

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۱

خلاصه

مقدمه

اشریشیاکلی‌های یوروباتوژنیک (UPEC) یکی از شایع‌ترین عوامل میکروبی ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشند که سروتیپ‌های مختلفی از این گروه سرمی که دارای تنوع ژنتیکی هستند در ایجاد این عفونت‌ها دخالت دارند. مطالعه حاضر با هدف دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های یوروباتوژن اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش کار

تعداد ۶۷ ایزوله UPEC که از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری جدا شده بودند، انتخاب و به روش ERIC-PCR آزمایش شدند.

نتایج

ایزوله‌های مورد مطالعه دارای الگوی باندهای از محدوده ۱۱۰ تا ۳۱۰۰ جفت باز بودند که در آنالیز الگوی باندهای حاصله با ضریب تشابه تطابق ساده در سطح تشابه ۹۱ درصد در ۱۵ زیرگروه قرار گرفتند. بجز قرابت ۱۰۰ درصدی که در ۴ مورد دیده شد، سایر ایزوله‌ها دارای قرابت ژنتیکی بین ۴۴/۴ تا ۴۸/۱٪ بودند. قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چند زیرگروه نشان‌گر قدرت تمایزدهی قابل قبول تکنیک ERIC-PCR در ژنوتایپینگ اشریشیاکلی و وجود منابع مختلف آلودگی دستگاه ادراری با این پاتوژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

روش ERIC-PCR، روشی ساده، سریع و کم‌هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف اشریشیاکلی از جمله سویه‌های UPEC می‌باشد.

کلمات کلیدی

اشریشیاکلی‌های یوروباتوژنیک، دسته‌بندی ژنتیکی، ERIC-PCR، استان چهارمحال و بختیاری
پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

حسن ممتاز*^۱

غلامرضا بنی‌شریف دهکردی^۲

فاطمه بنی‌شریف دهکردی^۳

شکوفه بنی‌طالبی دهکردی^۴

^۱ استاد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد

^۳ کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

^۴ کارشناس پرستاری، گروه پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد

* گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴

Email: hamomtaz@iaush.ac.ir

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان است که به طور عمده توسط باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد می‌شود (۱). *اشریشیاکلی* عامل ۹۰-۸۰٪ از موارد UTI اکتسابی از جامعه و ۵۰-۳۰٪ از UTI بیمارستانی می‌باشد (۲). این عفونت از علل عمده بستری شدن بیماران در بیمارستان با عوارض قابل توجه و هزینه‌های بالای مراقبت بهداشتی است (۳).

تشخیص و درمان مؤثر UTI یک نگرانی جدی در زمینه مراقبت‌های بهداشتی است (۴). در سراسر جهان حدود ۱۵۰ میلیون نفر مبتلا به UTI تشخیص داده شده که سالانه بالغ بر ۶ میلیارد دلار هزینه درمانی آن در جهان می‌باشد (۵). شدت عفونت دستگاه ادراری به دو عامل بیماری‌زایی باکتری و خصوصیات میزبان بستگی دارد (۱). *اشریشیاکلی* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت مجاری ادراری که به نام *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) قلمداد می‌شود عوامل حدت مختلفی از جمله آلفا همولیزین، فاکتور نکروزدهنده سایتوپاتیک، عوامل چسبندگی و سیستم‌های اکتساب آهن را دارا می‌باشد که با داشتن این عوامل منجر به آسیب بافتی می‌شود (۸-۶).

تحقیقات نشان داده که شیوع فاکتورهای ویروالانس در سویه‌های UPEC، با پاتوژنیسته ادراری در ارتباط می‌باشد. به عنوان مثال دیده شده که همولیزین باکتری در موارد پیلونفریت، سیستیس و باکتریوری بدون علامت بیشتر تولید می‌شود (۹).

اشریشیاکلی با دارا بودن پادگن‌های اصلی K, H, O و نیز داشتن انواع عوامل حدت از جمله ژن *fimH* به روش‌های مختلف قابل تب بندی است (۱۱-۱۰).

از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی نظیر سروتایپینگ، بررسی الگوی پلاسمیدی، تعیین الگوی حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، روش‌های متکی بر برش آنزیمی نظیر RFLP جهت دسته‌بندی این باکتری استفاده شده است. روش‌های

متکی بر PCR نظیر ERIC-PCR، RAPD-PCR، REP-PCR و BOX-PCR به عنوان روش‌های سریع در دسته‌بندی ژنتیکی این باکتری استفاده شده‌اند. روش RAPD-PCR یکی از سریع‌ترین روش‌های تایپینگ مولکولی پیشرفته می‌باشد که به آسانی قابل انجام است. در سال‌های اخیر به دلیل سادگی این روش، سرعت بالای آن، دقت بالا، قابلیت تکرارپذیری، هزینه نسبتاً پایین و قدرت بالا در افتراق بین سویه‌ای مورد استفاده ویژه‌ای قرار گرفته است (۱۱-۱۰).

