

## شناسایی ژنهای *afa* و *sfa*، *fim* و *pap* در سویه های اشریشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در کرمان به روش PCR چند گانه

مهدی زیدآبادی نژاد<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>

### چکیده

۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی.

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی.

**زمینه و هدف:** عفونت دستگاه ادراری دومین عامل شایع عفونت در بدن انسان می باشد. در میان عوامل عفونت دستگاه ادراری اشریشیاکلی شایع ترین باکتری عامل عفونت ادراری در هر دو جنس می باشد.

**روش بررسی:** در این بررسی ۲۰۰ نمونه ی ادراری جهت شناسایی اشریشیاکلی کشت داده شد. جدایه ها بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی استاندارد تشخیص داده شد و DNA استخراج شده از جدایه های تأیید شده به منظور تعیین ژن های *papEF*، *fimH*، *afaBC* و *sfa/focDE* به روش Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** در مجموع، از ۱۱۰ جدایه ی اشریشیاکلی از نمونه های ادراری کشت داده شده شناسایی گردید. بررسی ژنوتیپی ژن های حدت نشان داد که ۴۲/۵ درصد از جدایه ها حداقل یکی از ۴ ژن حدت را دارا بودند. ژن *papEF* با ۲۱/۸۱ درصد بیشترین فراوانی و ژن های *sfa/focDE* و *fimH* به ترتیب ۴/۵۴ و ۲/۷۷ و ژن *afaBC* (۱/۸۱ درصد) کمترین درصد فراوانی داشتند. ۳۲ جدایه (معادل ۲۹/۰۹ درصد) واجد هر دو ژن *papEF* و *afaBC* بودند.

**نتیجه گیری:** عفونت های دستگاه ادراری، از نگرانی های بهداشتی گسترده ای محسوب می شود که منطبق بر مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد. علت تفاوت نتایج با سایر مطالعات می تواند به دلیل تفاوت مناطق جداسازی نمونه ها باشد.

**واژه های کلیدی:** اشریشیاکلی، ژن های بیماریزا، عفونت مجاری ادراری.

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

\*نویسنده مسؤل:

کیومرث امینی؛ دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

## مقدمه

براساس خصوصیات بیماری‌زایی هر کدام از به آنها و علائم بالینی میزبان، سویه های بیماری‌زای *E.coli* به چندین گروه یا پاتوتایپ تقسیم می‌شوند (۹). UPEC عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری (UTI) در کشورهای توسعه یافته است (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). UTI رایج‌ترین بیماری‌های عفونی انسان محسوب می‌شود (۱۴). در ایالات متحده آمریکا (USA) هر ساله ۱/۶ میلیون دلار هزینه صرف درمان این عفونت‌ها می‌گردد. تخمین زده می‌شود که ۴۰-۵۰٪ از زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یک بار UTI را تجربه می‌کنند (۱۵). این بیماری عفونی معمولاً با عفونت مثانه شروع می‌شود اما اغلب با فرا گرفتن کلیه‌ها توسعه پیدا می‌کند و سرانجام ممکن است منجر به نارسایی کلیوی شود و حتی به خون هم راه یابد (۱۳). توانایی UPEC برای ایجاد عفونت علائم دار دستگاه ادراری به دلیل وجود دو نوع عامل ویرولانسمی باشد: ادهسین‌ها (فیمبریه نوع I، P- فیمبریه، S- فیمبریه، FIC- فیمبریه و ...) و توکسین مانند همولیزین، فاکتور نکروز دهنده تومور (۱۳، ۱۶ و ۱۷). UPEC دارای فاکتورهای اتصال هستند به نام پیلی یا فیمبریه، که به آنها اجازه می‌دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز کنند (۱۴). ادهسین‌ها آنتی ژنهای فیمبریالی هستند که باکتری را قادر می‌سازند تا به موکوس روده متصل شود (۱۸). از ادهسین‌های معمول موجود در UPEC می‌توان به P فیمبریا، فیمبریا نوع ۱، S فیمبریا، FIC فیمبریا و خانواده ادهسین Dr (۱۹) که شامل ادهسین Dr و ادهسین‌های فیمبریا می‌باشد، نام برد (۲۰). این فیمبریه‌ها، به ترتیب، توسط ژنهای *afa*، *foc*، *sfa*، *fim*، *pap* کد می‌شوند (۲۱). در UPEC، فیمبریا نوع ۱ مهم‌ترین عامل حداث است. تعدادی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه این ژن را تولید می‌کنند. فیمبریه نوع ۱ به وسیله بیش از ۹۰٪ سویه های *E.coli* بیان می‌شود

