بررسی فراوانی شیوع ژن های ویرولانس Fim H و PAI در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر رشت

سیّده زینب قاسمی پور[۱]، علی صالح زاده[۱*]، حجت‌اله زمانی[۲]

۱) گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۷ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۳**

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری است. سویه های این باکتری انواع مختلفی از فاکتورهای ویرولانس از جمله چسبنده ها، توکسین ها و سیستم های جذب آهن را دارا می باشند. ژن های ویرولانس بر روی عناصر ژنتیکی متحرک و یا در نواحی خاصی از کروموزوم که جزایر بیماری زایی نامیده می شوند، قرار دارند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های ویرولانس Fim H و PAI در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر رشت بوده است.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به چند آزمایشگاه تشخیص طبی شهر رشت انجام شد. باکتری اشریشیاکلی با استفاده از تکنیک های بیوشیمیایی و میکروب شناسی استاندارد شناسایی شد و فراوانی ژن های ویرولانس Fim H و PAI با استفاده از آزمایش PCR بررسی گردید.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که ۷۶ درصد از زنان و ۲۴ درصد از مردان مبتلا به عفونت مجاری ادراری بودند($P<0.01$) که نشان دهنده شایع تر بودن عفونت ادراری در زنان نسبت به مردان می باشد. بر اساس نتایج آزمایش PCR میزان فراوانی ژن Fim H، ۴۲ مورد(۸۴ درصد) و ژن PAI، ۳۸ مورد(۷۶ درصد) بود و در ۳۳ مورد هر دو ژن Fim H و PAI (۶۶ درصد) شناسایی شدند.

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که شیوع ژن های ویرولانس Fim H و PAI در میان سویه های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری بالا می باشد. بنا بر این، ژن های فوق می توانند به عنوان هدف در مداخلات درمانی مورد برررسی بیشتری قرار گیرند.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، PAI، Fim H، عفونت مجاری ادراری

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email:salehzadehmb@yahoo.com

Copyright © 2018 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 یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می باشد. خانواده انتروباکتریاسه، گروه بزرگ و ناهمگون از باسیل های گرم منفی هستند که جایگاه طبیعی آن ها دستگاه گوارش انسان و حیوانات می باشد. اشریشیاکلی، که در روده بزرگ انسان و حیوانات وجود دارد، پاتوژن فرصت طلبی است که خصوصاً در بچه ها ایجاد بیماری می کند. اشریشیاکلی در روده انسان مانع تکثیر و ازدیاد بعضی از باکتری های پروتئولتیک دیگر می شود و از طرف دیگر در ساختن تعدادی از ویتامین های لازم برای بدن از جمله ویتامین K نقش دارد(۱).

عفونت مجرای ادراری نوعی پاسخ التهابی این مجرا نسبت به تهاجم عوامل عفونی از جمله باکتری ها می باشد. میکروارگانیسم های مختلف قادر هستند از راه مجرای ادراری وارد مثانه شده و با طی مسیری به سمت کلیه ها حرکت کنند. چنان چه قسمت های تحتانی مجرای ادراری مانند پیش آب راه و مثانه درگیر شوند، عفونت را التهاب مثانه گویند و بیمار از سوزش و درد در هنگام خروج ادرار رنج می برد. اگر قسمت های فوقانی مجرای ادراری درگیر شود، عفونت را التهاب کلیه می نامند و بیمار از علائمی چون درد پهلو، تهوع، استفراغ، تب و لرز شدید رنج می برد. دستگاه ادراری انسان یکی از شایع ترین محل‌های عفونت ادراری است(۲). با توجه به شیوع بالا و عوارض جدی، تشخیص و درمان هر چه سریع تر عفونت ادراری ضروری است. اشریشیاکلی به عنوان عامل اصلی و شایع عفونت ادراری در کلیه سنین کاملاً مشخص است(۳). این باکتری می تواند انواع متفاوتی از فیمبریه های لازم برای تشخیص و اتصال به گیرنده های مجاری ادراری را تولید کند که فراوان ترین آن ها عباتند از فیمبریه نوع ۱ که توسط ژن fim رمز می شود و فیمبریه P که توسط ژن pap رمز می شود. این عوامل اتصالی، حمل کننده لیگاندها یا ادهسین ها هستند و به گیرنده های موجود در سطح سلول ها متصل می شوند و مقدمات عفونت های ادراری را ایجاد می کنند(۴). فیمبریه نوع ۱، ساختاری پیچیده دارد و به طور عمده شامل یک زیر واحد بزرگ Fim A و یک نوک فیمبریوم است. در فیمبریه نوع ۱، ساختار فیبریلی کوچکی قرار دارد که حاوی Fim G، Fim H و احتمالاً ترکیب جزئی از Fim F است و به ساختار میله ای حاوی زیر واحدهای Fim A متصل شده است. در این میان، فیمبریه Fim H به بخش های مختلف دستگاه ادراری می چسبد. فیمبریه نوع ۱ به مانوز حساس است که البته تهاجم های Fim H به سلول های اپی تلیال توسط باند سیستئین در دومین مانوز و فعال سازی آبشار سیگنال ترانس داکشن با استفاده از پروتئین تیروزین کیناز، فسفواینوزیتید ۳- کیناز و بازآرایی اکتین اسکلت سلولی انجام می شود. عوامل اتصالی Fim H گلیکوپروتئین مانوزیله و گیرنده های اینترگرین β1 و α3 را از روی سطح لومنی سلول های اپی تلیال مثانه شناسایی می کنند(۵،۶).

