

مقایسه الگوی ژنتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی عامل پیلونفریت و سیستیت با استفاده از روش

Pulsed Field Gel Electrophoresis

مجتبی انوری نژاد^{۱*}، شهره فرشاد^۲، مرضیه حسینی^۳

خلاصه

مقدمه: عفونت مجاری ادراری یکی از معمول‌ترین عفونت‌های باکتریایی است که توسط گروهی از باکتری‌ها که به نام اوروپاتوژن اشریشیاکلی شناخته می‌شوند و دارای تنوع ژنتیکی زیادی می‌باشند ایجاد می‌شود. سیستیت و پیلونفریت دو نوع از علائم بالینی است که در بیماران مبتلا به این نوع از عفونت‌ها مشاهده می‌شود. تنوع ژنتیکی بالای ایزوله‌های اشریشیاکلی مانع تشخیص سوش‌های غالب در ایجاد عفونت مجاری ادراری می‌شود و هنوز این مسئله که آیا تمام ایزوله‌های اوروپاتوژن قادر به ایجاد هر دو بیماری پیلونفریت و سیستیت هستند یا خیر مشخص نیست. روش‌های مناسب و دقیقی برای تقسیم‌بندی ژنتیکی این ارگانسیم‌ها مورد نیاز است که یکی از بهترین این روش‌ها پالس‌فیلد (Pulsed Field) می‌باشد که در این مطالعه به منظور بررسی الگوی ژنتیکی ایزوله‌های عامل عفونت ادراری از آن استفاده شده است.

روش: این بررسی توصیفی - مقطعی بر روی ۹۰ سوش *Escherichia coli* جدا شده از کودکان مبتلا به عفونت‌های ادراری انجام گرفت و الگوهای ژنتیکی به دست آمده برای ۴۲ ایزوله عامل سیستیت و ۴۸ ایزوله عامل پیلونفریت با روش PFGE مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: با استفاده از روش PFGE کلاً ۶۶ الگو به دست آمد که بیشترین درصد ایزوله‌ها تعداد ۱۳ و ۱۲ باندها و کمترین درصد ایزوله‌ها تعداد ۱۹ و ۸ باندها تشکیل دادند. اندازه ژنوم ایزوله‌ها نیز ۴۱۷۰-۱۶۱۰ kbp بود. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که در بعضی موارد ایزوله‌های عامل سیستیت و پیلونفریت دارای الگوی مشترک می‌باشند و علائم بالینی متفاوت مربوط به بروز فاکتورهای مختلف است. واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، پیلونفریت، سیستیت، پالس‌فیلد ژل الکتروفورز

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۲- دانشیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی

استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۳- کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

* نویسنده مسؤول، آدرس: بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی • آدرس پست الکترونیک: manvarinejad@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۲/۲۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۹/۰۸/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۰۸/۱۶

مقدمه

عفونت های مجاری ادراری (Urinary Tract Infection: UTI) که شامل پیلوفریت و سیستیت می باشند، از شایع ترین عفونت های خارج روده ای هستند. مهم ترین عامل ایجاد کننده UTI در بزرگسالان و کودکان (۹۰-۸۰ درصد) به وسیله *E. coli* سویه UPEC صورت می گیرد (۳-۱). تجمع باکتری در قسمت های مختلف مجاری ادراری می تواند بافت های این بخش را درگیر کند و طبقه بندی UTI نیز بر اساس مکانی است که درگیر می شود. اگر تجمع باکتری در مجاری ادراری تحتانی مثل مثانه اتفاق بیفتد به آن سیستیت می گویند که این مورد در تمام سنین به خصوص در جنس مؤنث بسیار روی می دهد در حالی که مردان کمتر به آن مبتلا می شوند. علائم سیستیت درد بالای عانه، فوریت ادرار و سوزش ادرار می باشد. اگر باکتری قسمت مجاری فوقانی را درگیر کند به آن پیلوفریت گفته می شود. پیلوفریت یا همان عفونت کلیه که نوع حاد آن با علائم درد پهلو، تب، تهوع، استفراغ و ناخوشی همراه است ممکن است نشانه های سیستیت را نیز داشته باشد (۵،۴).

میزان شیوع UTI معمولاً به جنس و سن افراد بستگی دارد. در دوران نوزادی و در سال اول زندگی پسر بچه ها بیشتر از جنس مخالف به عفونت دستگاه ادراری مبتلا می شوند که یکی از دلایل آن نقص مادرزادی و رفلاکس وزیکواورترال می باشد اما بعد از ۱۲ ماهگی تقریباً عفونت UTI به دختران محدود می شود (۶،۵).

