مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی،(JSIAU)
سال ۱۹ ، شماره ۷٤/۱ ، زمستان ۱۳۸۸

بررسی روش‌های مختلف تایپینگ برای تشخیص و افتراق سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری

رباب رفیعی طباطبایی
گروه میکروبیولوژی ، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
سیدعلی پوربخش
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
زهرا جلالی*
گروه میکروبیولوژی ، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸٦/۵/۲۸ **تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۳**

Archive of SID

چکیده

مقدمه :عفونت ادراری از شایع‌ترین عفونت‌های انسانی می‌باشد. *اشریشیاکلی* عامل ۹۰٪ از این عفونت‌هاست.

هدف: در این مطالعه روش‌های مختلف تایپینگ (سروتایپینگ، رزیستوتایپینگ و بررسی طرح‌پلاسمیدی) برای تشخیص و افتراق سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از عفونت‌های ادراری مورد مقایسه قرار گرفته است.

روش بررسی: چهل و چهار سویه *اشریشیاکلی* جداشده از بیماران مبتلا در شمال ایران در بهار ۸۳ مورد بررسی قرار گرفت. سروتایپینگ با استفاده از Mast Diagnostic Kit و آنتی‌سرم O_2 تولیدشده توسط مؤسسه رازی، رزیستوتایپینگ به روش Kirby&Bauer و استخراج پلاسمید به روش تغییریافته Birnboim & Doly انجام گرفت. برای سویه‌هایی که طرح پلاسمیدی مشابه داشتند هضم آنزیمی با آنزیم EcoRIانجام گرفت.

*عهده‌دار مکاتبات: z_jalali2000@yahoo.com

www.SID.ir

نتایج: در سروتایپینگ، ۱۶سویه در ۴ گروه شامل سروتایپ‌های O_2, O_6, O_{18}, O_{25} سروتایپ شدند. در رزیستوتایپینگ ۲۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دست آمد که شایع‌ترین آن‌ها تتراسایکلین/آمپی‌سیلین بود. همه سویه‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند. در بررسی طرح پلاسمیدی ۴ سویه فاقد پلاسمید بودند و ۴۰ سویه تعداد ۱ تا ۱۰ پلاسمید نشان دادند که همگی دارای یک پلاسمید ۹/۹ مگادالتونی بودند و ۸۵ ٪ آن‌ها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند. تعداد ۳۱ طرح پلاسمیدی مشاهده شد و استفاده از آنزیم EcoRI درمواردی الگوهای متفاوتی نشان داد.

نتیجه گیری: سروتایپ‌های O_2 و O_6 از فراوان‌ترین سروتایپ‌ها بودند که می‌تواند نشان‌دهنده ایجاد موارد عفونت‌های ادراری توسط محدودی از سویه‌های *اشریشیاکلی* با سروتایپ‌های خاص باشد. مقاومت بالا به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین احتمالا به دلیل مصرف بی‌رویه این انتی بیوتیک هاایجاد شده است. حضور پلاسمید ۹/۹ مگادالتونی در اکثر سویه‌ها (٪۹۰) می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک سویه‌های UPEC باشد. در این مطالعه طرح پلاسمیدی نسبت به سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ سویه‌های بیشتری افتراق داد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، تایپینگ، بررسی طرح پلاسمیدی، عفونت دستگاه ادراری

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری (Urinary Tract Infection: UTI) از رایج‌ترین عفونت‌های انسانی است. [۱،۲] عفونت در زنان به‌دلیل مجرای ادراری کوتاه‌تر، رایج‌تر از مردان می‌باشد. عفونت ممکن است در هر قسمتی از مجاری ادراری بروز نماید و باعث التهاب مثانه، مجرای پیشابراه، پروستات و کلیه گردد. عوامل مستعدکننده این بیماری شامل: سنگ مجاری ادراری و کلیه، حاملگی، عیوب مادرزادی، دیابت، سل، هیپرتروفی پروستات و دستکاری مجاری ادراری مثل سوندزدن می‌باشد. باکتری‌های عامل عفونت دستگاه ادراری شامل *اشریشیاکلی*، *پروتئوس* و چندگونه *کلبسیلا*، *انتروباکتر*، *سودوموناس*، *انتروکوک*، *استرپتوکوکوس*، *استافیلوکوک*، *سیتروباکتر*، *سراشیا*، *پرویدنسیا* و *آلکالی‌ژنز* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشند. [۳،۴] در شرایطی که دستگاه ادراری از لحاظ آناتومیکی طبیعی و سالم باشد، *Escherichia coli* عامل ۹۰-۷۰ درصد از عفونت‌های دستگاه ادراری است. [۱-٤] این باکتری که جزء فلورطبیعی روده انسان است می‌تواند از مدفوع و ناحیه پرینال به دستگاه ادراری مهاجرت کرده و ایجادعفونت نماید. برای درمان این عفونت از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی استفاده می‌شود. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و حیوان باعث ازبین‌رفتن سویه‌های حساس و انتخاب سویه‌های مقاوم می‌شود. مقاومت سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از مهم‌ترین مسایلی است که دنیای‌پزشکی با آن مواجه است. لذا لزوم انجام آزمایشات حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان این عفونت بیش از پیش احساس می‌گردد. [۱،۵]

یک ابزار اپیدمیولوژیکی در بررسی شیوع عفونت دستگاه ادراری و تشخیص منبع عفونت و افتراق سویه‌های *E.coli* عامل عفونت، تایپینگ باکتری‌های *E.coli* است. به طورکلی طبقه‌بندی و تایپینگ باکتری‌ها به روش‌های مختلفی مثل Biotyping ، Serotyping، Phage-typing، Resistotyping، Bacteriocintyping و

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular typing(Genotyping) انجام می‌شود.[٦،٧]

در ایران اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی روی عفونت دستگاه ادراری ایجاد شده توسط باکتری *E.coli* به بیوتایپینگ، سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ (تایپینگ به وسیله تعیین الگوی مقاومتی) محدود بوده است اما استفاده از تکنیک‌های مولکولی (ژنوتایپینگ) مانند بررسی طرح‌پلاسمیدی (Plasmid Profile Analysis: PPA) به همراه بررسی الگوی برش‌های ایجاد شده به وسیله آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده (Restriction Endonuclease Analysis: REA) نیز به عنوان روش قابل قبولی در مطالعات اپیدمیولوژیکی باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. PPA به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیکی در بررسی شیوع بیماری عفونی، تشخیص منبع عفونت، تشخیص سویه اپیدمیک باکتری‌ها، تشخیص پلاسمید اپیدمیک و تایپینگ سویه‌های باکتری، مورد استفاده قرارمی‌گیرد.[۶] این مطالعه جهت استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی *اشریشیاکلی* و استفاده از الگوهای پلاسمیدی به‌دست آمده از باکتری‌ها برای تایپینگ این سویه‌ها و هم‌چنین تجسس رابطه اپیدمیولوژیک بین سویه‌ها انجام‌شد.