علاوه بر تکنیک RAPD-PCR، تکنیک ERIC-PCR جهت مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی و سنجش‌های مبتنی بر ERIC-PCR استفاده از پرایمرهایی می‌باشد که هدف آن‌ها توالی‌های تکراری محفوظ شده در ژنوم باکتری می‌باشد. از جمله گروه‌هایی از عناصر تکراری، توالی‌های تکراری توافقی درون ژن اینتروباکتریال یا ERIC می‌باشد که در باکتری‌های روده‌ای گرم منفی شایع است. به طور کلی اجزاء و عناصر ERIC ۱۲۶bp شامل یک نمونه تکراری معکوس مرکزی بسیار حفاظت شده در مناطق فراژنی می‌باشد که از این توالی تکراری جهت طراحی پرایمر در تکنیک ERIC-PCR جهت بدست آوردن انگشت‌نگاری DNA استفاده می‌شود (۱۱). در مطالعه حاضر نیز از روش ERIC-PCR جهت دسته‌بندی ایزوله‌های UPEC جدا شده از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی ۶۷ ایزوله *اشریشیاکلی* که از بیماران واجد عفونت‌های دستگاه ادراری از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح شهرستان شهرکرد در فاصله زمانی تیر ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹۴ جدا شده بودند، انتخاب گردید.

این ایزوله‌ها در آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی بیمارستان‌ها و مراکز درمانی مربوطه جدا سازی و تعیین هویت شده بودند. پس از انتقال ایزوله‌ها (رشد یافته در محیط مولر هینتون آگار) به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

در این روش، PCR در واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۴ میکرولیتر MgCl₂، ۱/۷۵ میکرولیتر dNTP Mix، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳ میکرولیتر از زوج پرایمرهای

ERIC1:

ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC

ERIC2:

AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر یک از ایزوله ها و ۲۹/۶۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیک ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله های جدا شده به شرح زیر تنظیم گردید:

واسرشته سازی اولیه یک چرخه ۶ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه.

محصول PCR مربوط به مرحله فوق روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد.

آزمایش ERIC-PCR روی هر کدام از ایزوله های مورد مطالعه ۳ نوبت انجام گرفت تا از تعداد باندهای ایجاد شده توسط هرایزوله اطمینان حاصل گردد. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تصاویر حاصل از الکتروفورز نمونه های مورد مطالعه، از نرم افزار (NTSYS version 2.02e) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر، به صورت داده های کمی صفر و یک (وجود باند یا عدم وجود باند)، امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی ژل ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده های صفر و یک با استفاده از ضریب جاکارد و دایس و تطابق ساده محاسبه شد. به منظور تعیین کارایی روش ERIC تجزیه خوشه ای بر مبنای ضرایب مشابه، از ضریب همبستگی کو فنتیک استفاده گردید. سپس برای گروه بندی سویه ها، تجزیه خوشه ای به روش (Unweighted Pair Group Method using UPGMA arithmetic Averages) بر مبنای ضریب

شهرکرد مجدداً با روش های متداول میکروبی شناسی تأیید هویت شدند.

جهت تأیید قطعی بودن اشریشیاکلی در ایزوله های جدا شده از روش PCR با ردیابی ژن *I6srRNA* استفاده شد. در این راستا از زوج پرایمرهای

I6srRNAF:

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG،

I6srRNAR:

CCGTCAATTCATTTGAGTTT

معرفی شده توسط لی و همکاران استفاده شد (۱۲). در این مرحله از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC-25922 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x (10x PCR buffer)، ۱ میکرولیتر MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاس - لیتوانی)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای ذکر شده در بالا، ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر یک از ایزوله ها و ۱۶/۸ میکرولیتر آب مقطر تنظیم شد. برنامه حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مراحل پیش رو انجام پذیرفت:

واسرشته سازی اولیه یک چرخه ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، و در ادامه ۳۳ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه.

در انتها محصول PCR در این مرحله بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و از ژل حاصله در حضور نور UV تصویربرداری و ثبت شد.

