بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا(س)

دانشکده ی علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد

رشته ی میکروبیولوژی

عنوان:

بررسی فراوانی ژنوتیپ های *E.coli* انتروپاتوژنیک (EPEC) در نمونه های سبزیجات

استاد راهنما:

جناب آقای دکترسیاوش سلمانزاده اهرابی

اساتید مشاور:

سرکار خانم دکتر طاهره فلسفی

جناب آقای دکتر محمد مهدی اصلانی

دانشجو:

محبوبه موسوی

بهمن ۹۱

کلیه ی دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهرا است.

سپاس خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت، پس در هر نفسی که فرو می‌رود ممد حیات است و چون برمی آید مفرح ذات.

بعد از شکر و سپاس خداوند متعال بر خود لازم می‌دانم از کسانی که در پیمودن این مسیر مرا یاری نموده‌اند نام برده و در حد توان این زبان قاصر از آنان قدردانی نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر سیاوش سلمان زاده که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند. سرکار خانم دکتر طاهره فلسفی که مرا از راهنمایی‌های ارزنده‌شان در این مسیر بهره‌امند نمودند و همچنین از جناب آقای دکتر محمد مهدی اصلانی تشکر می‌کنم.

همچنین از داور گرامی دکتر ایراجیان که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

با تقدیر و سپاس فراوان از پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آن‌ها بوده‌ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی‌ها و مشکلات بوده است.

با سپاس بی دریغ از همسر مهربانم که کمی و کاستی‌های مرا در این دوره تحمل نموده و از هیچ گونه پشتیبانی مادی و معنوی دریغ ننمود.

در نهایت از دوستان و هم‌کلاسی خوب دوران کارشناسی ارشدم خانم‌ها بسارده، موسوی، هندیان، حشمتی، غلامی، قشقایی، رضایی، نجاتی پور و سایر کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند تشکر و قدر دانی می‌کنم.

خدایا چنان کن سرانجام کار تو خشنود باشی و ما رستگار.

محبوبه موسوی

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم

به پاس مهربانی هایشان

و به همسر عزیزم

به پاس همراهی صمیمانه اش

چکیده

به دنبال افزایش مصرف میوه‌جات و سبزیجات در سراسر جهان، تعداد شیوع‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده با بیماری‌زاها از جمله پاتوتایپ‌های مولد اسهال اشرشیاکلی نیز افزایش یافته است. سویه‌های اشرشیاکلی بیماری‌زای روده‌ای Enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* عامل مهمی در ایجاد اسهال حاد و مزمن در انسان‌ها هستند. شیوع‌هایی از آن در ارتباط با مصرف آب و غذای آلوده بوده است. این مطالعه به منظور ارزیابی فراوانی EPEC در ۱۰۰ نمونه سبزی شامل ۷۲ نمونه ریحان، ۲۵ نمونه اسفناج و ۱۵ نمونه گشنیز با تکنیک PCR در تهران انجام گرفته است. PCR با ۴ جفت پرایمر برای ژن‌های *eaeA*، *stx1*، *stx2* و *bfpA* انجام گرفت و سویه‌هایی از اشرشیاکلی که برای ژن *eaeA* مثبت و برای ژن‌های *stx1* و *stx2* منفی بودند به عنوان EPEC معرفی شدند. سویه‌های EPEC در ۲ نمونه اسفناج (۸٪) و ۵ نمونه ریحان (۶/۹۵٪) شناسایی شدند و نمونه‌های گشنیز آلودگی با EPEC نشان ندادند. علاوه براین هیچ‌کدام از نمونه‌ها دارای ژن *bfpA* نبودند که آلودگی با سویه های غیرتیپیک EPEC را پیشنهاد می‌کند.

