پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال شانزدهم، شماره ۵، پی در پی ۸۳، صفحات ۲۲۶ تا ۲۳۳
آذر و دی ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۴/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۳

تعیین تنوع ژنی اشریشیاکلی از آب چاه پارکهای تهران با روش مولتی پلکس PCR

دکتر محمدمهدی سلطان‌دلال[۱و۲*]، سامان سپهری[۳]، دکتر مصطفی حسینی[۴]، اکرم طباطبایی بفرویی[۵]، دکتر زهرا دیلمی خیابانی[۶]

۱. استاد، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. استاد، مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۴. دانشیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵. کارشناس ارشد بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان

چکیده

سابقه و هدف: آب نقش عمده‌ای در زمینه بهداشت عمومی داشته و آب آلوده دارای اثرات مستقیم بر سلامت انسان می‌باشد. با توجه به نقش پر اهمیت اشریشیاکلی‌های مولد اسهال (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC) در کودکان، و کاربرد روشهای فنوتیپی در آزمایشگاهها، این سؤال مطرح است که *E.coli*های شناسایی شده جزو کدامیک از *E.coli*های مولد اسهال می‌باشند؟ هدف از این مطالعه شناخت وضعیت آلودگی میکروبی آب چاه پارکهای تهران، و تعیین انواع پاتوتایپ اشریشیاکلی‌های مولد اسهال می‌باشد.

مواد و روشها: ۱۶۵ نمونه آب چاه پارکها از ۵ منطقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تهران در شرایط استریل نمونه‌برداری و جهت بررسی با فیلتر غشایی و تعیین انواع پاتوتایپ‌های *E.coli* به آزمایشگاه بخش میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت منتقل گردید.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که ۹۰ نمونه (۵۴/۵٪) از آبهای تهیه شده آلوده به *E.coli* بودند. نمونه‌های آب چاه در جنوب تهران درصد آلودگی بیشتری نسبت به سایر نقاط داشته است. نتایج تکمیلی با مولتی پلکسPCR نشان داد که از ۹۰ نمونه آلوده به *E.coli*، تنها ۶۷ سویه DEC جدا شد، که به ترتیب ۴۲ سویه (۶۲/۷٪) EPEC، ۱۲ سویه (۱۷/۹٪) STEC (یا EHEC)، ۹ سویه (۱۳/۴٪) به عنوان سویه‌های EIEC و ۴ سویه (۶٪) به عنوان سویه‌های ETEC شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: حضور پاتوتایپ‌های مختلف در نمونه‌های آب چاه پارکها می تواند بر اهمیت استفاده از علائم هشداردهنده و آموزش مردم بویژه کودکان به هنگام بازی و استفاده از پارکها تأکید نماید.

واژگان کلیدی: آب چاه، اشریشیاکلی، روش شناسایی ژنتیکی، اسهال

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Soltan Dallal MM, Sepehri S, Hosseini M,Tabatabaei Bafrouei A, Deilami Khiabani Z. Determination of genotype variation of Escherichia coli in well water of Tehran's parks by Multiplex PCR. Pejouhandeh 2011;16(5):226-33.

مقدمه

کلی‌فرم‌ها دسته‌ای از باکتری‌ها هستند که در روده انسان و حیوانات خونگرم به تعداد فراوان یافت می‌شوند، لذا، بسیاری از استانداردهای غذایی و آب را با تعیین کلی‌فرم‌های مدفوع مشخص می‌نمایند (۱ و ۲). بارزترین کلی‌فرم مدفوعی، اشریشیاکلی است که به عنوان بخشی از فلور ضروری روده انسان، در حفظ فیزیولوژی میزبان سالم نقش دارد. اشریشیاکلی به علت فراوانی در مدفوع انسان و حیوانات خونگرم، و به دلیل اینکه آسانتر از سایر پاتوژن‌های روده‌ای قابل تشخیص و تمایز است به عنوان معرف آلودگی مدفوعی انتخاب شده و حضور آن در آب و مواد غذایی نشاندهنده آلودگی اخیر آن نمونه با مدفوع و حضور احتمالی سایر

* **نویسنده مسؤول مکاتبات:** دکتر محمد مهدی سلطان دلال؛ بلوار کشاورز، خ ۱۶ آذر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش میکروب‌شناسی؛ تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۲۱-۹۸+؛ **پست الکترونیک:** soltanirad34@yahoo.com

پاتوژن‌های خطرناک می‌باشد (۵-۳). از بین عوامل باکتریایی بیماریزا، اشریشیاکلی مولد اسهال (DEC) در این دسته‌بندی جایگاه ویژه‌ای داشته و یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می‌باشد (۶ و ۷).