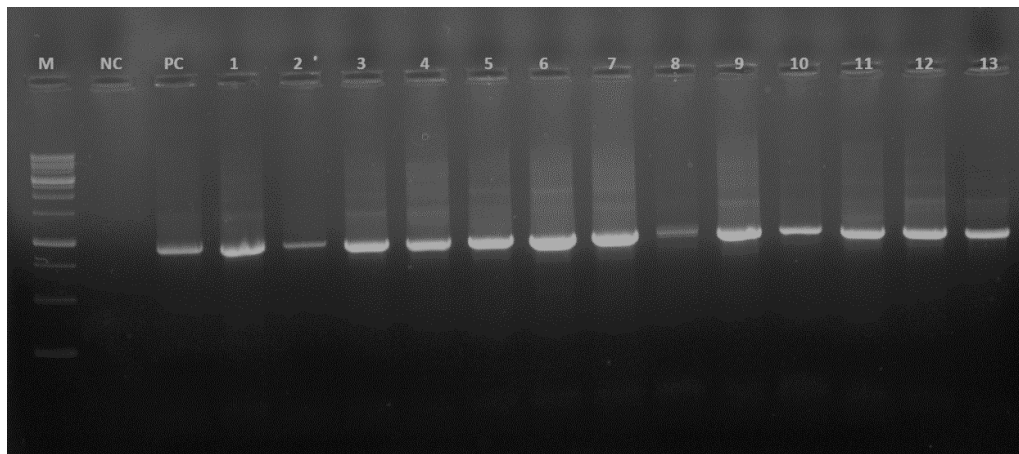
به منظور دسته بندی ژنتیکی ایزوله های اشریشیاکلی مورد مطالعه از روش Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) طبق روش توصیه شده توسط Versalovic و همکاران استفاده شد (۱۳).

تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفتیک را دارا بود، استفاده گردید.

نتایج

علاوه بر آزمون‌های میکروبی متداول به منظور تشخیص ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از روش PCR جهت ردیابی ژن

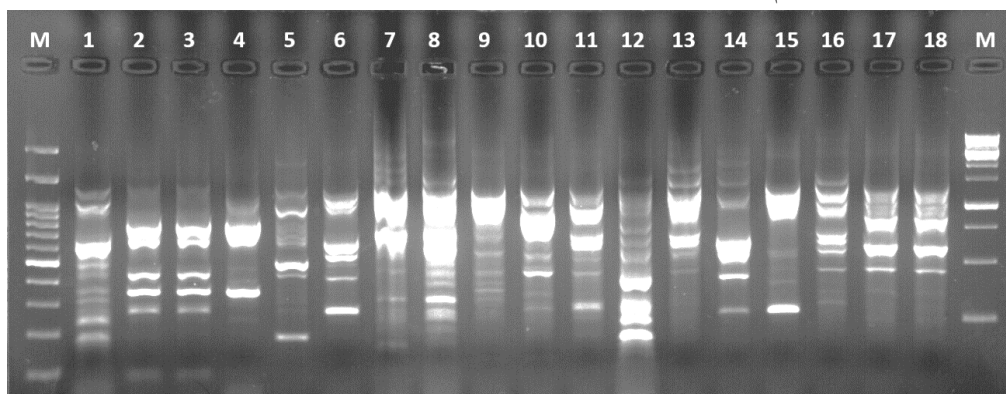
16srRNA استفاده گردید؛ نتیجه حاصل از ردیابی ژن *16srRNA* در شکل ۱ که حاصل از الکتروفورز محصول PCR این ژن می‌باشد، نشان داده شده است. حضور قطعه ۹۱۹ جفت بازی تأیید گر این مطلب است.



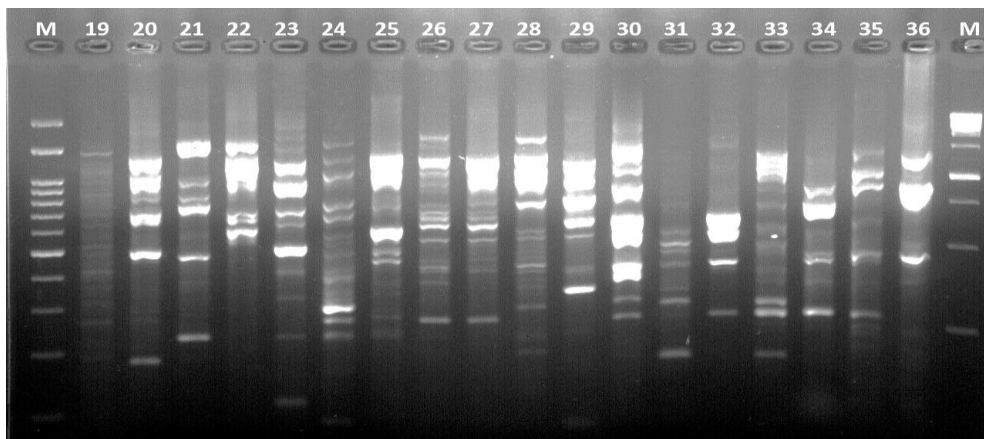
شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های یورپاتوژنیک *اشریشیاکلی* (ستون M=مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون NC=نمونه کنترل منفی، ستون PC=نمونه کنترل مثبت، ستون‌های 1-13=نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۹۱۹ جفت بازی DNA مربوط به ژن *16srRNA*).