این جدایه‌های EPEC برای حساسیت ضد میکروبی خود با روش انتشار در آگار(-Kirby Bauer) مورد بررسی قرار گرفتند. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین، سفتازیدیم، سفالوتین، سفکسیم، سفپیم، آمیکاسین، ایمیپنم، جنتامیسین، کلرامفنیکل، کانامایسین، سفتیزوکسیم، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک‌اسید و تری متوپریم-سولفومتوکسازول بودند. ۱۰۰٪ سویه‌های جداشده از سبزیجات به کلرامفنیکل، استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاوم بودند و ۲۹٪ نیز به تری‌متوپریم- سولفومتوکسازول و سفتازیدیم و ۴۲,۸۵٪ به آموکسی‌سیلین مقاومت نشان دادند. جدایه‌های EPEC به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سبزیجات می‌تواند منبعی از عفونت‌های روده‌ای ناشی از EPEC در تهران باشد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و اهداف پژوهش.....۱
۱-۱- اشرشیاکلی ۲
۱-۲- اشرشیاکلی‌های مولد اسهال..... ۳
۱-۳- اشرشیاکلی بیماری‌زای روده‌ای.....۶
۱-۳-۱- تاریخچه و نام‌گذاری.....۶
۱-۳-۲- تظاهرات بالینی..... ۷
۱-۳-۳- واکنش های بیماری‌زا و میزبان ۷
۱-۳-۳-۱- آسیب بافتی A/E ۷
۱-۳-۳-۲- چسبندگی موضعی ۸
۱-۳-۳-۳- سایر الگوهای اتصال ۹
۱-۳-۴- فاکتورهای بیماری‌زایی ۹
۱-۳-۴-۱- پلازمید EAF..... ۹
۱-۳-۴-۲- BFP ۹
۱-۳-۴-۳- جزایر بیماری‌زایی : لوکوس زدودن انتروسیت ۱۰
۱-۳-۴-۴- سایر فیمبریاها ۱۶
۱-۳-۳-۵- پروتئین چسبیدن-زدودن خوکی.....۱۶
۱-۳-۳-۶- توکسین‌ها ۱۷
۱-۳-۳-۷- لنفوستاتین ۱۸
۱-۳-۳-۸- تهاجم ۱۸
۱-۳-۴- ویژگی‌های ویرولانس سویه های تیپیک و غیرتیپیک EPEC..... ۱۹
۱-۳-۵- اپیدمیولوژی ۱۹
۱-۳-۶- انتقال و مخازن ۲۰
۱-۳-۷- اسهال..... ۲۱
۱-۳-۸- تشخیص..... ۲۱
۱-۳-۸-۱- روش‌های فنوتیپی ۲۱
۱-۳-۸-۲- روش‌های ژنوتیپی ۲۲
۱-۳-۹- درمان..... ۲۲
۱-۳-۱۰- پیشینه‌ی پژوهش ۲۳
۱-۳-۱۱- اهداف پژوهش.....۲۶

عنوان **صفحه**

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۸
۲-۱- مواد و محلول‌های به کار رفته در این تحقیق ۲۸
۲-۲- وسایل و دستگاه‌های استفاده شده در این تحقیق ۲۹
۲-۳- محیط‌های کشت به کار رفته در این تحقیق ۳۰
۲-۴- مرحله‌ی ۱ : جمع آوری نمونه ۳۰
۲-۵- مرحله‌ی ۲: غنی سازی ۳۰
۲-۵-۱- تهیه محلول آنتی‌بیوتیک سفکسیم ۳۰
۲-۶- مرحله‌ی ۳ : کشت بر روی محیط جامد ۳۰
۲-۷- مرحله‌ی ۴: ذخیره سازی ۳۱
۲-۸- مرحله‌ی ۵: استفاده از نمونه‌های ذخیره شده ۳۱
۲-۹- سوش‌های استاندارد مورد استفاده به عنوان کنترل مثبت ۳۲
۲-۱۰- طرح کلی از آنچه در این پژوهش صورت گرفت ۳۲
۲-۱۱- روش‌های مولکولی ۳۳
۲-۱۱-۱- استخراج DNA ۳۳
۲-۱۱-۱-۱- استخراج DNA به روش جوشاندن ۳۳
۲-۱۱-۱-۲- استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم ۳۴
۲-۱۱-۱-۳- تعیین غلظت DNA ۳۶
۲-۱۱-۲- PCR ۳۶
۲-۱۱-۲-۱- ترکیبات لازم برای انجام PCR ۳۷
۲-۱۱-۲-۲- رقیق کردن پرایمرها ۳۷
۲-۱۱-۲-۳- ارزیابی خلوص پرایمرهای سنتز شده ۳۸
۲-۱۱-۳- مراحل مختلف PCR ۳۸
۲-۱۱-۳-۱- مشخصات پرایمر ژن *eaeA* ۳۹
۲-۱۱-۳-۲- مشخصات پرایمر ژن *stx1* ۴۰
۲-۱۱-۳-۳- مشخصات پرایمر ژن *stx 2* ۴۲
۲-۱۱-۳-۴- مشخصات پرایمر ژن *bfpA* در EPEC ۴۳
۲-۱۱-۴- ژل الکتروفورز برای شناسایی قطعات DNA ۴۵
۲-۱۱-۴-۱- بافر TBE ۵ X ۴۵
۲-۱۱-۴-۲- محلول ذخیره ی اتیدیوم بروماید ۴۵
۲-۱۱-۴-۳- مارکر اندازه DNA ۴۶

