Journal of Microbial World
Volume 13, No. 4, January 2021

Original Article

Molecular typing of β -lactamase -producing *Escherichia coli*: Multiple Locus variable number tandem repeat analysis Versus Pulsed-field gel electrophoresis

Alireza Dolatyar Dehkharghani[1], Setareh Haghighat[2], Marjan Rahnamaye Farzami[1], Mohammad Rahbar[1]

[1]Department of Microbiology, Research Center of Reference Health Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran. [2]Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: β -lactamase -producing *E. coli* is the most important agent causing urinary tract infections both in community and hospitals. Strain typing including MLVA and PFGE are the most common epidemiologically tools not only for detecting the cross transmission of nosocomial pathogens but also for determining the source of infection.

Materials and methods: The present study was carried of for comparison of discriminatory power of MLVA and PFGE methods. A Total of 230 isolates of *E. coli* from patients with urinary tract infections were examined for identifying and antimicrobial susceptibility testing MLVA and PFGE methods were used for molecular typing of all isolates.

Results: Out of 230 isolates, 130 (56.5%) β -lactamase -producing *E. coli* isolates were found in this study. The diversity indices of the VNTR loci showed an average diversity of 0.48 and 0.54 for 7-loci and 10-loci respectively. The discriminatory power of PFGE showed a value of 0.87.

Conclusion: Our study showed that PFGE is more discriminatory than MVLA. MLVA is a PCR- based method and generates unmistakable data, in contrast to PFGE. Optimization of polymorphic VNTR is essential to improve the discriminatory power of MLVA basis on geographical region.

Keywords: *Escherichia coli*,β -lactamase-producing ,varitypping, genetic diversity.

Received: 12 July 2020 Revised: 13 October 2020 Accepted: 10 December 2020

Correspondence to: Dr. Mohammad Rahbar

Tel: +98 9121303143

E-mail: rahbar.reflab@gmail.com

Journal of Microbial World 2021, 13(4): 360-368

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره چهارم (پیاپی ٤٥) زمستان ١٣٩٩
صفحات ٣٦٨-٣٦٠

Original Article

تایپینگ مولکولی *اشریشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز: مقایسه MLVA و PFGE

علیرضا دولت یار دهخوارقانی[1]، ستاره حقیقت[2]، مرجان رهنمای فرزامی[1]، محمد رهبر[1*]

[1]وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت، بخش میکروب شناسی
[2]دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوری های نوین، بخش میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز مهمترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه ادراری در جامعه و بیمارستان‌ها است. روش‌های تعیین تایپ سویه‌ها مانند MLVA و PFGE معمول‌ترین ابزار اپیدمیولوژیک نه تنها برای تشخیص انتقال متقاطع پاتوژن‌های بیمارستانی بلکه برای تعیین منبع عفونت می‌باشند.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به به منظور ارزیابی قدرت تمیز روش‌های MLVA و PFGE انجام شد. در مجموع ٢٣٠ جدایه *اشریشیا کلی* بدست آمده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری از نظر حساسیت ضد میکروبی آزمایش و به منظور مقایسه MLVA و PFGE برای تایپ مولکولی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: از ٢٣٠ جدایه، ١٣٠ جدایه *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز (٥٦/٥٪) در این مطالعه یافت شد. شاخص تنوع لوکوس‌های VNTR به ترتیب برای روش ٧ و ١٠ لوکوسی ٠/٤٨ و ٠/٥٤ تعیین شدند. قدرت تمیز PFGE ٠/٨٧ محاسبه گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که قدرت تمیز PFGE بیشتر از MVLA است. MLVA روشی مبتنی بر PCR است و برخلاف PFGE، داده‌های غیرقابل اشتباه تولید می‌کند. بهینه سازی VNTR پلی مورفیک برای بهبود قدرت تمیز MLVA در هر منطقه جغرافیایی ضروری است.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، تولید کننده بتالاکتاماز، ویروتایپینگ، تنوع ژنتیکی.

