تعیین الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بستری و سرپایی در مرکز آموزشی ـ درمانی امام خمینی تبریز

جاوید صادقی: کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: javid4888@yahoo.com
دکتر محمدرضا نهایی: استاد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد اصغرزاده: استادیار فرآورده های بیولوژیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۳/۶/۲۵، باز نگری نهایی: ۸۳/۱۲/۲۵، پذیرش: ۸۴/۲/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: عفونت های دستگاه ادراری بعد از عفونت های تنفسی شایع ترین عفونت محسوب می شوند و در زنان شایع ترند. در بین باکتری های مسبب عفونت هـای دسـتگاه ادراری اشریشـیاکلی ها بیشترین سهم را دارا هستند. برای مطالعه این باکتری ها روش های متنوعی براساس خصوصیات فنوتیپی و روش های ژنتـیک وجود دارد. خصوصیات فنوتیپی تمایل زیادی به تغییر دارند ولی روش های ژنتیک تغییرات کمتری را نشان می دهند. آنالیز DNA پلاسمیدی اطلاعات مفیدی را در مـورد منشأ اپیدمی و تعداد کلون های متفاوت موجود در یک اپیدمی به دست می دهد. لذا جهت مطالعه الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بستری و سرپایی و بررسی ارتباط محتمل در ساختار پلاسمیدهای جدا شده از سویه های فوق با استفاده از آنزیم های محدودالاثر این تحقیق انجام شد تا ارتباط اپیدمیولوژیک بین سویه های جدا شده مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها : تعداد ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه های ادراری بیماران بستری و سرپایی جدا شده و با روش های معمول باکتریولوژیک مورد شناسایی قرار گرفتـند.DNA پلاسـمیدی ایـن سـویه هـا بـا اسـتفاده از روش لـیز قلیایی تغییر یافته استخراج شد. سپس DNA پلاسمیدی استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکـتروفورز گـردید. بعـد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید پلاسمیدهای جداشده با نور اولتراویوله مورد شناسایی قرار گرفتند.جهت شناسایی باندهایopen circular از supercoiled از دو روش الکـتروفورز دو بعـدی و بـرش آنزیمـی استفاده شد. برای هضم آنزیمی چهار آنزیم محدودالاثر Eco Rl ، Hind III ، BamH1 و SmaI مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: از ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیماران با عفونت دستگاه ادراری الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی و الگوی پلاسمیدی مورد شناسایی قرار گرفت. کلیهسـویه هـا (۱۰۰٪) بـه آمیکاسـین حسـاس بودنـد، در حالـی که ۹۹ سویه(۹۹٪) به آمپی سیلین مقاومت نشان دادند. حساسیت در برابر نیتروفورانتوئین ۹۶درصد، سیپروفلوکساسـین ٦٤درصـد، نالیدیکسیک اسید ۵۷ درصد و کوتریموکسازول ۲۷درصد به دست آمد. از این تعداد ۱۰ سویه فاقد هرگونه پلاسمید بودند و از ۹۰ سویه باقیمانده ۱ تا ۷ پلاسمید شناسایی شد. وزن مولکولی پلاسمیدهای جداشده عمدتاً در محدوده kb ۹۰/ . تا kb ۲۱ بود. گرچه در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از kb ۲۱ نیز شناسایی شد. بیشترین تعداد پلاسمیدها در سویه های جداشده از بیماران بستری بود و نیز پلاسمیدهای با وزن مولکولی زیاد در این سویه هـا ردیابـی شـد. هشتادو سه سویه(۸۳ ٪) مقاوم به آمپی سیلین پلاسمید kb ۲۱ را داشتند. از مجموع ۹۰ سویه دارای پلاسمید ٤٤ الگوی پلاسمیدی به دست آمد. در نتـیجه برش با آنزیم های محدودالاثر الگوهای برشی مشابهی در برخی از سویه ها مشاهده شد و در مواردی که الگوی برشی متفاوتی حاصل می شد باندهای مشابهی مورد شناسایی قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشانگر حضور پلاسمید در سویه های اشریشیاکلی مولد عفونت دستگاه ادراری در بیماران سرپایی و بستری بوده و تشابه زیـادی در الگوهـای پلاسـمیدی و الگوهای برشی سویه های جداشده از عفونت های بیمارستانی از یک بخش خاص و از بخش های مختلف در یک زمان کوتاه به دست آمد که احتمال منشأ گرفتن این باکتری ها از یک کلون باکتریایی یا شیوع بالای انتقال ژن در بین سویه های بیمارستانی را مطرح می سازد.

کلید واژه ها: الگوی پلاسمیدی، اشریشیاکلی، عفونت دستگاه ادراری، مقاومت دارویی

مقدمه

عفونت های دستگاه ادراری بعد از عفونت های تنفسی شایع ترین عفونـت به شمار می روند(۳-۱). در بین باکتری های مسبب عفونت هـای دستگاه ادراری اشریشیا کلی ها بیشترین سهم را دارا هستند و به عـنوان شـایع ترین باکتری ها نقش ایفا می کنند، به طوری که بیش از ۸۰ درصـد عفونـت های دستگاه ادراری در بیماران سرپایی و بیش از ۵۰ درصـد عفونـت های یادشده در بیماران بستری را ایجاد می کنند (۵-۳). بـرای مطالعـه ایـن باکـتری هـا روش هـای متنوعی براساس خصوصـیات فنوتیپـی و ژنتیک وجود دارد. خصوصیات فنوتیپی نظیر

Archive of SID
www.SID.ir

الگوهـای بیوشـیمیایی، تعیین تیپ فاژ، آنتی ژن های سطحی سلول و الگـوی حساسـیت بـه آنتـی بیوتیک ها و عوامل ضد میکروبی تحت شـرایط وضـعیت های رشد، فاز رشد و جهش خود به خودی تمایل زیـادی بـه تغییـر دارنـد، ولـی خصوصیات ژنتیک نظیر آنالیز DNA پلاسـمیدی و کروموزومـی بـا استفاده از پروب های DNA، PFGE (pulse field gel electrophoresis) و PCR (polymerase chain reaction) تغییـرات کمـتری را نشـان مـی دهـند(۸-٦). آنالیز DNA پلاسـمیدی اطلاعـات مفـیدی را در مورد منشأ اپیدمی و تعداد کلون های متفاوت موجود در یک اپیدمی به دست می دهد (۱۱-۹). هدف ایـن پـژوهش راه اندازی استخراج و خالص سازی DNA پلاسمیدی باکـتری هـا و اسـتفاده از الگوی پلاسمیدی باکتری ها برای پیدا کردن منشـأ اپیدمـی ها و همچنین مشخص کردن تعداد کلون های متفاوت موجـود در اپیدمـی محـتمل بود که با استفاده از باکتری های شایع در عفونت های ادراری در بیماران بستری و سرپایی انجام شد.