در این تحقیق علاوه بر روش‌های قبل، از این روش نیز استفاده‌کردیم. لذا این تحقیق به‌منظور تعیین سروتایپ، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، تعیین طرح‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از اندونوکلئازهای محدودکننده در سویه‌های *E.coli* جداشده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری و استفاده از نتایج حاصله برای تایپینگ این سویه‌ها انجام‌شد.

مواد و روشها

سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه. پس از انجام آزمایشات باکتریولوژیکی استاندارد[۸] بر روی ادرار بیماران و تشخیص UTI در آزمایشگاه بیمارستان‌های مختلف واقع در شمال ایران در بهار ۱۳۸۳ مجموع ۴۴ سویه *E.coli* از ادرار بیماران جداسازی شده و مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی. بررسی‌های باکتریولوژیکی اولیه روی همه نمونه‌های جمع‌آوری شده انجام گرفت. نمونه‌ها روی محیط مکانکی آگار و EMB آگار کشت داده شدند. سپس تست‌های IMViC، اوره، TSI، قندهای مانیتول و اینوزیتول و اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین انجام گرفت.[۸]

آزمایش‌های رزیستوتایپینگ. در این مرحله از کار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین طرح مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک Kirby & Bauer براساس دستورالعمل NCCLS انجام گرفت.[۸-۱۰] ده آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل آمپی‌سیلین، سفازولین، ایمی پنم، جنتامیسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین ونیتروفورانتویین بودند.

آزمایش‌های سرولوژیک. برای بررسی‌های سرولوژیکی از Mast (Mast Group Ltd., Mesey Side, Uk) Diagnostic Kit و همچنین آنتی‌سرم $O_۲$ تولید شده توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی استفاده شد (جدول۱). بدین صورت که باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، به پلیت‌های حاوی باکتری، ۵ میلی لیتر بافر فسفات (PBS) اضافه گردید. سطح محیط به آرامی به هم

Archive of SID

www.SID.ir

زده شد تا کلونی‌های باکتریایی از سطح محیط جدا و در بافر حل شوند. مخلوط بافر و باکتری در لوله آزمایش استریل ریخته و به مدت ۲/۵ ساعت در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو گردید. [۸] این کار برای از بین بردن آنتی‌ژن‌های K حساس به حرارت بود، زیرا گاهی اوقات آنتی‌ژن K از واکنش آنتی‌ژن O جلوگیری می‌کند. [۵] سپس با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی والان و مونووالان موجود در کیت، تست آگلوتیناسیون روی سویه‌ها صورت گرفت: ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌سرم پلی والان روی لام تمیزی ریخته و ۵۰ میکرولیتر عصاره باکتریایی اتوکلاو شده به آن اضافه گردید و مخلوط شد. در صورت مثبت شدن جواب تست با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان، آزمایش به طور جداگانه برای آنتی‌سرم‌های مونو والان انجام گرفت تا سروتایپ باکتری مشخص شود. [۸]

جدول ۱: آنتی‌سرم‌های پلی‌والان و مونووالان موجود در Mast Diagnostic Kit.

شماره آنتی‌سرم‌های پلی‌والان	آنتی‌سرم‌های مونووالان
پلی‌والانت ۱	$O_{۱}$,$O_{۲۶}$,$O_{۳۶a}$,$O_{۱۱۱}$,$O_{۱۱۹}$,$O_{۱۲۷a}$,$O_{۱۲۸}$
پلی‌والانت ۲	$O_{۴۴}$,$O_{۵۵}$,$O_{۱۲۶}$,$O_{۱۴۶}$,$O_{۱۶۸}$
پلی‌والانت ۳	$O_{۱۸}$,$O_{۱۱۴}$,$O_{۱۴۲}$,$O_{۱۵۱}$,$O_{۱۵۷}$,$O_{۱۵۸}$
پلی‌والانت ٤	$O_{۶}$,$O_{۲۷}$,$O_{۷۸}$,$O_{۱٤۸}$,$O_{۱۵۹}$,$O_{۱۶۸}$
پلی‌والانت ۵	$O_{۲۰}$,$O_{۲۵}$,$O_{۶۳}$,$O_{۱۵۳}$,$O_{۱۶۷}$
پلی‌والانت ٦	$O_{۸}$,$O_{۱۵}$,$O_{۱۱۵}$,$O_{۱٦۹}$
پلی‌والانت ۷	$O_{۲۸ac}$,$O_{۱۱۲ac}$,$O_{۱۲٤}$,$O_{۱۳٦}$,$O_{۱٤٤}$
پلی‌والانت ۸	$O_{۲۹}$,$O_{۱٤۳}$,$O_{۱۶۲}$,$O_{۱٦٤}$

Archive of SID

آزمایش‌های استخراج پلاسمید

در این مطالعه روش انتخابی برای جداسازی و استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری‌ها روش دناتوراسیون قلیایی (یا روش تغییریافته Birnboim and Doly) بود. [۱،٦،۱۱] با انجام این روش، محلولی حاوی DNA پلاسمیدی استخراج‌شده از باکتری‌ها به دست می آید که بلافاصله الکتروفورز گردید.

