NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/38 , 2020

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 flura 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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۸ بهار ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

شناسایی هم‌زمان ۳ فاکتور ویرولانس *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونتدستگاه ادراری با روش Multiplex-PCR

الهام سیاسی *، عاطفه رضایی، جمیله نوروزی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *اشریشیاکلی* (*E. coli*) فلور طبیعی در روده طبیعی انسان و حیوانات است. این باکتری یکی از عوامل اصلی عفونت ادراری است. هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی حضور هم‌زمان ۳ فاکتور بیماری‌زای *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در ژنوم سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری بود.

مواد و روش‌ها: ۶۰ نمونه باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری جمع‌آوری گردید. باکتری‌های مورد نظر با تست‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم شناسایی شدند. ژنوم باکتری از طریق کیت‌های جداسازی DNA باکتری گرم منفی جداسازی شد. سپس برای حضور هم‌زمان ۳ عامل بیماری‌زایی مورد نظر از روش Multiplex-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: در این ۶۰ نمونه باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی شده، حضور ژن‌های بیماری‌زا، *kpsMTII* ۷۱/۶۶ درصد، *iucD* ۸۸/۳۳ درصد، *usp* ۳۶/۶۶ درصد بود و هم‌چنین حضور هم‌زمان ۳ فاکتور در ۲۸/۳۳ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. بین فراوانی حضور این سه ژن با ایجاد عفونت ادراری در نمونه‌های *اشریشیاکلی* مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود داشت (Pvalue< ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، مشابه با مطالعه‌های پیشین، بین حضور این سه ژن بیماری زا در نمونه‌های مورد مطالعه از باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری می‌تواند ارتباط معنی‌دار وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، عفونت ادراری، ژن های بیماری‌زا، Multiplex PCR.

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی* (*E. coli*)، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. باکتری *اشریشیاکلی* به‌صورت طبیعی و هم‌زیست در دستگاه گوارش انسان و حیوانات زندگی می‌کند (۱). انواع گونه‌های مختلف این باکتری موجب بروز بیماری در انسان و حیوانات از طریق ایجاد عفونت یا ترشح سموم می‌شوند. کودکان، افراد مسن و افرادی که به بیماری‌های مزمن مبتلا هستند، نسبت‌به عفونت ناشی از این باکتری حساس‌تر بوده و علائم عفونت با شدت بیش‌تری در آن‌ها بروز می‌کند (۲). گاهی باکتری *اشریشیاکلی* از دستگاه گوارش انسان، تغییر مکان می‌دهد و به دستگاه ادراری و مجاری ادراری وارد می‌شود، باعث ایجاد عفونت ادراری می‌شود (۳). عفونت دستگاه ادراری یک عفونت باکتریایی است

