مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره چهارم (پیاپی ۹)، زمستان ۱۳۸۹
صفحات ۲۵۰ ـ ۲۴۵

تعیین گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های اشریشیا کلی عامل عفونت دستگاه ادراری درجنوب ایران

سارا اسعدی*[۱]، کاووس صلح جو[۲]، محمد کارگر[۳]، عباسعلی رضائیان[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار دانشگاه علوم پزشکی جهرم، گروه میکروبیولوژی
[۳]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۴]مربی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیاکلی عامل بیش از ۸۰٪ از عفونت‌های ادراری در تمام گروه‌های سنی جامعه است. سویه‌های اشریشیاکلی به چهار گروه فیلوژنتیک تقسیم می‌شوند. اغلب جدایه های‌های بیماریزای خارج روده‌ای متعلق به گروه B2 و D هستند. هدف از این پژوهش، تعیین گروه‌های فیلوژنتیک اشریشیاکلی جدا شده از بیماران با عفونت ادراری در جنوب ایران بود.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی اشریشیاکلی جداشده ازکشت ادرار بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان پیمانیه جهرم در سال ۱۳۸۹ انجام شد. از آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت باکتری‌های جداشده استفاده شد. سپس طبقه‌بندی گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های اشریشیاکلی با استفاده ازپرایمرهای اختصاصی ChuA وyjaA و TspE4.C2 و آزمون PCR انجام شد.

یافته ها: از ۶۰ باکتری اشریشیاکلی شناسایی شده، ۴۷ مورد (۷۸/۳۴٪) مربوط به زنان و ۱۳ مورد (۲۱/۷۶٪) مربوط به مردان بود. شایع ترین گروه های فیلوژنتیک شناسایی شده D، A و B1 به ترتیب با فراوانی ۷۰٪، ۲۳/۳٪ و ۶/۷ ٪ بودند. اما درهیچ‌کدام از نمونه‌های مورد بررسی گروه B2 شناسایی نشد.همچنین بین گروه فیلوژنتیکی و متغیرهای سن، جنس، سابقه عفونت ادراری، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و سابقه بستری شدن در بیمارستان ارتباط معناداری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری در این منطقه، بیشتر متعلق به گروه فیلوژنتیک D بودند که در مقایسه با سایر مناطق از نظر نوع گروه فیلوژنتیکی متفاوت می‌باشند.

واژگان کلیدی: گروه فیلوژنتیک، اشریشیاکلی، عفونت دستگاه ادراری، PCR

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، آزمایشگاه بیمارستان پیمانیه
تلفن ۰۷۹۱۲۲۳۰۹۶۳
پست الکترونیکی: asadi_63s@yahoo.com

مقدمه

اشریشیاکلی، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که در سال ۱۸۸۶کشف گردید. این باکتری انتشار وسیع داشته و در سراسر دنیا در روده انسان و حیوانات خونگرم و خونسرد یافت می‌شود. این باکتری مدت‌ها جزء باکتری‌های همزیست و غیر بیماری‌زا بود. اما امروزه نقش آن به عنوان عامل فرصت‌طلب و عامل مولد عفونت مورد قبول همگان قرار گرفته است. اکثریت سویه‌های اشریشیاکلی در روده کومنسال هستند و بخشی از فلور طبیعی محسوب می‌شوند. اما بعضی از سویه‌های آن بیماریزا می‌باشند و موجب ایجاد بیماری‌های روده ای و خارج روده‌ای می‌شوند (۱ و ۲). سویه‌های اشریشیاکلی به ۴ گروه فیلوژنتیک A، B1، B2، D تقسیم می‌شوند. اغلب گروه‌های A، B1 کومنسال می‌باشند و گروه B2 و به میزان کمتری D شامل سویه‌های بیماریزای خارج روده‌ای هستند (۴-۲). باکتری اشریشیاکلی از نظر آسیب شناسی نیز طبقه‌بندی می‌شود و هر گروه آن را یک پاتوتایپ می‌نامند. در این تقسیم‌بندی پاتوتایپ‌های عامل عفونت‌های خارج روده ای، بیماری‌هایی مانند عفونت ادراری، مننژیت نوزادی و عفونت خون ایجاد می‌کنند و پاتوتایپ‌های مربوط به عفونت‌های روده‌ای باعث بیماری‌هایی مثل اسهال شدید در بالغین و کودکان می‌شوند (۴). در این میان عفونت دستگاه ادراری تهدید جدی برای سلامت محسوب می‌شود که سالانه میلیون‌ها نفر را درگیر می‌کند. این بیماری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است که در بیماران سرپایی و بیماران بستری دربیمارستان ایجاد می‌شود. براساس آمارهای جهانی، سالانه ۲۹-۱۷ میلیارد دلارهزینه صرف درمان عفونت‌های بیمارستانی می‌شود که ۳۹٪ مربوط به عفونت های ادراری است (۵). در ایران باکتری اشریشیا کلی مسئول ۸۰٪ از عفونت‌های ادراری در بیماران سرپایی و ۵۰٪ عفونت‌های ادراری در بیماران بستری در بیمارستان است. مطالعه حاضر با هدف تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی باکتری اشریشیا کلی در بیماران با عفونت ادراری و ارتباط آن با متغییرهایی مانند سن، جنس، سابقه عفونت ادراری، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و سابقه بستری شدن در بیمارستان در ۲۸ روز گذشته انجام شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه واستخراج *DNA*: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی سویه‌های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان پیمانیه جهرم در یک دوره سه ماهه از خرداد سال ۸۹ تا مرداد ۸۹ انجام شد. از نمونه ادرار بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه، پس از کشت بر روی محیط های Blood Agar و EMB و انجام تست‌های بیوشیمیایی TSI، سیترات، اندول، حرکت و اوره آز، سویه‌های اشریشیا کلی جمع‌آوری شد. هم‌زمان با نمونه‌گیری، پس از دریافت رضایت نامه کتبی اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه عفونت قبلی، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و سابقه بستری در بیمارستان (طی ۲۸روز گذشته) درپرسش نامه تنظیمی ثبت گردید. برای استخراج DNA از کیت DNP TM (سیناژن، ایران) استفاده شد. برای تشخیص نمونه های استخراج DNA شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و برای تعیین غلظت و نسبت A260/A280 از دستگاه بیوفتومتر(Ependorf) آلمان استفاده شد.