عنوان **صفحه**

۲-۱۱-۴-۴- بافر بارگذاری ۴۶
۲-۱۱-۵- مراحل الکتروفورز DNA ۴۷
۲-۱۲- یافتن کلونی‌های EPEC ۴۹
۲-۱۳- بررسی حضور سویه‌های تیپیک EPEC در بین سویه‌های EPEC جداسازی شده ۴۹
۲-۱۴- آزمایشات بیوشیمیایی ۴۹
۲-۱۴-۱- تست اوره آز ۴۹
۲-۱۴-۱-۱- تهیه‌ی محیط کشت اوره ۵۰
۲-۱۴-۲- تست احیای نیترات ۵۰
۲-۱۴-۲-۱- تهیه‌ی محیط کشت نیترات ۵۱
۲-۱۴-۳- تست تریپل شوگر آیرون آگار ۵۱
۲-۱۴-۴- تست IMVIC(تست ایمویک) ۵۲
۲-۱۵- کنترل کیفی محیط‌ها و مواد مورد استفاده ۵۴
۲-۱۶- سنجش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ۵۴
۲-۱۶-۱- سنجش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش Kirby-Bauer ۵۴

فصل سوم:نتایج ۵۷
۳-۱- سوش‌های جداسازی شده با روش PCR ۵۸
۳-۲- مقایسه نمونه‌های PCR حاصل از استخراج به روش فنل-کلروفرم و جوشاندن ۵۹
۳-۳- نتایج تنظیم PCR ۶۰
۳-۳-۱- تنظیم PCR برای ژن *eaeA* ۶۰
۳-۳-۱- تنظیم PCR برای ژن *bfpA* ۶۱
۳-۳-۵- تنظیم PCR برای۴ ژن ۶۲
۳-۴- سنجش میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها ۶۴

فصل چهارم: بحث ۶۹
پیشنهادات ۷۶
فهرست منابع ۷۷

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱). خصوصیات اشرشیاکلی‌های مولد اسهال ۵

جدول (۲-۱). مواد و محلول‌های به کار رفته در این تحقیق ۲۷

جدول (۲-۲). وسایل و دستگاه‌های به کار رفته در این تحقیق ۲۸

جدول (۲-۳). محیط کشت‌های به کار رفته در این تحقیق ۲۹

جدول (۲-۴). سوش‌های کنترل مثبت ۳۲

جدول (۲-۵). محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز استخراج DNA در روش فنل-کلروفرم ۳۶

جدول (۲-۶). مشخصات پرایمر ژن *eaeA* ۳۹

جدول (۲-۷). برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *eae A* ۳۹

جدول (۲-۸). مواد واکنش PCR ژن *eae A* ۴۰

جدول (۲-۹). مشخصات پرایمر ژن *stx1* ۴۰

جدول (۲-۱۰). برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *stx1* ۴۱

جدول (۲-۱۱). مواد واکنش PCR ژن *stx1* ۴۱

جدول (۲-۱۲). مشخصات پرایمر ژن *stx2* ۴۲

جدول (۲-۱۳). برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *stx2* ۴۲

جدول (۲-۱۴). مواد واکنش PCR ژن *stx2* ۴۳

جدول (۲-۱۵). مشخصات پرایمر ژن *bfpA* ۴۳

جدول (۲-۱۶). برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *bfpA* ۴۴

جدول (۲-۱۷). مواد واکنش PCR ژن *bfpA* ۴۴

جدول (۲-۱۸). مواد و محلول‌های مورد نیاز برای ژل الکتروفورز ۴۵

جدول (۲-۱۹). تست‌های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی *E.coli* ۵۴

