

The Identification of pathogenic *Escherichia coli* strains to carry intimin gene isolated from various water sources

Soraiya Hosseini¹, Reza Ranjbar², Taghi Zahrayi Salehi³

1. Department of Microbiology, faculty of science, Islamic Azad University, Save Branch, Save, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

Article Information

Article history:

Received: 2015/04/08
Accepted: 2015/05/25
Available online: 2016/10/16

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2016; 10(4): 17-24

Corresponding author at:

Dr. Reza Ranjbar

Molecular Biology Research
Center, Baqiyatallah
University of Medical Science,
Tehran, Iran

Tel: 02188039883

Email:

ranjbarre@gmail.com

Abstract

Background and Aim: *Escherichia coli* is considered as one of the most important causes of bacterial infections transmitted through water and foods. Several factors are involved in the pathogenesis of *Escherichia coli*. The aim of this study was to investigate the prevalence of *E coli* strains carrying virulence gene intimin isolated from different water sources in Alborz province.

Materials and Methods: This study was carried out in 2013. The research included all *E. coli* strains isolated from different surface water sources in Alborz province. *Escherichia coli* isolates were detected and identified by standard microbiological and biochemical tests. The strains were evaluated for the presence of intimin gene by PCR using specific primers.

Results: One hundred *E. coli* strains were isolated then PCR was successfully optimized for detection of intimin gene. The PCR results showed 33% of the strains carried out intimin gene.

Conclusions: Compared to many studies, our findings showed the high frequency of *E. coli* strains carrying intimin gene isolated from surface water sources. The presence of this virulence genes is a potential threat for contamination of drinking water which is important for health care systems.

KeyWords: *Escherichia coli*, PCR, Intimin gene

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hosseini S, Ranjbar R, Zahrayi Salehi T. The Identification of pathogenic *Escherichia coli* strains to carry intimin gene isolated from various water sources. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (4) :17-24

شناسایی سویه‌های *شریشیا کلی* حامل ژن بیماری زای اینتیمین (Intimin) جدا شده از منابع مختلف آبی

ثریا حسینی^۱، رضا رنجبر^۲، تقی زهرایی صالحی^۳

۱. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، شعبه ساوه، ساوه، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۰۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

میکروبی شناسی مولکولی

IJMM 1395; 10(4): 17-24

نویسنده مسئول:

دکتر رضا رنجبر

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی،

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله...

(عج)، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۳۹۸۸۳

پست الکترونیک:

ranjbarre@gmail.com

زمینه و اهداف: *شریشیا کلی* یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی عفونت‌های منتقله از طریق آب و مواد غذایی است. فاکتورهای متعددی موجب بیماری زایی *شریشیا کلی* می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی سویه‌های *شریشیا کلی* حامل ژن بیماری زای اینتیمین (Intimin) از منابع آبی استان البرز می‌باشد.

مواد و روش کار: این مطالعه بر روی ایزوله‌های *شریشیا کلی* جدا شده از منابع آبی مختلف استان البرز در سال ۱۳۹۱-۲ انجام شد. ایزوله‌های *شریشیا کلی* توسط روش‌های استاندارد میکروبیولوژی و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی شدند. سویه‌ها از لحاظ حضور ژن بیماری‌زای اینتیمین توسط پرایمرهای اختصاصی و به کمک PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: ۱۰۰ ایزوله *شریشیا کلی* جداسازی شده در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. PCR به‌طور موفقیت‌آمیزی جهت شناسایی ژن اینتیمین بهینه‌سازی شد. نتایج PCR نشان داد ۳۳ ایزوله (۳۳٪) از ایزوله‌ها حامل ژن اینتیمین بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد میزان شیوع ایزوله‌های *شریشیا کلی* واجد ژن اینتیمین در مقایسه با بسیاری از مطالعات انجام‌شده قبلی، نسبتاً بالاتر است. حضور این ژن‌ها در سویه‌های *شریشیا کلی* به احتمال فراوان با قدرت بیماری‌زایی در آن سویه‌ها ارتباط دارد که اثبات آن نیاز به مطالعات بیشتری در آینده دارد. حضور این‌گونه ژن‌های بیماری‌زا و پتانسیل بیماری‌زایی *شریشیا کلی* نشان‌دهنده اهمیت بهداشتی حضور این میکروارگانیسم در آب شرب مورد استفاده می‌باشد.