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۰

که دستگاه ادراری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باکتری *اشریشیاکلی* مهم‌ترین عامل عفونت ادراری است (۴). عفونت ادراری در میان خانم‌ها به‌دلیل آناتومی خاص دستگاه ادراری، بسیار شایع‌تر از آقایان است و عود عفونت بسیار معمول است. شدت عفونت بستگی‌به باکتری عامل عفونت (مرتبط با فاکتورهای بیماری‌زای آن) و حساسیت میزبان دارد (۵، ۶). سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* انواع مختلفی از عوامل بیماری-زایی از جمله سیستم چسبندگی (چسبنده‌ها)، توکسین‌ها، سیستم‌های اکتساب آهن، آلفا همولیزین، فاکتور نکروزدهنده سایتوتوکسیک را دارا هستند. این عوامل می‌توانند به ترویج ویرولانس و بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* کمک کنند. از سیستم چسبندگی یا همان ادهسین‌ها می‌توان به فیمبریه تیپ ۱ اشاره کرد. از سیستم‌های اکتساب آهن سیدروفورها هستند. سیدروفورها به دو گروه، انتروباکتین و آئروباکتین تقسیم می‌شوند. هم‌چنین به تولید توکسین‌هایی مانند آلفا همولیزین و سایتوتوکسیک نکروزدهنده می‌توان اشاره کرد (۹ - ۷). کپسول باکتری *اشریشیاکلی* در بیماری‌زایی باکتری نقش دارد. کپسول باکتری باعث چسبیدن باکتری و اتصال باکتری به بافت سلول میزبان می‌شود (۱۰). فاکتور *kpsMTII* کپسول باکتری است، که مقاومت باکتری را در برابر آنتی-بیوتیک ها زیاد می‌کند (۱۱). کپسول باعث چسبیدن باکتری و اتصال باکتری به سلول میزبان 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 *اشریشیاکلی* 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 آئروباکتین‌ها است. آهن را از محیط‌های فقیر مانند مجاری ادراری جذب می‌کند و در اختیار باکتری قرار می دهد. این مکانیسم نوعی مکانیسم دفاعی برای باکتری محسوب می‌شود. عامل *iucD* در گروه B2، از گروه‌های ژن‌های بیماری‌زایی قرار دارد. این عامل در کلونیزاسیون باکتری نقش دارد (۱۲، ۱۳). عامل *usp* همان ژن کد کننده Uropathogenic Specific Protein است. یک نوع پروتئین اختصاصی بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* است. عامل *usp* در شدت بیماری‌زایی و عفونت باکتری نقش دارد. گاهی اوقات عفونت ادراری همراه با پروتئینوری است. عامل *usp* عامل ایجاد پروتئینوری است (۱۳،۱۲). باکتری *اشریشیاکلی* که عامل عفونت مجاری ادراری و بخش عمده‌ای از عفونت ادراری بیمارستانی محسوب می‌شود به این ۳ عامل بیماری‌زا *kpsMTII*، *iucD*، *usp* برای کلونیزاسیون و شدت بیماری‌زایی نیاز دارد. بنابراین این مطالعه به شناسایی و حضور هم‌زمان این ۳ عامل بیماری‌زا در نمونه‌های *اشریشیاکلی* 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 ازمایشگاه دارای علائم عفونت ادراری بودند تهیه شد و پس از شناسایی باکتری ایجاد کننده عفونت ادراری در نمونه های مورد بررسی، ۶۰ نمونه که با باکتری *اشریشیاکلی* آلوده بودند، جداسازی شدند.

جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از نمونه-های ادرار - جهت تأیید آلوده بودن نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری به *اشریشیاکلی* نمونه‌های ادرار بر روی محیط کشت بلاد آگار(Blood Agar) (شرکت مرک المان) و ائوزین متیلن‌بلو EMB (Eosin Methylene Blue Agar) (شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و به‌مدت 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 *اشریشیاکلی* از سایر باکتری‌های گرم منفی کشت در محیط‌های کشت افتراقی (شرکت مرک آلمان) شامل: اندول، مک کانکی، ائوزین متیلین بلو، سیمون سیترات، اوره از، MR-VP، SIM، TSI، تخمیر قند، اسکولین براث و تست ی اکسیداز و کاتالاز استفاده شد. محیط‌های کشت برای ایجاد کلنی باکتری‌ها به‌مدت ۲۴

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

شناسایی ژن‌های ویرولانس *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* با استفاده از تکنیک Multiplex PCR

استخراج DNA **باکتری** – استخراج ژنوم نمونه‌های باکتری اشریشیاکلی با استفاده از کیت‌های استخراج DNA باکتری گرم منفی (شرکت سینا کلون با نام CinnaPur-DNA CAT (NO: PR881612 انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی آگارز و استفاده از دستگاه نانودراپ کنترل گردید. به این ترتیب که ۳ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. هم‌چنین به‌منظور آگاهی از غلظت DNA و درجه خلوص آن، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ قرار داده شد و نسبت جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ خوانده شد.