در تظاهرات مختلف بیماری مثل پیلوفریت و سیستیت عوامل وابسته به میزبان و ارگانیزم می توانند نقش مهمی ایفا کنند (۷،۳). به علاوه در مرحله کلونیزاسیون (مهم ترین مرحله بیماری UTI) و هم چنین هنگام غلبه بر سیستم دفاعی میزبان عوامل ویروالانس متفاوتی بوده که اجازه تهاجم به دستگاه ادراری را می دهند (۹،۸). با وجود این هنوز هیچ کدام از این عوامل یا هیچ فرمول خاصی از ترکیب چندتایی آنها شناخته نشده است که بتواند به طور منحصر

به فرد سوش های خاص UPEC دخیل در این تظاهرات مختلف بالینی بیمار را شناسایی نماید. به علاوه هنوز مشخص نیست که آیا تمام سویه های UPEC قادرند هر دو بیماری پیلوفریت و سیستیت را ایجاد کنند یا برای هر بیماری سوش های مشخصی وجود دارد (۷،۴). در دهه اخیر و به ویژه طی سال های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۷ دانشمندان تلاش های زیادی را به منظور به دست آوردن ژنوم و عوامل ویروالانس *E. coli* انجام داده اند. با مطالعه این بررسی ها می توان دریافت که با توجه به تنوع ژنتیکی این ارگانیزم به جز تعدادی فاکتور ویروالانس، هنوز ژن ویروالانس جدیدی کشف نشده است و بنابراین درک پایینی از پاتوژنز باکتریایی UTI وجود دارد (۱۱-۹). لذا نتایج حاصل از بررسی های مولکولی می توانند در انتخاب سوش ها و مکان های ژنی غالب برای ارزیابی اهمیت ژن هایی که جدید کشف می شوند بسیار کارآمد باشند.

از طرف دیگر روش های ژنوتیپی مثل PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) با قدرت افتراق بالا برای ارتباط بین سوش های داخل یک گونه استفاده می شود (۱۳،۱۲) به عنوان مثال در یک مطالعه بر روی ۱۵۶ سوش *E. coli* عامل عفونت ادراری با استفاده از این روش ۱۰-۱۵ باند و با وزن مولکولی ۱۲۰۰-۵۰ kbp به دست آمده است (۲). از این روش در میان روش های ژنوتیپی به عنوان روش استاندارد طلایی نام برده می شود (۱۶-۱۴).

هدف این تحقیق بررسی ژنتیکی انواع ایزوله های *E. coli* جدا شده از موارد عفونت های ادراری کودکان مبتلا به پیلوفریت و سیستیت با استفاده از روش PFGE می باشد (روشی که هم اکنون به علت پیشرفت های آن در استاندارد کردن شرایط الکتروفورز بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد). علاوه بر این به منظور ارائه روش قابل اعتماد برای افتراق سوش های جدا شده و این که آیا تمام سویه های UPEC قادرند هر دو بیماری پیلوفریت و سیستیت را ایجاد

کنند، در این مطالعه از الگوهای ژنتیکی PFGE استفاده شده است.

روش بررسی

جداسازی و تشخیص باکتری

در این مطالعه ایزوله‌های اشرشیاکلی از نمونه‌های ادرار کودکان ۱ ماهه تا ۱۴ ساله، مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان مطهری جهرم طی یک دوره یک ساله به روش Mid stream یا کیسه ادرار جمع‌آوری گردید. تشخیص UTI بر پایه علائم بالینی و نتایج آزمایشگاهی استوار گردید. این نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی استاد البرزی انتقال داده شدند و در محیط کشت Blood Agar و EMB کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت بررسی شدند. در صورت رشد ارگانیزم خالص بیش از 10^5 کلنی که دال بر عفونت ادراری است، برای تعیین نوع ارگانیزم و تأیید *E. coli* از رنگ‌آمیزی گرم، تست قند، تست ایندول و سیترات استفاده شد. از آنجایی که احتمال آلودگی ثانویه در حین جمع‌آوری نمونه‌ها وجود دارد سعی شد با هماهنگی پزشک مربوطه و با استفاده از تست‌های افتراقی این موضوع به حداقل برسد.

بیمارانی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند که عفونت‌های ادراری را از طریق جامعه کسب کرده بودند. به این ترتیب کودکانی که ۴۸ ساعت پس از بستری شدن در بیمارستان یا یک ماه قبل از نمونه‌گیری سابقه بستری شدن در بیمارستان داشته، هم‌چنین بیمارانی که در ۱۵ روز قبل از آزمایش آنتی‌بیوتیک مصرف کرده بودند از مطالعه حذف شدند.

Pulsed Field Gel Electrophoresis

این تست با استفاده از روش Eijmaes و همکاران با کمی تغییرات انجام گردید (۲). به‌طور خلاصه ایزوله‌ها بر روی

محیط کشت مولر هیتتون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌طور خالص کشت داده شدند و سپس با لوب از کلنی‌ها برداشته و با ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی مخلوط شد به‌صورتی که شدت جذب نور آن در طول موج ۶۱۰nm بین ۰/۶-۰/۷ باشد. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد تا رسوب میکروبی حاصل شود. سپس این رسوب با محلول شناورساز (resuspension) که حاوی ۱۰ میلی‌مول در لیتر Trise-HCl، pH=۸ و ۱۰۰ میلی‌مول در لیتر EDTA بود یک‌بار شستشو و دوباره رسوب میکروبی حاصل از سانتریفوژ با ۱CC بافر شناورساز مخلوط و به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفت.

