مقاله اصیل پژوهشی

مطالعه فیلوژنتیکی سویه‌های یوروپاتوژنیک اشریشیاکلای در منطقه سیستان

حسینعلی عبدی[1]، احمد راشکی[2]

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های *اشریشیاکلای* ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری، دارای تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت می‌باشند. اطلاعات کمی در مورد گروه‌های فیلوژنتیکی، نوع و چگونگی عمل فاکتورهای بیماری‌زا در اشریشیاکلای مولّد عفونت‌های ادراری در مناطق مختلف ایران وجود دارد. در این مطالعه، الگوی فیلوژنتیکی و فراوانی فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های *اشریشیاکلای* جداشده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری، به روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق: در این مطالعه مقطعی- توصیفی، تعداد 100 ایزوله اشریشیاکلای، از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در فاصله زمانی بهمن 1391 تا مرداد 1392 جمع‌آوری گردید. ایزوله‌ها به روش آزمایش‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی رایج، مورد تأیید قرار گرفتند. DNA ژنومی ایزوله‌ها، به روش جوشاندن استخراج شد. تعیین فراوانی ژن‌های بیماری‌زا و الگوی گروه‌های فیلوژنتیکی، با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام گردید. نتایج با استفاده از آزمون دقیق فیشر، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان شیوع ژن‌های cnf1، iha، irp2 و ompT به‌ترتیب: 28%، 29%، 89% و 67% تعیین گردید؛ همچنین توزیع گروه‌های فیلوژنی A، B_1، B_2 و D در بین ایزوله‌های جداشده به‌ترتیب: 17%، 6%، 55% و 22% بود. به‌طور کلی، فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس به‌ترتیب به میزان 96%، 66%، 61% و 79% در ایزوله‌های گروه B_2 مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد که سویه‌های متعلّق به گروه B_2، فراوان‌ترین و حامل بیشترین ژن‌های بیماری‌زا می‌باشند؛ بنابراین می‌توانند در عفونت ادراری، نقش مؤثّرتری را نسبت به سایر گروه‌های فیلوژنی ایفا نمایند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلای یوروپاتوژنیک، آنالیز فیلوژنتیکی، فاکتورهای حدّت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1393؛ 21 (3): 385-393.

دریافت: 1393/02/11 **پذیرش: 1393/07/23.**

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، سیستان و بلوپستان، ایران؛

[2] نویسنده مسئول؛ استادیار میکروب‌شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوپستان، ایران.

آدرس: زابل- دانشگاه زابل- دانشکده دامپزشکی

تلفن: 00989151970877 پست الکترونیکی: ah_rashki@usal.es

مقدمه

عفونت مجاری ادراری شامل عفونت‌های کلیه‌ها و مثانه است که از نظر شیوع، دوّمین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی می‌باشد (1، 2). باکتری *اشریشیاکلای*، شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است. این ارگانیسم همچنین عامل 90% تمامی عفونت‌های ادراری شناخته‌شده در بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی است. شدّت عفونت، بستگی به هر دو عامل حساسیّت میزبان و وجود فاکتورهای حدّت در باکتری‌های مولّد عفونت دارد. سویه‌های اشریشیاکلای مولّد عفونت ادراری، بر خلاف واریوتایپ‌های مولّد عفونت‌های گوارشی، به نام سویه‌های اشریشیاکلای یوروپاتوژنیک (Uropathogenic E. coli (UPEC)) خوانده می‌شوند (3). امروزه مطالعات نشان می‌دهند که سویه‌های UPEC، دارای فاکتورهای حدّت ویژه‌ای هستند که در تجمّع و چسبیدن آنها به سطح سلول‌های مخاطی میزبان و مهار سیستم دفاعی آنها، نقش داشته و به پیشرفت و توسعه بیماری کمک می‌کنند (4)؛ از این میان، پروتئین 67 کیلودالتونی Iha، یک فاکتور حدّت دوعملکردی است که هم به‌عنوان گیرنده سیدروفور و هم در پروتئین‌های غشای خارجی به‌عنوان ادهسین، ایفای نقش می‌کند (5). پروتئین دیگری که به‌عنوان فاکتور حدّت در اشریشیاکلای ایفای نقش می‌کند، پروتئاز غشای خارجی (OmpT) است. این پروتئین، یکی از پروتئین‌های موجود در غشای خارجی اشریشیاکلای است که می‌تواند پپتیدهای کاتیونی ضدّ میکروبی سلول‌های پوششی و ماکروفاژها را تجزیه نماید (6). عامل حدّت دیگر، یرسینیاباکتین (irp2) است که به‌عنوان یک گیرنده سیدروفور در غشای اشریشیاکلای، موجب تشدید بیماری می‌شود (7). فاکتور نکروزدهنده سیتوتوکسیک (Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF))، موجب تغییر اکتین اسکلت سلولی میزبان و کمک به تهاجم باکتریایی به سلول‌های اندوتلیال سدّ خونی- مغزی می‌شود که در نهایت باعث مرگ آپاپتوزی سلول‌های پوششی مثانه می‌گردد (8). تحقیقات نشان می‌دهند که ژن cnf1، در سویه‌های UPEC و سویه‌های مولّد مننژیت نوزادان بیان می‌شود (9). ابتلای مکرّر به عفونت و مقاومت جدّی باکتری در آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه عوامل حدّت سویه‌های اشریشیاکلای جداشده از عفونت مجاری ادراری را ارزشمند می‌سازد. گروهی از محققین تأکید کرده‌اند که نوع گروه فیلوژنتیکی اشریشیاکلای، نقش مهمی در بیماری‌زایی آنها دارد. سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای، اساساً در گروه B_2 و به مقدار کمتر در گروه D قرار دارند؛ در حالی که سویه‌های کومنسال، متعلّق به گروه A و B_1 می‌باشند (8، 9).

نتایج حاصل از مطالعات مولکولی روی فاکتورهای بیماری‌زای اشریشیاکلای خارج روده‌ای نشان داده است که بیشتر فاکتورهای بیماری‌زا، در سویه‌های متعلّق به گروه B_2 دیده شده است؛ در حالی که سویه‌های متعلّق به گروه A و B_1، اغلب فاکتورهای بیماری‌زای کمتری دارند (4). بیماری‌زایی هر یک از این گروه‌های فیلوژنی A، B_1، B_2 و D، با فعالیّت فاکتورهای بیماری‌زای متفاوتی همراه است (10)؛ بنابراین با توجه به افزایش روزافزون عفونت‌های اشریشیاکلای و متفاوت‌بودن فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی در مناطق مختلف دنیا، مطالعه عوامل مرتبط با بیماری‌زایی در باکتری‌های جداشده ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی شناسایی عوامل حدّت باکتری، به پزشکان و دست‌اندرکاران بهداشت و درمان کشور اجازه می‌دهد که ضمن پیش‌بینی نقطه تکامل پیشرفت عفونت، دارو یا واکسن مناسب برای درمان و پیشگیری را طراحی و ارائه دهند؛ بنابراین این پژوهش برای تعیین میزان فراوانی ژن‌های مهم حدّت شامل: cnf1 ، iha، irp_2 و ompT و میزان توزیع آنها در چهار گروه مختلف فیلوژنتیکی اشریشیاکلای جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، در منطقه سیستان انجام شده است.

روش تحقیق

تهیه نمونه

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد 185 نمونه ادرار به روش Mid-stream (قسمت میانی جریان ادرار) از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های منطقه سیستان، در فاصله زمانی بهمن 1391 تا مرداد 1392 جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و EMB کشت شد؛ سپس با استفاده از آزمایش‌های رایج بیوشیمیایی مانند: اکسیداز، سیمون‌سیترات، تخمیر قندها، حرکت، ایندول، اوره‌آز، احیای نیترات، MR-VP متیل‌رد- وژپروسکوئر و تولید H_2S، تعداد 100 ایزوله اشریشیاکلای جمع‌آوری شد.

استخراج DNA ژنومی

ایزوله‌های اشریشیاکلای در محیط Leuria Bartauni (LB) مایع، به مدت 18-24 ساعت، در دمای 37°C گرماگذاری گردید؛ سپس باکتری از محیط مایع با کمک سانتریفوژ جدا گردید. سلول‌ها طی دو مرحله با محلول 1%PBS شستشو داده شد و در 100 میکرولیتر آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون به مدت 10 دقیقه در دمای 98°C جوشانده شد. پس از سانتریفوژکردن، محلول رویی حاوی DNA برای انجام Multiplex-PCR در دمای 20°C- ذخیره گردید.

آزمون Multiplex-PCR

برای شناسایی وجود ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس (cnf1، iha، irp2 و ompT) در ایزوله‌های اشریشیاکلای جداشده، از پرایمرهای جدول یک و تکنیک Multiplex-PCR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. برای انجام فرایند PCR، آنزیم Master Mix RED 2× از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش، 2میکرولیتر از DNA الگو، 12/5 میکرولیتر از Master Mix RED 2× و 1 میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (20 پیکومول در میکرولیتر)، با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی، با آب مقطر دو بار تقطیر، به 25 میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR، واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه در 94°C به مدت 5 دقیقه و سپس 35 سیکل تکثیر شامل: واسرشتگی در 94°C به مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در دمای 59°C به مدت 50 ثانیه، طویل‌شدن رشته الگو (extension) در 72°C به مدت 70 ثانیه و طویل‌شدن نهایی (final extension) به مدت 7 دقیقه در دمای 72°C.

جدول 1- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه (bp)	رفرانس
cnf1	F R	AGGCAGGAATAAACCAGGAGGT ACGAGCAGAATTTGACACACGA	1286	این مطالعه
ompT	F R	TGCGATCAGCTCTTTTGCTTCT AGTTGACTGACTTTTCGGCCTC	144	این مطالعه
irp2	F R	AGCATCGCCTGCTAAAACTGAA CAGACGATGCAGGGCGTTATTA	623	این مطالعه
iha	F R	CTGGAAGTCAGCATTCGTGGAA GATGCCACTCATCCTCAGCAAA	934	این مطالعه
chuA	F R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	(12)
yjaA	F R	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	(12)
TspE4C2	F R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	(12)

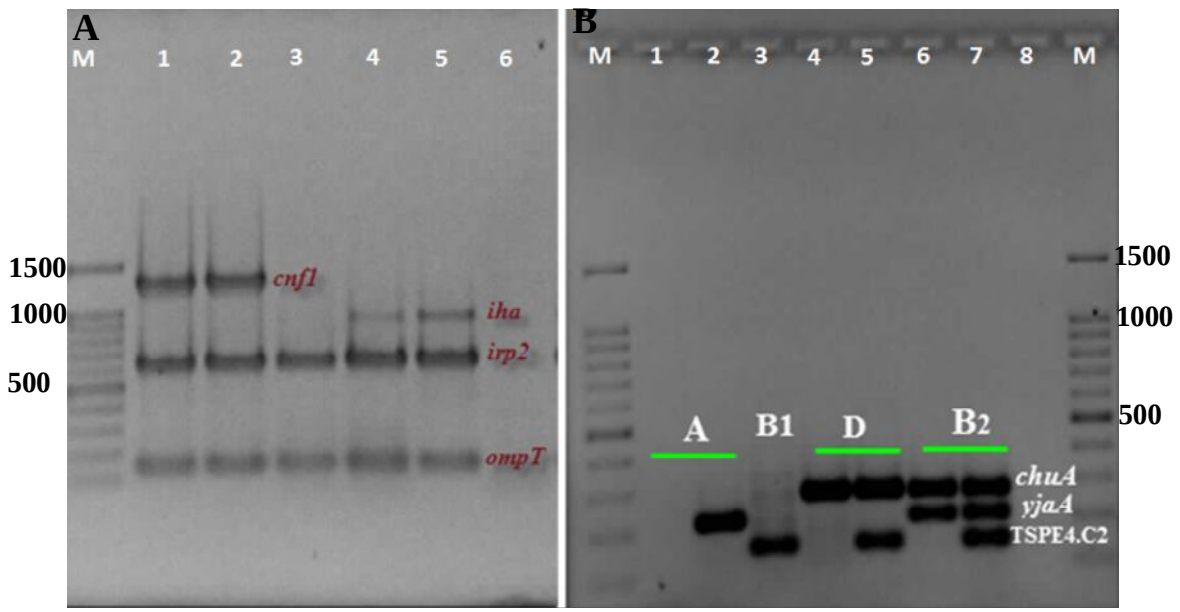
پس از انجام واکنش، 5 میکرولیتر از محصولات واکنش، در ژل آگارز 2% به مدت 40 دقیقه تحت تأثیر ولتاژ 75، الکتروفورز شد و قطعات تکثیرشده، با استفاده از نشانگر 100 Ladder ارزیابی شد (شکل 1A). قطعات تکثیرشده، توسط تعیین توالی و هضم آنزیمی تأیید گردید.

