مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۱، شماره ۵۲
خرداد– تیر۹۷، صفحه ۹۴۰-۹۴۹

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 61, No.2 P: 940-949
May-June 2018

مقاله اصلی

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۱- تاریخ پذیرش:۹۷/۰۳/۰۱

حسن ممتاز[۱*]
غلامرضا بنی‌شریف دهکردی [۲]
فاطمه بنی‌شریف دهکردی[۳]
شکوفه بنی‌طالبی دهکردی[۴]

۱ استاد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد
۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد
۳ کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
۴ کارشناس پرستاری، گروه پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد

* گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶٤
Email: hamomtaz@iaush.ac.ir

خلاصه

مقدمه

*اشریشیاکلی*های یوروپاتوژنیک (UPEC) یکی از شایع‌ترین عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشند که سروتیپ‌های مختلفی از این گروه سرمی که دارای تنوع ژنتیکی هستند در ایجاد این عفونت‌ها دخالت دارند. مطالعه حاضر با هدف دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های یوروپاتوژن *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش کار

تعداد ۶۷ ایزوله UPEC که از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری جدا شده بودند، انتخاب و به روش ERIC-PCR آزمایش شدند.

نتایج

ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدوده ۱۱۰ تا ۳۱۰۰ جفت باز بودند که در آنالیز الگوی باندینگ حاصله با ضریب تشابه تطابق ساده در سطح تشابه ۹۱ درصد در ۱۵ زیرگروه قرار گرفتند. بجز قرابت ۱۰۰ درصدی که در ۴ مورد دیده شد، سایر ایزوله ها دارای قرابت ژنتیکی بین ۴۴/۴ تا ۴۸/۱٪ بودند. قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چند زیر گروه نشان گر قدرت تمایزدهی قابل قبول تکنیک ERIC-PCR در ژنوتایپینگ *اشریشیاکلی* و وجود منابع مختلف آلودگی دستگاه ادراری با این پاتوژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

روشERIC-PCR، روشی ساده، سریع و کم‌هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* ازجمله سویه‌هایUPEC می‌باشد.

کلمات کلیدی

*اشریشیاکلی*های یوروپاتوژنیک، دسته بندی ژنتیکی، ERIC-PCR، استان چهارمحال و بختیاری

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

www.SID.ir

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است که به طور عمده توسط باکتری *اشریشیاکلی*) ایجاد می‌شود (۱). *اشریشیاکلی* عامل ۹۰-۸۰٪ از موارد UTI اکتسابی از جامعه و۵۰-۳۰٪ از UTI بیمارستانی می‌باشد (۲). این عفونت از علل عمده بستری شدن بیماران در بیمارستان با عوارض قابل‌توجه و هزینه‌های بالای مراقبت بهداشتی است (۳).

تشخیص و درمان مؤثر UTI یک نگرانی جدی در زمینه مراقبت‌های بهداشتی است (۴). در سراسر جهان حدود۱۵۰میلیون نفر مبتلا به UTI تشخیص داده شده که سالانه بالغ بر۶ میلیارد دلار هزینه درمانی آن در جهان می باشد (۵). شدت عفونت دستگاه ادراری به دو عامل بیماری‌زایی باکتری و خصوصیات میزبان بستگی دارد (۱). *اشریشیاکلی* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت مجاری ادراری که به نام *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) قلمداد می‌شود عوامل حدت مختلفی ازجمله آلفا همولیزین، فاکتور نکروزدهنده سایتوپاتیک، عوامل چسبندگی و سیستم‌های اکتساب آهن را دارا می‌باشد که با داشتن این عوامل منجر به آسیب بافتی می‌شود (۸-۶).

تحقیقات نشان داده که شیوع فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های UPEC، با پاتوژنیسیته ادراری در ارتباط می‌باشد. به عنوان مثال دیده‌شده که همولیزین باکتری در موارد پایلونفریت،سیستیس و باکتریوری بدون علامت بیشتر تولید می‌شود (۹).

اشریشیاکلی بادارابودن پادگن‌های اصلیK,H,O و نیز داشتن انواع عوامل حدت از جمله ژن *fimH* به روش‌های مختلف قابل تیب بندی است (۱۱-۱۰).