دریافت مقاله: ١٣٩٩/٤/٢٥ ویرایش مقاله: ١٣٩٩/٧/٢٢ پذیرش مقاله: ١٣٩٩/٩/٢٠

مقدمه

اشریشیا کلی رایج‌ترین عامل باکتریایی عفونت مجاری ادراری است (١). در واقع، *اشریشیا کلی* عامل بیش از ٨٥٪ عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشد (٢). صد و پنجاه میلیون نفر سالانه در کل دنیا تحت تأثیر عفونت‌های دستگاه ادراری قرار می‌گیرند (٣). زنان ٣٠ برابر بیشتر از مردان دچار عفونت مجاری ادراری می‌شوند و حدود ٦٠ درصد آنها حداقل یک بار در زندگی خود مبتلا به عفونت مجاری ادراری می‌شوند (٣). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) که سفالوسپورین و مونوباکتام‌ها را هیدرولیز می‌کنند آنزیم‌های به واسطه پلاسمید کلاس A هستند. آنها توسط اسید کلاولانیک در شرایط in vitro مهار می‌شوند (٤ و ٥). باکتری‌های تولید کننده ESBL می‌توانند باعث مقاومت در برابر پنی سیلین، سفالوسپورین با طیف اثر محدود و گسترده و آنتی بیوتیک‌های آزترونام شوند. آنها معمولاً می‌توانند در برابر آمینوگلیکوزیدها، تریمتوپریم/سولفامتوکسازول و کینولون‌ها مقاومت نشان دهند (٦ و ٧).

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، آزمایشگاه مرجع وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی
تلفن: ٠٩١٢١٣٠٣١٤٣ پست الکترونیک: rahbar.reflab@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

بتا-لاکتامازهای AmpC یا به صورت کروموزومی کدگذاری می‌شوند و یا می‌توانند با واسطه پلاسمید بیان شوند. بتا-لاکتامازهای AmpC پلاسمیدی می‌توانند آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را به جز سفپیم و کارباپنم هیدرولیز کنند. تشخیص AmpC از نظر بالینی برای کنترل بیمارانی که از عفونت رنج می‌برند بسیار مهم است. با این حال، هیچ دستورالعمل استانداردی برای تشخیص مقاومت ایجاد شده به واسطه AmpC در باسیل‌های گرم منفی وجود ندارد بنابراین، در آزمون‌های حساسیت ضد میکروبی به ویژه با روش‌های فنوتیپی می‌توان نتایج کاذب بدست آورد (۸). مراکز ارائه دهنده خدمات بهداشتی و جامعه به عنوان دو منبع مهم عفونت *اشریشیا کلی* در نظر گرفته می‌شوند (۹).

شناسایی منابع آلودگی و شناسایی مسیرهای انتقال توسط خوشه بندی ژنتیکی انجام می‌شود. این موضوع، شناسایی صحیح و کنترل انتشار عفونت‌ها را ممکن می‌سازد. تکنیک‌های مختلف تایپ مولکولی به طور گسترده ای در تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی بیماری‌های عفونی باکتریایی برای مطالعه منبع و ارتباط بین سویه‌ها استفاده شده است. در میان تکنیک‌های تایپ مولکولی، الکتروفورز روی ژل در میدان الکتریکی ضربان دار (PFGE) به عنوان یک روش استاندارد طلایی، MLVA و ریبوتایپینگ کارایی خوبی در بررسی شیوع و موارد پراکنده دارند (۹ و ۱۰). PFGE یک روش قدرتمند تایپ مولکولی است و معمولاً برای خوشه بندی باکتری‌ها استفاده می‌شود. در روش PFGE، از آنزیم‌های برش دهنده برای برش ژنوم باکتری‌ها و تولید تعداد محدودی از قطعات ژنی با وزن مولکولی بالا استفاده می‌شود. این قطعات سپس توسط الکتروفورز ژل با متغیرهای برنامه ریزی شده در هر دو جهت و زمانبندی های متفاوت میدان الکتریکی جدا می‌شوند. MLVA و ریبوتایپ دو تکنیک تایپ مولکولی دیگر هستند که برای باکتری‌ها اغلب استفاده می شود. در این مطالعه، روش‌های PFGE و MLVA را برای خوشه بندی سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده AmpC ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

در فاصله سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷، دویست و سی جدایه *اشریشیا کلی* تولید کننده بتا لاکتاماز از بیماران بستری با علائم UTI در بیمارستان میلاد (بیمارستان عمومی تهران، ایران) جمع آوری شد. جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند و تمام جدایه‌ها با استفاده از تریپتی کیس سوی براث به علاوه ۱۵٪ گلیسرول برای مطالعات بیشتر در مولکول در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

الف) تست حساسیت ضد میکروبی برای غربالگری جدایه‌های اشریشیا کلی تولید کننده بتالاکتاماز AmpC: جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *E. coli* با استفاده از روش E-test (MIC) مطابق با دستورالعمل CLSI 2018 مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش، از آنتی بیوتیک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) (Mast Diagnostics Ltd) استفاده شده است.

ب) تشخیص جدایه‌های مثبت AmpC: آزمون غربالگری برای تشخیص جدایه‌های AmpC-Positive بر روی سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه ادرار با استفاده از دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) انجام شد.

در مرحله بعدی، سویه‌های مشکوک توسط مجموعه تشخیص AmpC (MASTDISCS ™ ID ، انگلستان) تأیید شدند. سرانجام، نتایج آزمونهای تشخیص AST و AmpC در نرم افزار WHONET ثبت شد.

ج) شناسایی جدایه‌های مثبت ESBL: غربالگری برای تولید ESBL با استفاده از ۳۰ میکروگرم دیسک سفتازیدیم (CAZ) با استفاده از روش انتشار دیسک طبق دستورالعمل CLSI (2018) انجام شد. جدایه‌هایی که منطقه مهار آنها کمتر از ۲۲ میلی متر بود به عنوان سفتازیدیم (CAZ) به عنوان تولید کننده بالقوه ESBL حساس نبودند. یک دیسک سفتازیدیم (CAZ) (۳۰ میکروگرم) و یک دیسک ترکیبی سفتازیدیم با اسید کلاولانیک (CAC) (۱۰/۳۰ میکروگرم) به عنوان یک آزمون تأییدی برای هر جدایه احتمالی ESBL استفاده شد. هر دو دیسک در صفحه مولر هینتون آگار (MHA) قرار گرفتند و

یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. ۵ ≤ میلی متر افزایش در قطر منطقه برای هر باسیل گران منفی به عنوان ESBL مثبت در نظر گرفته شد.

د) آنالیز نواجی تکراری چند ناحیه‌ای (MLVA): کل ژنوم *اشریشیا کلی* با استفاده از کیت آماده سازی الگو PCR با خلوص بالا از کشت‌های یک ۱۸ ساعته استخراج شد (روش،آلمان). MLVA در *اشریشیا کلی* با استفاده از هفت ناحیه (CVN001، CVN002، CVN003، CVN004، CVN007، CVN014، CVN015) انجام شد، همانطور که توسط Lindstedt و همکاران شرح داده شده است (۱۱). علاوه بر این، CVN016 و CVN01 و یک تکرار پالیندرومی کوتاه به طور منظم (CCR001) که به منظور بهبود قدرت تمیز این MLVA توضیح داده شده است، به لوکوس‌ها اضافه شدند در نتیجه MLVA ۱۰ لوکوسی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲). پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است. تکرارها با استفاده از PCR تکثیر و بر روی آگارز ۳٪ارزیابی شدند. سایز مارکرهای ۱۰۰ جفت باز و ۲۰ جفت با (Bio-Rad) به عنوان نشانگر اندازه DNA برای VNTRs استفاده شد.

اعداد تکرار VNTR برای هر جدایه با فرمول محاسبه شد. RL / (PS-OF) که PS – اندازه محصول، OF – منطقه افست و RL – طول یک واحد تکرار است.

CVN001: ((PS) −250) / 39
CVN002: ((PS) 272) / 18
CVN003: ((PS) −404) / 15
CVN004: ((PS) −231) / 15
CVN007: ((PS) −314) / 18
CVN014: ((PS) −111) / 6
CVN015: ((PS) −189) / 6
CCR001: ((PS) −131) / 59
CVN016: ((PS) −478) / 6
CVN017: ((PS) −202) / 6

ناحیه افست شامل ناحیه توالی است که حاوی تکرار نیست.