الکتروفورز در ژل

از ژل آگارز ۰/۸ درصد برای جداسازی مولکول‌های DNA در محدوده ۰/۵ تا ۱۰ کیلوباز استفاده شد. [۱۲،۱۳] نتیجه الکتروفورز با دوربین poloroid عکس‌برداری شد. [٦]

تعیین‌اندازه و وزن‌مولکولی پلاسمیدها

الکتروفورز در ژل‌آگارز، مولکول‌های DNA پلاسمیدی با اندازه‌های مختلف را جدامی‌سازد. برای تعیین‌اندازه این پلاسمیدها از مارکرهای مختلفی استفاده می‌شود. در این مطالعه از مارکر 1 kb DNA Ladder

www.SID.ir

استفاده گردید. یکی از راه‌های به‌دست‌آوردن اندازه قطعات مجهول استفاده از نمودار Semi-log plots بود.[۱۳] روش دیگر برای تخمین اندازه مولکول DNA پلاسمیدی استفاده از نرم‌افزارPHOTO CAP بود. اساس محاسبات کامپیوتر براساس روش لگاریتمی می‌باشد. بعد از به‌دست‌آوردن اندازه باندها (کیلوجفت باز) توسط هر کدام از این دو روش (که نتایج یکسانی از هر دو روش به‌دست آمد)، از طریق فرمول زیر وزن‌مولکولی پلاسمیدها به‌دست آمد:[۱۳]

(مگادالتون ۰/۶۶) دالتون ۶۶۰۰۰۰ = هر کیلو جفت باز

استفاده از آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودکننده (هضم آنزیمی)

در این مطالعه این کار برای سویه‌هایی که دارای یک پلاسمید بودند انجام‌شد. برش آنزیمی پلاسمیدها با استفاده از آنزیم محدودکننده EcoRI طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (Fermentase) انجام گرفت. از نتیجه الکتروفورز عکس‌برداری کرده و نتایج به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. (در مواردی که پس از الکتروفورز باندهایی به‌دست آید که دارای یک وزن‌مولکولی باشند برای مشخص شدن این که این پلاسمیدها واقعاً یکسان هستند یا نه، از آنزیم‌های محدودکننده استفاده می‌شود.[۱،٦]

نتایج و بحث

آزمایش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی

همه باکتری‌های جداشده و تشخیص داده شده در محیط مکانکی‌آگار کلونی‌های لاکتوز مثبت صورتی رنگ و در محیط ائوزین متیلن بلوآگار کلونی‌های با جلای سبز فلزی نشان دادند. قابل ذکر است که در این مطالعه از سوش‌هایی از اشریشیاکلی که لاکتوز منفی بودند و جلای فلزی ایجاد نمی‌کردند صرف نظر گردید تا همه نمونه ها خصوصیات کاملا" یکسانی داشته باشند. نتیجه آزمایش‌های اندول و متیل رد مثبت و آزمایش‌های VP و سیترات منفی بود. در محیط TSI پاسخ اسید ـ اسید همراه با تولید گاز مشاهده شد. هیچ سویه‌ای H_2S تولید نکرد. بعضی سویه‌ها متحرک و بعضی غیر متحرک بودند. نتیجه آزمایش اوره منفی بود و نتایج آزمایشات قندهای گلوکز و مانیتول مثبت بود و قند اینوزیتول منفی بود. نتیجه آزمون اسید آمینه لیزین مثبت و اسید آمینه آرژنین منفی بود.

آزمایش‌های سرولوژیک

شانزده سویه (۳۶/۴٪) در ۴ گروه سروتایپ شدند. سروتایپ$O_۶$ در ۸ سویه (۱۸/۲٪)، سروتایپ $O_۲$ در ۶ سویه (۱۳/۶٪)، سروتایپ$O_{۱۸}$ در ۱ سویه (۲/۳٪) و سروتایپ$O_{۲۵}$ نیز در ۱ سویه (۲/۳٪) مشاهده شد (جدول۲). سروتایپ‌های$O_۶$ و $O_۲$ فراوان‌ترین سروتایپ‌های شناسایی‌شده بودند. قابل ذکر است که به دلیل محدودیت آنتی‌سرم‌هایO موجود در کیت مورد استفاده که در جدول ۱ مشاهده می شود، سروتایپینگ برای ۲۸ سویه (۶۳/۶٪) انجام‌پذیر نبود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: تعداد و درصد سروتایپ های O شناسایی‌شده در سویه‌های مورد مطالعه

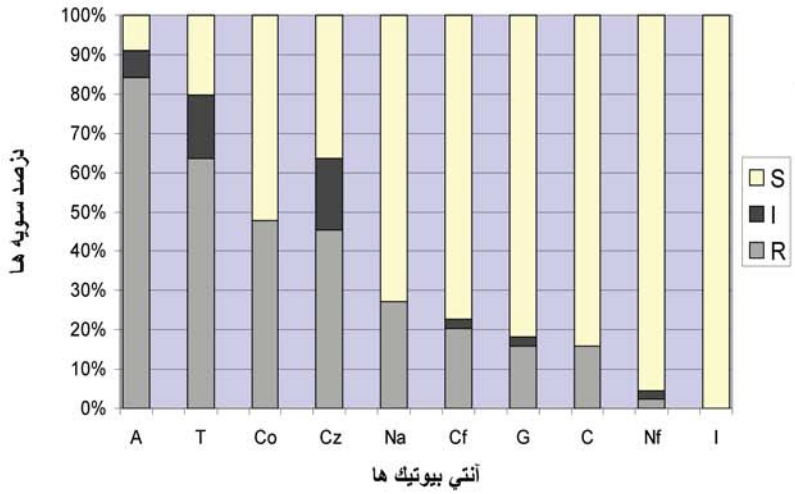
سروتایپ	شماره سویه‌ها	تعداد و درصد سویه‌ها
$O_{۶}$	۲ ، ۷ ، ۱۷ ، ۱۹ ، ۲۱ ، ۳۶ ، ۳۸ ، ۴۰	۸ (٪۱۸/۲)
$O_{۲}$	۴ ، ۱۱ ، ۱۲ ، ۲۳ ، ۲۴ ، ۴۲	۶ (٪۱۳/۶)
$O_{۱۸}$	۴۴	۱ (٪۲/۳)
$O_{۲۵}$	۱۴	۱ (٪۲/۳)
قابل سروتایپ		۱۶ (٪۳۶/۴)
غیر قابل سروتایپ		۲۸ (٪۶۳/۶)

آزمایش‌های رزیستوتایپینگ

سویه‌های مورد مطالعه میزان بالایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. بالاترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (٪۸۴/۱)، تتراسایکلین (٪۶۳/۶) و کوتریموکسازول (٪۴۷/۷) بود. بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (٪۱۰۰)، نیتروفورانتوئین (٪۹۵/۴) و کلرامفنیکل (٪۸۴/۱) بود. نتایج حساسیت، حالت حد واسط و مقاومت سویه‌های مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمودار۱ نشان داده شده‌است.