از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی نظیر سروتایپینگ، بررسی الگوی پلاسمیدی، تعیین الگوی حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، روش‌های متکی بر برش آنزیمی نظیر RFLP جهت دسته‌بندی این باکتری استفاده شده است.روش‌های متکی بر PCR نظیرERIC-PCR ، RAPD-PCR ، REP-PCR و BOX-PCR به عنوان روش‌های سریع در دسته‌بندی ژنتیکی این باکتری استفاده شده‌اند. روش RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ مولکولی پیشرفته می‌باشد که به آسانی قابل انجام است. در سال‌های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت بالای آن، دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، هزینه‌ی نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه‌ای مورد استفاده ویژه‌ای قرار گرفته است (۱۱-۱۰).

علاوه بر تکنیک RAPD-PCR، تکنیک ERIC-PCR جهت مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی و سنجش‌های مبتنی بر ERIC-PCR استفاده از پرایمرهایی می‌باشد که هدف آن‌ها توالی‌های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتری می‌باشد. از جمله گروه‌هایی از عناصر تکراری، توالی‌های تکراری توافقی درون ژن اینتروباکتریال یا ERIC می‌باشد که در باکتری‌های روده‌ای گرم منفی شایع است.به طور کلی اجزاء و عناصر ERIC ،۱۲۶bp شامل یک نمونه تکراری معکوس مرکزی بسیار حفاظت‌شده در مناطق فراژنی می‌باشد که از این توالی تکراری جهت طراحی پرایمر در تکنیک ERIC-PCR جهت بدست آوردن انگشت‌نگاری DNA استفاده می‌شود (۱۱).در مطالعه حاضر نیز از روش ERIC-PCR جهت دسته‌بندی ایزوله‌های UPEC جداشده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی ۶۷ ایزوله *اشریشیاکلی* که از بیماران واجد عفونت‌های دستگاه ادراری از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح شهرستان شهرکرد در فاصله زمانی تیر ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹۴ جدا شده بودند، انتخاب گردید.

این ایزوله‌ها در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بیمارستان‌ها و مراکز درمانی مربوطه جدا سازی و تعیین هویت شده بودند. پس از انتقال ایزوله‌ها (رشد یافته در محیط مولر هینتون آگار) به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

www.SID.ir

شهرکرد مجدداً با روش‌های متداول میکروب‌شناسی تائید هویت شدند.

جهت تائید قطعی بودن *اشریشیاکلی* در ایزوله‌های جداشده از روش PCR با ردیابی ژن *16srRNA* استفاده شد. در این راستا از زوج پرایمرهای

*16srRNA*F:
AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ،

*16srRNA*R:
CCGTCAATTCATTTGAGTTT

معرفی‌شده توسط **لی** و همکاران استفاده شد (۱۲). در این مرحله از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC-25922 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x (PCR buffer10x)، ۱ میکرولیتر Mgcl2، ۵/. میکرولیتر dNTP Mix، ۲/. میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس ـ لیتوانی)، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای ذکر شده در بالا ، ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر یک از ایزوله ها و ۱۶/۸ میکرولیتر آب مقطر تنظیم شد. برنامه حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مراحل پیش رو انجام پذیرفت :

واسرشته سازی اولیه یک چرخه ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، و در ادامه ۳۳ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه ، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای 72درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه.

در انتها محصول PCR در این مرحله بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد.

به منظور دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* مورد مطالعه از روش Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) طبق روش توصیه شده توسط Versalovic و همکاران استفاده شد (۱۳).

در این روش، PCR در واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer10x ، ۴ میکرولیتر Mgcl2، ۱/۷۵ میکرولیتر dNTP Mix، ۶/. میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳ میکرولیتر از زوج پرایمرهای

ERIC1:
ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC
ERIC2:
AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر یک از ایزوله ها و ۲۹/۶۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیکERIC-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های جداشده به شرح زیر تنظیم گردید:

واسرشته سازی اولیه یک چرخه ۶ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه ، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای 72درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه.

محصول PCR مربوط به مرحله فوق روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد.

آزمایش ERIC-PCR روی هرکدام از ایزوله‌های مورد مطالعه ۳ نوبت انجام گرفت تا از تعداد باندهای ایجادشده توسط هرایزوله اطمینان حاصل گردد. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های مورد مطالعه،از نرم‌افزار(NTSYS version2.02e) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر، به صورت داده‌های کمی صفر و یک (وجود باند یا عدم وجود باند)، امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های صفر و یک با استفاده از ضریب جاکارد و دایس و تطابق ساده محاسبه شد. به منظور تعیین کارایی روشERIC تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضرایب تشابه، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده گردید. سپس برای گروه‌بندی سویه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش (Unweighted Pair Group Method using UPGMA arithmetic Averages) بر مبنای ضریب