در همین زمان LMA ۲٪ (Low Melting Agarose) به کمک بافر شناورساز تهیه و تا شفاف شدن کامل آن در حاوی محلول میکروبی اضافه و به‌خوبی مخلوط گردید. سپس به درون قالب (mold) انتقال داده شد و به مدت یک ساعت درون یخچال نگهداری گردید تا ژل کاملاً شکل گیرد.

ژل از درون mold با احتیاط خارج و درون ارلن انداخته شد. به هر ارلن ۲۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده (۵۰ میلی‌مول در لیتر Tris-HCL، pH=۸، ۵۰ میلی‌مول در لیتر EDTA و ۱٪ laurylsarcosin) اضافه گردید به‌صورتی که ژل در آن غوطه‌ور شود. سپس به هر کدام ۱۲۵ میکرولیتر پروتیناز K (MBI, Fermentas, Lithuania) اضافه و سپس به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه شیکر قرار داده شد.

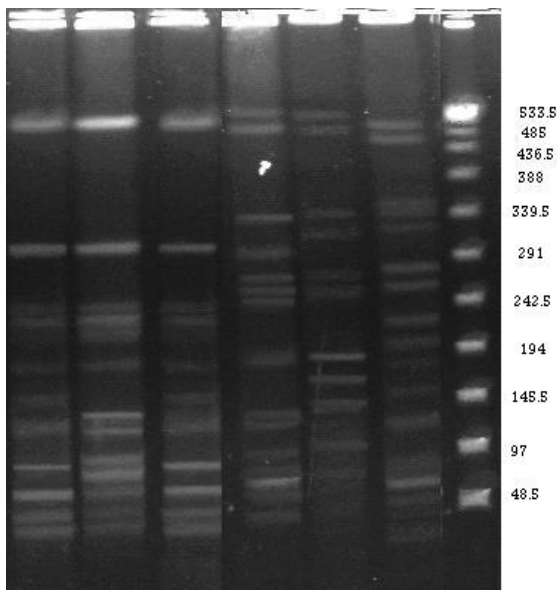
بعد از ۲۰ ساعت محلول lysis از درون ارلن خارج و سپس ژل درون ارلن ابتدا ۳ بار به‌وسیله آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۲ مرتبه به‌وسیله بافر شستشو (۱۰ میلی‌مول در لیتر Tris-HCl، pH=۸ و ۱ میلی‌مول در لیتر EDTA) استریل و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه شستشو

نتایج

از میان ۹۰ نمونه به‌دست آمده ۶۲/۵٪ متعلق به جنس مذکر و بقیه متعلق به جنس مؤنث با میانگین سنی ۲۶/۹±۲۱/۸ ماه بودند. در مجموع ۴۹/۲٪ از بیماران مبتلا به سیستیت و ۵۰/۸٪ بیماران مبتلا به پیلونفریت بودند.

الگوی Pulsed Field Gel Electrophoresis

بر اساس PFGE و مشاهده تشابه باندهای ژنتیکی در میان ۹۰ ایزوله *E. coli*، ۶۶ الگوی ژنتیکی به‌دست آمد که از S1 تا S66 نامگذاری شدند. در این میان ۱۶ الگو وجود داشت که در آن نمونه‌ها با یکدیگر کاملاً تشابه داشتند. به‌عنوان مثال در الگوی شماره S23، نمونه‌های C18، P68، P80، P19 و P13 و یا در الگوی شماره S44 نمونه‌های C39، C25 و P36 الگوی ژنتیکی یکسانی داشتند.



1 2 3 4 5 6 PFM

شکل ۱. الگوی پالس‌فیلد ژل الکتروفورزیس نمونه‌های اشریشیاکلی

کل ژنوم ارگانیزم درون حفرات قرار داده شد و سپس طبق روش ذکر شده به‌وسیله آتریم XbaI مورد برش قرار گرفته و پس از الکتروفورز باندهای مختلف برای هر ایزوله به‌دست آمد. نمونه‌های شماره ۱ و ۳ به ترتیب مربوط به دو نمونه سیستیت و پیلونفریت بوده که کاملاً با یکدیگر مشابه بوده و دارای دودمان (clonality) یکسان می‌باشند.