Archive of SID

www.SID.ir



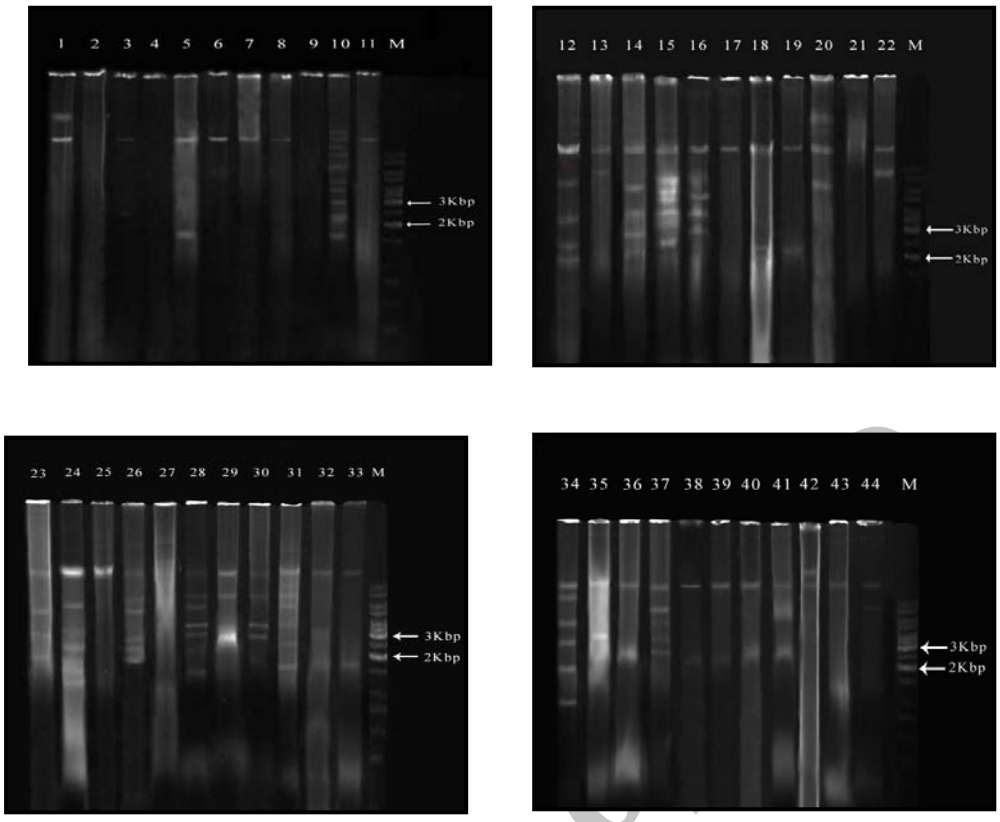
نمودار۱- درصد حساسیت(S)، حدواسط(I) و مقاومت(R) سویه‌های *E.coli* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد مطالعه

دو سویه به همه آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و سویه کاملاً مقاوم دیده نشد. مقاومت به سه یا بیشتر آنتی‌بیوتیک (Multiple Antibiotic Resistance: MAR) در ۲۵ سویه (۵۶/۸٪) دیده شد که بیشتر حالت مربوط به مقاومت‌های سه گانه و چهارگانه بود. در سویه‌های مورد مطالعه، ۲۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌دست آمد که شایع‌ترین آن‌ها تتراسایکلین/آمپی‌سیلین (۱۳/۶٪) و آمپی‌سیلین (۱۱/۶٪) بودند.

آزمایش‌های استخراج پلاسمید

از ۴۴ سویه مورد مطالعه، ۴ سویه (۹٪) فاقد پلاسمید بودند؛ و ۴۰ سویه (۹۱٪) دارای یک تا ۱۰ پلاسمید بودند (شکل۱) که پلاسمیدها وزنی بین ۰/۶۹ تا ۱۵/۰۵ مگادالتون داشتند. همه سویه‌های دارای پلاسمید، حاوی یک پلاسمید ۹/۹ مگادالتونی بودند. از سویه‌های دارای این پلاسمید، ۸۵ درصد مقاومت به آمپی‌سیلین نشان دادند. برای سویه‌های مورد مطالعه ما طرح‌های پلاسمیدی متنوعی به‌دست آمد که در ۳۱ طرح‌پلاسمیدی تقسیم‌بندی شدند. تصاویر مربوط به الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج‌شده در شکل۱ نشان داده شده‌است.

www.SID.ir

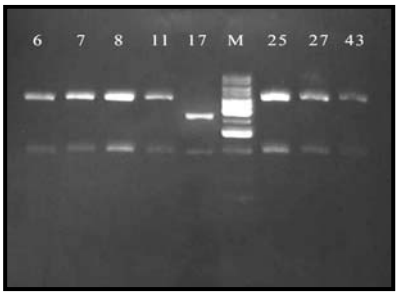


شکل۱- تصاویر حاصل از الکتروفورز پلاسمیدهای استخراجی از ۴۴ سویه مورد مطالعه

آزمایش استفاده از آنزیم‌محدودکننده EcoRI

برای ۸ سویه‌ای که طرح‌پلاسمیدی یک‌باندی داشتند (دارای پلاسمید ۹/۹ مگادالتونی بودند) هضم آنزیمی انجام گرفت که دو الگوی هضم متفاوت به‌دست آمد (شکل۲).

در کل پس از هضم آنزیمی ۳۲ طرح متفاوت برای سویه‌های مورد مطالعه شناسایی‌شد.



