

تعیین الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بستری و سرپایی در مرکز آموزشی - درمانی امام خمینی تبریز

جاوید صادقی: کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: javid4888@yahoo.com

دکتر محمدرضا نهایی: استاد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد اصغرزاده: استادیار فرآورده های بیولوژیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۳/۶/۲۵، بازنگری نهایی: ۸۳/۱۲/۲۵، پذیرش: ۸۴/۲/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: عفونت های دستگاه ادراری بعد از عفونت های تنفسی شایع ترین عفونت محسوب می شوند و در زنان شایع ترند. در بین باکتری های مسبب عفونت های دستگاه ادراری اشریشیاکلی ها بیشترین سهم را دارا هستند. برای مطالعه این باکتری ها روش های متنوعی براساس خصوصیات فنوتیپی و روش های ژنتیک وجود دارد. خصوصیات فنوتیپی تمایل زیادی به تغییر دارند ولی روش های ژنتیک تغییرات کمتری را نشان می دهند. آنالیز DNA پلاسمیدی اطلاعات مفیدی را در مورد منشأ اپیدمی و تعداد کلون های متفاوت موجود در یک اپیدمی به دست می دهد. لذا جهت مطالعه الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های ادراری بیماران بستری و سرپایی و بررسی ارتباط محتمل در ساختار پلاسمیدهای جدا شده از سویه های فوق با استفاده از آنزیم های محدودالتر این تحقیق انجام شد تا ارتباط اپیدمیولوژیک بین سویه های جدا شده مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه های ادراری بیماران بستری و سرپایی جدا شده و با روش های معمول باکتریولوژیک مورد شناسایی قرار گرفتند. DNA پلاسمیدی این سویه ها با استفاده از روش لیز قلیایی تغییر یافته استخراج شد. سپس DNA پلاسمیدی استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید پلاسمیدهای جدا شده با نور اولتراویوله مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت شناسایی باندهای open circular از supercoiled از روش الکتروفورز دو بعدی و برش آنزیمی استفاده شد. برای هضم آنزیمی چهار آنزیم محدودالتر BamHI، Hind III، Eco RI و SmaI مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: از ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیماران با عفونت دستگاه ادراری الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی و الگوی پلاسمیدی مورد شناسایی قرار گرفت. کلیه سویه ها (۱۰۰٪) به آمیکاسین حساس بودند، در حالی که ۹۹ سویه (۹۹٪) به آمپی سیلین مقاومت نشان دادند. حساسیت در برابر نیتروفورانتوین ۹۶ درصد، سیپروفلوکساسین ۴ درصد، نالیدیکسیک اسید ۵۷ درصد و کوتریموکسازول ۲۷ درصد به دست آمد. از این تعداد ۱۰ سویه فاقد هرگونه پلاسمید بودند و از ۹۰ سویه باقیمانده ۱ تا ۷ پلاسمید شناسایی شد. وزن مولکولی پلاسمیدهای جدا شده عمدتاً در محدوده ۰/۹۰ kb تا ۲۱ kb بود. گرچه در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۲۱ kb نیز شناسایی شد. بیشترین تعداد پلاسمیدها در سویه های جدا شده از بیماران بستری بود و نیز پلاسمیدهای با وزن مولکولی زیاد در این سویه ها ردیابی شد. هشتاد و سه سویه (۸۳٪) مقاوم به آمپی سیلین پلاسمید ۲۱ kb را داشتند. از مجموع ۹۰ سویه دارای پلاسمید ۴۴ الگوی پلاسمیدی به دست آمد. در نتیجه برش با آنزیم های محدودالتر الگوهای برشی مشابهی در برخی از سویه ها مشاهده شد و در مواردی که الگوی برشی متفاوتی حاصل می شد باندهای مشابهی مورد شناسایی قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشانگر حضور پلاسمید در سویه های اشریشیاکلی مولد عفونت دستگاه ادراری در بیماران سرپایی و بستری بوده و تشابه زیادی در الگوهای پلاسمیدی و الگوهای برشی سویه های جدا شده از عفونت های بیمارستانی از یک بخش خاص و از بخش های مختلف در یک زمان کوتاه به دست آمد که احتمال منشأ گرفتن این باکتری ها از یک کلون باکتریایی یا شیوع بالای انتقال ژن در بین سویه های بیمارستانی را مطرح می سازد.

کلیدواژه ها: الگوی پلاسمیدی، اشریشیاکلی، عفونت دستگاه ادراری، مقاومت دارویی

مقدمه

۸۰ درصد عفونت های دستگاه ادراری در بیماران سرپایی و بیش از ۵۰ درصد عفونت های یاد شده در بیماران بستری را ایجاد می کنند (۳-۵). برای مطالعه این باکتری ها روش های متنوعی براساس خصوصیات فنوتیپی و ژنتیک وجود دارد. خصوصیات فنوتیپی نظیر

عفونت های دستگاه ادراری بعد از عفونت های تنفسی شایع ترین عفونت به شمار می روند (۱-۳). در بین باکتری های مسبب عفونت های دستگاه ادراری اشریشیا کلی ها بیشترین سهم را دارا هستند و به عنوان شایع ترین باکتری ها نقش ایفا می کنند، به طوری که بیش از

دیفیوژن (کری - بائر) در برابر آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کوتریموکسازول، آمیکاسین، سپیروفلوکسامین، نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانتوین استفاده شد. کلیه آنتی بیوتیک ها از شرکت MAST تهیه شدند.