ستون PFM: مارکر به قدرت تفکیک 1000bp

داده شد. شستشو بر روی شیکرانکو باتوردار و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس ژل با احتیاط از درون ارلن خارج و به کمک یک کاردک به قطعات کوچک (۳ قطعه) تقسیم و یک قطعه از آن به درون تیوب اپندورف استریل انتقال یافت و با توجه به پروتکل کارخانه سازنده با ۵۱۱ از آنزیم XbaI (MBI, Fermentas, Lithuania) به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور گردید. در مرحله بعد بافر تانک (running buffer) شامل Trise base (pH=۸/۳)، Boric acid و EDTA (Gene Navigator System, Amersham Bioscience, Sweden) و به درون دستگاه PFGE منتقل شد. همین‌طور با استفاده از این بافر ژل مورد نظر (NA Agarose Amersham BioSciences, Sweden) که نمونه‌ها بایستی در آن الکتروفورز شوند به‌صورت ۱/۲ درصد ساخته شد و بعد از شکل‌گیری ژل، نمونه‌ها به درون حفرات که به‌وسیله شانه ایجاد شده بودند منتقل و سپس با Low Melting Agar ۱٪ در بافر تانک پوشانده شدند و پس از چند دقیقه نمونه به‌منظور جداسازی ژنوم به درون دستگاه منتقل گردید تا به‌طور کامل در بافر غوطه‌ور شوند. در هر تست در یکی از حفرات مارکر مخصوص PFGE (PFM) به‌نام (lambda ladder) قرار گرفته شد که در مراحل بعدی با توجه به وزن ملکولی مارکر اندازه باندهای نمونه‌ها تعیین شد. شرایط انجام آزمایش بدین صورت بود: زمان انجام آزمایش ۳۳ ساعت، درجه حرارت ۱۴ درجه سانتی‌گراد، زاویه بین میدان‌های الکتریکی ۱۲۰ درجه، ولتاژ ۶ ولت در هر سانتی‌متر، ۵ ثانیه زمان initial switch و ۴۰ ثانیه زمان final switch. بعد از اتمام زمان نمونه‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و سپس به کمک دستگاه Gel logic 2000 (Kodak, USA) و با استفاده از نور UV به‌کاررفته در آن از نمونه‌ها عکس‌برداری گردید. سپس به کمک نرم‌افزار Photocapt تعداد و اندازه باندهای جدا شده هر ایزوله در مقایسه با مارکر مخصوص PFGE تعیین گردیده و در نتیجه الگوهای ژنوتیپی سوش‌ها با یکدیگر مقایسه شدند.

جدول ۱. فراوانی تعداد باندهای حاصل از الکتروفورز پالس فیلد ژل در سوش های UPEC جدا شده از کودکان

تعداد باندهای <i>E. coli</i> (درصد)	تعداد باندها
(۱/۱)۱	۸
(۳/۳)۳	۹
(۵/۵)۵	۱۰
(۱۳/۳)۱۲	۱۱
(۲۳/۳)۲۱	۱۲
(۲۵/۵)۲۳	۱۳
(۸/۸)۸	۱۴
(۶/۱)۶	۱۵
(۷/۷)۷	۱۶
(۳/۳)۳	۱۷
(۱/۱)۱	۱۹

بر اساس الگوهای مشاهده شده الگویی که بیشترین تکرار را داشت الگوی شماره S2 با ۱۲ باندها بود که در میان ۵ ایزوله تکرار شده بود. طیف اندازه باندها از ۲ کیلو جفت باز تا ۶۶۰ کیلو جفت باز و تعداد باندها از ۸ الی ۱۹ باندها متغیر بود. فراوان ترین الگوها شامل الگوهای ۱۳ و ۱۲ باندها بودند که به ترتیب در ۲۵/۵٪ و ۲۳/۳٪ ایزوله ها مشاهده شدند. این در حالی بود که الگوهای ۱۹ و ۸ باندها ۱/۱٪ از کل الگوها را شامل می شدند. فراوانی الگوهای مختلف بر اساس تعداد باندها در جدول ۱ نشان داده شده است.

تعداد الگوها نیز به تفکیک عامل بیماری زایی، عبارت از ۳۶ الگو برای نمونه های عامل پیلونفریت و ۳۰ الگو برای سیستمیت بود. بیشترین و کمترین تعداد و اندازه باندها و ژنوم به تفکیک ایزوله های پیلونفریت و سیستمیت در جدول شماره ۲ مشخص شده است.

جدول ۲. تنوع ژنتیکی سوش های اشریشیاکلی عامل پیلونفریت و سیستمیت بر اساس اندازه ژنوم و تعداد و اندازه باندها

در روش الکتروفورز پالس فیلد ژل

مشخصات ژنتیکی	نمونه های پیلونفریت	نمونه های سیستمیت	مجموع نمونه ها
تعداد باندها	۸-۱۹	۹-۱۶	۸-۱۹
اندازه باندها	۱۰-۶۷۰ kbp	۲-۶۶۰ kbp	۲-۶۶۰ kbp
اندازه ژنوم	۱۶۱۰-۴۱۷۰ kbp	۱۶۳۰-۳۷۴۰ kbp	۱۶۱۰-۴۱۷۰ kbp

بحث و نتیجه گیری

باکتری اشریشیاکلی فلور طبیعی روده می باشد و یکی از گونه های متنوع باکتریایی است که تنوع زیاد آن موجب ابهامات زیادی شده است (۷،۱۰). هنوز مشخص نیست که آیا هر کدام از بیماری های عفونت مجاری ادراری توسط ایزوله های خاصی ایجاد می شود یا سوش های مشابه با منشأ clonality یکسان باعث علائم بالینی متفاوتی می شوند (۴). اکثر سویه های اشریشیاکلی تا زمانی که در روده هستند هیچ خطری ندارند ولی اگر در قسمت های دیگر بدن نظیر

