

پلاسمید رپلیکون تایپینگ جدایه های اشریشیا کلی چسبنده ی روده ای جدا شده از کودکان اسهالی با استفاده از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

خلاصه

مقدمه: پلاسمیدها در انتقال افقی ژن ها به ویژه مقاومت آنتی بیوتیکی و عوامل بیماری زا نقش حیاتی دارند و مطالعات چندانی روی نوع پلاسمیدهای حمل شده توسط پاتوتیپ های اشریشیا کلی چسبنده ی روده ای انجام نگرفته است. هدف اصلی این مطالعه دسته بندی پلاسمید های جدایه های اشریشیا کلی چسبنده ی روده ای جدا شده از کودکان اسهالی بر اساس گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی به روش Johnson و همکاران (۲۰۰۷) می باشد.

روش کار: این مطالعه توصیفی بر روی ۴۴ جدایه اشریشیا کلی چسبنده ی روده ای جدا شده از نمونه مدفوع کودکان اسهالی به منظور شناسایی ۱۸ رپلیکون پلاسمیدی به روش Johnson و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که رپلیکون پلاسمید FreP با ۳۵٪ (۷۹/۵۴) بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید Inc HI2, Inc HI1, Inc X, Inc با ۱٪ (۲/۲۷) کمترین فراوانی را داشت. رپلیکون های W, Inc N, Inc FIC, Inc FIIA در هیچکدام از جدایه ها یافت نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه بیانگر تنوع بالای پروفایل گروه های ناسازگار پلاسمیدی در بین جدایه های مورد مطالعه بود.

کلمات کلیدی: پلاسمید، رپلیکون تایپینگ، اشریشیا کلی چسبنده ی روده ای، "اسهال کودکان، مولتی پلکس پی سی آر
پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

زکیه ایمان پناه^{۱*}

غلامرضا هاشمی تبار^۱

مهدی عسکری بدوئی^۱

^۱گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

نویسنده مسئول: دکتر زکیه ایمان پناه، دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: golkar34@gmail.com

مقدمه

به طور طبیعی پلاسمیدهای باکتریایی، عناصر خود تکثیرشونده و متنوعی هستند که صفاتی چون مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین، ماندگاری و سازگاری در محیط و حدت را برای باکتری ها کدگذاری می کنند (۱-۲). همچنین پلاسمیدها عامل اصلی انتقال افقی ژن ها (HGT)^۱ هستند که نقش مهمی در سازگاری باکتری نسبت به تغییرات محیطی دارند (۳). علاوه بر این، پلاسمیدها می توانند به پویایی ژنوم باکتری از طریق حمل عناصر قابل انتقال و ترانسپوزون ها و الحاق آنها در کروموزوم باکتری (نوترکیبی همسان و یا غیرهمسان) کمک کنند (۱). به دلیل نقش آنها در HGT به ویژه در رابطه با ظهور و انتشار مقاومت های ضد میکروبی (۴-۵) توجه زیادی به شناسایی و طبقه بندی پلاسمید های باکتریایی شده است. به طور معمول پلاسمیدها را بر اساس ناسازگاری آنها با یکدیگر (صفتی در ارتباط با تکثیر و یا همانند سازی پلاسمیدها) طبقه بندی می کنند (۶). تایپینگ پلاسمیدها بر اساس ناسازگاری (Inc)^۲ بر این واقعیت استوار است، که دو پلاسمیدی که توالی دخیل در همانند سازی و جدا سازی DNA مشابه ای دارند قادر به تکثیر در یک میزبان نیستند (۶). از آنجایی که تایپینگ ناسازگاری بر اساس فاکتورهای همانند سازی آنها است، بنابراین از اصطلاحات Inc, Rep برای توصیف انواع پلاسمیدها در یک میزبان استفاده می شود (۷-۱۰). در حال حاضر ۲۷ گروه ناسازگار (Inc) در میان خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده است. طبقه بندی پلاسمیدها بر اساس گروه های ناسازگار به دلیل نقش آنها در مقاومت های آنتی بیوتیکی و انتقال فاکتورهای بیماریزا بسیار مطلوب و کاربردی است (۸-۹). متأسفانه، مطالعه بر اساس ناسازگاری فیزیکی به ویژه هنگامی که به جمعیت باکتری های بزرگ اعمال می شود، خسته کننده و زمان بر است. در سال ۱۹۸۸ در مطالعه ی Couturier و همکاران از روش هیبریداسیون برای تایپینگ مقایسه ای پلاسمیدهای باکتریایی