کلمات کلیدی: *شریشیا کلی*، PCR، ژن اینتیمین

کپی‌رایت © حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مدفوعی_دهانی منتقل می‌شوند (۷). آب آلوده منشأ بیماری‌هایی نظیر التهاب معده و روده (گاستروانتریت)، التهاب بافت کبد (هپاتیت A) و عفونت انگلی روده‌ای (ژیاردیازیس) می‌باشد (۸). با توجه به نقش غیر قابل‌انکار آب در شرب و بهداشت جوامع، شناسایی *شریشیا کلی* نقش مهمی در حفظ و پالایش بهداشت و سلامت جوامع بشری دارد، چراکه وجود این باکتری در آب و مواد غذایی از سوی استانداردهای ملی و بین‌المللی ممنوع بوده و وجود *شریشیا کلی* در محصولات غذایی بیانگر آن است که سایر میکروارگانیسم‌های انتروباکتریاسه با منشأ مدفوعی یا روده‌ای

شریشیا کلی باکتری میله‌ای شکل گرم منفی خانواده انتروباکتریاسه است (۱). زیستگاه طبیعی *شریشیا کلی* روده انسان و حیوانات خونگرم است که به‌طور معمول چند ساعت پس از تولد در روده نوزادان مستقر می‌شود (۲، ۳). *شریشیا کلی* بارزترین کلی فرم مدفوعی است که به‌عنوان شاخص کیفیت آب آشامیدنی انتخاب‌شده است (۴-۶). آب آشامیدنی باید سالم و عاری از میکروارگانیسم‌های شناخته‌شده و باکتری‌های نشانگر باشد. بسیاری از بیماری‌های ناشی از آب توسط عوامل بیماری‌زای روده‌ای ایجاد می‌شود که به‌طور عمده از طریق مسیر

طالقان است، تصفیه ورودی خانه بیلقان (کرج) که منبع آن از رودخانه کرج است و تعدادی از چاه‌های شهرستان کرج می‌باشد و در طی حدود یک سال از مهرماه ۹۱ تا مهرماه ۹۲ جمع‌آوری شد.

شناسایی باکتری:

پس از جمع‌آوری نمونه‌های آب از منابع آبی استان البرز، امور باکتری‌شناسی بر روی نمونه‌ها انجام شد که شامل سه مرحله احتمالی، تأییدی و تکمیلی بود. در مرحله احتمالی، کلیه نمونه‌های آب به محیط کشت پرسنس-اِبسنس (P-A) محصول شرکت مرک آلمان، تلقیح و در دمای $35 \pm 5^\circ\text{C}$ سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. بعد از این مدت وجود گاز در لوله دورهام و ایجاد pH اسیدی مبنی بر حضور کلی فرم‌ها در نمونه بود. در مرحله تأییدی نمونه‌های مثبت در مرحله احتمالی در محیط برلیانت گرین براث کشت داده و در دمای $35 \pm 5^\circ\text{C}$ به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. بعد از این مدت وجود گاز در لوله دورهام و ایجاد PH اسیدی مبنی بر حضور کلی فرم‌ها در نمونه بود. نمونه‌های مثبت پس از مرحله تأییدی در محیط کشت EC broth محصول شرکت مرک آلمان کشت داده شدند و در دمای $44 \pm 5^\circ\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب گرم، گرم‌خانه گذاری شد. وجود گاز در لوله دورهام و ایجاد PH اسیدی مبنی بر حضور کلی فرم‌های گرما پای (Thermotolerant coliform) در نمونه‌ها بود که این کلی فرم‌های گرماپای شامل گونه‌های *شرشیا*، *کلبسیلا*، *انترو* و *سیترو باکتر* است که قادر به تولید لاکتوز و گاز می‌باشند. در مرحله بعد کلیه نمونه‌های لاکتوز مثبت بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار (EMB)، محصول شرکت مرک آلمان کشت داده شده و در دمای $35 \pm 5^\circ\text{C}$ سلیوس گرم‌خانه گذاری شدند. حضور کلنی‌های دارای جلای سبز فلزی بیانگر حضور *شرشیا* کلی بود. کلیه کلنی‌های واجد جلای سبز فلزی به‌عنوان *شرشیا* کلی احتمالی مورد آزمون‌های اندول-متیل رد-ووکش پروسکوئر-سیترات (IMVIC) قرار گرفته و در صورتی که نتایج به‌صورت اندول (+)، متیل رد (+)، ووکش پروسکوئر (-) و سیترات (-) بودند به‌عنوان سویه *شرشیا* کلی جداسازی و نگه‌داری شدند (۲۵).

