

بررسی فراوانی ژن های *sfa* و *pap* در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان آیت اله روحانی بابل

امیر حسین شعبانی^۱، اکرم امینی (MSc)^۲، امیرمرتضی ابراهیم زاده نامور (PhD)^{۳*}

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

دریافت: ۹۶/۸/۲، اصلاح: ۹۶/۱۱/۲، پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: عفونت های ادراری ناشی از اشریشیاکلی از مهم ترین علل عفونت های بیمارستانی به شمار می روند. فاکتورهای آدهسینی از قبیل ژن های *sfa* و *pap* در اتصال باکتری به سلول های اپیتلیال و روند پاتوژنیسیته سهم بسزایی را ایفا می کنند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع ژن های مذکور در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان روحانی شهر بابل می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی ۷۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه ادراری بیماران بستری در بیمارستان روحانی شهر بابل جدا و با استفاده از تست های افتراقی میکروب شناسی از قبیل کشت در محیط مک کانکی آگار، TSI، تست اکسیداز و غیره تایید گردید. در ادامه مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. سپس DNA باکتری استخراج و فراوانی ژن ها با روش مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه مقاومت به اریترومایسین (۶۵/۷ درصد) و تریمتوپریم-سولفامتاکسازول (۵۷ درصد) به ترتیب بیشترین درصد را به خود اختصاص داد. همچنین در صد فراوانی ژن های *sfa* و *pap* به ترتیب ۶۰ درصد و ۲۷ درصد گزارش گردید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که ژن های *sfa* و *pap* از فراوانی قابل توجهی برخوردار بوده و مقاومت آنتی بیوتیکی نیز نیاز به توجه ویژه دارد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

عفونت های باکتریایی از مهمترین و شایع ترین علل عفونت های مجاری ادراری محسوب می شوند که می تواند منجر به صرف هزینه های گزاف در بخش درمانی گردد (۱). در کشورهای در حال توسعه سالانه حدود ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت مجاری ادراری مبتلا می شوند (۲). طبق مطالعات صورت گرفته میزان بروز آن در جنس مونث در مقایسه با جنس مذکر از درصد فراوانی بالاتری برخوردار است (۳). از میان عوامل باکتریایی، اشریشیاکلی مهم ترین عامل در ایجاد این نوع از عفونت ها محسوب می شود. این باکتری میکروارگانیسم غالب فلور روده ای محسوب می شود که می تواند عفونت های خارج روده ای شدیدی مانند پیلونفریت، باکتری، استئومیلیت، پنومونی، سیستیت و غیره را به دنبال داشته باشد (۴). از طرفی عامل حدود ۳۵ درصد از عفونت های اکتسابی بیمارستانی شناخته شده است (۵). اشریشیاکلی در شرایطی مانند نقص سیستم ایمنی و یا وجود بیماری های زمینه ای می تواند به کمک فاکتورهای آدهسینی کلونیزه شده و نهایتاً به سمت مثانه و کلیه پیشروی کرده و موجب سیستیت و عفونت مجاری ادراری گردد (۴). شواهد آزمایشگاهی و بالینی بیانگر این مطلب می باشد که سویه هایی که توانایی ایجاد عفونت را دارند دارای ویژگی های ویروالانس مختلفی

می باشند که می توانند در اتصال، کلونیزاسیون و بیماریزایی باکتری نقش مهمی را ایفا کنند. اتصال باکتری به سلول های اوروپی تللیال به باکتری اجازه می دهد تا در مقابل عملکرد تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند. از این رو، اتصال باکتری به سلول های اوروپی تللیال یک مرحله مهم برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است (۳). این اتصال به واسطه یکی از آدهزین های باکتریایی به نام فیمبریه P که توسط ژن *pap* یا *pyelonephritis associated pili* که می شود اتفاق می افتد (۳). فیمبریه P در کلونیزاسیون باکتری در مجاری ادراری فوقانی، اتصال به اندوتلیوم عروق کلیوی و نهایتاً ایجاد پیلونفریت نقش دارد (۶). از دیگر فاکتور های آدهسینی مهم در رابطه با این موضوع فیمبریه S است که توسط ژن *sfa* یا *fimbrial adhesion* که می شود. ژن های فوق از نوع آدهزین های مقاوم به مانوز بوده و بر روی ناحیه ای از کروموزوم به نام جزیره بیماریزایی قرار دارند (۳-۵). با توجه به مطالعات صورت گرفته ارتباط معنی داری بین وجود ژن های *pap* و *sfa* و عفونت های پیلونفریت، مننژیت و سیتی سمی گزارش شده است (۷). در میان این فاکتورهای آدهزینی، سایر فاکتورهای بیماریزایی مانند

□ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۴۳۶۱۹ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر امیرمرتضی ابراهیم زاده نامور

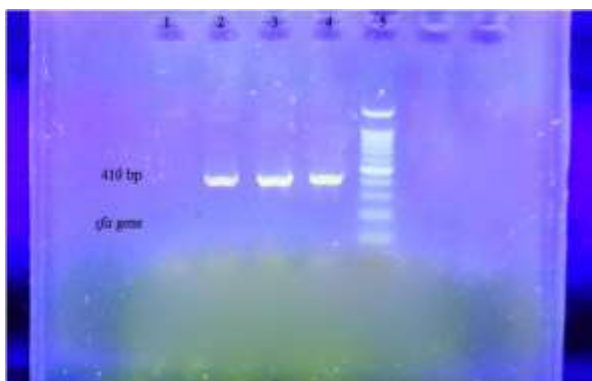
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۱۱-۳۲۱۹۹۵۹۲

جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی جهت بررسی ژن های *pap* و *sfa*

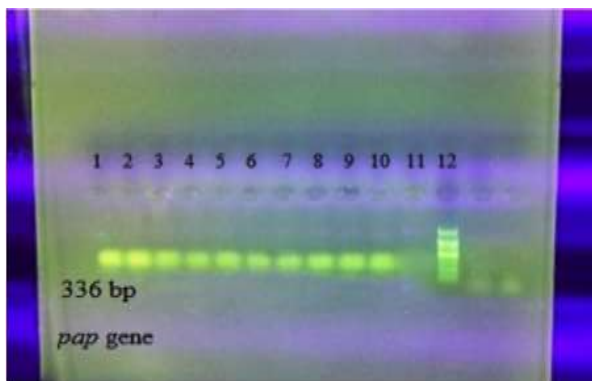
Gene	Primers	Amplicon size (bp)
<i>pap</i>	GCA ACA GCA ACG CTG GTT GCA TCA T AGA GAG AGC CAC TCT TAT ACG GAC A	۳۳۶
<i>sfa</i>	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	۴۱۰

یافته ها

از میان ۷۰ سویه اشریشیاکلی جمع آوری شده، ۵۳ درصد و ۴۷ درصد به ترتیب متعلق به جنس مونث و مذکر بود. بر اساس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۶۵/۷ درصد سویه ها به اریترومایسین و ۵۷ درصد به تری متوپریم/سولفامتوکسازول مقاومت داشتند. از طرفی ۴۱/۵ درصد به سیپروفلوکساسین، ۳۲/۸ درصد به جنتامایسین، ۲۷/۲ درصد به توپرامایسین، ۱۲/۸ درصد به لووفلوکساسین و ۴/۳ درصد به ایمی پنم مقاوم بودند. در بین سویه های مورد مطالعه فراوانی سویه های دارای مقاومت چندگانه ۱۵/۷ درصد بدست آمد. در بررسی فراوانی ژن های مورد بررسی ۲۷٪ سویه ها دارای ژن *pap* و ۶۰٪ دارای ژن *sfa* بودند. شکل ۱ و ۲ تصاویر مربوط به PCR ژن های مذکور می باشند.



شکل ۱. لاین ۱ کنترل منفی، لاین ۲ و ۳ سویه های دارای ژن *sfa* لاین ۴ سویه کنترل مثبت و لاین ۵ 100 bp DNA Ladder



شکل ۲. لاین ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ سویه های دارای ژن *pap* لاین ۱۰ سویه کنترل مثبت، لاین ۱۱ سویه کنترل منفی و لاین ۱۲ 100 bp DNA Ladder

اثر واکتین، کولیسین و همولیزین نیز به اشریشیاکلی یوروپاتوژن نسبت داده می شوند(۸). لذا با توجه به مطالب فوق تشخیص سریع فاکتورهای ویرولاتس به کمک تکنیک PCR و بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی برای تعیین پروتکل درمانی امری ضروری است. بررسی ژن های مذکور در بین سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن در مناطق مختلف جغرافیایی دنیا و همچنین کشور ایران مورد ارزیابی قرار گرفته اما از آنجایی که در شهر بابل تاکنون مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی فراوانی ژن های *pap* و *sfa* در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان آیت الله روحانی شهر بابل در یک مقطع زمانی شش ماهه می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل با کد ۱۳۹۵.۲۴۷. MUBABOL.REC بر روی نمونه های ادراری جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان روحانی شهر بابل صورت پذیرفت. در یک مقطع زمانی شش ماهه با مراجعه به آزمایشگاه بیمارستان آیت الله روحانی ۷۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری تایید شده توسط پزشک، جداسازی و جهت تشخیص نهایی به بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ارسال گردید.

در آزمایش مستقیم آنالیز ادرار، نمونه ها از لحاظ وجود WBC، سلول های اپیتلیال، باکتری و موکوس مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از تست های استاندارد میکروب شناسی از قبیل کشت بر روی محیط مک گانکی آگار، رنگ آمیزی گرم، تست های افتراقی نظیر تست اندول، سیمون سیترا، TSI، SIM، MR/VP و غیره سویه های اشریشیاکلی مورد تایید نهایی قرار گرفت. در انتها سویه ها در محیط BHI براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول در ۲۰- درجه سانتی گراد جهت آزمایش های بعدی ذخیره شدند.

تست آنتی بیوگرام: تست مقاومت آنتی بیوتیکی به روش کربی بائر و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی اریترومایسین (۱۵ μg)، تریمتوپریم-سولفامتاکسازول (۲۵ μg + ۲۳/۷۵ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، توپرامایسین (۱۰ μg)، لووفلوکساسین (۵ μg) و ایمی پنم (۱۰ μg) طبق استاندارد های (2016) CLSI صورت پذیرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شرکت ROCHE بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گردید.

تست PCR: جهت انجام این تست از پرایمرهای اختصاصی بررسی شده با نرم افزار Blast و برنامه های مخصوص استفاده شد (جدول ۱).

حجم نهایی برای هر یک از واکنش ها ۲۵ μl درنظر گرفته شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، انیلینگ در دمای ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام و پس از اتمام واکنش، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر میزان فراوانی ژن *sfa* و *pap* به ترتیب ۶۰ و ۲۷ درصد بدست آمد. باکتری اشریشیاکلی یکی از مهمترین علل اصلی ایجادکننده عفونت مجاری ادراری بشمار می آید(۱). وجود فیمبریه در اشریشیاکلی های پاتوژن عامل مهمی در بیماریزایی باکتری محسوب شده و همراه با سایر فاکتورهای بیماریزایی می تواند نقش بسزایی را در پاتوژنسیته ایفا کند. وجود فاکتورهای دخیل در چسبندگی نقش بسیار اساسی در اتصال باکتری به سطوح ادراری و کلونیزاسیون آن دارند. در مطالعه Tarchouna و همکاران، ۹۰ سویه مورد بررسی قرار گرفت که ۴۱ درصد سویه های دارای ژن *sfa* و ۳۴ درصد دارای ژن *pap* بودند(۹).

در تحقیق Karimian و همکاران با بررسی ۱۲۳ سویه اشریشیاکلی جمع آوری شده از عفونت های ادراری میزان ژن *sfa* ۱۴/۶ درصد و میزان ژن *pap* ۲۷ درصد گزارش شد(۱۰). در مطالعه Rahdar و همکاران فراوانی ژن *sfa* و *pap* نیز ۸۱ درصد گزارش گردید(۷). همچنین در مطالعه Asadi و همکاران میزان فراوانی هر دو ژن ۵۳/۳ درصد گزارش شد(۱۱). در مطالعه Bahalo و همکاران میزان ژن های *sfa* و *pap* به ترتیب ۳۰ و ۴۰ درصد بدست آمد(۱۲). از طرفی در گزارش Mohajeri و همکاران، (۴۲/۲۰/۵)٪ از سویه ها دارای ژن *pap* و (۴۴/۲۱/۵)٪ دارای ژن *sfa* بودند(۱۳). همچنین در مطالعه Shetty و همکاران. فراوانی ژن *pap* ۶۰/۸۷ درصد و ژن *sfa* ۳۹/۱٪ گزارش گردید(۱۴). تنوع در میزان فراوانی ژن های مذکور در مطالعات انجام گرفته ممکن است به

علت پراکندگی سویه ها در مناطق مختلف جغرافیایی باشد. از آنجائیکه اولین مرحله جهت بیماریزایی اشریشیاکلی اتصال آن به دیواره اوروایی تلیال می باشد لذا فیمبریه و فاکتورهای اتصالی نقش کلیدی را بر عهده دارند. از طرفی پیلونفریت و عفونت های پیچیده ادراری با حضور ژن های کد کننده فاکتورهای اتصالی رابطه معنی داری دارند، در نتیجه تشخیص سریع آنها می تواند در درمان بیماران مفید واقع گردد. با توجه به اهمیت این موضوع فراوانی ژن های مذکور در بیمارستان روحانی شهر بابل مورد بررسی قرار گرفت که نتایجی مشابه موارد گزارش شده در دیگر نقاط کشور بدست آمد. از طرفی وجود سویه های دارای مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی نیز در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت که تا حدودی درصد کمی را به خود اختصاص داد اما با این وجود مقاومت به آنتی بیوتیک ایمی پنم می تواند در آینده ای نه چندان دور مشکلات درمانی را در پی داشته باشد لذا با بکارگیری استراتژی های درمانی می توان از بروز و ظهور سویه های مذکور پیشگیری نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل جهت حمایت از این طرح، پرسنل بخش آزمایشگاه بیمارستان آیت الله روحانی و همچنین آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل جهت همکاری در این طرح تشکر و قدردانی می گردد.

The Frequency of pap and sfa Genes Among Escherichia Coli Strains Isolated from Hospitalized Patients of Rouhani Hospital in Babol, Iran

A.H. Shabani¹, A. Amini (MSc)², A.M. Ebrahimzadeh Namvar (PhD)^{2*}

1.Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(3); Mar 2018; PP: 64-8

Received: Oct 24th 2017, Revised: Jan 22th 2018, Accepted: Feb 9th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Escherichia coli* urinary tract infections are known as one of the most important nosocomial infections. Adhesion genes such as *sfa* and *pap* which are important in bacterial attachment and colonization in epithelial cells have a significant role in bacterial pathogenicity. The aim of this study was to investigate the frequency of mentioned genes among *E. coli* strains isolated from hospitalized patients of Rouhani hospital in Babol city.

METHODS: A total of 70 *E. coli* strains were isolated from urinary specimens of Rouhani hospitalized patients and then identified and confirmed with differential tests by using MacConkey agar, TSI, Oxidase test and etc. Thereafter, antimicrobial pattern were carried out by disk diffusion method. Finally the bacterial genomic DNA was extracted and the frequency of genes was determined by molecular method.

FINDINGS: In this study resistance to Erythromycin (65.7%) and Trimethoprim-sulfamethoxazole (57%) had the highest resistance ratio. On the other hand the frequency of *sfa* and *pap* genes was 60% and 27% respectively.

CONCLUSION: The results of this study showed the *sfa* and *pap* genes have a high prevalence and antibiotic resistance also needs special attention.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, Urinary Tract Infections, Antibiotic Resistance.

Please cite this article as follows:

Shabani AH, Amini A, Ebrahimzadeh Namvar AM. The Frequency of Pap and SFA Genes Among Escherichia Coli Strains Isolated from Hospitalized Patients of Rouhani Hospital in Babol, Iran. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(3):64-8.

*Corresponding Author; A. Ebrahimzadeh Namvar (PhD)

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

Tel: +98 11 32199592

E-mail: amirmorteza.namvar@gmail.com.

References

1. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;252(2):183-90.
2. Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis*. 2001;183:1-4.
3. Usein C, Damian M, Tatu-chitoiu D, Capusa C, Faragas R, Tudorache D, et al. Prevalence of virulence genes in escherichia coli strains isolated from romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Med*. 2001;5(3):303-10.
4. Al-Badr A, Al-Shaikh G. Recurrent urinary tract infections management in women: a review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013;13(3):359-67.
5. Schwartz DJ, Conover MS, Hannan TJ, Hultgren SJ. Uropathogenic Escherichia coli superinfection enhances the severity of mouse bladder infection. *PLoS Pathog*. 2015;8;11(1):1004599.
6. Melican K, Sandoval RM, Kader A, Josefsson L, Tanner GA, Molitoris BA, Richter-Dahlfors A. Uropathogenic escherichia coli p and type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):1001298.
7. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Rashki Ghalehnoo M. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc*, and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic escherichia coli isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;17:8(8):e22647.
8. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic escherichia coli from a university hospital in ribeirão preto, são paulo, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo Brazil*. 2006;48(4):185-8.
9. 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(6):e450-3.
10. karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African J Microbiol. Res*. 2012; 6(39):6811-6816.
11. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The association of virulence determinants of uropathogenic escherichia coli with antibiotic resistance. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(5):e9936.
12. Bahalo S, Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Momeni M, Tajbakhsh F. Detection of some virulence factors of Escherichia coli isolated from urinary tract infection isolated of children in Shahrekord Iran by Multiplex PCR. *Middle-East J Scien Res*. 2013;14(1):29-32.
13. Mohajeri P, Khademi H, Ebrahimi R, Farahani A, Rezaei M. Frequency distribution of virulence factors in uropathogenic Escherichia coli isolated from Kermanshah in 2011-2012. *Int J Appl Basic Med Res*. 2014;4(2):111-6.
14. Shetty AV, Kumar SH, Shekar M, Shetty AK, Karunasagar I, Karunasagar I. Prevalence of adhesive genes among uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection in Mangalore. *Indian J Med Microbiol*. 2014;32(2):175-8.