

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

بررسی ژنوتیپ های اشرشیاکلی شیگاتوکسیژنیک (STEC) در نمونه های سبزیجات

اساتید راهنما

جناب آقای دکتر سیاوش سلمانزاده اهرابی

سرکار خانم دکتر طاهره فلسفی

استاد مشاور

جناب آقای دکتر محمد مهدی اصلانی

دانشجو

سمیه مظاهری

خرداد ماه 1391

ب

**کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به
دانشگاه الزهرا
است**

این پایان نامه را به دو سروارید گرانبهای صدف

زندگی ام پدر و مادر عزیزتر از جانم به پاس تمام

زحمات بی دریغ شان تقدیم میکنم

چکیده:

بیماری های عفونی اسهالی یک مشکل مهم و عامل مرگ و میرهای چشمگیر در جهان هستند. سوش های *Esherichia coli* بیماری زای روده ای عامل مهمی در ایجاد اسهال اپیدمیک و اندمیک در سراسر جهان هستند. اطلاع از شیوع *Shiga toxin – producing E. coli* (STEC) در منابع مختلف می تواند در مدیریت و کنترل بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری ها مفید باشد. حیوانات مزرعه مانند گاو مخزن اصلی STEC در کشور ما هستند. به علاوه سبزیجات تازه آلوده می توانند یک منبع بالقوه برای STEC در تهران است. اهداف این مطالعه تعیین فراوانی STEC در سبزیجات و نیز تعیین الگوی حساسیت آنها به آنتی بیوتیک های مختلف توسط روش استاندارد انتشار دیسک بود.

در این مطالعه 100 نمونه کاهو در طی 6 ماه از شهر تهران جمع آوری شد. شناسایی سوش ها با روش مولکولی PCR و تست های بیوشیمیایی انجام شد. این سوش ها برای ژن های *stx1*, *stx2*, *eaeA* ، *fliCh7* و *rfbO157* ، ژنهای اختصاصی STEC، بررسی شدند. تست حساسیت ضد میکروبی بر اساس روش انتشار دیسک انجام شد.

در این مطالعه آمار ایزوله های STEC در کاهو 8 درصد بود. سه ایزوله حامل ژن *stx1*، 3 ایزوله حامل ژن *stx2* و یکی از ایزوله ها ژنهای *stx2*، *fliCh7* و *rfbO157* را حمل می کرد به احتمال 90 درصد *O157:H7* می باشد. برای تایید نیاز به آزمایش های سرولوژی است. در تست مقاومت آنتی بیوتیکی، همه ایزوله ها به سفتازیدیم، سفپیم، ایمی پنم، کلرآمفنیکل، آمیکاسین، استرپتومایسین، کانامایسین، سفالوتین، نورفلوکساسین، سفترآکسون، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساس و به تتراسایکلین و آمپی سیلین مقاوم بودند. نتایج مطالعه حاضر نقش احتمالی کاهو به عنوان یک منبع آلودگی به سوش های STEC را نشان داد.

۲	فصل اول : مقدمه و پیشینه پژوهش
۲	1-1- بیماری های ناشی از غذا و نقش باکتری ها در ایجاد این بیماری ها
۳	2-1- تاکسونومی <i>Escherichia coli</i>
۴	3-1- <i>E. coli</i> بیماری زای روده ای (<i>Enteropathogenic E. coli</i> (EPEC)
۵	4-1- <i>E. coli</i> توکسین زای روده ای (<i>Enterotoxigenic E. coli</i> (ETEC)
۶	5-1- <i>E. coli</i> مهاجم روده ای (<i>Enteroinvasive E. coli</i> (EIEC)
۶	6-1- <i>E. coli</i> لانه گزین روده ای (<i>Enteroadherent E. coli</i> (EAAgEC)
۷	7-1- <i>E. coli</i> چسبنده به صورت پراکنده (<i>Diffusely adherent E. coli</i> (DAEC)
۸	8-1- <i>E. coli</i> مولد توکسین شیگا (<i>Shiga toxin – producing E. coli</i> (STEC)
۸	1-8-1- تاریخچه و نامگذاری:
۱۰	2-8-1- اهمیت پزشکی و یافته های بالینی
۱۰	1-2-8-1- کولیت هموراژیک (HC)
۱۱	2-2-8-1- سندروم اورمیک همولیتیک (HUS)
۱۱	3-2-8-1- پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک (TTPP)
۱۲	3-8-1- اپیدمیولوژی <i>STEC</i>
۱۲	1-3-8-1- توزیع سروتیپ های بیماری زا
۱۲	۱-۱-۳-۸-۱- ایالات متحده
۱۲	2-1-3-8-1- کانادا
۱۲	3-1-3-8-1- بریتانیا و ایرلند شمالی (UK)
۱۳	4-1-3-8-1- قاره اروپا
۱۳	5-1-3-8-1- ژاپن
۱۳	6-1-3-8-1- امریکای جنوبی
۱۳	7-1-3-8-1- استرالیا