دستگاه ادراری تناسلی، آپاندیس، کیسه صفرا، دستگاه تنفسی و ملتحمه چشم و... وارد شوند می توانند به تنهایی یا به کمک سایر باکتری ها ایجاد عفونت نمایند (۱۷). در افتراق عفونت مجاری ادراری فوقانی از تحتانی در کودکان علائم سیستمیک، نشانه های بالینی و همین طور یافته های آزمایشگاهی زیاد کمک کننده نیستند (۶،۱۸،۱۹)، بنابراین به منظور ارائه روش قابل اعتماد برای افتراق ایزوله های جدا شده و کشف مکان های ژنی غالب و اینکه آیا تمام سویه های UPEC قادرند هر دو بیماری پیلونفریت و

سیستیت را ایجاد کنند، الگوهای ژنتیکی این سوش‌ها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

از آنجایی که خصوصیات ژنتیکی تغییرات کمتری نشان می‌دهند (۲۰،۲۱) می‌توان از آنها برای بررسی الگوی ژنتیکی استفاده کرد. از میان این روش‌ها بیشترین و معمول‌ترین آن که برای دسته‌بندی و مطالعه ارتباط بین سوش‌های یک گونه در مناطق مختلف کاربرد دارد تکنیک PFGE می‌باشد (۲۲،۲۳). در واقع مقایسه الگوی پالس‌فیلد روش مفیدی برای به‌دست آوردن ارتباط احتمالی بین ایزوله‌های یک گونه می‌باشد (۲۴).

آنزیم‌های محدودکننده مهم‌ترین عامل در شکستن DNA و ایجاد باند در طول ژل در تکنیک PFGE می‌باشند. این آنزیم‌ها برای هر باکتری اختصاصی است که ما در اینجا از آنزیم XbaI استفاده کردیم که توالی نوکلئوتیدی

$$5\text{-T}\downarrow\text{CTAGA}\dots 3\text{-}$$

$$3\text{-A GATC}\uparrow\text{G}\dots 5\text{-}$$

در ژنوم ایزوله‌های *E. coli* را مورد شناسایی قرار می‌دهد (۲۷-۲۵) و یکی از معمول‌ترین آنزیم‌هایی است که در مطالعات سوش‌های اشریشیا کلی به کار برده می‌شود (۲۴). آنزیم فوق در این طرح به‌طور موفقیت‌آمیزی در افتراق ایزوله‌های (UPEC) و تولید باندهایی با وضوح بسیار عالی استفاده شد. تعداد بخش‌های DNA که در این مطالعه به‌وسیله این آنزیم ایجاد شد برای سویه‌های پیلونفریت بین ۸ تا ۱۹ باند و برای سویه‌های عامل سیستیت بین ۹ الی ۱۶ تکه بود. وزن مولکولی باندها نیز بسیار متنوع بود که برای سوش‌های عامل هر بیماری در جدول شماره ۲ مشخص شده است. با توجه به این که نمونه‌ها در مدت زمان یک سال و در یک جامعه از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بودند این نتایج قابل پیش‌بینی بود. در بررسی دیگری با استفاده از روش PFGE روی اورپاتوژن‌ها ۱۹-۲۴ باند و با وزن مولکولی ۳۰-۵۰۰ kbp به‌دست آمده است (۲۸).

یکی از کاربردهای پالس‌فیلد تخمین اندازه ژنوم میکروارگانیزم‌ها می‌باشد که با جمع کردن باندهای جداسازی شده برای هر ایزوله به‌دست می‌آید. این نتایج با مطالعات گذشته که در مورد ارگانیزم‌های مختلف صورت گرفته قابل مقایسه است. با به‌دست آوردن اندازه متفاوت ژنوم سوش‌های داخل یک گونه می‌توان به تنوع ژنتیکی آن گونه پی برد (۲۹،۳۰). در این بررسی نیز اندازه ژنوم سوش‌ها بسیار متفاوت بود که برای سویه‌های عامل پیلونفریت بین ۱۶۱۰ kbp تا ۴۱۷۰ kbp و برای سویه‌های سیستیت ۱۶۳۰ تا ۳۷۴۰ جفت باز متغیر بود و نشان داد که داخل یک گونه سوش‌های مختلف و ناهمگونی وجود دارد و *E. coli* از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار می‌باشد.