برای استخراج و خلص سازی DNA پلاسمیدی از رشد باکتری های تحت مطالعه در محیط کشت LB محتوی آمپی سیلین (۵۰ μg/ml) استفاده شد که از رشد ۲۴ ساعته باکتری در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB تلقیح نموده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس ۱/۵ میلی لیتر از کشت باکتریایی به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر منتقل و به مدت ۴ دقیقه در دور ۶۰۰۰g سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و مرحله فوق در همان لوله تکرار شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر از بافر لیز کننده (محتوی گلوکز ۵۰ mM، EDTA ۱۰ mM و Tris-HCl ۲۵، pH=۸) که به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال ۲۰ °C - نگهداری شده بود در وضعیت فوق العاده سرد بر روی رسوب سلولی ریخته شد و سپس سلول ها با استفاده از سمپلر در محلول به شکل سوسپانسیون در آمدند. سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. در مرحله بعد ۰/۴ ml محلول دناتوره کننده (محتوی ۲N NaOH / ۱ SDS / تازه تهیه شده) اضافه و سر لوله بسته شد و ۶ بار به آرامی سر و ته شد و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه گردید. سپس ۰/۳ میلی لیتر از محلول استات پتاسیم (محتوی ۱۲۰ میلی لیتر استات پتاسیم ۵M، ۲۳ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۵۷ میلی لیتر آب مقطر که در ۴ °C نگهداری می شد و قبل از مصرف به ظرف محتوی یخ منتقل می شد) در وضعیت سرد اضافه گردید. شش بار به آرامی سر و ته شد و به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. محتویات لوله به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g در ۴ °C سانتریفوژ شد، ۷۵۰ μl از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد.

بر روی ۷۵۰ μl از مایع رویی فوق، ۱/۵ μl از RNase A (Fermentase) با غلظت ۱۰ mg/ml (غلظت نهایی ۲۰ μg/ml) افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون ۷۵۰ μl از محلول فنل متعادل شده/کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱/۲۴/۲۵) اضافه شد و به مدت یک دقیقه ورتکس گردید و سپس به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g در ۴ °C سانتریفوژ شد. آنگاه مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و بر روی آن ۷۵۰ μl از اتانل ۹۶٪ که به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال ۲۰ °C - نگهداری شده بود افزوده شد و پس از بستن سر لوله ۶ بار سروته گردید و به مدت ۲ ساعت در ۲۰ °C - انکوبه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g در ۴ °C سانتریفوژ گردید، مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب سفید رنگ باقیمانده در ته لوله با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. محتویات لوله به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد و میکروتیوب برای آگیری به صورت وارونه در روی دستمال کاغذی قرار گرفت. درب میکروتیوب به مدت ۱۰-۵ دقیقه به شکل باز نگهداری شد تا اتانل باقیمانده تبخیر شود و سپس ۵۰ μl از بافر [محتوی (pH=8) Tris-HCl ۱۰ mM و

الگوهای بیوشیمیایی، تعیین تیپ فاز، آنتی ژن های سطحی سلول و الگوی حساسیت به آنتی بیوتیک ها و عوامل ضد میکروبی تحت شرایط وضعیت های رشد، فاز رشد و جهش خود به خودی تمایل زیادی به تغییر دارند، ولی خصوصیات ژنتیک نظیر آنالیز DNA پلاسمیدی و کروموزومی با استفاده از پروب های DNA، PFGE (pulse field gel electrophoresis) و PCR (polymerase chain reaction) تغییرات کمتری را نشان می دهند (۸-۶). آنالیز DNA پلاسمیدی اطلاعات مفیدی را در مورد منشأ اپیدمی و تعداد کلون های متفاوت موجود در یک اپیدمی به دست می دهد (۱۱-۹). هدف این پژوهش راه اندازی استخراج و خلص سازی DNA پلاسمیدی باکتری ها و استفاده از الگوی پلاسمیدی باکتری ها برای پیدا کردن منشأ اپیدمی ها و همچنین مشخص کردن تعداد کلون های متفاوت موجود در اپیدمی محتمل بود که با استفاده از باکتری های شایع در عفونت های ادراری در بیماران بستری و سرپایی انجام شد.

اولین بار «مارمور» و همکارانش در ۱۹۶۱ توانستند با استفاده از روش سانتریفوژ شیب غلظتی DNA پلاسمیدی را از باکتری اشریشیاکلی جدا کنند (۱۲). از آن زمان به بعد روش های زیادی برای جدا کردن DNA پلاسمیدی از باکتری ها به کار برده شده است (۱۳ و ۱۴). این روش ها برای نوع خاص باکتری از قبیل باکتری های گرم مثبت (۱۹-۱۵) یا گرم منفی (۲۲-۲۰)، اندازه پلاسمیدها، تعیین الگوی پلاسمیدی، هضم با آنزیم های محدودالتر یا اهداف بالینی سازگار شده اند (۲۳).

بعد از استخراج DNA از الکتروفورز در ژل آگارز جهت جداسازی، شناسایی و خلص سازی DNA استفاده می شود. در این روش ساده و سریع جهت مشخص نمودن محل DNA در داخل ژل از رنگ آمیزی با رنگ های فلورسنت نظیر اتیدیوم بروماید یا SYBR Gold استفاده می شود (۲۴ و ۲۵).

از الگوی پلاسمیدی (۱ و ۲۶) و الگوی هضم پلاسمیدها با آنزیم های محدودالتر در مطالعات اپیدمیولوژیک به خوبی استفاده شده است. لذا این مطالعه جهت راه اندازی استخراج و خلص سازی DNA پلاسمیدی باکتری ها و استفاده از الگوی پلاسمیدی باکتری ها برای تجسس منشأ اپیدمی ها و همچنین مشخص کردن تعداد کلون های متفاوت موجود در باکتری های شایع در عفونت های ادراری در بیماران بستری و سرپایی انجام شد.

مواد و روش ها

تعداد ۱۰۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری بیماران بستری در بخش های ریه (۱۷ سویه)، کلیه (۱۴ سویه)، گوارش (۱۰ سویه)، مغز و اعصاب (۹ سویه) و بیماران سرپایی (۵۰ سویه) مرکز آموزشی- درمانی امام خمینی تبریز جمع آوری شدند. کلیه این سویه های باکتریایی جمع آوری شده با تعداد 10^5 CFU/ml از نمونه های ادراری بیماران به دست آمده و با روش های باکتریولوژیک مرسوم مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۹-۲۷). جهت انجام آزمون حساسیت در برابر مواد ضد میکروبی از روش دیسک

است. بیشترین تعداد پلاسمید در سویه های جدا شده از بخش کلیه به دست آمد. همچنین سویه های E.coli جدا شده از این بخش حضور پلاسمیدهای با وزن مولکولی بالا را نشان داد (جدول ۱).

