دوره ۲۱، شماره ۶۶، تابستان ۱۳۹۷، صفحات: ۶۲-۵۲

مقاله پژوهشی

تایپینگ سویه‌های *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان اصفهان و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های سروگروپ O25 به روش چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA

مهرنوش میرزاییان[۱]، حسن ممتاز[۲*]، زهرا بهزاده[۳]

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۳] استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۴/۱۶

چکیده

مقدمه: عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی هستند که عمدتاً توسط اشریشیاکلی اوروپاتوژنیک (UPEC: Uropathogenic Escherichia coli) ایجاد می‌شوند. در این ارتباط، هدف از مطالعه حاضر تعیین شیوع انواع سروگروپ‌های O در باکتری‌های اشریشیاکلی جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان اصفهان و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های سروگروپ O25 به روش RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۲۲۶ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از بیمارستان‌های استان اصفهان جمع‌آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های اشریشیاکلی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سروگروپ‌های این جدایه‌ها به روش PCR تعیین گردیدند و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های دارای سروگروپ O25 با استفاده از روش RAPD-PCR انجام شد.

یافته‌ها: از میان تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، ۹۶ جدایه اشریشیاکلی جدا گردید. شایع‌ترین انواع آنتی‌ژن O عبارت بودند از: O25 (۳۷/۵ درصد)، O21 (۹/۳۷ درصد) و O6 (۸/۳۳ درصد). شایان ذکر است که اختلاف آماری معناداری بین فراوانی سروگروپ O25 با سایر سروگروپ‌های شناسایی‌شده در جدایه‌ها مشاهده شد (P=۰/۰۲۶). همچنین دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های دارای سروگروپ O25، ۲۷ پروفایل مختلف را در میان این ۳۶ جدایه با ضریب تشابه بالای ۸۰ درصد نشان داد.

نتیجه‌گیری: در اشریشیاکلی‌های مولد عفونت ادراری، سروگروپ‌های O می‌توانند با الگوی عوامل ویرولانس در هر سویه در ارتباط باشند. روش RAPD-PCR می‌تواند برای تشخیص سویه‌های اشریشیاکلی از نمونه‌های بالینی و یا محیطی مورد استفاده قرار بگیرد. باید خاطرنشان ساخت که تنوع ژنتیکی بالا در جدایه‌ها نشانگر منابع مختلف آلودگی دستگاه ادراری به اشریشیاکلی می‌باشد.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی اوروپاتوژنیک، آنتی‌ژن O، عفونت دستگاه ادراری، RAPD-PCR

* **نویسنده مسئول:** حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴؛ ایمیل: hamomtaz@yahoo.com

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری پس از دستگاه تنفسی به‌عنوان یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها محسوب می‌گردد که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارد؛ به‌طوری که این عفونت در زنان بسیار شایع‌تر از مردان است. در کودکان نیز احتمال عفونت وجود دارد و ۵-۳ درصد از دختران و ۱ درصد از پسران به این عفونت دچار می‌شوند (۱). شدت عفونت ادراری به عواملی چون حساسیت میزبان و وجود فاکتورهای بیماری‌زا در سویه‌های مولد عفونت بستگی دارد (۲). میکروارگانیسم‌های متعددی در ایجاد عفونت ادراری نقش دارند که از آن جمله می‌توان به باکتری‌ها و قارچ‌ها اشاره کرد (۶-۳). امروزه باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان غالب‌ترین عامل ایجاد عفونت مجرای ادرار در بیش از ۸۰ درصد از بیماران گزارش شده است (۷).

اشریشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده *انتروباکتریاسه* است که به‌طور همزیست در روده بسیاری از جانوران خون‌گرم وجود دارد. برخی از سویه‌های این باکتری با به‌دست‌آوردن عوامل بیماری‌زا از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها، باکتریوفاژها و ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی از حالت همزیست خارج شده و طبیعت بیماری‌زا پیدا می‌کنند (۱۲-۸). از میان سروتیپ‌های متعدد *اشریشیاکلی*، تنها تعداد کمی از آن‌ها توانایی ایجاد عفونت ادراری دارند که به آن‌ها *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک گفته می‌شود (۱۳). سویه‌های اوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* عموماً با استفاده از آنتی‌ژن O تقسیم‌بندی می‌گردند و عموماً گروه‌های O1، O2، O4، O6، O7، O8، O15، O16، O18، O21، O22، O25، O75 و O83 مرتبط با سویه‌های اوروپاتوژنیک می‌باشند (۱۴).