در تظاهرات مختلف بالینی عفونت‌های مجاری ادراری عوامل وابسته به میزبان و ارگانیزم نقش مهمی دارند (۳،۷۸). بیشتر سوش‌های UPEC چندین فاکتور بیماری‌زا را به‌طور هم‌زمان بیان می‌کنند. بعضی از این فاکتورهای اصلی ارگانیزم در سوش‌های ایجادکننده این دو نوع بیماری مشترک است اما پراکندگی آنها متفاوت است به‌عنوان مثال توزیع پراکنده فیمبریه P باعث به‌وجود آمدن عفونت‌های مختلف مجاری ادراری می‌شود (۳۱،۳۲). سموم و کپسول‌ها بیشتر در ارتباط با پیلونفریت می‌باشند (۳۱،۳۳) اما آدهزین‌های (Dr adhesions) Dr به‌خصوص در کودکان بیشتر در ارتباط با سیستیت می‌باشند (۱). سیستم آئروباکتین بیشتر در میان سوش‌های عامل پیلونفریت دیده می‌شود که این احتمالاً به دلیل توانایی بیشتر سوش‌های *E. coli* در ایجاد سیستیت به نسبت عفونت‌های ته‌اجمی مجاری ادراری می‌باشد چرا که UPEC نیاز کمتری به عوامل بیماری‌زا برای به‌وجود آمدن سیستیت دارند. به‌طور کلی سوش‌های UPEC عامل سیستیت از سوش‌های ایجادکننده پیلونفریت متفاوتند (۱،۳۴).

در سویه‌هایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار داده شد الگوی خاصی که در تظاهرات بالینی دخیل باشد دیده

سوش‌های یک گونه به روش PFGE به دست آمده (۳۷-۳۵، ۲۳) نتایج مطالعه حاضر زیاد تعجب‌آور نیست. در واقع سوش‌های یکسان با فاکتورهای ویروالانس مشابه ممکن است در مناطق جغرافیای مختلف پراکندگی متفاوتی داشته باشند که این موضوع نیز باعث به وجود آمدن الگوهای متفاوت (باندهای متفاوت در تعداد و اندازه) از سوش‌های *E. coli* در مناطق مختلف می‌شود، که این تفاوت در تعداد و اندازه باندها و ژنوم با توجه به علایم بالینی عفونت ادراری در شهر جهرم در جدول شماره ۲ بیان شده است. علاوه بر اینکه مدت زمان و مکان نمونه‌گیری می‌تواند باعث به وجود آمدن تنوع الگوها در میان نمونه‌های این مطالعه بشود، اما دلایل دیگری از قبیل بازآرایی توالی‌ها، حذف یا اضافه شدن DNA و یا تعویض بازها نیز می‌تواند باعث تنوع الگوها شود که برای بررسی آزمایشات بیشتری مورد نیاز است.

با توجه به بررسی مطالعات گذشته، این اولین مطالعه برای بررسی شیوع UTI در کودکان یک منطقه در ایران است که در آن برای دسته‌بندی و چگونگی ارتباط ژنتیکی بین سوش‌های عامل پیلونفریت و سیستیت در کودکان از روش PFGE استفاده شد. کشف الگوهای ژنتیکی در سوش‌های UPEC و پراکندگی آنها در شناخت مکان‌های ژنی غالب باعث آنالیز بیشتر این سوش‌ها و دریافت این مطلب که چگونه تفاوت ژنتیکی باعث ایجاد بیماری‌های مختلف می‌شود، خواهد شد. تنوع ژنتیکی بسیار بالای *E. coli* مانع تشخیص الگوی خاص در ایجاد بیماری‌های سیستیت و پیلونفریت و همین‌طور ارتباط بین سوش‌های ایجاد UTI در کودکان و فرم بالینی عفونت شد.

در پایان نیز بایستی یادآور شد با وجود اینکه از روش PFGE به عنوان روش استاندارد طلایی در مطالعات اپیدمیولوژیک نام برده می‌شود اما به تنهایی با استفاده از این روش نمی‌توان شباهت کامل دو ایزوله را اثبات کرد. به همین دلیل و نیز به علت اهمیت موضوع پیشنهاد می‌شود

نشد، اما تعدادی از سویه‌ها با الگوی ژنتیکی کاملاً یکسان (به عنوان مثال c1 و p28) هم در سیستیت و هم در پیلونفریت نقش داشتند که نشان می‌دهد از یک کلون به وجود آمده‌اند، که این ممکن است به دلیل مشترک بودن فاکتورهای بیماری‌زا در این دو نوع بیماری باشد و تفاوت نه چندان زیاد تعداد ژن‌های عوامل بیماری‌زا باعث به وجود آمدن الگوهای مشابه در PFGE می‌شود. دلیل دیگری که می‌توان عنوان کرد مربوط به بیان ژن‌های کدکننده پیلوسینی می‌باشد که در صورت روشن بودن این ژن، باکتری به صورت بالارونده در مجاری ادراری حرکت کرده و باعث عفونت کلیه و ایجاد پیلونفریت می‌شود و در صورت خاموش بودن باعث ایجاد عفونت در مثانه می‌شود، در نتیجه سویه‌ها با الگوی ژنتیکی یکسان باعث ایجاد بیماری‌های متفاوت می‌شوند. در بررسی‌های گذشته Rasko و همکاران نشان دادند که ایزوله‌های پیلونفریت دارای ژن‌های مخصوصی هستند که فقط باعث ایجاد عفونت کلیه می‌شوند، بدین معنی که سوش‌های پیلونفریت و سیستیت از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر متفاوتند و این تفاوت ژنتیکی فاکتورهاست که باعث ایجاد بیماری‌های مختلف می‌شود و در روش‌های ملکولی مثل PFGE نیز باعث به وجود آمدن الگوهای متفاوتی می‌شود (۴).