- ۱۳ STEC مخزن 2-3-8-1
- ۱۴ راه های انتقال به انسان 3-3-8-1
- ۱۴ منبع غذایی حیوانی : 1-3-3-8-1
- ۱۴ میوه و سبزیجات : 2-3-3-8-1
- ۱۵ آب : 3-3-3-8-1
- ۱۵ شخص به شخص : 4-3-3-8-1
- ۱۵ حیوان به انسان : 5-3-3-8-1
- ۱۵ قرارگیری در معرض عفونت : 6-3-3-8-1
- ۱۵ دوز عفونی 4-3-8-1
- ۱۶ فاکتورهای بیماری زایی STEC 5-3-8-1
- ۱۶ اینتیمین Intimin 1-1-5-3-8-1
- ۱۷ گیرنده Intimin 2-1-5-3-8-1
- ۱۷ پروتئین های ترشعی و سیستم ترشعی تیپ III 3-1-5-3-8-1
- ۱۸ جزیره پاتوژنسیته LEE 4-1-5-3-8-1
- ۱۹ مکانیسم های دیگر چسبندگی 5-1-5-3-8-1
- ۲۰ انتروهمولایزین 2-5-3-8-1
- ۲۱ سرین پروتئاز ترشعی EspP 3-5-3-8-1
- ۲۲ EAST1 4-5-3-8-1
- ۲ انتقال آهن 5-5-3-8-1
- ۲۳ کاتالاز – پراکسیداز 6-5-3-8-1
- ۲۳ شینگاتوکسین ها 1-7-5-3-8-1
- ۲۴ ساختار شینگاتوکسین ها 2-7-5-3-8-1
- ۲۵ ژنتیک شینگاتوکسین 3-7-5-3-8-1
- ۲۵ گیرنده شینگاتوکسین ها 4-5-7-3-8-1
- ۲۵ ورود و عملکرد شینگاتوکسین در سلول هدف 5-5-7-3-8-1
- ۲۸ Imuno magnetic separation : جداسازی به وسیله ذرات مغناطیسی 6-3-8-1
- ۲۸ اهداف پژوهش 7-3-8-1

۲۸	۸-۳-۸-۱- پیشینه پژوهش.....
۳۲	فصل دوم : مواد و روش ها.....
۳۳	۱-۲- مواد و وسایل استفاده شده.....
۳۳	۲-۲- مواد، محلول ها و آنزیم های به کار رفته در این پژوهش.....
۳۴	3-2- محیط کشت های به کار رفته در این پژوهش.....
۳۵	۴-۲- مواد و وسایل ورد نیاز برای واکنش PCR.....
۳۵	5-2- مرحله 1: جمع آوری نمونه.....
۳۵	6-2- مرحله 2: غنی سازی.....
۳۶	7-2- مرحله 3: کشت بر روی محیط جامد.....
۳۶	8-2- مرحله 4: ذخیره سازی.....
۳۷	9-2- مرحله 5: استفاده از نمونه های ذخیره شده.....
۳۷	10-2- روش های مولکولی.....
۳۷	۱-۱۰-۲- استخراج DNA:.....
۳۷	1-1-10-2- استخراج DNA به روش جوشانیدن.....
۳۸	2-1-10-2- استخراج DNA با روش فنل کلروفرم.....
۴۰	۳-۱-۱۰-۲- تعیین غلظت DNA.....
۴۰	۲-۱۰-۲- واکنش زنجیره ای پلیمرز.....
41	1-2-10-2- ترکیبات لازم برای انجام PCR.....
۴۱	2-2-10-2- مراحل PCR.....
۴۱	3-2-10-2- مواد و وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR:.....
۴۲	3-10-2- ویژگی پرایمرها.....
۴۲	1-3-10-2- پرایمر ژن stx_1 :.....
۴۳	2-3-10-2- پرایمر ژن stx_2
۴۵	3-3-10-2- پرایمر ژن $eae A$
۴۶	4-3-10-2- پرایمر ژن rfb_{O157}
۴۷	5-3-10-2- پرایمر ژن $fliC_{h7}$
۴۹	4-10-2- معرفی سوش های استاندارد مورد استفاده.....

