (EAEC)

پاتوتیپ *اشریشیاکلی* انترواگرگتیو عامل ایجاد اسهال آبکی پایدار نوزادان درکشورهای در حال توسعه و اسهال مسافرین در این کشورها است. این سویه ها به وسیله ی الگوی چسبندگی آجری شکل بی نظیری که طی۶ ساعت بعد از کشت در سلول های کشت سلول HEP[5] ایجاد می کنند، شناسایی می شوند. این فرآیند توسط فیمبریه شماره یک چسبنده ایجاد کننده تجمع صورت می

1 Attaching and Effacing
2 entrocyte attaching-effacting
3bundle forming pili
4 Atypical EPEC
5 Human laryngeal epithelium