



Scan online to view this article

## Identification of 3 Virulence Factors *kpsMTII, iucD, usp* in Urinary Tract Infection *E. coli* by Multiplex-PCR

Elham Siasi \*, Atefeh Rezaei, Jamileh Nowroozi

Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

**Aim and Background:** *E. coli* is a normal flora in the human and animal intestinal tract. This bacteria is one of the main cause of the urinary tract infection. The aim of this study was identification and simultaneously presence of 3 virulence factors, *kpsMTII, iucD, usp* in the genome of urinary tract infection *E. coli* strains.

**Materials and Methods:** 60 samples of *E. coli*, which caused urinary tract infection, were collected. These bacteria were isolated by biochemical tests and gram staining. Then bacteria genome was extracted by gram-negative bacteria DNA extraction kits. Multiplex-PCR was used for identifying of 3 virulence factors.

**Results:** In these 60 samples of isolated *E. coli*, the prevalence of virulence genes is as follows: *kpsMTII* 71.66%, *iucD* 88.33%, and *usp* 36.66%. As also, simultaneously presence of 3 virulence factors were observed in 28.33% of samples. There was significant association between prevalence of these three genes and urinary tract infection in studied *E. coli* isolates (*Pvalue*<0.05).

**Conclusion:** According to this study results, that was similar to previous researches, could be significant related between prevalence of these three genes in studied urinary tract infection *E. coli* samples.

**Key words:** *E. coli*, Urinary tract infection, Virulence genes, Multiplex PCR.

**Corresponding author:**

Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran,  
Email: emi\_biotech2006@yahoo.ca



برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## شناسایی همزمان ۳ فاکتور ویرولانس *kpsMTII* و *iucD* و *usp* در اشريشياكلی ايجاد كننده عفونت دستگاه ادراري با روش Multiplex-PCR

الهام سياسي \*، عاطفة رضائي، جميله نوروزي

گروه ميكروبیولوژي، دانشكده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** باكتري اشريشياكلی (*E. coli*) فلور طبیعی در روده طبیعی انسان و حیوانات است. این باكتري یکی از عوامل اصلی عفونت ادراری است. هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی حضور همزمان ۳ فاکتور بیماری‌زای *kpsMTII* و *iucD* و *usp* در ژنوم سویه‌های باكتري اشريشياكلی ايجاد كننده عفونت ادراري بود.

**مواد و روش‌ها:** ۶۰ نمونه باكتري اشريشياكلی ايجاد كننده عفونت ادراري جمع‌آوری گردید. باكتري‌های مورد نظر با تست‌های بيوشيمايي و رنگ‌آميزي گرم شناسايي شدند. ژنوم باكتري از طريق كيتهای جداسازی DNA باكتري گرم منفي جداسازی شد. سپس برای حضور همزمان ۳ عامل بیماری‌زایی مورد نظر از روش Multiplex-PCR استفاده شد.

**يافته‌ها:** در اين ۶۰ نمونه باكتري اشريشياكلی جداسازی شده، حضور ژن‌های بیماری‌زا، *iucD* ۷۱/۶۶ *kpsMTII* درصد، *usp* ۳۶/۶۶ درصد بود و همچنان حضور همزمان ۳ فاکتور در ۲۸/۳۳ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. بين فراوانی حضور اين سه ژن با ايجاد عفونت ادراري در نمونه‌های اشريشياكلی مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این تحقیق، مشابه با مطالعه‌های پیشین، بين حضور این سه ژن بیماری‌زا در نمونه‌های مورد مطالعه از باكتري اشريشياكلی ايجاد كننده عفونت ادراري می‌تواند ارتباط معنی‌دار وجود داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** اشريشياكلی، عفونت ادراري، ژن‌های بیماری‌زا، Multiplex PCR

طبیعی و هم‌زیست در دستگاه گوارش انسان و حیوانات زندگی می‌کند (۱). انواع گونه‌های مختلف این باكتري موجب بروز بیماری در انسان و حیوانات از طريق ايجاد عفونت یا ترشح سموم می‌شوند. کودکان، افراد مسن و افرادی که به بیماری‌های مزمن مبتلا هستند، نسبت به عفونت ناشی از این باكتري حساس‌تر بوده و علائم عفونت با شدت بيشتری در آن‌ها بروز می‌کند (۲). گاهی باكتري اشريشياكلی از دستگاه گوارش انسان، تغیير مکان می‌دهد و به دستگاه ادراري و مجاری ادراري وارد می‌شود، باعث ايجاد عفونت ادراري می‌شود (۳). عفونت دستگاه ادراري يك عفونت باكتريایي است

### مقدمه

باكتري اشريشياكلی (*E. coli*), نوعی باسيل گرم منفي از خانواده انترباكتریاسه است. باكتري اشريشياكلی بهصورت

### نويسنده مسئول:

گروه ميكروبیولوژي، دانشكده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

emi.biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰

تاریخ پذيرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۰

دارد. گاهی اوقات عفونت ادراری همراه با پروتئینوری است. عامل *usp* عامل ایجاد پروتئینوری است (۱۲، ۱۳). باکتری اشريشياکلی که عامل عفونت مجاری ادراری و بخش عمدہای از عفونت ادراری بیمارستانی محسوب می‌شود به این ۳ عامل بیماری زایی نیاز دارد. بنابراین این مطالعه به شناسایی و حضور هم‌زمان این ۳ عامل بیماری زایی در نمونه‌های اشريشياکلی ایجاد کننده عفونت ادراری، که می‌تواند در شدت و گسترش این بیماری مؤثر باشد، پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه -** نمونه‌گیری و جمع‌آوری نمونه‌های ادراری، از شهر تهران طی ۵ ماه در تابستان و پائیز ۱۳۹۷ از دو آزمایشگاه تشخیص طبی ایرانا و اکسیر انجام شد. نمونه‌ها از افراد دارای عفونت ادراری که به تشخیص پزشک و مسئول ازمايشگاه دارای علائم عفونت ادراری بودند تهیه شد و پس از شناسایی باکتری ایجاد کننده عفونت ادراری در نمونه‌های مورد بررسی، ۶۰ نمونه که با باکتری اشريشياکلی آلوده بودند، جداسازی شدند.