روش ذکر شده می‌توان به ساختار و مسیر تکاملی ژنوم آن‌ها دست یافت (۱۶). در این بررسی جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌ها از روش ERIC-PCR استفاده شد که در این راستا ۶۷ ایزوله مورد مطالعه سه نوبت با روش ERIC-PCR آزمایش و پس از اطمینان از حضور قطعات تکثیر یافته در PCR (تصاویر ۵ تا ۵) آنالیز شدند.

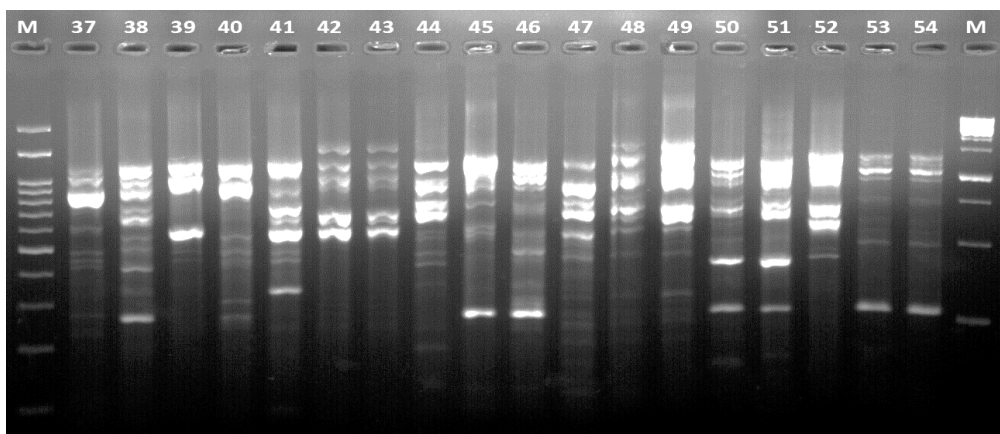
PCR عناصر تکرارشونده ERIC یکی از روش‌های سریع و ساده‌ای است که به طور معمول در شناسایی، طبقه بندی و بررسی تنوع عوامل باکتریایی بکار می رود (۱۳-۱۵). توالی‌های تکراری ERIC از جمله توالی‌هایی هستند که در سرتاسر ژنوم باکتری‌های بیماری‌زا پراکنده هستند و ممکن است نقش مهمی در سازماندهی ژنوم باکتری‌ها داشته باشند. با ردیابی پراکنش این توالی‌ها در ژنوم باکتری‌ها با استفاده از



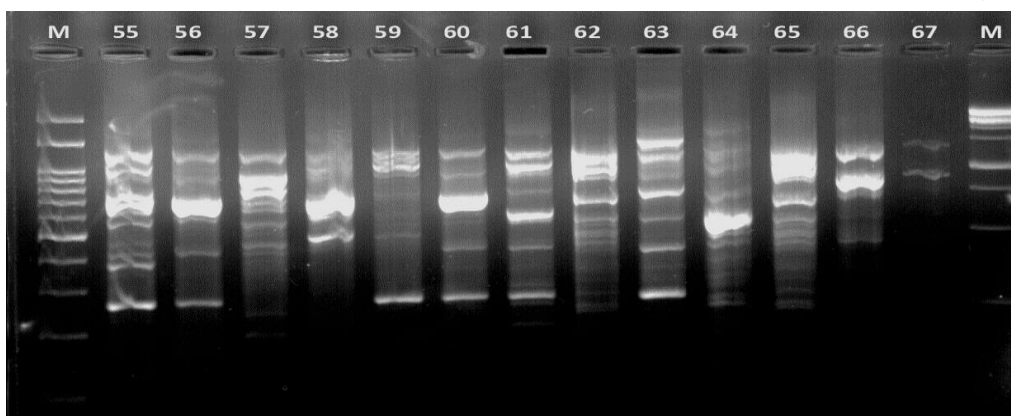
شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله‌های یورپاتوژنیک *اشریشیاکلی* (ایزوله‌های ۱ تا ۱۸) (ستون M در سمت چپ تصویر= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M در سمت راست تصویر= مارکر ۱ کیلو بازی DNA).



