# شناسایی ژن های کدکننده بیوفیلم(agg) در جدایه های بالینی اشریشیاکلی انترواگریگیتیو به روش Multiplex-PCR

راضیه جعفری[۱]، کیومرث امینی[۲*]، بهروز شجاعی سعدی[۳]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳**

## چکیده

***مقدمه:*** بیوفیلم مجموعه ای از سلول های میکروبی است که به طور برگشت ناپذیر به سطح وابسته و به وسیله شستشو ملایم از بین نمی روند. ژن aggR بر روی پلاسمید اصلی(pAA) که بسیاری از فاکتورهای حدت را کد می کنند، قرار دارد. سویه های پاتوژن EAEC دارای ژن aggR بوده که این ژن در شش دسته از اشریشیاکلی بیماریزای روده ای شناسایی شده است.

***مواد و روش ها:*** در تحقیق حاضر تعداد ۶۰ نمونه مدفوع از کودکان با میانگین سنی ۴ تا ۷ سال جمع آوری گردید و پس از کشت و آزمایش های بیوشیمیایی نظیر: کاتالاز، اکسیداز، محیط TSI شناسایی شدند.

***یافته های پژوهش:*** ژن aggA در ۷ نمونه ۱۱/۶ درصد، agg4A ۹ نمونه ۱۵ درصد، aggR ۵ نمونه ۸ درصد مثبت بودند. هم چنین مشخص شد که ۲۸ درصد سویه های جدا شده حداقل واجد یکی از فاکتورهای حدت aggR، aggA، agg4A بودند.

***بحث و نتیجه گیری:*** سویه های تیپیکال EAEC با دارا بودن ژن aggR شیوع بالائی در سویه های ایزوله شده در این منطقه نشان داده اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویرولانس دارای هتروژنی هستند. از راه های محدود کردن عفونت های این باکتری، تهیه واکسن علیه سویه پاتوژن است.

**واژه های کلیدی:** اشریشیاکلی، Multiplex PCR، aggR، aggA، بیوفیلم

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

*Email:dr_kumarss_amini@yahoo.com*

*Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.*

## مقدمه

باکتری اشریشیاکلی توانایی کلونیزه شدن و پایداری در میزبان های حیوانی، انسانی و محیط را دارد. اشریشیاکلی باکتری گرم منفی و میله ای شکل است که معمولاً در روده موجودات خونگرم یافت شده، به عنوان بخشی از فلور طبیعی روده انسان طبیعتاً غیر بیماریزا است، لیکن برخی از سروتیپ های آن می توانند باعث مسمومیت غذایی جدی در انسان شوند. عفونت مجاری ادراری ناشی از این باکتری یکی از شایع ترین عفونت های باکتریایی و دومین عفونت شایع و از علل عمده مراجعه بیماران به بیمارستان ها است در میان همه عوامل باکتریال بیماریزای ادراری در بیماران سرپایی و بستری، اشریشیاکلی، باسیل گرم منفی و فلور طبیعی روده، شایع ترین عامل است که بین ۷۵ تا ۹۰ درصد در موارد عفونت ادراری جدا شده است(۱). در طبیعت، باکتری ها به دو شکل پلانکتونیک و بیوفیلم یافت می شوند. بیوفیلم باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتری ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می چسبند. بیوفیلم ها مجموعه ای از سلول های میکروبی هستند که به طور برگشت ناپذیر به سطح وابسته اند و به وسیله شستشو ملایم از بین نمی روند. علاوه بر این، تمایز سلول های غیر متصل(Planctonic) به شکل بیوفیلم بالغ، تغییرات فنوتیپی را ایجاد می کند که دارای پیامدهای عمده ای از قبیل افزایش مقاومت به عوامل ضدمیکروبی و از بین نرفتن توسط دفاع میزبان است. بیش از ۵۰ درصد عفونت های باکتریایی گزارش شده شامل تشکیل بیوفیلم اند. تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف باکتری ها از جمله اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده‌شده است(۲). اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک (Enteropathogenic Escherichia coli)، اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic Escherichia coli)، اشریشیاکلی انتروهموراژیک (Enterohemorrhagic Escherichia coli)، اشریشیاکلی دیفیوز ادهیرنت (Diffuse-adhering Escherichia coli)، اشریشیاکلی انتروایونویسیو (Enteroinvasive Escherichia coli)، و اشریشیاکلی انترواگرگیتیو (Enteroaggregative Escherichia coli) سویه های اشریشیاکلی انترواگرگیتیو عامل ایجاد اسهال حاد و مزمن و اسهال پایدار در کودکان، می باشند. این سویه ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی اگرگیتیو به سلول های اپیتلیالی مانند HeLa و 2-HEp هستند(۲). استفاده از روش PCR بر اساس حضور ژن های مرتبط با حدت، تشخیص سویه های EAEC را بهبود می بخشد. پاتوژنز و نحوه بیماریزایی سویه های EAEC به طور کامل مشخص نشده است و بسیاری از ژن های کدکننده فاکتورهای ویرولانس سویه های EAEC بر روی پلاسمید ۶۵-۶۰ مگادالتونی باکتری(pAA) قرار دارند. فعالیت اکثر ژن های کدکننده فاکتورهای ویرولانس در سویه های EAEC توسط یک ژن تنظیم کننده اصلی به نام aggR کنترل می شود(۲). ژن aggR بر روی پلاسمید اصلی ویرولانس باکتری(pAA) که بسیاری از فاکتورهای ویرولانس را کد می کند قرار دارد، سویه های دارای رگولون aggR به نام سویه های EAEC تیپیک(EAEC Typical) نام گذاری شده اند و اعتقاد بر این است که سویه های بالقوه پاتوژن EAEC دارای ژن aggR می باشند(۳،۴). مکانیسم های بیماریزایی هر یک از این پاتوتیپ ها به طور ژنتیکی توسط کروموزوم، پلاسمید و یا باکتریوفاژ کد می‌شود و هر پاتوتیپ ژن های ایجادکننده بیماریزای مخصوص به خود را دارد یا به عبارتی دیگر حضور یا عدم حضور یک یا چندین فاکتور ویرولانس باعث شناسایی این پاتوتیپ ها می شود(۵). ژن agg شش دسته از اشریشیاکلی بیماریزای روده ای شناسایی شده که بیماریزایی پنج گونه از آن ها برای انسان به اثبات رسیده است، این سویه ها دارای الگوی چسبندگی اختصاصی اگرگیتیو به سلول های اپیتلیالی مانند HeLa و 2-HEp هستند(۸-۶). تغییرات فنوتایپی باعث تغییر سلول های اشریشیاکلی از حالت غیر متصل(Planctonic) به حالت متصل می شود. رشد بیوفیلم باکتری های پاتوژن اغلب منجر به عفونت هایی می شود که تحمل به آنتی بیوتیک ها و پاسخ های ایمنی میزبان را افزایش می دهد. بیوفیلم ها