در واقع فیمبریه ها با کمک به باکتری ها در اتصال به سطوح اپی تلیال باعث می شوند تا باکتری در غشاهای مخاطی کلونیزه شوند. زمانی که کلونیزاسیون رخ می دهد، باکتری می تواند بیماری زایی ایجاد نماید(۷). ژن های PAI در واقع زیر گروهی از جزایر ژنومی است که ترکیب و سازماندهی مشابهی با این جزایر دارد. بر اساس مدلی که پترسون و همکاران ارائه دادند، سلول باکتری در ابتدا به صورت انتقال افقی ژن، بلوک هایی از ژن های بیگانه را دریافت کرده که به نام جزایر ژنومی خوانده می شود. اگر این جزایر باعث ایجاد بیماری در موجود شوند، یعنی به عنوان یک انگل عمل کنند«جزایر بیماری زایی» گفته می شود(۸). ژن های PAI اعمالی را که می تواند برای بقا و انتقال میکروب مفید باشد را رمز می کنند. برای مثال PAI رمز کننده جذب سوکروز در سالمونلا سنفتنبرگ برای سازگاری متابولیکی این باکتری در میزبان می باشد. ژن های PAI حاوی ژن هایی هستند که فاکتورهای مقاومت آنتی بیوتیکی را رمز می کنند و ژن های مخفی و سیاری مانند ترانسپوزون ها و اینتگرین ها را حمل می کنند که در دسته ای از باکتری ها، پروتئین هایی را رمز می کند که در حذف PAI دخالت دارند. هم چنین آن ها مسئول سنتز پروتئین ها و عوامل اتصال هستند که در سیستم های ترشحی مختلف انجام می شود(۹).

شدت عفونت مجاری ادراری به دو عامل ویرولانس باکتری و حساسیت میزبان بستگی دارد(۱۰). اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال مجاری ادراری یک مرحله ضروری برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است. این فرآیند به باکتری اجازه می دهد تا در مقابل عملکرد شستشوی ادرار و تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند. سویه های UPEC قادر هستند تا انواع متفاوتی از چسبنده های لازم برای تشخیص و اتصال به رسپتورهای مجاری ادراری را تولید کنند(۱۱). علاوه بر این، شرایط میزبان مانند سن بالا و زمینه هایی مانند انسداد مجاری ادراری، دیابت شیرین و ضعف مثانه به کلونیزاسیون باکتری کمک کرده و نقش مهمی در عفونت مجاری ادراری است(۱۲). درمان نامناسب عفونت مجاری ادراری با گذشت زمان می تواند باعث نارسایی کلیه شود(۱۳). فاکتورهای ویرولانس مختلفی به بیماری زایی UPEC نسبت داده می شود(۱۴). آگاهی بهتر از خصوصیات ویرولانس ارگانیسم پاتوژن به پزشک این امکان را می دهد که روند پیشرفت عفونت در میزبان و درمان مناسب آن را پیش بینی کند(۱۳).

با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار و خانواده او رخ خواهد داد. بنا بر این تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان شیوع ژن های ویرولانس Fim H و PAI، که جزء عوامل اولیه برای اتصال باکتری در دستگاه ادراری و ایجاد عفونت دستگاه ادراری می باشند، صورت پذیرفته است.

مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از ۷۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به چند آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر رشت انجام شد. محدوده سنی بیماران از کودک ۷ روزه تا خانم ۷۷ ساله متغیر بود. در این بررسی، سویه های اشریشیاکلی جدا شده با روش های استاندارد میکروب شناسی و آزمایش های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه های ادرار بر روی محیط های کشت استاندارد آزمایشگاهی EMB agar و Blood agar و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. کلنی هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند به عنوان باکتری مورد نظر در نظر گرفته شدند. تست های تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست کاتالاز و تست های بیوشیمیایی شامل کشت در محیط های TSI agar، SIM agar، Simmons citrate agar، MR-VP broth و Urea Agar جهت تشخیص و تایید اشریشیاکلی استفاده گردید. پس از شناسایی، باکتری های جدا شده تا زمان انجام آزمایش های بعدی در محیط کشت TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

باکتری های جدا سازی شده به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط LB کشت داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. نمونه های DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده اند.

از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) برای شناسایی حضور ژن های ویرولانس استفاده شد. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در واکنش PCR ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای forward و reveres با یکدیگر مخلوط شدند و حجم نهایی با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر برنامه ریزی شد. واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه مربوط به ژن Fim H و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه مربوط به ژن PAI و طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتی گراد

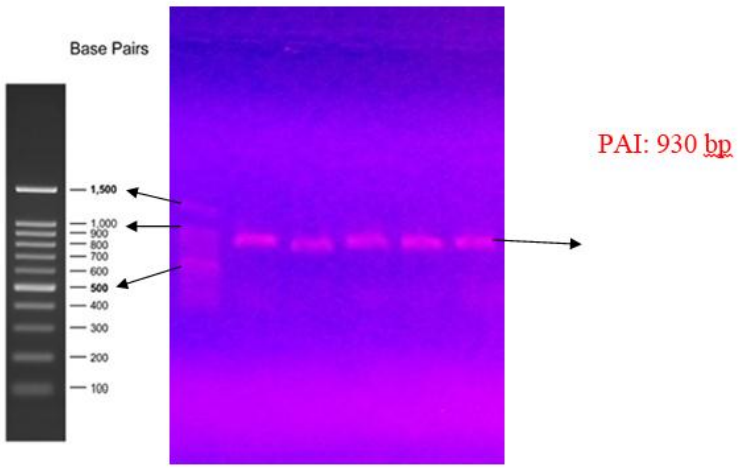
به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. محصول به دست آمده از PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندهای حاصله تحت پرتو UV آشکارسازی و عکسبرداری گردید. جهت تایید نهایی و صحت تکثیر ژن های ویرولانس Fim H و PAI محصول PCR جهت انجام توالی یابی ارسال گردید و توالی های به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد.

جدول شماره ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن PAI و Fim H

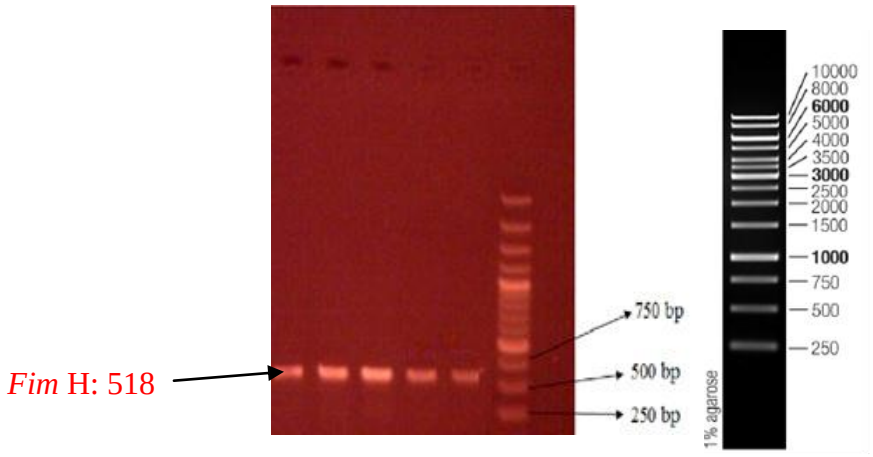
نام ژن	توالی پرایمر	طول قطعه	منبع
$Fim\ H_R^F$	F: 5'TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 3' R: 5'GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA3'	518bp	10
PAI_R^F	F: 5'GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A 3' R: 5'TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA C 3'	930bp	10