شکل ۳- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله های یورپاتوژنیک/اشرفیایکلی (ایزوله های ۱۹ تا ۳۶) (ستون M در سمت چپ تصویر = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M در سمت راست تصویر = مارکر ۱ کیلوبازی DNA).



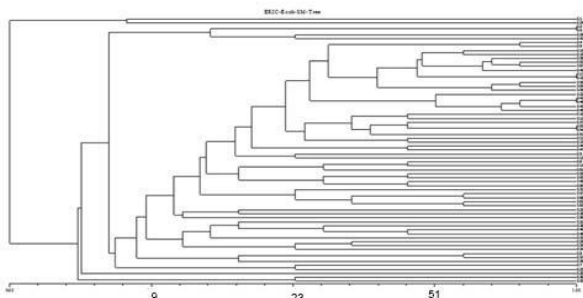
شکل ۴- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله های یورپاتوژنیک/اشرفیایکلی (ایزوله های ۳۷ تا ۵۴) (ستون M در سمت چپ تصویر = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M در سمت راست تصویر = مارکر ۱ کیلوبازی DNA).



شکل ۵- ژل حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله های یورپاتوژنیک/اشرفیایکلی (ایزوله های ۵۵ تا ۶۷) (ستون M در سمت چپ تصویر = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و ستون M در سمت راست تصویر = مارکر ۱ کیلوبازی DNA).

NTSYS آنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده های ۰ و ۱ با استفاده از ضرایب جاگارد، دایس و تطابق ساده محاسبه شد که ضریب کوفاکتیک محاسبه شده برای الگوریتم

طبق تصاویر (۲ تا ۵) ایزوله های مورد مطالعه دارای الگوی بانندی از محدود ۱۱۰ تا ۳۱۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله ها در قالب اعداد ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم وجود باند) امتیازدهی و به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل هادر برنامه



تصویر ۶- دندروگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های یوروباتوزنیک *اشریشیاکلی* با نشانگر ERIC-PCR بر مبنای ضریب تطابق ساده در سطح تشابه ۷۲٪ ایزوله‌های مورد مطالعه دارای ۹ زیرگروه، در سطح تشابه ۸۱٪ دارای ۲۳ زیرگروه بوده که تعداد زیرگروه‌ها در سطح تشابه ۹۱٪ به ۵۱ زیرگروه افزایش می‌یابد که خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین ایزوله‌های مورد مطالعه است.

بحث

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از شایع‌ترین عوامل میکروبی دخیل در ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری است که سروتیپ‌های مختلفی از این باکتری که *اشریشیاکلی* یوروباتوزنیک گفته می‌شوند، در ایجاد این عفونت‌ها دخیل می‌باشد (۱۷).

در گذشته از روش‌های فنوتیپی از جمله سروتایپینگ جهت دسته‌بندی سویه‌های این باکتری استفاده می‌شد. امروزه روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های مرسوم فنوتیپی شده است. چند روش برای دسته‌بندی سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* طراحی و ارائه شده است. ارزیابی سیستم‌های مختلف طبقه‌بندی باکتری‌ها در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بر پایه معیارهای مهمی نظیر توان تمایزدهی تکنیک، قابلیت تعیین تیپ و تکرارپذیری روش مربوطه می‌باشد. روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی برای تیپ‌بندی سویه‌های *اشریشیاکلی* شناخته شده است (۱۸). روش‌های فنوتیپی نظیر سروتایپینگ و فاژتایپینگ قدرت تمایزدهی پایینی دارند از این رو روش‌های ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا، هزینه پایین، کاربرد آسان و سریع در شناسایی و دسته‌بندی سویه‌های *اشریشیاکلی* کاربرد پیدا کرده‌اند (۱۹).

اخیراً روش‌های مختلفی برای تعیین منشأ و منبع میکروب‌ها به کار رفته‌اند. روش‌هایی مثل ریبوتایپینگ، ERIC-PCR،

UPGMA و هر کدام از سه ضریب فوق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ضریب کوفنتیک محاسبه شده برای الگوریتم و ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده روی UPGMA ایزوله‌های یوروباتوزنیک *اشریشیاکلی* با نشانگر

ضریب تشابه الگوریتم	ضریب تشابه جاکارد (J)	ضریب تشابه دایس (DICE)	ضریب تطابق ساده (SM)
۰/۶۶۰	۰/۵۷۸	۰/۶۹۲	UPGMA

طبق اطلاعات جدول فوق ضریب تطابق ساده (۰/۶۹۲) بزرگ‌تر از دو ضریب جاکارد و دایس بوده لذا جهت محاسبه درصد تشابه ژنتیکی ایزوله‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی از این ضریب استفاده شد. در نشانگر ERIC-PCR در چهار مورد، ایزوله‌ها دارای قرابت ۱۰۰٪ (ضریب شباهت ۱) بودند. قرابت ژنتیکی ۱۰۰٪ بین ایزوله‌های شماره ۲ و ۳ ایزوله‌های ۱۷ و ۱۸، ایزوله‌های ۴۲ و ۴۸ و ایزوله‌های ۵۳ و ۵۴ مشاهده شد.