به طور تیپیک به وسیله سلول های باکتریایی متراکم و کلاسترهای فوق العاده هیدراته از سلول باکتری مشخص می شوند. مولکول ها و ساختارهای سطحی مختلف در تشکیل بیوفیلم در اشریشیاکلی دخیل دانسته شده اند(۸،۹). بیوفیلم ها به آرامی و آهسته رشد می کنند و در مکان های مختلف رشد و پرورش آن ها صورت می گیرد و بیماری ها و عفونت های سرایت کننده بیوفیلم آن قدر آهسته پیش می رود که برای آشکارسازی، علائم کفایت نمی کند. به هر حال باکتری بیوفیلم می تواند به روش های مختلف و به راحتی به بافت های جدید، عفونت و آلودگی را سرایت دهد(۱۰). علاوه بر این، تمایز سلول های غیر متصل به شکل بیوفیلم بالغ، تغییرات فنوتایپی را ایجاد می کند که دارای پیامدهای عمده ای از قبیل افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی و از بین رفتن توسط دفاع میزبان است. این تغییرات فنوتایپی باعث تغییر سلول های اشریشیاکلی از حالت پلانکتونی به شیوه زندگی بدون تحرک می شود(۱۱). پس از این که اهمیت بیوفیلم ها در ایجاد عفونت ها خصوصاً عفونت های بیمارستانی مشخص گردید، تحقیق روی مکانیسم مقاومت های داروئی بیوفیلم ها افزایش پیدا کرد. تاکنون درباره علل مقاومت باکتری های مقیم بیوفیلم چهار دلیل اصلی ارائه شده است: الف) فنوتیپ تطبیقی: فنوتیپ مقاوم در بیوفیلم تطابق پیدا نموده و باقی می ماند و توسط آنتی بیوتیک از بین نمی رود. بعد از مدتی فنوتیپ مقاوم، نوع غالب خواهد بود. حدس می زنند که حدود ۰/۱ درصد تا ۱۰ درصد باکتری های بیوفیلم مقاوم باشند. زمانی که آنتی بیوتیک قطع می گردد باکتری ها رشد مجدد کرده و فعالیت خود را آغاز نموده و یک بیوفیلم تازه تشکیل می دهند و به همین دلیل بیماری ضرورت پیدا می کنند(۱۲). دانشمندان پیشنهاد کرده اند که عواملی هم چون pH، هیدراتاسیون سطح و غلظت کاتیون های دو ظرفیتی می تواند فعالیت بیوسایدها را از محیط های اسیدی و بی هوازی موجود در لایه های عمیق بیوفیلم تحت تاثیر قرار دهد(۱۳،۱۴). هدف از این مطالعه، تعیین حضور ژن های بیوفیلم در ایزوله های اشریشیاکلی مولد اسهال در نمونه های بالینی به روش Multiplex PCR بوده است.

## مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی نمونه های مدفوعی به تعداد ۶۰ مورد جمع آوری شده از کودکان با میانگین سنی ۴ تا ۷ سال مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مدفوع به وسیله محیط انتقالی کری بلیر به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی منتقل گردید. جداسازی و تعیین هویت باکتری برای تایید وجود اشریشیاکلی و جداسازی باکتری، نمونه ها بر روی محیط های انتخابی و افتراقی مانند مک کانکی آگار (مرک، آلمان)، EMB (مرک، آلمان)، ECC (E.coli Chrome Agar)(هایمدیا، هندی)، کشت داده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شوند. بعد از گرمخانه گذاری جهت شناسایی حضور باکتری E.coli، آزمون های تاییدی بیوشیمیایی شامل: آزمون های IMViC، TSI ( Triple Sugar Iron) Agar (مرک، آلمان)، جهت تشخیص نهایی انجام می گردد(۱۵).

*آزمون های بیوشیمیایی جهت تشخیص باکتری E.coli*: برای تایید نهایی پس از کشت روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار EMB آگار و ECC و E.coli chrome Agar تشخیص باکتری اشریشیاکلی با روش های میکروب شناسی شامل آزمودن کاتالاز و اکسیداز و استفاده از محیط های افتراقی مانند TSI، SIM، MRVP، سیمون سیترات، اوره آگار، نیترات آگار، و نیز آزمون های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها، طبق جدول تشخیص میکروب شناسی انجام گرفت. ضمناً بر روی مک کانکی پرگنه های لاکتوز مثبت و بر روی EMB نیز پرگنه های لاکتوز مثبت به همراه جلای فلزی و نیز کلنی های آبی بر روی محیط ECC و محیط اشریشیاکلی Chrome Agar بررسی شد. سپس سویه های جداسازی شده در محیط های کشت TSAدر دمای ۴ درجه سانتی گراد و نیز TSB گلیسیرین دار در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد(۱۵).

*جداسازی و تایید بیوشیمیایی اشریشیاکلی:* نمونه ها ابتدا در محیط مک کانکی و آگار خون دار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. کلنی اشریشیاکلی در محیط مک کانکی به دلیل تخمیر لاکتوز صورتی رنگ است. بعد از انکوباسیون کلونی های لاکتوز مثبت از محیط مک کانکی به محیط EMB منتقل شد و باکتری ها توسط آزمون های بیوشیمیایی(IMViC) برای شناسایی اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت، که در صورت مثبت بودن دو آزمون اول(اندول و متیل رد) و منفی بودن تست(ووژپرسکائر و سیترات) تائید قطعی صورت گرفت(۱۶).

*بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری(EAEC):* برای انجام آزمایش از روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer استفاده شد. ابتدا کشت تازه ۲۴ ساعته از باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و سپس از کلنی های ظاهر شده بر سطح محیط کشت با حل نمودن دو تا سه پرگنه در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی سترون سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu $ml^{-۱}$) تهیه شد. سپس با کمک سوآپ سترون از هر باکتری بر روی محیط MHA به صورت متراکم کشت داده شد. پس از ۵ دقیقه که رطوبت ناشی از سوسپانسیون باکتری ها جذب محیط شد، دیسک های آنتی بیوتیک مورد نظر برای هر باکتری به کمک پنس استریل با رعایت فاصله هر دیسک از دیگری و نسبت به لبه پلیت بر روی محیط MHA قرار داده شد. پلیت های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت هاله های عدم رشد اندازه گیری و با جدول استاندارد آنتی بیوتیک ها بررسی شدند(۱۷،۱۸).

*بررسی تشکیل بیوفیلم(EAEC) با روش میکروتیتر پلیت:* بررسی تشکیل بیوفیلم(EAEC) با روش میکروتیتر پلیت با استفاده از روش اتصال به کریستال ویوله(Crystal Violet; CV) انجام شد(۲۲). برای بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، نخست یک لوپ از کلنی باکتری را به یک لوله حاوی ۵ میلی لیتر لوریا برتانی(LB) تلقیح و این لوله به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. بعد از گذشت این مدت و فعال شدن باکتری ها، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط استریل LB تلقیح شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی لیتری برداشته و داخل چاهک های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل LB قرار داده شد. بعد از تلقیح درب پلیت گذاشته شد و گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت. بعد از گذشت این مدت، محتوی داخل چاهک ها خالی شد و شستشوی چاهک ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. پلیت ها به شدت تکان داده شدند تا سلول های غیر متصل حذف شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به چاهک ها اضافه گردید تا سلول ها تثبیت گردند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک ها تخلیه شد و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت ها خشک گردید. سپس هر چاهک را با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲ درصد(CV) به مدت ۵ دقیقه رنگ شد. بعد از ۵ دقیقه، چاهک ها با آب شهری به آرامی شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به عنوان حلال پر شدند و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب نوری چاهک های رنگ شده با کریستال ویوله در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA plate reader خوانده شد(۱۹).