از روش‌های تشخیصی گوناگونی جهت شناسایی این باکتری استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به روش‌های سرولوژیکی، کشت سلولی و روش‌های مولکولی اشاره کرد. در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی، استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه PCR به دلیل حساسیت بسیار بیشتر نسبت به روش‌های دیگر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. از مهم‌ترین روش‌های بر پایه PCR می‌توان به روش چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA (RAPD-PCR) اشاره کرد. این روش که با استفاده از پرایمرهای کوچک تصادفی انجام می‌شود دارای مزیت‌های فراوانی است که از آن جمله می‌توان به هزینه کمتر نسبت به سایر تکنیک‌ها، نمونه‌برداری تصادفی بسیاری از جایگاه‌های ژنی، عدم نیاز به ترادف اولیه جهت ساخت و طراحی پرایمر، امکان بررسی همزمان چندین ژن و سرعت نسبتاً زیاد اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی RAPD کاربردهای فراوانی دارند که از آن جمله می‌توان به ژنوتایپینگ، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، بررسی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی، انگشت‌نگاری DNA و شناسایی و بررسی تفاوت‌ها در سطح سوش اشاره کرد (۱۵،۱۶). با وجود آنکه مطالعات بسیاری در ارتباط با عوامل ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری و به‌ویژه مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده از بیماران مبتلا به این عفونت‌ها انجام شده‌اند؛ اما دسته‌بندی ژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مولد عفونت‌های دستگاه ادراری مورد بررسی قرار نگرفته‌اند؛ از این رو هدف از مطالعه حاضر تایپینگ سویه‌های *اشریشیاکلی* جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان اصفهان و دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های سروگروپ O25 به روش RAPD-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها

در این مطالعه ۲۲۶ نمونه ادرار در بازه زمانی خرداد

۱۳۹۵ تا خرداد ۱۳۹۶ از بیماران بستری در مراکز درمانی و بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری (بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و تأمین اجتماعی) جمع‌آوری گردید. شناسایی اولیه *اشریشیاکلی* از طریق کشت در محیط مک‌کانکی (MacConkey) (Merck، آلمان) و آزمایشات مختلف بیوشیمیایی مانند رشد در محیط ائوزین متیلن بلو (EMB: Eosin Methylene Blue) (Merck، آلمان)، واکنش تولید اسید در محیط TSI (Triple Suger Iron) (Merck، آلمان) و واکنش IMViC (Indole Methyl red Voges-proskauer Citrate) (از طریق کشت در محیط‌های SIM (Sulfide Indol Motility)، MR/VP (Methyl Red/Voges Proskauer) و سیمون سیترات (Simmons Citrate) (Merck، آلمان) صورت گرفت.

شناسایی مولکولی ایزوله‌ها به روش PCR

به‌منظور تأیید جدایه‌های احتمالی *اشریشیاکلی*، تکثیر ژن 16srRNA با استفاده از روش PCR انجام شد. جهت انجام PCR ابتدا ژنوم باکتری‌هایی که براساس تست‌های بیوشیمیایی به‌عنوان *اشریشیاکلی* تشخیص داده شدند به کمک کیت استخراج DNA (سیناژن- ایران) استخراج گردید. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن 16srRNA در جدول ۱ نشان داده شده‌اند (۱۷). واکنش نهایی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر DNA هدف، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۱ میکرومول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (Taq فرمنتاز لیتوانی) صورت گرفت. علاوه‌براین، برنامه دمایی

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر *ژن* 16srRNA و شناسایی سروگروپ‌های اوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*

سروگروپ	ژن هدف	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
E. coli	16srRNA	F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) R(5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3′)	۹۱۹
O1	*wzx*	F(5′-GTGAGCAAAAGTGAAATAAGGAACG-3′) R(5′-CGCTGATACGAATACCATCCTAC-3′)	۱۰۹۸
O2	*wzy*	F(5′-AGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGAC-3′) R(5′-AGTTTAGTATGCCCCTGACTTTGAA-3′)	۷۷۰
O4	*wzy*	F(5′-TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC-3′) R(5′-AATAATTTGCTATACCCACACCCTC-3′)	۶۶۴
O6	*wzy*	F(5′-GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC-3′) R(5′-TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC-3′)	۷۸۳
O7	*wzx*	F(5′-CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC-3′) R(5′-TGGCTTCGAGATTAAACCTATTCCT-3′)	۶۱۰
O8	*orf469*	F(5′-CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG-3′) R(5′-GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG-3′)	۴۴۸
O15	*wzy*	F(5′-TCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG-3′) R(5′-ATAAAACGAGCAAGCACCACACC-3′)	۱۸۳
O16	*wzx*	F(5′-GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG-3′) R(5′-GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG-3′)	۳۰۲
O18	*wzx*	F(5′-GTTCGGTGGTTGGATTACAGTTAG-3′) R(5′-CTACTATCATCCTCACTGACCACG-3′)	۵۵۱
O21	*wzx*	F(5′-CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG-3′) R(5′-TGAAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC-3′)	۲۰۹
O22	*wzx*	F(5′-TTCATTGTCGCCACTACTTTCCG-3′) R(5′-GAAACAGCCCATGACATTACTACG-3′)	۴۶۸
O25	*wzy*	F(5′-AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCGC-3′) R(5′-GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC-3′)	۲۳۰
O75	*wzy*	F(5′-GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT-3′) R(5′-ACCCGATAATCATATTCTTCCCAAC-3′)	۵۱۱
O83	*wzx*	F(5′-GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG-3′) R(5′-TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC-3′)	۳۶۲