۴۹	1-4-10-2- سوش استاندارد کنترل مثبت
۵۰	2-4-10-2- سوش استاندارد کنترل منفی
۵۰	5-10-2- ژل الکتروفورز برای شناسایی قطعات DNA
۵۲	11-2- یافتن کولونی های <i>STEC</i>
۵۲	12-2- بررسی حضور سروتیپ <i>O157:H7</i>
۵۲	13-2- آزمایشات بیوشیمیایی
۵۲	الف : محیط TSI (Triple Sugar Iron agar)
۵۳	ب: محیط SIM
۵۳	ج: تست سیترات
۵۳	د: آزمایش MRVP
۵۴	14-2- کنترل کیفی محیط ها و مواد مورد استفاده
۵۴	15-2- سنجش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها
۵۵	1-15-2- تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها به روش Kirby – Bauer
۵۸	فصل سوم : نتایج
۵۹	1-3- سوش های جداسازی شده
۶۱	۲-۳- نتایج تنظیم PCR
۶۱	۱-۲-۳- تنظیم PCR برای ژن <i>stx₁</i>
۶۲	۲-۲-۳- تنظیم PCR برای ژن <i>stx₂</i>
۶۳	3-2-3- تنظیم PCR برای ژن های <i>rfbO157</i> و <i>fliC_{h7}</i> ، <i>eaeA</i>
۶۴	4-2-3- تنظیم PCR برای ژن 5
۶۵	۳-۳- سنجش میزان حساسیت به آنتی بیوتیک ها
۶۷	فصل چهارم : بحث
۷۶	پیشنهادات
۷۷	فصل پنجم: منابع

فهرست جداول:

33	جدول (1-2): وسایل به کار رفته در این پژوهش
33	جدول (2-2): مواد، محلول ها و آنزیم های به کار رفته در این پژوهش
34	جدول (3-2): محیط کشت های به کار رفته در این پژوهش
42	جدول (4-2): مشخصات پرایمر ژن stx_1 در STEC
42	جدول (5-2): برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن stx_1 در STEC
43	جدول (6-2): مواد واکنش PCR ژن stx_1
43	جدول (7-2): مشخصات پرایمر ژن stx_2 در STEC
44	جدول (8-2): برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن stx_2 در STEC
44	جدول (9-2): مواد واکنش PCR ژن stx_2
45	جدول (10-2): مشخصات پرایمر ژن $eaeA$ در STEC
45	جدول (11-2): برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن $eaeA$ در STEC
46	جدول (12-2): مواد واکنش PCR ژن $eaeA$
46	جدول (13-2): مشخصات پرایمر ژن rfb_{O157} در STEC
47	جدول (14-2): برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن rfb_{O157} در STEC
47	جدول (15-2): مواد واکنش PCR ژن rfb_{O157}
48	جدول (16-2): مشخصات پرایمر ژن $fliC_{h7}$ در STEC
48	جدول (17-2): برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن $fliC_{h7}$ در STEC
49	جدول (18-2): مواد واکنش PCR ژن $fliC_{h7}$
49	جدول (19-2): سوش های کنترل مثبت
50	جدول (20-2): سوش های کنترل منفی

- جدول (21-2) تست های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی *E. coli* 54
- جدول (22-2) تهیه استاندارد های مک فارلند..... 56
- جدول (1-3) سوش های STEC جداسازی شده 60
- جدول (2-3) . میزان حساسیت سوش های STEC جدا شده از کاهو به 12 آنتی بیوتیک ذکر شده به روش انتشار دیسک..... 65
- جدول (3-3) . نتایج آنتی بیو گرام سوش های جدا شده از کاهو با استفاده از روش انتشار دیسک برحسب درصد..... 66