گروه بندی فیلوژنتیک: برای گروه بندی فیلوژنتیک سویه های اشریشیاکلی به چهار گروه A، B1، B2 و D از روش پیشنهادی کلرمونت (Clermont) و همکاران در سال ۲۰۰۰(نمودار۱) استفاده شد (۱).

واکنش سه‌تایی زنجیره‌ای پلیمراز (Triplex PCR) برای تعیین گروه‌بندی فیلوژنتیک جدایه‌ها با هدف قرار دادن دو ژن، chuA و yjaA و قطعه DNA ناشناس، TSPE4.C2 انجام شد. ژن chuA:یک ژن ضروری برای انتقال هم در سویه‌های اشریشیا کلی انتروهموراژیک O157:H7 است. ژن YjaA: در توالی ژنومی کامل اشریشیاکلی *K12* وجود دارد، اما عملکرد آن ناشناخته است. ژن TspE4.C2: یک قطعه DNA ناشناس از کتابخانه ژنی اشریشیاکلی است (۱). با استفاده از کیت PCR Premix (سیناژن) شامل ۵ میکرومولار DNA، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومولار از هر dNTP، ۱ میکرو مولار از هر پرایمر (جدول ۱) و ۱U آنزیم پلی‌مراز *Taq* انجام شد. شرایط دمایی ترموسایکلر عبارت بودند از: واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و سایز محصولات PCR.

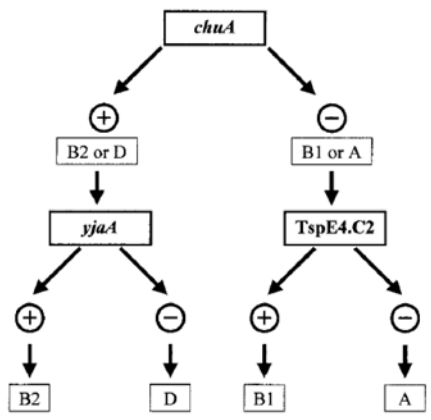
هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر '3→'5	اندازه bp
ChuA	ChuA-F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	۲۷۹
	ChuA-R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
YjaA	YjaA-F	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	۲۱۱
	YjaA-R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4.C2	TspE4.C2-F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	۱۵۲
	TspE4.C2-R	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال بسته به دمای ذوب پرایمر (جدول شماره ۱) و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه وسپس گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه .

آنالیز آماری: ارزیابی آماری داده ها با استفاده از نسخه ۱۵ نرم‌افزار SPSS وارتباط بین متغییرها به کمک روش ضریب همبستگی فی و کرامر انجام شد. مرزمعنی داری در $p<0/05$ قرار داده شد.