دستگاه PCR تحت شرایط زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل: دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه. در نهایت محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و در پایان توسط دستگاه UV transilluminator مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که برای بررسی باندهای حاصل از محصول PCR از DNA ladder به اندازه ۱۰۰ جفت باز و ۱ کیلو باز، از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی سروگروپ‌های اوروپاتوژنیک اشریشیاکلی

به‌منظور شناسایی سروگروپ‌های اوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* از پرایمرهای ذکرشده در جدول ۱ استفاده گردید.

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های سروگروپ O25 به روش RAPD-PCR

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های سروگروپ O25 *اشریشیاکلی* با استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی AACGCGCAAC انجام شد (۱۸). واکنش نهایی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۳ میکرولیتر DNA هدف، ۵ میکرولیتر PCR buffer 10x، ۲ میکرومول پرایمر RAPD، ۳۰۰ میکرو مول dNTPs، ۴ میلی‌مول $MgCl_2$ و ۳ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (Taq فرمنتاسلیتوانی) صورت گرفت. برنامه دمایی دستگاه PCR نیز تحت شرایط زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه (۱۸). در نهایت محصولات PCR مربوط به مرحله فوق در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید و در پایان با استفاده از دستگاه UV transilluminator ارزیابی شد.

آنالیز نتایج

نتایج حاصل از فراوانی سروگروپ‌های شناسایی‌شده در ایزوله‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 18 و مدل آماری مربع کای و نتایج حاصل از الکتروفورز ۳۶ ایزوله توسط نرم‌افزار Bionumerics (Applied Maths، Sint-Martems-Latem، Belgium) و ضریب تشابه دایس آنالیز شدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که شباهت بالای ۸۰ درصد در یک پروفایل قرار گرفت.

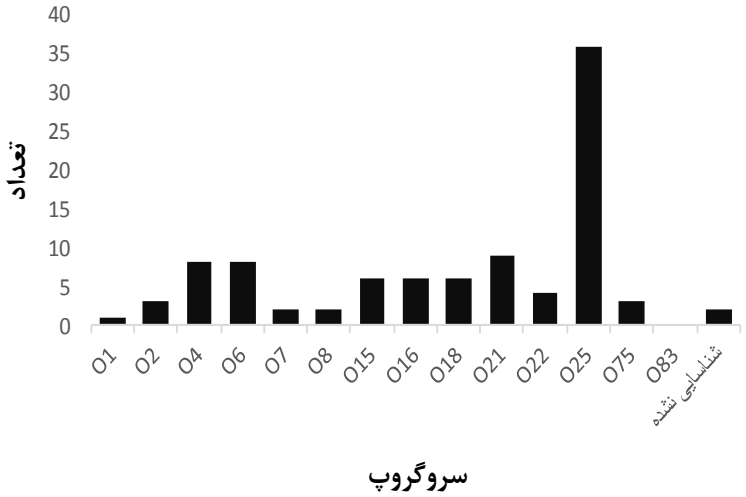
نتایج

نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که از ۲۲۶ نمونه ادرار مورد مطالعه، ۹۶ نمونه (۴۲/۴۷ درصد) آلوده به *اشریشیاکلی* بودند. تمام نمونه‌هایی که در روش بیوشیمیایی *اشریشیاکلی* تشخیص داده شدند، از نظر داشتن ژن 16srRNA مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که تمام ایزوله‌های جداشده حامل این ژن بودند.