فهرست اشکال:

- تصویر (1-3): محصول PCR چند سوش STEC برای ژن *stx1* 61
- تصویر (2-3): محصول PCR چند سوش STEC برای ژن *stx2* 62
- تصویر (3-3): محصول PCR ژن *eaeA* ، *fliC_{h7}* و *rfb_{O157}* 63
- تصویر (4-3): محصول PCR پنج ژن 64

فصل اول

مقدمه و پیشینه پژوهش

فصل اول : مقدمه و پیشینه پژوهش

1-1- بیماری های ناشی از غذا و نقش باکتری ها در ایجاد این بیماری ها

میوه های تازه، سبزیجات و آب میوه به عنوان غذا های مغذی شناخته می شوند. مصرف سبزیجات و میوه خام می تواند باعث انتقال باکتری ها، ویروس ها و انگل های بیماری زا به انسان شود. در برخی از موارد برای تقویت زمین کشاورزی از کودهای طبیعی و برای آبیاری از فاضلاب استفاده می شود. چنانچه این مواد دارای آلودگی میکروبی باشند به دلیل تماس ریشه و در برخی موارد برگهای گیاهان با خاک، باعث انتقال باکتری به گیاه می شود. در سالهای اخیر فراوانی شیوع بیماری های ناشی از غذا به دلیل مصرف سبزیجات و میوه های تازه افزایش یافته است (Lync *et al* ۲۰۰۰, Chang & Chen ۲۰۰۳).

بیماری های اسهالی ناشی از مصرف سبزیجات خام آلوده به باکتری های پاتوژن اسهالی، بیماری های غالب در توریست های بازدید کننده از کشور های درحال توسعه است. *Escherichia coli* تولیدکننده توکسین شیگا، یک پاتوتیپ از *E. coli* بیماری زای روده ای و عامل رایج این بیماری است (Beuchat ۱۹۹۶).

بسته به نوع عامل ایجاد مسمومیت، علائم و زمان بروز آن متفاوت است. در مواردی باکتری به بدن وارد می شود و بعد از تولید توکسین روده ای باعث بروز علائم مسمومیت می شود که بسته به نوع باکتری از 8 ساعت تا چندین روز طول می یابد، در *E. coli* مولد شیگا توکسین ، 3-5 روز بعد از ورود باکتری به بدن علائمی مانند اسهال یا گاهی اسهال خونی دیده می شود. در بسیاری از موارد نیز بیماری به دلیل قدرت تهاجمی باکتری مانند *Shigella* وارد شده به بدن است، بدون آنکه توکسینی تولید شود (Holmberg SD & Blak PA ۱۹۸۴, Dineges MM *et al* ۲۰۰۰).

2-1- *Escherichia coli* تاکسونومی

جایگاه تاکسونومیک *E. coli* به شرح زیر است :

Domain : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Species : *coli*

انتروباکتریاسه گروه بزرگ و ناهمگونی از باسیل های گرم منفی می باشد. یک جنس از این خانواده *Escherichia* است که شامل 6 گونه *adecarboxylate* , *vulneris* , *fergusonii* , *hermanii* , *blattae* , *coli* (Donnenberg MS 2010).

E. coli جزء فلور طبیعی روده انسان و حیوانات است. این باکتری در آب، خاک و غذا نیز یافت می شود، اما اغلب نتیجه آلودگی آنها به مدفوع است به همین دلیل *E. coli* به عنوان یک شاخص آلودگی مدفوعی آب و غذا محسوب می شود. اغلب سوش های آن بیماری زا نیستند اما در میان آنها سوش های پاتوژنی تکامل یافته اند که مسئول بیماری های بالینی در انسان هستند (Dooan-Halkman HB *et al* ۲۰۰۳).

دو گروه پاتوژن *E. coli* شامل :

- بیماری زای خارج روده (*Enteraintestinal pathogenic E. coli*) EXPEC

- بیماری زای روده ای (*Intestinal pathogenic E. coli*) IPEC

EXPEC در مننژیت نوزادان و عفونت های ادراری دیده شده است. *IPEC* در برخی بیماری های اسهالی دیده شده است (Donnenberg MS 2002).