یافته های پژوهش

در این مطالعه، از ۷۰ نمونه ادرار افراد مبتلا به آلودگی ادراری استفاده گردید. پس از انجام بررسی های میکروب شناسی و بیوشیمیایی، ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا گردید. به عبارتی شیوع باکتری اشریشیاکلی در نمونه ادرار افراد در مطالعه ما ۷۱/۴۳ درصد بود. هم چنین در این مطالعه، مشاهده شد که تعداد کشت مثبت در خانم ها، ۳۸ مورد(۷۶ درصد) و در آقایان ۱۲ مورد(۲۴ درصد) می باشد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد($P<0.01$). بر اساس نتایج آزمایش PCR، میزان شیوع ژن Fim H، ۴۲ مورد(۸۴ درصد) و ژن PAI، ۳۸ مورد(۷۶ درصد) بود. هم چنین ۳۳ نمونه حاوی هر دو ژن Fim H و PAI (۶۶ درصد) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که در بین سویه های مورد بررسی، شیوع ژن Fim H بیشترین درصد آماری را به خود اختصاص داده است. شکل شماره ۱ و ۲ به ترتیب تصاویر الکتروفورز محصول PCR ژن های ویرولانس PAI و Fim H را روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می دهد.



شکل شماره ۱. نتیجه الکتروفورز ژن PAI در ایزوله های اشریشیاکلی مورد مطالعه



شکل شماره ۲. نتیجه الکتروفورز ژن Fim H در ایزوله های اشریشیاکلی مورد مطالعه

نتایج توالی یابی ژن های ویرولانس Fim H و PAI نشان داد که ژن های تکثیر شده در پژوهش حاضر به درستی تکثیر شده اند(شکل شماره ۳ و ۴). میزان همولوژی ژن های Fim H و PAI با ژن های Fim H و PAI موجود در بانک ژن به ترتیب ۹۹ و ۹۵ درصد بود. بنا بر این ژن های Fim H و PAI مورد بررسی در تحقیق حاضر مشابه ژن های Fim H و PAI موجود در بانک ژن به ترتیب با شماره دسترسی های ID:gbIFJ865748.1I و ID:gbICP000247.1I می باشند.

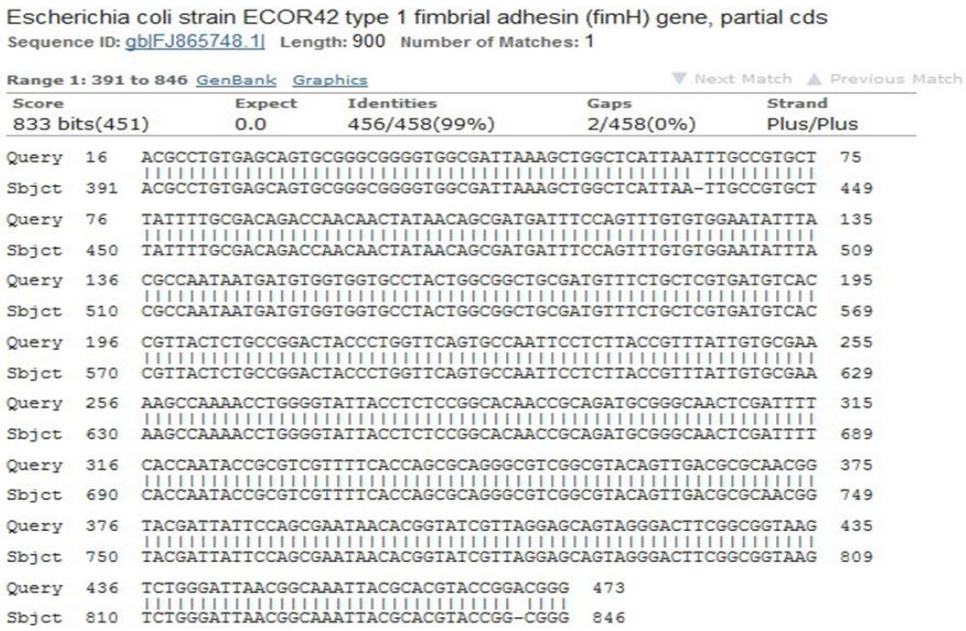
Sequence ID: **gb|CP000247.1|** Length: 4938920 Number of Matches: 1
Range 1: 2976543 to 2977396

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1325 bits(717)	0.0()	811/856(95%)	8/856(0%)	Plus/Minus	