اولیـن بار «مارمور[1]» و همکارانش در ۱۹٦۱ توانستند با استفاده از روش سـانتریفوژ شـیب غلظتـی DNA پلاسـمیدی را از باکـتری اشریشـیاکلی جدا کنند(۱۲). از آن زمان به بعد روش های زیادی برای جـدا کـردن DNA پلاسـمیدی از باکـتری هـا به کار برده شده است (۱۳و ۱٤). ایـن روش ها برای نوع خاص باکتری از قبیل باکتری های گـرم مثبـت(۱۹-۱۵) یا گرم منفی(۲۲-۲۰) ، اندازه پلاسمیدها، تعیین الگـوی پلاسـمیدی، هضـم با آنزیم های محدودالاثر یا اهداف بالینی سازگار شده اند(۲۳).

بعـد از اسـتخراج DNA از الکـتروفورز در ژل آگـارز جهـت جداسـازی، شناسایی و خالص سازی DNA استفاده می شود. در این روش ساده و سریع جهت مشخص نمودن محل DNA در داخل ژل از رنگ آمیزی با رنگ های فلورسنت نظیر اتیدیوم بروماید یا SYBR Gold استفاده می شود(۲۴و۲۵).

از الگـوی پلاسمیدی (۱و ۲٦) و الگوی هضم پلاسمیدها با آنزیم هـای محدودالاثـر در مطالعـات اپیدمـیولوژیک به خوبی استفاده شده اسـت. لـذا ایـن مطالعـه جهـت راه اندازی استخراج و خالص سازی DNA پلاسمیدی باکتری ها و استفاده از الگوی پلاسمیدی باکتری ها بـرای تجسس منشأ اپیدمی ها و همچنین مشخص کردن تعداد کلون های متفاوت موجود در باکتری های شایع در عفونت های ادراری در بیماران بستری و سرپایی انجام شد.

مواد و روش ها

تعداد ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری بیماران بستری در بخش های ریه (۱۷ سویه)، کلیه (۱٤ سویه)، گوارش (۱۰ سویه)، مغز و اعصاب (۹ سویه) و بیماران سرپایی (۵۰ سویه) مرکز آموزشی- درمانی امام خمینی تبریز جمع آوری شدند. کلیه این سویه های باکتریایی جمع آوری شده با تعداد $>10^5$CFU/ml از نمونه های ادراری بیماران به دست آمده و با روش های باکتریولوژیک مرسوم مورد شناسایی قرار گرفتند(۲۹-۲۷). جهت انجام آزمون حساسیت در برابر مواد ضد میکروبی از روش دیسک دیفیوژن(کربی ـ بائر)در برابر٦ آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین، کوتریموکسازول، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانتوئین استفاده شد. کلیه آنتی بیوتیک ها از شرکت MAST تهیه شدند.

برای استخراج و خالص سازی DNA پلاسمیدی از رشد باکتری هـای تحت مطالعه در محیط کشت LB محتوی آمپی سیلین(۵۰ µg/ml) اسـتفاده شـد کـه از رشد ۲٤ ساعته باکتری در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB تلقیح نموده و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ ^{o}c انکوبه گردید. سـپس۵ /۱ میلـی لیتر از کشت باکتریایی به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر منـتقل و بـه مدت ٤ دقیقه در دور ٦۰۰۰g سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و مرحله فوق در همان لوله تکرار شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر از بافر لیز کننده (محتوی گلوکز ۵۰ mM، ۱۰mM EDTA و mM ۲۵Tris-HCl، pH=۸) کـه بـه مـدت ۱۰ دقـیقه در یخچال ۲۰ ^{o}c- نگهداری شده بود در وضعیت فوق العاده سرد بر روی رسوب سلولی ریخـته شـد و سپس سلول ها با استفاده از سمپلر در محلول به شکل سوسپانسـیون در آمدنـد. سوسپانسـیون سـلولی بـه مدت ۵ دقیقه در حـرارت آزمایشگاه انکوبه شد. در مرحله بعد ۰/٤ ml محلول دناتوره کننده(محتوی۲N NaOH/ و SDS ۱٪ تازه تهیه شده) اضافه و سر لوله بسـته شد و ٦ بار به آرامی سر و ته شد و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه گردید. سپس ۰/۳ میلی لیتر از محلول استات پتاسیم (محتوی ۱۲۰ میلی لیتر استات پتاسیم ۵M ، ۲۳ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۵۷ میلـی لیـتر آب مقطـر کـه در٤ ^{o}c نگهـداری می شد و قبل از مصـرف به ظرف محتوی یخ منتقل می شد) در وضعیت سرد اضافه گردید. شش بار به آرامی سر و ته شد و به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه شـد.محـتویات لولـه بـه مـدت ۵ دقـیقه در دور ۱۲۰۰۰g در٤ ^{o}c سانتریفوژ شد، ۷۵۰µl از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد.

بـر روی ۷۵۰µl از مـایع رویـی فـوق، ۱/۵ µl از RNase A (Fermentase) بـا غلظت ۱۰ mg/ml (غلظت نهایی۲۰µg/ml) افزوده شـد و بـه مـدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ ^{o}c انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون ۷۵۰µl از محلول فنل متعادل شده/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱/۲٤/۲۵) اضـافه شد و به مدت یک دقیقه ورتکس گردید و سپس بـه مـدت ٤ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g در٤ ^{o}c سانتریفوژ شد. آنگاه مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و برروی آن ۷۵۰µl از اتانل۹٦٪ کـه بـه مـدت ۱۰ دقیقه در یخچال۲۰ ^{o}c- نگهداری شده بود افزوده شد و پس از بستن سر لوله ٦ بار سروته گردید و به مدت ۲ ساعت در ۲۰ ^{o}c- انکوبـه شـد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g در ٤ ^{o}c سانتریفوژ گردید ، مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب سفید رنـگ باقـیمانده در تـه لولـه بـا اتـانول ۷۰ درصـد شستشو داده شد. محـتویات لولـه بـه مدت ۱ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد و مـایع رویـی دور ریخـته شـد و میکروتیوب برای آبگیری به صورت وارونـه در روی دسـتمال کـاغذی قـرار گرفت. درب میکروتیوب به مـدت ۱۰- ۵ دقـیقه به شکل باز نگهداری شد تا اتانل باقیمانده تبخیر شـود و سـپس۵۰ µl از بافر [محتوی(pH=8) Tris-HCl ۱۰mM و

