بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا(س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی - گرایش میکروبیولوژی

عنوان

تعیین فراوانی، ژنوتیپ و پروفایل مولکولی اشریشیاکلی شیگاتوکسیژنیک از نمونه های سبزی جمع آوری شده در تهران

استاد راهنما

دکتر سیاوش سلمان زاده اهرابی

استاد مشاور

دکتر طاهره فلسفی

دانشجو

فاطمه محمدپور قاضی

اسفند 1388

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به

دانشگاه الزهرا (س) است.

تلاشی را که برای تحقق این نا چیز متحمل شدم ؛

به مادر دلسوزم، پدر مهربانم ،همسر فرهیخته ام

و دختر نازنینم، بهار

تقدیم می کنم

تشکر و قدردانی

خداوند را سپاس می گویم که با تمام کاستی های وجودم و تمام ضعفهای روح و جسمم مرا یاری کرد تا تلاشی را که با علاقه و انگیزه آغاز کرده بودم با موفقیت به پایان برسانم و سختی های مسیر مرا دلسرد و مایوس نسازد.

بر خود لازم می دانم که از مسئولین محترم گروه زیست شناسی تشکر کرده و برایشان توفیق روز افزون آرزو کنم.

از جناب استاد دکتر سلمان زاده که با راهنمایی های ارزشمند و دقیق و زحمات بی دریغ خود از سختی های راه کاستند، تشکر ویژه می کنم.

همینطور از سرکار خانم دکتر فلسفی به دلیل پیشنهادات مدبرانه شان که حقیقتا در کنار راهنمایی استاد راهنما، کارگشا بود قدردانی می نمایم.

برای هر دو عزیز سلامتی و طول عمر از درگاه خداوند متعال آرزو دارم.

چکیده :

E.coli تولید کننده توکسین شیگا (STEC) ، می تواند موجب اسهال خونی شود که در 2-15% موارد، به خصوص در کودکان ، موجب ایجاد سندرم (HUS) می شود و می تواند موجبات نارسایی کلیوی و حتی مرگ را فراهم آورد . در % 90 موارد اسهال خونی که به HUS منجر شده، STEC نقش داشته است. در کشور ما ،گوشت گاو به عنوان اصلی ترین منبع برای STEC مطرح شده است(Salmanzadeh .A.S.2009).

در این مطالعه از روش های مولکولی (PCR) استفاده شده تا تعیین شود آیا سبزیجات تازه را می توان به عنوان منبع بالقوه STEC در تهران در نظر گرفت یا خیر .طبق داده های این پژوهش ، میزان شیوع STEC در سبزیجات تازه تهران شامل جعفری و تره 12/8% می باشد.

طبق این تحقیق24 % سویه ها *stx2*، 24 % سویه ها *stx1* ، 36 % سویه ها دارای هر دو ژن *stx1* و *stx2*، 15% موارد دارای ژن *O157* و vt2 را بودند. همه سویه ها فاقد *H7* و *eae* بوده اند. تست حساسیت به آنتی بیوتیک ها ، بر روی همه ایزوله های غیر O157 صورت گرفت . در نهایت همه سویه ها برای دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و تتراسیکلین مقاوم بودند.

MIC برای سویه های STEC-O157 با استفاده از 4 آنتی بیوتیک انجام شد . همه سویه ها به آمپی سیلین و تتراسیکلین مقاوم بودند.

در نهایت بر اساس این مطالعه ، سبزیجات تازه تهران را می توان به عنوان منبع بالقوه STEC در تهران درنظرگرفت.