نتایج

در این پژوهش با استفاده از تست‌های اختصاصی بیوشیمیایی از نمونه‌های تهیه شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری ۶۰ باکتری اشریشیا کلی شناسایی شد. از لحاظ جنسیت فراوانی عفونت در زن‌ها (۷۸/۳۳٪) بیشتر از مردان (۲۱/۶۶٪) بود. شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنیک شناسایی شده مربوط به گروه D (۴۲ مورد) با فراوانی ۷۰%، گروه A (۱۸ مورد) با فراوانی ۲۳/۳ %و گروه B1 (۴ مورد) با فراوانی ۶/۷٪ بود (شکل ۱). اما هیچ کدام از سویه‌ها متعلق به گروه B2 نبودند. در این تحقیق بین گروه‌های فیلوژنتیک باکتری اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری با متغیرهایی مانند سن (p=۰/۳۲)، جنس (p=۰/۵۴)، سابقه عفونت ادراری (p=۰/۲۳)، سابقه مصرف آنتی بیوتیک (p=۰/۲۳)، بستری شدن در ۲۸ روز گذشته در بیمارستان (p=۰/۳۷) ارتباط معنی‌داری یافت نشد (جدول ۲).

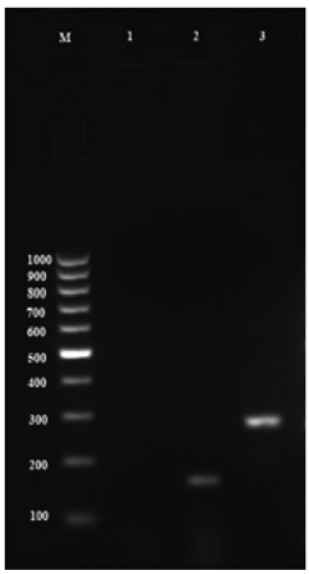


نمودار۱: نمای شماتیک تعیین گروه های فیلوژنتیک.

بحث

در هر سال به علت عفونت خارج روده‌ای توسط اشریشیا کلی میلیون‌ها نفر از نظر بهداشتی و اقتصادی زیان می‌بینند (۶). با جستجوی منابع اطلاعاتی مشخص شد که هیچ مطالعه و اطلاعات قبلی در مورد شیوع گروه‌های فیلوژنیک در جنوب ایران وجود ندارد. نتایج ما در این پژوهش نشان دادکه متداول ترین گروه فیلوژنیک شناسایی شده گروه D می‌باشد ودر هیچکدام از جدایه‌های مورد بررسی گروه B2 شناسایی نشد. در حالی که فراوان‌ترین سویه در پژوهش کانامارو (Kanamaru) و همکاران در سال ۲۰۰۶، سویه‌های گروه فیلوژنتیک B2 بودند (۷). در مطالعه دیگر هانکوک (Hancock) و همکاران در سال ۲۰۰۹ مقایسه‌ای از الگوهای گروه‌های فیلوژنتیک در سویه‌های اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری در انسان وخوک انجام دادند. طرح

کلونال سویه ها تفاوت های عمیقی داشتند. سویه‌های انسانی به طور برجسته متعلق به کلونال‌هایی از نوع B2 و D و سویه‌های خوکی از نوع A و B1 بودند(۸). جانسون (Johnson) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ایالت متحده آمریکا نشان دادند که شیوع گروه فیلوژنتیک B2 بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد(۹). اما گنگش (Ghenghesh) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در لیبی با ارزیابی ارتباط سویه‌های اشریشیا کلی بیماری‌زا در بیماران دیابت نوع شیرین با عفونت ادراری نشان دادند که بیشتر جدایه ها متعلق به گروه A می‌باشند. اما سویه‌های بیماریزا ادراری در افراد فاقد دیابت ملی توس بیشتر متعلق به گروه B2 بودند(۱۰). در تحقیقی که توسط زائو (Zhao) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی گروه‌های فیلوژنتیک جدایه‌های اشریشیا کلی بیماریزا در ادرار نشان دادند که گروه‌های D و B2 فراوان‌ترین گروه‌های فیلوژنتیک می‌باشند (۱۱). در تحقیقی که توسط ساوما ـ آئود (Sawma-Aouad) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی سویه اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری انجام شد، سویه‌های مورد آزمایش اغلب گروه B2 و هیچ یک از ایزوله‌ها متعلق به گروه B1 نبودند (۱۲). در حالی که مطالعات هو (Ho) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در هنگ کنگ نشان داد که اغلب نمونه‌های ادراری متعلق به گروه‌های B2 و D هستند (۱۳).