*استخراج DNA و Multiplex-PCR:* استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت تجاری سیناکلون (EX6011) انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول شماره ۱ ذکر شده است. مخلوط ترکیبات مورد استفاده جهت انجام واکنش Multiplex-PCR شامل: آب مقطر ۱۲/۷ میکرولیتر، 10X. PCR buffer به میزان ۲ میکرولیتر، MgCl2 1.5 mM به میزان ۰/۵ میکرولیتر، ( dNTP mix 5 Mm) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای ۰/۵ µM مورد استفاده هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase 2.5 unit به میزان ۰/۳ میکرولیتر، نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه می گردد.

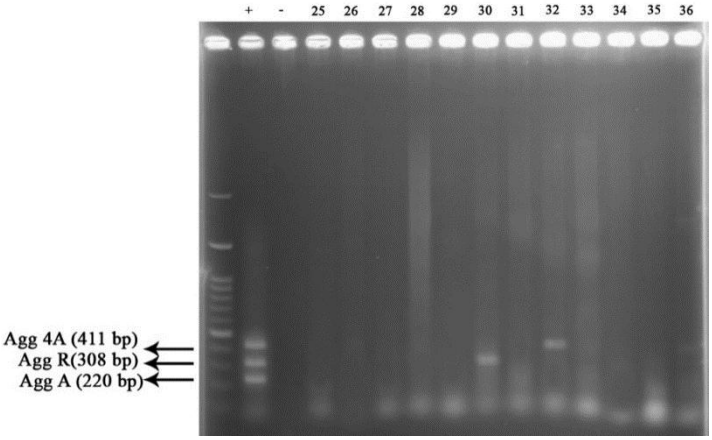
*برنامه آزمون Multiplex-PCR*: مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله چسبیدن ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ چرخه)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه هست. بعد از انجام آزمون Multiplex-PCR در دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی محصول نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار می گیرد. جدول شماره ۱ پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می دهد(۲۰).

**جدول شماره ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون Multiplex-PCR (۲۳).**

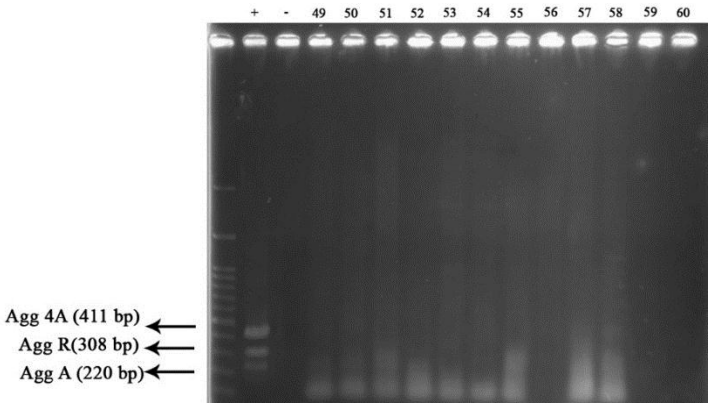
| پرایمر | توالی پرایمر('3–5') | طول محصول(bp) |
|---|---|---|
| aggR-F | ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG | ۳۰۸ |
| aggR-R | ATACAGAATCGTCAGCATCAGC | ۳۰۸ |
| agg4A-F | TCC ATT ATG TCA GGC TGC AA | ۴۱۱ |
| agg4A-R | GGC GTT AAC GTC TGA TTT CC | ۴۱۱ |
| aggA-F | TCT ATC TRG GGG GGC TAA CGC T | ۲۲۰ |
| aggA-R | ACC TGT TCC CCA TAA CCA GAC C | ۲۰ |

## یافته های پژوهش

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در این منطقه سویه های EAEC یکی از شایع ترین پاتوژن های روده ای محسوب می گردند. در PCR ژن pCVD432 به عنوان معمول ترین هدف جهت شناسایی مولکولی این سویه ها می باشد. سویه های تیپیکال EAEC سویه های تیپیکال EAEC با دارا بودن ژن aggR شیوع بالایی در سویه های ایزوله شده در این منطقه را نشان داده اند و با توجه به الگوی فاکتورهای ویرولانس دارای هتروژنی هستند. ژن aggA در ۷ نمونه ۱۱/۶ درصد، agg4A ۹ نمونه ۱۵ درصد، aggR ۵ نمونه ۸ درصد مثبت بودند. هم چنین مشخص شد که ۲۸ درصد سویه های جدا شده حداقل واجد یکی از فاکتورهای حدت aggR، aggA، agg4A بودند.