Features:

```
Query  12       ACGGTATCTGTATGCCACTTTTAA-TATGAATTAATTTTAGAAGAAAAACTATATCTCTC  70
Sbjct  2977396  ACGGTATCTGTATGCCACTTTTAAATATGAATTAATTTTAGAAGAAAAACTATATCTCTC  2977337
Query  71       TATTCGTACCAAAGTATTAATGGACTAATTATATATAACATTTATATGAGATAACCCACA  130
Sbjct  2977336  TATTCGTACCAAAGTATTAATGGACTAATTATATATAACATTTATATGAGATAACCCACA  2977277
Query  131      TGAAACAAAAGAAAGCCTGGAGttttttCAGAGCCTGGGGAAGGCATTTATGTATCCCA  190
Sbjct  2977276  TGAAACAAAAGAAAGCCTGGAGTTTTTTCAGAGCCTGGGGAAGGCATTTATGTATCCCA  2977217
Query  191      TTGCTCTGCTAAGTGTATGTGGCATGATGCTAGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCCAGTGATG  250
Sbjct  2977216  TTGCTCTGCTAAGTGTATGTGGCATGATGCTAGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCCAGTGATG  2977157
Query  251      ATATGGCAAAGTTAATTCCATTTCTGGCTATTCCAATAATTAAAACCATACTTGATTTCA  310
Sbjct  2977156  ATATGGCAAAGTTAATTCCATTTCTGGCTATTCCAATAATTAAAACCATACTTGATTTCA  2977097
Query  311      TTGTTAGTCTTGGTTTGTTTGCCTTTGTTAATTTACCTGTATTGTTTGCGATAGCGATTC  370
Sbjct  2977096  TTGTTAGTCTTGGTTTGTTTGCCTTTGTTAATTTACCTGTATTGTTTGCGATAGCGATTC  2977037
Query  371      CCTTAGGATTATTAAAAGATAAAGAGGATAAAGCCTATGGTGCTTTTTCTGGCTTAATTG  430
Sbjct  2977036  CCTTAGGATTATTAAAAGATAAAGAGGATAAAGCCTATGGTGCTTTTTCTGGCTTAATTG  2976977
Query  431      GTTTTATGGCGATGCATCTGGGAACGAACTTTTATCTTAAACAGCACGACTTATTGGTCG  490
Sbjct  2976976  GTTTTATGGCGATGCATCTGGGAACGAACTTTTATCTTAAACAGCACGACTTATTGGTCG  2976917
Query  491      TTGCTGACCAAATGTCGACACATGGGCAAACCATCATTCTGGGGATCCAGTCCTACAATA  550
Sbjct  2976916  TTGCTGACCAAATGTCGACACATGGGCAAACCATCATTCTGGGGATCCAGTCCTACAATA  2976857
Query  551      CCAGCGTGTTGGGGGGAATTGTTGCTGGGTTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAAAGATCG  610
Sbjct  2976856  CCAGCGTGTTGGGGGGAATTGTTGCTGGGTTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAAAGATCG  2976797
Query  611      TTAATTTACGCATGGCAGAATCACTAGGTTTCTATAGCGGCCCACGTCTGGTGCCTATCA  670
Sbjct  2976796  TTAATTTACGCATTCCAGAATCATTAGGTTTTTATAGCGGCCCACGTCTGGTGCCTATCA  2976737
Query  671      TTACACTGATTGCGATGA-TGGCATCCGGTCGGACCATTCCATTTATCTGGCCTTCTTTT  729
Sbjct  2976736  TTACACTGATTGTGATGAGTGG-ATTTGGTCTGATCATTCCTTTTATCTGGCCGCCATTT  2976678
Query  730      GTT--TCTCTGGGTTGCTCAT-GGCCACTGGTAATCAACTTCTCGTCCTGTAGGTTAGTT  786
Sbjct  2976677  TTCAATCTCTTCAT-GCTCATTGGCCACTGGATATCAACTTCCGGTCCTGTTGGTTATTT  2976619
Query  787      CTACTAGACAGATGCCGTACGTGTGACGATTCCATTCGGCTTAAAC-ATGTCGTGACGAC  845
Sbjct  2976618  CTTCTATGCAGTTGCCGAACGTGTGACGATTCCTTTTGGCTTAAACCATCTGGTGACGTC  2976559
Query  846      ACTGTTCAGCTTCACG  861
Sbjct  2976558  AGTGTTCCGCTTTACG  2976543
```