جدول (۲-۲۰). تهیه‌ی استاندارد نیم مک فارلند ۵۵

جدول (۳-۱). درصد فراوانی نمونه‌های سبزی آلوده به EPEC ۵۸

جدول (۳-۲). درصد فراوانی انواع سویه‌های EPEC ۵۸

جدول (۳-۳) میزان حساسیت سویه‌های EPECجدا شده از سبزیجات ۶۴

جدول (۳-۴). نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های جدا شده از ریحان ۶۵

جدول (۳-۵). نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های جدا شده از اسفناج ۶۶

جدول (۳-۶). نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌های جدا شده از سبزیجات ۶۷
جدول (۳-۷). پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده..... ۶۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱). شکل شماتیک از خوشه‌ی ژنی *bfpA*..... ۱۰
شکل (۱-۲). شکل شماتیک از سازماندهی ژن‌ها در LEE..... ۱۱
شکل (۱-۳). مجموعه ی Tir– اینتیمین..... ۱۲
شکل (۱-۴). شکل شماتیک از سیستم ترشحی تیپ III..... ۱۵
شکل (۳-۱). نتایج حاصل از استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم و جوشاندن..... ۵۹
شکل (۳-۲). نتایج PCR برای ژن *eaeA*..... ۶۰
شکل (۳-۳). نتایج تنظیم PCR برای ژن *bfpA*..... ۶۱
شکل (۳-۴). نتایج تنظیم PCR برای ژن‌های *stx1* و*stx2*..... ۶۲
شکل (۳-۵). نتایج تنظیم PCR برای ۴ژن..... ۶۳

کوتاه نوشت‌ها(Abbreviations)

AA: aggregative adherence
AE: Attaching and effacing
Bfp: bundle forming pilus
CFU: Colony-forming unit
DAEC: Diffusely adherent *E.coli*
DNA:deoxyribonucleic acid
EAEC: Enteroaggregative *E.coli*
AEST1: enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1
EAF: *Escherichia coli* adherence factor
eae: EPEC attaching and effacing
Efa: EHEC factor for adherence
EHEC: Enterohaemorrahagic *E.coli*
EIEC: Enteroinvasive *E.coli*
EPEC: Eneropathogenic *E.coli*
ETEC: Enterotoxigenic *E.coli*
esc:*E.coli* secretion system
esp: *E.coli* secreted protein
EtBr: Ethidium Bromide
FAS: Fluorescent-actin staining test
g: geram
HC: Haemorrhagic colitis
HUC: Haemorrhagic uremic syndrome
HIV: Human Immunodeficiency Virus
kDa: Kilo Dalton
kbp: Kilo base
l: Litter
LA: localized adherence
LAL: localized-like adherenc
LEE: Locus of enterocyte effacement
Lif: Lymphostatin inhibitory factor
LT: Heat-labile enterotoxin
MAP: Mitochondrion–associated protein
µl: microlitre
MDa: Mega Dalton
MNEC: Meningitis-associated *E.coli*
ml: mililitter
nm: nanometer
ng: nano gram
OD: Optical Dencity
ORP: Open fram reading
Paa: Porcine attaching and effacing
PAI: Pathogenicity island*:*
PCR: Polymerase Chain Reaction
Stx: Shiga toxin
TBE: Tris-Borate-EDTA
Tir: Translocated intimin receptor
TSI: triple sugar iron agar
TTSS: Type III secretion system
UPEC: Uropathogenic *E.coli*

فصل اول:

مقدمه و اهداف پژوهش

بیماری اسهال یکی از مشکلات مهم سلامتی در سراسر جهان می باشد. سالانه ۲ میلیون نفر در اثر این بیماری در جهان جان خود را از دست می‌دهند که بیشتر آن‌ها را کودکان زیر ۵ سال، به ویژه در کشورهای درحال توسعه تشکیل می‌دهند (Clarke, Haigh et al. 2003). دامنه‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل انگل‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها از عوامل ایجاد اسهال در کودکان هستند. در این میان مصرف آب و غذای آلوده و به ویژه مصرف سبزیجات و میوه‌ی خام می‌تواند باعث انتقال باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌های بیماری‌زا به انسان شود. در سال‌های اخیر فراوانی بیماری‌های ناشی از غذا به ویژه مصرف سبزیجات و میوه‌های تازه افزایش یافته است (Ibenyassine, AitMhand et al. 2006; Chang & Chen 2003; Lync et al. 2000). در میان باکتری‌ها، اشرشیاکلی‌های مولد اسهال[۱] از شناخته‌شده‌ترین عوامل ایجادکننده‌ی اسهال در سراسر دنیا می‌باشند (Bryce, Boschi-Pinto et al. 2005; Nataro and Kaper 1998). آلودگی مواد غذایی با این بیماری‌زاهای روده‌ای به عنوان یکی از عوامل مهم بیماری‌های اسهالی در نظر گرفته می‌شود. اشرشیاکلی بیماری‌زای روده