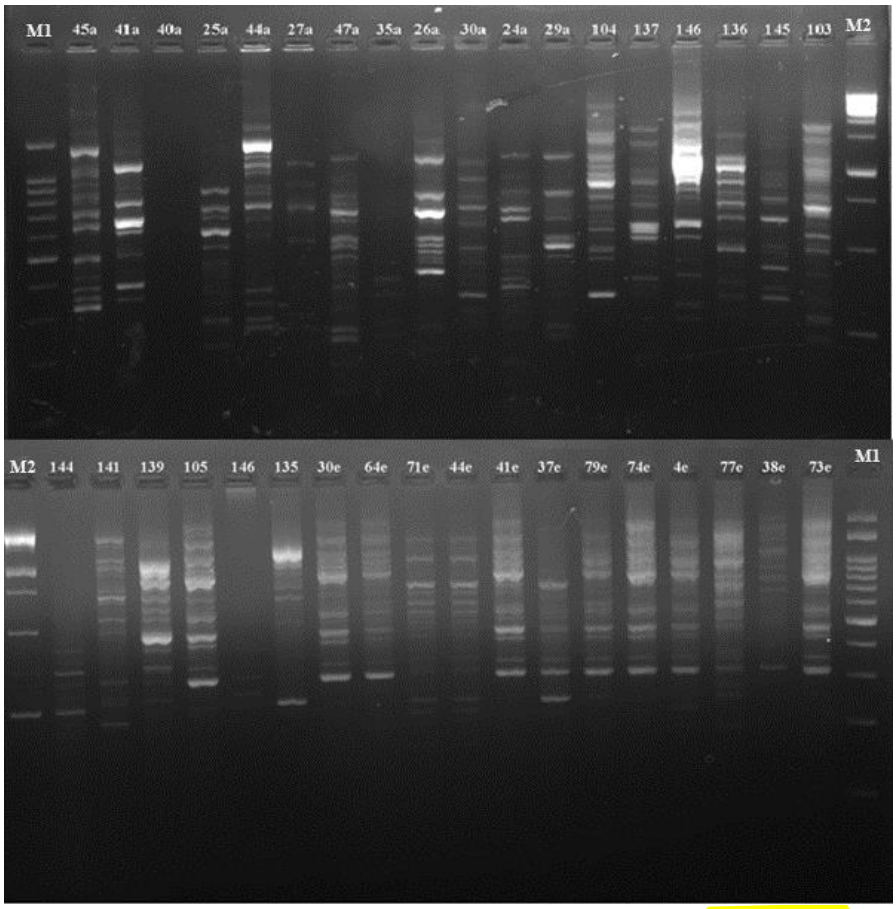
به‌منظور شناسایی سروگروپ‌های مختلف ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداشده از روش PCR استفاده گردید. نتایج نشان داد که در میان این ایزوله‌ها، سروگروپ O25 از فراوانی بیشتری نسبت به سایر سروگروپ‌ها برخوردار است (نمودار ۱). علاوه‌براین، در آنالیز آماری اختلاف آماری معناداری بین فراوانی سروگروپ O25 با سایر سروگروپ‌های شناسایی‌شده در جدایه‌ها مشاهده شد (P=۰/۰۲۶).

در این پژوهش ۳۶ ایزوله مربوط به گروه سرمی O25 انتخاب شده و به روش RAPD-PCR ژنوتایپ گردیدند.