گروه‌بندی فیلوژنتیکی

تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلای جمع‌آوری‌شده، با استفاده از روش ذکرشده در سال 2000 توسط Clermont و همکاران انجام شد (11). در این روش، ژن‌های نشانگر chuA، yjaA و TspE4.C2 با پرایمرهای جدول یک تکثیر گردید (شکل 1 B1). بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز 2% و اندازه نشانگر 100 bp صورت گرفت. گروه‌بندی فیلوژنتیکی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق به‌صورت: گروه B_2 (chuA+، yjaA+ و TspE4.C2±)، گروه D (chuA+، yjaA- و TspE4.C2±)، گروه B_1 (chuA-، yjaA± و TspE4.C2+) و گروه A (chuA-، yjaA± و- TspE4.C2) انجام گرفت (11). سویه ECOR62 ($chuA^+$، $yjaA^+$ و $TspE4.C2^+$) به‌عنوان کنترل مثبت و سویه MG1655 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تجزیه و تحلیل آماری، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش 20) استفاده شد. برای مقایسه بین گروه‌های فیلوژنتیکی و توزیع ژنی و مقایسه ژن‌های بیماری‌زا با یکدیگر، از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید. سطح معنی‌داری α=0/05 در نظر گرفته شد.



شکل 1- نمونه محصولات PCR ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت (A) و ردیف‌های 1 و 2 گروه فیلوژنتیکی yjaA±، chuA-)، A) ردیف 3 گروه فیلوژنتیکی yjaA±، chuA-) B1 و TspE4.C2+)، ردیف‌های 4 و 5 گروه فیلوژنتیکی yjaA–، chuA+) D و TspE4.C2±) و ردیف‌های 6 و 7 گروه فیلوژنتیکی yjaA+، chuA+) B2 وTspE4.C2±) را نشان می‌دهد (B)

یافته‌ها

جدول 2- شیوع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت در در بین ایزوله‌های اشریشیاکلای متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی

ژن‌های کدکننده فاکتور های حدت	تعداد کل ایزوله‌های حاوی ژن‌ها	میزان توزیع فاکتورهای ویرولانس در گروه های فیلوژنتیکی				سطح معنی‌داری
		A(17)	B1(6)	B2(55)	D(22)	
cnf1	28	0(%0)	0(%0)	27(%49)	1(%5)	<0/001
iha	29	2(%12)	2(%33)	19(%35)	6(%27)	0/14
irp2	78	12(%71)	2(%33)	54(%98)	10(%45)	<0/001
ompT	67	3(%18)	1(%17)	53(%96)	10(%45)	<0/001

پس از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی تمامی 185 نمونه ادراری جمع‌آوری‌شده، تعداد 100 (54/1%) ایزوله اشریشیاکلای جدا گردید و با روش Multiplex-PCR، ژن‌های بیماری‌زای مورد نظر تکثیر گردید.