[۱] Diarhaegenic *Escherichia.coli* (DEC)

ای[1] عامل اصلی ابتلای کودکان به اسهال در کشورهای در حال توسعه و مسئول شیوع‌های پراکنده در کشورهای صنعتی است. EPEC تاکنون از طیف گسترده‌ای از مواد غذایی جدا شده است (Carneiro, Lins et al. 2006; Abbar and Kaddar 1991).

۱-۱- اشرشیاکلی

اشرشیاکلی اولین بار در سال ۱۸۸۵ میلادی توسط تئودور اشریش تعریف گردید و Bacterium coli commune نامیده شد (Deborah Chen and Frankel 2006).

اشرشیاکلی یک گونه از جنس اشرشیا، شامل باسیل‌های گرم منفی، متحرک و بی هوازی اختیاری، در خانواده‌ی انتروباکتریاسه[2] است (Navarrete 2010; Afset 2007). این باکتری جزو فلور نرمال کولون پستانداران بوده و تنها چند ساعت بعد از تولد، در سیستم گوارش انسان و حیوانات پستاندار تکثیر شده و با این عمل نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارش ایفا می‌نماید. لازم به ذکر است که برخی از سویه‌های اشرشیاکلی با بدست آوردن عوامل ویرولانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلازمیدها، ترانسپوزون‌ها، باکتریوفاژها و لوکوس‌های بیماری‌زایی به صورت سویه‌های بیماری‌زا در می‌آیند و تا زمانی‌که این باکتری‌ها عناصر ژنتیکی کدکننده‌ی فاکتورهای ویرولانس را دریافت نکنند، به صورت همزیست باقی می‌مانند (Kaper, Nataro et al. 2004; Sixma, Kalk et al. 1993). بر اساس ظهور علائم کلینیکی، اشرشیاکلی‌های بیماری‌زا به گروه‌های مختلف تقسیم بندی می‌شوند:

۱- اشرشیاکلی‌های مولد اسهال

۲- اشرشیاکلی‌های بیماری‌زای مجاری ادراری[3]

۳- اشرشیاکلی مرتبط با مننژیت و سپتیسمی[4]

[1] Eneropathogenic *E.coli* (EPEC)
[2] Enterobactereace
[3] Uropathogenic *E.coli* (UPEC)
[4] Meningitis-associated *E.coli* (MNEC)

UPEC عفونت مجاری ادراری[1] را ایجاد می‌کند که یکی از مهم‌ترین عفونت‌های خارج روده‌ای اشرشیاکلی است. مننژیت و سپتیسمی نیز یکی دیگر از عفونت‌های خارج روده‌ای ایجاد شده توسط اشرشیاکلی است که پاتوتایپ MNEC عامل آن می‌باشد.

پاتوتایپ‌های اشرشیاکلی که در عفونت‌های خارج روده‌ای دخیل هستند، بتازگی ExPEC[2] نامیده شده‌اند (Nguyen, Le Van et al. 2005; Kaper, Nataro et al. 2004).

۱-۲- اشرشیاکلی‌های مولد اسهال

اشرشیاکلی‌های مولد اسهال بر اساس خصوصیت ویرولانس، مکانیسم بیماری‌زایی و علائم کلینیکی در ۶ دسته قرار می‌گیرند (Kaper, Nataro et al. 2004) که عبارتند از:

۱- اشرشیاکلی بیماری‌زای روده‌ای

۲- اشرشیاکلی توکسین‌زای روده‌ای[3]

۳- اشرشیاکلی مهاجم روده‌ای[4]

۴- اشرشیاکلی خونریزی دهنده‌ی روده‌ای[5]

۵- اشرشیاکلی لانه گزین روده‌ای[6]

۶- اشرشیاکلی با چسبندگی پراکنده[7]

ETEC عامل اسهال حاد کودکان زیر ۵ سال و اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است (Al-Gallas, Abbassi et al. 2007). سویه‌های ETEC در روده‌ی کوچک بدون تهاجم تکثیر شده

[1] Urinary tract infections(UTIs)
[2] Extrapathogenic *E.coli* (ExPEC)
[3] Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)
[4] Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)
[5] Enterohaemorrahagic *E.coli* (EHEC)
[6] Enteroaggregative *E.coli*(EAEC)
[7] Diffusely adherent *E.coli* (DAEC)

و یک یا هر دو انتروتوکسین حساس[1] و مقاوم[2] به حرارت را تولید می‌کنند (Muza-Moons, Koutsouris et al. 2003).