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندی در محدوده ۱۵۰ تا

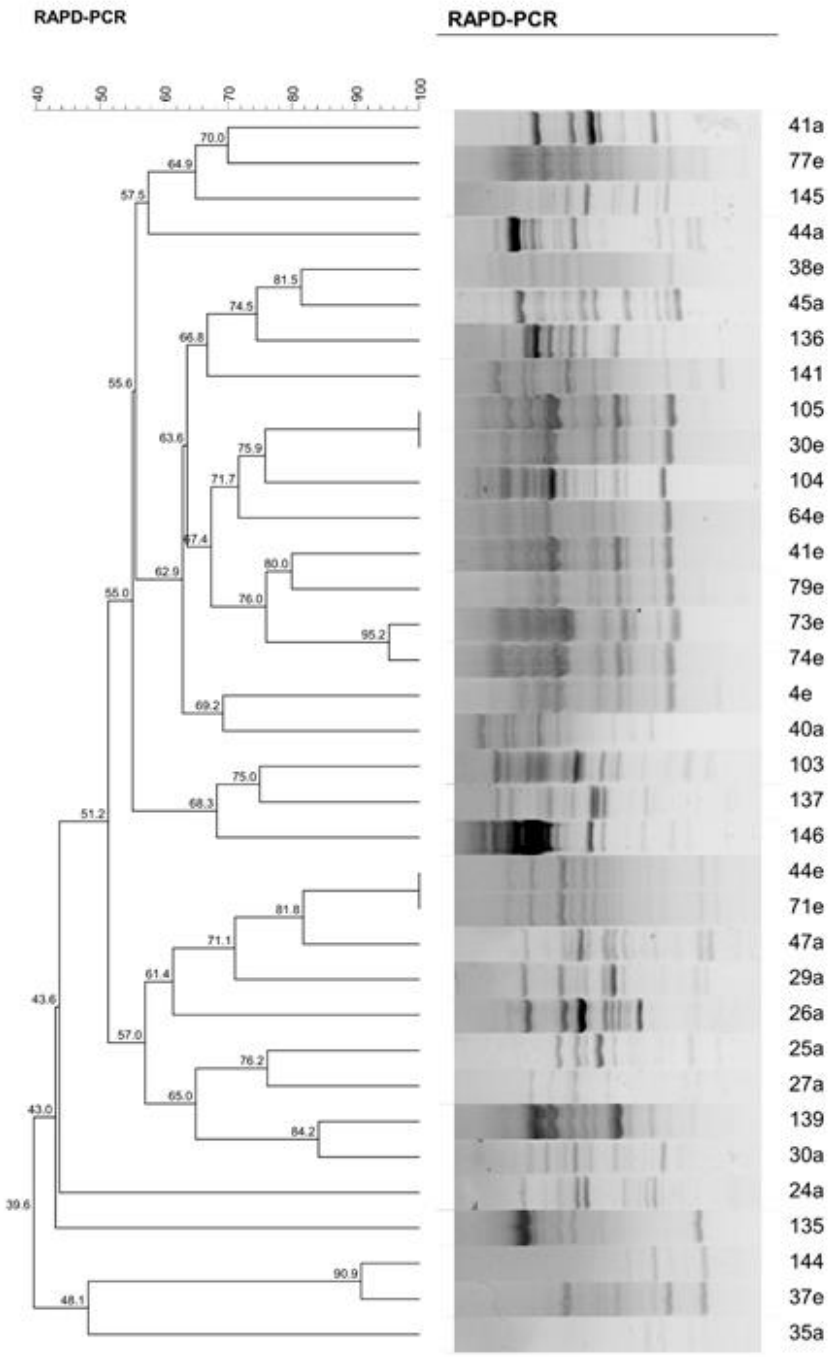


نمودار ۱: نتایج شناسایی سروگروپ‌های اوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*



شکل ۲: باندهای حاصل از آنالیز RAPD-PCR مربوط به سروگروپ‌های O25 باکتری *اشریشیاکلی*
(ستون M1= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون M2= مارکر ۱ کیلوبازی DNA)

۳۱۰۰ جفت باز بودند. از سوی دیگر آنالیز RAPD، ۲۷ پروفایل مختلف در ۳۶ ایزوله O25/*شریشیاکلی* را نشان داد. شایان ذکر است که دو جفت از ایزوله‌ها شامل (30e، 105) و (71e، 44e) الگوی یکسانی داشتند. باید خاطرنشان ساخت که به‌جز قرابت ۱۰۰ درصدی بین ایزوله‌های فوق، بیشترین قرابت ژنتیکی معادل ۹۵/۲ و کمترین میزان آن ۳۹/۶ درصد تعیین شد. ایزوله‌هایی که قرابت بالای ۸۰ درصد داشتند در یک پروفایل قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳: دندروگرام ارتباط ژنتیکی بین سروگروپ‌های O25 باکتری *اشریشیاکلی* براساس نشانگر RAPD-PCR

بحث

عفونت مجاری ادراری شامل عفونت کلیه‌ها و مثانه می‌باشد و درمان نامناسب آن می‌تواند باعث ایجاد نارسایی کلیوی گردد. در بیش از ۸۰ درصد از موارد این عفونت توسط باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد می‌شود که آن را *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک می‌گویند (۱۹،۲۰). این سویه‌ها دارای ویژگی‌های ویرولانس خاصی هستند که در کلونیزاسیون و بیماری‌زایی آن نقش دارند (۲۱). شناسایی این سویه‌ها اغلب براساس روش‌های سرولوژیکی و توسط آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری مانند آنتی‌ژن سوماتیک O صورت می‌گیرد. این آنتی‌ژن قسمتی از لیپوپلی‌ساکارید موجود در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی است که از واحدهای اولیگوساکاریدی تکرارشونده ساخته شده و عامل اصلی تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. علاوه‌براین، این باکتری براساس انواع مختلفی از آنتی‌ژن O به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌گردد (۲۲).

در مطالعه حاضر که در ارتباط با ۲۲۶ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح استان اصفهان انجام شد، ۹۶ (۴۲/۴۷ درصد) ایزوله *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک از بیماران جدا گردید. در مطالعه‌ای مشابه که توسط والوی و همکاران در جنوب غربی ایران انجام شد، میزان شیوع *اشریشیاکلی* اوروپاتوژنیک در بیماران مبتلا به عفونت ادراری ۴۳/۲۷ درصد اعلام گردید که با مطالعه حاضر بسیار مشابهت دارد (۲۳)؛ درحالی که براساس مطالعه Manjula در هند و پژوهش Abiodun در نیجریه، این مقدار به‌ترتیب ۵۶/۷۹ و ۸۴ درصد می‌باشد که اختلاف بسیار زیادی با نتایج مطالعه حاضر دارد (۲۴،۲۵). یکی از دلایل این امر می‌تواند عدم رعایت بهداشت فردی در این نواحی باشد.