فراوانی ژن‌های cnf1، iha، irp2 و ompT در میان 100 ایزوله اشریشیاکلای به‌ترتیب: 28%، 29%، 89% و 67% تعیین گردید (جدول 2). در این مطالعه مشخص شد که در بین ایزوله‌های مورد بررسی، ژن irp2 بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داده بود و فراوانی ژن‌های ompT، iha و cnf1 به‌ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشت. بر اساس نتایج آورده‌شده در جدول 2، از 100 ایزوله اشریشیاکلای جمع‌آوری‌شده، تعداد 55 ایزوله (55%) در گروه B2، 22ایزوله (22%) در گروه D، 17 ایزوله (17%) در گروه A و 6ایزوله (6%) در گروه B1 قرار گرفتند (جدول 2). بررسی میزان توزیع ژن‌های cnf1، iha، irp2 و ompT در ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی نشان داد که به‌ترتیب: 96%، 66%، 61% و 79% در ایزوله‌های متعلّق به گروه فیلوژنتیکی، B2 مشاهده شد؛ همچنین بررسی آماری نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که توزیع ژن cnf1 در ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های A، B_2 و D و حضور ژن ompT و irp2 در ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های A و B_2، رابطه معنی‌داری داشت (جدول 2). توزیع ژن‌های iha در هیچ‌یک از ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی، رابطه معنی‌داری را نشان نداد. نتایج آورده‌شده در جدول 2 نشان می‌دهد که ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های A و B_1، فاقد حضور ژن cnf1 بودند. این ژن در یک ایزوله از گروه D و 27 ایزوله از گروه B_2 وجود داشت؛ همچنین نتایج مندرج در جدول 2 نشان می‌دهد که فقط یک جدایه از گروه‌های B2 و D فاقد ژن irp2 بود. کمترین توزیع ژن‌های ویرولانس، در ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های A و B_1 مشاهده گردید.

بحث

نتایج این مطالعه بیانگر شیوع بالای ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت در بین ایزوله‌های اشریشیاکلای مولّد عفونت‌های ادراری می‌باشد. در مطالعه حاضر مشخص شد که 89% از 100 ایزوله اشریشیاکلای، حداقل یکی از انواع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت را دارا بودند. در این مطالعه دریافت شد که شیوع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت: فاکتور نکروزدهنده سیتوتوکسیک (cnf1)، پروتئین ادهسین (*iha*)، پروتئاز غشای خارجی (*OmpT*) و گیرنده سیدروفور (irp2) در ایزوله‌های مورد مطالعه به‌ترتیب: 28%، 29%، 67% و 89% بود که این میزان در مطالعات مختلف متفاوت گزارش شده است. شیوع بالای ژن‌های irp2 (89%) و chuA (77%) نسبت به سایر ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت، نقش مهم آهن برای بقا و بیماری‌زایی باکتری را در محیط ادرار که دارای غلظت آهن پایین است، نشان می‌دهد. کریمیان و همکاران در سال 2012 با مطالعه بر روی سویه‌های UPEC جداشده از بیماران با عفونت ادراری بستری‌شده در اورژانس و

بیمارستان بقیه‌الله تهران، نتایجی مخالف با نتایج مطالعه حاضر را گزارش کردند. آنها فروانی ژن‌های cnf1، ompT، iha و irp2 را به‌ترتیب به میزان: 50/4%، 4/87%، 17/88% و 11/38% گزارش کردند (12) که دلیل این اختلاف ممکن است تفاوت در ناحیه جغرافیایی و یا آب و هوای منطقه باشد. Sannes و همکاران در سال 2004 میلادی، شیوع ژن‌های cnf1، iha و ompT را به‌ترتیب: 23%، 25% و 51% در ایزوله‌های اشریشیاکلای مولّد عفونت‌های ادراری گزارش نمودند که در بعضی موارد، بالاتر از میزان شیوع به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر بوده است (13). ممتاز و همکاران در سال 2013 میلادی در مطالعه‌ای در ایران بر روی 123 ایزوله اشریشیاکلای جداشده از عفونت‌های ادراری، شیوع ژن‌های cnf1 و irp2 را به‌ترتیب: 62 و 14 مورد گزارش کردند (14). نتایج مطالعه حاضر با نتایج دیگر مطالعات بیان‌شده، متفاوت می‌باشد که علت آن را می‌توان تفاوت در تعداد و نوع نمونه‌های بالینی و یا منطقه جغرافیایی در بین مطالعات بیان‌شده ذکر کرد. در مطالعه حاضر، بیشتر ایزوله‌های مورد مطالعه، متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی B_2 (55%) و D (22%) بودند؛ در حالی که در مجموع، 23% از جدایه‌ها متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی A و B_1 بودند که تقریباً نزدیک به نتایج مطالعات انجام‌شده توسط Bashir و همکاران در سال 2012 می‌باشد (15) ولی با نتایج مطالعات علیزاده و همکاران در سال 2013 میلادی (شهرستان بم)(16) و Basu و همکاران در سال 2013 میلادی (17) تفاوت دارد. می‌توان یکی از علل تفاوت نتایج این دو مطالعه با مطالعه اخیر را متفاوت‌بودن منطقه جغرافیایی مورد مطالعه و تفاوت در نوع نمونه‌های بالینی عنوان کرد؛ علاوه بر آن، نتایج مطالعه حاضر با گزارش‌های منتشرشده توسط نویدی‌نیا و همکاران در سال 2013 مطابقت دارد (18).

همچنین مطالعه حاضر نشان داد که ایزوله‌های مولّد عفونت ادراری، حاوی فاکتورهای چندگانه حدّت هستند که با مطالعات انجام‌شده توسط سایر محققین مطابقت دارد (19-21). مطالعه میزان توزیع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت در بین ایزوله‌های متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی نشان داد که بیشترین توزیع ژن‌های مورد مطالعه، در ایزوله‌های متعلّق به گروه B_2 مشاهده شد. در مطالعه‌ای که توسط Bashir و همکاران در منطقه فیصل‌آباد پاکستان در سال 2012 بر روی 59 نمونه UPEC جداشده از بیماران بستری‌نشده انجام شد، مشخص گردید که بیشترین ژن‌های بیماری‌زا در سویه‌های متعلّق به گروه B_2 دیده شده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (15). در مطالعه‌ای که توسط عبدی و همکاران در سال 2014 بر روی *اشریشیاکلاهای* جداشده از عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان در منطقه سیستان انجام شد، بیشترین ژن‌های بیماری‌زا، در ایزوله‌های گروه B_2 مشاهده شدند (19).

در پایان، به نظر می‌رسد که اپیدمیولوژی و میزان فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت سویه‌های مولّد عفونت ادراری، در مناطق مختلف ایران متفاوت می‌باشد. احتمالاً آداب و رسوم هر منطقه، نوع عادت غذایی، سطح عمومی بهداشت مردم و بیمارستان‌های منطقه، میزان جمعیّت و حتی روش نمونه‌گیری، می‌تواند در میزان فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت در ایزوله‌های مولّد عفونت ادراری نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مقاله، میزان فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدّت در ایزوله‌های اشریشیاکلای جداشده از عفونت‌های ادراری بیماران منطقه سیستان بالاست. مطالعه حاضر نشان داد که ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری، منبع بالقوّه انتشار سویه‌های اشریشیاکلای با فاکتورهای حدّت بالا می‌باشد. سویه‌های گروه B_2، نقش مؤثّرتری را در عفونت ادراری ایفا می‌نمایند. این اطلاعات کمک فراوانی به محقّقینی که در زمینه مطالعه اپیدمیولوژی و درمان عفونت‌های ادراری تلاش می‌کنند، خواهد کرد؛

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PCR، روش مناسبی و دقیقی برای تشخیص عوامل حدّت در باکتری‌های مولّد عفونت‌های اداری است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش، بخشی از پایان‌نامه حسینعلی عبدی- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل- می‌باشد. بدین‌وسیله از اساتید و کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را برای انجام این پژوهش فراهم نمودند، سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع:

1- 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.

2- Foxman B. Epidemiology of urinary tractinfections: incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med. 2002; 113Suppl 1A: 5S-13S.