ممکن است در غذا وجود داشته باشند. *شرشیا* کلی طیف وسیعی از عفونت‌های بالینی را در انسان ایجاد کرده است که عبارت‌اند از اسهال یا عفونت‌های روده‌ای، عفونت مجرای ادراری، التهاب پرده محافظتی مغز و نخاع (مننژیت) و مسمومیت خون (سپتی سمی) (۹-۱۲). پاتوتیپ‌های اسهال زایی *شرشیا* کلی از مهم‌ترین عوامل اسهال‌های همه‌گیر و تک‌گیر در جهان می‌باشند. بر اساس یافته‌های بالینی، خصوصیات ظاهری و ویژگی‌های بیماری‌زایی، پاتوتیپ‌های اسهال زای *شرشیا* کلی عبارت‌اند از *شرشیا* کلی توکسین زای روده‌ای (ETEC)، *شرشیا* کلی پاتوژنی (EPEC)، *شرشیا* کلی چسبنده روده‌ای (EAEC)، *شرشیا* کلی مهاجم روده‌ای (EIEC) و *شرشیا* کلی خونریزی دهنده روده‌ای (EHEC) (۱۳-۱۵). اسهال عفونی حاد، یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر کودکان در سراسر جهان به‌خصوص کشورهای در حال توسعه است به‌طوری‌که بیشترین میزان بروز اسهال در ۵ سال اول زندگی کودک است (۱۶-۱۹). هر یک از پاتوتیپ‌های اسهال زای *شرشیا* کلی توسط مکانیسم‌های متفاوتی ایجاد بیماری می‌کنند. مکانیسم اصلی بیماری‌زایی در دو پاتوتیپ *شرشیا* کلی پاتوژنی و *شرشیا* کلی خونریزی دهنده روده‌ای توسط مکانیسم اتصال-تخریب انجام می‌گیرد (۲۱، ۲۰). پروتئین‌هایی که در اتصال باکتری *شرشیا* کلی خونریزی دهنده روده‌ای به سطح پوشش روده نقش اصلی را بر عهده دارند شامل سه پروتئین اینتیمین، بخشی از سیستم ترشحی نوع ۳ (EspA) و پروتئین گیرنده تیر (Tir) می‌باشند (۲۲). پروتئین اینتیمین یک پروتئین ۹۴ کیلو دالتونی غشای خارجی می‌باشد و به‌وسیله ژن اینتیمین کد می‌شود (۲۳). این پروتئین مسئول اتصال نزدیک باکتری به سلول‌های مخاطی روده و ایجاد آسیب طی مکانیسمی به نام اتصال و تخریب می‌باشد (۲۴). هدف از انجام این تحقیق شناسایی سویه‌های *شرشیا* کلی حامل ژن بیماری زای اینتیمین از منابع مختلف آبی است و هدف کاربردی نیز راه‌اندازی روش‌های سریع شناسایی ژن بیماری زای اینتیمینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه:

روش انجام این پژوهش از نوع توصیفی-تحقیقی بوده و جامعه آماری آن ۱۰۰ نمونه به‌دست‌آمده از منابع مختلف آب سطحی استان البرز می‌باشد که از آب‌های سطحی مانند چشمه‌ها، ورودی تصفیه‌خانه رجایی شهر (طالقان) که منبع آن از