در این مطالعه و با استفاده از این روش در مجموع ۶۶ الگو (۳۶ الگو برای نمونه‌های عامل پیلونفریت و ۳۰ الگو برای سیستیت) به دست آمد. همان‌گونه که در جدول شماره ۱ عنوان شده است بیشترین درصد سوش‌های با تعداد ۱۳ و ۱۲ باند به ترتیب ۲/۲۵٪ و ۳/۲۳٪ و کمترین درصد سوش‌ها با تعداد ۱۹ و ۸ باند بودند که ۱/۱٪ از نمونه‌ها را تشکیل دادند و بیشترین الگویی که در میان نمونه‌ها تکرار شد الگوی شماره ۲ با ۱۲ باند در میان ۵ سوش بود. الگوهای به دست آمده در این مطالعه نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بسیار بالای *E. coli* در این منطقه می‌باشد. از آنجایی که با توجه به مطالعات گذشته که الگوهای متفاوتی از

سپاسگزاری

این طرح در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۲-۸۴ در مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی شیراز انجام گرفته است. در پایان لازم است از همکاری صمیمانه کارکنان این مرکز کمال تشکر و قدردانی را نمایم.

پژوهش‌های مرتبط در این زمینه به صورت وسیع انجام گرفته تا شباهت کامل و قطعی ایزوله‌ها با روش‌های ملکولی دیگر به اثبات رسانده شود و ویژگی‌های باکتری‌های مقاوم، اپیدمیولوژی و ارتباط آن با چگونگی مصرف کلیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج بررسی گردد.

Comparison of Genetic Patterns of *E. coli* Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis, Using Pulsed Field Gel Electrophoresis

Anvarinejad M., M.Sc.,^{1*} Farshad Sh., Ph.D.,² Hoseini M., B. Sc.¹

1. Microbiologist, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Associate Professor of Microbiology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

* Corresponding author; e-mail: manvarinejad@yahoo.com

(Received: 14 Nov. 2009 Accepted: 7 Nov. 2010)

Abstract

Background & Aims: Urinary tract infection (UTI) is one of the most frequently acquired bacterial infections caused by a large genetically heterogeneous group of *Escherichia coli* which are called uropathogenic *E. coli* (UPEC). Cystitis and pyelonephritis are two most common symptoms seen in patients with UTI. The genetic diversity of this organism has hampered the identification of UTI strains and it is unclear whether all UPEC isolates are capable of causing both cystitis and pyelonephritis. Therefore, Careful selection of appropriate genotyping methods is mandatory. The most popular method is Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) that is used in the present study to evaluate the genetic patterns of UPEC.

Methods: In this cross-sectional study a total of 90 *E. coli* strains consisting of 48 isolates causing pyelonephritis and 42 isolates causing cystitis in children were analyzed by PFGE and their corresponding patterns were compared.

Results: Sixty six PFGE profiles were obtained from the genome of *E. coli* strains by this genotyping method. Most strains exhibited twelve and thirteen bands and the patterns with eight or nineteen bands had the lowest rate. Genome size of strains was between 1610-4170 kbp.

Conclusion: According to these results, it can be suggested that in some cases the strains causing pyelonephritis or cystitis have common patterns and different clinical symptoms could be attributed to different gene factors.

Keywords: *Escherichia coli*, Pyelonephritis, Cystitis, Pulsed Field Gel Electrophoresis

References

1. Johnson DE, Lockatell CV, Russell RG, Hebel JR, Island MD, Stapleton A, et al. Comparison of Escherichia coli strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3059-65.
2. Ejmaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, et al. Pulsed field gel electrophoresis typing of escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1776-81.
3. Houdouin V, Bonacorsi S, Mahjoub-Messai F, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Sebag G, et al. Phylogenetic groups and virulence factors of Escherichia coli strains causing pyelonephritis in children with and without urinary tract abnormalities. *Clinical Microbiology and infection* 2007; 13(7): 740-2.
4. Rasko DA, Phillips JA, Li X, Mobley HLT. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic Escherichia coli CFT 073: probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis* 2001; 184: 1041-9.
5. Sussman M. Urinary tract infection: A clinical overview. In: Sussman M (editor), Molecular medical microbiology. Vol 2, United States of America, Academic Press 2001; p 1510.
6. Overturf GD. Urinary tract infection In: Jenson HB, Baltimore RS (editors), Pediatric infection disease. 2nd ed., USA, Saunders Company, 2002; p 983.
7. Marrs CF, Zhang L, Faxman B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli pathotypes. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 252(2): 183-90.
8. Ishitoya S, Yamamoto S, Kanamaru S, Kurazono H, Habuchi T, Ogawa O, Terai A. Distribution of afaE adhesins in Escherichia coli isolated from Japanese patients with urinary tract infection. *J Urol* 2003; 169(5): 1758-61.
9. Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of Escherichia coli: a comparative genomics approach. *PNAS* 2006; 103(15): 5977-82.
10. Zhang L, Foxman B, Manning SD, Tallman P, Marrs CF. Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 2000; 68(4): 2009-15.
11. Bauer AP, Ludwig W, Schleifer KH. A novel DNA microarray design for accurate and straightforward identification of Escherichia coli safety and laboratory strains. *Syst Appl Microbiol* 2008; 31(1): 50-61.
12. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms In: murray PR Baron EJ, Pfaller MA, et al (editors), Manual of clinical microbiology, 7th ed., Washington, ASM press, 1999; p127.
13. Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC. Molecular analysis by pulsed field gel electrophoresis and antibiogram of streptococcus pneumoniae serotype 6B isolates from selected areas within the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2703-7.
14. Fitzgerald C, Helsel LO, Nicholson MA, Olsen SJ, Swerdlow DL, Flahart R, et al. Evaluation of methods for subtyping