**جداسازی و شناسایی ایزوله‌های اشريشياکلی از نمونه‌های ادرار -** جهت تأیید آلوده بودن نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری به اشريشياکلی نمونه‌های ادرار بر روی محیط کشت بلاد آگار (Blood Agar) (شرکت مرک المان) و اوزین متیلن‌بلو (Eosin Methylene Blue Agar) EMB (شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از کشت ادرار، رنگ‌آمیزی گرم برای تفکیک باکتری‌های گرم منفی از باکتری‌های گرم مثبت و جداسازی نمونه باکتری گرم منفی موردنظر استفاده شد. سپس برای شناسایی باکتری اشريشياکلی از سایر باکتری‌های گرم منفی کشت در محیط‌های کشت افتراقی (شرکت مرک آلمان) شامل: اندول، مک‌کانکی، اوزین متیلن‌بلو، سیمون سیترات، اوره از، SIM، MR-VP، TSI، تخمیر قند، اسکولین براث و تست ی اکسیداز و کاتالاز استفاده شد. محیط‌های کشت برای ایجاد کلنسی باکتری‌ها به مدت ۲۴

که دستگاه ادراری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باکتری اشريشياکلی مهم‌ترین عامل عفونت ادراری است (۴). عفونت ادراری در میان خانم‌ها به دلیل آناتومی خاص دستگاه ادراری، بسیار شایع‌تر از آفایان است و عود عفونت بسیار معمول است. شدت عفونت بستگی به باکتری عامل عفونت (مرتبه با فاکتورهای بیماری زایی آن) و حساسیت میزان دارد (۵، ۶). سویه‌های باکتری اشريشياکلی انواع مختلفی از عوامل بیماری-زایی از جمله سیستم چسبندگی (چسبندگی توکسین‌ها، سیستم‌های اکتساب آهن، آلفا همولیزین، فاکتور نکروزدهنده سایتو توکسیک را دارا هستند. این عوامل می‌توانند به ترویج ویرونانس و بیماری زایی باکتری اشريشياکلی کمک کنند. از سیستم چسبندگی یا همان ادھسین‌ها می‌توان به فیمبریه تیپ ۱ اشاره کرد. از سیستم‌های اکتساب آهن سیدروفورها هستند. سیدروفورها به دو گروه، انترباکتین و آتروباکتین تقسیم می‌شوند. هم‌چنین به تولید توکسین‌هایی مانند آلفا همولیزین و سایتو توکسیک نکروزدهنده می‌توان اشاره کرد (۹-۷). کپسول باکتری اشريشياکلی در بیماری زایی باکتری نفس دارد. کپسول باکتری باعث چسبیدن باکتری و اتصال باکتری به بافت سلول میزان می‌شود (۱۰). فاکتور *kpsMTII* کپسول باکتری است، که مقاومت باکتری را در برابر آنتی-بیوتیک‌ها زیاد می‌کند (۱۱). کپسول باعث چسبیدن باکتری و اتصال باکتری به سلول میزان می‌شود و هم‌چنین باعث مقاومت باکتری در برابر استرس‌ها محیطی می‌شود. پس این عامل در ایجاد عفونت و کلونیزاسیون باکتری نقش دارد (۱۲). از دیگر خصوصیت‌های باکتری اشريشياکلی برای ایجاد عفونت ادراری سیستم اکتساب آهن است که باکتری با کمک سیدروفورها آهن را جذب می‌کند (۱۳). فاکتور *iucD* سیدروفور یا آهن بر است که از دسته آتروباکتین‌ها است. آهن را از محیط‌های فقیر مانند مجاری ادراری جذب می‌کند و در اختیار باکتری قرار می‌دهد. این مکانیسم نوعی مکانیسم دفاعی برای باکتری محسوب می‌شود. عامل *iucD* در گروه B2 از گروه‌های زن‌های بیماری زایی قرار دارد. این عامل در کلونیزاسیون باکتری نقش دارد (۱۲، ۱۳). عامل *usp* همان زن کد کننده Uropathogenic Specific Protein است. یک نوع پروتئین اختصاصی بیماری زایی باکتری اشريشياکلی است. عامل *usp* در شدت بیماری زایی و عفونت باکتری نقش

(*usp* و *iucD kpsMTII*) به طور همزمان استفاده شد. زیرا در PCR چندتایی چندین جفت پرایمروها (تهیه شده از شرکت تکاپوزیست) و مواد (تهیه شده از شرکت ویرا ژن) و برنامه مورد نیاز برای دستگاه PCR که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند به ترتیب در جداول ۱ و ۳ اورده شده‌اند. پس از انجام واکنش PCR برای بررسی تشکیل باندهای مربوط به این ۳ عامل بیماری‌زا *iucD kpsMTII* و *usp* محصول‌های PCR بر روی ژل اکاروز الکتروفورز شدند و از نمونه فاقد DNA (دارای آب مقطر) به عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت از سویه استاندارد *E. coli ATC25923* در کنار چاهک‌های نمونه‌های مورد آزمون استفاده شد. سپس رنگ-امیزی با رنگ انتیدیوم برامید و عکس‌برداری با دستگاه ژل‌دک انجام گرفت.