1. Marmur

Archive of SID

www.SID.ir

۱mM EDTA] بـر روی رسـوب ریخـته شـد و رسوب در آن حل گردید. از لامبدا DNA برش داده شده با آنزیم های Eco R1 و HindIII بـه عنوان کنترل مثبت و از اشریشیاکلی فاقد پلاسمید با PTCC شماره ۱۳۳۸ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بـرای الکـتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج و خالص شده از ژل آگـارز ۰/۸ درصـد اسـتفاده شـد. بعـد از تهیه ژل آگارز، ۵ µl از محلـول DNA پلاسـمیدی تهیه شده با ۱ µl از بافر لود کننده حاوی ۰/۲۵ درصـد بروموفنل بلو ، ۰/۲۵ درصد گزیلن سیانول و ۳۰ درصد گلیسرول در آب) مخلوط گردید و در چاهک موجود در ژل قرار داده شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل آگارز به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بافر محـتوی ۰/۵ µg/ml اتـیدیوم بـرومایـد رنـگ آمیزی شد. پس از رنگ آمـیزی از نـور اولتراویـولـه (۳۰۰nm) بـرای شناسایی باندهای DNA استفاده شد، برای تعیین اندازه قطعات بدست آمده از سایز مارکر لامبدا DNA استفاده شد.

جهـت شناسـایی باندهـای open circular(oc) از باندهـای covalently closed circular(ccc) از الکـتروفورز دو بعـدی و بـرش آنزیمی با آنزیم های EcoR1 و HindIII استفاده شد (۲۱، ۲٤و ۳۰).

برش آنزیمی پلاسمیدها با استفاده از آنزیم های محدودالاثر Eco Rl ، Hind III ، BamH1 و SmaI مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده (Fermentase) انجام گرفت، که پس از برش دادن پلاسمیدها، در روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

سـویه های جمع آوری شده از بیماران سرپایی و بستری با روش هـای مرسـوم آزمایشـگاهی تعیین هویت شدند. کلیه سویه ها از نظر تخمـیر گلوکـز و لاکـتوز، حرکت، آزمایش MR و دکربوکسیلاسیون لیزیـن و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، اکسـیداز و تولید اوره آز منفی ثبت شدند. از نظر تولید SH۲ یک سویه مثبت وجود داشت و بقیه منفی بودند. نتایج مقاومت سویه های آزمایشـی در برابـر آنتـی بیوتـیک های مورد مطالعه به شرح زیر بود: آمپی سیلین۹۹درصد، کوتریموکسازول۷۳درصد، سیپروفلوکساسین۳٦ درصد، نالیدیکسیک اسید٤۳درصد، نیتروفورانتوین ٤ درصد، در حالی کـه کلـیه سـویه های تحت مطالعه در برابر آمیکاسین حساس بودند. تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه های E.coli بررسی شده از ۱تا ۷ عدد بود (*نمودار* ۱).

انـدازه مولکولـی پلاسـمیدهای جـدا شده از kb ۰/۹ تا kb ۲۱< متغیـر بود. ده سویه فاقد هر گونه پلاسمید بودند، در حالی که در ۹۰ سویه باقیمانده حضور DNA پلاسمیدی به اثبات رسید. در ۲٦ سویه فقـط یک پلاسمید شناسایی شد، در حالی که در ٦٤ سویه باقیمانده از ۲ تا ۷ پلاسمید شناسایی شدند.

مقایسه الگوی پلاسمیدی مشابه در یک بخش و در بین بخش های بیمارستانی تحت مطالعه در *جدول* ۱ نشان داده شده است. بیشترین تعداد پلاسمید در سویه های جدا شده از بخش کلیه به دست آمد. همچنین سویه های E.coli جدا شده از این بخش حضور پلاسمیدهای با وزن مولکولی بالا را نشان داد(*جدول* ۱).

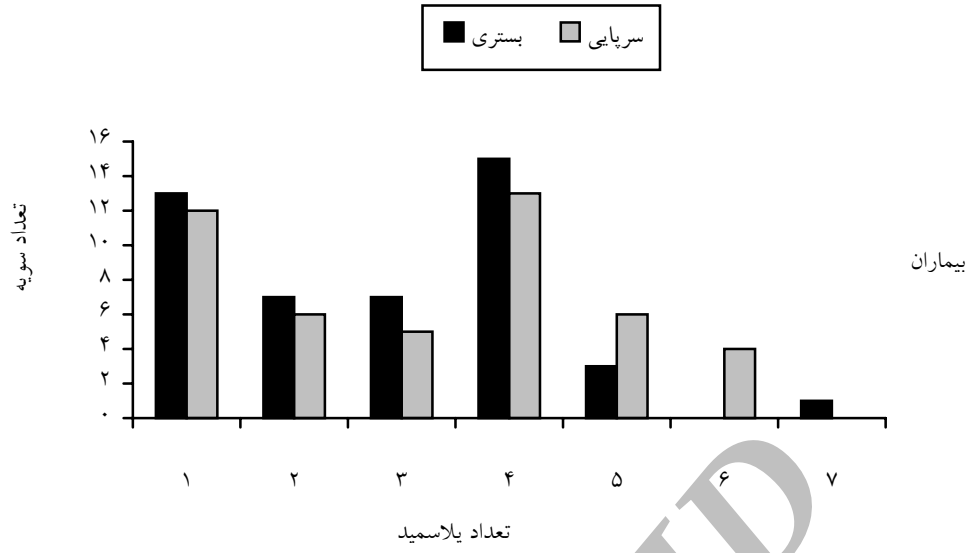
در *شـکل* ۱ الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از سویه های آزمایشی نشان داده شده اند. با توجه به حضور DNA کروموزومی در آزمایش های الکتروفورز به عمل آمده و مزاحمت باند یاد شده از نظر تعییـن تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه ها نسبت به حذف DNA کروموزومی اقدام شد و بعد از حذف DNA کروموزومی نتایج بهتری از آنالیز پلاسمیدها به دست آمد.