شش گروه از *E. coli* در *IPEC* باعث بیماری اسهال در انسان می شوند که به آنها دلیل *E. coli* اسهالی گفته می شود (Heuvelink 2000 , Nataro JP & Kaper JB 1998).

این 6 گروه شامل:

- 1- پاتوتیپ *E. coli* بیماری زای روده ای (*EPEC*) *Enteropathogenic E. coli*
- 2- پاتوتیپ *E. coli* توکسین زای روده ای (*ETEC*) *Enterotoxigenic E. coli*
- 3- پاتوتیپ *E. coli* مهاجم روده ای (*EIEC*) *Enteroinvasive E. coli*
- 4- پاتوتیپ *E. coli* لانه گزین روده ای (*EAggEC*) *Enteroadherent E. coli*
- 5- پاتوتیپ *E. coli* مولد توکسین شیگا (*STEC*) *Shiga toxin – producing E. coli*
- 6- پاتوتیپ *E. coli* چسبنده به صورت پراکنده (*DAEC*) *Diffusely adherent E. coli*

می باشند.

3-1- *E. coli* بیماری زای روده ای (*EPEC*) *Enteropathogenic E. coli*

این پاتوژن روده ای برای اولین بار در دهه 1940 هنگام شیوع اسهال در شیرخوارگاه و بیمارستان ها ، باعث مرگ میر فراوان شد. سپس این پاتوژن طی یک بررسی در لندن و همچنین در اسکاتلند شناخته شد (Bray J 1945, Giles C & Sangster G 1948) .

این باکتری شیگاتوکسین تولید نمی کند و اتصال آن به سلولهای اپیتلیال روده از طریق BFP (*Bundle Forming Pilli*) ، نوعی مژه تیپ IV ، صورت می گیرد. این مژه توسط پلاسمید EAF کد می شود (Nataro JP & Kaper JB 1998).

باکتری های این گروه توکسین بزرگی تولید می کنند که مانع فعالیت لنفوسیت ها می شود. سوش های EPEC خوشه هایی بنام اتصالات لوکالیزه را بر سطح سلولهای یوکاریوت ایجاد می کنند. بعد از اتصال به سلول اپیتلیال روده ژن های کروموزومی بخشی بنام LEE را کد می کنند. این منطقه شامل 41 ژن است و سیستم ترشچی تیپ III را کد می کند. اینتیمین یک پروتئین آدهزین برای اتصال EPEC به سلول میزبان است و توسط ژن *eaeA* واقع بر LEE رمز می شود و گیرنده آن پروتئین Tir می باشد که توسط EPEC ترشح می شود و در غشای سلول میزبان جای می گیرد. این پاتوتیپ پروتئین های دیگری نیز مانند EAST1 ، لنفوستاتین و EspA, B, D تولید می کند که توسط پروتئین های ترشچی به سطح روده کوچک چسبیده باعث از بین رفتن میکروویلی ها و تشکیل پاهای اکتینی یا ساختمان های فنجانکی شکل می شود (Frankel G *et al* 1998 , Cleary J *et al* 2004).

این پاتوتیپ باعث بالارفتن غلظت کلسیم داخل سلولی و در نهایت ایجاد اسهال حاد می شود (Donnenberg MS 2002). دوز عفونی آن برای بزرگسالان در حدود 10^8 تا 10^{10} باکتری می باشد (Levine MM 1978).

***E. coli* -4-1 توکسین زای روده ای (*Enterotoxigenic E. coli* (ETEC))**

سوش های ETEC اولین بار در سال 1968 هنگام مطالعه روی علت اسهال غیر کلرا در هند و بنگلادش شناخته شد. علت شایع اسهال مسافرتی در جهانگردانی که به کشورهای در حال توسعه مسافرت می کنند است (Heuvelink AE 2000).

فاکتور های کلونیزاسیون ETEC، در انسان باعث چسبندگی آن به سلولهای اپیتلیال روده کوچک میشوند. LT یک اگزوتوکسین حساس به حرارت است با وزن مولکولی 86 کیلو دالتون که توسط پلاسمید رمز می شود و توسط برخی سوش ها بیان می شود. ST یک

انتروتوکسین مقاوم به حرارت است که توسط برخی از سوش ها تولید می شود، وزن مولکولی آن 4 کیلودالتون است (Heuvelink AE 2000). دوز عفونی ETEC برای بزرگسالان حداقل 10^8 سلول است (Manning SD 2005).