واکنش Multiplex PCR – پس از استخراج DNA از نمونه های باکتری‌های شناسایی شده برای بررسی حضور هم‌زمان ژن‌های *kpsMTII*، *iucD* و *usp* از روش Multiplex-PCR استفاده شد. در این تکنیک از ۳ جفت پرایمر اختصاصی در یک محلول PCR برای تکثیر ۳ توالی هدف (۳ ژن *kpsMTII*، *iucD* و *usp*) به‌طور هم‌زمان استفاده شد. زیرا در Multiplex-PCR یا PCR چندتایی چندین جفت پرایمر هم‌زمان مورد نیاز است. پرایمرها (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 به‌ترتیب در جداول ۱و ۲ و ۳ اورده شده اند. پس از انجام واکنش PCR برای بررسی تشکیل باندهای مربوطبه این ۳ عامل بیماری‌زا *kpsMTII*، *iucD* و *usp* محصول‌های PCR بر روی ژل اگاروز الکتروفورز شدند و از نمونه فاقد DNA (دارای آب مقطر) به‌عنوان 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 اتیدیوم برامید و عکس‌برداری با دستگاه ژل‌داک 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 Pvalue < ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام ژن	توالی پرایمر '3-'5	طول محصول PCR	رفرنس مورد استفاده
iucD	F- TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT R-AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	۶۰۲ bp	۱۲
usP	F- ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT R- CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT	۱۰۰۰ bp	۱۲
kpsMTII	F- GCGCATTTGCTGATACTGTTG R- CATCAGACGATAAGCATGAGCA	۲۷۲ bp	۱۲

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

مواد برای واکنش PCR	مقدار برحسب 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 برحسب میکرولیتر (µl)
Taq polymerase	۰/۵
dNTP (۲۰۰ µM)	۱
بافر	۲/۵
$MgCl_2$ (۱ mM)	۱

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

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

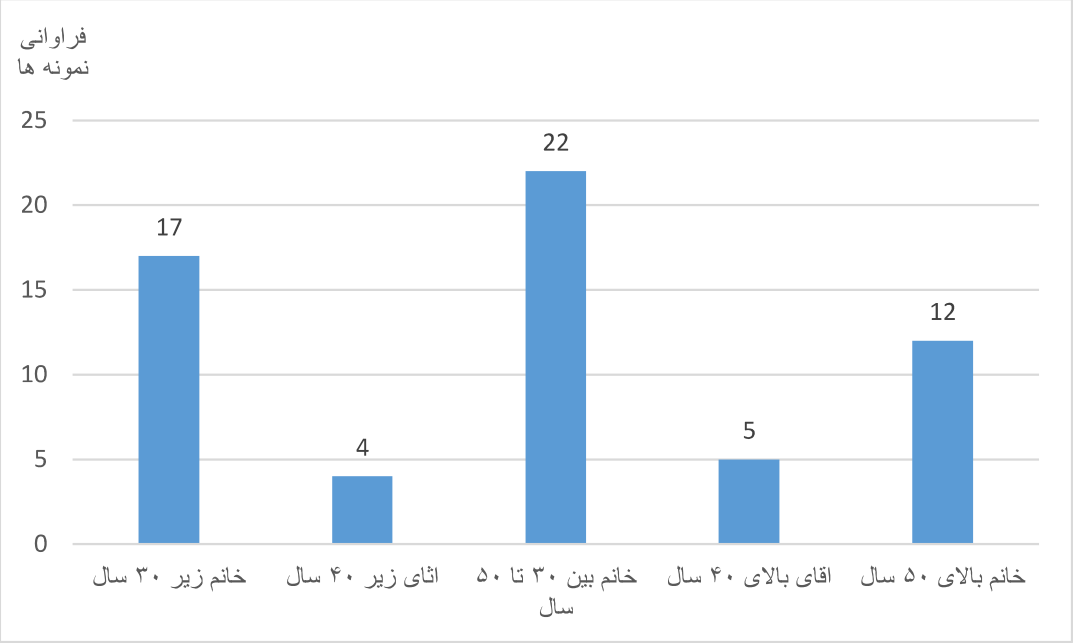
* مراحل ۲ تا ۴ در ۳۵ سیکل تکرارشدند.

یافته‌ها

بررسی توزیع فراوانی *اشریشیاکلی* در جمعیت مورد مطالعه – نمونه‌های جداسازی شده مربوط به ۴ مرد زیر ۴۰ 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 و۲).