جهـت مشـخص کـردن باندهای open circular(oc) از باندهای covalently closed circular(ccc) از روش الکـتروفورز دو بعـدی و هضـم آنزیمی پلاسمیدها استفاده شد. در روش الکتروفورز دو بعدی پـس از تاثـیر نور اولتراویوله باندهای OC جدید به وجود آمد که این باندهـا با باندهای OC قبلی و باندهای SC یک مثلث تشکیل دادند که از ایـن طریق این باندها از یکدیگر شناسایی شدند. این روش در کلیه سـویه هـای مطالعه شده موفقیت آمیز بود. در روش برش آنزیمی اگر یـک محـل شناسـایی برای آنزیم در روی پلاسمید وجود داشته باشد آنـزیم پلاسمید را از آن سایت برش داده و پس از برش فقط یک باند در الکتروفورز مشاهده می شود که در این تحقیق در بسیاری از موارد نتـیجه موفقیـت آمـیز بود، گرچه در برخی از موارد بیش از یک محل شناسایی در روی پلاسمید وجود داشت که امکان افتراق باندها فراهم نگـردید. بدیـن طـریق باندهـای OC شناسایی شد و در ثبت الگوی پلاسمیدی سویه های آزمایشی مد نظر قرارگرفت. الگوی برشی سویه هـای دارای پلاسـمید با وزن مولکولی یکسان با استفاده از آنزیم های SmaI , Hind III , Eco R1 و BamHI در *شـکل* ۲ نشان داده شده است که در مواردی الگوی برشی متفاوت و در برخی از موارد الگوی برشـی یکسـانی حاصـل شـد. در بیـن پلاسمیدهای با الگوی برشی متفاوت باندهای مشابهی به دست آمد.

اشریشـیاکلی همانـند سـایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه از نظر مقاومـت در برابر آنتی بیوتیک ها شهرت زیادی دارد و غالباً در درمان عفونـت های ادراری ناشی از این باکتری از آنتی بیوتیک هایی از قبیل نیتروفورانتوییـــن، نالیدیکســیک اســید، سیپروفلوکساســین و کوتریموکسـازول اسـتفاده می شود(۳٤-۳۲). سویه های جدا شده از بـیماران بستری و سرپایی الگوی حساسیت متفاوتی را به آنتی بیوتیک هـا نشـان مـی دهند. در این پژوهش کلیه سویه های بررسی شده در برابـر آمیکاسین حساس بودند. در حالی که ۹۹ سویه (۹۹٪) در مقابل آمپـی سـیلین مقاومـت نشـان دادنـد. مقاومـت بـه آنتـی بیوتیک های کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانتویین در سویه های جدا شـده از بیماران بستری بیشتر از سویه های جدا شده از بیماران سرپایی بود. نتایج حاصل از آزمون حساسیت در برابر سیپروفلوکساسین مقاومت بیشـتری را در سویه های جدا شده از بیماران سرپایی در مقایسه با سویه های جدا شده از بیماران بستری نشان داد.

Archive of SID

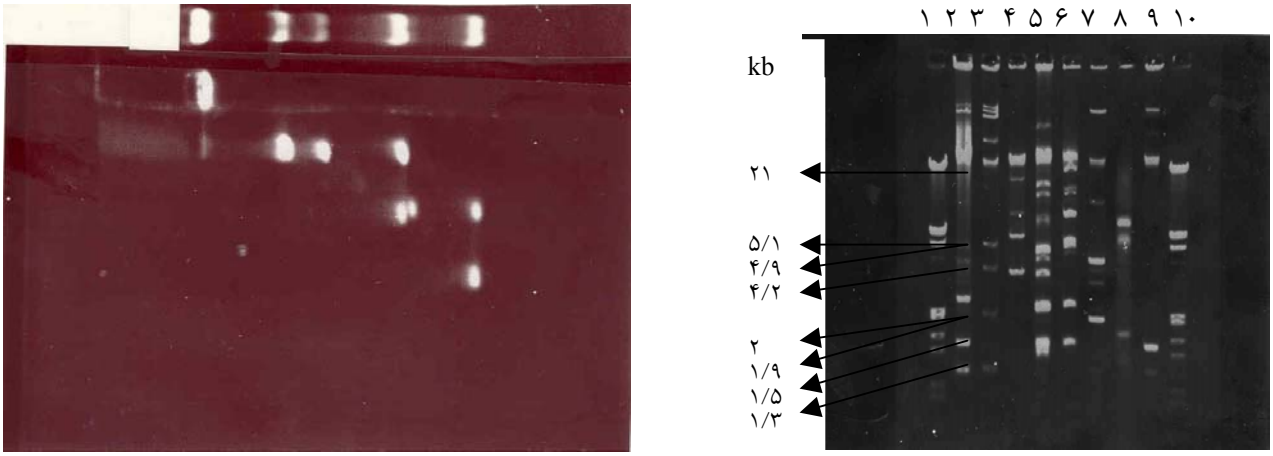
www.SID.ir



نمودار ۱: مقایسه تعداد پلاسمید در بین سویه های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی.

جدول ۱: الگوهای پلاسمیدی مشابه در یک بخش و در بین بخش ها

الگوی پلاسمیدی (وزن مولکولی kb)	تعداد سویه های جدا شده با الگوی پلاسمیدی یکسان از بخش			
	ریه	کلیه	گوارش	مغز و اعصاب
۱ ، ۱/۵ ، ۲۱ ، ۲۱<	۰	۰	۲	۰
۲۱	۷	۲	۲	۱
۲/۵ ، ۵ ، ۱۵ ، ۲۱	۰	۱	۰	۱
۲/۵ ، ۳/۵ ، ۱۵ ، ۲۱	۱	۱	۰	۰
۱/۷ ، ۳ ، ۳/۵ ، ۲۱	۱	۱	۰	۰
۱/۳ ، ۱/۷ ، ۳/۵ ، ۲۱	۲	۰	۰	۰
۱ ، ۲/۵ ، ۳ ، ۲۱	۲	۱	۰	۰
۱ ، ۳ ، ۲۱	۱	۰	۰	۱
۱ ، ۲۱	۰	۲	۰	۰