شکل۲- باندهای به‌دست آمده پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم EcoRI

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

عفونت دستگاه ادراری که یکی از شایع‌ترین عفونت‌های انسانی به شمار می‌رود[۱،۲،۴،۱۴،۱۵] بیماری عودکننده ای است و سالانه تقریباً ۱۱ میلیون زن به آن مبتلا می‌شوند.[۱] در بین باکتری‌های عامل این عفونت، *اشریشیاکلی* بیشترین سهم را دارد و شیوع بالایی نشان می‌دهد.[۱-۴،۱۴،۱۵] *اشریشیاکلی* که جزء فلورطبیعی روده انسان است می‌تواند از مدفوع و ناحیه پرینال به دستگاه ادراری مهاجرت کرده و ایجادعفونت نماید.

سروتایپ‌های متعددی از *اشریشیاکلی* ایجادعفونت دستگاه ادراری می‌کنند. این سروتایپ‌ها شامل O_1، O_2، O_4، O_5، O_6، O_7، O_8، O_9، O_{11}، O_{15}، O_{16}، O_{17}، O_{18}، O_{19}، O_{20}، O_{21}، O_{22}، O_{25}، O_{27}، O_{50}، O_{62}، O_{75}، O_{77} و ... می‌باشد.[۱۶-۱۹، ۲] (با آنتی‌سرم‌های O موجود در جدول ۱ مقایسه گردد.)

در مطالعه ما در ۱۶ سویه (۳۶/۴٪) سروتایپ‌های O_2، O_6، O_{18}، O_{25} به‌دست آمد. به دلیل محدودیت آنتی‌سرم‌های O موجود در کیت مورد استفاده، ۲۸ سویه (۶۳/۶٪) سروتایپ نشدند و این کیت قادر به افتراق همه‌سویه‌های مورد مطالعه نبود. در مطالعه Blanco و همکاران در اسپانیا (۱۹۹۵) برروی ۱۰۳ سویه *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری، ۶۸٪ سویه‌ها در سروتایپ‌های O_1، O_2، O_4، O_6، O_9، O_{18}، O_{27}، O_{73}، O_{75}، O_{77} شناسایی‌شدند. ۳۲٪ سویه‌ها قابل سروتایپ نبودند. فراوان‌ترین سروتایپ‌ها O_2، O_4، O_6 بودند[۱۶]. در مطالعه Vranes و همکاران در کرواسی (۲۰۰۱) بر روی ۱۶۰ سویه *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری ۷۵/۶٪ سویه‌ها در سروتایپ‌های O_1، O_2، O_4، O_5، O_6، O_7، O_8، O_9، O_{11}، O_{15}، O_{17}، O_{18}، O_{25}، O_{50}، O_{75} شناسایی‌شدند. ۲۴/۴٪ سویه‌ها قابل تایپ نبودند. فراوان‌ترین سویه‌ها O_2، O_4، O_6 بودند[۱۷]. در مطالعه کتولی و همکاران در سوئد (۲۰۰۴) برروی ۸۷ سویه *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری از شیراز، ۷۱/۳٪ سویه‌ها با سروتایپ‌های O_1، O_2، O_4، O_6، O_7، O_8، O_{15}، O_{17}، O_{18}، O_{19}، O_{21}، O_{75} شناسایی‌شدند، ۲۸/۷٪ سویه‌ها قابل تایپ نبودند. فراوان‌ترین سروتایپ‌ها O_2 و O_6 بودند.[۲]

در مطالعه ما فراوان‌ترین سروتایپ‌های شناسایی‌شده O_2 و O_6 بودند که با نتایج مطالعات ذکر شده مشابهت دارد. این مسأله نشان می‌دهد که بسیاری از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری ممکن است به‌وسیله تعداد محدودی از سویه‌های *اشریشیاکلی* که معمولاً متعلق به سروتایپ‌های خاصی می‌باشند، ایجادشود.[۱۶]

در مطالعه ما سویه‌های *اشریشیاکلی* درصد مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نشان دادند. مقاومت بالا به آمپی‌سیلین (۸۴٪)، سپس تتراسایکلین (۶۴٪) و بعد کوتریموکسازول (۴۸٪) مشاهده شد. ۱۰۰٪ سویه‌های مورد مطالعه ما به ایمی‌پنم حساس بودند. ۹۵٪ به نیتروفورانتویین حساس بودند. در مطالعه Lee و همکاران در کره جنوبی (۲۰۰۴) که برروی عفونت دستگاه ادراری انجام گرفت بالاترین مقاومت بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده نسبت به آمپی‌سیلین(۶۲٪) و سپس کوتریموکسازول دیده شد و همه سویه‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند.[۴] در مطالعه Karaca و همکاران (۲۰۰۵) در ترکیه برروی *E.coli* جداشده از عفونت دستگاه ادراری، مقاومت بالا به کوتریموکسازول در طی ۱۰ سال بررسی شد که نشان می دهد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در حال افزایش است.[۱۴] در مطالعه‌ای از صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۳) برروی *E.coli* های جداشده از عفونت دستگاه ادراری مقاومت بالا به آمپی‌سیلین (۹۹٪) مشاهده شد. ۹۶٪ سویه‌ها به نیتروفورانتویین حساس

Archive of SID

www.SID.ir

بودند.[۱] در مطالعه زابلی و همکاران در آمل (۱۳۸۴) که برروی باکتری‌های غالب در عفونت‌های ادراری انجام‌شد نسبت به کوتریموکسازول و آموکسی‌سیلین (از بتالاکتام‌ها) میزان بالایی مقاومت گزارش شد. جنتامیسین مؤثرترین دارو بود.[۲۰] در مطالعه ما میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی بسیار بالا بود. در اکثر این مطالعات سویه‌های مورد مطالعه مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی بالایی نشان دادند.