الکتروفورز روی ژل در میدان الکتریکی ضربان دار (PFGE): کشت ۱۸ ساعته جدایه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از ادرار برای تهیه پلاگ‌های جامد آگارز مورد استفاده قرار گرفت و سپس ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس توسط پروتئیناز K انکوبه

جدول ۱: توالی‌های آغازگر برای روش MLVA

Target	locus	Primer sequence	Reference
CVN001	F	AACCGGCTGGGGCGAATCC	(11)
	R	GGCGGCGGTGTCAGCAAATC	
CVN002	F	AACCGTTATGAARGRAAGTCCT	(11)
	R	TCGCCCAGTAAGTATGAAATC	
CVN003	F	AAAAATCCGGATGAGWTGGTC	(11)
	R	TTGCGTTGTCAGTAATTTGTTCAG	
CVN004	F	MGCTGCGGCRCTGAAGAAGA	(11)
	R	CCCGGCAGGCGAAGCATTGT	
CVN007	F	ACCGTGGCTCCAGYTGATTTC	(11)
	R	ACCAGTGTTGCGCCCAGTGTC	
CVN014	F	TCCCCGCAATCAGCAAMACAAAGA	(11)
	R	GCAGCRGGGACAACGGAAGC	
CVN015	F	TAGGCATAGCGCACAGACAGATAA	(11)
	R	GTACCGCCGAACTTCAACACTC	
CVN016	F	GCTGCAGGAGAATGGGATGGTTTT	(12)
	R	GGTGAGGTGTCCGAGTGGCTGAAG	
CVN017	F	GCAATCACCGCCGCAATCTGTT	(12)
	R	CGCCGCCGAAGCAAATCTC	
CCR001	F	CTCAGGGAAAAGGGAAGACACTAC	(12)
	R	TTGCACTGAACACCGAATACG	

گردید. پلاگ‌ها ٦ مرتبه توسط آب مقطر و بافر TE ٥٦–٥٥ درجه سلسیوس شسته شدند. طبق دستورالعمل سازنده، یک قطعه پلاگ ۲ میلی متری با ۵۰ واحد آنزیم برش دهنده *Xba*I برش داده شد (Thermo Fisher Scinetific، USA).

PFGE با استفاده از سیستم CHEF Mapper XA، Hercules، با استفاده از ژل آگارز ۱٪ Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad Laboratories)، Hercules، در ۲/۲ لیتر Trisfer buffered EDTA 0.5X انجام شد (Thermo Fisher Scinetific، ایالات متحده آمریکا). شرایط الکتروفورتیک استفاده شده به شرح زیر است: زمان سوئیچ اولیه ٢.١٦ ثانیه، زمان سوئیچ نهایی٥٤.١٧ ثانیه، زمان اجرا۲۱ ساعت، شیب ولتاژ ٦ ولت / سانتی متر، زاویه ۱۲۰ درجه، دما ١٤ درجه سانتیگراد. سروتیپ *سالمونلا انتریکا* Braenderup H9812 به عنوان استاندارد در هر سری کار همراه با جدایه‌های *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

مقایسه مشخصات MLVA و PFGE: تمام پروفایل‌های PFGE

و MLVA در BioNumerics ٦.٦، با استفاده از الگوریتم UPGMA (روش گروه جفتی بدون وزن با میانگین حسابی) پردازش شدند. برای PFGE و MLVA به ترتیب از ضریب دایس و ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. این نرم افزار برای بررسی تنوع مورد استفاده قرار گرفت (شاخص تنوع سیمپسون).