بر اساس نوع همانند سازی آنها ۱۹ پروب مرتبط با ۱۹ گروه ناسازگار مختلف استفاده کردند. اگر چه این روش نشان دهنده پیشرفت قابل توجهی در تایپینگ پلاسمیدها بود، اما روش زمان گیر و خسته کننده و ناسازگار با رویکردهای فعلی از روش مطلوب بود (۶). در تحقیقی که توسط Carattoli و همکاران انجام شد، از یک روش ساده و کاربردی تایپینگ رپلیکون مبتنی بر PCR^۳ برای طبقه بندی ۱۸ گروه ناسازگاری پلاسمید در خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد (۱۰). اگر چه این روش تا حد زیادی نسبت به روش های قبلی ساده تر بود، اما با داشتن ۵ مرحله Multiplex PCR همچنان زمانبر بود. در نهایت روش ابداع شده توسط Johnson و همکاران بر مبنای سه مرحله Multiplex PCR می تواند برای مطالعه پلاسمیدهای جمعیت های بزرگ باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد (۷). *اشریشیا کولی*^۴ یکی از اعضای خانواده ی انتروباکتریاسه^۵ می باشد. این باکتری یک باسیل گرم منفی کوتاه و بدون اسپور و بی هوازی اختیاری است، در محیط کشت ساده یا سنتتیک دارای مقدار کمی گلیسرول یا گلوکز به عنوان تنها منبع غذایی باکتری، به آسانی رشد می کند. بعضی گونه ها دارای تاژک پری تریش^۶ و متحرک می باشند، *اشریشیا کولی* یک میکروارگانیزم روده ای شایع در انسان است، این باکتری گرم منفی توانایی ایجاد بیماری های داخل روده ای IPEC^۷ و خارج روده ای ExPEC^۸ را دارد (۱۱). *اشریشیا کولی* بیماریزا می تواند، یکی از عوامل اصلی اسهال در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه باشد (۱۲)، اسهال یکی از عوامل مرگ و میر نوزادان و کودکان در کشورهای در حال توسعه می باشد، به طوری که سالانه حدود دو میلیون مورد مرگ کودکان در این مناطق گزارش می گردد (۱۳-۱۴). سازمان بهداشت جهانی WHO^۹ اسهال را به صورت دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل سه مرتبه در یک دوره ۲۴ ساعته تعریف کرده است. اسهال حاد شدیدترین نوع اسهال بوده و توسط بسیاری از عوامل ویروسی، باکتریایی و انگلی ایجاد می شود (۱۵). یکی از عوامل ایجاد کننده

^۶peritrichous flagella^۷Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*^۸Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*^۹World Health Organization^۱Horizontal gene transfer^۲Incompatible plasmids^۳PCR-based replicon typing^۴*Escherichia coli*^۵Enterobacteriaceae

روش کار

جمع آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی ۴۵۰ نمونه اسهال کودکان از بیمارستان های تخصصی کودکان در شهر مشهد جمع آوری گردید. پس از جداسازی و شناسایی ۴۲۲ جدایه ی *اشریشیاکلی*، با استفاده از PCR، و پرایمرهای *CVD432*، *aggR*، جدایه ی EAEC شناسایی شد. تمام جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای و در میکروتیوب های ۲ میلی لیتری حاوی محیط BHI^۹ برات استریل حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مراحل بعدی ذخیره گردید. آزمایش های تشخیصی در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شدند.

استخراج DNA:

DNA جدایه ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. با استفاده از لوب استریل از سطح محیط کشت تازه LB agar^{۱۰} (۲۴ ساعته) چند پرگنه برداشته شد و به میکروتیوب ۱/۵ دارای ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و حل گردید و به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و بعد از آن ۵ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد سرد گردید، میکروتیوب ها با ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه و یا ۸۰۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و به میزان ۳۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر از سطح رویی مایع برداشته شد و به عنوان DNA در میکروتیوب های ۰/۵ ذخیره سازی شد و در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد جهت استفاده (های) بعدی قرار داده شد.