استخراج DNA:

غلظت $100 \text{ Pmol}/\mu\text{L}$ با آب مقطر دو بار استریل رقیق شده و به عنوان استوک برای نگهداری طولانی مدت در فریزر 20°C درجه سلسیوس منتقل شد و محلول کاری با اضافه کردن $90 \mu\text{L}$ آب مقطر به $10 \mu\text{L}$ محلول استوک فراهم شد. حجم نهایی واکنش PCR، $25 \mu\text{L}$ و حاوی $12/5 \mu\text{L}$ مسترمیکس امپلیکون (Master mix amplicon، $1 \mu\text{L}$ از هر یک از پرایمرها، $2 \mu\text{L}$ DNA الگو و $8/5 \mu\text{L}$ آب مقطر استریل انجام شد. غلظت DNA، 1 mgr در هر μL بود. واکنش PCR با شرایط دمایی به صورت واسرشت اولیه 94°C درجه سلسیوس در زمان 4 دقیقه، واسرشت شدن 94°C درجه سلسیوس 30 ثانیه، دمای اتصال 60°C درجه 30 ثانیه، دمای گسترش 72°C درجه 72 ثانیه و دمای گسترش نهایی 72°C درجه 7 دقیقه انجام شد. از نمونه واجد ژن اینتیمین حاصل از مطالعات قبلی به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه استفاده شد. در نهایت $10 \mu\text{L}$ از محصول PCR به درون چاهک های ژل آگارز $1/5$ درصد در داخل تانک الکتروفورز به صورت افقی منتقل شد. پس از انجام الکتروفورز رنگ آمیزی در محلول انیديوم بروماید به مدت 15 دقیقه انجام شد. سپس شستشوی ژل در آب مقطر و سرانجام در دستگاه Gel documentation عمل عکس برداری از ژل و ذخیره اطلاعات انجام گردید.

انجام PCR

جهت بررسی حضور ژن بیماری زای اینتیمین از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده گردید. طبق بررسی های به عمل آمده و مرور و مطالعه توسط سایر محققین جفت پرایمرهای موردنظر از سایر مقالات استخراج شد و تأیید کارایی پرایمرها از طریق BLAST انجام شد و در نهایت به منظور تهیه به شرکت (تکاپوزیست- ایران) سفارش داده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۶). برنامه دمایی PCR ژن موردنظر با استفاده از برنامه دمایی توصیه شده توسط سایر محققین در دستگاه Mastercycler gradient ساخت شرکت Eppendorf انجام گرفت. ابتدا پرایمر موجود طبق دستور کار ارسال شده از طرف شرکت تکاپوزیست تا

جدول ۱: ژن هدف و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام پرایمر	(۵' - ۳')	ترادف سکانس پرایمر	دمای ذوب	اندازه باند
eaeA		CACACGAATAAACTGACTAAAATG AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT	۶۰	۳۷۶

آنالیز آماری:

$kmo = 4/275^{**}$ می باشد که در سطح احتمال یک درصد معنی دار است.

یافته ها

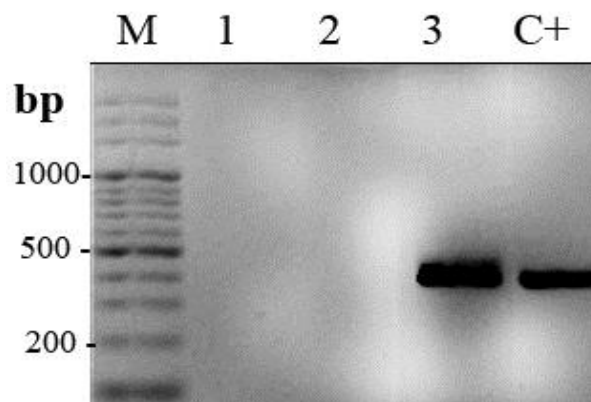
از کل نمونه های آب مربوط به ایزوله های /شریشیا کلی جدا شده از منابع آبی استان البرز که از مهر ۹۲-۱۳۹۱ جمع آوری گردید، در مجموع 100 ایزوله جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمون PCR برای شناسایی ژن بیماری زای اینتیمین بر روی ایزوله های /شریشیا کلی جدا شده از منابع آبی با کمک پرایمرهای اختصاصی که از مقالات استخراج شده بود انجام شد. PCR توانست به طور موفقیت آمیزی و به طور اختصاصی ژن ویروالانس اینتیمین را تکثیر نماید. تصویر ۱ نتیجه آزمون