یافته ها

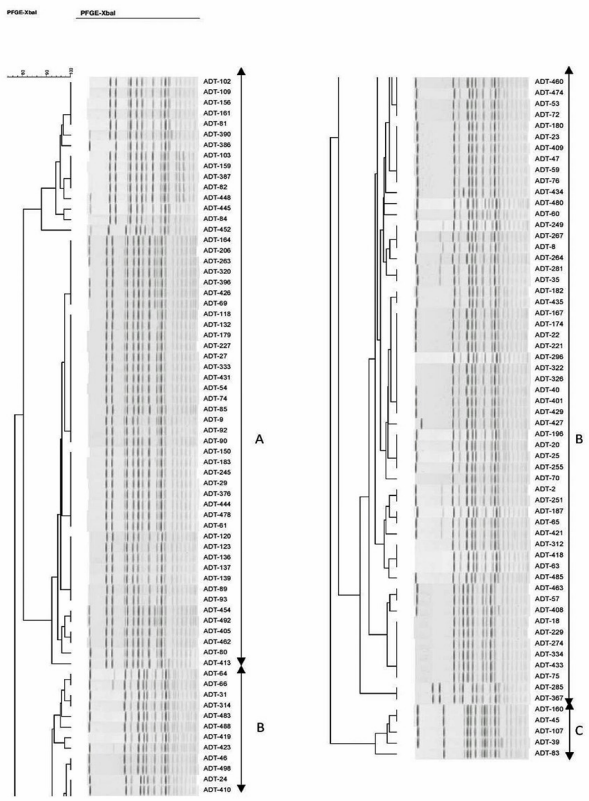
در مجموع ۲۳۰ جدایه طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ جمع آوری شد. با توجه به اینکه هدف از استفاده از این روش‌ها تشخیص شیوع و کنترل عفونت در یک بیمارستان می باشد، بنابراین تاریخ و مکان اطلاعات به تفسیر داده‌ها کمک خواهند کرد. در این مطالعه، تنها به بخش‌های جمع آوری نمونه دسترسی وجود داشت.

تایپینگ جدایه‌های اشریشیا کلی تولید کننده بتالاکتاماز با روش PFGE: یک دندروگرام با استفاده از نرم افزار BioNumerics نسخه ٦/٦ رسم شد. در این دندروگرام بر اساس شباهت ژنتیکی (کات اف ۸۰٪) ٤٩ پالسوتایپ و ۳ خوشه تشخیص داده شد که A تا C را نامگذاری شدند (شکل ۱). الگوی PFGE تولید کنندگان β-lactamase و مقایسه بین الگوها در جدول (۲) ذکر شده است.

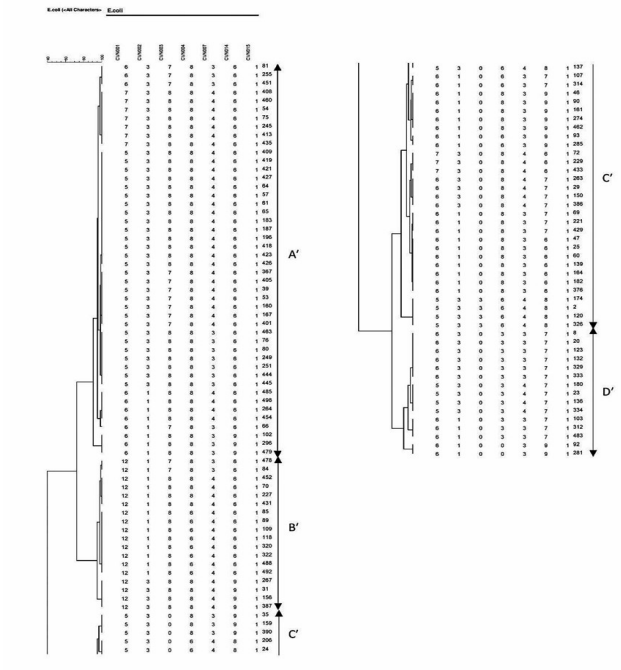
تایپینگ جدایه های اشریشیا کلی تولید کننده بتالاکتاماز به روش MLVA: دندروگرام مبتنی بر پروفایل های MLVA ۷ و ۱۰ لوکوسی توسط نرم افزار BioNumerics نسخه ٦.٦ رسم شد. در این مطالعه تایپ MLVA ۷ لوکوسی جدایه های *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز را به ۲٦ تیپ مجزا و ٤ خوشه تقسیم کرد که A' تا D' نامگذاری شدند (شکل ۲). الگوی MLVA تولید کنندگان بتالاکتاماز و مقایسه بین الگوها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: مقایسه شاخص تنوع سیمپسون برای MLVA و PFGE

Typing method	Simpsons index of diversity
7-loci MLVA	0.54
10-loci MLVA	0.48
PFGE	0.87