اشریشیا کلی EPEC عامل عمده اسهال نوزاد انسان در کشورهای توسعه نیافته می‌باشد اما به طور روزافزون در کشورهای توسعه یافته نیز شناسایی می‌شود. EPEC بر روی سطح اپیتلیال کلونیزه شده و اثرات بیماریزایی خود را در وهله اول با اتصال به سطح انتروسیت‌ها اعمال می‌کند و موجب تغییرات هیستوپاتولوژیک می‌شود (۱۰-۸). اشریشیاکلی ETEC شایعترین عامل اسهال در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و مسؤول بیش از یک میلیارد مورد اسهال در سال می‌باشد، که ۴۰۰-۳۰۰ میلیون آن در کودکان زیر ۵ سال رخ می‌دهد. ETEC شایعترین عامل اسهال مسافر می‌باشد و با کلونیزه شدن در روده کوچک و ترشح دو نوع توکسین LT (حساس به حرارت) و ST (مقاوم به حرارت) موجب اسهال می‌شود (۱۳-۱۱). اشریشیاکلی EHEC در دهه اخیر به عنوان عامل اسهال شدید خونی و همچنین کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمیک هموراژیک (HUS) بویژه در بین کودکان شناخته شده است. از خصوصیات اصلی EHEC تولید وروتوکسین VT1 و VT2 می‌باشد. *E.coli* مولد وروتوکسین به سروگروپ O157:H7 تعلق دارد که اغلب در ارتباط با همه‌گیریهای گسترده می‌باشد. از ویژگی بارز این سویه‌ها اهمیت آنها در عوارض بالینی بسیار وخیم بویژه در کودکان می‌باشد (۱۶-۱۴). اشریشیاکلی EIEC قادر به تهاجم به اپیتلیوم کولون بوده و گاهی موجب اسهال خونی (دیسانتری) می‌شود. این باکتری باعث دیسانتری باسیلی مشابه شیگلوز می‌گردد و بیماران دارای تب، کرامپ و مدفوع خونی می‌باشند. علایم بیماری مربوط به توانایی باکتری در اتصال اختصاصی به سلول‌های مخاط روده بزرگ می‌باشد (۱۷ و ۱۸).

از آنجایی که سویه‌های DEC از *E.coli* غیر بیماریزا (که به طور معمول در مدفوع انسان یافت می‌شوند) قابل تمیز و جداسازی نمی باشد، نمی‌توان تنها براساس معیارهای بیوشیمیایی و کشت این سویه‌ها را شناسایی کرد (۱۹ و ۲۰). لذا در بررسی نمونه‌های آب بویژه آب آشامیدنی که توسط *E.coli* آلوده می‌شوند، نمی‌توان بیماریزا بودن و یا نبودن آن را شناسایی نمود. با توجه به نقش پر اهمیت اشریشیاکلی‌های مولد اسهال (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC) در کودکان (۲۱و ۲۲)، و کاربرد روشهای فنوتیپی در آزمایشگاهها، این سؤال مطرح است که *E.coli*های شناسایی شده جزو کدامیک از *E.coli*های مولد اسهال می‌باشند؟ از طرفی با توجه به خشکسالی سالهای اخیر و کمبود آب، در حال حاضر بخشی از آب تهران از چاههای موجود جبران می‌شود. لذا این مطالعه گذشته از شناخت وضعیت آب چاههای تهران، به دلیل شناخت میزان و وضعیت انواع اشریشیاکلی‌های مولد اسهال در آب چاه می‌تواند مفید و پاسخگوی بسیاری از ابهامات و سؤالات باشد.

مواد و روشها

این مطالعه از نوع توصیفی بوده و جمعاً ۱۶۵ نمونه آب چاه را بررسی نمود. برای این منظور، ۳۳ نمونه از ۵ منطقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکزتهران در شرایط استریل نمونه‌برداری و جهت بررسی طبق مراحل زیر به آزمایشگاه بخش میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت منتقل گردید.

مرحله اول:

۱- جداسازی اشریشیاکلی از نمونه‌های آب چاه به روش فیلتراسیون (۲۳)

روز اول: ابتدا ظرف حاوی نمونه خوب تکان داده شد و ۲۵۰ cc از نمونه در شرایط استریل از فیلتر واتمن ۴۷ mm با سایز ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. سپس با استفاده از پنس استریل، فیلتر بر روی سطح پلیت حاوی محیط مک‌کانکی آگار قرار داده شد و پلیت به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ^{oC} ۳۷ گرماگذاری گردید.

روز دوم: پس از طی مدت زمان ذکر شده، پرگنه‌های مورد نظر شمارش شده و در ۱۰۰ cc آب گزارش گردید. سپس ۵-۳ پرگنه از هر پلیت بر روی محیط مک‌کانکی آگار جهت انجام تست افتراقی خالص شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ^{oC} ۳۷ گرماگذاری شدند.

روز سوم: پس از خالص‌سازی، برای پرگنه‌های مورد نظر تست‌های افتراقی (LD، TSI، SIM، اوره، سیمون سیترات و MRVP) انجام شد.