3- Gonz?lez-Ortiz M1, Hern?ndez-Gonz?lez SO, Hern?ndez-Salazar E, Mart?nez-Abundis E. Effect of oral L-carnitine administration on insulin sensitivity and lipidprofile in type 2 diabetes mellitus patients. Ann Nutr Metab. 2008; 52(4): 335-8.

4- Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E. Determination of Escherichia coli O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(2): 129-36.

5- Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, et al. Iha: a novel Escherichia coli O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infect Immun. 2000; 68(3): 1400-7.

6- Kukkonen M, Korhonen TK. The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in Escherichia coli to systemic spread of Yersinia pestis. Int J Med Microbiol. 2004; 294(1): 7-14.

7- Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island. Microbes Infect. 2001; 3(7): 561-9.

8- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology. 2005; 151(Pt 6): 2097-110.

9- Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. Lett Appl Microbiol. 2000; 30(3): 213-6.

10- Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrialadhesin I are not essential for uropathogenic Escherichia coli to adhere to and invade bladder epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002; 33(1): 23-6.

11- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4555-8.

12- Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(39):6811-6.

13- Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. J Infect Dis. 2004; 190(12): 2121-8.

14- 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.

15- Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar MI. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic E. coli from Faisalabad region of Pakistan. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012; 11: 23.

16- Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of Escherichia coli isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran. Comp Clin Path. 2014; 23(5): 1253-7.

17- Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus haemolyticus and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Res Microbiol. 2011; 162(10): 1060-6.

18- Navidinia M, Peerayeh SN, Fallah F, Bakhshi B. Phylogenetic Groups and Pathogenicity Island Markers in Escherichia coli Isolated From Children. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(10): e8362.

19- Rashki A. Cervico-vaginopathogenic Escherichia coli in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Microb Pathog. 2014; 75: 29-34.

20- Adib N, Ghanbarpour R, Solatzadeh H, Alizade H. Antibiotic resistance profile and virulence genes of uropathogenic Escherichia coli isolates in relation to phylogeny. Trop Biomed. 2014; 31(1): 17-25.

21- Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Slim AF, Ben Boubaker IB. Multidrug resistance and high virulence genotype in uropathogenic Escherichia coli due to diffusion of ST131 clonal group producing CTX-M-15: an emerging problem in a Tunisian hospital. Folia Microbiol (Praha). 2014; 59(3): 257-62.

Abstract *Original Article*

The phylogenetic study of Uropathogenic *Escherichia coli* strains in Sistan of Iran

Hossien Ali Abdi[1], Ahmad Rashki[2]

Background and Aim: Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains are a causative agent in most of the urinary tract infections (UTIs), which constitute a multitude of virulence factors. There is little information about phylogenetic group distribution, types, and their virulence factors in Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in different areas of Iran.

In the present study, the phylogenic pattern and prevalence of four known uropathogenic virulent factors were identified by means of multiplex-PCR.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, one hundred E. coli isolates were collected from patients with urinary tract infection in zabol during. January - August 2013- and the isolates were verified using conventional biochemical and morphologic tests. DNA of all isolates was extracted by means of boiling method. The prevalence of virulent genes and phylogenetic groups was determined employing Multiplex-PCR. Finally, the obtained data was analyzed using Fisher's exact test.

Results: Prevalence of *cnf1*, *iha*, *irp2* and *ompT* genes were 28%, 29%, 89%, and 67%, respectively. Furthermore, the distribution of A, B_1, B_2 and D phylogenetic groups were 17%, 6%, 55% and 22%, respectively. Overall, virulent genes were more prevalent (96%, 66%, 61% and 79% respectively) in groups B2 isolates.

Conclusion: It was found that UPEC isolates largely belong to phylogenetic group B_2, which carry the most frequent and number of virulent genes. Therefore, they can play a more effective role in the occurrence of UTI compared to other phylogenetic groups.

Key Words: Uropathogenic *E. coli*; phylogenetic analysis; Virulent factors

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (3): 385-393.

Received: May 1, 2014 ***Accepted: November 14, 2014***

[1] *MSc student zabol university, faculty of bascic science*
[2] *Corresponding Author; assistant professor zabol university, faculty of vet-medicine* *ah_rashki@usal.es*