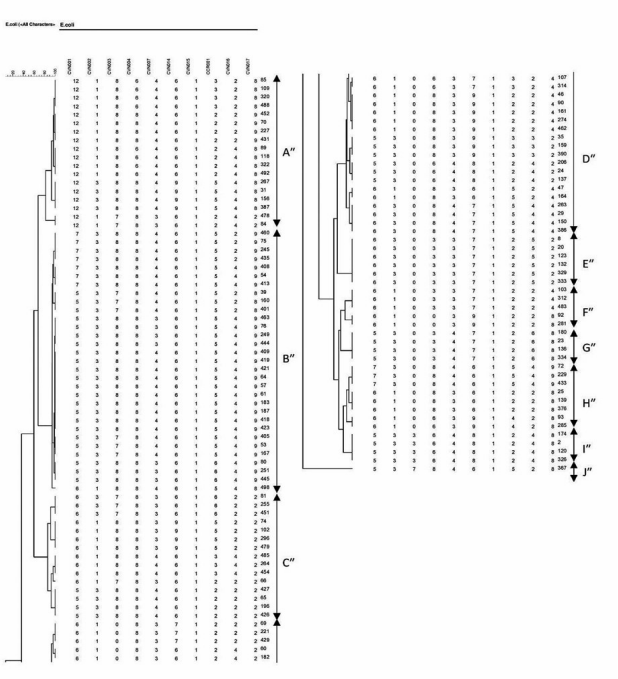


شکل ۱: خوشه بندی *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز با استفاده از PFGE



شکل ۲: خوشه بندی *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز با استفاده از MLVA ۷ لوکوسی

۳۶ تایپ و ۱۰ خوشه اصلی تقسیم شد و "A تا "J نامگذاری گردید (شکل ۳).



شکل ۳: خوشه بندی *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز با استفاده از MLVA ۱۰ لوکوسی

مقایسه مشخصات MLVA و PFGE: تجزیه و تحلیل ترکیب هفت لوکوس VNTR مجموعه سویه‌ها نشان داد که تعداد آلل‌ها از یک برای CVN015 تا ۵ برای CVN001 متغیر است. شاخص‌های تنوع مکان‌های VNTR، که با شاخص تنوع سیمپسون اندازه گیری شده اند، میانگین تنوع ۰/۵٤ را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل ترکیب ده جایگاه VNTR مجموعه سویه‌ها نشان داد که تعداد آلل‌ها از یک برای CVN015 تا ۵ برای CVN001، CVN016 و CCR001 متغیر است. شاخص‌های تنوع مکان‌های VNTR که با شاخص تنوع سیمپسون اندازه گیری شده اند، میانگین تنوع ۰/٤۸ را نشان می‌دهند. کمترین شاخص تنوع برای CVN015 یافت شد، زیرا ۱۰۰٪ جدایه‌ها آلل یکسانی در این مکان داشتند و بالاترین شاخص تنوع برای CVN001 در MLVA هفت لوکوسی و CVN001، CVN016 و CCR001 در MLVA ده لوکوسی یافت شد. تجزیه و تحلیل PFGE ٤۹ الگوی PFGE مجزا را در میان جدایه‌ها شناسایی کرد.

در این مطالعه قدرت تمیز PFGE بیشتر از MLVA نشان داده شد. شاخص سیمپسون MLVA با ۷ لوکوس ۰/۵٤ با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه شد، در حالی که شاخص سیمپسون MLVA با ۱۰ موقعیت ۰/٤۸ با فاصله اطمینان ۹۵٪ برآورد گردید. شاخص سیمپسون PFGE با فاصله اطمینان ۹۵٪ مقدار ۰/۸۷ را نشان داده شد (جدول ۱). عدم تطابق بین روش‌ها زیاد بود.

بحث

جدایه‌های *اشریشیا کلی* تولیدکننده بتالاکتامازکه به سرعت در حال گسترش هستند و انتقال مداوم سویه‌ها از جامعه به محیط بیمارستان (۱٤و۱۵و۱٦)، نظارت بر عفونت‌های اکتسابی بیمارستان و توجه به شیوع بالقوه را به چالشی سخت گیرانه تبدیل می‌کند. به منظور انتخاب روش مناسب با توجه به شرایط آزمایشگاهی موجود، ما روش MLVA (۷ مکان و ۱۰ مکان) و PFGE به منظور تایپ مولکولی *اشریشیا کلی*، را روی سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز ارزیابی گردید. کارآمد بودن PFGE و MLVA ۷ لوکوسی و ۱۰ لوکوس برای تایپ ۱۳۰ *اشریشیا کلی* تولید کننده بتالاکتاماز جدا شده از بیماران ایرانی مبتلا به عفونت ادراری مقایسه گردید. برای بررسی اپیدمیولوژی *اشریشیا کلی* در مطالعات مختلف از روش‌های مختلف ژنوتیپ استفاده شده است (۱۷و۱۸و۱۹). برای چندین سال PFGE، روش استاندارد طلایی بوده و سال‌های متمادی شبکه بین المللی پالس نت از این روش برای مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی استفاده کرده است (۶و۲۰). بر خلاف PFGE، MLVA روش تایپ سریع، مقرون به صرفه و آسان برای تفسیر و مبتنی بر PCR است.