همانطور که ملاحظه می‌شود الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه ما همانند نتایج به‌دست آمده از سایر کشورهای آسیایی و مناطق مختلف کشور خودمان می‌باشد. مقاومت بالا به آمپی‌سیلین که جزء بتالاکتام‌ها می‌باشد به دلیل استفاده بیشتر توسط پزشکان، مصرف بی‌رویه و در دسترس بودن به‌ویژه در کشورهای جهان سوم می‌باشد و نشان می‌دهد که مقاومت به آمپی‌سیلین در اکثر مناطق بسیار شایع است. پس می‌توان ادعا نمود که آمپی‌سیلین که از داروهای پرمصرف می‌باشد در درمان عفونت دستگاه ادراری نقشی نمی‌تواند داشته باشد. هم چنین تجویز کوتریموکسازول که در بیشتر موارد به‌عنوان درمان اولیه برای عفونت دستگاه ادراری به‌کار می رود نیز مناسب نمی‌باشد. در صورتی که عفونت محدود به مجاری ادراری تحتانی باشد به راحتی می‌توان نیتروفورانتوئین و نالیدیکسیک اسید را به دلیل تراکم بالایی که در ادرار پیدا می‌کنند تجویز کرد. از آمینوگلیکوزیدها (مثل جنتامیسین) نیز می‌توان به‌عنوان داروی انتخابی درمان UTI استفاده کرد.

نظر به این‌که خصوصیات فنوتیپی از قبیل الگوهای بیوشیمیایی، وجود آنتی‌ژن‌های سطحی سلول و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس تغییرات در شرایط رشد تمایل به تغییر دارند، استفاده از این خصوصیات برای شناسایی منبع عفونت یا بیماری‌های ایجادشده توسط گونه‌های هتروژن نظیر *اشریشیاکلی* مفید نبوده یا ارزش محدودی خواهد داشت، برای شناسایی اپیدمیولوژی چنین عفونت‌های چند عاملی و گونه‌های هتروژن، استفاده از روش‌های مولکولی نظیر آنالیز الگوی‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از الگوی برش DNA پلاسمیدی یا کروموزومی به‌وسیله آنزیم‌های محدودکننده ضروری است. روش‌های زیادی برای جداکردن DNA پلاسمیدی از باکتری‌ها به‌کار برده شده‌است. این روش‌ها برای نوع خاص باکتری از قبیل باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی، اندازه پلاسمیدها، تعیین الگوی‌پلاسمیدی، هضم با آنزیم‌های محدودکننده یا اهداف بالینی سازگار شده‌اند.[۱]

نتایج به‌دست آمده نشان داد که ۹۱ درصد سویه‌های مورد مطالعه ما حاوی پلاسمید بودند. در پژوهشی که به وسیله Woo-Joo و همکاران در کره (۱۹۵۵) بر روی *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت دستگاه ادراری انجام‌شد، ۷۲ درصد سویه‌ها حاوی پلاسمید بودند.[۲۱] در مطالعه کرباسی‌زاده و همکاران در اصفهان (۱۳۸۲) که بر روی کلی‌فرم‌ها جداشده از عفونت‌های بیمارستانی انجام‌شد، ۷۶٪ سویه‌های *E.coli* جداشده از عفونت دستگاه ادراری دارای پلاسمید بودند.[۱۵] در مطالعه صادقی و همکاران که در تبریز (۱۳۸۴) برروی سویه‌های *اشریشیاکلی*‌های جداشده عفونت‌های ادراری انجام گرفت ۹۰٪ سویه‌ها دارای پلاسمید گزارش شدند.[۱] تعداد پلاسمیدهای جداشده از سویه‌های مورد مطالعه ما از ۱ تا ۱۰ عدد بود. در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) تعداد ۱ تا ۷ پلاسمید در سویه‌ها گزارش شد.[۱]

در مطالعه ما وزن‌مولکولی پلاسمیدهای شناسایی‌شده عمدتاً در محدوده ۰/۶۹ تا ۹/۹۹ مگادالتون بود که در چند سویه پلاسمیدهایی با وزن بیشتر نیز شناسایی‌شد. در مطالعه دکتر کرباسی‌زاده و همکاران در اصفهان (۱۳۸۲)

Archive of SID

www.SID.ir

پلاسمیدهایی با وزن بیشتر از ۳۷/۲۲ مگادالتون گزارش شد.[۱۵] در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) وزن‌مولکولی پلاسمیدها بین ۰/۶۶ تا ۱۳/۸۶ مگادالتون گزارش شد که در برخی از سویه‌ها پلاسمیدهای بیش از ۱۳/۸۶ مگادالتون نیز گزارش شد.[۱]

از سویه‌های مورد مطالعه ما ۹۱ درصد دارای پلاسمیدی با وزن ۹/۹ مگادالتون بودند. این مسأله می تواند نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک سویه‌های UPEC (UroPathogenic E.coli) باشد[۲۲]. در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) نیز پلاسمیدی با وزن ۱۳/۸۶ مگادالتون در میان ۸۴ درصد از سویه‌های مورد مطالعه مشاهده شد.[۱] در مطالعه دکتر کرباسی‌زاده و همکاران در اصفهان (۱۳۸۲) یک پلاسمید کانجوگیتیو با وزن بیش از ۳۷/۲ مگادالتونی در ۵۰ درصد سویه‌های *اشریشیاکیلی* مورد مطالعه مشاهده شد.[۱۵] در مطالعه Malkawi در اردن (۱۹۸۸) که برروی ***E.coli*** جداشده از بیماران مبتلا به اسهال انجام‌شد همه سویه‌های جداشده دارای پلاسمیدی با وزن ۱۶/۵ مگادالتون بودند.[۲۳]

در مطالعه ما ۹۱ درصد از سویه‌ها (یعنی همه سویه‌های دارای پلاسمید) حاوی پلاسمیدی با وزن ۹/۹ مگادالتون بودند. از طرف دیگر ۸۵ درصد از این سویه‌ها به آمپی‌سیلین مقاومت نشان می‌دادند. بنابراین این احتمال وجود دارد که ژن کدکننده مقاومت در برابر آمپی‌سیلین روی پلاسمید ۹/۹ مگادالتونی قرار گرفته باشد. در مطالعه مبین و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) برروی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز، سویه‌های مورد مطالعه دارای پلاسمیدهای ۳/۹۶ و ۲/۶۴ مگادالتونی بودند. پس از حذف پلاسمیدی با توجه به نتایج به نظر می‌رسید که پلاسمید ۲/۶۴ مگادالتونی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی مؤثر بود.[۲٤] در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) ۸۴ درصد سویه‌ها حاوی پلاسمید با وزن ۱۳/۸۶ مگادالتون داشتند و ۸۳٪ از این سویه‌ها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند. آن‌ها نیز احتمال قرار گرفتن ژن کدکننده مقاومت به آمپی‌سیلین روی پلاسمید ۱۳/۸۶ مگادالتونی را بیان کردند.[۱] در مطالعه کرباسی‌زاده و همکاران در اصفهان (۱۳۸۲) پلاسمید کانجوگیتیو با وزن بیش از ۳۷/۲ مگادالتون موجود در ۵۰ درصد از سویه‌های *اشریشیاکلی* مورد مطالعه، حاوی ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فلزات سنگین بود.[۱۵] در پژوهشی که Malkawi در اردن (۱۹۹۸) برروی ***E.coli*** های جداشده از اسهال انجام‌شد، حضور ژن کدکننده مقاومت به آمپی‌سیلین برروی پلاسمیدهایی با وزن ۱۶/۵ مگادالتونی به اثبات رسید.[۲۳]