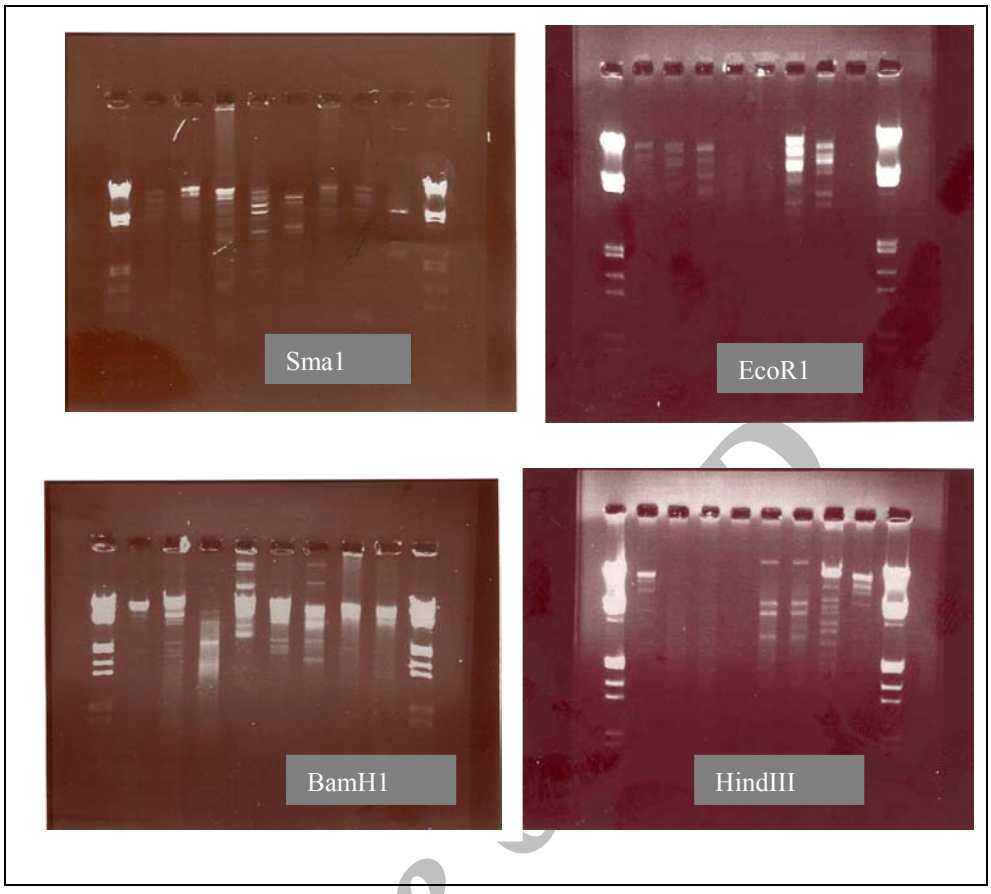


شکل ۱ : الکتروفورز DNA پلاسمیدی در ژل آگارز ۸/درصد: در این شکل با اعمال تغییراتی در روش استخراج DNA پلاسمیدی، باندهای مربوط به DNA کروموزومی حذف شده اند و باندهای مشاهده شده در ردیف اول (بعد از چاهک ها) در برخی از سویه ها، باندهای پلاسمیدی هستند

شکل ۲: الکتروفورز دو بعدی جهت شناسایی باندهای open circular از باندهای خطی و supercoil. باندهایی که پس از الکترفورز در جهت دوم با یکدیگر مثلث تشکیل می دهند مربوط به یک پلاسمید هستند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳: الگوی برشی سویه های دارای پلاسمید یکسان با آنزیم های SmaI , Hind III , Eco R1 و BamHI.
الگوهای برشی مشابهی در نتیجه اثر آنزیم های Hind III و BamHI مشاهده می شود.

بحث

عفونت دستگاه ادراری بیماری رایج و عود کننده ای است که سالانه تقریباً ۱۱ میلیون زن از آن متأثر می شوند و این عفونت یکی از علل اصلی عفونت های بیمارستانی به شمار می رود(٦و۲۷). معمولاً عفونت دستگاه ادراری به عنوان عامل اپیدمی در نظر گرفته نمی شود و فقط گزارش های محدودی از شیوع عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشریشیاکلی در خارج از بیمارستان در دست است (٦). احتمالاً چنین شیوع هایی اتفاق می افتد ولی به دلیل زیاد بودن این قبیل عفونت ها و اینکه ارگانیسم های بسیار متفاوتی در ایجاد آن نقش دارند به آسانی قابل ردیابی نیستند. اشریشیاکلی عامل تعدادی از بیماری های انسانی بوده و معمولاً(بیش از ۸۰ درصد موارد) عامل عفونت دستگاه ادراری است(٦، ۱۱و ۳۱). این باکتری از نظر ژنتیکی هتروژن است و ترادف کمتر از ۷۰ درصد دارد، در حالی که ژنوم های انسان و شامپانزه ۹۸ درصد هومولوژی ترادف نشان می دهند(٦). با توجه به هتروژنیسیته فوق و اینکه این باکتری جزو فلور طبیعی روده است، طبیعی است که سویه های بسیار متفاوتی از این باکتری باعث پیدایش عفونت دستگاه ادراری شوند(٦). ژنوم باکتری کاملاً تغییرپذیر است. علاوه بر اضافه شدن و حذف ژن های موجود در کروموزوم، فنوتیپ باکتری ها با از دست دادن یا با کسب پلاسمیدها تغییر می یابند؛ به عنوان مثال، مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها از طریق پلاسمیدهای R منتقل می شود و شیوع خصوصیت خاص از طریق انتقال پلاسمیدها(انتقال عمودی و افقی) بهتر از انتقال یک کلون باکتریایی خاص اتفاق می افتد(٦).

نظر به اینکه خصوصیات فنوتیپی از قبیل الگوهای بیوشیمیایی ، باکتریوفاژ تایپینگ ، وجود آنتی ژن های سطحی سلول و الگوهای حساسیت ضد میکروبی بر اساس تغییرات در شرایط رشد ، مرحله رشد و جهش خود به خودی تمایل به تغییر دارند، استفاده از این خصوصیات برای شناسایی منبع عفونت یا بیماری های ایجاد شده توسط گونه های هتروژن نظیر اشریشیاکلی مفید نبوده یا ارزش محدودی خواهد داشت، برای شناسایی اپیدمیولوژی چنین سندرم های چند عاملی و گونه های هتروژن استفاده از روش های مولکولی نظیر PFGE، AP-PCR و آنالیز الگوی پلاسمیدی یا استفاده از الگوی برشی DNA پلاسمیدی یا کروموزومی به وسیله آنزیم های محدودالاثر ضروری است(۸-٦).