سروگروپ‌های سویه‌های اوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* با برخی از عوامل مؤثر در بیماری‌زایی این باکتری در ارتباط هستند. در مطالعات گذشته گزارشاتی مبنی بر ارتباط بین سروگروپ‌های مختلف این باکتری و سویه‌های اوروپاتوژنیک مشاهده شده است (۲۶). در مطالعه حاضر ۱۴ سروگروپ O در جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت. از ۹۶ جدایه مورد بررسی، ۹۴ جدایه (۹۷/۹۱ درصد) واجد یکی از سروگروپ‌های مورد بررسی بودند و تنها ۲/۰۹ درصد از سویه‌ها فاقد این سروگروپ بودند که از این میان، سروگروپ O25 با فراوانی ۳۷/۵ درصد بیشترین فراوانی را در میان سروگروپ‌های مورد مطالعه به خود اختصاص داد. در این ارتباط، در مطالعه‌ای که توسط عیسی‌زاده و همکاران در شهر رشت صورت گرفت، میزان فراوانی سروگروپ O25 برابر با ۳۹/۱ درصد به‌دست آمد که تقریباً مشابه با نتایج مطالعه حاضر است (۲۷). همچنین نتایج پژوهش Dormanesh و همکاران نشان داد که سروگروپ‌های اصلی در عفونت ادراری O1، O2، O4، O7 و O25 هستند. در مطالعه گودرزی و همکاران در سه شهر تهران، سنندج و بروجرد نیز گزارش گردید که سروگروپ O1 دارای بیشترین فراوانی است. از سوی دیگر، در مطالعه حاضر سروگروپ O83 در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نشد که این مهم با نتایج مطالعات Dormanesh و همکاران و Goudarzi و همکاران مطابقت دارد (۲۸،۲۹).

در روش RAPD-PCR از تک‌پرایمرهای کوتاه الیگونوکلئوتیدی استفاده می‌شود که بخش‌های خاصی از ژنوم را برای تولید الگوهای باندینگ قابل شناسایی جهت تمایز سویه‌های باکتریایی به روش PCR تکثیر می‌دهد و امروزه کاربرد گسترده‌ای در ژنوتایپینگ سویه‌های مختلف باکتری‌ها پیدا کرده است (۳۰).

مطالعه حاضر با هدف به‌کارگیری تکنیک RAPD-PCR

جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری انجام شد. در این مطالعه از تکنیک RAPD برای ژنوتایپینگ ۳۶ ایزوله *E. coli* یوروپاتوژن سروگروپ O26 جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های استان اصفهان استفاده شد و قرابتی بین ۳۹/۶ تا ۱۰۰ درصد در این ایزوله‌ها با ضریب تشابه دایس مشاهده گردید.

در این راستا، در مطالعه‌ای در هند از تکنیک RAPD جهت تعیین الگوی ژنتیکی ۵۸ ایزوله *E. coli* جداشده از عفونت‌های دستگاه اداری در بیمارستان Tamil Nadu استفاده شد و ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ این ایزوله‌ها بررسی گردید. در این بررسی ۲۴ ایزوله در گروه B2، ۱۹ ایزوله در گروه A، ۲ ایزوله در گروه B1 و ۷ ایزوله در گروه D/*شریشیاکلی*های یوروپاتوژنیک قرار گرفتند (۱۸).

استفاده از پرایمرهای مختلف و بیش از یک پرایمر در تکنیک RAPD ممکن است قدرت تمایزدهی و ژنوتایپینگی RAPD را بهبود بخشد. در این ارتباط، Chansiripornchai و همکاران (۲۰۰۱) در پژوهش خود از شش پرایمر مختلف در آزمایش RAPD استفاده کردند و نشان دادند که پرایمر شماره ۴ برای بررسی الگوی ژنتیکی سویه‌های *E. coli* ارجحیت دارد (۳۰).

اخیراً از روش‌های مولکولی زیادی جهت تعیین منشأ و منبع عفونت‌های باکتریایی استفاده شده است. روش‌هایی مانند ریبوتایپینگ (۳۱)، ERIC-PCR (۳۲)، RAPD-PCR (۳۳،۳۴) و RFLP (۳۵) به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌منظور متمایزکردن سویه‌های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از کاربردی‌ترین روش‌های مولکولی به‌ویژه برای ژنوتایپینگ سویه‌های *E. coli* روش RAPD-PCR است که در مطالعه حاضر نیز از همین روش جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های UPEC استفاده شد. در این زمینه، پژوهشی در مورد ژنوتایپینگ سویه‌های *E. coli* جداشده از انسان و دام توسط Tseng و همکاران با استفاده از روش RAPD-PCR انجام شد. این پژوهشگران تکنیک RAPD را به‌عنوان یک تکنیک حساس برای انگشت‌نگاری سویه‌های *E. coli* گزارش کردند (۳۶).

در مطالعه‌ای دیگر تعیین مشخصات مولکولی و ژنتیکی سویه‌های *E. coli* پاتوژنیک در جوندگان آزمایشگاهی با استفاده از روش RAPD انجام شد (۳۷). در بررسی Carvalho و همکاران (۲۰۰۷) نیز رابطه کلونال بین ایزوله‌های انتروپاتوژنیک انسان و پریمات‌ها با به‌کارگیری روش RAPD نشان داده شد (۳۸).