سویه‌های EIEC از نظر خصوصیات ظاهری و بیماری‌زایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می‌شوند (Donnenberg and Whittam. 2001). EIEC یک بیماری‌زای داخل سلولی حقیقی است که قادر به هجوم و همانندسازی در سلول‌های اپی‌تلیال و ماکروفاژهاست (Nataro and Kaper. 1998).

EHEC یکی از عوامل اسهال ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته است. عفونت EHEC با اسهال آبکی آغاز شده و در موارد پیشرفته‌تر ممکن است به کولیت هموراژیک یا سندروم اورمی همولیتیک تبدیل شود. این پاتوتایپ، تولیدکننده‌ی انتروتوکسین‌های شبه شیگا یا وروتوکسین است (Kaur, Chakraborti et al.2010).

EAEC یک بیماری‌زای نوظهور با شیوع روز افزون است و در ارتباط با اسهال مزمن در کودکان و بزرگسالان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد. این سویه‌ها الگوی اتصالی آجر-انباشته[3] را بر روی سلول‌های HeLa یا HEp-2 نشان می‌دهند (Kaper, Nataro et al. 2004; Kaur, Chakraborti, et al. 2010).

DAEC یک گروه ناهمگون است که الگوی اتصال پراکنده[4] را بر روی کشت سلول های HEp-2 یا HeLa ایجاد می‌کنند و در ارتباط با اسهال آبکی در کودکان هم در کشورهای توسعه یافته و هم در حال توسعه می‌باشند. در برخی از موارد امکان تبدیل به اسهال مزمن هم وجود دارد (Kaur, Chakraborti, et al. 2010; Jafari, Aslani et al. 2012).

خصوصیات مربوط به هرکدام از این پاتوتایپ‌ها در جدول ۱-۱ آورده شده است، اما در بخش بعدی به تفصیل به خصوصیات مربوط به EPEC می‌پردازیم:

[1] Heat-labile enterotoxin (ST)
[2] Heat-Stable enterotoxin (LT)
[3] Stacked-brick
[4] Diffuse adherence (DA)

جدول (۱-۱). خصوصیات اشرشیاکلی‌های بیماری‌زا برگرفته از (Navarrete 2010)