کمترین قرابت ژنتیکی بین دو ایزوله ۲۴ و ۴۴ (ضریب شباهت ۰/۴۴۴)، ایزوله‌های ۲۰ با ۲۳، ۲۴ با ۳۴، ۲۴ با ۳۸ و ۲۴ با ۴۷ (ضریب شباهت ۰/۴۸۱) مشاهده شد.

به جز قرابت ۱۰۰ درصدی که بین ایزوله‌های فوق‌الذکر مشاهده شد. بین سایر ایزوله‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت ژنتیکی ۹۶/۲ درصد بود که بین ایزوله‌های ۴۲ با ۴۳، ۴۲ با ۴۹، ۴۳ با ۴۸، ۴۸ با ۴۸ و ۴۹ با ۴۹، ۵۲ با ۳۹، ۵۲ با ۴۵، ۵۲ با ۶۷، ۶۴ با ۵۸، ۶۴ با ۵۹ دیده شد.

در دندروگرام حاصل از نشانگر ERIC-PCR، مجموع ۶۷ ایزوله مورد مطالعه در سطح تشابه ۶۳ درصد در دو گروه A و B قرار می‌گیرند. که گروه A دارای دو زیرگروه A_۱ و A_۲ که هر کدام دارای یک ایزوله (ایزوله‌های ۲۴ و ۱) و گروه B دارای دو زیرگروه B_۱ و B_۲ که B_۱ دارای دو زیرشاخه B_۳ و B_۴ که زیرشاخه B_۴ تنها دارای یک ایزوله (ایزوله ۲۰) و زیرشاخه B_۳ با دو زیرگروه B_۵ و B_۶ با تعداد زیادی زیرشاخه و زیرگروه B_۲ دارای دو شاخه B_۷ و B_۸ با یک ایزوله در هر شاخه (ایزوله‌های ۳۰ و ۳۳) هستند (تصویر ۶).

در مطالعه Ranjbar و Ardakani از روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ ۹۸ ایزوله/اشریشیاکلی که در فاصله ژوئن ۲۰۱۴ تا ژانویه ۲۰۱۵ از بیمارستان بقیه الله تهران جدا شده بودند استفاده کردند. در این بررسی ایزوله‌ها در سطح تشابه ۷۰ درصد در ۶ زیرگروه E₁ تا E₆ قرار گرفتند (۲۶). در سال ۲۰۰۶، Wilson و همکاران، انتشار توالی‌های ERIC را در کل ژنوم باکتری‌های روده‌ای از جمله اشریشیاکلی و شیگلا بررسی کردند و مشاهده کردند که توالی‌های ERIC در ناحیه نزدیک ژن‌هایی با بیان بالا، بیشتر یافت می‌شوند و چون این توالی‌ها کوچک هستند، تکنیک ERIC-PCR کاربرد گسترده‌ای در ژنوتایپینگ ایزوله‌های باکتریایی دارد (۲۷). Ramezanzadeh و همکاران از روش ERIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳۰ ایزوله/اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی استفاده کردند و دریافتند که ۲۰۵ ایزوله از این نمونه‌ها را می‌توان در ۲۰ ژنوتیپ جداگانه قرار داد که اغلب آن‌ها در گروه فیلوژنتیکی D قرار می‌گیرند (۲۸).

Lang و همکاران در مطالعه‌ای روی ایزوله‌های اتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی جدا شده از گاو نشان دادند که روش ERIC-PCR یک روش کاربردی و سریع در طبقه‌بندی فیلوژنتیکی و بررسی ساختار تکامل نژادی سویه‌های اشریشیاکلی می‌باشد (۲۹).