برای تجزیه و تحلیل داده های این پژوهش از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) در دو سطح آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. در سطح آمار توصیفی از توزیع فراوانی، درصد، میانگین، انحراف معیار و در سطح آمار استنباطی از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف و آزمون کای اسکور (X^2) استفاده شد. آزمون کای اسکور (X^2) نشان داد که مقدار کای اسکور $(X^2=11.560)$ می باشد که در سطح احتمال یک درصد بزرگتر است. بنابراین بین نمونه های فاقد ژن و واجد ژن بر اساس سویه های /شریشیا کلی حامل ژن بیماری زای اینتیمین در منابع مختلف آبی استان البرز با روش PCR تفاوت وجود دارد. آزمون کالموگروف-اسمیرنوف (kmo) نیز نشان داد که مقدار کالموگروف-اسمیرنوف

همچنین عوامل انگلی مانند ژیا ردیا و *آتتاموبا هیستولیتیکا* ایجاد می شود. روتا ویروس ها و *شریشیا کلی* های اسهال را از عمده ترین عوامل ایجاد کننده اسهال می باشند. در مطالعه حاضر فراوانی ژن بیماری زای اینتیمین در ایزوله های *شریشیا کلی* جدا شده از منابع آبی استان البرز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی که بر روی ۱۰۰ ایزوله *شریشیا کلی* جداسازی شده آزمایش PCR انجام شد، پس از بررسی محصولات PCR و مشاهده باندهای ایجاد شده فراوانی ژن اینتیمین ۳۳ ایزوله (۳۳٪) مشخص شد. برخلاف مطالعات متعدد بالینی، مطالعات چندانی در رابطه با فراوانی ژن های بیماری زای *شریشیا کلی* در منابع آبی در دنیا و ایران انجام نشده است، اما از آن جهت که منابع آبی توسط افراد مبتلا به پاتوتیپ های مختلف اسهال را آلوده می شوند لذا اهمیت موضوع نمایان می شود.

مطالعه ای در سال ۱۳۹۰ توسط Dallal و همکاران در رابطه با تعیین تنوع ژنی *شریشیا کلی* از آب چاه پارک های تهران با روش مولتی پلکس PCR انجام شد. در این پژوهش ۱۶۵ نمونه آب چاه پارک ها از ۵ منطقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تهران نمونه برداری شد. پس از بررسی با فیلتر غشایی انواع پاتوتیپ ها مورد بررسی قرار گرفت. طی این بررسی شایع ترین پاتوتیپ جدا شده از مناطق ۵ گانه تهران *شریشیا کلی* انتروپاتوژنیک بود به گونه ای که ۴۲ سویه (۶۲٪) دارای ژن اینتیمین بودند (۲۷). فراوانی ژن اینتیمین در مطالعه Dallal مقایسه با مطالعه حاضر بیشتر بوده و یک احتمال می تواند تعداد نمونه های بیشتر مطالعه Dallal نسبت به مطالعه حاضر باشد. در مطالعه ای دیگر که توسط Widmer و همکاران در سال ۲۰۱۳ همزمان در ۴ کشور ویتنام، اندونزی، کامبوج و تایلند برای بررسی فراوانی ژن های بیماری زا بر روی آب های سطحی انجام گرفت از ۵۶۴ ایزوله *شریشیا کلی* ۲۲ ایزوله (۳/۹٪) حداقل دارای یک ژن بیماری زا بودند. در این مطالعه شایع ترین پاتوژن جدا شده *شریشیا کلی* خونریزی دهنده روده ای بود که شامل ۹ نمونه از ۲۲ نمونه بود. پاتوژن معمول در مرتبه دوم سویه های *شریشیا کلی* پاتوژنی شامل ۷ نمونه از ۲۲ نمونه گزارش شدند. سویه *شریشیا کلی* توکسین زای روده ای در ۶ نمونه مشاهده شد. سه گونه *شریشیا کلی* پاتوژنی با ژن های اینتیمین و شیگا توکسین (*stx1*) مشاهده شد. ژن اینتیمین در ۷ ایزوله از ۲۲ ایزوله یافت شد (۲۸). این مطالعه از نظر تعداد ایزوله های *شریشیا کلی* فراوانی قابل توجهی نسبت به مطالعه حاضر داشته، ولی از نظر