عفونت مجرای ادراری نوعی پاسخ التهابی این مجرا نسبت به تهاجم عوامل عفونی از جمله باکتری‌ها می‌باشد. میکروارگانیزم‌های مختلف قادر هستند از راه مجرای ادراری وارد مثانه شده و با طی مسیری به سمت کلیه‌ها حرکت کنند. چنانچه قسمت‌های تحتانی مجرای ادراری مانند پیش‌آب راه و مثانه درگیر شوند عفونت را التهاب مثانه (سیستیت) گویند و بیمار از سوزش و درد در هنگام خروج ادرار رنج می‌برد (۱). *اشریشیاکلی* عضوی از خانواده انتروباکتریاسیه می‌باشد که توانایی کلونیزه شدن و دوام در زیست‌گاه‌های متعدد محیطی و جانوری را دارد (۲). سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زای خارج روده ای می‌توانند در محل‌هایی مانند خون، سیستم اعصاب مرکزی، و سیستم ادراری کلونیزه شده و سبب بیماری شوند. سویه‌های UPEC شایع‌ترین سویه‌های عامل بیماری در انسان هستند (۳). این سویه‌ها دارای تیپ I فیمبریه هستند که غالباً به چسبیدن به نسج مخاطی واژن و مجاری ادراری تمایل دارند. عوامل چسبنده در سویه‌های UPEC شامل پیلی S، خانواده Dr، پیلی P تیپ I فیمبریه هستند که تیپ I فیمبریه بیش‌تر در ارتباط با ایجاد سیستیت توسط سویه‌های حامل است. برای بیان تیپ I فیمبریه، حداقل ۹ ژن که در دسته ژنی *fim* قرار دارند، نیاز است. مطالعات نشان داده‌اند که *fimH* برای جذب باکتری به داخل سلول اپی‌تلیال مثانه لازم است (۴). *E.coli* جزء فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم محسوب می‌شود (۵ و ۶). این باکتری‌ها اگرچه معمولاً بی‌ضرر می‌باشند، چندین سویه از *E.coli* عوامل ژنتیکی (ژنهای ویرولانس) را به دست آورده‌اند که به آنها خاصیت بیماری‌زایی برای انسان و حیوان می‌بخشد (۷ و ۸). این پاتوژنها مسئول ایجاد چند نوع عفونت بالینی مثل بیماری‌های انتریک و اسهالی، عفونت‌های دستگاه ادرار، سپسیس و مننژیت هستند.

نگهداری شدند تا در مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گیرند (۲۳-۲۴).

### استخراج DNA

به منظور تکثیر ژنهای هدف؛ ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از کیت ( CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. توالی الیگونوکلئوتیدی از آغازگرهای موجود استفاده در جدول یک استفاده شد (جدول ۱) (۱۷). پس از BLAST آغازگرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی 0.05 Taq DNA polymerase (MgCl<sub>2</sub> 3 mM، dNTPs 0.4mM، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰.۵ μg/ml) در مقایسه با سویه استاندارد /شریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۳ الکتروفورز گردید (۱۷).

(۲۲). با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار و خانواده او رخ خواهد داد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف شناسایی ژنهای *pap* و *sfa fim* و *afa* /شریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان کرمان به روش PCR چند گانه صورت پذیرفته است.

### روش بررسی

این مطالعه توصیفی- مقطعی (cross-sectional) از اردیبهشت لغایت مهر سال ۱۳۹۴ تعداد ۲۰۰ نمونه ادراری به صورت کاملاً تصادفی از افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری از بیمارستان باهنر و سیدالشهدا کرمان در ظروف مخصوص جمع آوری ادرار و استریل جمع آوری گردید. نمونه های دارای ۱۰<sup>۵</sup> یا بیشتر از باکتری به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شد. نمونه ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) کشت داده و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه منتقل شدند. تمامی نمونه ها با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر اکسیداز، احیای نیترات، سیمون سیترات، واکنش TSI، اوره آز، اندول، حرکت، MR/VP و لیزین دکربوکسیلاز (مرک، آلمان) تعیین هویت شدند. جدایه های تعیین هویت شده در محیط عصاره قلب-مغز آگار (BHI) (مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت و در ۷۰-درجه سلسیوس