پاتوتایپ	فاکتورهای ویرولانس	ساختار / جایگاه	تظاهرات بالینی
Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)	آنتی ژن‌های فاکتور کلونیزاسیون /(CFA) آنتی ژن‌های سطحی(CS) انتروتوکسین مقاوم به حرارت (STa,STb) انتروتوکسین حساس به حرارت (LT)	فیمبریه/پلازمید توکسین مونومریک/ پلازمید توکسین A/B5/ پلازمید	اسهال آبکی، استفراغ، اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه و اسهال مسافرتی در تمام سنین.
Enteropathogenic *E.coli* (EPEC)	جزایر بیماری‌زایی LEE: سیستم ترشحی تیپ III، اینتیمین، Tir، EspA، EspB، EspC، EspD، EspH،EspF پلازمید فاکتور چسبندگی (EAF): پیلی تشکیل دهنده‌ی غلاف (BFP) تنظیم کننده‌ی کد شده توسط پلازمید (Per) توکسین کلاسیک تولید نمی‌کند.	LEE بر روی کروموزوم پلازمیدهای EAF	اسهال آبکی تا خونی، گه گاه منجر به اسهال مزمن می گردد. نوع کلاسیک منجر به اسهال اندمیک تا اپیدمیک در کودکان می شود.
Enteroaggregative *E.coli* (EAEC)	فیمبریای اتصال توده‌ای (AAFs) توکسین‌ها (pic,ShEt1,EAST,Pet,EspP)، دیسپرسین، فلاژلین، ریگولون aggR	فیمبریه /پلازمید توکسین مونومریک/ پلازمید	اسهال آبکی موکوئیدی، نوع کلاسیک در ارتباط با اسهال مزمن است. دومین عامل اسهال مسافرتی، عامل اسهال مرتبط با AIDS.
Enterohemorragic *E.coli* (EHEC)	<u>جزایر بیماری‌زایی LEE</u>: سیستم ترشحی تیپ III، اینتیمین، Tir، EspA، EspB، EspC، EspD، EspH،EspF ادهزین مهار/ فعال سازی لنفوسیت (LifA/Efa) وروتوکسین ها: vt1 و vt2 انتروهمولیزین (EHEC-Hly) سرین پروتئاز (EspP)	LEE بر روی کروموزوم پروتئین های ترشحی/پلازمید توکسین AB/ پروفاژ/کروموزوم/ پلازمید	اسهال آبکی تا خونی، ایجادکننده‌ی سندروم اورمی همولیتیک و کولیت هموراژیک.
Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)	سیستم ترشحی تیپ III، پلازمید تهاجم (pInv) ,IpgD, IpaH ,IpaC, IpaB ,IpaA, IscA, توکسین ها (ShET1,ShET2) سرین پروتئاز (SepA)	پروتئین های ترشحی/پلازمید pInv پروتئین های ترشحی/پلازمید	اسهال آبکی و خونی که منجر به دیسانتری باسیلی می شود.
Diffusly adheren *E.coli* (DAEC)	خانواده‌ی ادهزین های Dr ادهزین فیمبریایی F1845	توکسین مونومریک/پلازمید فیمبریه/پلازمید	اسهال آبکی، ایجاد بیماری‌های التهابی روده، عفونت دستگاه ادراری

۱-۳- اشرشیاکلی بیماری‌زای روده‌ای

۱-۳-۱- تاریخچه و نام‌گذاری

EPEC نخستین پاتوتایپ شناخته شده از اشرشیاکلی است. شیوع‌هایی از اسهال کودکان که در دهه‌های ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ میلادی در اروپا و آمریکای شمالی به وقوع پیوستند، منجر به شناسایی اشرشیاکلی به عنوان عامل اسهال تابستانی در کودکان شد (Deborah Chen and Frankel 2006). در سال ۱۹۵۵ میلادی اصطلاح اشرشیاکلی بیماری‌زای روده‌ای توسط Neter برای آن دسته از سروتیپ های اشرشیاکلی که بیماری‌زای روده‌ای بوده و به ندرت از مدفوع افراد سالم جدا می‌شدند به کار رفت (Knutton, Baldwin et al. 1993; Neter, Westphal et al. 1955).

در سال ۱۹۷۸ میلادی، سازمان جهانی بهداشت شایع‌ترین گروه‌های سرولوژیکی EPEC که عامل اصلی اسهال در انسان شناخته شده‌اند، شامل O26، O55، O86، O111، O114، O119، O125، O126، O127، O128، O148 و O158 را معرفی کرد (Nguyen, Le Van et al. 2005; Trabulsi, Keller et al. 2002).

امروزه سویه‌های EPEC به عنوان اشرشیاکلی‌های مولد اسهالی تعریف می‌شوند که توانایی ایجاد آسیب بافتی که آسیب بافتی چسبیدن و زدودن[1] نامیده می‌شود را در اپی‌تلیوم روده‌ای داشته باشند و به علاوه قادر به تولید شیگا توکسین نیز نباشند.

در سال ۱۹۹۵ میلادی این سویه‌ها به دو دسته مجزا تقسیم شدند:

I. سویه‌های EPEC تیپیک[2]: سویه‌هایی از EPEC که دارای پلازمید فاکتور چسبندگی EPEC[3] هستند.

II. سویه‌های EPEC غیرتیپیک[4]: سویه‌هایی از EPEC که فاقد پلازمید EAF می‌باشند (Deborah Chen and Frankel 2006; Nataro and Kaper 1998).