**آنالیز آماری**- برای تجزیه تحلیل درصد حضور ۳ فاکتور بیمارزا در ۶۰ نمونه باکتری جداسازی شده آنالیز آماری با نرمافزار SPSS ورژن ۲۴ (تست کای اسکوئر) انجام شد و میزان  $<0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس نتایج بررسی شد.

### شناسایی ژن‌های ویرولانس *iucD kpsMTII* و *usp* در ایزوله‌های اشريشياکلي با استفاده از تکnik Multiplex PCR

استخراج DNA باکتری - استخراج ژنوم نمونه‌های باکتری اشريشياکلي با استفاده از کيت‌های استخراج DNA باکتری CinnaPur-DNA CAT گرم منفي (شرکت سينا کلون با نام NO: PR881612) انجام شد. کيفيت و كميت DNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی آگارز و استفاده از دستگاه نانودرآپ کنترل گردید. به اين ترتيب که ۳ ميكروليلتر از DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. همچنان بهمنظور آگاهي از غلظت DNA و درجه خلوص آن، ۱ ميكروليلتر از DNA استخراج شده در دستگاه نانودرآپ قرار داده شد و نسبت جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ خوانده شد.

واکنش Multiplex PCR - پس از استخراج DNA از نمونه‌های باکتری‌های شناسایی شده برای بررسی حضور همزمان ژن‌های *usp* و *iucD kpsMTII* از روش PCR استفاده شد. در این تکنيک از ۳ جفت پرایم اختصاصي در يك محلول PCR برای تکثير ۳ توالي هدف (۳ ژن

جدول ۱- پرایمروهاي مورد استفاده در اين پژوهش

نام ژن	توالی پرایم ۵'-۳'	طول محصول	رفرنس مورد استفاده
<i>iucD</i>	F- TACCGGATTGTATGCAGACCGT R-AATATCTCCTCCAGTCGGAGAAG	۶۰۲ bp	۱۲
<i>usP</i>	F- ATGCTACTGTTCCGGTAGTGTGT R- CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT	۱۰۰۰ bp	۱۲
<i>kpsMTII</i>	F- GCGCATTGCTGATACTGTTG R- CATCAGACGATAAGCATGAGCA	۲۷۲ bp	۱۲

جدول ۲- مقدار مورد استفاده جهت واکنش Multiplex-PCR در حجم نهایی ۲۰ μl

مواد برای واکنش PCR	مقدار بر حسب میکرولیتر (μl)
Master mix 2X	۵
DNA نمونه (۱۰۰ نانوگرم)	۴
پرایمر چپ (۱۰ پیکومول)	۳
پرایمر راست (۱۰ پیکومول)	۳
اب مقطر	۵
مواد موجود در Master mix	مقدار بر حسب میکرولیتر (μl)
Taq polymerase	۰/۵
(۲۰۰ μM) dNTP	۱
بافر	۲/۵
(۱ mM) MgCl <sub>2</sub>	۱

جدول ۳- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل واکنش Multiplex-PCR

شماره مرحله	نام مرحله	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱	واسرشت شدن اولیه	۹۵	۳ دقیقه
۲	واشرست شدن	۹۵	۳۰ ثانیه
۳	دمای اتصال	۵۵	۳۰ ثانیه
۴	طوبیل شدن	۷۲	۴۰ ثانیه
۵	طوبیل شدن انتهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

\* مراحل ۲ تا ۴ در ۳۵ سیکل تکرار شدند.

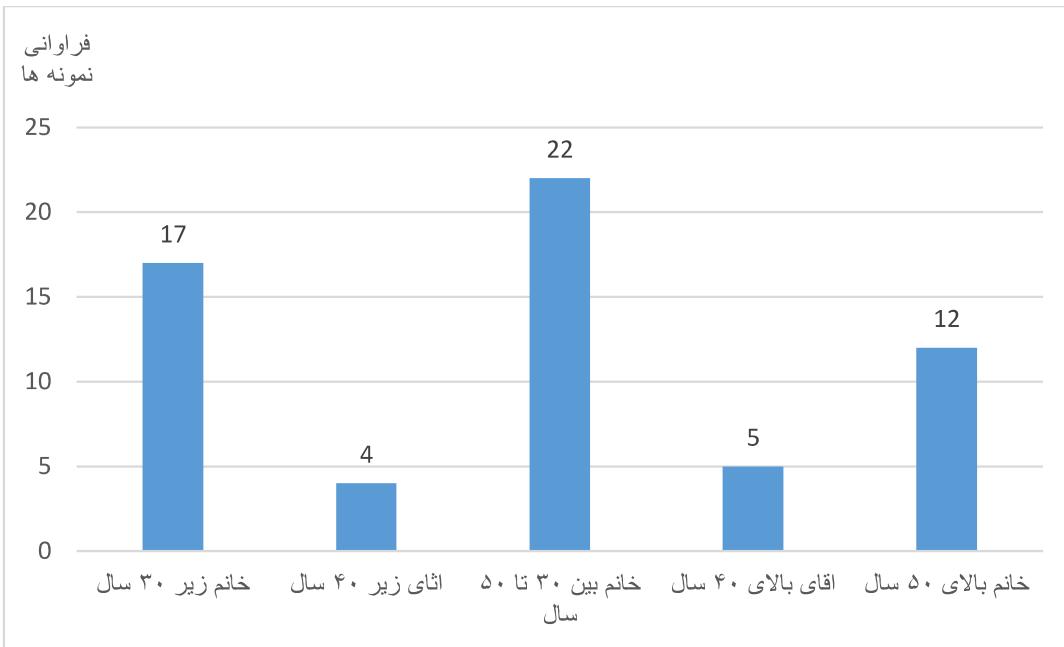
رنگ‌آمیزی گرم، کشت و تست‌های افتراقی حضور باکتری گرم منفی/اشریشیاکلی در ۶۰ نمونه از نمونه‌های عفونت ادراری تأیید شد.