در شکل ۱ الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از سویه های آزمایشی نشان داده شده اند. با توجه به حضور DNA کروموزومی در آزمایش های الکتروفورز به عمل آمده و مزاحمت باند یاد شده از نظر تعیین تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه ها نسبت به حذف DNA کروموزومی اقدام شد و بعد از حذف DNA کروموزومی نتایج بهتری از آنالیز پلاسمیدها به دست آمد.

جهت مشخص کردن باندهای open circular (oc) از باندهای covalently closed circular (ccc) از روش الکتروفورز دو بعدی و هضم آنزیمی پلاسمیدها استفاده شد. در روش الکتروفورز دو بعدی پس از تاثیر نور اولتراویوله باندهای OC جدید به وجود آمد که این باندها با باندهای OC قبلی و باندهای SC یک مثلث تشکیل دادند که از این طریق این باندها از یکدیگر شناسایی شدند. این روش در کلیه سویه های مطالعه شده موفقیت آمیز بود. در روش برش آنزیمی اگر یک محل شناسایی برای آنزیم در روی پلاسمید وجود داشته باشد آنزیم پلاسمید را از آن سایت برش داده و پس از برش فقط یک باند در الکتروفورز مشاهده می شود که در این تحقیق در بسیاری از موارد نتیجه موفقیت آمیز بود، گرچه در برخی از موارد بیش از یک محل شناسایی در روی پلاسمید وجود داشت که امکان افتراق باندها فراهم نگردید. بدین طریق باندهای OC شناسایی شد و در ثبت الگوی پلاسمیدی سویه های آزمایشی مد نظر قرار گرفت. الگوی برشی سویه های دارای پلاسمید با وزن مولکولی یکسان با استفاده از آنزیم های Eco RI, Hind III, SmaI و BamHI در شکل ۲ نشان داده شده است که در مواردی الگوی برشی متفاوت و در برخی از موارد الگوی برشی یکسانی حاصل شد. در بین پلاسمیدهای با الگوی برشی متفاوت باندهای مشابهی به دست آمد.

اشریشیاکلی همانند سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه از نظر مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها شهرت زیادی دارد و غالباً در درمان عفونت های ادراری ناشی از این باکتری از آنتی بیوتیک هایی از قبیل نیتروفوران توئین، نالیدیکسیک اسید، سپروفلوکساسین و کوتریموکسازول استفاده می شود (۳۴-۳۲). سویه های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی الگوی حساسیت متفاوتی را به آنتی بیوتیک ها نشان می دهند. در این پژوهش کلیه سویه های بررسی شده در برابر آمیکاسین حساس بودند. در حالی که ۹۹ سویه (۹۹٪) در مقابل آمپی سیلین مقاومت نشان دادند. مقاومت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و نیتروفوران توئین در سویه های جدا شده از بیماران بستری بیشتر از سویه های جدا شده از بیماران سرپایی بود. نتایج حاصل از آزمون حساسیت در برابر سپروفلوکساسین مقاومت بیشتری را در سویه های جدا شده از بیماران سرپایی در مقایسه با سویه های جدا شده از بیماران بستری نشان داد.

بر روی رسوب ریخته شد و رسوب در آن حل گردید. از لامبدا DNA برش داده شده با آنزیم های Eco RI و HindIII به عنوان کنترل مثبت و از اشریشیاکلی فاقد پلاسمید با PTCC شماره ۱۳۳۸ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج و خالص شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. بعد از تهیه ژل آگارز، ۵ μl از محلول DNA پلاسمیدی تهیه شده با ۱ μl از بافر لود کننده حاوی ۰/۲۵ درصد بروموفنل بلو، ۰/۲۵ درصد گزیلن سیانول و ۳۰ درصد گلیسرول در آب) مخلوط گردید و در چاهک موجود در ژل قرار داده شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل آگارز به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بافر محتوی ۰/۵ μg/ml اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. پس از رنگ آمیزی از نور اولتراویوله (۳۰۰nm) برای شناسایی باندهای DNA استفاده شد، برای تعیین اندازه قطعات بدست آمده از سایز مارکر لامبدا DNA استفاده شد.

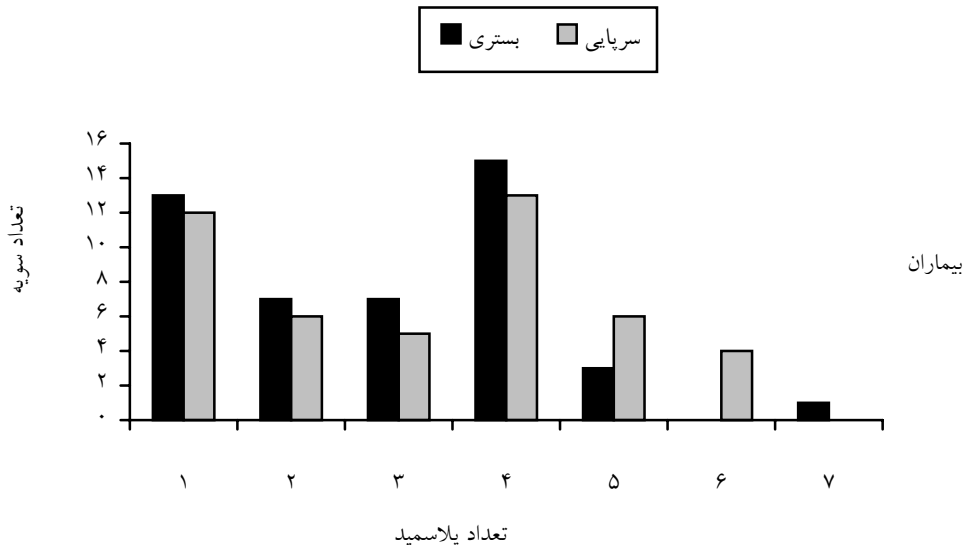
جهت شناسایی باندهای open circular (oc) از باندهای covalently closed circular (ccc) از الکتروفورز دو بعدی و برش آنزیمی با آنزیم های EcoRI و HindIII استفاده شد (۲۱، ۲۴ و ۳۰). برش آنزیمی پلاسمیدها با استفاده از آنزیم های محدودالتر Eco RI, Hind III, BamHI و SmaI مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده (Fermentase) انجام گرفت، که پس از برش دادن پلاسمیدها، در روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