Archive of SID

www.SID.ir

روش های متنوعی برای استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری ها وجـود دارد(۱۷،۱۶،۳۵). در ایـن پـژوهش به دلیل سهولت و سرعت روش، عـدم نـیاز به اولتراسانتریفوژ و قیمت نسبتاً ارزان، مقدار DNA اسـتخراج شـده و مناسـب بـودن آن برای هضم آنزیمی از روش لیز قلیایـی اسـتفاده شـد. بعـد از اسـتخراج DNA از باکتری های تحت مطالعـه بـرای شناسایی پلاسمیدهای به دست آمده از الکتروفورز در ژل آگارز استفاده شد. با توجه به نتایج مطالعات اولیه[1] و نیز نتایج سایر مطالعـات(۲٤، ۲۵، ۳٦و ۳۷) از آگـارز ۰/۸ درصـد بـرای جداسازی پلاسـمیدهای اسـتخراج شـده و از آگـارز ۱ درصـد بـرای مطالعـه پلاسـمیدهای برش داده شده با آنزیم های محدودالاثر استفاده شد. در آزمایش الکتروفورز پلاسمیدها در سه شکل supercoil, linear, open circular ممکـن اسـت دیـده شـوند کـه هـر یک باند مجزایی را در الکـتروفورز ایجـاد مـی کنـند. شکل supercoil به خاطر فشرده بودن سریع تر از دو شکل دیگر حرکت می کند و بعد از آن شکل خطی و دست آخر open circular حرکت می کند(۱۱، ۲۱، ۲٤، ۳۸و ۳۹).

بهتریـن روش بـرای افـتراق ایـن سه شکل از DNA برش دادن پلاسـمید با آنزیم های محدودالاثر است، به شرطی که فقط یک محل شناسایی برای آنزیم در روی پلاسمید تحت مطالعه وجود داشته باشد. بـا الکـتروفورز نمودن آنها در کنار یکدیگر می توان اشکال مختلف را شناسایی کرد (٤۰،۲٤). در این پژوهش برای افتراق باندهای مختلف و شناسـایی دقـیق تعـداد پلاسـمیدهای موجود در سویه های آزمایشی عـلاوه بر برش آنزیمی از روش الکتروفورز دو بعدی نیز استفاده شد. لازم بـه ذکر است که استفاده از الکتروفورز دو بعدی انتخاب باندهای open circular و supercoil را برای استخراج از ژل تسهیل می کند(۲۱).

مطالعـه الگـوی پلاسـمیدی روش مولکولـی رایـج در مطالعات اپیدمـیولوژیک و بـرای بررسی ارتباط بین سویه های باکتریایی است. تعـداد و اندازه پلاسمیدهای موجود به عنوان راهی برای شناسایی بهتر سویه های باکتریایی در آنالیز شیوع عفونت های بیمارستانی و عفونت هـای کسـب شـده از جامعـه به کار می رود(۷، ۳۷و ٤۱). استفاده از الگـوی پلاسمیدی برای شناسایی سویه هایی که حاوی پلاسمیدهای چند گانه باشند بهتر جواب می دهد(٤۲). مطالعات متعددی در جهت اثـبات شیوع باکتری های خاص با استفاده از الگوی پلاسمیدی انجام شـده اسـت. اشریشـیاکلی از جملـه باکـتری هایـی اسـت که الگوی پلاسـمیدی آن در محل های مختلف و از منابع متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است(٤۸-٤۳).

در ایـن تحقـیق الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونـت هـای دستگاه ادراری بیماران بستری و سرپایی مطالعه شدند. نـتایج بـه دست آمده نشان داد که ۹۰ درصد سویه های تحت مطالعه حـاوی پلاسمید بودند. نتایج مشابهی در سایر تحقیقات به دست آمده اسـت. در تحقیقی که ورلاند[2] و همکارانش بر روی اشریشیاکلی ها انجـام دادنـد، ۸۷/۵ درصد از سویه ها دارای پلاسمید گزارش شدند (٤۹). در پـژوهش دیگـری کـه بـه وسیله وو-جوو[3] و همکارانش بر روی اشریشـیاکلی های به دست آمده از عفونت های دستگاه ادراری انجام شد، ۷۲ درصد سویه ها حاوی پلاسمید بودند(۱). در تحقیقات انجـام گرفـته بـر روی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت دستگاه اداری در ایـران نیز نتایج مشابهی حاصل شده است، به طوری که در مطالعـات انجـام شـده بـه وسیله نوروزی و همکاران ۹۳/۹ درصد از سـویه هـا دارای پلاسمید گزارش شده اند(۵۰). نتایج مطالعه امیدی و همکـاران نیز بیانگر حضور پلاسمید در ۸۳/۲ درصد از سویه ها بوده اسـت(۵۱). تعـداد پلاسـمیدهای جدا شده در سویه های مطالعه ما از یک تا ۷ عدد بود. در مطالعاتی که به وسیله یوسف و ملکاوی[4] (٤٦) و ورلانـد و همکارانش(٤۹) بر روی اشریشیاکلی ها انجام گرفت تعداد پلاسـمیدها را از یـک تـا ۶ عـدد گـزارش نمودنـد. وزن مولکولـی پلاسـمیدهای شناسایی شده در مطالعه ما عمدتاً در محدوده ۱ kb تا ۲۱kb بود و در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۲۱kb نـیز شناسـایی شد. در تحقیق انجام گرفته به وسیله یوسف و ملکـاوی انـدازه پلاسمیدها از ۱/۵ kb تا ۵٤ kb گزارش شده است (٤٦). در مطالعـه تسـن و چـای[5] اندازه پلاسمیدها از ۲ kb تا ۲۲ kb بـوده اسـت(٤۷). در مطالعـه حاضـر ۸٤ درصـد از سـویه‌هـا حاوی پلاسـمید بـا وزن مولکولـی ۲۱ kb بودنـد. از طرف دیگر، ۹۹ درصد سـویه هـا به آمپی سیلین مقاوم بودند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که ژن کد کننده مقاومت در برابر آمپی سیلین در روی پلاسمید ۲۱ kb قـرار گرفـته باشد. لازم به ذکر است که در مطالعه یوسف و ملکاوی، ژن کـد کننده مقاومت به آمپی سیلین بر روی پلاسمید۲۵ kb به اثبات رسـیده است(٤٦). جهت اثبات ارتباط پلاسمید ۲۱ kb شناسایی شده در مطالعـه حاضر و مقاومت در برابر آمپی سیلین با روش های حذف پلاسمید و مطالعه حساسیت باکتری یا با انتقال این پلاسمید به باکتری شـناخته شـده دیگـر قـابل انجـام اسـت کـه جهت اثبات این ارتباط مطالعاتی در حال انجام است.