نتیجه گیری

انتخاب یک تکنیک ژنوتایپینگ به سطح مهارت کاربران و امکانات آزمایشگاه و نیز به هدف بررسی وابسته است. در بررسی حاضر از تکنیک ERIC-PCR جهت دسته‌بندی ژنتیکی سویه‌های UPEC به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین میکروارگانسیم‌های یوروپاتوژن استفاده شد و قرار گرفتن ایزوله‌های مورد مطالعه در چندین زیرگروه نشانگر قدرت تمایزدهی قابل قبول این تکنیک در ژنوتایپینگ اشریشیاکلی می‌باشد. در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش ERIC-PCR، روشی ساده، سریع و کم‌هزینه جهت توصیف تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف اشریشیاکلی از جمله سویه‌های UPEC می‌باشد اما توصیه می‌گردد که مطالعات بیشتری روی نمونه‌های اخذ شده از بیمارستان‌های مختلف سطح کشور انجام و روش ERIC-PCR با روش‌های مولکولی نوین تر مثل PFGE مقایسه گردد امید است که

RAPD-PCR و RFLP به طرز موفقیت‌آمیزی برای متمایز کردن سویه‌های باکتری‌های مختلف استفاده شده‌اند (۲۰-۲۳). از کاربردی‌ترین روش‌ها در تیپ‌بندی سویه‌های اشریشیاکلی روش‌های مبتنی بر PCR به‌ویژه سه روش RAPD-PCR، ERIC-PCR و RFLP-PCR می‌باشد، در این مطالعه نیز از روش ERIC-PCR جهت دسته‌بندی ایزوله‌های یوروپاتوژنیک اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در بیماران بستری در بیمارستان‌های استان چهارمحال و بختیاری استفاده شد.

۶۷ ایزوله اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک با نشانگر ERIC-PCR، آزمایش و میزان شباهت ژنتیکی آن‌ها با ضریب تطابق ساده تعیین گردید. به‌جز شباهت ۱۰۰ درصدی که در چهار مورد بین ایزوله‌هایی ۲ با ۱۷، ۳ با ۱۸، ۴ با ۴۲ و ۵۳ با ۵۴ مشاهده شد، بیشترین کمترین درصد قرابت از ۴۴/۴ تا ۹۶/۲٪ بین ایزوله‌های مورد مطالعه دیده شد و همان‌گونه که در درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس ضریب تطابق ساده، مشهود است، ایزوله‌های UPEC مورد بررسی در سطح تشابه ۶۳٪ در دو گروه A و B با دو زیرگروه A₁ و A₂، B₁ و B₂ قرار گرفتند در حالی که در سطح تشابه ۷۲٪، در ۹ زیرگروه، در سطح تشابه ۸۱٪ در ۲۳ زیرگروه و در سطح تشابه ۹۱٪ در ۵۱ زیرگروه قرار گرفتند که خود نشانگر تنوع بالای ژنتیکی بین ایزوله‌های مورد مطالعه می‌باشد و نشان می‌دهد که منابع مختلفی می‌توانند منشاء آلودگی دستگاه ادراری به اشریشیاکلی باشند.

در سال ۲۰۰۲، da Silveira و همکاران ۴۹ ایزوله/اشریشیاکلی از مرغان مبتلا به سپتی‌سمی، سندرم تورم سر و مرغ‌های بدون علامت کلینیکی، جداسازی و از روش ERIC-PCR برای دسته‌بندی آن‌ها استفاده کردند. ایزوله‌ها در چهار گروه A تا D قرار گرفتند و نتایج نشان داد که روش ERIC-PCR می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های مولکولی مثل RAPD-PCR و RFLP-PCR باشد (۲۴).

Meacham و همکاران در دانشگاه میشیگان، تعداد زیادی از ایزوله‌های اشریشیاکلی را ژنوتایپینگ کرده و نتیجه گرفتند که بیش از یک روش ERIC-PCR را باید جهت دسته‌بندی ژنتیکی این باکتری استفاده کرد (۲۵).

چهارمحال و بختیاری مفید باشد.

نتایج مطالعه حاضر در بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های یوروپاتوژنیک/شریشیاکلی و ارتقای سلامت عمومی جامعه استان