Lindstedt BA و همکاران در سال ۲۰۰۷ اولین کسانی بودند که روش MLVA را برای *اشریشیا کلی* بر اساس ۷ لوکوس توصیف کردند (CVN001، CVN002، CVN003، CVN004، CVN007، CVN014، CVN015) (۱۱). Løbersli I و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از سه لوکوس بیشتر

(CCR001، CVN016 و CVN0017) روش مبتنی بر ۱۰ لوکوس را برای تایپ مولکولی *اشریشیا کلی* طراحی نمودند. همانطور که در مطالعه دیگر گزارش شده است (۲۱و۲۲). این لوکوس‌های اضافی قدرت تمیز را بهبود بخشید. نتایج نشان داد که برخی از لوکوس‌ها در تمام جدایه ها تعداد تکرار مشابهی دارند. چنین تکرارهایی می‌توانند مبنای منطقه جغرافیایی را تغییر دهند، بنابراین در روش MLVA می‌توان از لوکوس‌های انتخابی مبتنی بر منطقه جغرافیایی استفاده نمود. در این مطالعه، محاسبه شاخص‌های تنوع سیمپسون برای مکان‌های MLVA نشان داد که CVN001، CVN016 و CCR001 با ۵ آلل مختلف از تنوع آللی بیشتری برخوردار هستند. CVN015 کمترین تغییر را در جدایه‌های مورد مطالعه با یک آلل داشت. به دست آوردن چنین تنوع کم برای CVN015 نشان می‌دهد که این لوکوس می‌تواند با یک VNTR چند شکلی جایگزین شود.

PFGE گسترش کلونال سویه‌ها را در بیمارستان‌ها، انتقال عمودی یا افقی ژن‌های مقاومت ضد میکروبی و راهبردهای کنترل عفونت ضعیف را در این محیط مراقبت‌های بهداشتی و درمانی نشان می‌دهد. نتایج مشاهده شده برای روش‌های MLVA هفت و ده لوکوسی نشان داد که VNTRs چند شکلی باید دقیق انتخاب شوند.

PFGE قدرت تمیز بالاتری نسبت به MLVA از خود نشان داد. بین خوشه‌های ایجاد شده در PFGE و MLVA رابطه معنی داری وجود نداشت. پروفایل MLVA (۷ و ۱۰ لوکوس) با چندین پروفایل PFGE مطابقت داشت. در این مطالعه، نشان داده شده است که سطح همخوانی بین روش‌های تایپ می‌تواند متفاوت باشد و به جمعیت جدا شده بستگی دارد. تفاوت در قدرت تمیز باید با دقت تفسیر شود.

در مطالعه حاضر، از یک آنزیم برش دهنده *Xba*I، برای PFGE استفاده گردید، در حالی که ۷ یا ۱۰ لوکوس برای MLVA هدف قرار گرفتند. استفاده از آنزیم‌های برش دهنده اضافی برای تجزیه و تحلیل PFGE ممکن است قدرت تمیز را بهبود بخشد. برش با آنزیم دوم یا سوم بیشتر قدرت تمیز PFGE را بهبود می‌بخشد (۲۳).