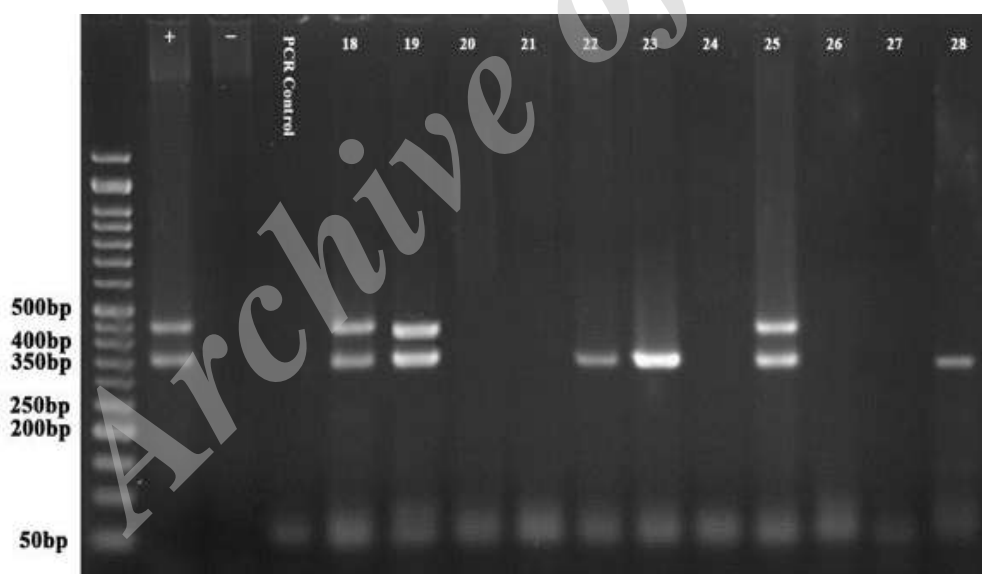
جدول ۱: توالی الیگونوکلیوتیدی استفاده شده در این تحقیق به عنوان پرایمر (۱۷)

پرایمر	توالی پرایمر (۵'→۳')	اندازه محصول (bp)
<i>Pap</i>	1: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AATA	۳۳۶
<i>Sfa</i>	1: CTCCG GAGAACTGGGTGCATCTTAC 2: CGG AGGAGT AA TTA CA AACCTGGCA	۴۱۰
<i>afa</i>	1: GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC 2: CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	۷۵۰
<i>Fim</i>	1: GTT GTT CTG TCG GCT CTG TC 2: TAA ATG TCG CAC CAT CCA G	۴۰۰

### یافته ها

*sfa*، ۳ جدایه نیز (۲/۷۷٪) دارای ژن *fimH* و ۱ جدایه (۱/۸۱٪) دارای ژن های *afa* بودند. ۳۲ جدایه (۲۹/۰۹٪) واجد هر دو ژن *papEF* و *afaBC* بودند. در شکل ۱ نتایج آنالیز مولکولی نشان داده شده است.

از ۲۰۰ نمونه ای اخذ شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری، ۱۱۰/شریشیاکلی جداسازی و مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که ۲۴ جدایه (۲۱/۸۱٪) دارای ژن *pap* ۵ جدایه (۴/۵۴٪) دارای ژن



شکل ۲: نتیجه آزمایش (Multiplex-PCR) به ترتیب از چپ به راست: نشانگر ۵۰ bp، شاهد مثبت، شاهد منفی، چاهک ۱۸، ۱۹ و ۲۵ جدایه های مثبت از نظر وجود ژن های *pap* و *saf*، چاهک های ۲۲، ۲۳ و ۲۸ جدایه های مثبت از نظر وجود ژن *pap* می باشد.

جنس مؤنث با طول دوره ی بستری و مدت زمان استفاده از سوند اداری مرتبط است (۱۳).