شناسایی وجود رپلیکون پلاسمیدها:

برای شناسایی وجود رپلیکون پلاسمیدها در جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای از پرایمرهای (جدول ۱) و روش Multiplex-PCR در سه پانل: پانل ۱ (FIC, B/O, A/C, P, T)، پانل ۲: (FIIA, FIA, FIB, K/B, W, Y) و پانل ۳ (N, II, FreP)

اسهال، گروه *اشریشیاکلی* اسهال زا DEC^۱ نامیده می شود (۱۱ و ۱۶)، زیرگروه های DEC عبارتند از: *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک (توکسین زای روده ای) ETEC^۲، *اشریشیاکلی* انترواینوسیو (مهاجم روده ای) EIEC^۳، *اشریشیاکلی* مولد شیکاتوکسین STEC^۴؛ *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (خونریزی دهنده روده ای) EHEC^۵، *اشریشیاکلی* انترواگریگیتو (چسبنده ی روده ای) EAEC^۶، *اشریشیاکلی* انتروپاتوژنیک (بیماریزای روده ای) EPEC^۷ (۱۷-۱۸)، *اشریشیاکلی* چسبنده روده ای اولین بار در سال ۱۹۸۷ (۱۹) از یک کودک مبتلا به اسهال حاد در لیمبا، پایتخت پرو جداسازی شد، از آن زمان در ارتباط با اسهال حاد و مداوم در کودکان (۲۰) و در افراد دارای نقص ایمنی اکتسابی (۲۱)، و همچنین به عنوان عامل اسهال مسافرتی در افرادی که به کشورهای صنعتی و یا کمتر توسعه یافته سفر می کردند، شناخته شد. پاتوتیپ EAEC باعث به وجود آمدن اسهال مزمن در کودکان و بزرگسالان می شود، که می تواند از یک اسهال آبکی تا اسهال شدید با دفع خون و موکوس متغیر باشد. در ایالات متحده EAEC از ETEC، به عنوان شایع ترین پاتوژن باکتریایی عامل اسهال، پیشی گرفته است (۲۲-۲۳). در مکزیک EAEC در مواد غذایی مانند دسر و سالسا^۸ یافت شده است (۲۴-۲۵). ضرورت انجام غربالگری و شناسایی و طبقه بندی پلاسمیدها جهت بررسی اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب بیماری اسهال ناشی از جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای به خصوص در کودکان و افراد دارای نقص ایمنی اکتسابی حائز اهمیت می باشد هدف از این مطالعه دسته بندی پلاسمید های جدایه های *اشریشیاکلی* چسبنده ی روده ای جدا شده از کودکان اسهالی بر اساس گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی به روش Multiplex-PCR می باشد.