شکل شماره ۳. نتیجه مقایسه قسمتی از توالی ژن به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن مربوط به ژن PAI


Escherichia coli strain ECOR42 type 1 fimbrial adhesin (fimH) gene, partial cds
Sequence ID: gb|FJ865748.1| Length: 900 Number of Matches: 1

Range 1: 391 to 846 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
833 bits(451)	0.0	456/458(99%)	2/458(0%)	Plus/Plus

```
Query  16   ACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAATTTGCCGTGCT  75
Sbjct  391  ACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAA-TTGCCGTGCT  449

Query  76   TATTTTGCGACAGACCAACAACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTA  135
Sbjct  450  TATTTTGCGACAGACCAACAACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTA  509

Query  136  CGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCAC  195
Sbjct  510  CGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCAC  569

Query  196  CGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA  255
Sbjct  570  CGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA  629

Query  256  AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTT  315
Sbjct  630  AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTT  689

Query  316  CACCAATACCGCGTCGTTTTCACCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGG  375
Sbjct  690  CACCAATACCGCGTCGTTTTCACCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGG  749

Query  376  TACGATTATTCCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTCGGCGGTAAG  435
Sbjct  750  TACGATTATTCCAGCGAATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTCGGCGGTAAG  809

Query  436  TCTGGGATTAACGGCAAATTACGCACGTACCGGACGGG  473
Sbjct  810  TCTGGGATTAACGGCAAATTACGCACGTACCGG-CGGG  846
```

شکل شماره ۴. نتیجه مقایسه قسمتی از توالی ژن به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن مربوط به ژن Fim H

بحث و نتیجه گیری

عفونـــت مـــجاری ادراری یکی از شـــایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان است که به طور عمده توسط باکتری اشریشیاکلی ایجاد می شود(۱۰). اشریشیاکلی عامل ۹۰–۸۰ درصد عفونت مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و ۵۰–۳۰ درصد از عفونت مجاری ادراری بیمارستانی است(۱۵). در مطالعه ای که یولت و همکاران بر روی مبتلایان به عفونت ادراری اشریشیاکلی و ویرولانس پاسخ ایمنی ذاتی در طول عفونت ادراری انجام دادند، مشاهده گردید که کودکان خردسال به صورت مکرر از عفونت دستگاه ادراری رنج می برند و بدون درمان فـــوری، باکتری می تواند به کلیه صعود کند، جایی که زخم کلیه در آن جا اتفاق خواهد افتاد(۱۶). مطالعه بهروزی و همکاران نیز نشان داد که باکتری اشریشیاکلی پاتوژن غالب جدا شده از نمونه های ادرار است(۱۷).

در مطالعه حاضر، از یک روش مولکولی برای مطالعه حضور ژن های ویرولانس اشریشیـــــاکلی یوروپاتوژنیک استفاده گردید. آزمون PCR، یک روش مولکولی خیلی اختصاصی، قدرتمند و موثر می باشد که برای آشکارسازی اپران های رمزکننده ادهسین و دیگر فاکتورهای ویرولانسی که می تواند روی ویرولانس عفونت مجاری ادراری اثر بگذارند، استفاده می شود.

نتایج بررسی حاضر موید این نکته می باشد که شیوع عفونت مجاری ادراری در زنان شایع تر از مردان است که این می تواند به خاطر تفاوت در آناتومی مجاری ادراری آن ها باشد که احتمالاً به علت کوتاهی پیشابراه، نزدیکی دهانه خروجی آن با مهبل و مقعد در زنان می باشد که این یافته با مطالعه ای که کنانی و همکاران روی ۱۰۴۹۲ نمونه در شهر کرمانشاه و هم چنین مطالعه ای که منصور و همکاران روی ۷۰۵۶ بیمار با علایم عفونت مجاری ادراری در شهر اهواز انجام دادند مطابقت دارد که در آن مطالعات نیز میزان عفونت در جنس مونث شایع تر بود(۱۸،۱۹).