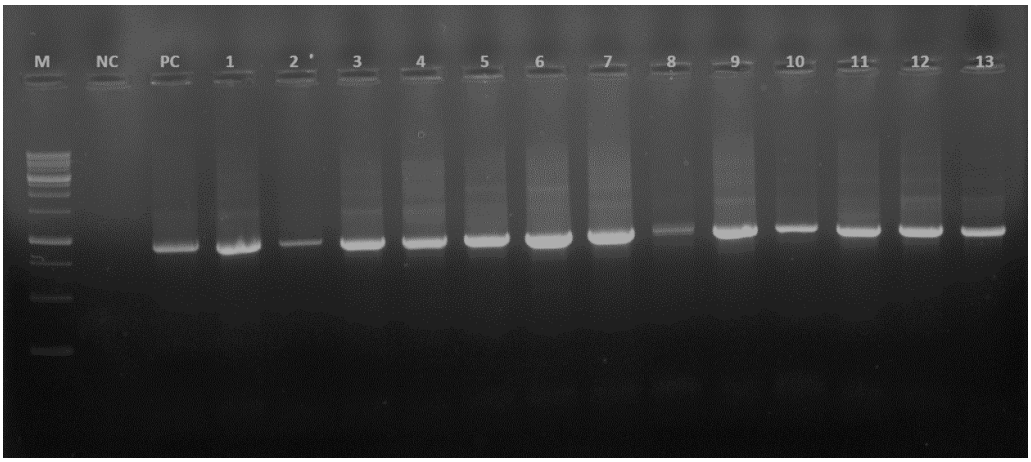
www.SID.ir

Arch

تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را دارا بود، استفاده گردید.

نتایج

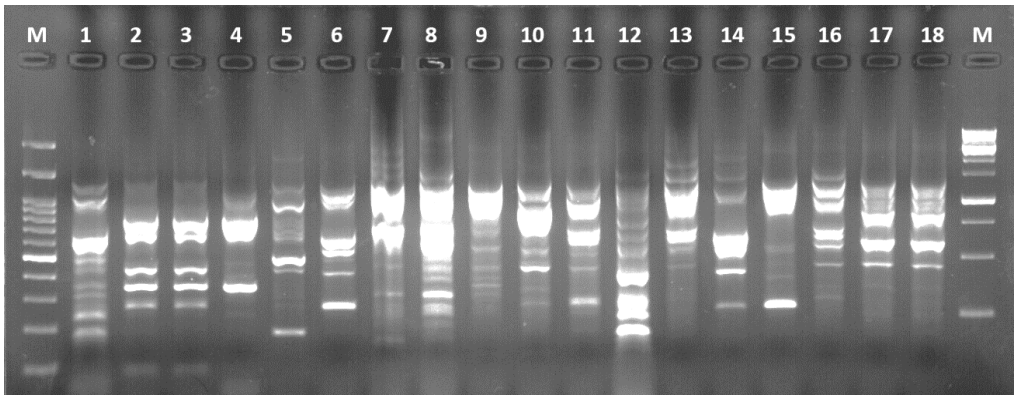
علاوه بر آزمون‌های میکروبی متداول به منظور تشخیص ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از روش PCR جهت ردیابی ژن *16srRNA* استفاده گردید؛ نتیجه حاصل از ردیابی ژن *16srRNA* در شکل ۱ که حاصل از الکتروفورز محصول PCR این ژن می‌باشد، نشان داده شده است. حضور قطعه ۹۱۹ جفت بازی تائید گر این مطلب است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NC= نمونه کنترل منفی، ستون PC= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 13-1= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

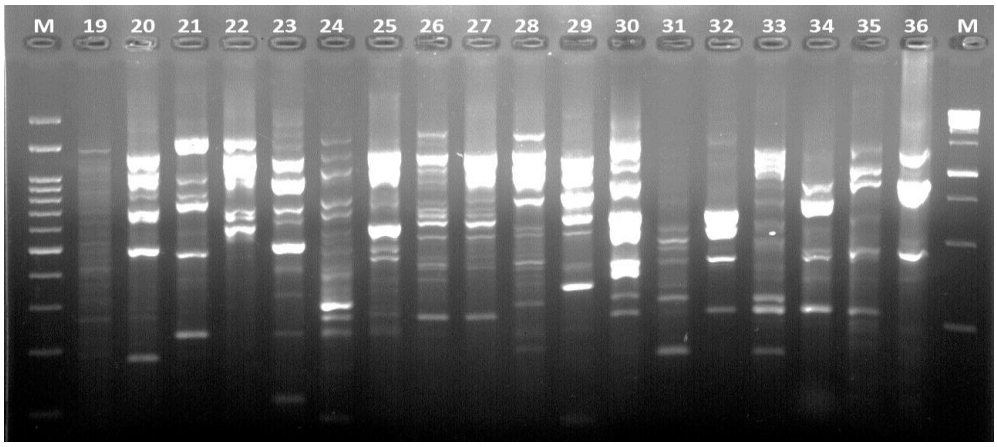
PCRعناصر تکرارشوندهERIC یکی از روش‌های سریع و ساده‌ای است که به طورمعمول در شناسایی، طبقه بندی و بررسی تنوع عوامل باکتریایی بکار می رود (۱۳-۱۵) . توالی‌های تکراریERIC از جمله توالی‌هایی هستند که در سرتاسر ژنوم باکتری‌های بیماری‌زا پراکنده هستند و ممکن است نقش مهمی در سازماندهی ژنوم باکتری‌ها داشته باشند. با ردیابی پراکنش این توالی‌ها در ژنوم باکتری‌ها با استفاده از روش ذکر شده می‌توان به ساختار و مسیر تکاملی ژنوم آن ها دست یافت (۱۶).

در این بررسی جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌ها از روش ERIC-PCRاستفاده شد که در این راستا ۶۷ ایزوله مورد مطالعه سه نوبت با روش ERIC-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در PCR (تصاویر ۲تا ۵) آنالیز شدند.

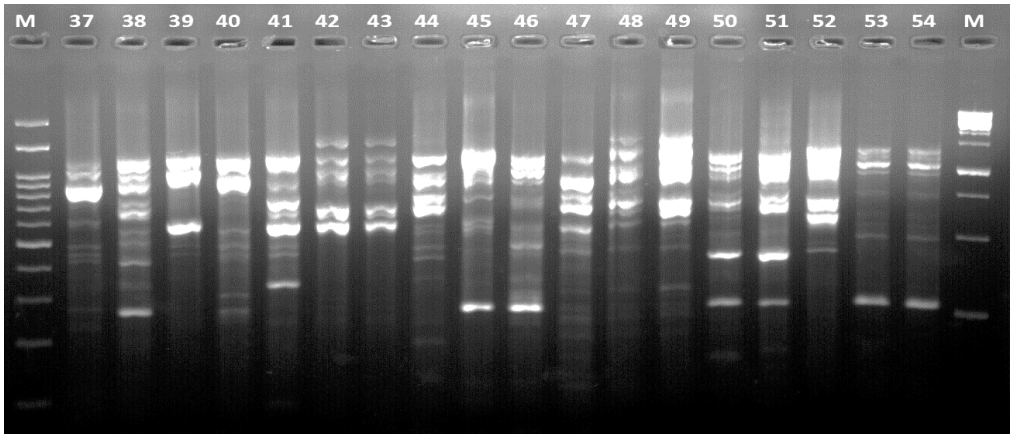


شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCRروی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*(ایزوله‌های ۱ تا ۱۸)(ستون M در سمت چپ تصویر= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M درسمت راست تصویر= مارکر ۱ کیلوبازی DNA).

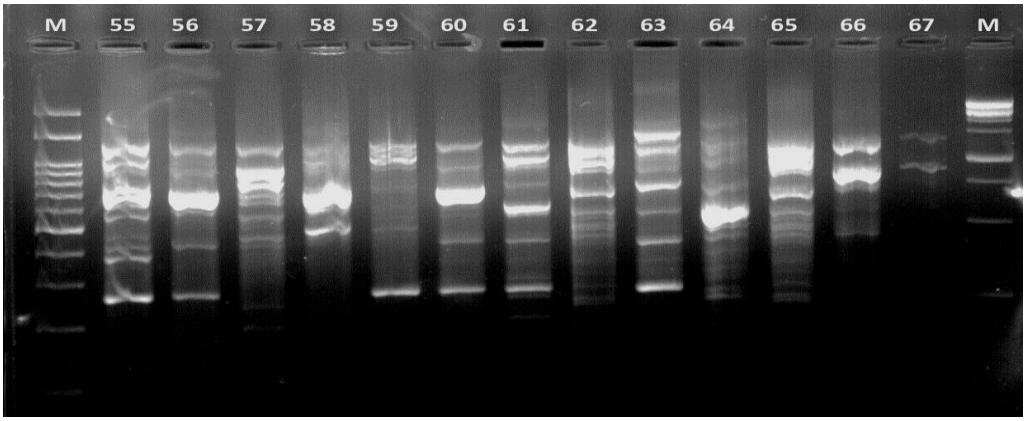
www.SID.ir



شکل۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*(ایزوله‌های ۱۹ تا ۳۶) (ستون M در سمت چپ تصویر= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M درسمت راست تصویر= مارکر ۱ کیلوبازی DNA).