روز چهارم: با توجه به نتایج تست‌های افتراقی، وجود یا عدم وجود اشریشیاکلی تعیین گردید. سپس پرگنه‌های مربوط به ایزوله‌های *E.coli* در ۸۰ – در تریپتی‌کیزسوی‌براث (TSB) و محیط skim milk غنی شده با گلیسرول نگهداری شدند، تا در مراحل بعدی به منظور استخراج DNA (جهت تکثیر با روش PCR) مورد استفاده قرار گیرند.

مرحله دوم:

۲-۱- استخراج DNA از سویه های *E.coli*: (۲۱)

در این مطالعه استخراج DNA با کیت استخراج DNA ژنومی خریداری شده از شرکت ژن‌فن‌آوران تولیدی شرکت BIONEER انجام گرفت. در این روش پس از کشت نمونه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ^{oC} ۳۷ و ۲۰ ساعت انکوبه‌گذاری،۱۰-۸ پرگنه تک *E.coli* با استفاده از لوپ برداشته شد و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه در تیوب‌های cc ۱/۵ مخلوط گردید و با ورتکس با دور ۳-۲ هزار به خوبی همگن شد؛ سپس براساس دستورالعمل کیت، استخراج DNA صورت گرفت.

محلول ژنومی که به این صورت حاصل شده را می‌توان مستقیماً در واکنش PCR مورد استفاده قرار داد و یا در ^{oC} ۴ برای آزمایشهای بعدی ذخیره نمود. برای ذخیره طولانی مدت بایستی محلول استخراج را در ^{oC} ۲۰- نگهداری نمود چرا که ممکن است DNA در معرض هیدرولیز اسیدی قرار گیرد.

۲-۲- انتخاب جفت پرایمرها: جهت بسط ژن‌های مورد مطالعه (*eae*، *stx1/2*، *elt*، *ipaH*) چهار جفت پرایمر اختصاصی و برای هر ژن یک پرایمر فوروارد و یک پرایمر ریورس بر اساس مقالات و منابع موجود انتخاب گردید و هومولوژی توالی آنها با BLAST مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه برای تکثیر ژن‌های ویرولان از جفت پرایمرهای (ژن‌فن‌آوران) نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های ویرولان پاتوتایپ‌های مختلف

پاتوتایپ	سکانس پرایمر	سایز(bp)	ژن هدف
EPEC	CTGAACGGCGATTACGCGAA	۹۱	*eae F*
	CGAGACGATACGATCCAG		*eae* R
EHEC	GAGCGAAATAATTTATATGTG	۵۱۸	*stx1/stx2* F
	TGATGATGGCAATTCAGTAT		*stx1/stx2* R
EIEC	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	۶۰۰	*ipaH* F
	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		*ipaH* R
ETEC	GGCGACAGATTATACCGTGC	۴۵۰	*elt* F
	CGGTCTCTATATTCCCTGTT		*elt* R

۲-۳- *E.coli* شاهد یا نمونه کنترل: در هر سری آزمایش به منظور اطمینان از صحت روند کار و مواد واکنشگر از سویه استاندارد به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای کنترل منفی از آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه استریل شده (مورد استفاده در تمام مراحل کار از جمله استخراج DNA، رقیق سازی پرایمر، واکنش PCR و ...) استفاده شد تا اطمینان بیشتری از صحت آزمایش حاصل گردد. برای کنترل مثبت از سویه‌های استاندارد، *E.coli* ATCC 35218 حاوی ژن‌های *stx1* و *stx2*، *E.coli* ATCC 7852 حاوی ژن *eae*، *Shigella sonnei* ATCC 9290 حاوی ژن *ipaH* و یک ایزوله بالینی ETEC حاوی ژن *elt*، که حاوی ژن‌های مورد مطالعه بودند استفاده شد.

۲-۴- آماده نمودن مخلوط اصلی واکنش: جهت یکنواخت نمودن شرایط آزمایش و برای کاهش دفعات استفاده از سمپلر و باز و بسته نمودن درب تیوب‌ها و انتقال آلودگی در نمونه‌های مورد آزمایش، مخلوط اصلی واکنش PCR Mixture از قبل تهیه شد. در ابتدا حجم هر واکنش مشخص گردید که در این آزمایش حجم واکنش نهایی (واکنش Uniplex برای set نمودن) ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد، چرا که بهترین تبادل حرارتی در این حجم انجام می‌گیرد. سپس تعداد نمونه‌ها همراه با کنترل منفی و مثبت با احتساب یک نمونه بیشتر محاسبه گردید. به دلیل تعداد زیاد پرایمرها (۴ جفت یا ۸ عدد) و همچنین ناهماهنگ بودن دمای ذوب آنها، در ابتدا برای set نمودن کار برای هر سویه استاندارد یک واکنش Uniplex انجام گرفت تا از وجود ژن مورد نظر در این سویه و همچنین مراحل و شرایط کار به منظور تشخیص این ژن، اطمینان کافی حاصل شود. سپس سه ژن *stx*1/2، *eae*A و *ipa* H در یک واکنش و ژن *elt* نیز در یک واکنش جداگانه (در یک واکنش Uniplex) مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۵- روش کار آزمون PCR : نمونه‌های DNA مربوط به سویه‌های بالینی و DNA سویه‌های استاندارد در میکروتیوب‌های جداگانه و از هر کدام در چند میکروتیوب تقسیم شد تا در موقع کار با آنها فرایند دفریز (آب شدن) به حداقل رسیده و کارآیی DNAی الگو کاهش نیابد. تیوب‌های مربوط به کیت PCR، آب مقطر دیونیزه استریل و میکروتیوب‌های مربوط به پرایمرها که قبلاً رقیق شده بود، از یخچال بیرون آورده شد تا ذوب شوند. پس از ذوب شدن تمامی مواد مصرفی، مخلوطی از مواد واکنش با در نظر گرفتن غلظت نهایی هر یک از مواد تهیه شد.