نتایج مشاهده باندهای محصول‌های PCR بر روی ژل الکتروفورز- باندهای مربوط به حضور هر یک از ژن‌های *usp*, *iucD*, *kpsMTII* و *usp* به ترتیب با طول ۶۰۲ bp, ۲۷۲ bp و ۱۰۰ bp در کنار مارکر مولکولی با سایز ۱۰۰ bp و نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در شکل ۱ آورده شده است.

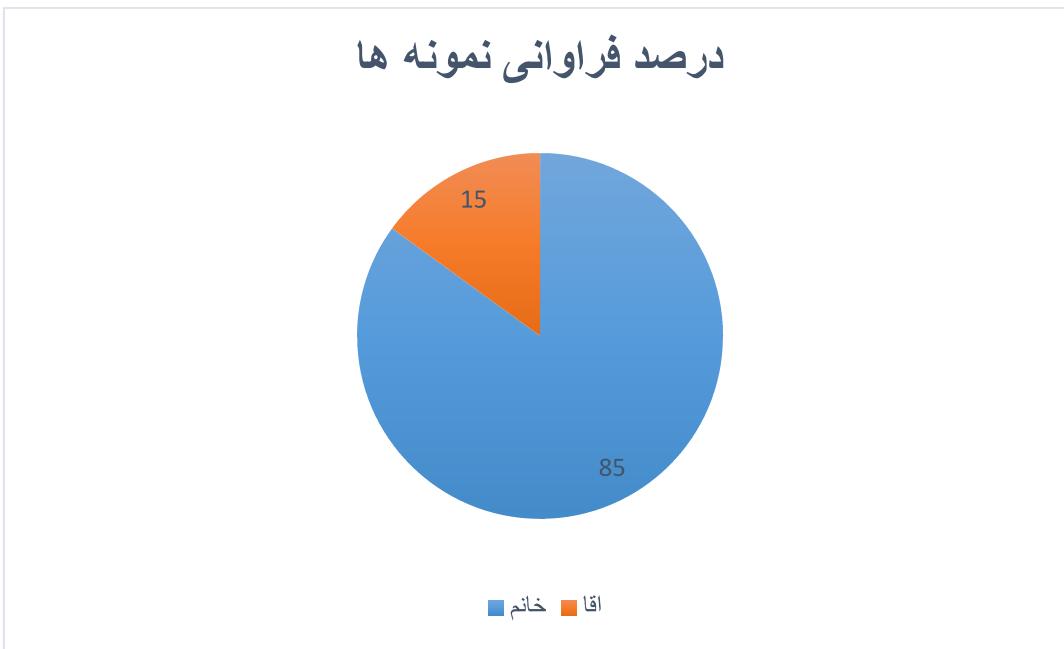
## یافته‌ها

بررسی توزیع فراوانی اشریشیاکلی در جمعیت مورد مطالعه - نمونه‌های جداسازی شده مربوط به ۴۰ مرد زیر ۳۰ سال، ۵ مرد بالای ۴۰ سال، ۱۷ زن زیر ۳۰ سال، ۲۲ زن ۳۰ تا ۵۰ ساله، ۱۲ زن بالای ۵۰ سال بود. در مجموع نمونه‌های شریشیاکلی از عفونت ادراری در ۹ مرد (۱۵٪) و ۵۱ زن (۸۵٪) شناسایی شد (نمودار ۱ و ۲).

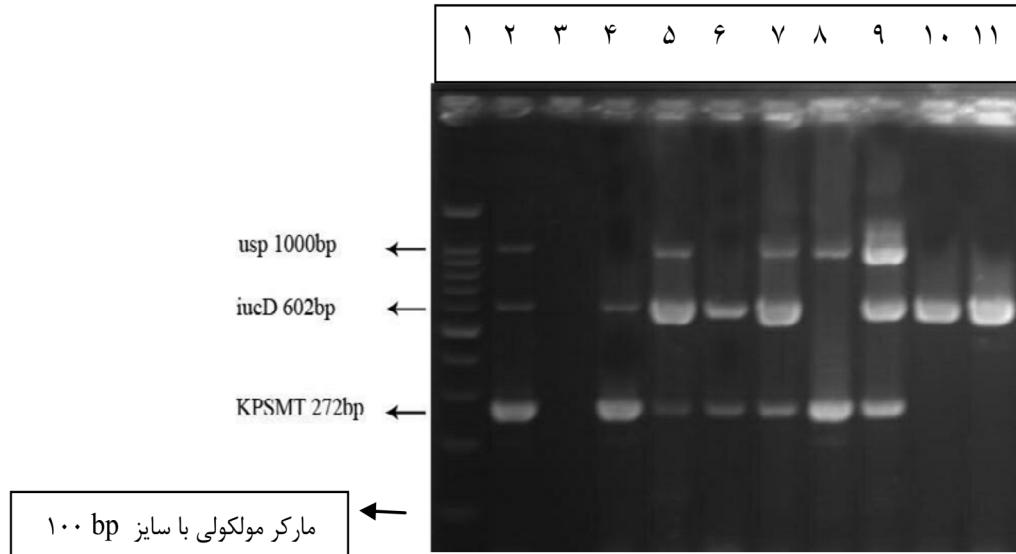
نتایج شناسایی ایزوله‌های اشریشیاکلی از نمونه‌های ادرار با کشت و تست‌های بیوشیمیایی - با نتایج حاصل از