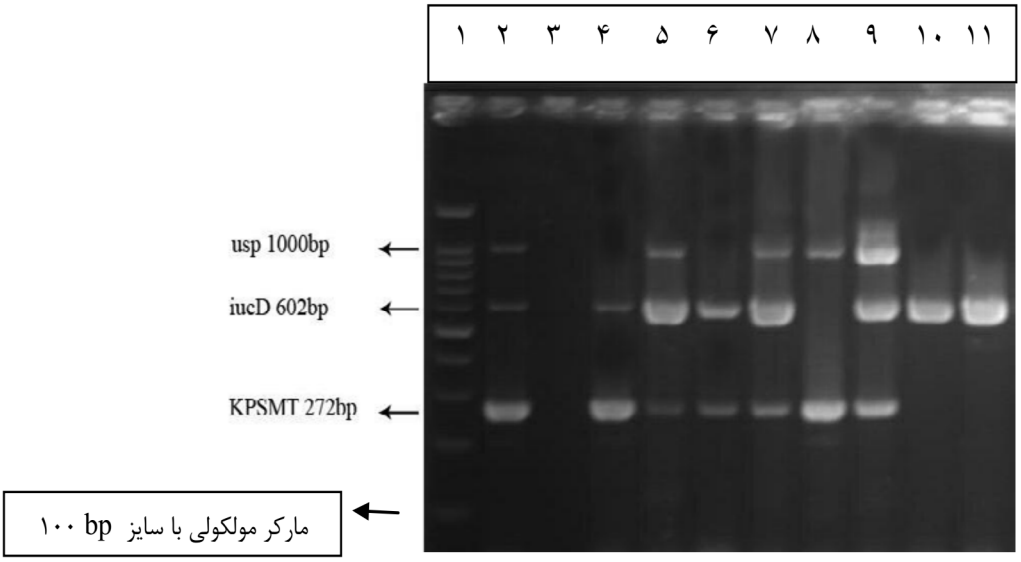
نتایج شناسایی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از نمونه‌های ادرار با کشت و تست‌های بیوشیمیایی- با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم، کشت و تست‌های افتراقی حضور باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* در ۶۰ نمونه از نمونه‌های عفونت ادراری تأیید شد.

نتایج مشاهده باندهای محصول‌های PCR بر روی ژل الکتروفورز- باندهای مربوط به حضور هر یک از ژن‌های *iucD kpsMTII* و *usp* به‌ترتیب با طول ۲۷۲ bp، ۶۰۲ bp و ۱۰۰۰ bp در کنار مارکر مولکولی با سایز ۱۰۰ bp و نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در شکل ۱ آورده شده است.