پس از محاسبه مواد واکنشگر، مواد در تیوب cc ۰/۲ که قبلاً شماره نمونه برروی آن نوشته شده بود ریخته و در نهایت حجم مخلوط به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. در هر یک از تیوب‌ها ابتدا ۱۲/۵ میکرولیتر از Mastermix، ۲/۵ میکرولیتر از coral load و ۳ میکرولیتر از DNAی الگو ریخته شد.

سپس به مدت ۱۰-۵ ثانیه مخلوط را spin کرده و به هر یک از تیوب‌ها ۵ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها اضافه شد. در نهایت مخلوط آماده مجدداً ۵ ثانیه spin شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه ترمال سایکلر (PeQlab) منتقل شده، برنامه مورد نظر وارد شده و دستگاه روشن شد.

۲-۶- آماده‌سازی مارکر اندازه مولکولی یا ladder: این مارکرها در وزنهای مولکولی متفاوت تهیه شده و پس از رقیق نمودن و اضافه نمودن رنگ مخصوص به آن استفاده می‌شود. در این مطالعه ladder با استفاده از آب مقطر استریل (به نسبت ۵:۵:۲۰ میکرولیتر به ترتیب از آب مقطر استریل: رنگ: مارکر) رقیق شد. در هنگام الکتروفورز ۵ میکرولیتر از ladder رقیق شده در یکی از چاهکها load شد.

۲-۶- الکتروفورز محصول PCR: ۵ میکرولیتر از محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی ۵ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید در بافر تریس بورات-EDTA (TBE) ۰/۵X و با جریان ۸۰ ولت آشکارسازی شد. دو چاهک به نمونه کنترل مثبت و منفی و یک چاهک به ladder اختصاص یافت. پس از load نمودن تمامی نمونه‌ها (نمونه‌های بالینی، کنترل مثبت و منفی و ladder) درب تانکر بسته شد، الکترودهای مثبت و منفی تانکر به دستگاه power supply متصل گردید و دستگاه روشن شد. ولتاژ به آرامی بر روی ۸۰ تنظیم شد و به مدت ۹۰ دقیقه ژل الکتروفورز گردید.

۲-۷- مشاهده باندهای DNA محصول و آنالیز نتایج ژل الکتروفورز: تعیین هویت باندهای حاصل به کمک مقایسه با مارکر وزن مولکولی (Ladder) یک کیلوباز انجام شد. تهیه عکس از ژل با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور (Bio-Rad Gel Doc™1000 fluorescent imaging system) در مجاورت نور ماورای بنفش صورت گرفت.

یافته‌ها

۱۶۵ نمونه آب چاه پارک از مناطق مختلف تهران مورد بررسی قرار گرفت که از این میان، ۹۰ نمونه (۵۴/۵٪) طبق استاندارد بین‌المللی ISO (۲۳) و استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۱۱ (۲۴) غیر قابل مصرف بود. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که نمونه‌های آب چاه در جنوب تهران از درصد آلودگی بیشتری نسبت به سایر نقاط برخوردار بوده است. آزمون کای دو نشان داد بین مناطق مختلف شهری از نظر درصد نمونه‌های غیر قابل مصرف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p< ۰/۰۶$). با توجه به درصد نمونه‌های غیر قابل مصرف مشاهده می‌شود که منطقه شمال و غرب دارای آلودگی کمتری نسبت به مناطق جنوب و شرق هستند (جدول ۲).

مولتی پلکس PCR نشان داد که از ۹۰ نمونه آلوده به *E.coli*، تنها ۶۷ سویه DEC جدا شد، که به ترتیب ۴۲ سویه (۶۲/۷٪) EPEC، ۱۲ سویه (۱۷/۹٪) STEC (یا EHEC)، ۹ سویه (۱۳/۴٪) به عنوان سویه‌های EIEC و ۴ سویه (۶٪) به عنوان سویه‌های ETEC شناخته شدند (جدول ۳ و شکل ۱).