بهینه سازی PCR را برای شناسایی ژن اینتیمین نشان می دهد. نتایج PCR بر روی کل نمونه ها نشان داد ۳۳ ایزوله (۳۳٪) از ایزوله ها واجد ژن اینتیمین بودند. در این مطالعه بررسی پاتوتیپ ها صورت نگرفت.



تصویر ۱: آزمایش PCR جهت شناسایی ژن اینتیمین در برخی ایزوله های نماینده *شریشیا کلی* جدا شده از نمونه های آبی را نشان می دهد. ستون M مارکر مولکولی 100 bp، ستون ۱ و ۲ نمونه های منفی، ستون ۳ نمونه مثبت و ستون C+ کنترل مثبت واجد ژن اینتیمین می باشند.

بحث

آب نقش به سزایی در زندگی انسان دارد و تمام انواع آب به طور ثابتی حاوی میکروارگانیسم های مختلفی است که این میکروارگانیسم ها از طرق گوناگونی وارد آب می شوند. تخمین تعداد کلی آن ها می تواند اطلاعات مفیدی برای ارزیابی و نظارت بر کیفیت آب به دست دهد. شمارش کلی برای ارزیابی سالم بودن منابع آب زیرزمینی و همچنین مؤثر بودن فرآیند تصفیه آب ضروری است و هرگونه افزایش در شمارش، زنگ خطری برای آلودگی شدید آب است و باید سریعاً مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد. آب آلوده دارای اثرات مستقیم بر سلامت انسان می باشد که از آن جمله می توان به بیماری هایی با منشأ آب آلوده اشاره نمود. نمونه ای از این بیماری ها یک اختلال گوارشی به نام اسهال است که از عوامل مهم مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می باشد و سالانه میلیون ها کودک بر اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند. اسهال عفونی حاد دومین عامل شایع مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال است و توسط بسیاری از عوامل عفونی ویروسی مانند آدنوویروس ها، عوامل باکتریایی مانند پاتوتیپ های مختلف *شریشیا کلی*، کمپیلو باکتر و *سالمونلا* و

تحقیق حاصل به عنوان یک تحقیق کاربردی بر پایه یک نیاز مهم و ضروری که کمتر مورد توجه قرار گرفته استوار بوده و با تعیین فراوانی ژن بیماری زا توسط تکنیک های مولکولی برای شناسایی سویه های بیماری زا می توان به نهادینه نمودن این روش در مراکز بهداشت آب پرداخت. بر طبق اطلاعات ما، این مطالعه برای اولین بار در کشور وجود و شیوع ژن های بیماری زا در بین ایزوله های /شریشیا کلی جداسده از منابع آبی استان البرز را گزارش می دهد.