کلمات کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، STEC، PCR، *E.coli*، O157، پروفایل مولکولی، سبزیجات.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فهرست جداول ..... و
فهرست اشکال ..... ح
فصل اول
کلیات و مقدمات ۱
۱-۱ نقش میکروب ها در ایجاد بیماری های غذایی ۲
۱-۲ بیماری هایی ناشی از مواد غذایی و اهمیت آن ها ۲
۱-۳ انواع بیماری زای اشریشیا کلی ۴
۱-۴ علایم بیماری گروه EPEC و مکانیسم بیماری زایی ۴
۱- ۵ علایم بیماری زایی ETEC و مکانیسم بیماری زایی ۶
۱-۶ علایم بیماری گروه EIEC و مکانیسم بیماری زایی ۶
۱-۷ علایم بیماری گروه EAggEC و مکانیسم بیماری زایی ۷
۱- ۸ *E.coli* مولد توکسین شیگا (STEC) ۸
۱- ۸- ۱ منشا ۸
۱-۸- ۲ یافته های بالینی بیماری های ناشی از STEC در انسان ۱۱
۱-۸- ۳ اپیدمیولوژی STEC ۱۲
۱-۸ - ۴ عفونت های ناشی از STEC بیماری زا ۱۳
۱-۸-۵ منابع بیماری ناشی از STEC ۱۴
۱-۸ -۶ منابع آلودگی غیر از غذا ۱۵
۱-۸-۶-۱ آلودگی از طریق آب ها ۱۵
۱-۸-۶-۲ آلودگی از طریق عمل آوری مواد غذایی ۱۵
۱-۸-۷ منابع آلودگی میکروبی غذا ۱۵
۱-۸-۷-۱ آلودگی های میکروبی حیوانات ۱۵

۱-۸-۷-۲ آلودگی از طریق فاضلاب ها ۱۶
۱-۸-۷-۳ آلودگی از طریق خاک ۱۶
۱-۸-۸ فاکتورهای بیماری زایی STEC و مکانیسم بیماری زایی ۱۷
۱-۸-۸-۱ شیگا توکسین (Stx) و یا وروتوکسین ها (VT) ۱۷
۱-۸-۸-۲ EASTI..... ۱۹
۱-۸-۸-۳ انتروهمولیزین ۲۰
۱-۸-۸-۴ LEE..... ۲۰
۱-۸-۸-۵ انتقال آهن ۲۰
۱-۸-۸-۶ سایر فاکتورهای ویرولانس..... ۲۱
۱-۸-۹ بیماری زایی STEC ۲۱
۱-۸-۱۰ تکامل STEC ۲۲
۱-۸-۱۱ درمان و پیشگیری ۲۳
فصل دوم
پیشینه پژوهش..... ۲۴
فصل سوم
مواد و روشها..... ۲۷
۳-۱ وسایل و دستگاه های استفاده شده ۲۸
۳-۲ مرحله ۱: جمع آوری نمونه ۳۱
۳-۳ مرحله ۲: غنی سازی ۳۱
۳-۴ مرحله ۳: کشت بر روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک ۳۲
۳-۵ مرحله ۴: ذخیره سازی ۳۲
۳-۶ مرحله ۵ : استفاده از نمونه های ذخیره شده ۳۳
۳-۷ طرح کلی از آنچه در این پژوهش صورت گرفت..... ۳۳
۳-۸ روشهای مولکولی ۳۴

۳-۸-۱ استخراج DNA ۳۴
۳-۸-۱-۱ استخراج DNA به روش جوشاندن ۳۵
۳-۸-۱-۲ استخراج DNA با روش فنل کلروفرم ۳۵
۳-۸-۱-۳ تعیین غلظت DNA ۳۷
۳-۸-۲ واکنش زنجیره ای پلیمر از PCR ۳۷
۳-۸-۲-۱ ترکیبات لازم برای انجام PCR ۳۷
۳-۸-۲-۲ مراحل مختلف PCR ۳۸
۳-۸-۲-۳ مواد و وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR ۳۹
۳-۸-۳ اختصاصات پرایمرها ۳۹
۳-۸-۳-۱ پرایمر ژن *stx1* ۳۹
۳-۸-۳-۲ پرایمر ژن *stx2* ۴۱
۳-۸-۳-۳ پرایمرهای ژن *eae* ۴۲
۳-۸-۳-۴ پرایمرهای ژن *rfbE* ۴۳
۳-۸-۳-۵ پرایمرهای ژن *flic* 7 ..... ۴۴
۳-۸-۴ معرفی سوش های استاندارد مورد استفاده ۴۵
۳-۸-۴-۱ سویه استاندارد کنترل مثبت ۴۵
۳-۸-۴-۲ سویه استاندارد کنترل منفی ۴۵
۳-۸-۵ ژل الکتروفورز برای شناسایی قطعات DNA ۴۶
۳- ۹ یافتن کلونی های STEC ۴۷
۳- ۱۰ تعیین ژنوتیپ STEC ۴۷
۳- ۱۱ آزمایشات بیوشیمیایی ۴۷
الف) محیط TSI (Triple suger iron agar) ۴۷
ب) محیط SIM ۴۸
ج) تست سیترات ۴۸

