

مطالعه فیلوژنتیکی سویه‌های یوروپاتوزنیک اشریشیاکلاهی در منطقه سیستان

حسینعلی عبدی¹، احمد راشکی²

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های اشریشیاکلاهی ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری، دارای تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت می‌باشند. اطلاعات کمی در مورد گروه‌های فیلوژنتیکی، نوع و چگونگی عمل فاکتورهای بیماری‌زا در اشریشیاکلاهی مؤلّد عفونت‌های ادراری در مناطق مختلف ایران وجود دارد. در این مطالعه، الگوی فیلوژنتیکی و فراوانی فاکتورهای ویروالانس در سویه‌های اشریشیاکلاهی 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 اشریشیاکلاهی 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*، *ihp2* و *ompT* به ترتیب: 28٪، 29٪، 89٪ و 67٪ تعیین گردید؛ همچنین توزیع گروه‌های فیلوژنی A، B₁، B₂ و D در بین ایزوله‌های جداشده به ترتیب: 17٪، 6٪، 55٪ و 22٪ بود. به طور کلی، فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس به ترتیب به میزان 96٪، 66٪، 61٪ و 79٪ در ایزوله‌های گروه B₂ مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشخص شد که سویه‌های متعلق به گروه B₂، فراوان‌ترین و حامل بیشترین ژن‌های بیماری‌زا می‌باشند؛ بنابراین می‌توانند در عفونت ادراری، نقش مؤثرتری را نسبت به سایر گروه‌های فیلوژنی ایفا نمایند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلاهی یوروپاتوزنیک، آنالیز فیلوژنتیکی، فاکتورهای حدت

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 بلوچستان، ایران؛

² نویسنده مسئول؛ استادیار میکروپزشناسی و ژنتیک مولکولی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران.

آدرس: زابل - دانشگاه زابل - دانشکده دامپزشکی

پست الکترونیکی: ah_rashki@usal.es

تلفن: 00989151970877

مقدمه

عفونت مجاری ادراری شامل عفونت‌های کلیه‌ها و مثانه است که از نظر شیوع، دومین نوع عفونت باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی می‌باشد (1، 2). باکتری/اشریشیاکلاهی، شایع‌ترین عامل عفونت مجاری ادراری شناخته شده است. این ارگانیسم همچنین عامل 90% تمامی عفونت‌های ادراری شناخته شده در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی است. شدت عفونت، بستگی به هر دو عامل حساسیت میزبان و وجود فاکتورهای حدت در باکتری‌های مولد عفونت دارد. سویه‌های اشریشیاکلاهی مولد عفونت ادراری، بر خلاف واریوتایپ‌های مولد عفونت‌های گوارشی، به نام سویه‌های اشریشیاکلاهی یوروپاتوژنیک (Uropathogenic (UPEC) *E. coli*) خوانده می‌شوند (3). امروزه مطالعات نشان می‌دهند که سویه‌های UPEC، دارای فاکتورهای حدت ویژه‌ای هستند که در تجمع 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 حدت دو عملکردی است که هم به عنوان گیرنده سیدروفور و هم در پروتئین‌های غشای خارجی به عنوان ادهسین، ایفای نقش می‌کند (5). پروتئین دیگری که به عنوان فاکتور حدت در اشریشیاکلاهی ایفای نقش می‌کند، پروتئاز غشای خارجی (*OmpT*) است. این پروتئین، یکی از پروتئین‌های موجود در غشای خارجی اشریشیاکلاهی است که می‌تواند پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی سلول‌های پوششی و ماکروفاژها را تجزیه نماید (6). عامل حدت دیگر، یرسینیا باکترین (*irp2*) است که به عنوان یک گیرنده سیدروفور در غشای اشریشیاکلاهی، 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 مولد مننژیت نوزادان بیان می‌شود (9). ابتلای مکرر به عفونت و مقاومت جدّی باکتری در آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه عوامل حدت سویه‌های اشریشیاکلاهی جدا شده از عفونت مجاری ادراری را ارزشمند می‌سازد. گروهی از محققین تأکید کرده‌اند که نوع گروه فیلوژنتیکی اشریشیاکلاهی، نقش مهمی در بیماری‌زایی آنها دارد. سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای، اساساً در گروه B₂ و به مقدار کمتر در گروه D قرار دارند؛ در حالی که سویه‌های کومنسال، متعلق به گروه A و B₁ می‌باشند (8، 9).