در نتیجه، مطالعه ما نشان داد که قدرت تمیز PFGE از MVLA بیشتر است. با توجه به اهمیت *اشریشیا کلی* در عفونت‌های بیمارستانی به ویژه جدایه‌های تولید کننده بتالاکتاماز و نظارت بر گسترش آنها، اجرای راهبردهای مناسب کنترل عفونت و اپیدمیولوژی عمومی ضروری است. چنین اهدافی نیاز به توسعه یک ابزار تایپ مولکولی قدرتمند دارد. با توجه به عدم دسترسی به تجهیزات مورد نیاز روش PFGE، روش جایگزین، MLVA می‌تواند باشد. MLVA یک روش مبتنی بر PCR است و به عنوان ابزاری برای مطالعه اپیدمیولوژیک شیوع بسیار ارزشمند است اما بهینه سازی جایگاه VNTR برای بهبود قدرت تمیز آن، حیاتی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری صمیمانه پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان میلاد و آزمایشگاه مرجع سلامت ایران و پشتیبانی فنی و جمع آوری اطلاعات تشکر می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Foxman, Betsy. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Am. J. Med. 2002; 113: a5-13.

2. Bergeron RC, Prussing C, Boerlin P P, Daignault D, Dutil L,Reid-Smith RJ, Zhanel GG,Manges AR. Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada; Emerg. Infect. Dis. 2013; 18: 415-421.

3. Al-Badr A, Al-Shaikh G. Recurrent Urinary Tract Infections Management in Women: A review. Sultan Qaboos Univ Med J. 2013; 13:359-367.

4. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Luis Martínez-Martínez L, Muniain MA,Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 2004; 42:1089-1094.

5. Hyytiä-Trees EK, Cooper K, Ribot EM, et al.. Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens.; Future Microbiol. 2007; 2: 175-185.

6. M. A. Bhat, S. Sageerabanoo, R. Kowsalya, and G. Sarkar. The occurrence of CTX-M3 type extended spectrum beta lactamases among *Escherichia coli* causing urinary tract infections in a tertiary care hospital in puducherry. J Clin Diagn Res. 2012; 6.7 : 1203-1206.

7. Bhattacharjee A, Sen M R, Prakash P, Gaur A, Anupurba S. Increased prevalence of extended spectrum β lactamase producers in neonatal septicaemic cases at a tertiary referral hospital. Indian J Med Microbiol. 2008; 26:356-60.

8. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:933–951.

9. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al.. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47 (11):3554–3560.

10. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect. Genet. Evol. 2009; 9: 430-440.

11. Lindstedt BA, Brandal LT, Aas L, Vardund T, Kapperud G. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic Escherichia coli and Shigella isolates for use in a genotyping assay. J Microbiol Methods. 2007; 69: 197-205.

12. Løbersli I, Haugum K, Lindstedt BA. Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loc. J Microbiol Methods. 2012; 88: 134-139.

13. www.Pulsnet International.com

14. Helldal L, Karami N, Florén K, Welinder-Olsson C, Moore ERB, Åhrén C.. Shift of CTX-M genotypes has determined the increased prevalence of extendedspectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in south-western Sweden. Clin. Microbiol. Infect. 2013; 19: E87-90.

15. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. Escherichia coli st131, an intriguing clonal group. Clin. Microbiol. Rev. 2014; 27: 543-574.

16. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al.; 2008; Prevalence and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 14: 144-153.

17. Karami N, Helldal L, Welinder-Olsson C, Åhrén C, Moore ERB. Sub-typing of extended-spectrum-β-lactamase-producing isolates from a nosocomial outbreak: Application of a 10-loci generic *Escherichia coli* multi-locus variable number tandem repeat analysis. PLOS One. 2013; 8: e83030.

18. Naseer U, Olsson-Liljequist BE, Woodford N, Dhanji H, Cantón R, Sundsfjord. Multi-locus variable number of tandem repeat analysis for rapid and accurate typing of virulent multidrug resistant *Escherichia coli* clones. PLOS One. 2012; 7: e41232.

19. Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B andHunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett. Standardization of pulsedfield gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3: 59-67.

20. P.Wayne. Performance standards for antimicrobial susceptibility. CLSI Document M100-S29, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.

21. Kim J, Hyeon JY, Lee E, Lee D, Kim YJ, Kim S. Molecular epidemiological analysis of five outbreaks associated with Salmonella enterica serovar Enteritidis between 2008 and 2010 on Jeju Island, Republic of Korea. Foodborne Pathog Dis. 2014; 11: 38-42.

22. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of Salmonella enterica serotype Enteritidis. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 536-543.

23. Cho S, Boxrud DJ, Bartkus JM, Whittam TS, Saeed M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Salmonella Enteritidis isolates from human and non-human sources using a single multiplex PCR. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 275 (1): 16-23.