د) آزمایش MRVP ۴۸
۳-۱۲کنترل کیفی محیط ها و مواد مورد استفاده ۴۹
۳- ۱۳ سنجش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها..... ۵۰
۳-۱۳-۱ تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک به روش Kirby-Bauer ۵۰
۳-۱۳-۲ تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) ۵۲
۳-۱۳-۲-۱ مواد و وسایل مورد نیاز برای MIC)..... ۵۲
۳-۱۳-۲-۱-۱ محیط کشت آبگوشت مولر هینتون براث (MHB) ۵۲
۳-۱۳-۲-۱-۲ سرم فیزیولوژی (۸۵٪) درصد NaCl ۵۲
۳-۱۳-۲-۱-۳ تهیه محلول نیم مک فارلند ۵۳
۳-۱۳-۲-۱-۴ تهیه محلولهای ذخیره آنتی بیوتیک ۵۳
۳-۱۳-۲-۱-۵ تهیه رقت های آنتی بیوتیک ۵۴
۳-۱۴ تهیه سوسپانسیون باکتری ۵۵
۳-۱۴-۱ آماده سازی سوسپانسیون میکروبی..... ۵۵
۳-۱۴-۲ کنترل کیفی سوسپانسیون میکروبی ۵۵
۳-۱۴-۳ گرما گذاری ۵۶
۳-۱۴-۴ خواندن نتایج ۵۶
۳-۱۴-۵ کنترل کیفی آزمایش ۵۶
فصل چهارم
نتایج ۵۷
۴-۱ نتایج استخراج ۵۷
۴-۲ نتایج PCR ۵۸
۴-۲-۱ PCR برای ژن *stx1*..... ۵۸
۴-۲-۲ PCR برای ژن *stx2*..... ۵۹
۴-۲-۳ PCR برای ژن *eae*..... ۶۰

۴-۲-۴ PCR برای ژن *rfbE* ۶۰
۴-۲-۵ PCR برای ژن *flich7* ۶۱
۴-۲-۶ PCR برای ۵ ژن ۷۱
۴-۳ سویه های جداسازی شده ۶۳
۴-۴ نمونه های جداسازی شده O157 ..... ۶۳
۴-۵ نتایج حاصل از PCR نمونه های جعفری و تره ۶۴
۴-۶ تعیین ژنوتیپ سویه های STEC جدا شده از تره ۶۸
۴-۷ تعیین ژنوتیپ سویه های STEC جدا شده از جعفری ۷۰
۴-۸ سنجش میزان حساسیت به آنتی بیوتیک ها ۷۱
۴-۸-۱ سنجش میزان حساسیت به آنتی بیوتیک ها به روش Kirby – Bauer ۷۱
۴-۸-۲ نتایج بررسی میزان حسایت سویه های O157 نسبت به آنتی بیوتیک ها ۸۲
فصل پنجم
بحث و پیشنهادات ۸۳
۵-۱ تست های بیوشیمیایی و کشت ۸۴
۵-۲ غنی سازی ۸۴
۵-۳ استخراج DNA ۸۵
۵-۴ روش PCR ۸۵
۵-۵ ژنوتیپ ها ۸۷
۵-۶حساسیت به آنتی بیوتیک ها به روش انتشار دیسک ۸۷
۵-۷ حساسیت سویه های O157 به ۴ آنتی بیوتیک (به روش MIC) ۸۹
۵-۸ پیشنهادات ۸۹
فصل ششم
منابع ۹۰
چکیده انگلیسی ۱۰۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول(۱-۱) مقایسه انواع *E.coli* و خصوصیات بیماری زایی آن ها..... ۸