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

نمودار ۲- درصد نمونه های مورد بررسی بر اساس جنسیت

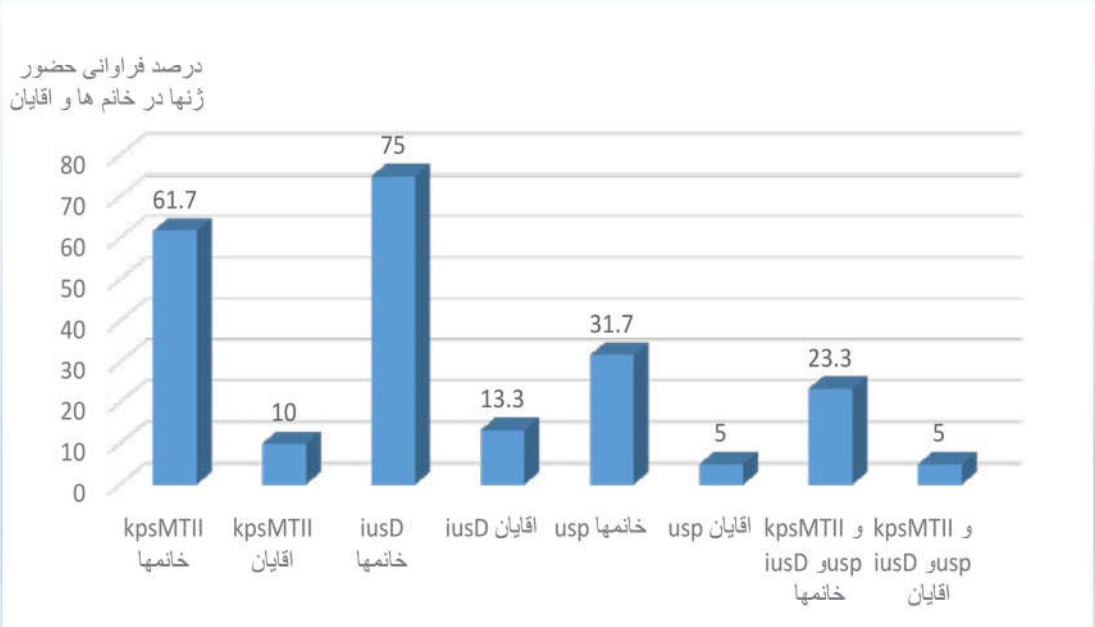


شکل ۱ – نتایج Multiplex PCR برای هر یک از ژن‌های *kpsMTII*، *iucD* و *usp*.

نه شماره ۱: مارکر مولکولی (۱۰۰bp) ؛ خانه شماره ۲: کنترل مثبت سویه استاندارد E. coli ATC25923 ؛ خانه شماره ۳ : کنترل منفی آب مقطر؛ خانه‌های ماره ۴ و۶ : نمونه‌های دارای حضور ۲ ژن *iucD* (۶۰۲bp) ، *kpsMTII* (۲۷۲bp)، خانه‌های شماره ۵ و ۷ و ۹ : نمونه‌های دارای حضور ۳ ژن *usp* (۱۰۰۰bp) ، *iuc* (۶۰۲bp)، *kpsMTII* (۲۷۲bp)، خانه شماره : نمونه دارای حضور ۲ ژن *usp* (۱۰۰۰bp) ، *kpsMTII* (۲۷۲bp)، خانه‌های شماره ۱۰ و ۱۱ : نمونه‌های ای حضور ژن *iucD* (۶۰۲bp).

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

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



نمودار ۳- درصد فراوانی حضور ژن‌های *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در نمونه‌های مورد مطالعه به تفکیک جنس افراد

نتیجه تجزیه و تحلیل داده‌ها - درصد فراوانی ژن‌های *kpsMTII*، *iucD* 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 *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در ۶۰ نمونه باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری اختلاف معنی‌دار وجود دارد (Pvalue<۰/۰۵ به‌دست آمده است). به‌عبارتی 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 *اشریشیاکلی* عامل عفونت ادراری وجود داشته باشند. هم‌چنین این سه ژن با توجه‌به 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 *اشریشیاکلی* که در بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت دستگاه ادراری به‌عنوان باکتری بیماری‌زا است با حضور ژن‌های پاتوژن مختلف که با توانایی بیماری‌زایی باکتری ارتباط دارد، همراه است (۱۴، ۱۵) هم‌چنین جهت افزایش سرعت و دقت تشخیص و کنترل پیشرفت عفونت در میزبان 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 *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی* و کلونیزاسیون و گسترش عفونت توسط این باکتری در ایجاد عفونت ادراری می‌تواند ارتباط وجود داشته باشد (۱۴، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۲). برای تأیید وجود این ارتباط با حضور ژن‌های بیماری‌زا در باکتری *اشریشیاکلی* 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 بیماری زا *usp*، *iha* و *iroN* در باکتری *اشریشیاکلی* 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 *iha* نوعی چسبنده و ادهسین است. عامل *iroN* سیستم اکتساب آهن در باکتری است که سبب جذب اهن از محیط و عفونت‌زایی باکتری می‌شود. آئروباکتین‌ها و سیدروفورها نیز آهن‌بر هستند. *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 ویرولانس *kpsMT*، *ompT*، *iha*، *iroN*، *usp*، در باکتری *اشریشیاکلی* 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 ادهسین است و چسبنده دیگر، *fimH* 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 سه ژن موثر در بیماری‌زایی، شامل *kpsMTII*، *iucD* و *usp*