بحث

امروزه علی‌رغم پیشرفت سریع در علم و توسعه بهداشت، جامعه مدرن هنوز از شیوع بیماریهای Water- borne رنج می‌برد (۱ و ۲). روش MF می‌تواند تکنیکی مفید برای اکثریت آزمایشگاههای کیفی آب باشد (۲۳). استفاده از این روش نسبتاً ساده است، و نمونه‌های بسیاری می‌توانند در طی یک روز (با توجه به تجهیزات محدود آزمایشگاه) توسط یک تکنسین با آموزش مقدماتی و پایه مورد آزمایش قرار گیرند.

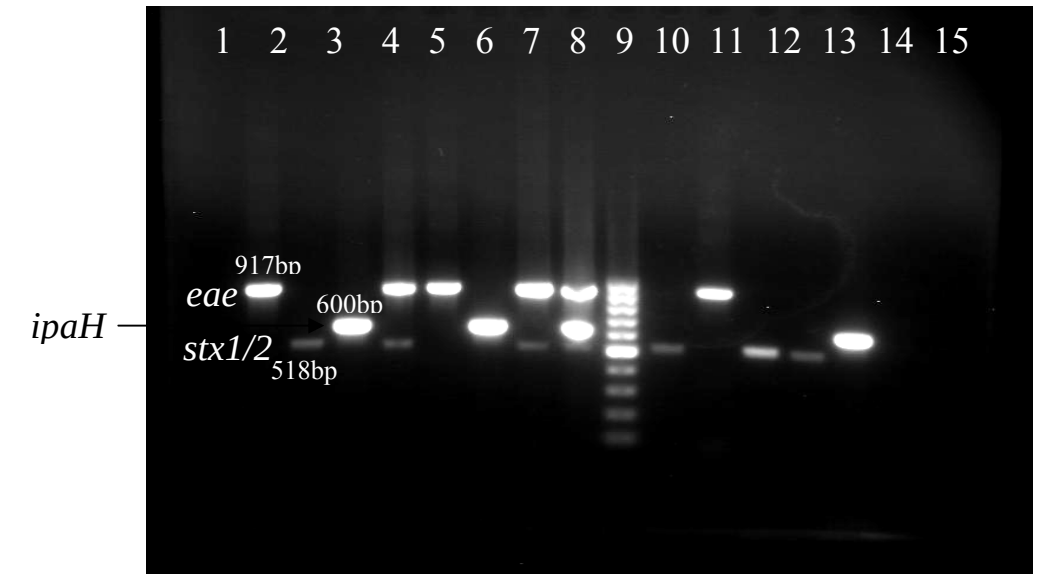
همچنین تغییرات زیادی در ارزیابی‌های روش فیلتراسیون غشایی در تست‌های مربوط به کلی‌فرم‌ها، کلی‌فرم‌های مدفوعی و *E.coli* انجام گرفته است که تعدادی از آنها در آزمایشهای غذاهایی نظیر شیر و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شوند اما اکثر آنها برای آنالیز آب آشامیدنی، آب چاه، و آبهای محیطی استفاده می‌شوند (۲۵ و ۲۶).

جدول۲- وضعیت توزیع نمونه‌های آب چاه از نظر قابلیت مصرف

حضورکلی‌فرم مدفوعی / مناطق جغرافیایی	قابل مصرف تعداد (٪)	غیر قابل مصرف تعداد (٪)
شمال	۲۰ (۶۰/۶)	۱۳ (۳۹/۴)
جنوب	۹ (۲۷/۳)	۲۴ (۷۲/۷)
شرق	۱۳ (۳۹/۴)	۲۰ (۶۰/۶)
غرب	۱۸ (۵۴/۵)	۱۵ (۴۵/۵)
مرکز	۱۵ (۴۵/۵)	۱۸ (۵۴/۵)
جمع	۷۵ (۴۵/۵)	۹۰ (۵۴/۵)

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی پاتوتایپ‌های DEC به تفکیک مناطق جغرافیایی

پاتوتایپ *E.coli* / مناطق جغرافیایی	EPEC	EHEC	EIEC	ETEC	جمع
منطقه شمال	۵	۲	۰	۰	۷
منطقه جنوب	۱۲	۳	۴	۲	۲۱
منطقه غرب	۸	۱	۰	۰	۹
منطقه شرق	۷	۲	۱	۱	۱۱
منطقه مرکز	۱۰	۴	۴	۱	۱۹
جمع	۴۲	۱۲	۹	۴	۶۷



تصویر۱- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *stx1/2* (۵۱۸ bp)، *eae* (۹۱۷ bp) و *ipaH* (۶۰۰ bp)