شکل ٤- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCRروی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*(ایزوله‌های ۳۷ تا ۵۴) (ستون M در سمت چپ تصویر= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M درسمت راست تصویر= مارکر ۱ کیلوبازی DNA).



شکل ٥- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCRروی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*(ایزوله‌های ۵۵ تا ۶۷) (ستون M در سمت چپ تصویر= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M درسمت راست تصویر= مارکر ۱ کیلوبازی DNA).

طبق تصاویر (۲تا۵) ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی از محدود ۱۱۰تا ۳۱۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد ۱(وجود باند) و ۰ (عدم وجود باند) امتیازدهی و به‌وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌هادر برنامه NTSYSآنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها،شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاکارد،دایس و تطابق ساده محاسبه شدکه ضریب کوفنتیک محاسبه‌شده برای الگوریتم

www.SID.ir

UPGMA و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی UPGMA ERIC-PCRایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* با نشانگر

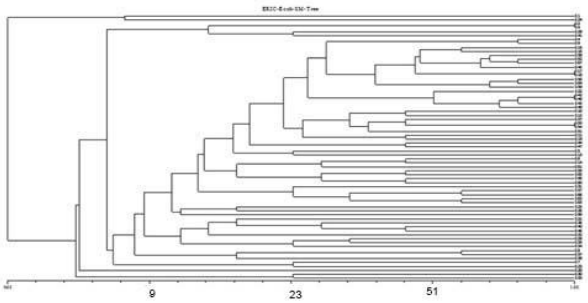
ضریب تشابه الگوریتم	ضریب تشابه جاکارد(J)	ضریب تشابه دایس(DICE)	ضریب تشابه تطابق ساده(SM)
UPGMA	۰/۶۶۰	۰/۵۷۸	۰/۶۹۲

طبق اطلاعات جدول فوق ضریب تطابق ساده (۰/۶۹۲) بزرگ‌تر از دو ضریب جاکارد و دایس بوده لذا جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از این ضریب استفاده شد. در نشانگر ERIC-PCR در چهار مورد، ایزوله‌ها دارای قرابت ۱۰۰٪ (ضریب شباهت۱) بودند. قرابت ژنتیکی ۱۰۰٪ بین ایزوله‌های شماره ۲و ۳ ایزوله‌های ۱۷و ۱۸، ایزوله‌های ۴۲و ۴۸ و ایزوله‌های ۵۳و ۵۴ مشاهده شد.

کمترین قرابت ژنتیکی بین دوایزوله ۲۴ و ۴۴(ضریب شباهت ۰/۴۴۴)، ایزوله‌های ۲۰ با ۲۳، ۲۴ با ۳۴، ۲۴ با ۳۸ و ۲۴ با ۴۷ (ضریب شباهت ۰/۴۸۱) مشاهده شد.

به‌جز قرابت ۱۰۰ درصدی که بین ایزوله‌های فوق‌الذکر مشاهده شد. بین سایر ایزوله‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت ژنتیکی ۹۶/۲ درصد بود که بین ایزوله‌های ۴۲با۴۳ ، ۴۲ با ۴۹ ، ۴۳ با ۴۸ ، ۴۸ با ۴۹ ، ۵۲ با ۳۹ ، ۵۲ با ۴۵ ، ۵۲ با۶۷ ، ۶۴ با ۵۸ ، ۶۴ با ۵۹ دیده شد.

در دندروگرام حاصل از نشانگرERIC-PCR ، مجموع ۶۷ ایزوله مورد مطالعه در سطح تشابه ۶۳ درصد در دو گروه Aو B قرار می‌گیرند. که گروه A دارای دو زیرگروه A_1 وA_2که هرکدام دارای یک ایزوله (ایزوله‌های ۲۴و ۱) و گروه B دارای دو زیر گروهB_1و B_2 که B_1دارای دو زیرشاخهB_3وB_4که زیرشاخه B_4 تنها دارای یک ایزوله (ایزوله ۲۰) و زیرشاخهB_3با دو زیرگروه B_5 و B_6 با تعداد زیادی زیرشاخه و زیرگروه B_2دارای دو شاخه B_7وB_8 با یک ایزوله در هر شاخه (ایزوله‌های ۳۰ و ۳۳) هستند (تصویر۶).