فراوانی ژن PAI در نتایج این مطالعه، ۷۶ درصد برآورد شد که نشان دهنده شیوع بالای مارکر PAI در نمونه های ادراری بود. در یک مطالعه انجام شده در آمریکا در سال ۲۰۰۰ که روی بیماران مبتلا به یوروسپسیس انجام شد، شیوع مارکر PAI، ۷۱ درصد گزارش گردید(۲۰). مطالعه نویدنیا و همکاران روی نمونه ادرار کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری شیوع مارکر PAI را ۸۹ درصد نشان داد(۲۱). هارزر و

همکاران بیان کردند که جزایر بیماری زایی(PAI) به میزان زیادی در باکتری اشریشیاکلی وجود دارد و باعث عفونت خارج روده ای می شود. آن ها شیوع هشت مارکر PAI را در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از ادرار کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری گزارش کردند(۲۲). از آن جا که بیشتر فاکتورهای ویرولانس خارج روده ای روی عناصر متحرک از جمله PAI به صورت یک دسته ژنی قرار دارند و هم چنین مارکر PAI موجب انتقال افقی ژن های ویرولانس می گردد، شیوع ۷۶ درصدی مارکر PAI می تواند نشان دهنده خطر گسترش وسیع سویه های UPEC با پاتوژنیسیته بالا در میان بیماران باشد. هم چنین نتایج به دست آمده در تحقیق ما نشان داد که ۸۴ درصد ایزوله های UPEC دارای ژن Fim H هستند. در مطالعه ای که توسط لان و همکاران در دانشگاه میشیگان انجام شد، مشخص گردید که فیمبریه نوع ۱ به مقدار زیادی در طول عفونت دستگاه ادراری بیان می گردد که این بیان می تواند منجر به کاهش حرکت در این باکتری گردد و این موضوع به عنوان یک عامل مهم در عفونت، به ویژه در ۲۴ ساعت از زمان کلونیزاسیون در مثانه، تلقی می گردد(۲۳).

کازمارک و همکاران، شیوع ژن Fim H را ۸۳ درصد برای اشریشیاکلی اظهار داشتند(۲۴). هم چنین در مطالعه ای دیگر، مورنو و همکاران، ۲۱ نمونه اشریشیاکلی از مبتلایان به عفونت ادراری جدا نموده و شیوع ژن مذکور را ۹۵ درصد گزارش کردند(۲۵). در واقع شیوع بالای ژن Fim H به دلیل چسبندگی آن می باشد(۲۶) که نتایج مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران فوق با نتایج تحقیق حاضر سازگاری دارد و بیانگر شیوع بالای این ژن ها در عفونت های ادراری است.

با توجه به احتمال وجود تنوع ژنتیکی در ژن های مورد بررسی، پیشنهاد می گردد این سویه ها از لحاظ تنوع ژنتیکی مقایسه شوند. هم چنین برای دستیابی به اطلاعات جامع و ارزیابی دقیق تر توصیه می شود که در تحقیقات آتی حضور دیگر عوامل ویرولانس مثل توکسین ها، سیستم های جمع کننده آهن نیز همراه با فیمبریه مورد بررسی قرار بگیرد تا بتوان مقایسه جامع تری در مورد عوامل ویرولان سویه های اشریشیاکلی عامل عفونت های ادراری انجام داد.

مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بسیار بالای ژن های Fim H و PAI در سویه های اشریشیاکلی بود که این امر می تواند یک فاکتور خطر در شیوع گسترده موارد عفونت های ادراری در نظر گرفته شود که نیازمند مداخلات بهداشتی و درمانی مناسب به منظور کنترل شیوع عفونت توسط سویه های E.coli ویرولان می باشد. از جمله محدودیت ها در اجرای این تحقیق، تعداد کم نمونه و عدم انجام ژنوتایپینگ هر ژن به منظور تعیین کلون های ژنتیکی بود.

References

1. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing Escherichia coli infections. Clin Microbial Rev 1998; 11: 450-79.
2. Elder JS. Urinary tract infection. Nelson text book of pediatrics. 18th ed. Philadelphia Saunders Elsevier Publication. 2007; P. 2223-8.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick. Medical Microbiology. 25th ed. USA Mc Graw Hill Publication. 2010; P.213-9.
4. Tiba MR, Yano T, Leite S. Genotypic characterization of virulence factors in E. coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: 255-60.
5. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders interplay between uropathogenic E. coli and innate host defenses. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8829-35.
6. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. PLos Path 2007; 3: 949-61.
7. Iebba V, Conte MP, Lepanto MS. Microevolution in fimH gene of mucosa associated Escherichia coli strains isolated from pediatric patients with inflammatory Bowel disease. Infect Immun 2012; 80: 1408-17.