Blanco و همکاران در پژوهشی که در ارتباط با جداسازی ژن های حدت یوروپاتوژنیک /شریشیاکلی به وسیله آزمایش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از روش های فنوتیپ ژن های *sfa*، *afa* و *pap* بالاترین درصد را در عفونت های اداری نشان دادند (۳۳). عربی و همکاران در پژوهشی بر روی ژنوتیپ فیمبریه مشترک در عفونت اداری /شریشیاکلی از ۳۴۳ سویه باکتری /شریشیاکلی ایزوله شده، توزیع ژن های فیمبریه *sfa*، *pap* و *afa* بیشترین فراوانی را در تولید عفونت اداری بعد از آزمایش PCR داشتند که به ترتیب ۸۷/۷ درصد (۳۰۱ مورد)، ۲۳/۹ درصد (۱۱۳ مورد) و ۱۶/۶ درصد (۵۷ مورد) می باشند (۳۴). به طور کلی می توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با نتایج این پژوهش، میزان ژن *pap* در جدایه ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده اند و ژن های فیمبریه *fimH* و *sfa* سپس در رتبه های بعدی قرار گرفته اند. مطالعه توسط ناظمی و همکاران در سال ۹۰ روی توزیع فراوانی ژنهای کد کننده فیمبریه در *E.coli* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه اداری صورت گرفت. میزان شیوع ژن های فیمبریه *foc* (۱۷٪)، *afa* (۱۰٪)، *pap* (۳۵٪) و *fim* (۹۴٪)، *sfa* (۳۱٪) تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *pap* و *fim* شایعترین ژنهای کد کننده فیمبریه در /شریشیاکلی جدا شده از عفونت اداری در شهر تهران می باشد که با این پژوهش که ژن *papEF* بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داد هم خوانی دارد (۳۵). در بیشتر مطالعات، ژن های *pap* و *sfa* دارای ترکیب ژنی می باشند و مقایسه مطالعات پیشین با مطالعه ی اخیر نشان داد که بیشترین عفونت اداری در زنان وجود دارد و بیشترین فراوانی مربوط به ژن های *pap* و *sfa* می باشد. مؤثرترین ژن در ایجاد عفونت

عفونت مجاری اداری یکی از شایعترین بیماری های با منشاء باکتریال در انسان می باشد. شایع ترین عامل اتیولوژیک این بیماری باکتری *E.coli* بوده، که با وجود آنتی ژن ها و توکسین های مختلف دخالت کننده در ایجاد عفونت، مهمترین عامل ویرولانسی در سویه های یوروپاتوژنیک /شریشیاکلی فیمبریه P می باشد (۲۶). در بین عوامل حدت در جدایه های بیماری زای /شریشیاکلی از موارد عفونت های اداری، فیمبریه ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند. فیمبریه P به عنوان یکی از فیمبریه های مقاوم به مانوز است که بیشترین نقش را در ایجاد عفونت های اداری داشته است (۲۸-۲۷). در مطالعه حاضر، فیمبریه P به عنوان یکی از مهم ترین ژن های حدت به میزان ۲۱/۸۱ درصد شناسایی گردید. با توجه به اینکه حضور این فیمبریه به عنوان یکی از مهم ترین عوامل خطر در بروز عفونت بالا رونده ی اداری انسان محسوب می گردد، گزارش های زیادی در کشورهای مختلف در این زمینه وجود دارد (۲۹). در بررسی حاضر فیمبریه S به عنوان یکی از عوامل آدهزینی مورد بررسی قرار گرفت و فراوانی آن ۴/۵۴ درصد گزارش گردید. فراوانی ژن *afa* در مطالعه حاضر ۱/۸۱ درصد شناسایی شد. بر اساس نتایج این تحقیق ۴۲/۲ درصد از جدایه ها واجد ژن های حدت بودند. فرشاد و همکاران گزارش کردند که در جهرم فراوانی ژن های فیمبریه *pap* ۳۰/۲ درصد است و شیوع بیشتری نسبت به فیمبریه *sfa* (۱۸/۷۵ درصد) دارد (۳۰). در مطالعه دیگری که در شهر سائوپائولو برزیل توسط Tiba و همکاران انجام شد، فراوانی ژن های *papE/F* (۳۲/۷ درصد)، *sfaD/E* (۲۷/۸ درصد) و *afaB/C* (۶/۲ درصد) برآورده شده است (۳۱). فراوانی ژن های بررسی شده در مطالعه حاضر، همخوانی بیشتری با یافته های Arisoy و همکاران نشان می دهد (۳۲). به نظر می رسد ابتلا به عفونت های اداری بیمارستانی که عامل ایجاد کننده ی آن /شریشیاکلی بود، در

عفونت‌های دستگاه ادراری، از نگرانی‌های بهداشتی گسترده‌ی محسوب می‌شود که منطبق بر مناطق جغرافیایی متفاوت می‌باشد. عفونت‌های باکتریایی دستگاه ادراری همراه با توسعه‌ی گونه‌های مقاوم در برابر درمان آنتی بیوتیکی در تمام گروه‌های سنی یافت می‌شوند. با توجه به شیوع بالای عفونت‌های مجاری ادراری و افزایش بروز پدیده مقاومت در این ایزوله‌ها، بررسی دوره‌ای و مداوم میزان مقاومت و مکانیسم ایجاد مقاومت در باکتریها می‌تواند در انتخاب مناسب‌ترین گزینه درمانی موثر باشد.