تصویر۶- دندروگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* با نشانگرERIC-PCRبر مبنای ضریب تطابق ساده

در سطح تشابه ۷۲٪ ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ۹ زیرگروه، در سطح تشابه ۸۱٪ دارای ۲۳ زیرگروه بوده که تعداد زیرگروه‌ها در سطح تشابه ۹۱٪ به ۵۱ زیرگروه افزایش می‌یابند که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله‌های مورد مطالعه است.

بحث

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از شایع‌ترین عوامل میکروبی دخیل در ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری است که سروتیپ‌های مختلفی از این باکتری که *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک گفته می‌شوند، در ایجاد این عفونت‌ها دخیل می‌باشد (۱۷).

درگذشته از روش‌های فنوتیپی ازجمله سروتایپینگ جهت دسته‌بندی سویه‌های این باکتری استفاده می‌شد. امروزه روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های مرسوم فنوتیپی شده است. چند روش برای دسته‌بندی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* طراحی و ارائه شده است. ارزیابی سیستم‌های مختلف طبقه‌بندی باکتری‌ها در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بر پایه معیارهای مهمی نظیر توان تمایزدهی تکنیک، قابلیت تعیین تیپ و تکرارپذیری روش مربوطه می‌باشد. روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی برای تیپ‌بندی سویه‌های *اشریشیاکلی* شناخته شده است(۱۸). روش‌های فنوتیپی نظیر سروتایپینگ و فاژتایپینگ قدرت تمایزدهی پایینی دارند از این‌رو روش‌های ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا، هزینه پایین، کاربرد آسان و سریع در شناسایی و دسته‌بندی سویه‌های *اشریشیاکلی* کاربرد پیدا کرده‌اند (۱۹).

اخیراًروش‌های مختلفی برای تعیین منشأ و منبع میکروب‌ها به‌کاررفته‌اند. روش‌هایی مثل ریبوتایپینگ،ERIC-PCR،

www.SID.ir

RAPD-PCR و RFLP به طرز موفقیت‌آمیزی برای متمایز کردن سویه‌های باکتری‌های مختلف استفاده شده‌اند (۲۰-۲۳).

ازکاربردی‌ترین روش‌ها در تیپ‌بندی سویه‌های *اشریشیاکلی* روش‌های مبتنی بر PCR به‌ویژه سه روش RAPD-PCR، ERIC-PCR و RFLP-PCR می‌باشد، در این مطالعه نیز از روش ERIC-PCRجهت دسته‌بندی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری در بیماران بستری در بیمارستان‌های استان چهارمحال و بختیاری استفاده شد.

۶۷ ایزوله *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک با نشانگرERIC-PCR، آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آن‌ها با ضریب تطابق ساده تعیین گردید. به‌جزشباهت ۱۰۰ درصدی که در چهار مورد بین ایزوله‌هایی ۲با ۳،۱۷با ۱۸، ۴۲ با ۴۸و ۵۳ با۵۴ مشاهده شد، بیشترین و کمترین درصد قرابت از ۴۴/۴ تا ۹۶/۲٪ بین ایزوله‌های موردمطالعه دیده شد و همان‌گونه که در درخت فیلوژنی ترسیم‌شده بر اساس ضریب تطابق ساده، مشهود است، ایزوله‌هایUPEC مورد بررسی در سطح تشابه ۶۳٪ در دو گروه Aو B با دو زیرگروهA_1 و A_2، B_1 و B_2 قرار گرفتند درحالی‌که در سطح تشابه ۷۲٪، در ۹ زیرگروه، در سطح تشابه ۸۱٪ در ۲۳ زیرگروه و در سطح تشابه ۹۱٪ در ۵۱ زیرگروه قرار گرفتند که خود نشانگر تنوع بالای ژنتیکی بین ایزوله‌های مورد مطالعه می‌باشد ونشان می دهد که منابع مختلفی می توانند منشاءآلودگی دستگاه ادراری به *اشریشیاکلی* باشند.

در سال 2002، da Silveira و همکاران ۴۹ ایزوله *اشریشیاکلی* از مرغان مبتلابه سپتی‌سمی، سندرم تورم سر و مرغ‌های بدون علائم کلینیکی، جداسازی و از روشERIC-PCR برای دسته‌بندی آن‌ها استفاده کردند. ایزوله‌ها در چهار گروه A تا D قرار گرفتند و نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های مولکولی مثل RAPD-PCR و RFLP-PCR باشد (۲۴).