نمودار ۱- تفکیک جنسی و سنی نمونه های مورد بررسی در این پژوهش



نمودار ۲- درصد نمونه های مورد بررسی بر اساس جنسیت



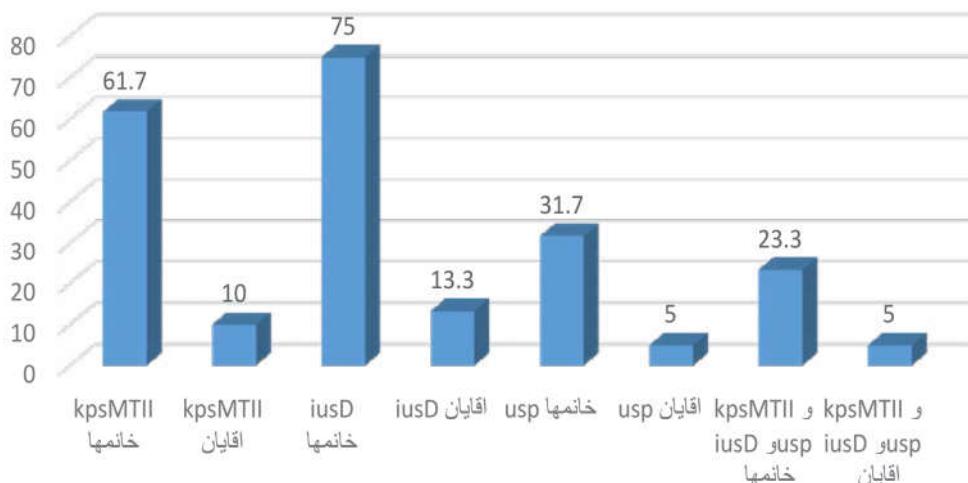
شکل ۱ - نتایج Multiplex PCR برای هر یک از ژن های *usp* و *iucD* و *KPSMTI*.

نه شماره ۱: مارکر مولکولی (۱۰۰ bp)؛ خانه شماره ۲: کنترل مثبت سویه استاندارد E. coli ATC25923؛ خانه شماره ۳: کنترل منفی آب مقطر؛ خانه های شماره ۴ و ۶: نمونه های دارای حضور ژن *iucD* (۶۰۲ bp)، خانه های شماره ۵ و ۷ و ۹: نمونه های دارای حضور ژن *usp* (۱۰۰۰ bp)، خانه های شماره ۲ و ۱۱: نمونه های دارای حضور ژن *KPSMTI* (۲۷۲ bp)، خانه شماره ۱۰: نمونه دارای حضور ژن *usp* (۱۰۰۰ bp)، خانه های شماره ۱۰ و ۱۱: نمونه های دارای حضور ژن *iucD* (۶۰۲ bp).

جدول ۴ - درصد فراوانی حضور هر یک از ۳ ژن و Pvalue ای ان در ۶۰ نمونه مورد مطالعه

نام ژن	حضور هر ژن	درصد فراوانی هر ژن	حضور هم زمان ۳ ژن	Pvalue بین فراوانی حضور ۳ ژن
<i>kpsMTII</i>	۴۳	۷۱,۷		
<i>iucD</i>	۵۳	۸۸,۳	۲۸/۳۳	P= 0.00
<i>usp</i>	۲۲	۳۶,۷		

درصد فراوانی حضور  
ژنها در خانم ها و اقلیان



نمودار ۳ - درصد فراوانی حضور ژن های *kpsMTII* و *iucD* و *usp* در نمونه های مورد مطالعه به تفکیک جنس افراد

و کلونیزاسیون و گسترش عفونت توسط این باکتری در ایجاد عفونت ادراری می‌تواند ارتباط وجود داشته باشد (۱۴، ۱۵، ۲۰، ۲۲). برای تأیید وجود این ارتباط با حضور ژن‌های بیماری‌زا در باکتری اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری، بررسی و مقایسه‌ایی بین نتایج مطالعه‌های پیشین و نتایج تحقیق حاضر، انجام گرفته است.

Bauer و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در مورد شناسایی و اپیدمیولوژی ۳ ژن بیماری‌زا *usp*, *iroN* و *aha* در باکتری اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری تحقیق کردند. نتایج آن‌ها نشان داد عامل *usp* پروتئین اختصاصی بیماری‌زا است و نقش مهمی در ایجاد عفونت ادراری دارد. عامل *aha* نوعی چسبنده و ادھسین است. عامل *iroN* سیستم اکتساب آهن در باکتری است که سبب جذب اهن از محیط و عفونت‌زایی باکتری می‌شود. آتروباکتین‌ها و سیدروفورها نیز آهن بر هستند. عامل *iroN* عامل به‌دست آوردن سیدروفور، انتروباکتین است و به عنوان گیرنده سیدروفور کاتکولات عمل می‌کند (۱۶). در این پژوهش نیز علاوه‌بر عامل *usp*، عوامل *kpsMTII* و *iucD* که ژن‌های پاتوژن بوده و در کلونیزاسیون و بیماری‌زایی باکتری می‌توانند نقش داشته باشند، به‌طور همزمان با روش Multiplex-PCR مورد شناسایی قرار گرفتند Kanamaru و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی عوامل ویرونلانس *kpsMT*، *ompT*, *iroN*, *aha*, *ompT*, در باکتری اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری با روش PCR تحقیق کردند. نتایج آن‌ها نشان داد *kpsMTII* نوعی کپسول باکتریایی است و سبب مقاومت باکتری می‌شود. هم‌چنین باعث کلونیزاسیون باکتری نیز می‌شود. *iroN* سیستم اکتساب آهن باکتری را کنترل نموده و باعث می‌شود باکتری آهن را از محیط جذب کند و عفونت‌زا گردد. *usp* پروتئین اختصاصی بیماری‌زایی است. *ompT* پروتئاز غشای خارجی است و نوعی آنزیم برای باکتری محسوب می‌شود. *Iha* نوعی چسبنده و ادھسین است و چسبنده دیگر، *fitmH* نیز وجود دارد. آن‌ها بیشترین فراوانی را برای ژن *ompT* و کمترین فراوانی را مربوط به ژن *iroN* گزارش نمودند. بنابراین تمامی این ژن‌ها می‌توانند در بیماری‌زایی باکتری مؤثر باشند (۱۷). در این تحقیق نیز حضور *usp* و *iucD* *kpsMTII* شامل

نتیجه تجزیه و تحلیل داده‌ها - درصد فراوانی ژن‌های *iucD* *kpsMTII* و *usp* و ارتباط حضور سه ژن در ۶۰ نمونه باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۴ و نمودار ۳ آورده شده است.