سویه های جمع آوری شده از بیماران سرپایی و بستری با روش های مرسوم آزمایشگاهی تعیین هویت شدند. کلیه سویه ها از نظر تخمیر گلوکز و لاکتوز، حرکت، آزمایش MR و دکربوکسیلاسیون لیزین و تولید اندول مثبت بودند و از نظر استفاده از سیترات، آزمایش VP، اکسیداز و تولید اوره از منفی ثبت شدند. از نظر تولید SH₂ یک سویه مثبت وجود داشت و بقیه منفی بودند. نتایج مقاومت سویه های آزمایشی در برابر آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به شرح زیر بود: آمپی سیلین ۹۹ درصد، کوتریموکسازول ۷۳ درصد، سپروفلوکساسین ۳۶ درصد، نالیدیکسیک اسید ۴۳ درصد، نیتروفوران توئین ۴ درصد، در حالی که کلیه سویه های تحت مطالعه در برابر آمیکاسین حساس بودند. تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه های E.coli بررسی شده از ۱ تا ۷ عدد بود (موردار ۱).

اندازه مولکولی پلاسمیدهای جدا شده از ۰/۹ kb تا ۲۱ kb > متغیر بود. ده سویه فاقد هر گونه پلاسمید بودند، در حالی که در ۹۰ سویه باقیمانده حضور DNA پلاسمیدی به اثبات رسید. در ۲۶ سویه فقط یک پلاسمید شناسایی شد، در حالی که در ۶۴ سویه باقیمانده از ۲ تا ۷ پلاسمید شناسایی شدند.

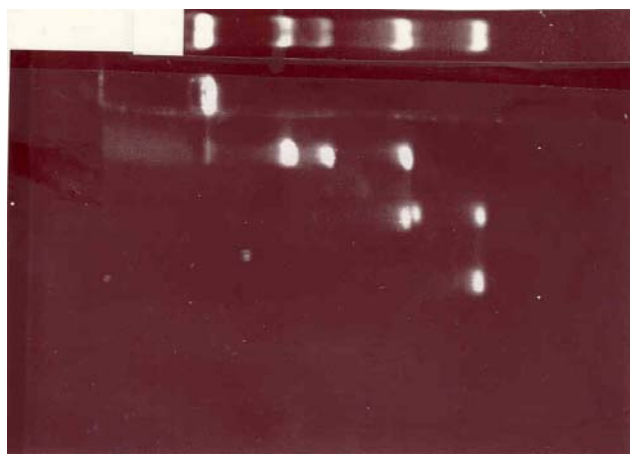
مقایسه الگوی پلاسمیدی مشابه در یک بخش و در بین بخش های بیمارستانی تحت مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده



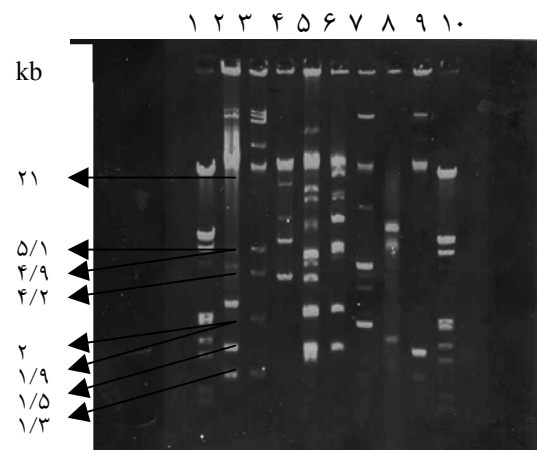
نمودار ۱: مقایسه تعداد پلاسمید در بین سویه های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی.