با مقایسه نتایج سایر مطالعات در کشورهای دیگر یافته های ما نشان داد ژن بیماری زا با فرکانس وقوع نسبتاً بالا از نمونه های منابع آبی استان البرز یافت شدند. حضور این ژن ها در سویه های /شریشیا کلی به احتمال فراوان با قدرت بیماری زایی در آن سویه ها ارتباط دارد که اثبات آن نیاز به مطالعات بیشتری در آینده دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از سرکار خانم پور علی (کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی بقیه... (عج)) و جناب آقای روح... خیری (کارشناس ارشد اداره آب و فاضلاب) به جهت همکاری در اجرای این پژوهش کمال تشکر را داریم. این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می باشد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

فراوانی ژن اینتیمین درصد بسیار کمتری نسبت به مطالعه حاضر دارد. در مطالعه ای دیگر Halabi و همکاران در سال ۲۰۰۸ با بررسی بر روی ۲۶۳۳ نمونه آب هایی که بین نوامبر ۲۰۰۰ و دسامبر ۲۰۰۳ در روستایی در اطراف اتریش جمع آوری شده بود و منابع جمع آوری نمونه آب ها شامل آب آشامیدنی، چشمه، چاه های حفر شده بود. بررسی شیوع ژن های شینگاتوکسین *stx2* (و *stx1*)، اینتیمین و همولیزین (*hlyA*) بر روی ۲۸۰ نمونه مثبت /شریشیا کلی مورد ارزیابی قرار گرفت و در این میان پس از انجام آزمون PCR، ۱۱ ایزوله (۳/۹٪) از ایزوله ها واجد ژن های بیماری زا بودند که ۷ ایزوله واجد ژن اینتیمین بودند (۲۹٪). در این مطالعه نیز تعداد ایزوله های /شریشیا کلی بیشتر از مطالعه حاضر، ولی درصد فراوانی ژن اینتیمین کمتر از مطالعه حاضر بوده است.

در سال ۲۰۱۳، Sidhu و همکاران ۳۰۰ نمونه آب از ۶ سایت در Brisbane استرالیا برای حضور ۱۱ ژن بیماری زای /شریشیا کلی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه حضور ژن های مختلفی از جمله *aggR* در /شریشیا کلی چسبنده ای روده ای، توکسین حساس به حرارت (*LT*) و توکسین مقاوم به حرارت (*ST*) در سویه /شریشیا کلی توکسین زای روده ای، *ipaH* در سویه /شریشیا کلی مهاجم روده ای، اینتیمین و پیلی تشکیل دهنده دسته (*bfp*) در سویه /شریشیا کلی پاتوژنی مورد بررسی قرار گرفت که درصد فراوانی ژن بیماری زای اینتیمین (۵۶٪) بود (۳۰٪). در این مطالعه هم تعداد ایزوله های /شریشیا کلی و هم درصد فراوانی ژن اینتیمین نسبت به مطالعه حاضر بیشتر بود.

References.

1. Bonyadian M, Salehi T, Mahzounieh M, Taheri F. Virulence genes of verotoxigenic *E. coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheese. J Vet Res 2011;66(3):223-8, 81.
2. Kargar M, Dianati P, Homayoon M. Evolution of Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Isolated from Hamburger by Multiplex PCR in Shiraz. J Isfahan Med Sch 2011;29(148).
3. Munshi SK, Rahman MM, Noor R. Detection of Virulence Potential of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* Isolated from Surface Water of Rivers Surrounding Dhaka City. J Bangladesh Acad Sci 2012;36(1):109-21.
4. Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M-R, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water :current methods and emerging approaches. J microbiol methods 2002;49(1):31-54.