**تصویر شماره ۱. نتایج آزمون Multiplex PCR از چپ به راست: چاهک اول Ladder 100bp ، چاهک دوم: کنترل مثبت باند٤١١(agg4A)-باند ۳۰۸ aggR bp، باند ۲۲۰bp - aggA)- چاهک سوم: کنترل منفی-چاهک چهارم تا پانزدهم شامل نمونه های ۳٦-۲۵ بالینی مثبت**




**تصویر شماره ۱. نتایج آزمون Multiplex PCR از چپ به راست: چاهک اول Ladder 100bp ، چاهک دوم: کنترل مثبت باند۴۱۱ (agg4A)-باند ۳۰۸ bp aggR، باند۲۲۰ bp (aggA) -چاهک سوم: کنترل منفی-چاهک چهارم تا پانزدهم شامل نمونه های ۶۰-۴۹ بالینی مثبت**

*نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت:* از میان ۶۰ نمونه مورد مطالعه ۱۶ نمونه(۲۶/۷ درصد) توان تشکیل بیوفیلم را به طور متوسط داشته اند و هیچ یک از ایزوله ها توانایی تشکیل بیوفیلم را به صورت قوی نداشته اند(جدول شماره ۲).

**جدول شماره ۳. توزیع ایزوله های جداسازی شده برحسب تشکیل بیوفیلم**

| ردیف | منبع نمونه | تعداد | میزان تشکیل بیوفیلم برحسب تعداد و درصد | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | عدم تشکیل بیوفیلم | تشکیل بیوفیلم ضعیف | تشکیل بیوفیلم متوسط | تشکیل بیوفیلم قوی |
| ۱ | بالینی | ۶۰ | ۳۲ (٪۵۳/۳) | ۱۲ (٪۲۰) | ۱۶ (٪۲۶/۷) | - |

## بحث و نتیجه‌گیری

اسهال در ایران در مناطق مختلف دارای شیوع متفاوتی بوده که در هر سال ۱/۶ میلیون ابتلا گزارش می شود که این رقم در سال ۲۰۰۳ به ۷۱۰۰۰ نفر کاهش یافت و این موضوع با مصرف مواد پروتئینی گوشتی در ارتباط بوده است(۲۰). Makled و همکاران در تحقیقی که تعداد ۱۰۰ نمونه از کشت باکتری بیماران مشکوک به عفونت دستگاه ادراری (UTI) جمع آوری گردید. با استفاده از تست های بیوشیمیایی متداول E.coli بودن ۷۰ نمونه تائید گردید. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژن با استفاده از روش Kirby-Bauer مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل بیوفیلم این باکتری با روش میکروتیترپلیت بررسی شد. به منظور بررسی اتصال باکتری و میزان هیدروفوبیسیتی، روش هیدروکربن اکتان استفاده شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج، حضور ژن های pap و sfa به روش Multiplex PCR مورد بررسی گرفت. از مجموع ۱۰۰ نمونه مورد بررسی به کمک روش های بیوشیمیایی متداول ۷۰ نمونه به عنوان اشریشیاکلی یوروپاتوژن شناسایی شدند. نتایج نشان دادن که این باکتری با هیدروفوبیسیتی ۲۳ درصد توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد. از نظر میزان تشکیل بیوفیلم ۸۶ درصد قدرت بسیار کم، ۲/۸ درصد قدرت متوسط و ۱۱/۲ درصد دارای قدرت بسیار بالا نشان دادند. هم چنین بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش Multiplex PCR بر روی ۱۰ نمونه ای که بالاترین قدرت تشکیل بیوفیلم را داشتند، ۱۰ نمونه(۱۰۰ درصد) واجد ژن pap، ۷ نمونه (۷۰ درصد) واجد ژن sfa و ۷ نمونه(۷۰ درصد) نیز به طور هم زمان دارای ژن pap و sfa بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن های pap و sfa شایع ترین ژن های کدکننده پیلی در اشریشیاکلی های جدا شده از عفونت ادراری هستند که می توانند به اتصال این باکتری به بافت های میزبانی و تشکیل بیوفیلم های مقاوم به آنتی بیوتیک کمک کنند(۲۱،۲۲). در تحقیقات بعدی در سال ۲۰۰۱ که بر روی همین سویه ها انجام