[1] Attaching and Effacing lesion (A/E)
[2] Typical
[3] EPEC adherence factor (EAF)
[4] Atypical

۱-۳-۲- تظاهرات بالینی

عفونت EPEC اغلب باعث ایجاد اسهال حاد می‌گردد (Nataro and Kaper 1998; Levine and Edelman 1984) و معمولاً بین ۵ تا ۱۵ روز طول می‌کشد (Hill, Phillips et al. 1991)، اما دیده شده است که در برخی از موارد بیماری به شکل مزمن در می‌آید (Levine and Edelman 1984). اسهال آبکی و گاه خونی، استفراغ و تب پایین از علائم عمومی عفونت EPEC می‌باشند. اتساع شکم، عدم تحمل غذا، از دست دادن آب بدن و کاهش وزن نیز گزارش شده است. عفونت گاه می‌تواند شدید بوده و منجر به مرگ گردد (Obiso, Lyerly et al. 1995; Lee, Gwack et al. 2012).

۱-۳-۳- واکنش های بیماری‌زا و میزبان

برای سال‌ها مکانیسمی که EPEC توسط آن ایجاد بیماری می‌کرد، ناشناخته بود. اما از سال ۱۹۷۹ میلادی شواهد زیادی برای فهم مکانیسم بیماری‌زایی آن فراهم شده است، به طوری که امروزه یکی از شناخته‌شده‌ترین بیماری‌زاهای اشرشیاکلی است (Kaper, Nataro et al. 2004).

۱-۳-۳-۱- آسیب بافتی A/E

خصوصیت بارز بیماری‌زایی EPEC آسیب بافتی (A/E) است. باکتری‌ها در ابتدا به سلول‌های اپی‌تلیال روده متصل می‌شوند. میکروویلی‌ها به صورت موضعی پاک شده و ساختارهای پدستال فنجان مانند شکل می‌گیرند که در آن‌ها باکتری‌ها، بالای سطح اپی‌تلیال قرار می‌گیرند. تغییرات قابل توجه اسکلت سلولی شامل تجمع اکتین پلیمریزه شده و سایر عناصر اسکلت سلولی نیز مستقیماً در زیر باکتری‌های متصل شده مشاهده می‌گردد (Kaper, Nataro et al. 2004; Deborah Chen and Frankel . 2006; Kelly, Prasannan et al. 1999). آسیب A/E علاوه بر EPEC، در EHEC،

برخی از سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از خرگوش[1]، خوک[2]، سیتروباکتر رودنتیوم[3] عامل هایپرپلازی در موش و اشرشیا آلبرتی[4] مولد اسهال نیز ایجاد می‌شود. بنابراین سویه‌های EPEC یک پروتوتایپ از یک خانواده‌ی کامل از بیماری‌زاهای روده‌ای هستند که قادر به ایجاد آسیب A/E می‌باشند (Afset 2007 ; Clarke, Haigh et al. 2003).

در گذشته تشخیص آسیب A/E تنها از طریق میکروسکوپ الکترونی میسر بود، اما امروزه روش رنگ آمیزی فلورسنت اکتین[5] مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش اکتین رشته‌ای تجمع یافته در زیر باکتری‌های چسبیده را با استفاده از فالوئیدین نشان دار شده با فلورسین شناسایی می‌کند. این تست پایه‌ی یک تست تشخیصی ساده و بسیار اختصاصی برای EPEC و سایر ارگانیسم‌هایی است که باعث چنین آسیب بافتی می‌شوند (Knutton, Phillips et al. 1991; Rosenshine, Ruschkowski et al. 1996).

۱-۳-۳-۲- چسبندگی موضعی[6]

یک خصوصیت مهم EPEC که در سویه‌های تیپیک دیده می‌شود، توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال به شکل میکروکلونی‌های سه بعدی است که الگوی LA نامیده می‌شود (Clarke, Haigh et al. 2003). در این مرحله باکتری‌ها به وسیله‌ی اتصالات ابتدایی و نسبتاً ناپایدار و به صورت موضعی به انتروسیت‌ها متصل می‌شوند. این اتصالات اولیه به واسطه‌ی پیلی تشکیل دهنده‌ی غلاف[7] ایجاد می‌شود که ژن‌های تولید کننده‌ی آن بر روی پلازمید EAF قرار دارند (Giron, Ho et al. 1991; Tobe, Hayashi et al. 1999).

[1] Rabbit pathogenic *E. coli* (REPEC)
[2] Pork pathogenic *E. coli* (PEPEC)
[3] *Citrobacter rodentium*
[4] *E.albertii*
[5] Fluorescent Actin Staining (FAS)
[6] Localised adherence (LA)
[7] Bundle forming pili (BFP)