8. Schmidt H., Hensel M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. Am Soc Microbiol2004; 14-56.
9. Lorenzo V, Martinez JL. Aerobactin production as a virulence factor a reevaluation. Eur J Clin Microbial Infect Dis 1988; 7:621-9.
10. Griebling TL. Urologic diseases in America project trends in resource use for urinary tract infections in Women. J Urol 2005; 173: 1281-7.
11. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Gut Pathog 2009; 1: 22.
12. Ulleryd P. Febrile urinary tract infection in men. Int J Antimicrob 2003; 22: 89-93.
13. Santo E, Macedo C, Marin JM. irulence factors of uropathogenic Escherichia coli from a university hospital in Ribeirao Preto Sao Paulo Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48:185-8.
14. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Int J Infect Dis 2013; 17: 450-3.
15. Ejrnaes K. Bacterial characteristic of importance for recurrent urinary tract infection caused by Escherichia coli. Dan Med Bull 2011; 58: 1-22.
16. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic E. coli virulence and innate immune responses during urinary tract infection. Curr Opin Microbiol 2013;16:100-7.
17. Behrooozi A, Rahbar M, Yousefi J. A survey on epidemiology of urinary tract infections and resistance pattern of uropathogenes in an Iranian 1000 bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res 2010; 4: 735-56.
18. Kanani M, Madani S, Khazaee S, Shahi M. The pattern of antibiotic resistance of gram-negative bacilli isolated from the urine medical centre Imam Reza Kermanshah. J Kermanshah Uni Med Sci 2010; 21:75-81.
19. Mansour A, Manijeh M, Zohreh P. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jundishapur J Microbiol 2009; 3: 118-23.
20. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of E.coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000; 181: 261-72.
21. Navidinia M, Najar Peerayeh SH, Fallah F, Bakhshi B, Adabian S, Alimehr SH, et al. Distrubtion of the pathogenicity islands markers in uropathogenic E.coli isolated from children in Mofid children Hospital. Arch Pediatr Infect Dis 2013; 1: 75-9.
22. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single stranded DNA among natural isolates of E.coli. J Bacteriol 1990; 172: 6175-81.
23. Lane MC, Simms AN, Mobley HL. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic E.coli. J Bact 2007; 189: 5523-33.
24. Kaczmarek A, Budzynska A, GospodarekE. Prevalence of genes encoding virulence factors among E. coli with K1 antigen & non-K1 E.coli strains. Nicolaus Copernicus University of Tourn. J Med Microbiol 2012; 321- 26.
25. Moreno A, Andreu T, Perez M, Sabate J, Johnson R, Prats G. Relationship between E.coli strains causing UTI in women & the dominant faecal flora of the same hosts. University of Minnesota. Epidemiol Infect 2006; 134; 1015-23.
26. Lopezbanda DA, Carrillocasas EM, Leyvaleyva M. Identification of Virulence Factors Genes in E. coli Isolates from Women with urinary tract infection in Mexico. Biomed Res Int 2014; 2:1-10.

Prevalence of Pathogenicity Islands and Fim H Virulence Genes in Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infection in Rasht City, Iran

Ghasemipour Z[1], Salehzade A[1], Zamani H[2]*

(Received: December 27, 2016 Accepted: June 24, 2017)

Abstract

Introduction: Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) is one of the most important etiologic agents of urinary tract infection (UTI). The UPEC strains have various types of virulence factors, including adhesions, toxins, and iron uptake systems. Virulence genes are located on transmissible genetic elements and/or on particular locus on the chromosome called pathogenicity islands (PAI). The aim of the current research was to evaluate the frequency of PAI and Fim H virulence genes among E. coli strains isolated from UTIs in Rasht, Iran.

Materials and Methods: This study was conducted on 50 E. coli strains, which were isolated from patients with UTIs referring to several medical laboratories of Rasht city. E. coli was identified using standard microbiological techniques and biochemical assays. Furthermore, the prevalence of PAI and Fim H virulence genes were evaluated using the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Results: The results showed that 76% of the females and 24% of the males were infected with UTI ($P<0.01$), which was indicative of the higher rate of UTIs in females than in males. Based on the results of PCR, 42 (84%) and 38 (76%) isolates were positive for Fim H and PAI genes, respectively. Additionally, 33 (66%) isolates carried both of these genes.

Conclusion: As the findings indicated, the prevalence of PAI and Fim H virulence genes in E. coli strains accounted for a high rate of UTI. Therefore, these genes could be studied as targets for medical interventions and epidemiological studies.

Keywords: Escherichia coli, PAI, Fim H, Urinary tract infection

1. Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran
** Corresponding author: Email: salehzadehmb@yahoo.com*