References

1. Adibfar P. Medical microbiology for undergraduate medical students, paramedical and specialized fields. 1st ed. Tehran, Iran. Noor-e Danesh Publisher; 2000. P. 85-100. (Persian)
2. Emtiazi G, Karimi M. The basics of biomolecular and genetic engineering. 1st ed. Tehran, Iran: Mani Publisher; 2005. P. 5-10. (Persian)
3. James MJ. Microbiology of modern food. Trans: Ashraf M, Motamedzadegan A, Alami A, Gohari Ardabili M. 6th ed. Mashhad, Iran: Ferdowsi University Publisher; 2003. P. 455-75. (Persian)
4. Tabatabaei A, Firoozi R. Animal bacterial disease. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2005. P. 206-28. (Persian)
5. Haghighi L. Intestinal bacteria (Enterobacteriaceae family). 1st ed. Bushehr, Iran: Bushehr's Medical Science University; 2004. P. 1113-59. (Persian)
6. Razavilar V. Pathogenic microbes in food and epidemiology of food poisoning. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2002. P. 84-90. (Persian)
7. Rokni N. Health principles of food. Tehran, Iran: Tehran University Publisher; 2002. P. 64-100. (Persian)
8. Zaeem Kohan J. Harrison's infectious diseases. Principles of Harrison's internal medicine. 1st ed. Tehran, Iran: Lamat Publication; 2001. P. 373-81. (Persian)
9. Zamanzad B. Determine the most common bacterial causes of urinary tract infection in women (at the age of sexual activity) and investigating their susceptibility pattern to conventional antibiotics in the referrals to the laboratory of specialized clinics of Shahrekord University of Medical Sciences. Traditional Med 1996; 1:21-5. (Persian)
10. Shah-Hosseini M, Rezaei Tehrani H. Polymerase chain reaction (PCR). 1st ed. Tehran, Iran: Basiran Publisher; 2001. P. 8-30. (Persian)
11. Freezer V, Vostaff D. Food microbiology. Trans: Ghasemia Safaei H. Isfahan, Iran: Isfahan University of Medical Sciences; 2004. P. 505-6. (Persian)
12. 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; 82:71-7.
13. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991; 19:6823-31.
14. Vicente JG, Roberts SJ. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. Eur J Plant Pathol 2007; 117:383-92.
15. Ménard M, Sutra L, Luisetti J, Prunier JP, Gardan L. *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. Eur J Plant Pathol 2003; 109:565-76.
16. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60:2286-95.
17. 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.
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18:426-39.

19. Rostamzad A, Esfahani SH, Enteshari J. The investigation of molecular epidemiology of *Shigella sonnei* isolated from clinical cases in Tehran using RAPD-PCR method. *Sci Med J* 2010; 9:279-89.
20. Rodtong S, Tannock GW. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:3480-4.
21. Parabhu 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; 9:298-301.
22. Gomes AR, Muniyappa L, Krishnappa G, Suryanarayana VV, Isioor S, Prakash B, et al. Genotypic characterization of avian *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. *Int J Poult Sci* 2005; 4:378-81.
23. 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; 35:907-14.
24. da Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IA, Leite DS, de Castro AF, et al. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet Microbiol* 2002; 89:323-8.
25. Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5224-6.
26. Ardakani MA, Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *E. Coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electron Physician* 2016; 8:2291-6.
27. Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol* 2006; 23:1156-68.
28. Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran J Microbiol* 2013; 5:126-31.
29. Xiu-Yan LA, Zhang YL, Jiang HT, Jiao LI, Hong-Bo NI. Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7:4001-5.

Original Article

Genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Chaharmahal and Bakhtiari province

Received: 20/02/2018 - Accepted: 22/05/2018

Hassan Momtaz^{1*}
Gholamreza Banisharif-Dehkordi²
Fatemeh Banisharif-Dehkordi³
Shokoofeh Banitalebi Dehkordi⁴

¹ Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

² Post graduated of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

³ Department of Genetics, Faculty of science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

⁴ Department of Nursing, Faculty of Nursing, Shahrekord University of Medical sciences, Shahrekord, Iran.

*Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Tel: 03833361064
Email: hamomtaz@iaush.ac.ir

Abstract

Background & objectives: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is one of the most prevalent microbial factor resulting in urinary system infections. Many of its serotypes with genetic variety contribute to these infections. The present study was done aiming at genetic classification of UPEC strains isolated from urinary system infections in Chahrmahal & Bakhtiari province, Iran.

Materials & Methods: A total of 67 isolates of UPEC from patients hospitalized in hospitals of Chahrmahal & Bakhtiari were chosen and tested in ERIC-PCR.

Results: The studied isolates had band pattern varying from 110-3100 bp which were classified to 15 subgroups in the resulting banding pattern with simple matching similarity coefficient in 91% similarity level. Except 100 proximity found in four cases, other isolates had 44.4-48.1% genetic proximity. Placement of the studied isolates in several subgroups showed the acceptable discrimination power of ERIC-PCR technique in genotyping/ *E.coli* and presence of various sources of contamination of urinary system with this pathogen.

Conclusion: ERIC-PCR is a simple, fast and low cost method for describing the genetic variety of different strains of *E.coli* including UPEC strains.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), genetic classification, ERIC-PCR, Chahrmahal & Bakhtiari province.

Acknowledgement: There is no conflict of interest.