در مطالعه ما از ۴۴ سویه مورد مطالعه ۳۱ طرح‌پلاسمیدی به‌دست آمد که بیانگر حضور شایع پلاسمید در سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری است. در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) از ۱۰۰ سویه مورد مطالعه ۴۴ الگوی‌پلاسمیدی به‌دست آمد.[۱] در مطالعه Woo-Joo و همکاران در کره (۱۹۹۵) بر روی *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت دستگاه ادراری از ۳۲ سویه مورد مطالعه ۱۳ الگوی‌پلاسمیدی به‌دست آمد.[۲۱]

زمانی که تعداد پلاسمیدها کمتر از ۳ عدد و اندازه پلاسمیدها نسبتاً بزرگ باشد قدرت افتراق الگوی‌پلاسمیدی کاهش می‌یابد و باید از روش‌های دیگری نظیر برش آنزیمی برای افتراق سویه‌ها استفاده کرد. استفاده از آنزیم‌های محدودکننده در پلاسمیدهای کوچکتر از ۵۰kb که تعداد پلاسمید موجود در یک سویه نیز کمتر از ۳ عدد باشد، قدرت افتراق را افزایش می‌دهد.[۱] در این مطالعه سویه‌های دارای پلاسمید منفرد که مشابه بودند را با آنزیم محدودکننده EcoRI برش داده و الگوهای برشی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج به‌دست

Archive of SID

www.SID.ir

آمده در بعضی موارد تشابه الگوهای برشی را نشان می‌دهد و در بعضی موارد الگوهای برشی متفاوت هستند. دکتر کرباسی‌زاده و همکاران در اصفهان (۱۳۸۲) نیز در مطالعه خود از آنزیم‌های محدودکننده استفاده کردند که در چند سویه الگوی برشی یکسان را به‌دست‌آوردند.[۱۵] در مطالعه صادقی و همکاران در تبریز (۱۳۸۴) نیز از آنزیم‌های محدودکننده استفاده گردید که در مواردی الگوی برشی متفاوت و در برخی موارد الگوی برشی یکسانی حاصل شد. به‌طور کلی پس از هضم آنزیمی ۳۲ الگوی متفاوت به‌دست آمد.

لازم به توضیح است که در مطالعه ما بعضی سویه‌های فاقد پلاسمید، مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دادند. همان طور که می دانیم مقاومت آنتی‌بیوتیکی علاوه بر کدشدن توسط پلاسمید، می‌تواند به‌وسیله ترانسپوزون، فاژ و ژن‌های کروموزومی نیز کد شود.[۱۵،۲۵] ما چنین حدس می‌زنیم که در این سویه‌ها مقاومت غیر پلاسمیدی است و توسط عوامل نام برده کد می‌شود.

قابل ذکر است که بعضی محققان بیان می‌کنند که بعضی سویه‌ها دارای پلاسمید هستند پس در آزمایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت نشان می‌دهند؛ اما ممکن است درطی مراحل آزمایشگاهی این پلاسمید از دست برود و باکتری در آنالیزپلاسمیدی فاقد هرگونه باندپلاسمیدی باشد. Brown و همکاران (۱۹۹۱) ناپایداری پلاسمیدها در شرایط عدم حضور آنتی‌بیوتیک در محیط کشت و ازبین‌رفتن آن‌ها را در طی مراحل آزمایشگاهی گزارش کرده‌اند.[۲۶] هم چنین Teophilo و همکاران در برزیل (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای که بروی *E.coli* های جداشده از مواد غذایی دریایی و طرح‌پلاسمیدی آن‌ها انجام داده‌اند از دست رفتن پلاسمیدها در حین کارهای آزمایشگاهی را بیان کرده‌اند.[۲۷]

در مطالعه ما بعضی از سویه‌ها که دارای چندین پلاسمید بودند به‌هیچ‌کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاومت نشان ندادند. همان طور که می‌دانیم انواع مختلفی از پلاسمیدها وجود دارند (عامل F، عامل Col، پلاسمیدهای تجزیه کننده مواد و پلاسمیدهای مربوط به فاکتورهای بیماری‌زا مثل انتروتوکسین، همولیزین، فیمبریه و ...). می‌توانیم چنین نتیجه بگیریم که پلاسمیدهای موجود در این سویه‌ها پلاسمیدهایی غیر از پلاسمید عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد و یا اگر پلاسمید کدکننده ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد، دارای ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک دیگری غیر از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه ما می‌باشد.