- campylobacter jejuni during an outbreak involving a food handler. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2386-90.
15. Gerner Smidt P, Kincaid J, Kubota K, Hise K, Hunter SB, Falr MA, et al. Molecular surveillance of shiga toxigenic Escherichia coli O157 by Pulse Net USA. *J Food Port* 2005; 68(9): 1926-31.
 16. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Reza S, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive -sequence -based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 199-207.
 17. Ebrahimzadeh MA, Mahdavee MR, Vahedi M. Antibiotic resistance in E. coli isolated from urine: A2-years study isolated from patient with urinary tract infections in Iran. *J Cell Tissue Res* 2005; 5(2): 445-8.
 18. Hoberman A, Charron M, Hickey RW, Baskin M, Kearney DH, Wald ER. Imaging studies after a first febrile urinary tract infection in young children. *N Eng J Med* 2003; 348(3): 195-202.
 19. Mohkam M, Karimi A, Karimi H, Sharifian M, Armin S, Dalirani R, Abdollah Gorgi F. Urinary Interleukin-8 in acute pyelonephritis of children. *Iranian J Kidney Dis* 2008; 2(4): 193-6.
 20. Foxman B, Riley L. Molcular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153(12): 1135-41.
 21. Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A. Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. *Iran J Med Sci* 1996; 21(3&4): 118.
 22. Alfizah H, Nordiah AJ, Rozaidi WS. Using pulsed field gel electrophoresis in the molecular investigation of an outbreak of Serratia marcescnes infection in an intensive care unit. *Singapore Med J* 2004; 45(5): 214-8.
 23. Gautom RK. Rapid Pulsed -field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997; 35(11): 2977-80.
 24. Watabe M, Hogg GM, Millar BC, Crothers L, Rooney PJ, Loughrey A, et al. Epidemiological study of E. coli O157: H7 isolated in northern Ireland using pulse field gel electrophoresis. *Ulster Med J* 2008; 77(3): 168-74.
 25. Basim E, Basim H. Pulsed field gel electrophories technique and its use in molecular biology. *Turk J Biol* 2001; 25: 405-18.
 26. Chu G. Pulsed field gel electrophoneia: theory and practice. In: Birren B, Lai E (editors) *Methods: A companion to methods in enzymology* 1990; 1(2): 129-42, San Diego, Academic Press.
 27. Goering R. Molecular epidemiology of nosocomial infection analysis of chromosomal restrict fragments pattern by PFGE. *Infect Control Hosp Epidemial* 1993; 14: 595-600.
 28. Kawamori F, Hiroi M, Harada T, Ohata K, Sugiyama K, Masuda T, et al. Molecular typing of Japanese Escherichia coli O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable number tandem repeat analysis and PFGE. *J Med Microbiol* 2008; 57: 58-63.
 29. Lin WJ, Johnson EA. Genome analysis of Clostridium botulinum type A by PFGE. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(12): 4441-7.
 30. Bautsch W, Grothues D, Tummler B. Genome fingerprinting of Pseudomonas

- aeruginosa by two-dimensional field inversion gel electrophoresis. *FEMS Microbiol lett* 1988; 52(3): 255-8.
31. Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect chemother* 2007; 13(2): 68-73.
32. Blackwood RA, Rode CK, Pierson CL, Bloch CA. PFGE genomic fingerprinting of hospital *Escherichia coli* bacteraemia isolates. *J Med Microbiol* 1997; 46: 506-10.
33. Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50(5): 255-60.
34. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4445-6.
35. Li Q, Sherwood JS, Logue CM. Characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from processed bison carcasses. *J Appl Microbiol* 2007; 103(6): 2361-9.
36. Bannerman TL, Honcock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulse Field Gel Electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3): 551-5.
37. Nikbin VS, Abdi-Ali A, Feizabadi MM, Gharavi S. Pulsed Field Gel Electrophoresis and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. *Iranian J Med Res* 2007; 126(2): 146-51.