⁶ Enteroaggregative *E. coli*

⁷ Enteropathogenic *E. coli*

⁸ Salsa

⁹ Brain Heart Infusion

¹⁰ Luria Broth

¹ Diarrheagenic *Escherichia coli*

² Enterotoxigenic *E. coli*

³ Enteroinvasive *E. coli*

⁴ Shiga toxin-producing *E. coli*

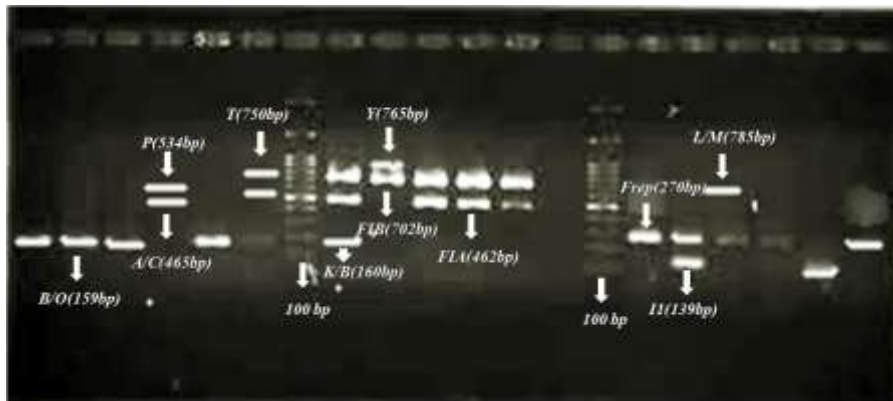
⁵ Enterohemorrhagic *E. coli*

۴۴ جدایه مورد مطالعه، در پانل ۱ رپلیکون پلاسمید B/O با (۶۴/۶۳/۲۸) بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید T با (۵۴/۴/۲) کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های FIC در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون های پلاسمیدهای P, A/C در ۴۴ جدایه به ترتیب (۸۲/۶/۳) و (۶۴/۱۳/۶) بود و در پانل ۲ رپلیکون پلاسمید FIB با (۳۶/۶۱/۲۷) بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید K/B با (۵۴/۴/۲) کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های W, FIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمیدهای Y, FIA به ترتیب (۹۱/۱۵/۷) و (۶۴/۱۳/۶) بود و در پانل ۳ رپلیکون پلاسمید FreP با (۵۴/۷۹/۳۵) بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید L/M با (۲۷/۲/۱) کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های X, HI1, HI2 در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمید II (۵۰/۲۲) مشاهده گردید (نمودار ۱). در پانل ۱ در ۸ الگوی رپلیکون پلاسمیدی (جدول ۲) و در پانل ۲، ۷ الگوی رپلیکون پلاسمیدی (جدول ۳) و در پانل ۳، ۵ الگوی رپلیکون پلاسمیدی (جدول ۴) و در مجموع ۲۲ الگوی رپلیکون پلاسمیدی (جدول ۵) شناسایی گردید. در (شکل ۱-تصویری از ژل الکتروفورز ژن های رپلیکون پلاسمید نشان داده شده است.

(X, L/M, HI1, HI2) استفاده شد (۷). PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. حجم واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر بود و غلظت و حجم اجزای آن شامل ۱ میکرومولار پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA، ۱۰ میکرولیتر Master mix PCR2X(Hot-start) (سیناکلون ایران) و آب مقطر تا حجم واکنش بود. برنامه ی دمایی سیکل PCR عبارت بود از: واسرشت اولیه^۱ ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل دمایی شامل واسرشت^۲ ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال^۳ ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش^۴ ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، پس از اتمام سیکل ها گسترش نهایی^۵ ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه به عنوان مرحله ی گسترش نهایی در نظر گرفته شد. آشکار سازی محصول PCR با الکتروفورز صورت گرفت. ۱۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با گرین و یوور (ساخت ایران) انجام شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از مارکر Ladder ۱۰۰ ارزیابی گردید (شکل ۱).

نتایج

تعداد ۴۴ جدایه اشریشیاکلی چسبنده ی روده ای جهت دسته بندی براساس رپلیکون پلاسمیدشان مورد ارزیابی قرار گرفتند. از



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز: چاهک ۱ تا ۶ مربوط به رپلیکون پلاسمید B/O با ۱۵۹ جفت باز و A/C با ۴۶۵ جفت باز و T با ۷۵۰ جفت باز و P با ۵۳۴ جفت باز. چاهک ۷ تا ۱۲ مربوط به رپلیکون پلاسمید FIA و FI با ۴۶۲ و ۷۰۲ جفت باز و Y با ۷۶۵ جفت باز و K/B با ۱۶۰ جفت باز. چاهک ۱۳ تا ۱۸ مربوط به رپلیکون پلاسمید II، FreP، L/M با ۱۳۹، ۲۷۰ و ۷۸۵ جفت باز می باشد.

⁴Extension

⁵Final extension

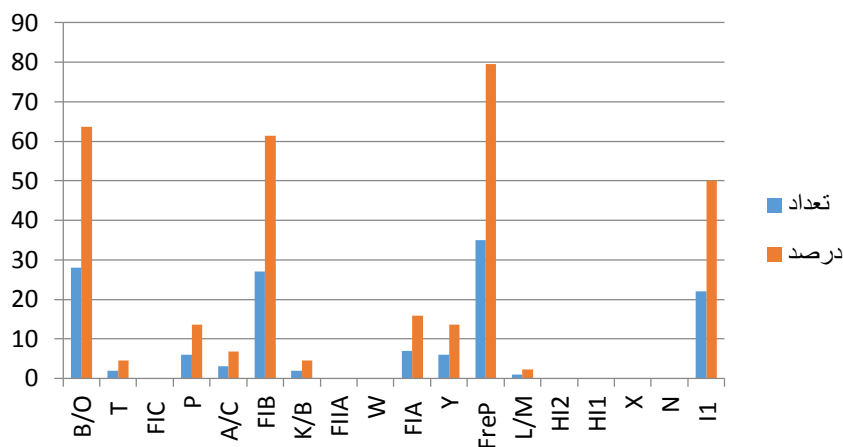
¹Initial denaturation

²Denaturation

³Annealing

جدول ۱- توالی پرایمرهای رپلیکون تایپینگ پلاسمیدهای باکتری اشریشیا کلی (۷)