از سوی دیگر، در مطالعه افشاری و همکاران (۲۰۱۶) از تکنیک RAPD جهت تمایز ایزوله‌های *E. coli* براساس میزبان و نوع عفونت استفاده گردید. نتایج حاکی از آن بودند که RAPD-PCR می‌تواند ایزوله‌های *E. coli* جداشده از گوساله‌های اسهالی و سپتی‌سمیک را با درصد تشابه ۱۰۰ و ۹۳/۳ از یکدیگر متمایز سازد (۳۳).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ایزوله‌های مورد مطالعه دارای باندهای مختلف در محدوده ۱۵۰ تا ۳۲۰۰ جفت باز بودند و طبق دندروگرام ترسیم‌شده بر پایه ضریب تشابه دایس در شاخه‌های مختلف قرار گرفتند؛ به‌طوری که در سطح تشابه بالای ۸۰ درصد در ۲۷ پروفایل مختلف جایگزین شدند. این تنوع زیاد در ایزوله‌ها احتمالاً ناشی از منابع مختلف آلوده‌کننده دستگاه ادراری و منشأ مختلف عفونت بالینی می‌باشد؛ اما برای اطمینان بیشتر لازم است منابع مختلف عفونت‌های بیمارستانی بررسی گردند و آزمایش در مورد تعداد بیشتری ایزوله از منابع مختلف انجام شود؛ از این رو توصیه می‌گردد مطالعات مشابهی در بیمارستان‌های سطح کشور انجام شود و از روش‌های پیشرفته‌تر مولکولی نظیر PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) جهت

ژنوتایپینگ ایزوله‌های *E. coli* استفاده گردد.

حمایت مالی

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها با هماهنگی بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و با رضایت کامل بیماران اخذ شدند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و پژوهش با اطلاع و هماهنگی نویسندگان ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس صفری تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. J Clin Microbiol. 2006; 44(5):1776-81.
2. Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of Escherichia coli isolated from recurrent urinary tract infections. Saudi Med J. 2005; 26(11):1755-8.
3. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(5):269-84.
4. Parish A, Holliday K. Long-term care acquired urinary tract infections' antibiotic resistance patterns and empiric therapy: a pilot study. Geriatr Nurs. 2012; 33(6):473-8.
5. Palou J, Angulo JC, Ramón de Fata F, García-Tello A, González-Enguita C, Boada A, et al. Randomized comparative study for the assessment of a new therapeutic schedule of fosfomycin trometamol in postmenopausal women with uncomplicated lower urinary tract infection. Actas Urol Esp. 2013; 37(3):147-55.
6. Hof H. Candiduria! What now? Therapy of urinary tract infections with Candida. Urologe A. 2017; 56(2):172-9.
7. Borsari AG, Bucher B, Brazzola P, Simonetti GD, Dolina M, Bianchetti MG. Susceptibility of Escherichia coli strains isolated from outpatient children with community-acquired urinary tract infection in southern Switzerland. Clin Ther. 2008; 30(11):2090-5.
8. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. Int J Nephrol. 2012; 2012:681473.
9. Slavchev G, Pisareva E, Markova N. Virulence of uropathogenic Escherichia coli. J Culture Collec. 2009; 6(1):3-9.
10. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2):123-40.
11. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Int J Infect Dis. 2013; 17(6):e450-3.
12. Ghalandari SM, Mirzaei M, Najar PS. Frequency of papA, papC genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic Escherichia coli. J Microbial World. 2016; 9(1):44-52.
13. Wullt B, Bergsten G, Connell H, Röllano P, Gebretsadik N, Hull R, et al. P fimbriae enhance the early establishment of Escherichia coli in the human urinary tract. Mol Microbiol. 2000; 38(3):456-64.
14. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic E. coli. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52(3):397-406.
15. Abou-Dobara MI, Deyab MA, Elsawy EM, Mohamed HH. Antibiotic susceptibility and genotype patterns of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infected patients. Pol J Microbiol. 2010; 59(3):207-12.