در پـژوهش حاضـر از ۱۰۰ سـویه مـورد مطالعـه ۴۴ الگـوی پلاسـمیدی بـه دسـت آمد که بیانگر حضور شایع پلاسمید در سویه های اشریشیاکلی در باکتری های محیط ما است. در مطالعه وو-جوو و همکـاران بـر روی اشریشـیاکلی هـای جـدا شده از عفونت های دسـتگاه ادراری از ۳۲ سـویه مـورد مطالعـه ۱۳ الگوی پلاسمیدی به دسـت آمـد(۱) کـه نتایج این مطالعه مطابق با یافته های پژوهش حاضر اسـت. در مطالعـه انجـام یافـته بـه وسـیله هونگ[6] و همکاران برروی اشریشـیاکلی هـای بـه دسـت آمده از بخش هماتوانکولوژی از ۸ سویه مورد مطالعه ۸ الگوی متفاوت به دست آمد(٤۸) که پراکندگی و تفاوت اساسی در الگوی پلاسمیدی در سویه های فوق الذکر را نشان می دهد.

نـتایج پژوهش حاضر حاکی از تشابه در الگوی پلاسمیدی سویه هـای جـدا شـده از یـک بخـش و نیز در بخش های مختلف تحت مطالعـه بود. همچنین الگوهای پلاسمیدی یکسانی در سویه های جدا شده از بیماران سرپایی به دست آمد.

در مطالعـات قبلـی بـه حضور حداقل ۳ پلاسمید و تشابه آنها در سـویه هـای مخـتلف بـه عـنوان معـیار قابل اطمینان در ایجاد ارتباط اپیدمـیولوژیک اشـاره شـده اسـت کـه چنیـن مطالعاتـی بـه ویژه در سـویه هـای اسـتافیلوکوک کواگـولاز منفـی، کلبسیلا پنومونیه و سایر باسـیل هـای گـرم منفـی گزارش شده است(۷، ٤۲و ۵۲). در مطالعه

1. Pilot study
2. Vorland
3. Woo-Joo
4. Malkavi & Yossef
5. Tsen & Chi
6. Hong

Archive of SID

www.SID.ir

حاضر الگوهای پلاسمیدی مشابهی با تعداد ۳ و بیش از ۳ پلاسمید در اشریشیاکلی های جدا شده از بخش ریه و بخش گوارش و نیز در بخش های گوارش و کلیه ، اعصاب و کلیه ، اعصاب و ریه ، کلیه و ریه شناسایی شد که نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک آنها است. زمانی که تعداد پلاسمیدها کمتر از ۳ عدد و اندازه پلاسمیدها نسبتاً بزرگ باشد قدرت افتراق الگوی پلاسمیدی کاهش می یابد و باید از روش های دیگری نظیر برش آنزیمی برای افتراق سویه ها استفاده کرد(۷و ٤۲).

استفاده از آنزیم های محدودالاثر در پلاسمیدهای کوچکتر از kb ۵۰ که تعداد پلاسمید موجود در یک سویه نیز کمتر از ۳ عدد باشد، قدرت افتراق را افزایش می دهد(۷و ٤۲). در این پژوهش سویه های دارای پلاسمید منفرد و دو تایی با آنزیم های محدودالاثر EcoRI، HindIII، BamH1 و SmaI برش داده شده و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج به دست آمده حاکی از تشابه الگوهای برشی در برخی سویه های به دست آمده از یک بخش خاص(ریه) بیمارستان بود که نشان دهنده منشأ منفرد این سویه ها از یک کانون است یا شیوع بالای انتقال ژن را در بین سویه های تحت مطالعه نشان می دهد.