نام	توالی (۵' به ۳')	هدف	اندازه ی محصول (b p)	دمای آنالینگ	
Panel 1					
B/O-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	B/O	۱۵۹	۶۰ درجه سانتی گراد	
B/O-R	TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA				
FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	FIC	۲۶۲		
FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	A/C	۴۶۵		
A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA				
A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	P	۵۳۴		
P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA				
P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	T	۷۵۰		
T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT				
T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC				
Panel 2					
K/B-F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	K/B	۱۶۰		
K/B-R	AACTCCTGATACAGGTGGC				
W-F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	W	۲۴۲		
W-R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT				
FIIA-F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	FIIA	۲۷۰		
FIIA-R	CTCTGCCACAACTTCAGC				
FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	FIA	۴۶۲		
FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG				
FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	FIB	۷۰۲		
FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT				
Y-F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	Y	۷۶۵		
Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT				
Panel 3					
Frep-F	TGATCGTTTTAAGGAATTTTG	Frep	۲۷۰		
Frep-R	GAAGATCAGTCACACCATCC				
II-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	II	۱۳۹		
II-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT				
X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	X	۳۷۶		
X-R	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC				
HII-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	HII	۴۷۱		
HII-R	TGCCGTTTACCTCGTGAGTA				
N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	N	۵۵۹		
N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC				
HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	HI2	۶۴۴		
HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT				
LM-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	LM	۷۸۵		
LM-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG				



نمودار ۱- درصد رپليکون پلاسميد در بين ۴۴ جدايه اشريشياکلي چسبنده ي روده اي

جدول ۲- پروفایل رپليکون پلاسميد پانل ۱ در جدايه هاي EAEC

شماره	پروفایل رپليکون پلاسميد	جدايه هاي EAEC
۱	بدون ژن	۱۲
۲	B/O	۲۴
۳	P	۳
۴	A/C, P	۱
۵	P, T	۱
۶	B/O, T	۱
۷	B/O, A/C	۱
۸	B/O, P	۱

جدول ۳- پروفایل رپليکون پلاسميد پانل ۲ در جدايه هاي EAEC

شماره	پروفایل رپليکون تايپينگ پلاسميد	جدايه هاي EAEC
۱	بدون ژن	۱۳
۲	FIB	۱۸
۳	Y	۴
۴	FIB, Y	۱
۵	FIB, FIA	۶
۶	K/B, Y	۱
۷	K/B, FIB, FIA	۱

جدول ۴- پروفایل رپلیکون پلاسمید پانل ۳ در جدایه های EAEC

شماره	پروفایل رپلیکون تایپینگ پلاسمید	جدایه های EAEC
۱	بدون ژن	۷
۲	II	۲
۳	FreP	۱۵
۴	L/M	۱
۵	FreP, II	۱۹

جدول ۵- پروفایل رپلیکون پلاسمید در جدایه های EAEC

شماره	پروفایل رپلیکون تایپینگ پلاسمید
۱	<i>Frep</i>
۲	<i>B/O, Frep</i>
۳	<i>P, FIB</i>
۴	<i>B/O, FIB</i>
۵	<i>B/O, FIB, Frep</i>
۶	<i>FIB, II, Frep</i>
۷	<i>FIB, II, FIA</i>
۸	<i>B/O, Frep, Y</i>
۹	<i>FIB, Frep, FIA</i>
۱۰	<i>P, FIB, II</i>
۱۱	<i>B/O, T, FIB, L/M</i>
۱۲	<i>B/O, FIB, II, Frep</i>
۱۳	<i>B/O, A/C, Frep, II</i>
۱۴	<i>A/C, P, Y, Frep</i>
۱۵	<i>B/O, FIB, II, Frep, Y</i>
۱۶	<i>B/O, FIB, Frep, K/B, FIA</i>
۱۷	<i>FIB, II, Frep, P, T</i>
۱۸	<i>B/O, FIB, Frep, II, FIA</i>
۱۹	<i>B/O, K/B, Y, Frep, II</i>
۲۰	<i>P, FIB, Frep, II, FIA</i>
۲۱	<i>B/O, P, FIB, Frep, II, FIA</i>
۲۲	<i>B/O, A/C, FIB, Frep, II, FIA</i>