ادراری ژن *pap* می‌باشد. با توجه به این که حدود یک سوم از جدایه‌ها در این بررسی دارای ژن‌های فیمبری‌ای بودند و بیشترین فراوانی مربوط به ژن *pap* و سپس *sfa* می‌باشد، نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه‌ی شناسایی ژن‌های فیمبری‌ای در عفونت‌های ادراری انسان ضروری به نظر می‌رسد، دو سوم از جدایه‌ها بدون اینکه دارای ژن فیمبری‌ای باشند قابلیت ایجاد بیماری را دارند.

## نتیجه‌گیری

## منابع

- 1-Eslami M, Najar Peerayeh S. Phenotypic and genotypic identification of TEM, PER and VEB beta lactamase genes in the clinical *Escherichia coli* strains. Arak medical university journal. 2012; 15(1); 1-9.
- 2-Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections. In: morbidity and economic costs. Dis Mon. 2003; 49: 53-70.
- 3-Klumpp J, Weiser C, Sengupta S, Forrestal G, Batler A, Schaeffer J. Uropathogenic *E. coli* potentiates type I pilus-induced apoptosis by suppressing NF-KB. *Infect Immun*. 2001. 6689-96.
- 4-Salyers A, Whitt D. Bacterial pathogenesis. In : A molecular approach. 2th ed. Washington DC. AMS Press; 2002. 534-542.
- 5-West DM, Sprigings KA, Cassar C, Wakeley PR, Sawyer J, and Davies RH. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor gene using multiplex real-time TaqMan1 PCR assays. *Vet Microbiol*. 2007; 122: 323-33.
- 6-Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, and Denamur E. The Link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*. 2009; 546-553.
- 7-Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, and Harel J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNAmicroarrays. *J Clin Microbiol*. 2003; 2113-2125.
- 8-Ulett G, Mabbett A, Fung Kh, Webb R, and Schembri M. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *J Microbiol*. 2007; 2321-2331.
- 9-Schwan W, Lee J, Lenard F, Matthews B, and Beck M. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and Type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002; 1391-1402.
- 10-Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Pans*. 2002; 17020-17024.
- 11-Raksha R, Srinivasa H, and Macaden RS. Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* urinary tract infections. *Indian J Med Microbiol*. 2003; 21(2): 102- 107.
- 12-Matiuzzi da Costa M, Drescher G, Maboni F, Weber Sh, de Avila Botton S, Henning Vainstein M, Schrank IS, and Castagna de Vargas A. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of brazile. *Brazilian J Microbiol*. 2008; 39:741-743.
- 13-Sorsa J. Characterization of genomic diversity in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) and development of a diagnostic DNA microarray for the differentiation of ExPEC isolates causing urinary tract infections. *Acad Disser Gene Microbiol*. 2007; 1-16.
- 14-Santo E, Macedo C, and Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in ribeirão preto, sao paulo, brazile. *Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48(4):185-188.