Meacham و همکاران در دانشگاه میشیگان، تعداد زیادی از ایزوله‌های *اشریشیاکلی* را ژنوتایپینگ کرده و نتیجه گرفتند که بیش از یک روش ERIC-PCR را باید جهت دسته‌بندی ژنتیکی این باکتری استفاده کرد (۲۵).

در مطالعه Ranjbar و Ardakani از روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ ۹۸ ایزوله *اشریشیاکلی* که در فاصله ژوئن ۲۰۱۴ تا ژانویه ۲۰۱۵ از بیمارستان بقیه‌الله تهران جداشده بودند استفاده کردند. در این بررسی ایزوله‌ها در سطح تشابه ۷۰ درصد در ۶ زیرگروه E_1 تا E_6 قرار گرفتند(۲۶). در سال ۲۰۰۶، Wilsonو همکاران، انتشار توالی‌هایERIC را درکل ژنوم باکتری‌های روده‌ای از جمله *اشریشیاکلی* و *شیگلا* بررسی کردند و مشاهده کردند که توالی‌هایERIC در ناحیه نزدیک ژن‌هایی با بیان بالا، بیشتر یافت می‌شوند و چون این توالی‌ها کوچک هستند، تکنیک ERIC-PCR کاربرد گسترده‌ای در ژنوتایپینگ ایزوله‌های باکتریایی دارد (۲۷). Ramezanzadeh و همکاران از روش ERIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳۰ ایزوله *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های بیمارستانی استفاده کردند و دریافتند که ۲۰۵ ایزوله از این نمونه‌ها را می‌توان در ۲۰ ژنوتیپ جداگانه قرار داد که اغلب آن‌ها در گروه فیلوژنتیکی D قرار می‌گیرند (۲۸).

Lang و همکاران در مطالعه‌ای روی ایزوله‌های انتروتوکسیژنیک *اشریشیاکلی* جداشده از گاو نشان دادند که روش ERIC-PCR یک روش کاربردی و سریع در طبقه‌بندی فیلوژنتیکی و بررسی ساختار تکامل نژادی سویه‌های *اشریشیاکلی* می‌باشد (۲۹).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیکERIC-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی سویه‌هایUPECبه‌عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های یوروپاتوژن استفاده شد و قرار گرفتن ایزوله‌های موردمطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل‌قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ *اشریشیاکلی* می‌باشد. درمجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روشERIC-PCR، روشی ساده، سریع و کم‌هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* ازجمله سویه‌هایUPEC می‌باشد اما توصیه می گردد که مطالعات بیشتری روی نمونه‌های اخذشده از بیمارستان‌های مختلف سطح کشور انجام و روش ERIC-PCR با روش‌های مولکولی نوین‌تر مثلPFGE مقایسه گردد امید است که

www.SID.ir

نتایج مطالعه حاضر در بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* و ارتقای سلامت عمومی جامعه استان چهارمحال و بختیاری مفید باشد.

References

1. Adibfar P. Medical microbiology for undergraduate medical students, paramedical and specialized fields. 1st ed. Tehran, Iran. Noor-e Danesh Publisher; 2000. P. 85-100. (Persian)
2. Emtiazi G, Karimi M. The basics of biomolecular and genetic engineering. 1st ed. Tehran, Iran: Mani Publisher; 2005. P. 5-10. (Persian)
3. James MJ. Microbiology of modern food. Trans: Ashraf M, Motamedzadegan A, Alami A, Gohari Ardabili M. 6th ed. Mashhad, Iran: Ferdowsi University Publisher; 2003. P. 455-75. (Persian)
4. Tabatabaei A, Firoozi R. Animal bacterial disease. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2005. P. 206-28. (Persian)
5. Haghighi L. Intestinal bacteria (Enterobacteriaceae family). 1st ed. Bushehr, Iran: Bushehr's Medical Science University; 2004. P. 1113-59. (Persian)
6. Razavilar V. Pathogenic microbes in food and epidemiology of food poisoning. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2002. P. 84-90. (Persian)
7. Rokni N. Health principles of food. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2002. P. 64-100. (Persian)
8. Zaeem Kohan J. Harrison's infectious diseases. Principles of Harrison's internal medicine. 1st ed. Tehran, Iran: Lamat Publication; 2001. P. 373-81. (Persian)
9. Zamanzad B. Determine the most common bacterial causes of urinary tract infection in women (at the age of sexual activity) and investigating their susceptibility pattern to conventional antibiotics in the referrals to the laboratory of specialized clinics of Shahrekord University of Medical Sciences. Traditional Med 1996; 1:21-5. (Persian)
10. Shah-Hosseini M, Rezaei Tehrani H. Polymerase chain reaction (PCR). 1st ed. Tehran, Iran: Basiran Publisher; 2001. P. 8-30. (Persian)
11. Freezer V, Vostaff D. Food microbiology. Trans: Ghasemia Safaei H. Isfahan, Iran: Isfahan University of Medical Sciences; 2004. P. 505-6. (Persian)
12. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, et al. A multiplex PCR method to detect 14 Escherichia coli serogroups associated with urinary tract infections. J Microbiol Methods 2010; 82:71-7.
13. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991; 19:6823-31.
14. Vicente JG, Roberts SJ. Discrimination of Pseudomonas syringae isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. Eur J Plant Pathol 2007; 117:383-92.
15. Ménard M, Sutra L, Luisetti J, Prunier JP, Gardan L. Pseudomonas syringae pv. avii (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (Prunus avium) in France. Eur J Plant Pathol 2003; 109:565-76.
16. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60:2286-95.
17. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 12:8.
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering 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; 18:426-39.