بحث

مطالعه حاضر که رپلیکون پلاسمید FreP با ۸۹/۷۴٪ بیشترین فراوانی را دارد و رپلیکون های FIC, FIIA در هیچکدام از جدایه ها یافت نشد مطابقت دارد. در مطالعه ای که توسط Johnson و همکاران بر روی جدایه های جداسازی شده از نمونه های ادراری و مدفوعی انجام دادند آملپیکون FreP بیشترین فراوانی را داشت و رپلیکون های FIC, FIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد که با مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد (۷). Abraham و همکاران طی بررسی که بر روی ۴۴ جدایه /شیرشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از افرادی که دارای التهاب مثانه و پیلونفریت بودند، انجام دادند مانند مطالعه حاضر رپلیکون های FIC, FIIA در هیچکدام از نمونه ها یافت نشد (۲۷). در مطالعه Xia و همکاران نشان دادند که پلاسمید IncII حامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی هستند و می توانند به مدت طولانی در فلور روده انسان و حیوان باقی بمانند. و تبدیل به یک مخزن برای انتقال مداوم این ژن ها در بین گونه های باکتریایی شوند (۲۸). در مطالعه حاضر IncII در ۵۶/۴۱٪ شناسایی شد که وقوع بالایی پلاسمید IncII در میان جدایه های بالینی اهمیت آن را در انتقال افقی و گسترده ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری /شیرشیاکلی را نشان می دهد. تحقیقات نشان می دهد پلاسمیدهای IncII موجود در باکتری های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، عامل حمل و انتشار ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف در حیوانات و انسان ها هستند (۳۱-۲۹).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر تنوع بالای گروه های ناسازگار پلاسمیدی در بین ایزوله های مورد مطالعه بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از عزیزانی که در انجام آزمایشات همکاری کردند، کمال تشکر را دارم.

این مطالعه نشان داد از ۴۴ جدایه مورد مطالعه، در پانل ۱ رپلیکون پلاسمید B/O با (۶۳/۶۴٪) ۲۸ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید T با (۴/۵۴٪) ۲ کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های FIC در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمیدهای P, A/C در ۴۴ جدایه به ترتیب (۶/۸۲٪) ۳ و (۱۳/۶۴٪) ۶ بود و در پانل ۲ رپلیکون پلاسمید FIB با (۶۱/۳۶٪) ۲۷ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید K/B با (۴/۵۴٪) ۲ کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های W, FIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمیدهای Y, FIA به ترتیب (۱۵/۹۱٪) ۷ و (۱۳/۶۴٪) ۶ بود و در پانل ۳ رپلیکون پلاسمید FreP با (۷۹/۵۴٪) ۳۵ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید L/M با (۲/۲۷٪) ۱ کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های N, X, HI1, HI2 در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمید II (۵۰٪) ۲۲ مشاهده گردید. در مجموع سه پانل رپلیکون پلاسمید FreP با (۷۹/۵۴٪) ۳۵ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید L/M با (۲/۲۷٪) ۱ کمترین فراوانی را داشت. رپلیکون IncFIC, IncN, IncFIIA, IncW, Inc X, Inc HI1, Inc HI2 در هیچکدام از جدایه ها یافت نشد. در پانل ۱ در ۸ الگوی رپلیکون پلاسمیدی و در پانل ۲، ۷ الگوی رپلیکون پلاسمیدی و در پانل ۳، ۵ الگوی رپلیکون پلاسمیدی و در مجموع ۲۲ الگوی رپلیکون پلاسمیدی شناسایی گردید. در مطالعه ای که راشکی و همکاران جهت بررسی پلاسمید رپلیکون تایپینگ سروتیب های O6, O2 و O157 باکتری /شیرشیاکلی با استفاده از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار (PBRT) انجام دادند. نتایج نشان داد که امپلیکون Fre با ۸۸٪ و رپلیکون های (78%) IncFIB, (60%) IncFIA, (53%) IncB/O, (50%) IncI1, (25%) IncN در بین ۴۰ ایزوله مورد مطالعه مشاهده شد. رپلیکون IncFIC و IncFIIA در هیچکدام از ایزوله ها مشاهده نشد (۲۶). که با نتایج

