



تعیین گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های اشریشیا کلی عامل عفونت دستگاه ادراری در جنوب ایران

سارا اسعدی^{۱*}، کاووس صلح جو^۲، محمد کارگر^۳، عباسعلی رضائیان^۴

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

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیا کلی عامل بیش از ۸۰٪ از عفونت‌های ادراری در تمام گروه‌های سنی جامعه است. سویه‌های اشریشیا کلی به چهار گروه فیلوژنتیک تقسیم می‌شوند. اغلب جدایه‌های های بیماری‌زای خارج روده‌ای متعلق به گروه B2 و D هستند. هدف از این پژوهش، تعیین گروه‌های فیلوژنتیک اشریشیا کلی جدا شده از بیماران با عفونت ادراری در جنوب ایران بود. مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی اشریشیا کلی جدا شده از کشت ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان پیمانیه جهرم در سال ۱۳۸۹ انجام شد. از آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت باکتری‌های جدا شده استفاده شد. سپس طبقه‌بندی گروه‌های فیلوژنتیک سویه‌های اشریشیا کلی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ChuA* و *yjaA* و *TspE4.C2* و آزمون PCR انجام شد.

یافته‌ها: از ۶۰ باکتری اشریشیا کلی شناسایی شده، ۴۷ مورد (۷۸/۳۴٪) مربوط به زنان و ۱۳ مورد (۲۱/۷۶٪) مربوط به مردان بود. شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنتیک شناسایی شده D، A و B1 به ترتیب با فراوانی ۷۰٪، ۲۳/۳٪ و ۶/۷٪ بودند. اما در هیچ کدام 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. نتیجه‌گیری: اشریشیا کلی 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، اشریشیا کلی، عفونت دستگاه ادراری، PCR

مقدمه

اشریشیاکلی، یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که در سال ۱۸۸۶ کشف 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، B2، D کمتری می‌باشند و به میزان کمتری D شامل سویه‌های بیماری‌زای خارج روده‌ای هستند (۳-۴). 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 در بیمارستان ایجاد می‌شود. براساس آمارهای جهانی، سالانه ۲۹- ۱۷ میلیارد دلار هزینه صرف درمان عفونت‌های بیمارستانی می‌شود که ۳۹٪ مربوط به عفونت‌های ادراری است (۵). در ایران باکتری اشریشیاکلی 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 اشریشیاکلی در بیماران با عفونت ادراری و ارتباط آن با متغیرهایی مانند سن، جنس، سابقه عفونت ادراری، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک 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 مراجعه کننده 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 اشریشیاکلی جمع‌آوری شد. هم‌زمان با نمونه‌گیری، پس از دریافت رضایت نامه کتبی اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه عفونت قبلی، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و سابقه بستری در بیمارستان (طی ۲۸ روز گذشته) در پرسش 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 کلمونت (Clermont) و همکاران در سال ۲۰۰۰ (نمودار ۱) استفاده شد (۱).

واکنش سه تایی زنجیره‌ای پلیمرز (Triplex PCR) برای تعیین گروه بندی 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 اشریشیاکلی انتروهموژنیک 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 میکرومولار 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.

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

زن‌ها (۷۸/۳۳٪) بیشتر از مردان (۲۱/۶۶٪) بود. شایع‌ترین گروه‌های فیلوژنتیک 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 اشریشیاکلی 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).

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 و سپس گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

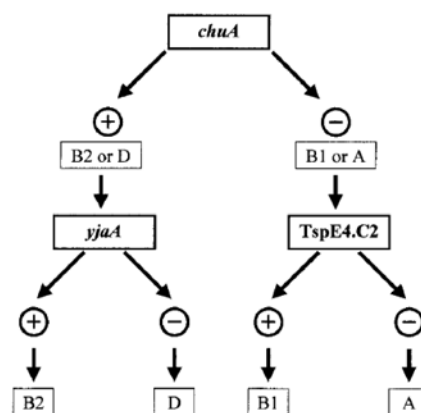
آنالیز آماری: ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از نسخه ۱۵ نرم‌افزار SPSS و ارتباط بین متغیرها به کمک روش ضریب همبستگی فی و کرامر انجام شد. مرز معنی‌داری در $p < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

نتایج

در این پژوهش با استفاده از تست‌های اختصاصی بیوشیمیایی از نمونه‌های تهیه شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری ۶۰ باکتری اشریشیاکلی شناسایی شد. از لحاظ جنسیت فراوانی عفونت در

بحث

در هر سال به علت عفونت خارج روده‌ای توسط اشریشیاکلی 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 فیلوژنتیک در جنوب ایران وجود ندارد. نتایج ما در این پژوهش نشان داد که متداول‌ترین گروه فیلوژنتیک شناسایی شده گروه D می‌باشد و در 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 اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری در انسان و خوک انجام دادند. طرح



نمودار ۱: نمای شماتیک تعیین گروه‌های فیلوژنتیک.

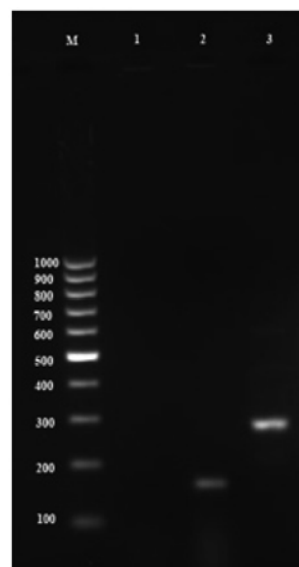
نتیجه‌گیری

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 قدردانی

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

کلونال سویه‌ها تفاوت‌های 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 جدایه‌ها 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-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 هیچ‌یک 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*.

References

1. Clermont O, Bonacors S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia 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 distributed among geographically distinct human populations. *J Microbiology*, 2001; 147(6):1671-1676.
3. Johnson 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. Phylogenetic 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, Elkhatabroun 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.



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

Sara Asadi¹, Kavous Solhjoo², Mohammad Kargar³, Abbas Ali Rezaeian⁴

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Assistant professor, Department of Microbiology, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

³Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

⁴Lecturer, 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 phylogenetic 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.