- 15-Snyder J, Haugen B, Lockett CV, Maroncle N, Hagan E, Johnson D, Welch R, and Mobley H. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2005; 75:88–7596.
- 16-Alex P, Stouracova K, Hamric J, and Rychlik I. Gene typing of the colonization K88 (F4) in enterotoxigenic *E.coli* strains isolated from diarrhoeic piglets. *Vet Med- Czech*. 2001; 46-49.
- 17-Birosova E, Siegfried L, Kmetova M, Makara A, Ostro A, Gresova A, et al. Detection of virulence factors in ahaemolytic *Escherichia coli* strains isolated from various clinical materials. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 569–573.
- 18-Blanco M, Leonel L, Blanco J, Dahbi Gh, Mora A, Cecilia L, Gonzalez E, and Blanco J. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol*. 2006; 9:53-60.
- 19-Mulvey M. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 2002; 4(5): 257–271.
- 20-Riberio M, Yano Tand Silva Leite D. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Inst Med trop Sao Paulo*. 2008; 50(5):255-260.
- 21-Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, and Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *Immunol Med Microbiol*. 2002; 33: 23-26.
- 22-Soderhall M. The importance of *Escherichia coli* fimbriae in urinary tract infection. Department of Nephrology. 2001; 1-8.
- 23-Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology: with student consult*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2012.
- 24-Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6(39): 6811-6.
- 25-Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, and Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12(2): 85-90.
- 26-Hosseini F, Goudarzi M, Bambaee B, Moradibid Hendi S. Molecular study of the impact of solid surface on type one fimbriae phase variation in *E. coli* serogroups O44 causing urinary tract infection. *Kerman medical university journal*. 2009; 16(3): 215-223. [In Persian]
- 27-Terai A, Yamamoto S, Mitsumori K, Okada Y, Kurazono H, Takeda Y, et al. *Escherichia coli* virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis. *Int J Urol* 1997; 4(3): 289-94.
- 28-Gunther NW, Snyder JA, Lockett V, Blomfield I, Johnson DE, Mobley HL. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect Immun* 2002; 70(7): 3344-54.
- 29-Ishitoya S, Yamamoto S, Mitsumori K, Ogawa O, Terai A. Non-secretor status is associated with female acute uncomplicated pyelonephritis. *BJU Int* 2002; 89(9): 851-4.
- 30-Farshad S, Emamghoraishi F, Japoni A. Association of virulent genes hly, sfa, cnf-1 and pap with antibiotic sensitivity in *Escherichia coli* strains isolated from children with community-acquired UTI. *Iran Red Crescent Med J* 2010; 12(1): 33-7.
- 31-Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50(5): 255-60.
- 32-Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsoy ED, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. *Int J Clin Pract* 2006; 60(2): 170-3.
- 33-Blanco M, Blanco JE, Rodriguez E, Abalia I, Alonso MP, and Blanco J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. *Journal of Microbiological Methods* 1997; 31(12): 37-43.
- 34-Arabi Sh, Tohidi F, Naderi S, Nazemi A. The common fimbriae genotyping in uropathogenic *Escherichia coli*. *Annals of Biological Research* 2012; 3(10): 4951-4.
- 35-Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Miri Nargesi MS, Sharifi S. Distribution of fimbriae genes encoding in *E.coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Laboratory Journal*. 2011; 4(2): 121-129.

## Detection of *pap*, *fim*, *sfa* and *afa* Genes in *Eschreshia Coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection by Multiplex-PCR in Kerman, Iran

Mehdi Zeidabadi Nejad <sup>1</sup>, Kumarss Amini <sup>2\*</sup>

1-MSc Department of Microbiology.

2-Assistant Professor of Microbiology.

1-Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

2- Assistant Professor of Microbiology.

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

\*Corresponding author:

Kumarss Amini; Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. Tel: +989125454074

### Abstract

**Background and Objective:** Urinary tract infection is the second most common infection in the human body. Among the causes of urinary tract infections, *E. coli* is one of the most common urinary tract pathogens in both genders.

**Subjects and Methods:** In this study, 200 urine samples to detect *E. coli* were cultured. Isolates were identified by standard biochemical tests and DNA extracted from isolates confirmed to determine the genes *papEF*, *fimH*, *afaBC* and *sfa/focDE* by Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chain reaction) method.

**Results:** In total, 110 *E. coli* strains from urine samples cultured were identified. The genotype virulence genes showed that 42.5 % of the isolates at least one of the four acuity type gene. *PapEF* gene with 21.81 % was the most frequent gene. While *sfa* and *focDE* genes had 4.54 and 2.77 % frequencies respectively. Thirty two samples (29.09%) had both *fimH* and *afaBC* genes.

**Conclusion:** Urinary tract infections are considered as a widespread health concern that is consistent with different geographic regions. The reason for the difference in results with other studies can be due to the difference in sample isolation regions.

**Keywords:** *Eschreshia coli*, Virulence genes, Urinary tract infection.

►Please cite this paper as:

Zeidabadi Nejad M, Amini K. Detection of *pap*, *fim*, *sfa* and *afa* Genes in *Eschreshia Coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infection by Multiplex-PCR in Kerman. *Jundishapur Sci Med J* 2017; 16(4):393-400.

Received: May 16, 2016

Revised: Aug 9, 2017

Accepted: Aug 12, 2017