www.SID.ir

19. Rostamzad A, Esfahani SH, Enteshari J. The investigation of molecular epidemiology of *Shigella soneii* isolated from clinical cases in Tehran using RAPD-PCR method. Sci Med J 2010; 9:279-89.
20. Rodtong S, Tannock GW. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. Appl Environ Microbiol 1993; 59:3480-4.
21. Parabhu V, Isloor S, Balu M, Suryanarayana VV, Rathnamma D. Genotyping by ERIC-PCR of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis cases. Indian J Biotechnol 2010; 9:298-301.
22. Gomes AR, Muniyappa L, Krishnappa G, Suryanarayana VV, Isioor S, Prakash B, et al. Genotypic characterization of avian *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. Int J Poult Sci 2005; 4:378-81.
23. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35:907-14.
24. da Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IA, Leite DS, de Castro AF, et al. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. Vet Microbiol 2002; 89:323-8.
25. Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41:5224-6.
26. Ardakani MA, Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *E. Coli* strains by the ERIC-PCR method. Electron Physician 2016; 8:2291-6.
27. Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolutionand implications for ERIC-PCR. Mol Biol Evol 2006; 23:1156-68.
28. Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. Iran J Microbiol 2013; 5:126-31.
29. Xiu-Yan LA, Zhang YL, Jiang HT, Jiao LI, Hong-Bo NI. Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. Afr J Microbiol Res 2013; 7:4001-5.

www.SID.ir

Original Article

Genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Chaharmahal and Bakhtiari province

Received: 20/02/2018 - Accepted: 22/05/2018

Hassan Momtaz[1*]
Gholamreza Banisharif-Dehkordi[2]
Fatemeh Banisharif-Dehkordi[3]
Shokoofeh Banitalebi Dehkordi[4]

[1] Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2] Post graduated of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[3] Department of Genetics, Faculty of science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
[4] Department of Nursing, Faculty of Nursing, Shahrekord University of Medical sciences, Shahrekord, Iran.

*Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Tel: 03833361064
Email: hamomtaz@iaush.ac.ir

Abstract

Background & objectives: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is one of the most prevalent microbial factor resulting in urinary system infections. Many of its serotypes with genetic variety contribute to these infections. The present study was done aiming at genetic classification of UPEC strains isolated from urinary system infections in Chahrmahal & Bakhtiari province, Iran.

Materials & Methods: A total of 67 isolates of UPEC from patients hospitalized in hospitals of Chahrmahal & Bakhtiari were chosen and tested in ERIC-PCR.

Results: The studied isolates had band pattern varying from 110-3100 bp which were classified to 15 subgroups in the resulting banding pattern with simple matching similarity coefficient in 91% similarity level. Except 100 proximity found in four cases, other isolates had 44.4-48.1% genetic proximity. Placement of the studied isolates in several subgroups showed the acceptable discrimination power of ERIC-PCR technique in genotyping/ E.coli and presence of various sources of contamination of urinary system with this pathogen.

Conclusion: ERIC-PCR is a simple, fast and low cost method for describing the genetic variety of different strains of E.coli including UPEC strains.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), genetic classification, ERIC-PCR, Chahrmahal & Bakhtiari province.

Acknowledgement: There is no conflict of interest.

www.SID.ir