گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۷، تیر ۱۳۹۷، صفحه ۴۶-۴۰

پلاسمید رپلیکون تایپینگ سروتیپ های O2، O6 و O157 باکتری *اشریشیاکلای* با استفاده از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار (PBRT)

آرزو کشتگر (MSc)[۱]، احمد راشکی (PhD)[۲*]، فاطمه حدادی (PhD)[۱]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲-گروه پاتوفیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت: ۹۶/۱۰/۶، اصلاح: ۹۶/۱۲/۱۵، پذیرش: ۹۷/۱/۶

خلاصه

سابقه و هدف: امروزه از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی در مطالعات اپیدمیولوژیکی برای توصیف انتشار صفاتی چون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه استفاده می شود. علی رغم نقش حیاتی پلاسمید ها در انتقال عوامل بیماری زا، مطالعات چندانی روی نوع پلاسمیدهای حمل شده توسط سروتیپ های باکتری *اشریشیا کلای* انجام نگرفته است. هدف اصلی این مطالعه دسته بندی پلاسمید های سروتیپ های O_6 O_2 و O_{157} باکتری *اشریشیاکلای* بر اساس گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی به روش Multiplex-PCR می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۴۰ ایزوله *اشریشیاکلای* متعلق به سروتیپ های O_6، O_2 و O_{157} به منظور شناسایی ۸ رپلیکون پلاسمیدی(*IncN*، *IncFIB*، *FreP*، *IncB/O*، *Inc FIIA*، *IncFIC*،*IncFIA*، *IncI1*) به روش Multiplex – PCR انجام گرفت.

یافته ها: نتاج نشان داد که امپلیکون Fre با ۸۸٪ و رپلیکون های *IncFIB*(78%), IncFIA(60%), IncB/O(53%), IncI1(50%), IncN(25%) در بین ۴۰ ایزوله مورد مطالعه مشاهده شد. رپلیکون IncFIC وIncFIIA در هیچکدام از ایزوله ها مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه بیانگر تنوع بالای گروه های ناسازگار پلاسمیدی در بین ایزوله های مورد مطالعه بود.

واژه‌های کلیدی: پلاسمید، Multiplex-PCR، رپلیکون.

مقدمه

به طور طبیعی پلاسمید های باکتریایی عناصر خود تکثیر شونده و متنوعی هستند که صفاتی چون مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین، ماندگاری و سازگاری در محیط و حدت را برای باکتری ها رمزگذاری می کنند(۲و۱). همچنین پلاسمیدها عامل اصلی انتقال افقی ژن ها (HGT) هستند که نقش مهمی در سازگاری باکتری نسبت به تغییرات محیطی دارند(۳). علاوه بر این، پلاسمید ها می توانند به پویایی ژنوم باکتری از طریق حمل عناصر قابل انتقال و ترانسپوزون ها و الحاق آنها در کروموزوم باکتری (نوترکیبی همسان و یا غیر همسان) کمک کنند(۱). به دلیل نقش آنها در HGT (۱)، به ویژه در رابطه با ظهور و انتشار مقاومت های ضد میکروبی (۵و۴) توجه زیادی به شناسایی و طبقه بندی پلاسمید های باکتریایی شده است. به طور معمول پلاسمید ها را بر اساس ناسازگاری آنها با یکدیگر (صفتی در ارتباط با تکثیر و یا همانند سازی پلاسمید ها) طبقه بندی می کنند(۶). تایپینگ پلاسمید ها بر اساس ناسازگاری (Inc) بر این واقعیت استوار است که دو پلاسمیدی که توالی دخیل در همانند سازی و جدا سازی DNA مشابه ای دارند قادر به تکثیر در یک میزبان نیستند(۶). از آنجاییکه تایپینگ ناسازگاری (Inc) بر اساس فاکتورهای همانند سازی آنها است، بنابر این از اصطلاحات Inc و Rep برای توصیف انواع پلاسمیدها در یک میزبان استفاده می شود (۷و۶و۱). در حال حاضر ۲۷ گروه ناسازگار (Inc) در میان خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده است. طبقه بندی پلاسمیدها براساس گروه های ناسازگار به دلیل نقش آنها در مقاومت های آنتی بیوتیکی و انتقال فاکتور های بیماری زا بسیار مطلوب و کاربردی است (۱۰-۸و۵و۲). متاسفانه، مطالعه بر اساس ناسازگاری فیزیکی به ویژه هنگامی که به جمعیت باکتری های بزرگ اعمال می شود، خسته کننده و زمان‌بر است. در سال ۱۹۸۸ در مطالعه ای Couturier و همکاران از روش هیبریداسیون برای تایپینگ مقایسه ای پلاسمیدهای باکتریایی براساس نوع همانند سازی آنها از ۱۹ پروب مرتبط با ۱۹ گروه ناسازگار مختلف استفاده کردند. اگر چه این روش نشان دهنده