شماره ۹: مارکر وزن مولکولی (Kb(ladder ۱، شماره ۸: سویه‌های استاندارد *E.coli* ATCC 35218 ATCC 7852، *higella sonnei* ATCC 9290 *E.coli* و کنترل مثبت، شماره ۱۵: کنترل منفی. سویه کنترل شماره ۸ دارای هر سه ژن *stx1/2*، *eae* و *ipaH* می‌باشد. شماره‌های ۱، ۵ و ۱۱: نمونه‌های بالینی *EPEC*، شماره‌های ۲، ۴، ۷، ۱۰، ۱۲ و ۱۳: نمونه‌های بالینی *EHEC* و شماره‌های ۳، ۶ و ۱۴: نمونه‌های بالینی *EIEC*. همانطور که در تصویر الکتروفورز مشخص است، دو سویه (نمونه‌های شماره ۴ و ۷) همزمان دارای دو ژن *eae* و *stx1/2* بودند و در گروه سویه‌های *EHEC* قرار گرفتند.

نتایج ما نشان داد ۵۴/۵٪ نمونه‌های آب چاههای پارکهای تهران به باکتری اشریشیاکلی آلوده و غیر قابل مصرف بودند. کمترین میزان آلودگی مربوط به منطقه شمال تهران با ۳۹/۴٪ و بیشترین میزان آلودگی مربوط به منطقه جنوب تهران با ۷۲/۷٪ بود. این نتایج اهمیت توجه داشتن به منابع آب زیرزمینی بخصوص در پارکها را مشخص می‌سازد زیرا ممکن است خانواده‌ها از آب پارک به عنوان آب شرب و یا شستن و پختن مواد غذایی استفاده نمایند.

شناسایی سویه‌های DEC از نمونه‌های آب آسان نمی‌باشد و محدودیتهایی در روشهای تشخیصی وجود دارد. در اکثر آزمایشگاهها جهت شناسایی سویه‌های *E.coli* مولد اسهال (DEC) از آزمونهای فنوتیپی استفاده می‌شود. با این حال، این گونه روشها به تنهایی جهت تشخیص هویت و شناسایی انواع پاتوتایپ‌های DEC کافی نمی‌باشند (۲۷ و ۲۸).

در این مطالعه چهار پاتوتایپ *E.coli* که در کودکان سبب اسهال (DEC) می‌شوند مورد شناسایی قرار گرفت. با استفاده از چهار جفت پرایمر مربوط به چهار پاتوتایپ مختلف DEC (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC) در یک واکنش PCR، به طور همزمان فاکتورهای ویرولانس (به ترتیب ژن‌های *eae*، *stx1/2*، *ipaH* و *elt*) آنها مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. با set up کردن تست MPCR جهت شناسایی همزمان ژن‌های ویرولانس چهار پاتوتایپ شایع DEC، روش حساسی طراحی شد که با صرفه‌جویی در وقت و هزینه آزمایشگاهی، تشخیص این سویه‌های پاتوژن ساده‌تر شود. البته در این تحقیق به علت اختلاف در دمای اتصال، در یک واکنش PCR سه ژن ویرولانس (*eae,stx1/2,ipaH*) به طور همزمان و ژن *elt* در واکنشی مجزا مورد آزمون قرار گرفتند.

شایعترین پاتوتایپ جدا شده از مناطق ۵ گانه تهرانEPEC بود به گونه‌ای که ۴۲ سویه (۶۲/۷٪) دارای ژن *eae* بودند. در مرحله بعد پاتوتایپ EHEC با ۱۲ سویه (۱۷/۹٪) دارای ژن *stx1/2* شناخته شد. ۹ سویه (۱۳/۴٪) دارای ژن *ipaH* بوده، لذا متعلق به پاتوتایپ EIEC و ۴ سویه (۶٪) دارای ژن elt و متعلق به پاتوتایپ ETEC بودند.

برخلاف مطالعات متعدد بالینی، مطالعات زیادی در جهان جهت بررسی فراوانی سویه‌های DEC در نمونه‌های محیطی صورت نگرفته است. اما از آنجایی که بیشتر منابع آب توسط افراد مبتلا به سویه‌هایDEC آلوده می‌شوند، لذا بررسی نتایج محققین دیگر در زمینه‌های بالینی می‌تواند اهمیت موضوع را مشخص نماید (۶ و ۱۰).