References

1. Woo-Joo K, Hee-Jin J, Hyun-Jin P, Min-Ja K, Seung-chull P: Application of ribotyping for molecular epidemiologic study of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Korean J Infect Dis1995; 27(6): 505-517.
2. Salyers AA, Whitt DD: Microbiology diversity, disease and the environment., Bethesda, Maryland, Fitzgerald Science Press 2001; 369-373.
3. Lionsquy G, Delaitte E, Pin P, Bourlioux P, Bourlioux N: Incidence of isolation and antbiotic resistence of E.coli responsible for urinary infections outside hospitals,in specialized hospitals and in general hospitals. Pathol Biol(Paris) 1984; 32(5): 389-92.
4. Selvarangan R, Goluszko P, Singhal J, Carnoy C, Moseley S, HudsonB: Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in Escherichia coli renal persistence. Infect Immun 2004; 72(8): 4827-35.
5. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O.: Uropathogenic Escherichia coli triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. Infect Immun 2004; 72(8): 4570-8.
6. Foxman B, Riley L: Molecular epidemiology: Focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-1141.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Georing RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(6): 426-439.
8. Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A: Molecular analysis of pseuodomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. Irn J Med Sci 1996; 21(3&4): 118.
9. Bennet PM, Howe TGB: Topley and Wilson, bacterial and bacteriophage genetics in: systematic bacteriology, 9th ed. Arnold, Avon, bath press 1998; 251-261.
10. Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH: Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. Frontiers in Bioscience 1999; 3: 43-62.
11. Novick RP: Plasmids. Scientific American 1980; 243(6): 76-90.
12. Broda P: Plasmids, San Francisco, W.H. Freeman and Company Limited 1979; 5-22, 125-136.
13. Trevors JT: Bacterial plasmid isolation and purification. J Microbiol Meth 1985; 3: 259-271.
14. Gerry P, Le Blanc DJ, Falkow S: General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J Bac 1973; 116(2): 1064-1066.
15. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc Acids Res 1979; 7: 1513-23.
16. Holmes DS, Quigley M: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analy Biochem 1981; 114: 193-7.
17. Kado CI, Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145: 1365-1373.
18. Olsen JE: An improved method for rapid isolation of plasmid DNA from wild-type Gram-negative bacteria for plasmid restriction profile analysis. Letters Appl Microbiol 1990; 10: 209-12.
19. Domenico P, Marx JL, Schoch PE, Cunba BA: Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. J Clinic Microbiol 1992; 30: 2859-63.
20. Wilson CR, Totten PA, Baldwin JN: Rapid procedure for the detection of plasmids in Staphylococcus epidermidis. Appl Envir Microbiol 1978; 36: 368-74.
21. Nahaie MR, Goodfellow M, Harwood CR: A rapid screening procedure for staphylococcal plasmids. J Microbiol Meth 1984; 2: 73-81.
22. Takahashi S, Nagano Y: Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J Clinic Microbiol 1984; 20: 608-13.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Bertin A: Comparison of several procedures for plasmid profile determination in Escherichia coli. J Microbiol Meth 1995; 22: 109-117.
24. Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning. A laboratory manual, volume 1, 3rd ed. New York, CSHL Press 2001; 1.1-1.34, 5.1-5.17.
25. Vanden Heuvel JP: General molecular biology techniques in: PCR protocols in molecular toxicology, CRC Press LLC 1998; 177-221.
26. Petrovska M: "Plasmid profile of nosocomial klebsiella pneumoniae". N.d. Available From yahoo. http://manu.edu.mk/rcgeb/tempus/, Accessed 20 December 2002.
27. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: Baily Scotts, diagnostic microbiology. Eleventh edition. New York, Mosby 2002; 927-938.
28. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A: Practical medical microbiology. Thirteenth edition, Edinbourg ,Churchill Livingstone 1996; 361-384.
29. MacFaddin JF: Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2000; 221-232, 239-253.
30. Hinterman G, Fischer HM, Crameri R, Hutter R: Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. Plasmid 1981; 5: 371-373.
31. Souza V, rocha M, Valera A, Eguiarte LE: Genetic structure of natural populations of Escherichia coli in wild hosts on different continents. App and Env Microbiol 1999; 65(8): 3373-3385.
32. 32.Walker TS: Microbiology, sanders text and review series. Philadelphia, W.B Saunders 1998; 152-172.
33. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA: Medical microbiology, LANGE, twenty second edition. New York, Mc Grow Hill 2001; 88-108.
34. Moustaoui N, Soukri A, Elmdaghri N, Boudouma M, Benbachir M.: Molecular biology of extended-spectrum β-lactamase-producing Entrobacteriaceae responsible for digestive tract colonization. J Hos Infec 2004; 57(3): 202-208.
35. Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual, second edition, New York,CHSL Press 1989.
36. Agarose gel electrophoresis. N.d. Available from yahoo. http://faculty.plattsburgh.edu, Accessed 4 December 2003.
37. Schaberg DR, Tompkins LS, Falkow S: Use of agarose gel electrophiresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacilli. J Clinic Microbiol 1981; 13(6): 1105-1108.
38. Lewin B: Genes VI. New York, Oxford 1997; 429-470, 505-530.
39. Isolation of plasmid DNA and restriction enzyme digests. Honors cell and molecular biology laboratory. BS/LBS/159H, 101-107.
40. Agarose gel electrophoresis of DNA. *Biotechnology Index.* N.d. Available from tbzmed.http://arbl.cvmbs.colostate.edu, Accessed 16 February 2003.
41. Tenover FC: Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strain identification and survilence of nosocomial and community-acquired infections. Clin Lab Med 1985; 5: 413-436.
42. Towner KJ, Cockayne A: Molecular methods for microbial identification and typing. London, Chapman & Hall 1995; 28-63.
43. Teophilo GN, Silva RH, Vieira F, Rodrigues P, Menezes FG: Escherichia coli isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. Int Microbiol 2002; 5: 11-14.
44. Prats G, Mirelis B, Miro E, Navarro F, Liovet T, Johnson JR, Camps N, Dominguez A, Salleras L: Cephalosporin-resistant Escherichia coli among summer camp attendees with Salmonellosis. Emerging Infect Dis 2003; 9(10): 1273-1280.
45. Smith SI, Aboaba OO, Adebiyi T, Onibokum H, Odunu kwe NN: Plasmid profile of Escherichia coli O157:H7 from apparently healthy animals. Afr J Biotechnol 2003; 2(9): 322-324.
46. Malkawi HI,Youssef MT: Antibiotic susceptibility testing and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from diarrhoeal patients. J Trop Pedi 1998; 44(3): 128-132.
47. Tsen HY, Chi WR: Plasmid profile analysis for enterotoxigenic Escherichia coli and detection of heat stable enterotoxin I(ST1) gene by Polymerase Chain Reaction. J Food and Drug Analysis 1996; 4(3): 215-222.
48. Jin-Hong Y, Dong-Ho H, Dong-Wook K, Chi-Wha H, Yang-Ree K, Kyung-Mi K, Wan-Shik S, Chong-Won P, Chun-Choo K, Moon-Won K, Dong-Jip K: Molecular epidemiology analysis of outbreak of Escherichia coli bacteremia in Hemato-Oncology unit. Korean J Infect Dis 1995; 27(2): 175-180.
49. Vorland LH, Carlson K, Aalen O: Antibiotic resistance and small R plasmids among Escherichia coli isolates from outpatients urinary tract infections in Northern Norway. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy 1985; 27(1): 107-113.
50. Nowroozi J, Jafari negad A, Owzaei E: Plasmid profiles of UTI patients with or without urinary stones. Abstracts, The 4th Congress of Microbiology, Shahed University, Tehran 2001; 141.
51. Omidi MN, Tavakoli A, Safaie HG, Shahcheraghi F: Plasmid analysis, antibiotic resistance in Escherichia coli isolated from UTI. Abstracts, 6th Iranian Congress of Microbiology, Tehran 2004; 70.
52. Suljagic V, Cobeljic M: Reliability of plasmid profile analysis in the identification of epidemic strains of bacteria causing an outbreak of intestinal infections. Vojnosanit pregl 2001; 58(6): 615-20.

Archive of SID

www.SID.ir