جدول ۱: الگوهای پلاسمیدی مشابه در یک بخش و در بین بخش ها

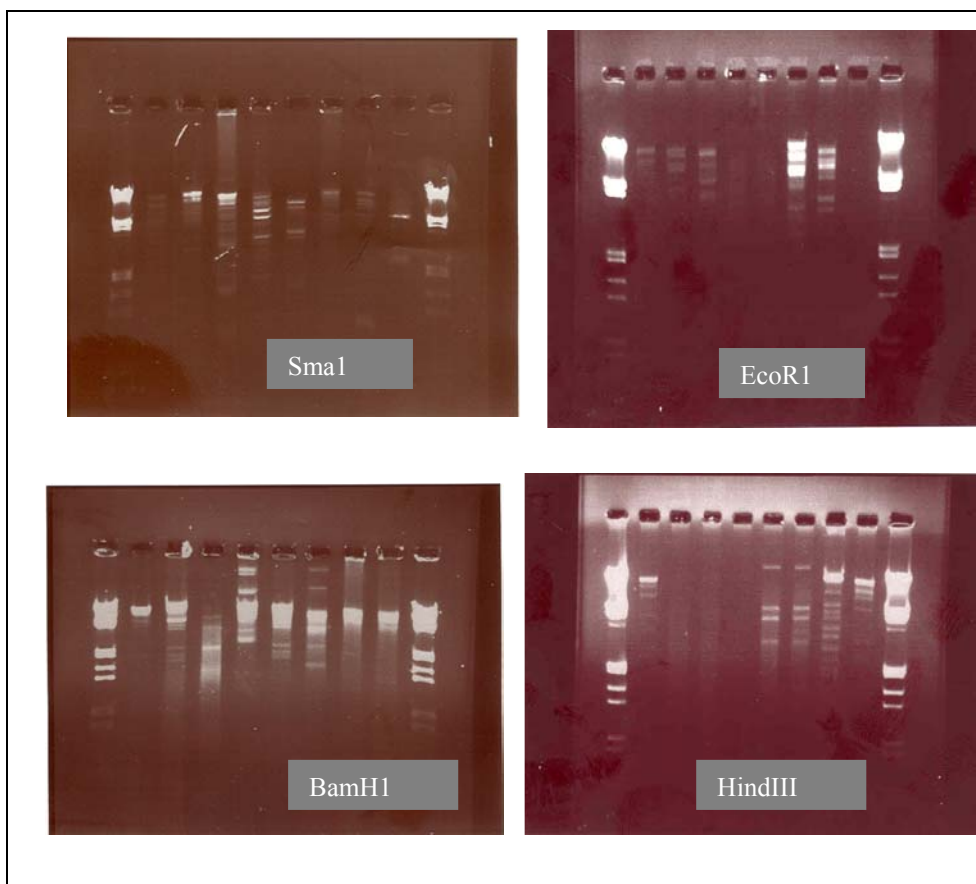
تعداد سویه های جدا شده با الگوی پلاسمیدی یکسان از بخش				الگوی پلاسمیدی (وزن مولکولی kb)
مغز و اعصاب	گوارش	کلیه	ریه	
۰	۲	۰	۰	>۲۱، ۲۱، ۱/۵، ۱
۱	۲	۲	۷	۲۱
۱	۰	۱	۰	۲۱، ۱۵، ۵، ۲/۵
۰	۰	۱	۱	۲۱، ۱۵، ۳/۵، ۲/۵
۰	۰	۱	۱	۲۱، ۳/۵، ۳، ۱/۷
۰	۰	۰	۲	۲۱، ۳/۵، ۱/۷، ۱/۳
۰	۰	۱	۲	۲۱، ۳، ۲/۵، ۱
۱	۰	۰	۱	۲۱، ۳، ۱
۰	۰	۲	۰	۲۱، ۱



شکل ۲: الکتروفورز دو بعدی جهت شناسایی باندهای open circular از باندهای خطی و supercoil، باندهایی که پس از الکتروفورز در جهت دوم با یکدیگر مثلث تشکیل می دهند مربوط به یک پلاسمید هستند.



شکل ۱: الکتروفورز DNA پلاسمیدی در ژل آگارز ۸ درصد: در این شکل با اعمال تغییراتی در روش استخراج DNA پلاسمیدی، باندهای مربوط به DNA کروموزومی حذف شده اند و باندهای مشاهده شده در ردیف اول (بعد از چاهک ها) در برخی از سویه ها، باندهای پلاسمیدی هستند.



شکل ۳: الگوی برشی سویه های دارای پلاسمید یکسان با آنزیم های SmaI, Hind III, EcoRI و BamHI
الگوهای برشی مشابهی در نتیجه اثر آنزیم های BamHI و Hind III مشاهده می شود.

بحث

فوتوتیپ باکتری ها با از دست دادن یا با کسب پلاسمیدها تغییر می یابند؛ به عنوان مثال، مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها از طریق پلاسمیدهای R منتقل می شود و شیوع خصوصیت خاص از طریق انتقال پلاسمیدها (انتقال عمودی و افقی) بهتر از انتقال یک کلون باکتریایی خاص اتفاق می افتد (۶).

نظر به اینکه خصوصیات فنوتیپی از قبیل الگوهای بیوشیمیایی، باکتریوفاژ تایپینگ، وجود آنتی ژن های سطحی سلول و الگوهای حساسیت ضد میکروبی بر اساس تغییرات در شرایط رشد، مرحله رشد و جهش خود به خودی تمایل به تغییر دارند، استفاده از این خصوصیات برای شناسایی منبع عفونت یا بیماری های ایجاد شده توسط گونه های هتروژن نظیر اشریشیاکلی مفید نبوده یا ارزش محدودی خواهد داشت، برای شناسایی اپیدمیولوژی چنین سندرم های چند عاملی و گونه های هتروژن استفاده از روش های مولکولی نظیر PFGE، AP-PCR و آنالیز الگوی پلاسمیدی یا استفاده از الگوی برشی DNA پلاسمیدی با کروموزومی به وسیله آنزیم های محدودالتر ضروری است (۸-۶).

عفونت دستگاه ادراری بیماری رایج و عود کننده ای است که سالانه تقریباً ۱۱ میلیون زن از آن متأثر می شوند و این عفونت یکی از علل اصلی عفونت های بیمارستانی به شمار می رود (۶ و ۲۷). معمولاً عفونت دستگاه ادراری به عنوان عامل اپیدمی در نظر گرفته نمی شود و فقط گزارش های محدودی از شیوع عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشریشیاکلی در خارج از بیمارستان در دست است (۶). احتمالاً چنین شیوع هایی اتفاق می افتند ولی به دلیل زیاد بودن این قبیل عفونت ها و اینکه ارگانسیم های بسیار متفاوتی در ایجاد آن نقش دارند به آسانی قابل ردیابی نیستند. اشریشیاکلی عامل تعدادی از بیماری های انسانی بوده و معمولاً (بیش از ۸۰ درصد موارد) عامل عفونت دستگاه ادراری است (۶، ۱۱ و ۳۱). این باکتری از نظر ژنتیکی هتروژن است و ترادف کمتر از ۷۰ درصد دارد، در حالی که ژنوم های انسان و شامپانزه ۹۸ درصد همولوژی ترادف نشان می دهند (۶). با توجه به هتروژنیته فوق و اینکه این باکتری جزو فلور طبیعی روده است، طبیعی است که سویه های بسیار متفاوتی از این باکتری باعث پیدایش عفونت دستگاه ادراری شوند (۶). ژنوم باکتری کاملاً تغییر پذیر است. علاوه بر اضافه شدن و حذف ژن های موجود در کروموزوم،