5. Edberg S, Rice E, Karlin R, Allen M. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. J Appl Microbiol 2000;88(S1):106-16
6. Odonkor ST, Ampofo JK. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. Microbiology research 2013;4(1):2.
7. Karouei H, Masoud S, Eslamifar M, Zazouli MA. Determination of fecal coliform contamination of water supplies in some rural areas of Sari, Iran with most probable number test. J Mazandaran Univ Med Sci 2013;23(104):89-95.
8. Zazouli MA, Safarpour Ghadi M, Veisi A, Habibkhani P. Bacterial contamination in bottled water and drinking water distribution network in semnan, 2012. J Mazandaran Univ Med Sci 2013;22(1):151-9.
9. Bonacorsi S, Bingen E. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. Int J Med Microbiol 2۰۰۵ ; ۲۹۵ (۶):۳۷۳ -۸۱.
10. Jeong H, Han S-j, Yoo H-N, Choi S-J, Oh S-Y, Kim Y-J, et al. Comparison of changes in etiologic microorganisms causing early-onset neonatal sepsis between preterm labor and preterm premature rupture of membranes. J Matern-Fetal Neonatal Med 2015;28(16):1923-8.
11. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. Virulence. 2014;5(1):170-8.
12. Molaabaszadeh H, Hajisheikhzadeh B, Mollazadeh M, Eslami K, Mohammadzadeh Gheshlaghi N. Study of sensibility and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Tabriz city. J Fasa Univ Med Sci 2013;3(2):149-54.
13. Rajendran P, Ajjampur SSR, Chidambaram D, Chandrabose G, Thangaraj B, Sarkar R, et al. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. Diagn microbiol infect dis 2010;68(2):117-22.
14. Safarpordehkordi F, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Poultry Meat Supply in Isfahan. Iran J Med Microbiol 2014;8(2):41-7.
15. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11(1):142 -201
16. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ 2003;81(3):197-204.
17. Gomez-Duarte OG, Romero-Herazo YC, Paez-Canro CZ, Eslava-Schmalbach JH, Arzuza O. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with childhood diarrhoea in Colombia, South America. J Infect Dev Ctries 2013;7(05):372-81.
18. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. Rev infect dis 1990;12(Supplement 1):S41-S50.
19. Okeke IN, Lamikanra A, Steinrück H, Kaper JB. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. J clin microbiol 2000;38(1):7-12.
20. Abbasi M, Aslani MM, Mostafavi E, Alikhani MY, Nikbin VS. Determination of Adhesion Virulence Factors of Enteropathogenic *Escherichia coli* (eaeA-, bfpA-) Isolates from Asymptomatic Individuals Compared to those with Diarrhea. Modares J Med Sci Pathol 2013;15(4):99-108.
21. Kargar M, Daneshvar M, Homayoun M. Prevalence of shiga toxins, intimin and hemolysin genes of *Escherichia coli* O157: H7 strains from industrial ground meat in Shiraz. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2011;18(675): 512-520
22. Saberi F, Salmanian AH, Amani J, Jafari M. Production of Chimeric Tir-intimin Protein from *E. coli* O157: H7 in the Tobacco (*Nicotiana glauca*) Plant and its Immunological Evaluation in an Animal Model. Modares J Med Sci Pathol 2012;15(3):23-36.
23. Louie M, De Azavedo J, Handelsman M, Clark C, Ally B, Dytoc M, et al. Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O :۱۵۷H7. Infect immun 1993;61(10):4085-92.
24. Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, Shakib P. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran. Feyz J Kashan Univ Med Sci 2013;17(2).
25. Association APH, Association AWW, Federation WPC, Federation WE. Standard methods for the examination of water and wastewater: APHA.; 1915.

26. Akter S, Islam M, Afreen K, Azmuda N, Khan S, Birkeland N. Prevalence and distribution of different diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulotypes in major water bodies in Bangladesh. *Epidemiol infect* 2013;141(12):2516-25.
27. Dallal MMS, Sepehri S, Bafrouei AT, Khiabani ZD. Determination of genotype variation of *Escherichia coli* in well water of Tehran's parks by Multiplex PCR. *Pajoohandeh Journal*. 2011;16(5):226-33.
28. Widmer K, Van Ha NT, Vinitnantharat S, Sthiannopkao S, Wangsaatmaja S, Prasetiati MAN, et al. Prevalence of *Escherichia coli* in surface waters of Southeast Asian cities. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;29(11):2115-24.
29. Halabi M, Orth D, Grif K, Wiesholzer-Pittl M, Kainz M, Schöberl J, et al. Prevalence of Shiga toxin-, intimin-and haemolysin genes in *Escherichia coli* isolates from drinking water supplies in a rural area of Austria. *Int j hyg environ health* 2008;211(3):454-7.
30. Sidhu JP, Ahmed W, Hodgess L, Toze S. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl environ microbiol* 2013;79(1):328-35.