در نمونه‌های باکتری *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفته است و در مقایسه با بررسی حضور تک تک ژن‌ها در مطالعه Kanamaru، حضور هم‌زمان این ژن‌ها با روش Multiplex PCR مطالعه شد و وجود اختلاف معنی‌دار، بین حضور این سه ژن مطالعه شده، مشاهده شد که می تواند گویای فراوانی مستقل از هم، این عوامل در باکتری مورد مطالعه باشد .Arisoy و همکارانش در سال ۲۰۰۶ تحقیقی را در مورد عوامل بیماری‌زایی باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری در کودکان توسط Multiplex-PCR انجام دادند. نتایج آن‌ها مشخص نمود فاکتورهای *fimH*, *iucD*, *iroN* شایع‌ترین ژن‌های بیماری‌زای باکتری *اشریشیاکلی* هستند که می‌توانند هم‌زمان حضور داشته باشند (۱۴). در این تحقیق نیز که همانند تحقیق آنان با روش Multiplex PCR در خصوص هم‌زمانی حضور سه عامل بیماری‌زا *kpsMTII*، *iucD* و *usp* انجام گرفت، مشاهده شد که در نمونه‌های باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری، عوامل بیماری‌زای، *kpsMTII*، *iucD* و *usp* با فراوانی‌های متفاوت به‌ترتیب در ۷۱/۷ درصد، ۸۸/۳ درصد و ۳۶/۷ درصد نمونه‌ها، حضور داشتند و بین حضور این ژن‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار وجود داشت. Oliveria و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در برزیل در مورد عوامل بیماری‌زا و مقاومت آنتی-بیوتیکی باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری با روش مولکولی PCR تحقیقی را انجام دادند. نتایج آن‌ها مشخص نمود، هر یک از ژن‌هایی که پاتوژن هستند شامل، کپسول باکتری (*kpsMTII*)، که چسبنده یا ادهسین‌های (فیمبریه تیپ ۱) هستند، سیستم اکتساب آهن یا سیدروفورها (*iucD*) ، پروتئین‌های اختصاصی بیماری‌زایی (*usp*)، آلفا همولیزین، توکسین‌ها (اندوتوکسین) و فاکتور نکروزدهنده سایتوتوکسیک، می‌توانند باعث شدت بیماری‌زایی و ایجاد عفونت در بیماران شوند (۱۸). در این تحقیق نیز که با روش مولکولی Multiplex-PCR در خصوص سه ژن بیماری‌زای *kpsMTII*، *iucD* و *usp* انجام گرفت در نمونه‌های باکتری *اشریشیاکلی* 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 می-توانند در ۲۸/۳۳ درصد موارد هم‌زمان حضور داشته باشند و بین حضور این عوامل در باکتری‌هایی که در ایجاد عفونت ادراری نقش داشتند ارتباط وجود دارد و در نتیجه این عوامل هم می‌توانند به‌طور هم‌زمان و هم به‌صورت جداگانه در ایجاد عفونت مؤثر باشند. Cunha و همکاران در سال ۲۰۱۷ پژوهشی را بر روی عوامل بیماری‌زای سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* 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٪)، *usp* (۱۰۰٪)، *cnsf1* (۲۲٪)، *kpsMTII* (۶۶٪)، *hlyA* (۵۲٪) را نام برد و از ژن‌های با حضور کم‌تر می‌توان به ژن‌های *tsh*, *ompT* و *hlyF* هر یک با فراوانی ۸٪ و ژن‌های *cvi/cva* با فراوانی صفر اشاره نمود (۱۹). در تحقیق حاضر نیز که با روش Multiplex PCR انجام شد، حضور دو ژن *kpsMTII* و *iucD* همانند عوامل مورد بررسی در تحقیق Cunha، با میزان فراوانی بالا به‌ترتیب در ۷۱/۷ درصد و ۸۸/۳ درصد نمونه ها مشاهده شد ولی ژن *usp* با فراوانی کم‌تر نسبت‌به 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 ویرولانس باکتری *اشریشیاکلی* 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 درصد) در ۱۴۹ جدایه باکتریایی حضور دارد. هم-چنین 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 متفاوت از روش آن‌ها (Multiplex PCR) انجام گرفته است، حضور ژن *usp* با میزان فراوانی ۳۶/۷ درصد در نمونه-های مورد بررسی مشاهده شد. هم‌چنین نتایج نشان داد که بین حضور هم‌زمان سه عامل بیماری‌زا *kpsMTII*، *iucD* و *usp* در باکتری‌های *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری

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 *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری، با روش PCR انجام دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که ژن بیماری‌زای *fim* با بیش‌ترین فراوانی و ژن *usp* با کم‌ترین فراوانی از بیماران با عفونت ادراری جداسازی شد. بررسی آنان بر روی ۱۲۳ نمونه باکتریایی و شناسایی چندین فاکتور بیماری‌زا و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است و بر روی سروتایپ‌های جدا شده از بیماران ایرانی مطالعه را انجام داده-اند (۲۱). در تحقیق حاضر که جداسازی هم‌زمان ۳ ژن بیماری‌زای *kpsMTII ،iucD* و *usp* با روش Multiplex PCR مشابه تحقیق Momtaz در جامعه بیماران ایرانی انجام شده، درصد حضور هم‌زمان ۳ ژن ۲۸/۳۳٪ و درصد حضور ژن *usp* با فراوانی کم‌تر نسبت‌به دو ژن دیگر در ۳۶/۷ 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 ژن‌های بیماری زایی در سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری، به‌روش Multiplex-PCR تحقیقی را انجام دادند. در ان مطالعه به‌منظور شناسایی ژن‌های *iha ،iroN* و *ompT* 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 ژن بیماری‌زایی به‌صورت هم‌زمان هستند. در تحقیق آنان بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن *iha* با ۵۶/۷ درصد و کم‌ترین فراوانی مربوط به ژن *iroN* به میزان ۲۰ درصد گزارش شد (۲۲). در این تحقیق که مشابه تحقیق Mohammadi با روش Multiplex PCR در نمونه‌های باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری انجام شده است، حضور هم‌زمان ۳ عوامل بیماری‌زای، *kpsMTII ،iucD* و *usp* در ۲۸/۳۳ درصد مشاهده شد. هم‌چنین بین حضور این عوامل بیماری‌زا در نمونه‌های باکتری *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت که می‌نواند گویای نقش مستقل هر یک از ژن‌ها در بیماری-زایی باکتری باشد.

بنابراین با مقایسه تحقیق حاضر و تحقیقات گذشته در این زمینه، تشابهات و تفاوت‌هایی مشاهده می‌شود که در توجیه تفاوت‌های موجود می‌توان به تفاوت اقلیم و مناطق جغرافیایی و یا نژادهای ملیتی و انواع سروتایپ‌هایی 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 *اشریشیاکلی* ایجاد کننده عفونت ادراری است که سبب شدت و گسترش عفونت شده و مانعی برای کنترل و درمان مناسب محسوب می‌شود. بنابراین با شناخت و آگاهی از حضور این ژن‌ها در سویه‌های بیماری‌زا می‌توان تمهیداتی را برای ارتقای سطح بهداشت عمومی جامعه و کنترل عفونت‌ها اندیشید، که حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر حضور هم‌زمانی سه عوامل بیماری‌زای، *kpsMTII ،iucD* و *usp* که از ژن‌های پاتوژن در باکتری *اشریشیاکلی* عامل عفونت ادراری هستند جهت پیش‌بینی روند پیشرفت و کنترل عفونت و در نتیجه درمان مناسب بیماری مورد بررسی قرار گرفته است و براساس نتایج حاصل از تحقیق چنین نتیجه‌گیری می‌شود که این سه ژن بیماری‌زا هم می-توانند به‌طور هم‌زمان حضور داشته باشند و سبب تشدید عفونت‌زایی باکتری شوند و هم با توجه‌به معنی‌دار بودن تفاوت حضور این سه ژن 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

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

منابع

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, Yossepowitch 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)