Enteroinvasive E. coli (EIEC) 5-1- *E. coli* مهاجم روده ای

سوش های EIEC اولین بار در جنگ جهانی دوم در ایتالیا شناخته شد و از آن زمان تا به حال چندین شیوع ناشی از غذا و آب این پاتوتیپ در جهان گزارش شده است. این دسته، بیماری شبیه شیگلوز ایجاد می کند که عامل اسهال در کودکان کشورهای در حال توسعه است، در کشورهای توسعه یافته این بیماری به ندرت رخ می دهد. EIEC با تهاجم به سلولهای اپی تلیال مخاط روده باعث ایجاد بیماری می شود. کلون (روده بزرگ) جایگاه غالب حمله آن است (Donnenberg MS 20 02 , Heuvelink AE 2000).

Enterogastric E. coli (EAggEC) 6-1- *E. coli* لانه گزین روده ای

EAggEC برای اولین بار توسط Nataro و همکاران در سال 1987 به عنوان عامل بیماری زا گزارش شد و امروزه به عنوان یک پاتوژن مهم روده ای در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته مطرح است. این پاتوتیپ با اسهال مداوم در کودکان، بیماری های ناشی از غذا و شیوع هایی در سراسر جهان در ارتباط است. EAggEC با یک الگوی مشخص چسبندگی به سلولهای انسانی می چسبد. فاکتورهای بیماری زایی در این باکتری شامل مژه های چسبندگی AAFI , AAFII , AAFIII (aggregative adherence fimbria) می باشد. فاکتورهای دخیل در بیماری زایی این گروه شامل توکسین کد شونده از طریق پلاسمید، موسیناز و همولایزین است (Heuvelink AE 2000).

Diffusely adherent E. coli 7-1 *E. coli* چسبنده به صورت پراکنده

(DAEC)

واژه DAEC ابتدا به هر سوش از *E. coli* که به سلولهای HEP-2 می چسبید و میکروکلونی هایی شبیه EPEC ایجاد نمی کرد، گفته می شد. با کشف سوش های EAaggEC، سوش های DAEC به عنوان یک گروه مستقل از *E. coli* دسته بندی شدند که به طور بالقوه باعث ایجاد اسهال می شدند و یک الگوی چسبندگی پراکنده در سنجش چسبندگی HEP-2 داشتند. در چسبندگی پراکنده، به نظر می رسد این باکتری ها روی سطح سلولهای HEP-2 پراکنده می شوند. طی گزارشی در فرانسه اعلام شد سوش های DAEC باعث بروز اسهال در بیماران بستری در بیمارستان می شود (Jallat C *et al* 1993). بنابراین می توان گفت DAEC یک پاتوژن اسهالی مهم در کشورهای توسعه یافته است.

اطلاعات کمی در ارتباط با خصوصیات بیماری زایی این پاتوتیپ وجود دارد. فاکتورهای بیماری زایی احتمالی شامل یک مژه سطحی و یک پروتئین 100 کیلو دالتونی غشای خارجی است. سوش های DAEC قادر به القا برآمدگی های انگشتی در سطح سلولهای کشت داده شده هستند. از مشخصه های این دسته می توان به الگوی اتصال به سلولهای اپیتلیال اشاره کرد که در آن تمام سطح سلول را می پوشاند. در بعضی از مطالعات مشخص شده است که DAEC در هر دو گروه دارای اسهال و بدون اسهال وجود دارد

(Giron JA *et al* 1991 , Jallat C *et al* 1993 , Nataro JP & Kaper JB 1998 , Scaletsky IC *et al* 2002).

1-8-1 *E. coli* مولد توکسین شیگا (STEC) *Shiga toxin producing E. coli*

1-8-1 - تاریخچه و نامگذاری:

Kibel و همکارانش در سال 1968 در آفریقای جنوبی در مورد بیماری سندرم اورمی همولیتیک (Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)، پیشنهاد کردند که یک سوش جهش یافته از *E. coli* مسئول ایجاد این سندرم است. برای اولین بار در سال 1970، Konowalchuk و همکارانش در کانادا توکسین های ورو در *E. coli* را کشف کردند. آنها هنگامی که مفید بودن سلولهای Vero (کلیه میمون سبز آفریقایی) را برای شناسایی LT (انتروتوکسین حساس به گرما) تولید شده توسط ETEC را بررسی می کردند، متوجه شدند که محیط کشت فیلتر شده بعضی از سوش های *E. coli* (تمامی سوش ها از افراد دارای اسهال جدا شده بودند) اثرات سیتوپاتیک غیر قابل برگشتی را بر خلاف اثرات قابل برگشت LT، روی سلولهای ورو ایجاد می کند. آنها احتمال ایجاد بیماری اسهال توسط این توکسین را پیشنهاد کردند فعالیت انتروتوکسیک این سوش ها در سال 1971 اثبات شده بود

(Konowalchuk J *et al* 1977, Konowalchuk J *et al* 1978, Konowalchuk J *et al* 1978b, Heuvelink AE 2000 Smith HW & Lingood MA 1971).

Konowalchuk و همکارانش این اثر را حاصل عمل یک یا تعداد بیشتری از سیتوتوکسین ها بیان کردند و آنها را verocytotoxins یا verotoxins (VTs) و سوش های *E. coli* تولید کننده را، *verotoxin-producing E. coli* یا *verotoxigenic E. coli* (VTEC) نامیدند (Heuvelink AE 2000).

به هر حال شناخت STEC به عنوان گروه مشخصی از باکتری های پاتوژن از دو مشاهده اپیدمیولوژیک کلیدی ناشی شد. اولین مورد در سال 1983 توسط Riely و همکارانش گزارش شد، که بیانگر دو همه گیری بیماری های گوارشی - روده ای با علائم دردشکم همراه

با کرامپ، اسهال آبکی که متعاقب آن خونریزی رخ می داد و عدم وجود تب یا تب پایین بود. این بیماری کولیت هموراژیت (HC) نام گرفت و مشخص شد که با ساندویچ های گوشت گاو و غذاهای آماده یا به اصطلاح fast food که در رستوران ها تهیه می شود در ارتباط است (Miller WT *et al* ۱۹۷۱, Riely LW *et al.* ۱۹۸۳, Heuvelink AE ۲۰۰۰).

دومین مشاهده کلیدی توسط Karmali و همکارانش در سال 1983 انجام گرفت. آنها ارتباط نزدیک بین موارد پراکنده فرم مثبت اسهال در بیماران سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) را با حضور VT و/یا *E. coli* تولیدکننده توکسین را در مدفوع این بیماران، نشان دادند (Karmali M ۱۹۸۳, Heuvelink AE ۲۰۰۰).

O'Brient و همکاران این سیتوتوکسین را خالص و ویژگی های آن را تعیین کردند، آنها فهمیدند که ساختار و فعالیت بیولوژیکی آن بسیار مشابه توکسین شیگا (*stx*)، یک سیتو توکسین درون سلولی تولید شده توسط *Shigella dysenteriae* type ۱ است. این توکسین به وسیله anti-*Stx* خنثی شدن می شد، در نتیجه این توکسین، توکسین شبه شیگا *Shiga-like toxin (SLT)* و سوش های *VTEC* تولید کننده توکسین شبه شیگا *Shiga-like toxin-producing E. coli (SLTEC)* نامیده شد. در سالهای بعد اطلاعات بدست آمده از این توکسین ها به سرعت افزایش یافت و دانسته شد که این توکسین ها یک خانواده با همولوژی در توالی اسیدهای نوکلئیک و پپتید ها را تشکیل می دهند بنابراین Calderwood و همکاران نام *Stx* را برای VT و *SLT* همچنین نام دلیل *E. coli* تولید کننده توکسین شیگا *Shiga toxin-producing E. coli (STEC)* را برای *VTEC* و *SLTEC* پیشنهاد کرد. *SLTEC*, *VTEC* و *STEC* واژه های معادل اند و همه به سوش هایی از *E. coli* که تولید کننده یک یا بیشتر از توکسین های خانواده *stx* اند اطلاق می شود، این خانواده شامل *stx*_۱ و *stx*_۲ و زیر گروه های آنها می باشد.