روش های متنوعی برای استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری ها وجود دارد (۱۷، ۱۶، ۳۵). در این پژوهش به دلیل سهولت و سرعت روش، عدم نیاز به اولتراسانتریفوژ و قیمت نسبتاً ارزان، مقدار DNA استخراج شده و مناسب بودن آن برای هضم آنزیمی از روش لیز قلیایی استفاده شد. بعد از استخراج DNA از باکتری های تحت مطالعه برای شناسایی پلاسمیدهای به دست آمده از الکتروفورز در ژل آگارز استفاده شد. با توجه به نتایج مطالعات اولیه^۱ و نیز نتایج سایر مطالعات (۲۴، ۲۵، ۳۶، ۳۷) از آگارز ۰/۸ درصد برای جداسازی پلاسمیدهای استخراج شده و از آگارز ۱ درصد برای مطالعه پلاسمیدهای برش داده شده با آنزیم های محدودالتر استفاده شد. در آزمایش الکتروفورز پلاسمیدها در سه شکل supercoil, linear, open circular ممکن است دیده شوند که هر یک باند مجزایی را در الکتروفورز ایجاد می کنند. شکل supercoil به خاطر فشرده بودن سریع تر از دو شکل دیگر حرکت می کند و بعد از آن شکل خطی و دست آخر open circular حرکت می کند (۱۱، ۲۱، ۲۴، ۳۸، ۳۹).

بهترین روش برای افتراق این سه شکل از DNA برش دادن پلاسمید با آنزیم های محدودالتر است، به شرطی که فقط یک محل شناسایی برای آنزیم در روی پلاسمید تحت مطالعه وجود داشته باشد. با الکتروفورز نمودن آنها در کنار یکدیگر می توان اشکال مختلف را شناسایی کرد (۲۴، ۴۰). در این پژوهش برای افتراق باندهای مختلف و شناسایی دقیق تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه های آزمایشی علاوه بر برش آنزیمی از روش الکتروفورز دو بعدی نیز استفاده شد. لازم به ذکر است که استفاده از الکتروفورز دو بعدی انتخاب باندهای open circular و supercoil را برای استخراج از ژل تسهیل می کند (۲۱). مطالعه الگوی پلاسمیدی روش مولکولی رایج در مطالعات اپیدمیولوژیک و برای بررسی ارتباط بین سویه های باکتریایی است. تعداد و اندازه پلاسمیدهای موجود به عنوان راهی برای شناسایی بهتر سویه های باکتریایی در آنالیز شیوع عفونت های بیمارستانی و عفونت های کسب شده از جامعه به کار می رود (۷، ۳۷ و ۴۱). استفاده از الگوی پلاسمیدی برای شناسایی سویه هایی که حاوی پلاسمیدهای چند گانه باشند بهتر جواب می دهد (۴۲). مطالعات متعددی در جهت اثبات شیوع باکتری های خاص با استفاده از الگوی پلاسمیدی انجام شده است. اشریشیاکلی از جمله باکتری هایی است که الگوی پلاسمیدی آن در محل های مختلف و از منابع متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است (۴۸-۴۳).

در این تحقیق الگوی پلاسمیدی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری بیماران بستری و سرپایی مطالعه شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که ۹۰ درصد سویه های تحت مطالعه حاوی پلاسمید بودند. نتایج مشابهی در سایر تحقیقات به دست آمده است. در تحقیقی که ورلاند^۲ و همکارانش بر روی اشریشیاکلی ها انجام دادند، ۸۷/۵ درصد از سویه ها دارای پلاسمید گزارش شدند (۴۹). در پژوهش دیگری که به وسیله ووجو^۳ و همکارانش بر روی اشریشیاکلی های به دست آمده از عفونت های دستگاه ادراری انجام شد، ۷۲ درصد سویه ها حاوی پلاسمید بودند (۱). در تحقیقات

انجام گرفته بر روی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت دستگاه ادراری در ایران نیز نتایج مشابهی حاصل شده است، به طوری که در مطالعات انجام شده به وسیله نوروزی و همکاران (۹۳/۹ درصد از سویه ها دارای پلاسمید گزارش شده اند) (۵۰). نتایج مطالعه امیدی و همکاران نیز بیانگر حضور پلاسمید در ۸۳/۲ درصد از سویه ها بوده است (۵۱). تعداد پلاسمیدهای جدا شده در سویه های مطالعه ما از یک تا ۷ عدد بود. در مطالعاتی که به وسیله یوسف و ملکاوی^۴ (۴۶) و ورلاند و همکارانش (۴۹) بر روی اشریشیاکلی ها انجام گرفت تعداد پلاسمیدها را از یک تا ۶ عدد گزارش نمودند. وزن مولکولی پلاسمیدهای شناسایی شده در مطالعه ما عمدتاً در محدوده ۱ kb تا ۲۱ kb بود و در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۲۱ kb نیز شناسایی شد. در تحقیق انجام گرفته به وسیله یوسف و ملکاوی اندازه پلاسمیدها از ۱/۵ kb تا ۵۴ kb گزارش شده است (۴۶). در مطالعه تسن و چای^۵ اندازه پلاسمیدها از ۲ kb تا ۲۲ kb بوده است (۴۷). در مطالعه حاضر ۸۴ درصد از سویه ها حاوی پلاسمید با وزن مولکولی ۲۱ kb بودند. از طرف دیگر، ۹۹ درصد سویه ها به آمپی سیلین مقاوم بودند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که ژن کد کننده مقاومت در برابر آمپی سیلین در روی پلاسمید ۲۱ kb قرار گرفته باشد. لازم به ذکر است که در مطالعه یوسف و ملکاوی، ژن کد کننده مقاومت به آمپی سیلین بر روی پلاسمید ۲۵ kb به اثبات رسیده است (۴۶). جهت اثبات ارتباط پلاسمید ۲۱ kb شناسایی شده در مطالعه حاضر و مقاومت در برابر آمپی سیلین با روش های حذف پلاسمید و مطالعه حساسیت باکتری یا با انتقال این پلاسمید به باکتری شناخته شده دیگر قابل انجام است که جهت اثبات این ارتباط مطالعاتی در حال انجام است.