گرفته است فقط ۴۶/۹ درصد این سویه ها با پروب اختصاصی سویه های EAEC واکنش دادند. اگر روش هیبریدیزاسیون در این مورد ملاک قرار گیرد میزان شیوع حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد خواهد بود که نزدیک به میزان فراوانی سویه های EAEC در این مطالعه می باشد. فراوانی سویه های EAEC در مناطق مختلف جغرافیایی بسیار متفاوت است. به طوری که فراوانی آن در شیلی ۳۳ درصد، هند ۲۰ درصد، برزیل ۶۹ درصد، آلمان ۲ درصد، سوئد ۱۲ درصد، استرالیا ۶/۵ درصد، نیجریه ۳۹ درصد، ژاپن ۳۷/۳ درصد و افریقای جنوبی ۱۹/۶درصد است که نشان دهنده شیوع کمتر در کشورهای صنعتی نسبت به کشورهای در حال توسعه، می باشد. در این مطالعه ۲۸ درصد سویه های جداشده حداقل یکی از فاکتورهای ویرولانس aggR، aggA، agg4A را دارا بودند. aggA در ۷ نمونه ۱۱/۶ درصد، agg4A ۹ نمونه ۱۵ درصد، aggR ۵ نمونه ۸ درصد مثبت بودند. از طرفی Jiang و همکاران در بررسی بیماران آمریکایی دارای اسهال مسافرتی مشاهده کردند، در سویه های EAEC جدا شده از این بیماران پس از ژن aggA شیوع ژن aggR از سایر فاکتورهای ویرولانس بیشتر است. هم چنین مشاهده کردند که سیتوکین های اینترلوکین ۸ و اینترفرون گاما در مدفوع افراد مبتلابه سویه های EAEC دارای رگولون aggR بسیار بالاتر از افرادی است که مبتلابه عفونت سویه های EAEC فاقد ژن aggR می باشند. به همین جهت پیشنهاد کردند که سویه های EAEC دارای هر دو ژن aggR و aafA یا هر کدام از این ژن ها به تنهایی سویه های پاتوژن می باشند(۲۳). از ۱۴۰ بیمار مبتلابه اسهال ۱۵(۱۰/۸ درصد) سویه اشریشیاکلی دارای ژن pCVD432 ایزوله گردید. ژن aggR در ۱۱ سویه(۷۳/۳ درصد) سویه شناسایی گردید. ژن های aggA و aafA به ترتیب در ۳ و ۴ ایزوله وجود داشت. ژن aap در ۹ سویه و ژن astA در ۷ سویه مثبت گزارش گردید. چندین ترکیب مختلف از شاخص های ژنتیکی در بین سویه های EAEC مشاهده شد و مشخص گردید که شایع ترین الگوهای ژنومی aap-aggR با ۵۳/۳ درصد و aafA-aggR با ۲۶/۷ درصد بودند. Lewis و همکاران در سال ۲۰۰۵ نقش بیوفیلم باکتری را در حفاظت از سیستم ایمنی، مورد آزمایش قرار داده و مشخص شد که بیوفیلم باکتریایی توانایی حفظ ارگانیسم در برابر ماکروفاژ را دارد(۲۴،۲۵). نوروزی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مقایسه توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های تولیدکننده ESBL و غیر ESBL نشان داد که میزان تولید بیوفیلم در سویه های ESBL باکتری اشریشیاکلی بیشتر بوده که این امر سبب افزایش مقاومت باکتری و در نتیجه افزایش توان بیماریزایی آن می شود(۲۶). در سال ۲۰۰۳ Faurschou و همکاران در تحقیقی که انجام دادند گزارش نمودند که تشکیل بیوفیلم در موتانت های اشریشیاکلی به لحاظ دارا بودن پیلی و فلاژل در این سویه ها، این اجزا در تشکیل ابتدایی بیوفیلم نقش نداشته ولی این ضمایم می توانند در توسعه بیوفیلم باکتری در موضع کلونیزه شده موثر باشند(۲۷). Ponnusamy در سال ۲۰۱۲ در مطالعه ای که با همکاران انجام دادند گزارش نمودند که ۶۰ درصد نمونه های اشریشیاکلی مورد بررسی تولید بیوفیلم نموده و میزان بروز مقاومت آنتی بیوتیک در بین گروه های واجد بیوفیلم به مراتب بیشتر از گروه غیر بیوفیلمی می باشد(۲۸). در مطالعه کرمعلی و همکاران، سویه های EAEC دارای ژن aggR به تنهایی یا همراه با سایر ژن های کدکننده فاکتورهای ویرولانس ارتباط پیوست های با تشکیل بیوفیلم داشتند. هم چنین سویه هایی که علاوه بر ژن aggR دارای ژن هاirp2 ,aaP astA و pet هستند، بیوفیلم بیشتری تولید کردند. با توجه به این مشاهدات این محققین پیشنهاد کردند که تولید بیوفیلم باعث کلونیزاسیون مداوم این سویه ها در روده انسان می شود. ارتباط نزدیکی با رگولون aggR و ژن های تحت تنظیم آن دارد. این مطالعه ژن agg4A بیشترین فراوانی را در میان فاکتورهای ویرولانس بررسی شده در سویه های EAEC بررسی شده داشتند. کرمعلی و همکاران با بررسی بر روی اشریشیاکلی در سال ۲۰۰۴ گزارش نمودند که تولید بیوفیلم با ژن های حدت aap, aatA, aggR, astA, irp2, pet, set1A مرتبط بوده و در نمونه های واجد بیوفیلم فراوانی این ژن ها بیشتر بوده