با توجه به جداول آنالیز آماری مربوطه، چنین نتیجه می‌شود که بین فراوانی حضور سه ژن *iucD* *kpsMTII* و *usp* در ۶۰ نمونه باکتری اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $Pvalue < 0.05$ ) بدست آمده است. به عبارتی دیگر بین درصد فراوانی حضور هر یک از این سه ژن در نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق تفاوت وجود داشته است و این سه ژن (در مقایسه با هم‌زمانی حضور هر سه ژن با هم) با فراوانی‌های متفاوت می‌توانند در باکتری اشريشیاکلی عامل عفونت ادراری وجود داشته باشند. هم‌چنین این سه ژن با توجه به فراوانی بیش‌تر نمونه‌ها از جنس مؤنث، در خانم‌ها با درصد بالاتری حضور داشتند که نتایج درصد فراوانی حضور آن‌ها به تفکیک جنسیت در نمودار ۳ نشان داده شده است.

## بحث

باکتری اشريشیاکلی که در بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت دستگاه ادراری به عنوان باکتری بیماری‌زا است با حضور ژن‌های پاتوژن مختلف که با توانایی بیماری‌زایی باکتری ارتباط دارد، همراه است (۱۴، ۱۵) هم‌چنین جهت افزایش سرعت و دقیق تشخیص و کنترل پیشرفت عفونت در میزان و درمان مناسب، شناخت خصوصیت‌های بیماری‌زایی ارگانیسم مهاجم، از جمله حضور ژن‌های پاتوژن در عامل عفونت، ضروری است. بنابراین در این مطالعه شناسایی همزمان ۳ ژن بیماری‌زایی *iucD* *kpsMTII* و *usp* در اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری با روش Multiplex-PCR انجام گرفته است و نتایج این تحقیق نشان داد این ۳ فاکتور، در ۲۸/۳۳ درصد نمونه‌ها حضور همزمان داشتند. هم‌چنین بین فراوانی حضور این سه ژن در نمونه‌های اشريشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری مورد مطالعه، ارتباط معنی‌داری وجود داشت. لذا بر اساس نتایج این پژوهش و مطالعه‌هاب مشابه که در این خصوص انجام گرفته است بین حضور این ژن‌های بیماری‌زا در باکتری اشريشیاکلی

بین حضور این عوامل در باکتری‌هایی که در ایجاد عفونت ادراری نقش داشتند ارتباط وجود دارد و در نتیجه این عوامل هم می‌توانند به طور هم‌زمان و هم به صورت جداگانه در ایجاد عفونت مؤثر باشند. Cunha و همکاران در سال ۲۰۱۷ پژوهشی را بر روی عوامل بیماری‌زا سویه‌های باکتری اشريشياکلي خارج روده‌ایی که سبب عفونت ادراری می‌شوند با روش مالتی لوکوس سکوئنسینگ انجام دادند. آنان مشخص نمودند برخی عوامل بیماری‌زا با درصد بالا و برخی ژن‌ها با میزان فراوانی کمتر در نمونه‌های ایجاد کننده عفونت ادراری حضور دارند. از عواملی که فراوانی بیشتری داشتند می‌توان ژن‌های *pap* (٪۸۵)، *sfa* (٪۱۰۰)، *cnsfI* (٪۱۰۰)، *usp* (٪۵۲)، *hlyA* (٪۶۶)، *kpsMTII* (٪۲۲)، *ompT*، *tsh*، *hlyF* و *iucD* هر یک با حضور کمتر می‌توان به ژن‌های *cvi/cva* با فراوانی صفر اشاره نمود. در تحقیق حاضر نیز که با روش Multiplex PCR انجام شد، حضور دو ژن *iucD* و *kpsMTII* همانند عوامل مورد بررسی در تحقیق Cunha، با میزان فراوانی بالا به ترتیب در ۷۱/۷ درصد و ۸۸/۳ درصد نمونه‌ها مشاهده شد ولی ژن *usp* با فراوانی کمتر نسبت به تحقیق Cunha در ۳۶/۷ درصد نمونه‌ها گزارش شده است که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع و تعداد جمعیت نمونه‌های مورد مطالعه و روش کار انجام گرفته باشد. در تحقیقی که Darko و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در خصوص عوامل ویرولاتس باکتری اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری، با روش PCR انجام دادند مشخص شد که عامل *usp* که یک پروتئین اختصاصی در عفونت ادراری و همولوگ ژن توکسین ویبریوکلرا است، با بیشترین فراوانی (٪۷۲/۴۸) در ۱۴۹ درصد جدایه باکتریایی حضور دارد. همچنین در ان تحقیق حضور عامل *papC* که یک فیمبریای چسبنده به سلول‌های اپیتلیال ادراری است، نیز شناسایی شد و بین حضور این دو عامل در نمونه‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری یافته شد (٪۲۰). در مطالعه حاضر که با روش متغیر از روش آن‌ها (Multiplex PCR) انجام گرفته است، حضور ژن *usp* با میزان فراوانی ۳۶/۷ درصد در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بین حضور هم‌زمان سه عامل بیماری‌زا *iucD*، *kpsMTII* و *usp* در باکتری‌های اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری

در نمونه‌های باکتری اشريشياکلي مورد بررسی قرار گرفته است و در مقایسه با بررسی حضور تک تک ژن‌ها در مطالعه Multiplex Kanamaru، حضور هم‌زمان این ژن‌ها با روش PCR مطالعه شد و وجود اختلاف معنی‌دار، بین حضور این سه ژن مطالعه شده، مشاهده شد که می‌تواند گویای فراوانی مستقل از هم، این عوامل در باکتری مورد مطالعه باشد Arisoy. و همکارانش در سال ۲۰۰۶ تحقیقی را در مورد عوامل بیماری‌زا باکتری اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری در کودکان توسط Multiplex-PCR انجام دادند. نتایج آن‌ها مشخص نمود فاکتورهای *iroN*, *iucD*, *fimH* شایع‌ترین ژن‌های بیماری‌زا باکتری اشريشياکلي هستند که می‌توانند هم‌زمان حضور داشته باشند (٪۱۴). در این تحقیق نیز که همانند تحقیق آنان با روش Multiplex PCR در خصوص *usp*، *iucD*، *kpsMTII*، *usp* سه عامل بیماری‌زا در ۷۱/۷ درصد، ۸۸/۳ درصد و ۳۶/۷ درصد نمونه‌ها، حضور انجام گرفت، مشاهده شد که در نمونه‌های باکتری اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری، عوامل بیماری‌زا، *iucD* و *kpsMTII* با فراوانی‌های متفاوت به ترتیب در ۲۰۱۱ در بزریل در مورد عوامل بیماری‌زا و مقاومت آنتی-بیوتیکی باکتری اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری با روش مولکولی PCR تحقیقی را انجام دادند. نتایج آن‌ها مشخص نمود، هر یک از ژن‌هایی که پاتوزن هستند شامل، گپسول باکتری (*kpsMTII*)، که چسبنده یا ادھسین‌های (فیمبریه تیپ ۱) هستند، سیستم اکتساب آهن یا سیدروفورها (*iucD*)، پروتئین‌های اختصاصی بیماری‌زا (*usp*)، آلفا همولیزین، توکسین‌ها (اندوتوكسین) و فاکتور نکروزدهنده سایتو توکسیک، می‌توانند باعث شدت بیماری‌زا و ایجاد عفونت در بیماران شوند (٪۱۸). در این تحقیق نیز که با روش Multiplex-PCR در خصوص سه ژن بیماری‌زا مولکولی *usp*، *iucD* و *kpsMTII* در انجام گرفت در نمونه‌های باکتری اشريشياکلي ایجاد کننده عفونت ادراری، سه عامل ایجاد عفونت مشابه عوامل مورد بررسی در تحقیق Oliveria بررسی شدند و نتایج این پژوهش نشان داد که سه ژن مذکور می‌توانند در ۲۸/۳۳ درصد موارد هم‌زمان حضور داشته باشند و

بنابراین با مقایسه تحقیق حاضر و تحقیقات گذشته در این زمینه، تشابهات و تفاوت‌های مشاهده می‌شود که در توجیه تفاوت‌های موجود می‌توان به تفاوت اقلیم و مناطق جغرافیایی و یا نژادهای ملیتی و انواع سروتاپی‌هایی که در جمعیت‌های مختلف سبب عفونت می‌شود، می‌توان اشاره نمود. همچنین تفاوت در تعداد نمونه‌های ایزوله شده و نوع عوامل بیماری‌زای مورد مطالعه و روش‌های متفاوت شناسایی آن‌ها مطرح است. اما نکته اصلی حضور این عوامل بیماری‌زا در سویه‌های باکتری /شریشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری است که سبب شدت و گسترش عفونت شده و مانع برای کنترل و درمان مناسب محسوب می‌شود. بنابراین با شناخت و آگاهی از حضور این زن‌ها در سویه‌های بیماری‌زا می‌توان تمهدیاتی را برای ارتقای سطح بهداشت عمومی جامعه و کنترل عفونت‌ها اندیشید، که حائز اهمیت است.

## نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر حضور حمزمانی سه عوامل بیماری‌زای، /شریشیاکلی عامل عفونت ادراری هستند جهت پیش‌بینی روند پیشرفت و کنترل عفونت و در نتیجه درمان مناسب بیماری مورد بررسی فرار گرفته است و براساس نتایج حاصل از تحقیق چنین نتیجه‌گیری می‌شود که این سه زن بیماری‌زا هم می‌توانند به طور همزمان حضور داشته باشند و سبب تشديد عفونت‌زایی باکتری شوند و هم با توجه‌به معنی دار بودن تفاوت حضور این سه زن در نمونه‌های مورد مطالعه، عوامل مذکور می‌توانند با فراوانی‌های متفاوت در باکتری بیماری‌زا حضور داشته باشند در نتیجه دارای اثرهای متفاوت در گسترش و کلونیزاسیون عفونت توسط این باکتری در بین بیماران باشند که این مسئله می‌تواند در تحقیقات متخصصین اپیدمیولوژی مورد توجه قرار گیرد.

## سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی در دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است و جا دارد از کلیه مسئولین محترم دانشگاه و دانشکده مذکور و همکاران محترم آزمایشگاه پاسارگارد که در انجام

در نمونه‌های مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود دارد. Momtaz و همکاران در سال ۲۰۱۳ تحقیقی را بر روی عوامل بیماری‌زا و فاکتورهای مقاومت به دارو در سویه‌های باکتری /شریشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری، با روش PCR انجام دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که زن بیماری‌زای *usp* با کمترین فراوانی و زن *usp* با عفونت ادراری جداسازی شد. بررسی آنان بر روی ۱۲۳ نمونه باکتریایی و شناسایی چندین فاکتور بیماری‌زا و زن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است و بر روی سروتاپی‌های جدا شده از بیماران ایرانی مطالعه را انجام داده‌اند (۲۱). در تحقیق حاضر که جداسازی هم‌زمان ۳ زن بیماری‌زای *kpsMTII* و *iucD* با روش Multiplex PCR مشابه تحقیق Momtaz در جامعه بیماران ایرانی انجام شده، درصد حضور هم‌زمان ۳ زن  $\frac{28}{33}$ % و درصد حضور زن *usp* با فراوانی کمتر نسبت به دو زن دیگر در  $\frac{36}{7}$  درصد نمونه‌ها گزارش شد که از این نظر مشابه با نتایج مطالعه Momtaz بوده است ولی از نظر روش کار و تعداد و جمعیت نمونه‌ها دو مطالعه با هم تفاوت دارند. Mohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۷ بهمنظور شناسایی زن‌های بیماری‌زای در سویه‌های باکتری /شریشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری، به روش Multiplex-PCR تحقیقی را انجام دادند. در ان مطالعه بهمنظور شناسایی زن‌های *aha*, *ompT*, *iroN* و *aha* در جدایه‌هایی از نمونه‌های بالینی تعداد ۲۰۰ نمونه ادرار جمع آوری گردید. نتایج آنان نشان داد ۱۰۰ درصد نمونه دارای ۱، ۲ یا هر ۳ زن بیماری‌زایی به صورت هم‌زمان هستند. در تحقیق آنان بیش‌ترین فراوانی مربوط به زن *aha* با  $\frac{56}{7}$  درصد و کمترین فراوانی مربوط به زن *iroN* به میزان ۲۰ درصد گزارش شد (۲۲). در این تحقیق که مشابه تحقیق Mohammadi با روش Multiplex PCR در نمونه‌های باکتری /شریشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری انجام شده است، حضور هم‌زمان ۳ عوامل بیماری‌زا، *iucD*, *kpsMTII* و *usp* در  $\frac{28}{33}$  درصد مشاهده شد. هم‌چنین بین حضور این عوامل بیماری‌زا در نمونه‌های باکتری /شریشیاکلی ایجاد کننده عفونت ادراری مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت که می‌نواند گویای نقش مستقل هر یک از زن‌ها در بیماری‌زای باکتری باشد.

کارهای آزمایشگاهی این پایان نامه کمال همکاری را مبدول  
فرموده‌اند، تشکر و قدردانی گردد.

1. Luthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv microb phys.* 2014; 65: 337-372.
2. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microb spec.* 2015; 3(4): 1-32.
3. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Inter J infec Dis.* 2013; 17(6): e450-453.
4. Chahales P, Thanassi DG. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Micro spec.* 2015; 3(5): 1-68.
5. Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzari S. Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(12): 1-7.
6. Waller TA, Pantin AL, Yenior AL, Pujalte GA. Urinary Tract Infection Antibiotic Resistance in the United States. *Prim care.* 2018; 45(3): 455-466.
7. Dan M, Yair Y, Samosav A, Gottesman T, Yossepovitch O, Harari-Schwartz O. *Escherichia coli* isolates from patients with bacteremic urinary tract infection are genetically distinct from those derived from sepsis following prostate transrectal biopsy. *Inter J Med Microb.* 2015; 305(4-5): 464-8.
8. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Fron Microb.* 2017; 8: 1566.
9. Kargar M, Kargar M, Zareian Jahromi M. Prevalence of Virulence Genes of *Escherichia Coli* O157:H7 Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Shiraz, Iran. *Med Lab J.* 2015; 9(3): 9-16.
10. Millan Y, Hernandez E, Millan B, Araque M. Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 beta-lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients in the community of Merida, Venezuela. *Rev Arg Microb.* 2014; 46(3): 175-181.
11. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Env Microb.* 2012; 78(4): 1198-1202.
12. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 2008; 50(5): 255-60.
13. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trend Molecul Med.* 2016; 22(11): 946-957.
14. Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsoy ED, et al. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* from children by multiplex polymerase chain reaction. *I J Clin Prac.* 2006; 60(2): 170-173.

15. Alishah M, Amini K, Zahraei Salehi T. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pediatric with urinary tract infection and their antibiotic resistance profile. J Urmia Uni Med Sci. 2017; 27(11): 942-949. (Full Text in Persian)
16. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, et al.. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iroN(*E. coli*). J Infec Dis. 2002; 185(10): 1521-1524.
17. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, et al. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors iroN, iha, kpsMT, ompT and usp in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. J Urol. 2003; 170(6 Pt 1): 2490-2493.
18. Oliveira FA, Paludo KS, Arend LN, Farah SM, Pedrosa FO, Souza EM, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Genetics and molecular research. Genet Mol Res. 2011; 10(4): 4114-4125.
19. Cunha MPV, Saidenberg AB, Moreno AM, Ferreira AJP, Vieira MAM, Gomes TAT, et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2- ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. PLOS ONE. 2017; 12(6): e0178970.
20. Darko SN, Kwabena Nsiah K, Twumasi P. Prevalence of *papC* and *usp* Virulence Factors in Uropathogenic *Escherichia coli* Causing Asymptomatic Urinary Tract Infections in Adolescents. British Microb Res J. 2013; 3(3): 423-430.
21. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annal Clin Microb Antimicrob. 2013, 12(8): 1-12.
22. Mohammadi J, Amini K. Detection of virulence genes in Uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains by Multiplex-PCR method. J Fasa Uni Med Sci. 2017; 7(1): 128-133. (Full Text in Persian)