در پژوهش حاضر از ۱۰۰ سویه مورد مطالعه ۴۴ الگوی پلاسمیدی به دست آمد که بیانگر حضور شایع پلاسمید در سویه های اشریشیاکلی در باکتری های محیط ما است. در مطالعه ووجو و همکاران بر روی اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری از ۳۲ سویه مورد مطالعه ۱۳ الگوی پلاسمیدی به دست آمد (۱) که نتایج این مطالعه مطابق با یافته های پژوهش حاضر است. در مطالعه انجام یافته به وسیله هونگ^۶ و همکاران بر روی اشریشیاکلی های به دست آمده از بخش هماتولوژی از ۸ سویه مورد مطالعه ۸ الگوی متفاوت به دست آمد (۴۸) که پراکندگی و تفاوت اساسی در الگوی پلاسمیدی در سویه های فوق الذکر را نشان می دهد. نتایج پژوهش حاضر حاکی از تشابه در الگوی پلاسمیدی سویه های جدا شده از یک بخش و نیز در بخش های مختلف تحت مطالعه بود. همچنین الگوهای پلاسمیدی یکسانی در سویه های جدا شده از بیماران سرپایی به دست آمد.

در مطالعات قبلی به حضور حداقل ۳ پلاسمید و تشابه آنها در سویه های مختلف به عنوان معیار قابل اطمینان در ایجاد ارتباط اپیدمیولوژیک اشاره شده است که چنین مطالعاتی به ویژه در سویه های استاتیلوکوک کواگولاز منفی، کلبسیلا پنومونیه و سایر باسیل های گرم منفی گزارش شده است (۷، ۴۲ و ۵۲). در مطالعه

- | | |
|----------------|---------------------|
| 1. Pilot study | 4. Malkavi & Yossef |
| 2. Vorland | 5. Tsen & Chi |
| 3. Woo-Joo | 6. Hong |

قدرت افتراق را افزایش می دهد (۷ و ۴۲). در این پژوهش سویه های دارای پلاسمید منفرد و دو تایی با آنزیم های محدودالایر EcoRI، HindIII، BamHI و SmaI برش داده شده و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج به دست آمده حاکی از تشابه الگوهای برشی در برخی سویه های به دست آمده از یک بخش خاص (ریه) بیمارستان بود که نشان دهنده منشأ منفرد این سویه ها از یک کانون است یا شیوع بالای انتقال ژن را در بین سویه های تحت مطالعه نشان می دهد.

حاضر الگوهای پلاسمیدی مشابهی با تعداد ۳ و بیش از ۳ پلاسمید در اشریشیاکلی های جدا شده از بخش ریه و بخش گوارش و نیز در بخش های گوارش و کلیه، اعصاب و کلیه، ریه، کلیه و ریه شناسایی شد که نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک آنها است. زمانی که تعداد پلاسمیدها کمتر از ۳ عدد و اندازه پلاسمیدها نسبتاً بزرگ باشد قدرت افتراق الگوی پلاسمیدی کاهش می یابد و باید از روش های دیگری نظیر برش آنزیمی برای افتراق سویه ها استفاده کرد (۷ و ۴۲).

استفاده از آنزیم های محدودالایر در پلاسمیدهای کوچکتر از ۵۰ که تعداد پلاسمید موجود در یک سویه نیز کمتر از ۳ عدد باشد،

References

1. Woo-Joo K, Hee-Jin J, Hyun-Jin P, Min-Ja K, Seung-chull P: Application of ribotyping for molecular epidemiologic study of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Korean J Infect Dis 1995; 27(6): 505-517.
2. Salyers AA, Whitt DD: Microbiology diversity, disease and the environment., Bethesda, Maryland, Fitzgerald Science Press 2001; 369-373.
3. Lionsquy G, Delaitte E, Pin P, Bourlioux P, Bourlioux N: Incidence of isolation and antibiotic resistance of E.coli responsible for urinary infections outside hospitals, in specialized hospitals and in general hospitals. Pathol Biol(Paris) 1984; 32(5): 389-92.
4. Selvarangan R, Goluszko P, Singhal J, Carnoy C, Moseley S, Hudson B: Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in Escherichia coli renal persistence. Infect Immun 2004; 72(8): 4827-35.
5. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O.: Uropathogenic Escherichia coli triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. Infect Immun 2004; 72(8): 4570-8.
6. Foxman B, Riley L: Molecular epidemiology: Focus on infection. Am J Epidemiol 2001; 153(12): 1135-1141.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Georing RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(6): 426-439.
8. Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A: Molecular analysis of pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. Irn J Med Sci 1996; 21(3&4): 118.
9. Bennet PM, Howe TGB: Topley and Wilson, bacterial and bacteriophage genetics in: systematic bacteriology, 9th ed. Arnold, Avon, bath press 1998; 251-261.
10. Actis LA, Tolmashy ME, Crosa JH: Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. Frontiers in Bioscience 1999; 3: 43-62.
11. Novick RP: Plasmids. Scientific American 1980; 243(6): 76-90.
12. Broda P: Plasmids, San Francisco, W.H. Freeman and Company Limited 1979; 5-22, 125-136.
13. Trevors JT: Bacterial plasmid isolation and purification. J Microbiol Meth 1985; 3: 259-271.
14. Gerry P, Le Blanc DJ, Falkow S: General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J Bac 1973; 116(2): 1064-1066.
15. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc Acids Res 1979; 7: 1513-23.
16. Holmes DS, Quigley M: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analy Biochem 1981; 114: 193-7.
17. Kado CI, Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145: 1365-1373.
18. Olsen JE: An improved method for rapid isolation of plasmid DNA from wild-type Gram-negative bacteria for plasmid restriction profile analysis. Letters Appl Microbiol 1990; 10: 209-12.
19. Domenico P, Marx JL, Schoch PE, Cunba BA: Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. J Clinic Microbiol 1992; 30: 2859-63.
20. Wilson CR, Totten PA, Baldwin JN: Rapid procedure for the detection of plasmids in Staphylococcus epidermidis. Appl Envir Microbiol 1978; 36: 368-74.
21. Nahaie MR, Goodfellow M, Harwood CR: A rapid screening procedure for staphylococcal plasmids. J Microbiol Meth 1984; 2: 73-81.
22. Takahashi S, Nagano Y: Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J Clinic Microbiol 1984; 20: 608-13.