سروگروپ‌های مختلف EPEC عامل عمده اسهال نوزاد انسان در کشورهای توسعه نیافته می باشند اما به طور روزافزونی در کشورهای توسعه یافته نیز شناسایی می‌شوند. عفونت ناشی از EPEC معمولاً در ارتباط با اسهال پایدار و مزمن در کودکان بویژه طیف سنی زیر یک سال می‌باشد (۲۹). معمولاً الگوی توزیع جغرافیایی سروتایپ‌های EPEC ایجادکننده اسهال در سرتاسر دنیا متفاوت است. از این رو بایستی به منظور کنترل دقیق بیماری ناشی از این سویه‌ها، سروتایپ‌های شایع در هر منطقه مورد شناسایی قرار گیرند. سلطان دلال در مطالعه خود (۹۹-۱۹۹۸) سروتیپ‌های O26,O55,O119,O127,O111 را به عنوان شایعترین سروتیپ‌های EPEC در اسهال کودکان زیر ۲ سال جنوب شهر تهران گزارش نمود (۳۰). در مطالعه فاگوندز، بیشترین (حدود ۵۰٪) سویه‌های جدا شده به سروگروه O25,O111,O119 تعلق داشتند (۳۱). در مطالعه حاضر بیشترین سروگروه EPEC جدا شده مربوط به سروگروه IV (O20,O114) بود. در مطالعات قبلی ما که بر روی کودکان مبتلا به اسهال انجام پذیرفت بیشترین سروگروه متعلق به IV (O20,O114) بوده است، که با نتایج محیطی ما کاملاً همپوشانی دارد (۳۲). با توجه به مطالعات متعددی که قبلاً صورت گرفته است، در شیوع سروگروهها و سروتیپ‌های EPEC در مناطق جغرافیایی مختلف، تنوع وجود دارد. در مطالعه ما از ۱۶۵ نمونه آب چاه، ۴۲ مورد (۶۲/۷٪) EPEC جدا گردید. سویه‌های EPEC تیپیک تاکنون از حیوانات جدا نشده است، از این رو به نظر می‌رسد تنها مخزن زنده این ارگانیسم‌ها انسان می‌باشد. از آنجایی که شاخصهای ویرولانس EPEC آتیپیک نسبتاً ناشناخته می‌باشد، پیشنهاد می‌شود جهت تحقیقات اپیدمیولوژیک، اکولوژیک و اجتماعی– اقتصادی راجع به این سویه‌های نوظهور، مطالعات مولکولی وسیعتری صورت گیرد و به منظور تمایز سویه‌های تیپیک و آتیپیک، بررسی وجود ژن‌های مسؤول (*eae* و *bfp*) به طور همزمان در مطالعات بعدی مد نظر قرار گیرد (۲۶-۲۱ و ۳۲).

در اکثر کشورها STEC/EHCE در منابع حیوانی و غذایی مورد شناسایی قرار می‌گیرند. اما تنها برخی از سروتایپ‌های شناخته شده در حیوانات بعنوان عوامل بیماری در انسان معرفی می‌شوند. تنها برخی از این سروتایپ‌ها دارای ژن‌های بیان‌کننده فاکتورهای ویرولانس سویه‌های EHEC مولد اسهال خونی و HUS می‌باشند. در برخی از مواردی که سویه‌های STEC/EHCE جدا شده‌اند، وجود خون در اسهال و علایم اسهال خونی مشاهده شده است. در برخی مطالعات، عفونتهای ناشی از STEC در موارد اسهال اسپورادیک، بدون خون، بویژه در نوجوانان گزارش شده است. از این رو لازم است تا آزمونهای مولکولی و سرولوژیک دقیقی جهت شناسایی آنها در دسترس باشد (۱۸-۱۶).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد اشریشیاکلی تولیدکننده شیگاتوکسین (STEC) می‌تواند به عنوان یکی از عوامل باکتریایی متداول در آلودگی منابع آب در کشور ما مطرح باشد که بایستی برای شناسایی آنها از تکنیک‌های جدید و مبتنی بر DNA بهره گرفت. شناسایی سویه‌های STEC در نمونه‌های آب به چند دلیل ذیل می‌تواند حایز اهمیت زیادی باشد: ۱- پیدایش سروتایپ‌های بیماریزای جدید و در راستای آن مقاومت روزافزون این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک، ۲- عدم وجود تکنیک‌های تشخیصی مناسب و متداول جهت شناسایی دقیق سویه‌های تولیدکننده توکسین شیگا و تمایز آنها از میکروفلور طبیعی آب و در نتیجه عدم توجه کافی به آنها، ۳- ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماریها و عفونتها و پیشرفت آنها به عوارض شدید سندرم اورمیک همولیتیک، کم خونی، نارسایی حاد کلیوی و حتی مرگ (۳۳).

در مطالعه حاضر، در نمونه‌های آب، فراوانی سویه‌های EIEC ۱۳/۴٪ و سویه‌های ETEC ۶٪ بوده است. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان اظهار داشت که اشریشیاکلی‌های مهاجم (EIEC) نیز به عنوان یکی از عوامل باکتریایی آلودگی آب چاه در کشور ما مطرح بوده و برای شناسایی آنها باید از تکنیک‌های جدید و مبتنی بر DNA بهره گرفت.

نتیجه‌گیری

بدلیل عدم وجود تکنیک‌های تشخیصی مناسب جهت شناسایی دقیق این سویه‌ها، عدم تمایز آنها از میکروفلور غیر بیماریزای آب

و در نتیجه عدم توجه کافی به آنها، و از طرفی مصرف آب آلوده و ایجاد اسهال خونی بویژه در کودکان، شناسایی آنها در نمونه‌های آب چاه پارکها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. حضور پاتوتایپ‌های مختلف در نمونه‌های آب چاه پارکها می‌تواند بر اهمیت استفاده از علائم هشدار دهنده و آموزش مردم بویژه کودکان به هنگام بازی و استفاده از پارکها تأکید نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۸۷۶۱ مورخ ۱۳۸۸/۸/۲۷ می‌باشد.