▣ این مقاله حاصل پایان نامه آرزو کشتگر دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۰۲۴۱۹ دانشگاه علوم پزشکی زابل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر احمد راشکی

آدرس: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۰۵۴-۲۴۸۲۲۲۵۰

E-mail: ah_rashki@usal.es

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]

پیشرفت قابل توجهی در تایپینگ پلاسمیدها بود، اما روش زمان‌گیر و خسته کننده و ناسازگار با رویکردهای فعلی از روش‌های مطلوب بود(۶). در تحقیقی که توسط Carattoli و همکاران انجام شد از یک روش ساده و کاربردی تایپینگ رپلیکون مبتنی بر PCR (PCR-based replicon typing) برای طبقه‌بندی ۱۸ گروه ناسازگاری پلاسمید در خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد (۸). اگرچه این روش تا حد زیادی نسبت به روش های قبلی ساده تر بود، اما با توجه به داشتن مرحله Multiplex-PCR و سه PCR ساده می تواند برای مطالعه پلاسمیدهای جمعیت های بزرگ باکتریایی خسته کننده و پر هزینه باشد که در این مطالعه نیز از این روش استفاده شده است. *اشریشیاکلای* خارج روده ای باعث بیماری های مختلفی در انسان و حیوان می شود. این گروه به طور معمول دارای پلاسمید های مرتبط با بیماری زایی و مقاومت ضد میکروبی هستند (۱۲و۱۱و۲).

این موضوع در سویه های *اشریشیاکلای* مولد عفونت ادراری یا *اشریشیاکلای* یوروپاتوژنیک (UPEC) که باعث بیماری های سیستیت و نفریت چرکی در انسان و حیوان می شود صادق است که دارای تعداد زیادی پلاسمید می باشند. اخیرا توسط محققین گزارش شده است که حضور پلاسمید های بیماری زا ColV و ColBM در *اشریشیاکلای* خارج روده ای مشخصه تعریف شده ای از پاتوتیپ بودن آنها است. سویه های UPEC علت اصلی عفونت های دستگاه ادراری از جمله سیستیت و پیلونفریت هستند. در این باکتری ها، گروه O-serogroups مربوط به مشخصات عامل ویرولانس در هر سویه است. مطالعات قبلی نشان داد که سروگروپهای O_1، O_2، O_4، O_6، O_7، O_8، O_{15}، O_{16}، O_{18}، O_{21}، O_{22}، O_{25}، O_{75} و O_{83} به ترتیب با سویه های UPEC مرتبط هستند و شیوع سروتایپ های مختلف در مناطق مختلف متفاوت است (۱۳).

تحقیقات نشان داده که پلاسمیدهای یافت شده در این باکتری ها متعلق به گروه ناسازگار IncFIB هستند که در ژنوم خود دارای نواحی خیلی محافظت شده‌ای چون FIB replicon، اپرون ColV و یا ColBM و چندین اپرون حاوی ژن های بیماری زا و ژن های دخیل در کسب و انتقال آهن می باشند. علاوه بر این، این نوع پلاسمیدها و دیگر پلاسمیدهای که مقاومت آنتی بیوتیکی را رمزگذاری می‌کنند در باکتری‌های UPEC یافت شده اند(۱۵و۱۴و۷و۲). با توجه به شیوع عفونت ادراری و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت های مختلف انسانی و نیز به دلیل سهل‌انگاری در درمان این نوع عفونت ها، مشکلات جبران-ناپذیری در آینده رخ خواهد داد.

بنابراین ضرورت انجام غربالگری، شناسایی و طبقه بندی پلاسمیدها جهت بررسی های اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب عفونت های ادراری حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر جهت دسته بندی سروتیپ ها O2 ، O6 و O157 باکتری *اشریشیاکلای* جدا شده از عفونت‌های ادراری بر اساس رپلیکون پلاسمید به روش Multiplex-PCR صورت گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه زابل با کد IR- OUZ-93.08، تعداد ۴۰ ایزوله *اشریشیاکلای* متعلق به سروتیپ های O2 ، O6 و O157 جدا شده در مطالعات قبلی از بیماران مشکوک به عفونت ادراری در زابل مورد بررسی قرار گرفتند(۱۷و۱۶).

استخراج DNA ژنومی: ابتدا ایزوله ها در محیط کشت LB (شرکت HiMedia کشورهند) براث کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار(Labnet International, Inc) گرماگذاری گردید. سپس باکتری از محیط مایع با کمک سانتریفوژ(اپندورف کشور آلمان) جدا گردید. سلول‌ها طی دو مرحله با محلول PBS ۱٪ شستشوی داده شد. سپس سلول های شستشوی داده شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به صورت سوسپانسیون در آمدند. سوسپانسیون سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸°C جوشانده شد. پس از سانتریفوژ کردن، محلول رویی حاوی DNA برای انجام Multiplex-PCR در برودت منفی ۲۰°C ذخیره گردید.

شناسایی وجود رپلیکون پلاسمید ها: برای شناسایی وجود رپلیکون پلاسمید های (N، FIB، FreP، B/o، FIIA، FIC، FIA، I1) در ایزوله های *اشریشیاکلای* جدا شده از پرایمرها(جدول ۱) و روش Multiplex – PCR در سه پانل: پانل ۱ (B/o و FIC)، پانل ۲ (FIB، FIA و FIIA) و پانل ۳ (FreP، I1 و N) استفاده شد(۷).

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر(اپندورف کشور آلمان) انجام گردید. برای انجام فرآیند PCR آنزیم Mastermix RED (شرکت آمپلیکون) از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA باکتری (DNA الگو) ۸ میکرولیتر از Mastermix RED و ۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۲۰ پیکو مول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود.

واسرشتگی اولیه (Initial Deneturation) در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی (Deneturation) در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (Annealing) به DNA پلاسمیدی (DNA الگو) در ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (Extension) در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (Final Extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر ۱۰۰ Ladder (شرکت فرمنتاز) ارزیابی گردید(شکل ۱).

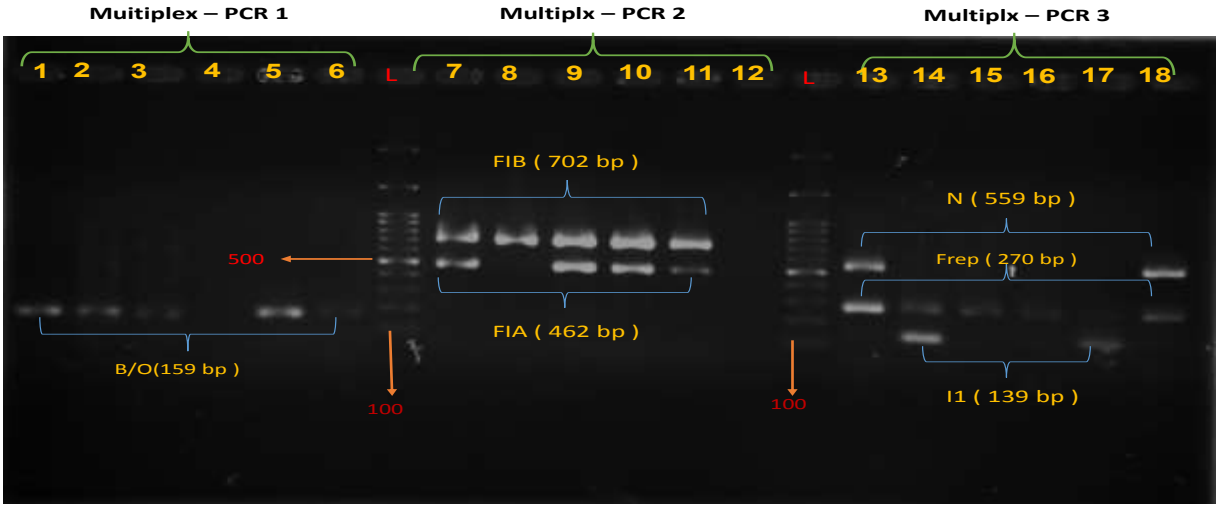
یافته ها

تعداد ۴۰ ایزوله باکتری *اشریشیاکلای* متعلق به سروتیپ های O_2، O_6 و O_{157} جهت دسته بندی براساس رپلیکون پلاسمیدشان مورد مطالعه قرار گرفت. از ۴۰ ایزوله مورد مطالعه، رپلیکون پلاسمید Frep با ۸۸٪ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید IncN با ۲۵٪ کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های IncFIC, IncFIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمیدهای IncFIB, Inc FIA, IncB/O, Inc I1 در ۴۰ ایزوله به ترتیب ۵۰٪، ۵۳٪، ۶۰٪، ۷۸٪ مشاهده گردید (نمودار ۱). همچنین رپلیکون، IncN و IncI1 و B/OInc در سروتیپ O_{157}، رپلیکون Frep در سروتیپ O_6 و رپلیکون IncFIA و IncFIB در سوتیپ O_2 بیشترین حضور را داشتند. ارتباط معنی داری بین سروتیپ و نوع پلاسمیدها مشاهده نشد (نمودار ۲).

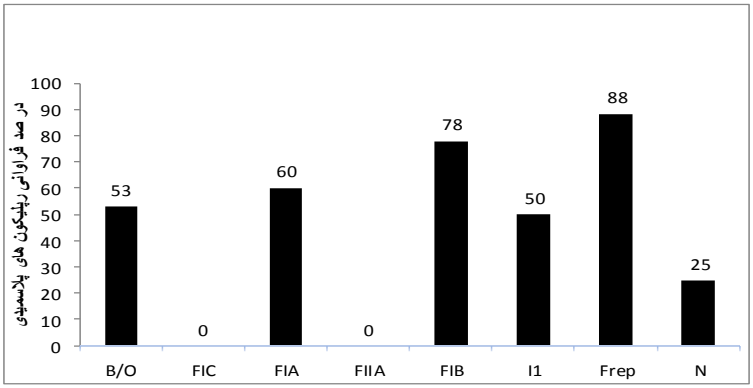
[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]

جدول ۱. توالی پرایمرهای رپلیکون پلاسمیدهای باکتری *اشریشیاکلای*

منبع	دما	اندازه (bp)	تعداد (نوکلوتید)	توالی پرایمر	پرایمر	رپلیکون پلاسمید
۷	۶۰	۱۵۹	۲۲	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	F	B/O
	۶۰		۲۱	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	R	
۷	۶۰	۲۶۲	۲۲	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	F	FIC
	۶۰		۲۳	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	R	
۷	۶۰	۲۷۰	۱۸	CTGTCGTAAGCTGATGGC	F	FIIA
	۶۰		۱۹	CTCTGCCACAAACTTCAGC	R	
۷	۶۰	۴۶۲	۲۳	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	F	FIA
	۶۰		۲۴	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	R	
۷	۶۰	۷۰۲	۲۴	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	F	FIB
	۶۰		۲۱	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	R	
۷	۶۰	۱۳۹	۱۹	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	F	I1
	۶۰		۲۱	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	R	
۷	۶۰	۲۷۰	۲۰	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	F	Frep
	۶۰		۲۰	GAAGATCAGTCACACCATCC	R	
۷	۶۰	۵۵۹	۲۰	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	F	N
	۶۰		۲۰	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	R	

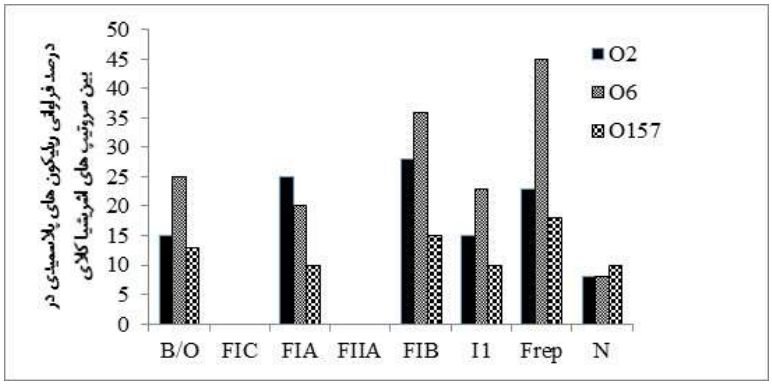


شکل ۱. تصویر الکتروفورز ژل آگارز. چاهک ۱ تا ۶ مربوط به رپلیکون پلاسمید B/O با ۱۵۹ جفت باز. چاهک ۷ تا ۱۲ مربوط به رپلیکون پلاسمید های FIA و FIB با ۴۶۲ و ۷۰۲ جفت باز . چاهک ۴ مربوط به رپلیکون پلاسمید FIB با ۷۰۲ جفت باز. چاهک ۵ مربوط به رپلیکون پلاسمید های FIA و FIB با ۴۶۲ و ۷۰۲ جفت باز. چاهک ۶ مربوط به رپلیکون پلاسمید های I1 و N با ۱۳۹ و ۲۷۰ جفت باز. چاهک ۷ مربوط به رپلیکون پلاسمید های Frep و N با ۲۷۰ و ۵۵۹ جفت باز و چاهک ۸ مربوط به رپلیکون پلاسمیدهای I1 و N و Frep با ۱۳۹ و ۲۷۰ و ۵۵۹ جفت باز



نمودار ۱. درصد رپلیکون پلاسمید در بین ۴۰ ایزوله باکتری *اشریشیاکلای*

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]



نمودار ۲. درصد رپلیکون پلاسمید در بین سروتیپ های ایزوله باکتری *اشریشیاکلای*

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه نشـــان داد که۸۸٪ از ایزوله ها حاوی رپلیکون Frep و رپلیکون های Inc N , IncI1 , IncB/O، IncFIA و IncFIB به ترتیب در ۲۵٪، ۵۰٪، ۵۳٪، ۶۰٪ و ۷۸٪ ایزوله های مورد مطالعه مشاهده گردید. در مطالعه مشابه ای که توسـط Johnson و همکاران بر روی ایزوله های جدا شده از نمونه های ادراری و مـدفوعی انجـام گرفـت آمپلیکون Frep بیشـــترین و IncN کمترین حضـور را داشـت که با مطالعه حاضـر همخوانی دارد (۷). همچنین IncFIC و IncFIIA در هیچکدام از نمونه ها مشـاهده نشد. در پژوهشی که Abraham و همکارانش بر روی ۴۴ ایزوله *اشریشیاکلای* یوروپاتوژنیک جدا شده از افرادی که دارای التهـاب مثـانـه و پیلونفریـت بودنـد، انجـام دادنـد رپلیکون IncFIC و IncFIIA در هیچکدام از ایزوله ها مشـاهده نشـد(۱۸). همچنین در این مطالعه، از میـان ۸ نوع رپلیکون مورد مطـالعـه، پلاســـمیـدهـای متعلق بـه گروه IncF (IncFIAو IncFIB) با فراوانی ۲۴٪ و ۳۱٪ به ترتیب بیشـتر از سایر گروه ها در بین ایزوله‌های جدا شـده حضـور داشتند. هم راستا با مطالعه حاضر Lyimo و همکاران نیز گزارش کردند که پلاسمیدهای متعلق به گروه IncF در اغلب ایزوله های مورد مطالعه شـان مشـاهده شـد(۱۹). همچنین این گروه نشـان دادند که پلاسـمیدهای متعلق به گروه IncF دارای قابلیت یوغی گری بالایی هستند(۱۹). علاوه بر آن Yang و همکاران در مطالعه ای گزارش کردند که IncF شایعترین خانواده پلاسـمیدی در بین پلاسـمیدهای *اشـریشـیاکلای* اسـت (۲۰). این گروه گزارش کردند که بیشتر پلاسمیدهای متعلق بهIncF دارای ژن های مقاومت‌های چندگانه آنتی بیوتیکی هسـتند که نشـان دهنده اهمیت آنهادرانتشـار مقاومت های آنتی بیوتیکی بین جمعیت های باکتریایی اسـت. علاوه بر آن، این پلاســـمید ها واجـد ســیســـتم addiction هســـتند که به ثبات و نگهداری آنها در میزبان بـاکتری‌هـا تحت شـــرایط مختلف کمک می‌کند(۲۰) که خود می تواند دلیل بالا بودن فراوانی این گروه از پلاسـمیدها در باکتری *اشریشیاکلای* مورد مطالعه باشد. در مطالعه حاضـر، IncI1 در ۵۰٪ ایزوله های مورد بررسـی مشـاهده گردید که وقوع بالا پلاسمید IncI1 در میان ایزوله های بالینی اهمیت آن را در انتقال افقی و گسـترده ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری *اشریشیاکلای* را نشان می دهـد(۲۱). طی مطـالعـه ای، Xia و همکاران گزارش کردند که پلاســـمید IncI1 حامل ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی هستند و می توانند به مدت طولانی در فلور روده انســـان و حیوانـات بـاقی بمانند و تبدیل به یک مخزن برای انتقال مداوم این ژن ها در بین گونه های باکتریایی شوند(۲۲). همچنین در بررسی حاضر فراوانی رپلیکون پلاســـمیـد IncB/O و IncN به ترتیب ۵۳٪ و ۲۵٪ گزارش گردید. تحقیقات مختلف نشـان داده اسـت که پلاسـمیدهای IncI1، A/C یا Inc N موجود در باکتری های متعلق به خانواده انتروباکتریاســـه، عامل حمل و انتشـار ژن های بتا–لاکتاماز وسیع الطیف در حیوانات و انسان ها هستند(۲۵–۲۳). در مطالعه ای که قبلا توسـط Abdi و همکاران روی ایزوله های مطالعه حاضـر صـورت گرفت، میزان مقاومت به داروهای بتالاکتام آمپی سیلین، سفتی زوکسیم و سـفکسـیم به ترتیب ۹۲٪، ۷۴٪ و ۷۱٪ تعیین گردید(۲۶). نتایج این مطالعه نشان داد که ممکن است وجود پلاسمیدهای IncI1، A/C یا Inc N در این ایزوله‌ها عامل اصـلی مقاومت بالا به آنتی بیوتیک های فوق باشـند. آنالیز الگوی رپلیکون پلاسـمیدی ایزوله های مورد مطالعه نشـان داد که ۱ ایزوله واجد ۶ پلاسـمید ، ۷ ایزوله واجد ۵ و ۱۴ ایزوله واجد ۴ پلاســـمید بودند که نشـــان دهنده تنوع بالای پلاســـمیـدی در ایزولـه هـای مورد مطـالعـه اســـت. در مطالعه ای که توســـط Hopkines و همکارانش در انگلستان بر روی ۶۷ نمونه از خانواده انتروباکتریاسه (*اشریشیاکلای* و سالمونلا) انجام شد، تنوع رپلیکون پلاسمید IncI1, IncFIA, IncFIB, و IncN را گزارش کردند(۵). همچنین مطالعه ای توسط Zurfluh و همکارانش برروی ایزوله های *اشـــریشـــیاکلای* صـــورت گرفت، تنوع رپلیکون پلاسـمیدی نیز گزارش گردید(۲۷). مطالعه حاضر نشان داد که *اشریشیاکلای* جدا شـــده از نمونـه هـای ادراری دارای چنـدین پلاســـمیـد متعلق به رپلیکون های IncI1, IncFIA, IncFIB, IncN, IncB/O و Frep می باشد.

باتوجه به اینکه روش مولکولی PBRT روش ساده و سریعی در شناسایی و طبقه بندی رپلیکون پلاسـمیدهای ناسـازگار سویه های *اشریشیاکلای* است و این مطالعه برای اولین بار در ایران در منطقه ســـیســـتان جهت پیگیری روند تکامل و گسترش پلاسمیدهای *اشریشیاکلای* مولد عفونت های ادراری انجام شد. همچنین این مطالعه جهت کسـب اطلاعات بیشتر راجع به پاتوژنز عفونت ها، کنترل عفونت های بیمارسـتانی و مطالعات اپیدمیولوژیکی کاربرد دارد، پیشنهاد می گردد که این مطالعه به صورت فراگیر در سایر قسمت های ایران نیز انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل بخاطر حمایت مالی از این طرح و همچنین از همه کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را انجام دادند، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]

Replicon Typing of O2, O6, and O157 Serotypes of Escherichia Coli Using PCR Method Based on Plasmid Incompatibility Groups

A. Keshtgar (MSc)[1], A. Rashki (PhD)*[2], F. Hadadi (PhD)[1]

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

J Babol Univ Med Sci; 20(7); July 2018; PP: 40-6
Received: Dec 27th 2017, Revised: Mrch 6th 2018, Accepted: Mrch 21st 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Today, the PCR-based replicon typing of major plasmid incompatibility groups is used in epidemiological studies to describe the distribution of traits such as antibiotic resistance in the bacteria of *enterobacteriaceae* family. Despite the crucial role of plasmids in transmitting pathogens, little studies have been conducted on the type of plasmid transmitted by bacterial serotypes of *E. coli*. The main objective of this study was to classify plasmid O2, O6 and O157 serotypes of *E. coli* bacteria based on major plasmid incompatibility groups using multiplex-PCR method.

METHODS: This descriptive study was performed on 40 isolates of *E. coli* related to O6, O2 and O157 serotypes to identify 8 plasmid replicons (*IncN, IncFIB, FreP, IncB/O, Inc FIIA, IncFIC, IncFIA, IncI1*) by multiplex-PCR method.

RESULTS: The results showed that the amplicon of Fre (88%), and replicons of IncFIB (78%), IncFIA (60%), IncB/O (53%), IncI1 (50%), IncN (25%) were observed in 40 studied isolates. IncFIC and IncFIIA replicons were not observed in any of the isolates.

CONCLUSION: The results of this study indicated a high diversity of plasmid incompatibility groups among the studied isolates.

KEY WORDS: *Plasmid, Multiplex-PCR, Replicon.*

Please cite this article as follows:

Keshtgar A, Rashki A, Hadadi F. Replicon typing of O2, O6, and O157 serotypes of Escherichia coli using PCR method based on plasmid incompatibility groups. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(7): 40-6.

* **Corresponding Author: A. Rashki (PhD)**
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Vet-Medicine, University of Zabol, Zabol, I.R.Iran
Tel: +98 54 24822250
E-mail: ah_rashki@usal.es

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]

References

1.Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol. 2005;3(9):722-32.

2.Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian Escherichia coli isolate. Avian Dis. 2002;46(2):342-52.

3.Smets BF, Barkay T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. Nat Rev Microbiol. 2005;3(9):675-8.

4.Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(10):4168-77.

5.Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among Salmonella and Escherichia coli isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):3203-6.

6.Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Rev. 1988;52(3):375-95.

7.Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic Escherichia coli isolates. Appl Environ Microbiol. 2007;73(6):1976-83.

8.Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005;63(3):219-28.

9.Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR. Characterization of variant Salmonella genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):1714-22.

10.Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M, Parkhill J, Taylor DE. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. Plasmid. 2004;52(3):182-202.

11.Dobrindt U. (Patho-)Genomics of Escherichia coli. Int J Med Microbiol. 2005;295(6-7):357-71.

12.Klumpp DJ, Weiser AC, Sengupta S, Forrestal SG, Batler RA, Schaeffer AJ. Uropathogenic Escherichia coli potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. Infect Immun. 2001;69(11):6689-95.

13.Sharma S, Kaur N, Malhotra S, Madan P, Ahmad W, Hans C. Serotyping and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Escherichia coli Isolates from Urinary Tract Infections in Pediatric Population in a Tertiary Care Hospital. J Pathogens. 2016;2016:2548517.

14.Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK. Complete DNA sequence of a Col BM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. J Bacteriol. 2006;188(16):5975-83.

15.Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, et al. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal Escherichia coli. Infect Immun. 2010;78(5):1931-42.

16.Rashki A, Abdi HA, Shookohi M. Prevalence of Genes Encoding Outer Membrane Virulence Factors Among Fecal Escherichia coli Isolates. Int J Basic Sci Med. 2017;2(1):52-7.

17.Rashki A, Abdi HA. O-serotyping of Escherichia coli Strains isolated from Patients With Urinary Tract Infection in Southeast of Iran. Int J Enteric Pathog. 2014;2(4):e20968.

18.Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of Escherichia coli strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. J Clin Microbiol. 2012;50(3):1027-30.

19.Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Temba S, Kipasika H, Smith W, et al. IncF Plasmids Are Commonly Carried by Antibiotic Resistant Escherichia coli Isolated from Drinking Water Sources in Northern Tanzania. Int J Microbiol. 2016;2016:3103672.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]

20.Yang QE, Sun J, Li L, Deng H, Liu BT, Fang LX, et al. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant Escherichia coli strains from animals in China. Front Microbiol. 2015;6:964.
21.Johnson TJ, Shepard SM, Rivet B, Danzeisen JL, Carattoli A. Comparative genomics and phylogeny of the IncI1 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic Escherichia coli. Plasmid. 2011;66(3):144-51.
22.Xia L, Liu Y, Xia S, Kudinha T, Xiao SN, Zhong NS, et al. Prevalence of ST1193 clone and IncI1/ST16 plasmid in E-coli isolates carrying blaCTX-M-55 gene from urinary tract infections patients in China. Sci Rep. 2017;7:44866.
23.Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various Salmonella enterica serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(5):1872-5.
24.Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, et al. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene blaCTX-M-1 in Salmonella enterica isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. Antimicrob Agents Chemother.54(10):4484-6.
25.Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli and Salmonella of human and animal origin. J Antimicrob Chemother. 2008;61(6):1229-33.
26.Abdi HA, Rashki GM. Virulence Genes, Genetic Diversity, Antimicrobial Susceptibility and Phylogenetic Background of Escherichia coli Isolates. Int J Enteric Pathog. 2015;3(3):e25692.
27.Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M. Replicon typing of plasmids carrying bla CTX-M-1 in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. Front Microbiol. 2014;5:555.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.6.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.40]