جدول (۳-۱) حلال پودرهای آنتی بیوتیکی ۳۰

جدول (۳-۲) مشخصات پرایمر ژن *stx1* درSTEC..... ۳۹

جدول (۳-۳) برنامه دستگاه برای انجام PCR ژن *stx1* در STEC..... ۴۰

جدول (۳-۴) مواد واکنش PCR ژن *stx1* ۴۰

جدول (۳-۵) مشخصات پرایمر ژن *stx2*..... ۴۱

جدول (۳-۶) برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *stx2* ۴۲

جدول (۳-۷) مواد واکنش جهت بررسی حضور ژن *stx2* در *STEC*..... ۴۲

جدول(۳-۸)مشخصات پرایمر ژن *eae* ۴۲

جدول (۳-۹) برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن*eae* ۴۳

جدول(۳-۱۰)مشخصات پرایمر ژن O157 در STEC..... ۴۳

جدول (۳-۱۱) برنامه دستگاه جهت انجام PCR ژن *O157* ۴۴

جدول (۳-۱۲) مشخصات پرایمر ژن *flic7* ۴۴

جدول(۳-۱۳) سوشهای کنترل مثبت..... ۴۵

جدول (۳-۱۴) سوشهای کنترل منفی ۴۵

جدول (۳-۱۵) تستهای بیوشیمیایی لازم برای شناسایی *E.coli*..... ۴۹

جدول (۳-۱۶) تهیه استانداردهای مک فازلند..... ۵۱

جدول (۳-۱۷) potency آنتی بیوتیک ها..... ۵۴

جدول(۴-۱) نمونه های STEC جدا سازی شده از سبزیجات تهران و ژنوتیپ آنها..... ۶۳
جدول (۴-۲) نمونه های جداسازی شده O157..... ۶۳
جدول (۴-۳) نتیجه PCR سویه های جدا شده STEC از تره ۶۴
جدول (۴-۴) نتیجه PCR سویه های جدا شده از جعفری..... ۶۶
جدول (۴-۵) ژنوتیپ سویه های جدا شده از تره ۶۸
جدول (۴-۶) ژنوتیپ سویه های جدا شده STEC از جعفری ۷۰
جدول (۴-۷) میزان حساسیت سویه های STEC جدا شده از تره به آنتی بیوتیک های استرپتومایسین ، تتراسیکلین ، کانامایسین ، آمیکاسین و کلرامفنیکل ، به روش انتشار دیسک..... ۷۲
جدول (۴-۸) میزان حساسیت سویه های STEC جدا شده از تره به آنتی بیوتیک های نور فلوکساسین ، جنتامیسین ، سفتازیدیم ، سفتریاکسون و آمپی سیلین ، به روش انتشار دیسک ۷۳
جدول(۴ - ۹) نتایج آنتی بیوگرام سویه های جداسازی شده از تره با استفاده از روش انتشار دیسک بر حسب درصد..... ۷۴
جدول (۴-۱۰) میزان حساسیت سویه های STEC جدا شده از جعفری به آنتی بیوتیک های استرتپومایسین ، تتراسیکلین ، کاناما یسین ، آمیکاسین و کلرآمفنیکل ، به روش انتشار دیسک..... ۷۶
جدول (۴-۱۱) میزان حساسیت سویه های STEC جدا شده از جعفری به آنتی بیوتیک های نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، سفتازیدیم ، سفتریاکسون و آمپی سیلین ، به روش انتشار دیسک ۷۷
جدول(۴-۱۲) نتایج آنتی بیوگرام سویه های جداسازی شده از جعفری با استفاده از روش انتشار دیسک بر حسب درصد..... ۷۸
جدول(۴-۱۳) نتایج آنتی بیوگرام سویه های جداسازی شده ازمجموع نمونه های جعفری و تره با استفاده از روش انتشار دیسک بر حسب درصد ۸۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل (۴-۱) نتایج حاصل از جوشاندن و فنل کلروفرم ۵۸