References

1. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(9):722-32.
2. Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Diseases*. 2002;46(2):342-52.
3. Smets BF, Barkay T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(9):675-8.
4. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(10):4168-77.
5. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX- M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3203
6. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*. 1988;52(3):375-95.
7. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(6):1976-83.
8. Boyd D, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1714-22.
9. Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M, Parkhill J, Taylor DE. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*. 2004;52(3):182-202.
10. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;63(3):219-28.
11. Pierad D, De Greve H, Haesbrouk F, Mainil J. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks respective role of cattle and humans. *Veterinary Research*. 2012;43:13.
12. Estrada T, Navarro F. Enterococcal *Escherichia coli* pathotype a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Medical Microbiology and Immunology*. 2012;66:1-18.
13. Mary A, Chikwelu L, Sandeep D, Kamaldeen AB. Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathogens*. 2011;3:3-9.
14. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:630-637.
15. Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2008;86:710-7.
16. Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, Vaneijk A, et al. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(14):232-245.
17. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11:142-201.
18. Arenas MM, Martínez Y, Torres AG. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Current Gastroenterology Reports*. 2012;14:386-394.
19. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1987;6: 829-831.

20. Wanke CA, Schorling JB, Barrett LJ, Desouza MA, Guerrant RL. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1991;10:746-751.
21. Mathewson JJ, Jiang ZD, Zumla A. HEp2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. *Journal Infect Diseases*. 1995;171: 1636-39.
22. Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis a prospective controlled study. *Journal Pediatr*. 2005;146:54-61.
23. Nataro JP, Mai V, Johnson J. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;43: 402-407.
24. Koo HL, Jiang ZD, Brown E, Garcia C, Qi H, Dupont HL. Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47:218-221.
25. Vigil KJ, Jiang ZD, Chen JJ. Coliform and *Escherichia coli* contamination of desserts served in public restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;80: 606-608.
26. Rashki A, Keshtgar A, Hadadi F. Replicon Typing of O2, O6, and O157 Serotypes of *Escherichia Coli* Using PCR Method Based on Plasmid Incompatibility Groups. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2018; 20(7): 40-6.
27. Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *Journal Clinical Microbiology*. 2012;50(3):1027-30.
28. Xia L, Liu Y, Xia S, Kudinha T, Xiao SN, Zhong NS, et al. Prevalence of ST1193 clone and IncII/ST16 plasmid in *E. coli* isolates carrying blaCTX-M-55 gene from urinary tract infections patients in China. *Scientific Reports*. 2017;7:44866.
29. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncII plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(5): 1872-5.
30. Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, et al. IncII plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene blaCTX-M-1 in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(10):4484-6.
31. Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal Antimicrob Chemother*. 2008;61(6):1229-33.

Original Article

Plasmid Replicon Typing of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates Isolated from Diarrheal Children Using PCR Method Based on Plasmid Incompatibility Groups

Received: 22/07/2023 - Accepted: 22/01/2024

Zakiyeh Imanpanah^{1*}

Gholamreza Hashemitabar¹

Mahdi Askari Badouei¹

¹ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Email: golkar34@gmail.com

Abstract

Introduction

Plasmids play a the crucial role in the horizontal transfer of genes, especially antibiotic resistance and pathogenic agents, and epidemiological studies have not been conducted on the type of plasmids transmitted by Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotypes. The main purpose of this study is to classify the plasmids of Enteroaggregative *Escherichia coli* isolates that isolated from children with diarrhea based on the major incompatible plasmid groups according to method of Johnson et al(2007).

Material and Method

This descriptive study was performed on 44 isolates of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates Isolated from diarrheal to identify 18 plasmid replicons by the method of Johnson et al(2007).

Results

The results showed the FreP 35(79.54%) plasmid replicon frequent and L/M plasmid replicon frequent with 1(2.27%) were the most and the least, respectively. IncFIC, IncN, IncW, Inc X, Inc HI1, Inc HI2 and IncFIIA replicons were not observed in any of the isolates.

Conclusion

The results of this study indicated a high diversity of profile plasmid incompatibility groups among the studied isolates.

Key words

Plasmid, Replicon Typing, EAEC, Children's diarrhea, Multiplex-PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest