مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۲، بهمن ۱۳۹۳، صفحه ۴۲-۳۶

# ارتباط بین گروه های فیلوژنتیکی با ژن های کد کننده فاکتور های حدت در ایزوله های اشریشیاکلای خارج روده ای به روش Multiplex-PCR

احمد راشکی (PhD)*[1]، حسینعلی عبدی (BSc)[2]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل

دریافت: ۹۳/۲/۶ ، اصلاح:۹۳/۲/۲۴ ، پذیرش:۹۳/۴/۴

## خلاصه

**سابقه و هدف:** باکتری اشریشیاکلای خارج روده ای مهمترین عامل عفونت های ادراری-تناسلی در انسان است. چندین فاکتور حدت مثل ژن های کد کننده پروتئین های سیتوتوکسین، ادهسین، رسپتورهای سیدروفور و پروتئاز خارج غشائی در *اشریشیاکلای* های خارج روده ای انسان شناسایی شده است. این مطالعه به منظور بررسی میزان توزیع ژن های کد کننده فاکتور های حدت و ارتباط آن با گروه های فیلوژنتیکی در ایزوله های *اشریشیاکلای* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به کلینیک های زنان شهرستان زابل انجام شد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۳۲ باکتری *اشریشیاکلای* با استفاده از روش های بیوشیمیایی استاندارد جداسازی شد. DNA ژنومی تمام ایزوله ها به روش جوشاندن استخراج گردید. حضور ژن های کد کننده فاکتور های حدت سیتوتوکسین (*cnf1*)، ادهسین غیرهموآگلوتنین (*iah*)، همولوگ سیدروفور (*irp2*) و پروتئاز خارج سلولی (*ompT*) به روش Multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت. گروه بندی فیلوژنتیکی تمام ایزوله ها با استفاده از حضور یا عدم حضور ژن های *chuA*، *yjaA* و قطعه TspE4.C2 به روش Triple-PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** میزان شیوع ژن های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* در بین ۱۳۲ ایزوله به ترتیب ۱۰٪، ۸٪، ۴۵٪ و ۶۳٪ تعیین گردید. از مجموع ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلای* ۱۴، ۷، ۶۰ و ۱۹ درصد به ترتیب در گروه های فیلوژنتیکی A، B1، B2 و D قرار گرفتند. بیشترین میزان توزیع ژن های کد کننده فاکتور های حدت در گروه B2 با فراوانی *cnf1*(۱۰۰٪)، *iha*(۶۲/۵٪)، *irp2*(۷۳/۰۱٪) و *ompT*(۸۴/۴۴٪) نسبت به سایر گروه ها تعیین گردید.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که *ompT* و *irp2* شایعترین ژن های کد کننده فاکتور حدت درایزوله های اشریشیاکلای خارج روده ای جدا شده از عفونت دستگاه تناسلی می باشد. این مسئله می تواند اطلاعاتی در رابطه با اهمیت آنها در آسیب شناسی عفونت دستگاه تناسلی که منجر به دست یابی به درمان های موثرتر می شود در اختیار محققین قرار دهد.

**واژه های کلیدی:** عفونت دستگاه تناسلی، پروتئاز خارجی غشاء، سیتوتوکسین، ادهسین، آنالیز فیلوژنتیکی، اشریشیاکلای.

## مقدمه

امروزه *اشریشیاکلای* یکی از شایعترین عوامل عفونت های ادراری-تناسلی و منتژیت در نوزادان است (۳-۱). اعتقاد بر این است که اغلب سویه های *اشریشیاکلای* مرتبط با این عفونت ها دارای فاکتورهای حدت متفاوتی هستند و به عنوان پاتوژن های خارج روده ای یا Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) شناخته می شوند (۴و۳). به طور معمول سویه های *اشریشیاکلای* به چهار گروه فیلوژنتیک اصلی A، B1، B2 و D تقسیم می شوند (۶و۵) که در این میان اغلب سویه های بیماری زا به ترتیب در گروه B2 و به میزان کمتر در گروه D قرار می گیرند (۵). بیشتر سویه های جدا شده از فلور روده متعلق به گروه های A و B1 هستند (۸و۷). سویه های متعلق به هر یک از چهار گروه دارای ویژگی های مختلف فنوتیپی، پروفایل های متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی و فاکتور های متعدد حدت می باشند (۱۰و۹) که در این میان نحوه توزیع ژن های کد کننده فاکتور های حدت در بین گروه های فیلوژنتیکی از اهمیت به سزایی برخوردار است (۱۴-۱۱). شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی اشریشیاکلای های جدا شده از منابع مختلف می تواند اطلاعات مفیدی در مورد منشاء آلودگی در اختیار محققین قرار دهد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داده است که اشریشیاکلای خارج روده ای مولد عفونت های ادراری- تناسلی، معمولا

این مقاله حاصل پایان نامه حسینعلی عبدی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی زابل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر احمد راشکی
آدرس: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی. تلفن:۱-۰۵۴-۳۱۲۳۲۲۵۰
E-mail:ah_rashki@usal.es

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

به گروه های B2 و D تعلق دارند (۱۷-۱۵). شدت و حدت عفونت دستگاه ادراری- تناسلی با حضور طیف گسترده ای از عوامل بیماری زا از جمله ادهسین ها، وجود رسپتورهای سیدروفور سطح سلولی و توکسین ها چند برابر می شود. بیشتر ژن های کد کننده فاکتور های حدت از قبیل *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* جایگزینی باکتری را در اپیتلیوم مجاری ادراری- تناسلی تسهیل کرده و یا فرآیندهای مختلف میزبان را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۸) تا عفونت های مختلفی از جمله عفونت داخل آمنیوتیک، عفونت پورپرال، مننژیت، عفونت مجاری ادراری و عفونت های نوزادان را ایجاد کنند. اشریشیاکلای ایجاد کننده عفونت های ادراری- تناسلی در مناطق مختلف جهان دارای الگوهای متفاوتی هستند و حتی در یک کشور، در مناطق مختلف نیز ممکن است یکسان نباشد. در کشور های توسعه یافته سویه های *اشریشیاکلای* مسبب عفونت های پروستات متعلق به گروه B2 بوده است (۱۵).

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۳ میلادی در بخش کودکان از ۱۱۲ *اشریشیاکلای* جدا شده از کودکان مبتلا به سیستیت و پیلونفریت ۶۷٪ متعلق به گروه B2 بود (۱۷) که حامل بیشترین فاکتور های حدت بودند. در یک بررسی که در Würzburg آلمان انجام شد، سویه های اشریشیاکلای گروه B2 شایعترین علت بروز عفونت های ادراری بودند (۱۹). در مطالعه ای که در ایران انجام شد، از ۱۰۲ *اشریشیاکلای* جدا شده از بیماران بستری شده در بیمارستان های شیراز ۶۵٪ در گروهA، ۱۸٪ در گروه B2 و ۱۵٪ در گروه D قرار داشتند (۲۰). همانطوریکه ذکر شد گزارشات زیادی در مورد اهمیت این فاکتور ها در عفونت-های ادراری از سراسر جهان و ایران منتشر شده است. اما تا به حال، گزارشی در مورد تعیین گروه فیلوژنتیکی *اشریشیاکلای* مولد عفونت های تناسلی در ایران منتشر نشده است. الگوی فاکتور های حدت *اشریشیاکلای* مسئول عفونت های ادراری-تناسلی در طی زمان تغییر می کند. به علت تغییر الگوی فاکتور های حدت در طی زمان، حدت و شدت علائم کلینیکی از یک فرد به فرد دیگر یا از یک جامعه به جامعه دیگر متفاوت است ، پایش مداوم اپیدمیولوژیک در مناطق مختلف کشور امری ضروری است. در حال حاضر در اکثر مراکز دانشگاهی ، تدریس بر اساس اطلاعاتی که از مطالعات انجام شده در کشور های توسعه یافته بدست آمده است صورت می گیرد. بنابراین با توجه به افزایش روزافزون عفونت های *اشریشیاکلای* و متفاوت بودن فاکتور های دخیل در بیماری زایی باکتری در مناطق مختلف دنیا، مطالعه بررسی عوامل مرتبط با بیماری زایی در باکتری های جدا شده ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان فراوانی ژن های بیماری زای کد کننده پروتئین های آلفا سیتوتوکسین (*cnf1*)، ادهسین غیرهموآگلوتنین (*iha*)، رسپتورسیدروفور (*irp2*) و پروتئاز خارج سلولی (*ompT*) در گروه های مختلف فیلوژنتیکی اشریشیاکلای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های دستگاه تناسلی در شهرستان زابل انجام گرفته است.

## مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۱ تا مرداد ۱۳۹۲ تعداد ۱۳۲ باکتری *اشریشیاکلای* از ۳۸۰ سواب گرفته شده (پس از کسب رضایت آگاهانه از بیماران) از ترشحات واژن و اندوسرویکس زنان باردار و غیر باردار مشکوک به واژنیت با استفاده از تست های رایج بیوشیمیایی جدا سازی گردید.

**استخراج DNA ژنومی:** استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های *اشریشیاکلای* در شرایط استریل و با روش شستشو با محلول تریس اتیلن دی آمین تترا استات (Tris-EDTA, TE) و جوشاندن (Boiling) انجام شد. به طور خلاصه چند کلنی خالص از اشریشیاکلای از محیط مکانکی (MacConkey agar) به لوله حاوی ۲ میلی لیتر محیط (TSB=Trypticase Soy Broth) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرما گذاری شد.

۱/۵ میلی لیتر از محیط TSB حاوی سلول های رشد کرده به میکروتیوب منتقل و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی میکروتیوب کاملاً تخلیه و طی دو مرحله رسوب به ترتیب با ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر TE شستشو داده شد و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر به رسوب اضافه شد و پس از ورتکس کردن، میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش ($100^{\circ}C$) قرار گرفت. سپس میکروتیوب ها به مدت ۳ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی حاوی DNA ژنومی باکتری جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. وجود DNA در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر و با بررسی جذب در ۲۶۰nm بررسی گردید.

**واکنش Multiplex-PCR:** برای شناسایی وجود ژن های کد کننده فاکتورهای حدت (cnf1، iha، irp2 وompT) در ایزوله های اشریشیاکلای جداشده از تکنیک Multiplex-PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. جهت انجام فرایند PCR آنزیم MasterMix RED ۲× از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر ازMasterMix RED ۲× و ۱ میکرولیتر از پرایمر های Forward و Reverse (۲۰ پیکو مول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (final extension) به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲٪ به مدت ۴۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر ۱۰۰ Ladder ارزیابی شد (شکل ۱).

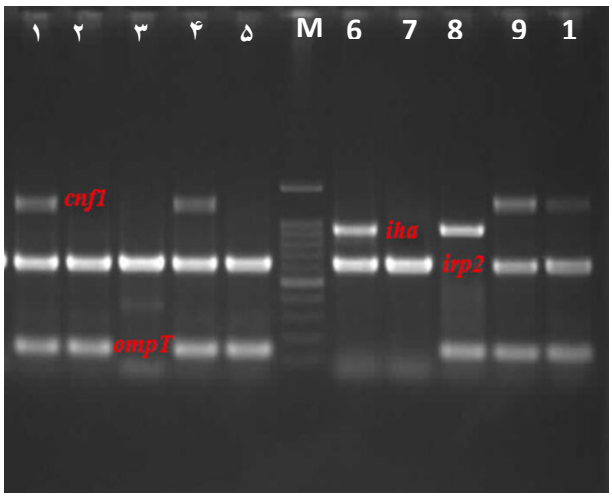
**گروه بندی فیلوژنتیکی:** تعیین فیلوژنتیکی ایزوله های *اشریشیاکلای* جمع آوری شده با استفاده از روش Clermont و همکاران انجام شد (۵). پس از استخراج DNA ژنومی ایزوله های اشریشیاکلای، حضور یا عدم حضور ژن های مارکر *chuA*، *yjaA* و قطعه TspE4.C2 با استفاده از تکنیک Triple-PCR و پرایمرهای آورده شده در جدول ۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. برنامه Triple-PCR به صورت یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ درجه سانتی

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

گراد به مدت ۷ دقیقه انجام پذیرفت. گروه بندی فیلوژنتیکی بر اساس وجود یا عدم وجود باندهای تکثیری ژن های فوق به صورت: گروه B2 ($chuA^+$، $yjaA^+$ و $TspE4.C2^{\pm}$)، گروه D ($chuA^+$، $yjaA^-$ و $TspE4.C2^{\pm}$) و گروه B1 ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$ و $TspE4.C2^+$) و گروه A ($chuA^-$، $yjaA^{\pm}$ و $TspE4.C2^-$) انجام گرفت (۵).

**جدول ۱ توالی پرایمر های ژن‌های کد کننده فاکتور های حدت و گروه های فیلوژنتیکی در اشریشیا کلی**

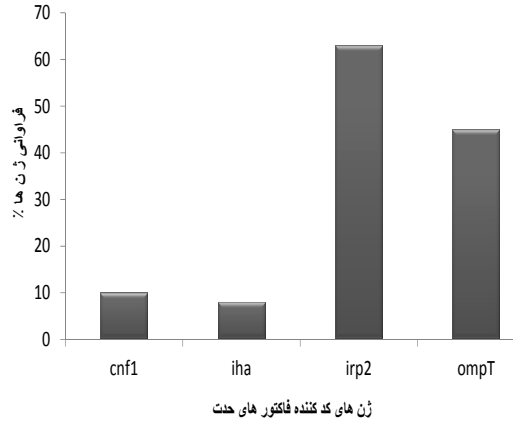
| ژن | توالی پرایمر (۵' به ۳') | اندازه(bp) |
|---|---|---|
| *cnf1* | F-AGGCAGGAATAAACCAGGAGGT | ۱۲۸۶ |
| | R-ACGAGCAGAATTTGACACACGA | |
| *iha* | F-CTGGAAGTCAGCATTCGTGGAA | ۹۳۴ |
| | R-GATGCCACTCATCCTCAGCAAA | |
| *irp2* | F-AGCATCGCCTGCTAAAACTGAA | ۶۲۳ |
| | R-CAGACGATGCAGGGCGTTATTA | |
| *ompT* | F- TGCGATCAGCTCTTTTGCTTCT | ۱۴۴ |
| | R-AGTTGACTGACTTTTCGGCCTC | |
| *ChuA* | F-GACGAACCAACGGTCAGGAT | ۲۷۹ |
| | R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA | |
| *YjaA* | F-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG | ۲۱۱ |
| | R-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC | |
| TspE 4C2 | F-GAGTAATGTCGGGGCATTCA | ۱۵۲ |
| | R-CGCGCCAACAAAGTATTACG | |



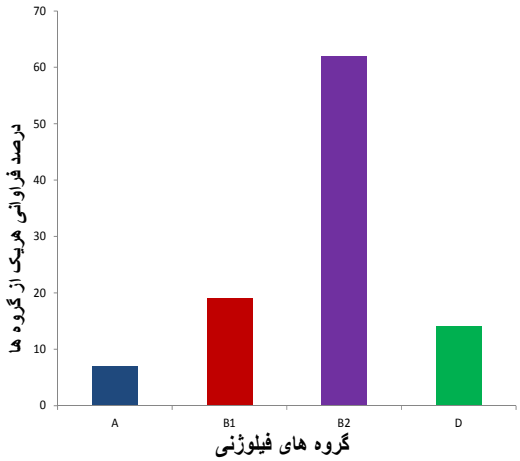

**شکل ۱. نمونه ای از Multiplex-PCR بارگذاری شده به ژل آگاروز ۲٪ را نشان می دهد. لدر ۱۰۰ جفت باز آلی بکار رفته است**

## یافته ها

از میان ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلای* ۱۰٪ دارای ژن *cnf1*، ۸٪ دارای ژن *iha*، ۶۳٪ دارای ژن *irp2* و ۴۵٪ دارای ژن *ompT* بودند (نمودار ۱). در این مطالعه مشخص شد که در بین سویه های مورد بررسی شیوع ژن *irp2* بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داده است و شیوع ژن های کد کننده پروتئاز خارج سلولی (*ompT*)، سیتوتوکسین (*cnf1*) و ادهسین غیر هموآگلوتنین (*iah*) به ترتیب در رده های بعدی قرار گرفتند (نمودار ۱). گروه بندی فیلوژنتیکی ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلای* با استفاده از روش Triple-PCR و پرایمر های ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. از ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلای* جمع آوری شده ۱۴٪ در گروه A، ۷٪ در گروه B1، ۶۰٪ در گروه B2 و ۱۹٪ در گروه D قرار گرفتند (نمودار ۲). ۱۰۰٪، ۶۲/۵٪، ۷۳/۰۱٪ و ۸۴/۴۴٪ از ایزوله های *اشریشیاکلای* به ترتیب حامل ژن های *cnf1*، *iha*، *irp2* و *ompT* متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 هستند (نمودار ۳).




**نمودار ۱. درصد ژنهای بیماری زا را در *اشریشیاکلای* های جدا شده از عفونت های سرویکوواژینال نشان می دهد**

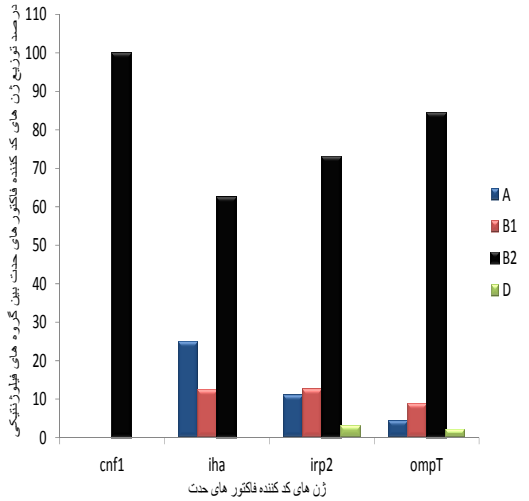



**نمودار ۲. درصد ایزوله *اشریشیاکلای* هر یک از گروه های فیلوژنتیک**

بیشترین میزان فراوانی ژن های کد کننده فاکتور های حدت در ایزوله های اشریشیاکلای گروه B2 مشاهده شد. ژن کد کننده فاکتور حدت سیتوتوکسین(*cnf1*) فقط در ایزوله های *اشریشیاکلای* متعلق به گروه B2 مشاهده شد. فقط سه ژن *iah*، *irp2* و *ompT* به ترتیب با فراوانی ۲۵، ۱۱/۱۱ و ۴/۴۴ درصد در ایزوله های *اشریشیاکلای* متعلق به گروه A مشاهده گردید. در

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

ایزوله های گروه B1 حضور ژن های فوق به ترتیب با فراوانی ۱۲/۵٪، ۱۲/۷٪ و ۸/۸۸٪ دیده شد. کمترین فروانی حضور ژن ها در ایزوله های اشریشیاکلای گروه D مشاهده شد (نمودار ۳). فقط دو ژن *irp2* و *ompT* به ترتیب با فراوانی ۳/۱۷٪ و ۲/۲۲٪ در گروه D ملاحظه شد.




**نمودار ۳. رابطه ژن های کد کننده فاکتور های حدت را با گروههای فیلوژنتیک ایزوله های *اشریشیاکلای* را نشان می دهد**

## بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر شیوع بالای ژن های کد کننده فاکتور های حدت در بین ایزوله های *اشریشیاکلای* مولد عفونت های دستگاه تناسلی است. در مطالعه حاضر مشخص شد که ۶۳ ٪ از ۱۳۲ ایزوله *اشریشیاکلای* حداقل یکی از انواع ژنهای کد کننده فاکتور های حدت را دارا بودند. در این مطالعه دریافت شد که شیوع ژنهای کد کننده فاکتور های حدت: *cnf1*، *irp2* و *ompT* در ایزوله های مورد مطالعه به ترتیب ۱۰٪، ۸٪، ۴۵٪ و ۶۳٪ بوده است.

یافته های فوق به غیر از ژن *cnf1* بیشتر از نتایج به دست آمده از مطالعات Karimian و همکارانش در سال ۲۰۱۲ می باشد. آنها عنوان کردند که شیوع ژنهای cnf1، *iah*، *irp2* و *ompT* به ترتیب ۵۰/۴٪، ۱۷/۸۸٪، ۱۱/۳۸٪ و ۴/۶۷٪ می باشد (۲۱). Sannes و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی شیوع ژنهای *cnf1*، *iha* و *ompT* را به ترتیب ۲۳٪، ۲۵٪ و ۵۱٪ در ایزوله های اشریشیاکلای مولد عفونت های ادراری گزارش نمودند که در بعضی موارد بالاتر از میزان شیوع بدست آمده از مطالعه حاضر بوده است (۲۲). Momtaz و همکاران در مطالعه ای در ایران بر روی ۱۲۳ ایزوله اشریشیاکلای جدا شده از عفونت های ادراری، شیوع ژن های *cnf1* و *irp2* را به ترتیب ۶۲ و ۱۴ مورد گزارش کردند(۲۳). علت تفاوت نتایج این مطالعه با دیگر مطالعات را می توان تفاوت در تعداد و نوع نمونه های بالینی در بین مطالعات بیان شده ذکر کرد. همچنین تعیین گروه های فیلوژنتیکی در ایزوله های اشریشیاکلای بر اساس روش ارائه شده توسط Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه۱۴٪، ۷٪، ۶۰٪ و ۱۹٪ از ایزوله‌های *اشریشیاکلای* مولد عفونت های دستگاه تناسلی به ترتیب در گروههای فیلوژنتیکی A، B1، B2 و D قرارگرفتند. که تقریبا نزدیک به نتایج مطالعات Sannes و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی(۲۲)، Clermont در سال ۲۰۰۵ میلادی(۳) و Bashir و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی بود(۱۱). اما با مطالعات Alizade و همکاران در سال ۲۰۱۳ میلادی (شهرستان بم) (۲۴) و Basu و همکاران در سال ۲۰۱۳ میلادی (۲۵) تفاوت دارد.

می توان یکی از علل تفاوت نتایج این دو مطالعه با مطالعه اخیر را متفاوت بودن منطقه جغرافیایی مورد مطالعه و تفاوت در نوع نمونه‌های بالینی عنوان کرد. در این مطالعه ژن های *cnf1*، *iah*، *irp2* و *ompT* بیشتر در ایزوله های متعلق به گروه B2 مشاهده شد، که این موضوع با نتایج سایر مطالعات هماهنگی دارد (۲۶و۱۴و۳). ایزوله های اشریشیاکلای گروه A و B1 سه ژن (*iah*، *irp2*و *ompT*) مورد بررسی را دارا بودند در حالیکه ایزوله های گروههای D فقط حاوی ۲ ژن (*irp2* و *ompT*) بودند، که مشابه نتایج Bashir و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی (۱۱)، Usein و همکاران در سال ۲۰۰۶ و ۲۰۱۱ میلادی بود (۲۸و۲۷).

در پایان، بررسی وجود ژن های کد کننده فاکتور های حدت در ایزوله های اشریشیاکلای مولد عفونت های دستگاه تناسلی یک پایه و نمای کاملتر و صحیح برای آنالیز خطر می باشد، به گونه ای که فراوانی ایزوله های تولید کننده فاکتور های حدت: سیتوتوکسین،ادهسین غیرهموآگلوتنین، همولوگ سیدروفور و پروتئاز خارج سلولی نشان دهنده میزان خطر بیماریزایی در بیماران مبتلا به عفونت های واژینال است. *اشریشیاکلای* کاملا قادر به اکتساب ژنتیک متحرک کد کننده فاکتور های حدت می باشد و این مسئله در پیشگیری و نیز کاربردهای تشخیصی اهمیت دارد و تحقیقات بیشتری را می طلبد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل و دوستانی که ما را در اجرای این تحقیق صمیمانه یاری داده اند، تقدیر و تشکر می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

# The Relationship between Phylogenetic Groups and Pathogenicity Encoding Genes with regards to Extra-Intestinal Escherichia coli Isolates' Factors using Multiplex-PCR Method

**A. Rashki (PhD)[*1], H.A. Abdi (BSc)[2]**

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, I.R. Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, I.R. Iran.

**J Babol Univ Med Sci; 17(2); Feb 2015; PP:36-42**

**Received: Apr 26th 2014, Revised: May 14th 2014, Accepted: Jun 25th 2014.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Extraintestinal Escherichia coli bacteria is the main reason behind the urogenital infections in humans. Several virulence factors such as cytotoxin genes coding for proteins, adhesion, siderophore receptors and outer-membrane protease are detected within the extraintestinal Escherichia coli. This study aimed to investigate the distribution of genes encoding virulence factors and their correlation with phylogenetic groups in Escherichia coli isolates. The samples were taken from the patients referring to the women's clinics in the city of Zabol, Iran.

**METHODS:** In this study, 132 Escherichia coli bacteria were isolated through standard, biochemical methods while all isolated genomic DNA was extracted by boiling. The presence of Cytotoxin Necrotizing Factor 1 (CNF1), IrgA homologue adhesin (iha), iron-responsible protein (irp2) and outer-membrane protease (ompT) was studied via Multiplex-PCR method. Furthermore, utilizing Triple-PCR method, we were able to carry out phylogenetic grouping of all the isolates using the presence or absence of such genes as chuA, yjaA and TspE4.C2 piece.

**FINDINGS:** Among 132 isolates, the prevalence of the following genes were determined as CNF1 (10%), iha (8%), irp2 (45%) and ompT (63%). Moreover, for the total number of 132 Escherichia coli isolates, 14%, 7%, 60% and 19% were placed in phylogenetic groups A, B1, B2 and D respectively. Most of the distribution of the genes encoding virulence factors were observed in the B2 group, with an abundance of CNF1 (100%), iha (5.62%), irp2 (01/73%) and ompT (44/84%) in comparison with the other groups.

**CONCLUSION:** This study concluded that ompT and irp2 are the most frequent genes to isolate virulence factors of extraintestinal Escherichia coli from the genital tract infections. This finding could provide researchers with information regarding the importance of the pathology of reproductive tract infections and thus, help them with discovering more effective remedies.

**KEY WORDS:** *Genital Tract Infections, Outer-Membrane Protease, Cytotoxin Adhesion, Phylogenetic Analysis, Escherichia coli.*

**Please cite this article as follows:**

Rashki A, Abdi HA. The Relationship between Phylogenetic Groups and Pathogenicity Encoding Genes with regards to Extra-Intestinal Escherichia coli Isolates' Factors using Multiplex-PCR Method. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(2):36-42.

* **Corresponding Author; A. Rashki (PhD)**
**Address:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol , I.R. Iran.
**Tel:** +98 54 31232250-1
**E-mail:** ah_rashki@usal.es

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

## References

1. Diard M, Garry L, Selva M, Mosser T, Denamur E, Matic I. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli are fitness elements involved in intestinal colonization. J Bacteriol. 2010;192(19):4885-93.
2. Klemm P, Hancock V, Schembri MA. Fimbrial adhesins from extraintestinal Escherichia coli. Environ Microbiol Rep. 2010; 2(5):628-40.
3. Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E. Determination of Escherichia coli O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(2):129-36.
4. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect. 2003;5(5):449-56.
5. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000;66(10):4555-8.
6. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. Biotechniques. 2000;29(2):332-7.
7. Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, et al. Molecular characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Jpn J Infect Dis. 2008;61(1):58-64.
8. Asano Y, Karasudani T, Tanaka H, Matsumoto J, Okada M, Nakamura K, et al. Characterization of the Escherichia coli O157:H7 outbreak strain whose Shiga toxin 2 gene is inactivated by IS1203v insertion. Jpn J Infect Dis. 2013;66(3):201-6.
9. Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains. Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1553-62.
10. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventre A, Elion J, et al. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology. 2001;147(Pt 6):1671-6.
11. Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar MI. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic E. coli from Faisalabad region of Pakistan. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;11:23.
12. Kitaichi K, Morishita Y, Doi Y, Ueyama J, Matsushima M, Zhao YL, et al. Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. Eur J Pharmacol. 2003;464(1):39-48.
13. Contreras CA, Ochoa TJ, Ruiz J, Lacher DW, Rivera FP, Saenz Y, et al. Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from Peruvian children. J Med Microbiol. 2011;60(Pt 5):639-46.
14. Woodworth JC, Tokach MD, Nelssen JL, Goodband RD, Dritz SS, Koo SI, et al. Influence of dietary L-carnitine and chromium picolinate on blood hormones and metabolites of gestating sows fed one meal per day. J Anim Sci. 2007;85(10):2524-37.
15. Krieger JN, Dobrindt U, Riley DE, Oswald E. Acute Escherichia coli prostatitis in previously health young men: bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. Urology. 2011;77(6):1420-5.
16. Osugui L, Pestana de Castro AF, Iovine R, Irino K, Carvalho VM. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. Vet Microbiol. 2014; 171(1-2):242-7.
17. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. Genotypic and phenotypic characterization of Escherichia coli isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. Pediatr Infect Dis J. 2013;32(5):543-8.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]

18. Graciano MF, Santos LR, Curi R, Carpinelli AR. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. J Cell Physiol. 2011; 226(4):1110-7.
19. Toval F, Kohler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of Escherichia coli isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. J Clin Microbiol. 2014 Feb;52(2):407-18.
20. Derakhshandeh A, Firouzi R, Moatamedifar M, Motamedi A, Bahadori M, Naziri Z. Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains isolated from human samples. Mol Biol Res Commun. 2013; 2(4):143-9.
21. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran African Journal of Microbiology Research 2012;39(68):6811–16.
22. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. J Infect Dis. 2004;190(12):2121-8.
23. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12:8.
24. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of Escherichia coli isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran. Comp Clin Pathol 2014; 23(5):1253-7.
25. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus haemolyticus and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Res Microbiol. 2011;162(10):1060-6.
26. Logue CM, Doetkott C, Mangiamele P, Wannemuehler YM, Johnson TJ, Tivendale KA, et al. Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated Escherichia coli from fecal E. coli isolates of healthy human hosts. Appl Environ Microbiol. 2012;78(16):5824-30.
27. Usein CR, Palade AM, Popovici N, Tatu-Chitoiu D, Ciontea S, Damian M. Virulence genotypes of Escherichia coli strains from bacteremia in relation to phylogeny. Roum Arch Microbiol Immunol. 2006;65(3-4):100-4.
28. Usein CR, Grigore LA, Georgescu RM, Bãltoiu MC, Condei M, Teleman MD. Phylogenetic background and extraintestinal virulence genotypes of Escherichia coli vaginal strains isolated from adult women. Rev Româ Med Lab. 2011; 19(1):37-45.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.5.0 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.17.2.36 ]