نتایج حاصل از مطالعات مولکولی روی فاکتورهای بیماری‌زای اشریشیاکلاهی خارج روده‌ای نشان داده است که بیشتر فاکتورهای بیماری‌زا، در سویه‌های متعلق به گروه B₂ دیده شده است؛ در حالی که سویه‌های متعلق به گروه A و B₁، اغلب فاکتورهای بیماری‌زای کمتری دارند (4). بیماری‌زایی هر یک از این گروه‌های فیلوژنی A، B₁، B₂ و D، با فعالیت فاکتورهای بیماری‌زای متفاوتی همراه است (10)؛ بنابراین با توجه به افزایش روزافزون عفونت‌های اشریشیاکلاهی و متفاوت بودن فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی در مناطق مختلف دنیا، مطالعه عوامل مرتبط با بیماری‌زایی در باکتری‌های جدا شده ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی شناسایی عوامل حدت 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 حدت شامل: *cnf1*، *irp2*، *aha* و *ompT* و میزان توزیع آنها در چهار گروه مختلف فیلوژنتیکی اشریشیاکلاهی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، در منطقه سیستان انجام شده است.

روش تحقیق

Multiplex-PCR در دمای 20°C - ذخیره گردید.

تهیه نمونه

آزمون Multiplex-PCR

برای شناسایی وجود ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس (irp2، iha، cnf1، ompT) در ایزوله‌های اشریشیاکالای جدا شده، 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 $2\times$ از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش، 2 میکرولیتر از DNA الگو، 12/5 میکرولیتر از Master Mix RED $2\times$ 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، طولیل‌شدن رشته الگو (extension) در 72°C به مدت 70 ثانیه و طولیل‌شدن نهایی (final extension) به مدت 7 دقیقه در دمای 72°C .

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 نیتрат، MR-VP متیل‌رد- و وژپروسکوئر و تولید H_2S ، تعداد 100 ایزوله اشریشیاکالای جمع‌آوری شد.

استخراج DNA ژنومی

ایزوله‌های اشریشیاکالای 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 1PBS% 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

جدول 1- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

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

یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن‌های فوق به صورت: گروه $(chuA^+, yjaA^+, TspE4.C2^\pm)$ B₂، گروه $(chuA^+, yjaA^+, TspE4.C2^\pm)$ B₁، گروه $(chuA^-, yjaA^\pm)$ A و گروه $(chuA^-, yjaA^\pm, TspE4.C2^+)$ ECOR62 (11). سویه $(chuA^+, yjaA^+, TspE4.C2^+)$ به عنوان کنترل مثبت و سویه MG1655 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

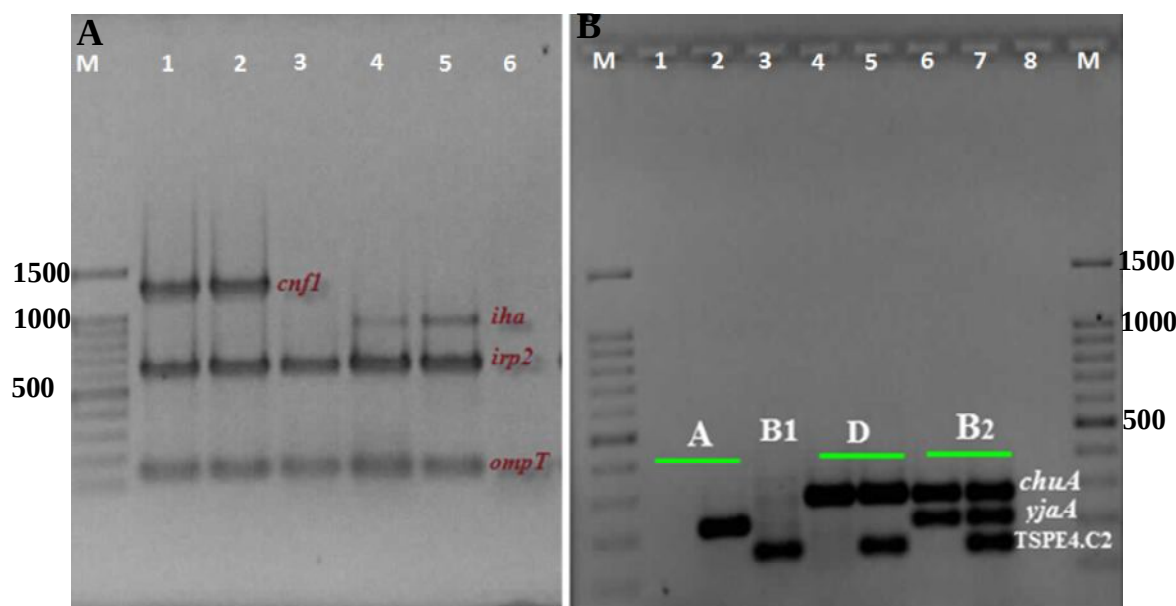
تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تجزیه و تحلیل آماری، از نرم افزار 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 $\alpha=0/05$ در نظر گرفته شد.