23. Bertin A: Comparison of several procedures for plasmid profile determination in *Escherichia coli*. *J Microbiol Meth* 1995; 22: 109-117.
24. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning. A laboratory manual*, volume 1, 3rd ed. New York, CSHL Press 2001; 1.1-1.34, 5.1-5.17.
25. Vanden Heuvel JP: General molecular biology techniques in: *PCR protocols in molecular toxicology*, CRC Press LLC 1998; 177-221.
26. Petrovska M: "Plasmid profile of nosocomial *klebsiella pneumoniae*". N.d. Available From yahoo. <http://manu.edu.mk/rcgeb/tempus/>, Accessed 20 December 2002.
27. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: *Baily Scotts, diagnostic microbiology*. Eleventh edition. New York, Mosby 2002; 927-938.
28. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A: *Practical medical microbiology*. Thirteenth edition, Edinbourg ,Churchill Livingstone 1996; 361-384.
29. MacFaddin JF: *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2000; 221-232, 239-253.
30. Hinterman G, Fischer HM, Cramer R, Hutter R: Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* 1981; 5: 371-373.
31. Souza V, rocha M, Valera A, Eguiarte LE: Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *App and Env Microbiol* 1999; 65(8): 3373-3385.
32. Walker TS: *Microbiology, sanders text and review series*. Philadelphia, W.B Saunders 1998; 152-172.
33. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA: *Medical microbiology*, LANGE, twenty second edition. New York, Mc Grow Hill 2001; 88-108.
34. Moustou N, Soukri A, Elmdaghri N, Boudouma M, Benbachir M.: Molecular biology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Entrobacteriaceae* responsible for digestive tract colonization. *J Hos Infec* 2004; 57(3): 202-208.
35. Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*, second edition, New York,CHSL Press 1989.
36. Agarose gel electrophoresis. N.d. Available from yahoo. <http://faculty.plattsburgh.edu>, Accessed 4 December 2003.
37. Schaberg DR, Tompkins LS, Falkow S: Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacilli. *J Clinic Microbiol* 1981; 13(6): 1105-1108.
38. Lewin B: *Genes VI*. New York, Oxford 1997; 429-470, 505-530.
39. Isolation of plasmid DNA and restriction enzyme digests. *Honors cell and molecular biology laboratory*. BS/LBS/159H, 101-107.
40. Agarose gel electrophoresis of DNA. *Biotechnology Index*. N.d. Available from tbzmed. <http://arbl.cvms.colostate.edu>, Accessed 16 February 2003.
41. Tenover FC: Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. *Clin Lab Med* 1985; 5: 413-436.
42. Towner KJ, Cockayne A: *Molecular methods for microbial identification and typing*. London, Chapman & Hall 1995; 28-63.
43. Teophilo GN, Silva RH, Vieira F, Rodrigues P, Menezes FG: *Escherichia coli* isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int Microbiol* 2002; 5: 11-14.
44. Prats G, Mirelis B, Miro E, Navarro F, Liovet T, Johnson JR, Camps N, Dominguez A, Salleras L: Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with Salmonellosis. *Emerging Infect Dis* 2003; 9(10): 1273-1280.
45. Smith SI, Aboaba OO, Adebisi T, Onibokun H, Odun kwe NN: Plasmid profile of *Escherichia coli* O157:H7 from apparently healthy animals. *Afr J Biotechnol* 2003; 2(9): 322-324.
46. Malkawi HI, Youssef MT: Antibiotic susceptibility testing and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal patients. *J Trop Pediatr* 1998; 44(3): 128-132.
47. Tsen HY, Chi WR: Plasmid profile analysis for enterotoxigenic *Escherichia coli* and detection of heat stable enterotoxin I (ST1) gene by Polymerase Chain Reaction. *J Food and Drug Analysis* 1996; 4(3): 215-222.
48. Jin-Hong Y, Dong-Ho H, Dong-Wook K, Chi-Wha H, Yang-Ree K, Kyung-Mi K, Wan-Shik S, Chong-Won P, Chun-Choo K, Moon-Won K, Dong-Jip K: Molecular epidemiology analysis of outbreak of *Escherichia coli* bacteremia in Hemato-Oncology unit. *Korean J Infect Dis* 1995; 27(2): 175-180.
49. Vorland LH, Carlson K, Aalen O: Antibiotic resistance and small R plasmids among *Escherichia coli* isolates from outpatients urinary tract infections in Northern Norway. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 1985; 27(1): 107-113.
50. Nowroozi J, Jafari negad A, Owzaei E: Plasmid profiles of UTI patients with or without urinary stones. Abstracts, The 4th Congress of Microbiology, Shahed University, Tehran 2001; 141.
51. Omidi MN, Tavakoli A, Safaie HG, Shahcheraghi F: Plasmid analysis, antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from UTI. Abstracts, 6th Iranian Congress of Microbiology, Tehran 2004; 70.
52. Suljagic V, Cobeljic M: Reliability of plasmid profile analysis in the identification of epidemic strains of bacteria causing an outbreak of intestinal infections. *Vojnosanit pregl* 2001; 58(6): 615-20.