16. Lee JC, Chang JG. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. Forensic Sci Int. 1994; 67(2):103-7.
17. 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(1):71-7.
18. Marialouis XA, Santhanam A. Antibiotic resistance, RAPD-PCR typing of multiple drug resistant strains of Escherichia Coli from urinary tract infection (UTI). J Clin Diagn Res. 2016; 10(3):DC05-9.
19. Kulkarni R, Dhakal BK, Slechta ES, Kurtz Z, Mulvey MA, Thanassi DG. Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic Escherichia coli. PLoS One. 2009; 4(3):e4752.
20. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(4):1198-202.
21. Rashki A, Abdi HA. O-serotyping of *Escherichia coli* Strains isolated from patients with urinary tract infection in southeast of Iran. Int J Enteric Pathog. 2014; 2(4):e20968.
22. Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan MD, Schembri MA. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic Escherichia coli. PLoS One. 2014; 9(4):e94786.
23. Valavi E, Nikfar R, Ahmadzadeh A, Kompani F, Najafi R, Hoseini R. The last three years antibiotic susceptibility patterns of uropathogens in Southwest of Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(4):e4958.
24. Manjula NG, Math GC, Patil A, Gaddad SM, Shivannavar CT. Incidence of urinary tract infections and its aetiological agents among pregnant women in Karnataka region. Adv Microbiol. 2013; 3(6):473-8.
25. Abiodun AO, Olufunke OA, Dunah FC, Oladiran F. Phenotypic identification and phylogenetic characterization of uropathogenic Escherichia coli in symptomatic pregnant women with urinary tract infections in South-Western Nigeria. Int J Biol. 2014; 6(4):145-55.
26. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, et al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic Escherichia coli including O25-ST131 in Mexico city. J Infect Dev Ctries. 2011; 5(12):840-9.
27. Issazadeh K, Naghibi SN, Khoshkholgh-Pahlaviani MM. Drug resistance and serotyping of uropathogenic Escherichia coli among patients with urinary tract infection in Rasht, Iran. Zahedan J Res Med Sci. 2015; 17(6):1-5.
28. Dormanesh B, Safarpoor Dehkordi F, Hosseini S, Momtaz H, Mirnejad R, Hoseini MJ, et al. Virulence factors and o-serogroups profiles of uropathogenic Escherichia coli isolated from Iranian pediatric patients. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(2):e14627.
29. Goudarzi V, Mirzaee M, Ranjbar R. O-serogrouping of Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection by using PCR method. Iran J Med Microbiol. 2017; 10(6):1-8.
30. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreeyajan J, Svenson SB. Differentiation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Vet Microbiol. 2001; 80(1):75-83.
31. Rodtong S, Tannock GW. Differentiation of Lactobacillus strains by ribotyping. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(10):3480-4.
32. Prabhu 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(3):298-301.
33. Afshari A, Rad M, Seifi HA, Ghazvini K. Genetic variation among Escherichia coli isolates from human and calves by using RAPD PCR. Iran J Vet Med. 2016; 10(1):33-40.
34. Gomes AR, Muniyappa L, Krishnappa G, Suryanarayana VV, Isloor S, Prakash B, et al. Genotypic characterization of avian Escherichia coli by random amplification of polymorphic DNA. Int J Poult Sci. 2005; 4(6):378-81.
35. 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(4):907-14.
36. Tseng C, Ting E, Johnson D, Saluta M, Dunst R. RAPD fingerprinting as a potential means for differentiating human and animal E. coli. Life Sci News. 2001; 7:10-1.
37. Maity B, Guru PY. Genetic diversity and molecular characterization of pathogenic Escherichia coli from different species of laboratory rodents. Indian J Biotechnol. 2007; 6:210-5.
38. Carvalho VM, Irino K, Onuma D, Pestana de Castro AF. Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic Escherichia coli isolated from non-human primates and humans. Braz J Med Biol Res. 2007; 40(2):237-41.

Volume 21, Issue 66, Summer 2018, Pages: 52-62

Original Article

Typing of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Isfahan Province and Genetic Classification of Serogroup O25 Isolates by RAPD-PCR Method

Mehrnoosh Mirzaeiyan[1], Hassan Momtaz[2*], Zahra Bamzadeh[3]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 29 March 2018 **Accepted:** 07 July 2018

Abstract

Introduction: Urinary tract infections (UTI) are one of the most common bacterial infections and are predominantly caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). The aim of this study was to investigate the prevalence of O-serogroups among *E. coli* isolated from patients with UTI in Isfahan Province and genetic classification of O25 serogroup isolates by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) method.

Materials and Methods: Overall, 226 urine samples from UTI patients were collected in hospitals in Isfahan Province, Iran. *E. coli* isolates were identified using standard methods. Serogroups of these isolates were determined by PCR method and genetic classification of isolates with serogroup O25 was performed using the RAPD-PCR method.

Results: A total of 96 *E. coli* strains were isolated from the urine samples. The most common types of O antigens were O25 (37.5%), O21 (9.37%), and O6 (8.33%), and there was a significant difference between the frequency of serogroup O25 and other serogroups identified in the strains (P=0.026). The genetic classification of isolates with serogroup O25 showed 27 different profiles among these 36 isolates with a similarity coefficient of 80%.

Conclusion: In UPEC, O-serogroups can be related to the virulence factor profile of each strain. The RAPD-PCR method can be used for the detection of relevant *E. coli* strains from clinical and/or environmental samples. High genetic diversity in isolates indicates different sources of urinary tract infection to *E. coli.*

Keywords: O-antigen, RAPD-PCR, Urinary tract infections, Uropathogenic *Escherichia coli*

* ***Corresponding Author:*** Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel: 03833361064; Email: hamomtaz@yahoo.com