در این پژوهش سه روش تایپینگ یعنی سروتایپینگ، رزیستوتایپینگ و بررسی الگوی‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده در مورد سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های ادراری مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. به‌روش سروتایپینگ ۴ سویه، به‌روش رزیستوتایپینگ ۲۴ سویه و به‌روش تعیین الگوی‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده ۳۲ سویه مختلف شناسایی‌شدند. در مطالعه ما روش سروتایپینگ به دلیل محدودیت در آنتی‌سرم‌های O موجود در کیت مورد استفاده و در نتیجه عدم سروتایپ درصد بالایی از نمونه ها، روش مناسبی برای تایپینگ در نظر گرفته نشد. زمانی می‌توان از سروتایپینگ برای تایپینگ استفاده کرد که آنتی‌سرم‌های مورد استفاده کامل باشد. روش تعیین طرح‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده قدرت افتراق سویه‌های بیشتری را نسبت به دو روش سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ نشان داد. این روش به‌طور موفقی برای تایپینگ سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از موارد عفونت دستگاه ادراری انسانی مورد

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده قرار گرفت. بسیاری از محققین از بررسی طرح‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده برای تایپینگ باکتری‌های گرم منفی مثل *اشریشیاکلی* استفاده کرده اند. آن‌ها معتقد بودند که این روش بر سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ ارجح است. در مطالعه‌ای که رفیعی طباطبایی و همکاران در تهران (۱۳۷۷) برروی *سالمونلا*های جداشده از نمونه‌های کلینیکی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بررسی طرح‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده روش مناسبی برای تایپینگ سویه‌های موردمطالعه بوده و نسبت به‌روش‌هایی مثل رزیستوتایپینگ ارجحیت دارد.[۲۸] در مطالعه‌ی دیگری از رفیعی طباطبایی و همکاران در تهران (۱۳۸۰) بررسی طرح‌پلاسمیدی به‌همراه استفاده از آنزیم‌های محدودکننده به‌طور موفقی برای تایپینگ سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از طیور مورد استفاده قرار گرفت و این روش سویه‌های بیشتری نسبت سروتایپینگ و رزیستوتایپینگ افتراق داده است.[۶] Olukoya و همکاران در نیجریه (۱۹۹۰) در مطالعه ای که برروی *شیگلا* انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بررسی طرح‌پلاسمیدی سویه‌های بیشتری را نسبت به رزیستوتایپینگ جدامی‌کند.[۲۹]

Archive of SID

Refrences:

1. Sadeghi, J., Nahaei. M.R, Asgharzadeh, M.S, *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences & Health Services*, **27**(2), 51(2005).
2. Katouli, M., Brauner, A., Haghighi, L., Kaijser, B., Muratov, V., Mollby, R., *Journal of Infection*, **50**(4), 312 (2004).
3. Raka, L., Mulliqi-Osmani, G., Berisha, L., Begolli, L., Omeragiq, Sh., Parsons, L., Salfinger, M., Jaka, A., Kurti, A., Jakupi, X.H., *International Journal of Antimicrobial Agents*, **23**(1), 2 (2004).
4. Lee, S.J., Lee, S.D., Cho, I.R., Sim, B.S., Lee, J.G., Kim, C.S., Kim, M.E., Cho, Y., Woo, Y., *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**(1), 61 (2004).
5. Adibfar, P., *Medical microbiology*, noore danesh, Tehran (2001).
6. Rafieii Tabatabaei. R, nasirian. R, *Medical Journal of Kurdistan University*, **22**(1), 1 (2001).
7. Kasra kermanshahi. R, *Bacteria and Mechanism of their Virolance*, Jahaddaneshgahi, Isfahan, Iran (2002)
8. Baron, E.J., Finegold, S.M., *Baily and Scott's Diagnostic Microbiology*, the C.V. Mosby Company (2002)
9. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Truck, M., *Am.j clin path*, **45**, 493 (1990)
10. *Performance Standard For antimicrobial disk Susceptibility Tests*, Nccls, **22,** 1 (2002).
11. Birnboim, H.C., Doly, J., *Nucleic Acids Research*, **7**(6), 1513 (1979).
12. Rickwood, D., Hames, B.D., *BIOS Scientific Publisher*, Oxford University Press, New York (1990).
13. Martin, R., *Gel Electrophoresis: Nucleic Acids*, IRL Press, New York (1996)
14. Karaca, Y., Coplu, N., Gozalan, A., Oncul, O., Citil, B.E., Esen, B., *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**(1), 77 (2005).
15. Karbasizade, V., Badami, N., Emtiazi, G., *African Journal of Biotechnology*, **2**(10), 379 (2003).

www.SID.ir

16. Blanco, M., Blanco, J., Blanco J.E., Alonso, M.P., Abalia, I., Rodriguez, E., Bilbao, J.R., Umaran, A., *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*., **13**(4), 236 (1995).
17. Vranes, J., Schonwald, S., Sterk-Kuzmanovic, N., Ivancic, B., *Acta clin Croat*, **40**, 165 (2001).
18. Coimbra, R., Grimont, F., Lenormand, P., Burguiere, P., Beutin, L., Grimont, P., *Research in Microbiology*, **151**, 639 (2002).
19. Kurazono, H., Nakano, M., Yamamoto, Sh., Ogawa, O., Yuri, K., Nakata, K., Kimura1, M., Makino, S., Nair, G.B., *Microbiological Immunology*, **47**(10), 797 (2003).
20. Zaboli, F, Mirjalili. S.A., Eizadi, R, *First international Iranian congress on biological science*, 550 (2005).
21. Woo-Joo, K., Hee-Jin, J., Hyun-Jin, P., Min-Ja, K., Seung-chull, P., *Korean J. Infect. Dis.*, **27**(6), 505 (1995).
22. Smith, SI., Aboaba, Oo. Odeigha, P., Shodipo, K., Adeyeye, J.A., Ibrahim, A., Adebiyi, T.1., *African Journal of Biotechnology*, **2**(9), 322 (2003)
23. Malkawi, H.I., Youssef, MT., *J Trop Pedi*, **44**(3), 128 (1998).
24. Mobayyen, H, Nahei, MR, Amirmozaffari, N, Sadeghi, J, Rasouli, M, *First international Iranian congress on biological science*, 180 (2005).
25. Molina-Aja, A., Garcia-Gasca, A., Abreu-Grobois, A., Bolan-Mejia, Ana Roque, C., Gomez-Gil, B., , *FEMS Microbiology Letters*, **213**, 7 (2002).
26. Brown, D.J., Threffall, E.J., Rowe, B., *Epidemiol. Infect*., **106**, 247 (1991).
27. Teophilo, G.N.D., Vieira, R.H.S.F., Rodrigues, D.P., Menezes, F.G.R., *Int Microbiol*, **5**, 11 (2002).
28. Rafieii Tabatabaei, R., *Abstracts the 8th Congress of Biology,* Razi University, Iran (2000).
29. Olukoya, D.k., *Epidemiology of Infection*, **105**(1), 59 (1990).

Archive of SID

www.SID.ir