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 Ladder 100 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



شکل 1- نمونه محصولات PCR ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت (A) و ردیف‌های 1 و 2 گروه فیلوژنتیکی $(-chuA, \pm yjaA)$ (A) ردیف 3 گروه فیلوژنتیکی $(-chuA, \pm yjaA)$ و B₁ $(TspE4.C2^+)$ ، ردیف‌های 4 و 5 گروه فیلوژنتیکی $(+chuA, -yjaA)$ و D $(TspE4.C2^\pm)$ و ردیف‌های 6 و 7 گروه فیلوژنتیکی $(+chuA, +yjaA)$ و B₂ $(TspE4.C2^\pm)$ را نشان می‌دهد (B)

یافته‌ها

جدول 2- شیوع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت در در بین ایزوله‌های اشریشیاکلاهی متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی

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

و B₁، فاقد حضور ژن *cnf1* بودند. این ژن در یک ایزوله از گروه D و 27 ایزوله از گروه B₂ 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 ویروالانس، در ایزوله‌های متعلق به گروه‌های A و B₁ مشاهده گردید.

بحث

نتایج این مطالعه بیانگر شیوع بالای ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت در بین ایزوله‌های اشریشیاکلاهی مولد عفونت‌های ادراری می‌باشد. در مطالعه حاضر مشخص شد که 89% از 100 ایزوله اشریشیاکلاهی، حداقل یکی از انواع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت را دارا بودند. در این مطالعه دریافت شد که شیوع ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت: فاکتور نکرودهنده سیتوتوکسیک (*cnf1*)، پروتئین ادهسین (*iha*)، پروتئاز غشای خارجی (*OmpT*) و گیرنده سیدروفور (*irp2*) در ایزوله‌های مورد مطالعه به ترتیب: 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 حدت، 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

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

فراوانی ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* در میان 100 ایزوله اشریشیاکلاهی به ترتیب: 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* به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشت. بر اساس نتایج آورده‌شده در جدول 2، از 100 ایزوله اشریشیاکلاهی جمع‌آوری‌شده، تعداد 55 ایزوله (55%) در گروه B₂، 22 ایزوله (22%) در گروه D، 17 ایزوله (17%) در گروه A و 6 ایزوله (6%) در گروه B₁ قرار گرفتند (جدول 2). بررسی میزان توزیع ژن‌های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* در ایزوله‌های متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی نشان داد که به ترتیب: 96%، 66%، 61% و 79% در ایزوله‌های متعلق به گروه فیلوژنتیکی، B₂ مشاهده شد؛ همچنین بررسی آماری نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که توزیع ژن *cnf1* در ایزوله‌های متعلق به گروه‌های A، B₂ و D و حضور ژن *ompT* و *irp2* در ایزوله‌های متعلق به گروه‌های A و B₂، رابطه معنی‌داری داشت (جدول 2). توزیع ژن‌های *iha* در هیچ‌یک از ایزوله‌های متعلق به گروه‌های فیلوژنتیکی، رابطه معنی‌داری را نشان نداد. نتایج آورده‌شده در جدول 2 نشان می‌دهد که ایزوله‌های متعلق به گروه‌های A

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 B₂ 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 B₂ 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 B₂ 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 جمعیت 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 اش‌ریشیاکلاهی جداشده از عفونت‌های ادراری بیماران منطقه سیستان بالاست. مطالعه حاضر نشان داد که ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری، منبع بالقوه انتشار سویه‌های اش‌ریشیاکلاهی با فاکتورهای حدّت بالا می‌باشد. سویه‌های گروه B₂ نقش مؤثرتری را در عفونت ادراری ایفا می‌نمایند. این اطلاعات کمک فراوانی به محققینی که در زمینه مطالعه اپیدمیولوژی و درمان عفونت‌های ادراری تلاش می‌کنند، خواهد کرد؛

بیمارستان بقیه‌الله تهران، نتایجی مخالف با نتایج مطالعه حاضر را گزارش کردند. آنها فراوانی ژن‌های ompT، cnf1، 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 اش‌ریشیاکلاهی 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 اش‌ریشیاکلاهی 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 B₂ (55٪) و D (22٪) بودند؛ در حالی که در مجموع، 23٪ از جدایه‌ها متعلّق به گروه‌های فیلوژنتیکی A و B₁ 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 متفاوت بودن 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)-

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

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.

تقدیر و تشکر

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, Safarpour 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.

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

Hossien Ali Abdi¹, Ahmad Rashki²

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, B₁, B₂ 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 B₂, 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 basic science

² Corresponding Author; assistant professor zabol university, faculty of vet-medicine ah_rashki@usal.es