REFERENCES

1. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May–June 2000. Can Commun Dis Rep 2000;26(20):170-3.
2. WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 2nd ed. vol 1- Recommendations. Geneva: WHO; 1993.
3. Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Symp Ser Soc Appl Microbiol 2000;(29):106S-116S.
4. Wohlsen T, Bates J, Vesey G, Robinson WA, Katouli M. Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water sample using precise refrence standards. Lett Appl Microbiol 2006;42(4):350-6.
5. Chao KK, Chao CC, Chao WL. Evaluation of colilert-18 for Detection of Coliforms and *E.coli* in subtropical freshwater.Appl Environ Microbiol 2004;70(2):1242-44.
6. Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, et al. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. J Clin Microbiol 2005;43(8):3636-41.
7. Hunter PR. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli.* J Water Health 2003;1(2):65-72.
8. Soltan-Dallal MM. Diarrhea caused by enteropathogenic bacteria in children. Arch Iran Med 2001;4(4):201-3.
9. Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(7):839-44.
10. Prère MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O. Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. Pathol Biol (Paris) 2006;54(10):600-2.
11. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BE, Balan A, Sbrogio-Almeida ME, et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. J Bacteriol 2008;190(7):2400-10.
12. Walker RI, Steele D, Aguado T. Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. Vaccine 2007;25(14):2545-66.
13. Das S, Goyal R. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) associated diarrhoeal cases in a tertiary care hospital of Delhi, India. J Commun Dis 2004; 36(3):222-3.
14. Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* and *stx2*), Intimin (*eaeA*), Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *hlyA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR**.** Appl Environ Microbiol 1999;65(2):868-72.
15. Olsen SJ, Miller G, Breuer T, Kennedy M, Higgins C, Walford J, et al. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. Emerg Infect Dis 2002;8(4): 370-5.
16. Pebody RG, Furtado C, Rojas A, McCarthy N, Nylen G, Ruutu P, et al. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. Epidemiol Infect 1999;123(2):217–23.
17. Altwegg M, Perschil I, Gruner E. [Molecular biology detection and antibiotic sensitivities of Shigella spp. and entero-invasive Escherichia coli (EIEC) in patients returning from the tropics]. Praxis (Bern 1994). 1997;86(9):348-51. (Full Text in German)
18. Stypułkowska-Misiurewicz H, Augustynowicz E, Andziak J, Kałuzewski S. [Susceptibility to vibriostatic factor 0/129 of Shigella, Salmonella and entero-invasive Escherichia coli (EIEC)]. Med Dosw Mikrobiol. 1994;46(4):277-83. (Full Text in Polish)
19. Lanyi B, Szita J, Ringelhann A. A waterborne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. Acta Microbiol Hungarica 1959;6:77-8.
20. Daniels NA, Neimann J, Karpati A, Parashar UD, Greene KD, Wells JG, et al. Traveller's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. J Infect Dis 2000;181(4):1491-5.
21. Aranda KR, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett 2007;267(2):145-50.

22. Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Vallès X, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. Am J Trop Med Hyg 2007;76(3):522–7.

23. ISO 9308-1 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.

24. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Drinking water –Microbiological specifications. Tehran: 2010.

25. Frampton EW, Restaino L. Methods for *E.coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. J Appl Bacteriol 1993;74(3):223-33.

26. Manafi M. Media for detection and enumeration of 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* from water and foods. In: Corry JEL, Curtis W, Baird RM Editors. Handbook of culture media for food microbiology. Elsevier; 2003. p. 167-93.

27. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol 2004;2(2):123–40.

28. Hunter PR. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli.* J Water Health 2003;1(2):65-72.

29. Qrskov F, Qrskov I. Serotyping of *E.coli* methods in microbiology. 14th ed. London: bergent academic press; 1984. p.43-112.

30. Soltan-Dallal MM, Khorramizadeh MR, MoezArdalan K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran. East Mediterr Health J 2006;12(6):792-7.

31. Fagundes Neto U, Schmitz LG, Scaletsky I. [Clinical and epidemiological characteristics of acute diarrhea by classical enteropathogenic *Escherichia coli*]. Rev Assoc Med Bras 1995;41(4):259-65. (Full Text in Portuguese)

32. Sharifi Yazdi MK, Akbari A. Soltan-Dallal MM. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2),* intimin (eae) and invasive plasmid antigen H (i*paH*) genes in diarrheagenic *Escherichia coli.* Afri J Biotech 2011;10(9):1522-6.

33. Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Scandinavian J Infect Dis 2005;37(6-7):405-16.