شکل (۴-۲) نتایج PCR برای ژن vt_1 ..... ۵۹

شکل (۴-۳) نتایج PCR برای ژن vt_2 ..... ۵۹

شکل (۴-۴) نتایج PCR برای ژن *eae* ۶۰

شکل (۴-۵) نتایج PCR برای ژن *rfb* ۶۰

شکل (۴-۶) نتایج pcr برای ژن h_7 ..... ۶۱

شکل (۴-۷) نتایج pcr برای ۵ ژن مورد بررسی ۶۲

هیستوگرام (۴-۱).درصد فراوانی ژن های مختلف در جداسازی شده از تره..... ۶۵

هیستوگرام(۴-۲).درصد فراوانی ژن های مختلف در سویه های جداسازی شده از جعفری. ۶۷

هیستوگرام (۴-۳). درصد فراوانی ژنوتیپ های مختلف در سویه های جداسازی شده از تره..... ۶۹

هیستوگرام (۴-۴).درصد فراوانی ژنوتیپ های مختلف در سویه های جداسازی شده از جعفری. ۷۱

هیستوگرام(۴-۵). درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده از تره، به روش انتشار دیسک. ۷۵

هیستوگرام(۴-۶). درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده از جعفری، به روش انتشار دیسک. ۷۹

هیستوگرام(۴-۷). درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده از مجموع نمونه های تره و جعفری، به روش انتشار دیسک. ۸۱

هیستوگرام(۴-۸) .نتایج MIC برای چهار سویه O157 . ..... ۸۲

فصل اول

کلیات و پیشگفتار

1- 1 نقش باکتری ها در ایجاد بیماری های غذایی

باکتری ها مسئول بروز بخش وسیعی از مسمومیت های غذایی می باشند. بسیاری از باکتری ها در گذشته عامل مسمومیت غذایی محسوب نمی شدند و اخیرا تحت عنوان باکتری های بیماری زای پنهان شناسایی شده اند که اهمیت آن ها در ایجاد مسمومیت های غذایی روز به روز بیشتر می شود. خصوصا این که بعضی از این میکروب ها قادرند تحت شرایط یخچالی و محیط با اکسیژن کم زنده مانده و یا رشد نمایند و بعضی نیز حتی با تعداد کم قادر به ایجاد بیماری می باشند و این زنگ خطری جدی برای سلامتی مصرف کنندگان مواد غذایی می باشد.(رضویلر ، 1381)

طبق بررسی Center for Disease Control (CDC) در آمریکا در طول 5 سال ، 77 درصد مسمومیت های غذایی از منبع مواد غذایی سرویس های عمومی در رستوران ها، 20 درصد از منبع منازل و تنها 3 درصد از منبع غذایی تجاری (کارخانه ها) ناشی می گردد، با اینکه کارخانه های مواد غذایی معیارهای کنترل مطمئن و لازم را در تهیه مواد غذای سالم و بهداشتی به کار می برند. این تا موقعی است که محصول به دست مصرف کننده می رسد. لذا تمام کسانی که در دستکاری و فرآیند این فراورده ها درگیر هستند و یا مصرف کننده اند، مسئولیت نگهداری غذا در شرایط بهداشتی را تا موقع مصرف به عهده داشته و هر گونه تخطی از معیارهای خاص کنترل غذا مثل نگهداری در شرایط غلط دمایی و زمانی و تغییر ماهیت آن و غیره ممکن است باعث رشد و یا تولید سم میکروب های بیماری زای موجود در غذا گردد.

2-1 بیماری هایی ناشی از مواد غذایی و اهمیت آن ها

در طول دهه گذشته وقوع بیماری هایی میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه و با استاندارد بهداشتی پایین ، بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است و این در حالی است که وقوع عفونت ها و

مسمومیت های غذایی اغلب گزارش نشده باقی مانده و لذا تعیین آمار دقیق از میزان ابتلا خصوصا در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نمی باشد.

غذا می تواند به عنوان یک حامل ، بسیاری از اجرام عفونی و غیر عفونی را در خود حمل کند که در بعضی شرایط رشد جرم عفونی را زیاد کرده و به عنوان ناقل فعال عمل نموده و یا تنها نقش ناقل غیرفعال را ایفا نماید که در این صورت عامل عفونت در غذا رشد ننموده و تنها به وسیله غذا به انسان منتقل می شود . ویروس ها، انگل ها و حتی برخی از باکتری های بیماری زای غذایی نیز، در گروه دوم قرار می گیرند.(رضویلر ،1381)

بیماری های غذایی از نظر تقسیم بندی جزء بیماری های روده ای تقسیم بندی می شوند که از نظر اهمیت در آمریکا بعد از بیماری های ریوی در مقام دوم قرار دارد. در یک بررسی در ایالات متحده گزارش شده که به طور متوسط هر آمریکایی حداقل هر سال یک بار به بیماری های روده ای و اسهال مبتلا می شود. گفته می شود که این مسئله به خاطر ناسالم بودن غذای تولید شده در این کشور نیست، بلکه مردم با عمل آوری غلط و غیر بهداشتی و یا از طریق انتقال اجرام، خود غذا را ناسالم می کنند.

E.coli عموما به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می شود. باکتری به عنوان عضو خانواده آنتروباکتریاسه خصوصیات عمومی این خانواده را دارا می باشد. بر خلاف سالمونلا و شیگلا ، اغلب اشریشیا ها اسید و گاز تولید می کنند . به هر حال این خصوصیات ممکن است در اثر موتاسیون از بین بروند(Cerqueira A., 1997) .

جنس *Escherichia* شامل 6 گونه *E.coli* ، *E.adecarboxylata* ، *E. fergusonii* ، *E.hermanii* ، *E.vulneris* و *E.blattae* می باشد. به استثنای *E.blattae* سایر گونه ها از نمونه های کلینیکی جدا شده اند. اشریشیاکلی ، باکتری بسیار نزدیک به شیگلاست .

E.coli باکتری بی هوازی اختیاری بسیار شایع در روده حیوان و انسان است. به همین علت نقش مهمی را در میکروب شناسی آب و غذا، به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی به عهده دارد .

3-1 انواع بیماری زای اشریشیاکلی

E.coli بیماری زای روده ای ، عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه و همچنین مکان هایی با سطح پایین بهداشت می باشد. پنج تحت گروه *E.coli* عامل اسهال در انسان شناخته شده است. که عبارتند از :

1-تحت گروه اشریشیا کلی بیماری زای روده ای یا تحت گروه EPEC(Enteropathogenic *E.coli*) .

2-تحت گروه اشریشیا کلی توکسین زای روده ای یا تحت گروه ETEC (Enterotoxigenic *E.coli*) .

3-تحت گروه اشریشیا کلی مهاجم روده ای یا تحت گروه EIEC (Enteroinvasive *E.coli*) .

4-تحت گروه اشریشیاکلی خونریزی دهنده روده ای یا تحت گروه EHEC (Enterohaemarnhagic *E.coli)*

5-تحت گروه اشریشیاکلی توده ای روده ای یا تحت گروه EAggEC(Enteroaggregatine *E.coli*) .

6- تحت گروه اشرشیاکلی چسبنده منتشر یا تحت گروه DAEC (Diffusely adherent *E.*coli)

4-1 علایم بیماری گروه EPEC و مکانیسم بیماری زایی

این گروه مسئول بسیاری از بیماری های اسهالی کودکان است. در این حالت، شدت علایم بیماری از بی نهایت ملایم که بدون تشخیص می ماند تا نوع شدید و تهدید کننده

زندگی متغیر است. دوره کمون بیماری 36-12 ساعت می باشد. این باکتری شیگا توکسین تولید نمی کند. اتصـــــال آن به سلول های اپیتلـــــیال روده از طـــریق BFP(Bundle forming pilus) ، که نوعی فیمبریه تیپ IV است صورت می گیرد. این فیمبریه توسط پلاسمید فاکتور اتصال بزرگ EPEC (EAF) کد می شود .
(Nataro J., et al, 1992) . (Donnenberg M., et al 2001)

همچنین EPEC توکسین بزرگی را تولید می کند که از فعالیت لنفوسیت ها ممانعت می کند. سوشهای EPEC خوشه های سه بعدی فشرده ای را بر سطح سلول های یوکاریوت ایجاد می کنند که اتصالات لوکالیزه نامیده می شوند. پس از اتصال به سلول اپتلیال روده ، ژن های کروموزومی واقع در منطقه 35 کیلو بازی که LEE نامیده می شود ، فعال می گردند . LEE شامل 41 ژن است که پروتئین های سیستم ترشحی تیپ III را کد می کنند (Nataro J., et al, 1992) . Tir که رسپتور فاکتور intimin می باشد، از طریق سیستم ترشحی تیپ III به غشای پلاسمایی سلول میزبان منتقل می گردد.

Intimin یک پروتئین غشای خارجی باکتری است که وزن آن 97-94 کیلو دالتون بوده و توسط ژن *eae* کد می شود. ژن *eae* در LEE واقع است.
پروتئین های ترشح شده از *E.coli* (ESPA / ESP B / ESP D) که ژن آن ها در منطقه LEE واقع است نیز از طریق سیستم ترشحی تیپ III ، Tir را به غشای سلول میزبان منتقل می کنند. Tir در EPEC برای انتقال به سلول میزبان در یکی از تیروزین های خود فسفریله است (Nataro J.,et al., 1992) .

نقش کامل ESP هنوز دقیقا مشخص نشده است (Donnenberg M., et al.,2001). اتصال منجر به تجمع فیلامنت های اکتین شده و در نهایت باعث اتصال کامل باکتری به سلول میزبان می گردد. غلظت کلسیم داخل سلولی بالا می رود و فرآیندهای دیگر پس از آن، که همگی منجر به اسهال حاد می شوند (Donnenberg M., et al.,2001) .

1- 5 علایم بیماری زایی ETEC و مکانیسم بیماری زایی

سویه های ETEC سبب بیماری اسهال مسافرتی و اسهال در نوزادان به خصوص در کشورهای توسعه یافته می باشند . اما این گروه با همه گیری های بیماری های ناشی از غذا نیز مرتبطند (Daniels N.,et al., 2000).

بیشتر سویه های مولد اسهال جدا شده از گوشت گاو به گروه ETEC تعلق دارند. سویه های ETEC از طریق آنتی ژن های فاکتور کولونیزاسیون (CFA) به سلول های اپیلتیال ژژونوم و ایلئوم متصل می شوند (Donnenberg M., et al.,2000) .

ادهسین های ETEC برای سلول میزبان اختصاصی می باشند. علایم عفونت با ETEC از طریق تولید 2 نوع انتروتوکسین ایجاد می شود : انتروتوکسین مقاوم در برابر حرارت (ST) و انتروتوکسین حساس در برابر حرارت (LT) . ST ها توکسین های کوچک و مونومری هستند که توسط پلاسمید کد می شوند و شامل دو زیر گروه می باشند : STa , STb .

LT ها توکسین هایی بزرگ و چند واحدی هستند که به دو گروه عمده تقسیم بندی می شوند :

LT-I , LT – II . LT-I با توکسین وبا مرتبط است. سویه های ETEC می توانند دارای ST ، LT یا هر دو باشند. STa سطح cGMP را در سلول افزایش می دهد که منجر به ترشح مایعات به خارج از سلول می گردد. LT منجر به کاهش جذب سدیم شده و در نهایت اسهال ایجاد می کند . مشخصه ETEC ایجاد اسهال آبکی می باشد.

1-6 علایم بیماری گروه EIEC و مکانیسم بیماری زایی

EIEC سبب اسهال خونی – بلغمی و شبیه شیگلاست که بسیاری از مکانیسم های بیماری زایی آن شبیه به شیگلا دیسانتری است (Donnenberg M., et al.,2001). EIEC پاتوژن اصلی در بیماری اسهال کودکان با مرگ و میر بالا بوده و در جوامع در حال