شکل ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR. از چپ به راست: M سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱) نتیجه منفی تکثیر ژن yjaA، ۲) قطعه ۱۵۲ جفت بازی حاصل از تکثیر قطعه TspE4.C2، ۳) قطعه ۲۷۹ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن .chuA.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری، بیشتر متعلق به گروه‌های بیماریزای این باکتری هستند و بر این اساس، تعیین گروه‌های فیلوژنتیک برای این باکتری در سایر مناطق نیز حائز اهمیت است.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین و پرسنل آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جهرم به دلیل همکاری صمیمانه علمی کمال امتنان را دارند.

References

1. Clermont O, Bonacors S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Esherichia coli* phylogenetic Group. Appl Environ Microbiol, 2000; 66(10): 4555-4558.
2. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distribution among gegraphically distinct human populatious. J Microbiology, 2001; 147(6):1671-1676.
3. Jonhson JR, Stell AL. Extended Virulence of genotyping of *Escherichia coli* strains from Patients with urosepsis in relation to phylogeny and host Compromise. J Infect Dis, 2000; 18(1): 261-72
4. Orsi RH, Stoppe NC, Sato MIZ, Prado PI, Ottoboni LMM. Phylogentic group distribution among *Escherichia Coli* isolated from rivers in saopaul state, Brazil.World J Microbiol Biotechnol. 2008; 24(8): 1573-1577.
5. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med. 2002; 113(1A) :5-13.
6. Saeed MA, Haque A, Ali A, Mohsin M, Bashir S, Tariq A, Afzal A, Iftikhar T, Sarwar Y. Relationship of drug resistance to phylogenetic groups of *E. coli* isolates from wound infections. J Infect Dev Ctries 2009; 3(9): 667-670.
7. Kanamaru S, Kurazono H, Nakano M, Terai A, Ogawa O, Yamamoto S. Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. Int J Urol, 2006; 13(6): 754-760.
8. Hancock V, Nielsen EM, Krag L, Engberg J, Klemm P. Comparative analysis of antibiotic resistance and phylogenetic group patterns in human and porcine urinary tract infectious *Escherichia coli*. APMIS. 2009; 117(11): 786-790.
9. Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol. 2005; 43(12):604-672.
10. Ghenghesh KS, Elkateb E, Berbash N, Abdel Nada R, Ahmed SF, Rahouma A, Seif-Enasser N, Elkhabroun MA, Belresh T, Klena JD. Uropathogens from diabetic patients in Libya: virulence factors and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates. J Med Microbiol, 2009;58(8):1006-1014.
11. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). Urology. 2009: 74(3):702-707.
12. Sawma-Aouad G, Hashwa F, Tokajian S. Antimicrobial resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic Escherichia coli in Lebanon. J Chemother. 2009; 21(2):153-158.
13. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009; 49(5):627-634.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 4, Janury 2011

Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection in Jahrom city, southern Iran

Sara Asadi[1], Kavous Solhjoo[2], Mohammad Kargar[3], Abbas Ali Rezaeian[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant professor, Department of Microbiology, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[4]Lecturer, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Abstract

Background and Objective: Escherichia coli is a causative agent of over 80% of urinary tract infections in all ages of the society. Strains of *Escherichia coli* are divided into four phylogenetic groups. Most of pathogenic extra-intestinal strains often belong to groups D and B2. This study aimed to define the phylogenetic groups of *E. coli* isolated from urinary tract infections in south of Iran.

Material and Methods: This cross- sectional study was carried out on the patients with urinary tract infection who admitted to peymanieh hospital of Jahrom in 2010. Specific biochemical tests were used for identification of bacteria. The phylogenetic groups of *E. coli* strains were determined by the PCR method and using two specific primers yjaA ChuA and TspE4.C2.

Results: Out of 60 identified *E. coli*, 78.34% were isolated from women while just 21.76% were isolated in men. The most common identified groups were classified as D (70%), A (23.3%) and B1 (6.7%), and none of the species belonged to the B2 group. Data analysis revealed no significant relationship between phylogentic groups with the variables age, sex, history of urinary tract infection, previous history of antibiotic use and hospitalization.

Conclusion: The results showed that most of the *E. coli* strains isolated from urinary tract infections in this region belonged to phylogenetic group D. Also, the results obtained from this region was different from other area.

Keywords: Phylogenetic groups, *E. coli*, urinary tract infections, PCR.

Correspondence to: Sara Asadi
Email: asadi_63s@yahoo.com
Tel: +987912230963
Journal of Microbial World 2011 3(4): 240-245