و تشـــــکیل بـــــیوفیلم تحـــت کنتـرل ژن aggR می باشـد(۲۹). Maule و همکـاران در سـال ۲۰۰۰ در بررسی بر روی اشریشیاکلی O157 جدا شده از سـطوح عنوان نمود که این باکتری می توانـد بـر روی سـطوح فلزی استیل تا ۶۰ روز زنده مانده و بهتـرین راه از بـین بردن این باکتری هـا اسـتفاده از هیپوکلریـت سـدیم و مواد کاتیونی می باشد(۲۹). TSAI و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تحقیق بر روی نمونه پودر ماهی تولیـد شـده در کارخانه ها گزارش نمودند که ۷۰ درصـد نمونـه هـا آلوده به باکتری اشریشیاکلی بوده که نشان دهنده عدم رعایت مسائل بهداشتی، پـایین بـودن سـطح آمـوزش کارگران و عدم رعایت مسائل فنی تولید که در حفـظ و بقای سویه های بیماریزا در کارخانه و سطوح تولیـــدی نقش دارند. سویه های تیپیکـال EAEC بـا دارا بـودن ژن aggR شیوع بالایی در سویه های ایزولـه شـده در ایـن منطقـه نشـان داده انـد و بـا توجـه بـه الگـوی فاکتورهای ویـرولانس دارای هتروژنی هسـتند(۳۰). از راه های محدود کردن عفونت های این باکتری، تهیـه واکسن علیه سویه پاتوژن است.

## سپاسگزاری

این مقـــــاله حاصل پایان نامـه کارشناسـی ارشـد می باشد. نویسندگان این مقالـه از کارکنـان آزمایشـگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد سـیرجان برای فراهم نمودن شـرایط انجـام ایـن تحقیـق کمـال تشکر و قدردانی را می نمایند.

کد اخلاق: IR.IAUS.REC.1397.016

*References*

1.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology e book. 1th ed. Elsevier Health Sci Publication. 2014;P:186-359.

2. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz melnick and adelbergs medical microbiology. 27th ed. Mcgraw Hill Prof Publication. 2015;P: 542-688.

3.Estrada T, Lopez C, Thompson R, Abonce M, Hernandez D, Santos JI, et al. Association of diarrheagenic Escherichia coli pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic E. coli with acute diarrhea. J Clin Microbiol 2009;47:93-8. doi: 10.1128/JCM.01166-08

4. Dupont HL, Garcia MT, Jiang ZD. Escherichia coli diarrhea. Bacter Infec Hum 2009;2: 299-314.

5. Aranda KR, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic enteroaggregative enterotoxigenic enteroinvasive and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Brazilian children. FEMS Microbiol let2007;267:145-50. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x

6. Sultandalal D, Sepehri S, Hosseinidahm D. [Determination of Escherichia coli gene diversity from well water in Tehran parks with method]. Pajhwedeh J 2011; 16: 226-33. (persian)

7.Kargar E, Rezaian H, Dalini GH. [Evaluation of the prevalence of strains of E. coli strains from Shiga toxin producers in Shiraz Iran]. Quarter J World Germs2010; 3:40-7. (persian)

8. Adeli F, Zibaii F. [The prevalence of Shigotoxin and Intemin genes in Shigatoxin producing E. coli strains isolated from urinary tract infection in Lorestan province]. J Kashan Uni Med Sci 2013; 17: 188-94. (persian) doi: 10.5812/jjm.17514

9. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton Jt, Greenberg E. The involvement of cell to cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science1998;280:295-8.

10. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet2001;358:135-8. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1

11. Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton AR, Twiddy EM, Brien AD, et al. Structure of Shigla toxin type 2 from Escherichia coli O157: H7. J Biol Chem2004;279:27511-7. doi: 10.1074/jbc.M401939200

12. Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, et al. Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Mole Microbiol2004;54:994-1010. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04323.x

13. Kolodkin I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg H. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF mediated cell death in Escherichia coli. Science2007;35850:652–5. doi: 10.1126/science.1147248
14. Rizzo PA, Bi Y, Dunn SD, Shilton BH. The second stalk of Escherichia coli ATP synthase structure of the isolated dimerization domain. Biochemistry2002;41:6875-84.
15. Strachan NJ, Dunn GM, Ogden ID. Quantitative risk assessment of human infection from Escherichia coli O157 associated with recreational use of animal pasture. Int J Food Microbiol 2002;75:39-51.
16. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various β lactamase resistance mechanisms. Diag Microbiol Infec Dis2005;52:71-4.doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.12.008
17. Serratore P, Zavatta E, Fiocchi E, Serafini E, Serraino A, Giacometti F, et al. Preliminary study on the antimicrobial susceptibility pattern related to the genotype of Vibrio vulnificus strains isolated in the north western Adriatic sea coastal area. Italian J Food Saf 2017;6:142-7.
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic M. A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Meth2000;40:175-9.
19. Nezarieh R, Shakibaie MR, Nave HH, Norouzi A, Salajegheh G, Hayatbakhsh M. Distribution of virulence genes, enterotoxin and biofilm formation among enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from stools of children with diarrhea in south east Iran. Arch Pediatric InfecDise2015;3:54-9.
20. Saifi M, Dallal MS, Pourshafie M, Eshraghian M, Pourmand M, Salari M, et al. High level resistance of Enterococcus faecium and E. faecalis isolates from municipal sewage treatment plants to Gentamicin. Iranian J Publ Health2008;37:103-7.
21. Makled AF, Salem EM, Elbrolosy AM. Biofilm formation and antimicrobial resistance pattern of uropathogenic E. coli comparison of phenotypic and molecular methods. Egyptian J Med Microbiol 2017;26:231-7.doi: 10.24171/j.phrp.2018.9.5.02
22.ALkhalide EK, Ahmed MM, Abood ZH. Original paper virulence factors genes and phylogenic groups of Escherichia coli isolated from high vagina and endocervix of women from Kerbala. Karbala J Med2015; 8:2292-6.
23.Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochem Moscow2005;70:267-74.
24.Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirtliff ME. Identification of Staphylococcus aureus proteins recognized by the antibody mediated immune response to a biofilm infection. Infec Immun 2006;74:3415-26.doi: 10.1128/IAI.00392-06
25.Norouzi F, Mansouri S, Moradi M, Razavi M. Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL and non ESBL producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Af J Microbiol Res2010;4:1143-7.
26.Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microb Infec2003;5:1317-27.doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008
27.Jiang X, Morgan J, Doyle MP. Fate of Escherichia coli O157: H7 in manure amended soil. Appl Environ Microbiol 2002;68:2605-9.doi: 10.1128/aem.68.5.2605-2609.2002
28.Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med 2012;5:210-3 doi: 10.1016/S1995-7645(12)60026-1.
29.Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin–producing Escherichia coli infections using Shiga toxin receptor analogues. J Infec Dis 2004;189:355-9.doi.org/10.1086/381130
30.Maule A. Survival of verocytotoxigenic Escherichia coli O157 in soil water and on surfaces. J Appl Microbiol 2000;88:22-8. doi.org/10.1111/1574-6941.12083

# Identification of Biofilm Encoding Genes (agg) in the Escherichia coli Isolates by Multiplex-PCR Method

*Jafari R[1], Amini K[2*], Shogaeisadi B[3]*

**(Received: February 6, 2018 Accepted: February 2, 2019)**

**Abstract**

*Introduction:* Biofilm is a collection of microbial cells that are irreversibly suppressed and mildly washed away. The aggR gene is located on the main plasmid (pAA), which codes for many actuator factors. The pathogen strains of EAEC have an aggR gene, the gene has been identified in six classes of pathogenic E. coli.

*Materials & Methods:* In the present study, 60 stool samples from children with an average age of 4 to 7 years were collected and after biochemical examinations such as catalase, oxidase, and TSI environment were identified. *Ethics code:* IR.IAUS.REC.1397.016

*Finding:* The aggA gene was in 7 samples 11.6%, agg4A 9 samples 15%, aggR 5 positive 8%. It was also found that 28% of isolated isolates had at least one of the factors of aggressiveness, aggR, aggA, and agg4A.

*Discussion & Conclusions:* The typical EAEC strains have a high prevalence of aggR genes in isolates isolated in this region and are heterozygous according to the pattern of virulence factors. By limiting the infections of this bacterium, it is a vaccine against a strain of the pathogen.

*Keywords:* Escherichia coli, Multiplex-PCR, AggR, AggA, Biofilm

*1. Dept of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran*
*2. Dept of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran*
*3. Dept of Microbiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran*
**Corresponding author Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com*

***Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences***