

Comparing thrB Gene Sequencing and Multiplex PCR Method in Grouping of the Different Strains of Escherichia Coli

Fatemeh Azizi¹,
Soghra Fallahi²,
Majid Asadi-Samani³,
Maryam Goudarzian⁴

¹ Medical Student, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

² PhD Student in Molecular Medicine, Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

³ Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁴ Iranian Research Center on Healthy Aging, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

(Received February 2, 2014 ; Accepted July 13, 2014)

Abstract

Background and purpose: The best-known groups of *Escherichia coli* are B2, B1, A, and D. Previous studies have clearly shown the difference between this group such as resistance to antibiotics, the growth rate, and pathogenicity. Therefore, identifying different groups of *E. coli* could be of great benefit in curing infections caused by this bacterium. There are some defects in traditional diagnosis methods for *E. coli* groups, hence, this study aimed at finding a more efficient method.

Material and methods: To identify different *E. coli* groups, after surveying genomic sequence of 60 *E. coli* and their grouping which was done by silico multiplex PCR method, a polymorphic sequence of homoserine kinase enzyme was selected. Then, 20 unknown samples of *E. coli* strains were grouped by this sequence and multiplex PCR methods.

Results: The 20 unknown samples of *E. coli* strains were grouped identically in both methods.

Conclusion: Identification and grouping of different *E. coli* strains by sequencing method was found to be more precise than multiplex PCR method.

Keywords: *Escherichia coli*, multiplex PCR, grouping, homoserine kinase, sequencing

گروه بندی سویه های مختلف باکتری اشرشیا کلی با استفاده از تعیین توالی ژن *thrB* و مقایسه آن با روش مولتی پلکس PCR

فاطمه عزیزی^۱
صغری فلاحي^۲
مجید اسدی سامانی^۳
مریم گودرزبان^۴

چکیده

سابقه و هدف: از مهم ترین گروه های شناخته شده باکتری *Escherichia coli* گروه های A, B1, B2 و گروه D می باشند. بررسی ها نشان داده این گروه ها دارای تفاوت هایی در بسیاری از ویژگی های خود از جمله میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها، نرخ رشد و میزان پاتوژنسیته می باشند که در نتیجه شناسایی گروه های مختلف آن می تواند در درمان بیماری هایی که توسط این باکتری ایجاد می شوند موثر باشد. در این بررسی سعی گردیده با توجه به وجود یک سری اشکالات در روش های قبلی شناسایی گروه های *E. coli*، روشی دقیق جهت شناسایی گروه های مختلف ارائه گردد.

مواد و روش ها: در این مطالعه بعد از بررسی توالی کامل ۶۰ سویه باکتری *E. coli* و گروه بندی آن ها توسط روش مرسوم مولتی پلکس PCR با نرم افزارهای PCR مجازی، توالی پلی مورف از ژن هوموسرین کیناز جهت گروه بندی سویه های مختلف باکتری *E. coli* انتخاب گردید و ۲۰ نمونه سویه باکتری فوق توسط این روش و روش مولتی پلکس PCR تعیین گروه شدند.

یافته ها: ۲۰ نمونه مورد بررسی در این تحقیق توسط دو روش مرسوم مولتی پلکس PCR و روش تعیین توالی به صورت صحیح و مشابه گروه بندی گردیدند.

استنتاج: تعیین گروه سویه های مختلف باکتری *E. coli* با روش تعیین توالی نسبت به روش مولتی پلکس PCR، دقیق تر و مطمئن می باشد.

واژه های کلیدی: *Escherichia coli*، گروه بندی، مولتی پلکس PCR، هوموسرین کیناز، تعیین توالی

مقدمه

گردیده است (۲)؛ که از مهم ترین گروه های فیلوژنتیکی شناخته شده گروه های A, B1, B2 و گروه D می باشد (۳،۴)؛ گروه های A و B1 به عنوان گروه های خواهری شناخته می شوند در حالی که گروه B2 به عنوان یک جد مشترک

سوش های مختلفی از باکتری *Escherichia coli* تا کنون شناسایی شده است که براساس بررسی های فیلوژنتیکی در چندین فیلوگروپ مختلف قرار می گیرند (۱). تاکنون ۸ گروه فیلوژنتیکی (A, B1, B, C, D, E, F, I) شناسایی

E-mail: fallahi.leila@gmail.com

مؤلف مسئول: صغری فلاحي - بندرعباس: دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

۱. دانشجوی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲. دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۳. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴. مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۳/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۴/۲۲

گاوها (۱۶) و شیوع گروه‌های A و B2 در انسان‌ها بیش‌تر می‌باشد (۱۷).

باکتری *E. coli* معمولاً جزء فلور طبیعی روده می‌باشد و در روده بزرگ انسان به فراوانی یافت می‌شود به همین دلیل دومین باکتری از لحاظ فراوانی در روده می‌باشد و شاخص آلودگی آب شهری به فاضلاب به حساب می‌آید (۱۸). از لحاظ بیماری‌زایی اغلب سویه‌های این باکتری در روده بیماری‌زا نمی‌باشند ولی برخی از سویه‌های آن مانند سویه *Enterotoxigenic E. coli* با تولید سم و سویه‌های *Enteropathogenic E. coli* با آسیب مستقیم و سویه‌های *Enteroinvasive E. coli* با تهاجم بافتی می‌توانند سبب بروز اسهال در انسان‌ها گردند (۱۹). گونه‌های *E. coli* در خارج از روده مثلاً در مجاری ادراری و ملتحمه بیماری‌زا بوده، و به عنوان بزرگ‌ترین عامل عفونت‌های ادراری می‌باشد (۱۸).

بر اساس بررسی‌های Clermont و همکاران در سال ۲۰۰۰، روشی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت شناسایی گروه‌های مختلف *E. coli* ارائه گردید که بر روی تکثیر سه ژن *yjaA*، *chuA* و قطعه‌ای از ژن *TspE4.C2* پایه ریزی شده است و تفاوت در تکثیر و یا عدم تکثیر این ژن‌ها به عنوان ملاکی جهت گروه‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰)، به صورتی که در اکثر سویه‌های گروه A (حدود ۷۷ درصد) قطعه‌ای از ژن *yjaA* تکثیر می‌گردد اما دو ژن دیگر در سویه‌های این گروه تکثیر نمی‌گردند؛ در سویه‌های متعلق به گروه B1 نیز فقط قطعه‌ای از ژن *TspE4.C2* تکثیر می‌شود و در گروه‌های B2 و D ژن *chuA* تکثیر می‌شود و از این طریق از دو گروه A و B1 تمایز داده می‌شوند و برای تفکیک دو گروه B2 و D از ژن *yjaA* استفاده می‌گردد، به این صورت که این قطعه در گروه B2 تکثیر می‌شود اما در گروه D تکثیر نمی‌شود. تفکیک گروه‌های A و B1 بر اساس ژن *TspE4.C2* صورت می‌گیرد به این صورت که در گروه B1، این قطعه در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر می‌گردد (۲۰).

برای این دو گروه شناخته می‌شود که این گروه‌ها دارای تفاوت‌هایی در بسیاری از ویژگی‌های خود مانند مکان و نحوه زندگی (۵)، استفاده از منابع مختلف کربن برای تولید انرژی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، نرخ رشد و میزان پاتوژن‌سپتیه می‌باشند (۶). بررسی‌های Walk و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثبات کرده است که اغلب سویه‌هایی از باکتری *E. coli* که قادر به تحمل محیط بیرون می‌باشند به گروه B1 تعلق دارند (۷). علاوه بر این اندازه ژنوم نیز در بین این گروه‌ها متغیر می‌باشد و گروه‌های A و B1 دارای ژنوم کوچک‌تری نسبت به گروه‌های B2 و D می‌باشند (۸).

مطالعات انجام شده توسط Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داده است که گروه‌های فیلوژنتیکی B2 و D دارای فاکتور پاتوژن‌سپتیه بیش‌تری نسبت به دو گروه دیگر می‌باشند (۹). پاتوژن‌های خارج روده باکتری *E. coli* اغلب به گروه‌های B2 و D تعلق دارند (۱۰-۱۱)، در حالی که سویه‌های کم‌سال اغلب به گروه‌های A و B1 تعلق دارند (۱۲)، در حالی که سویه‌های پاتوژن روده‌ای اغلب به گروه‌های A، B1 و D تعلق دارند (۱۳).

بر اساس تحقیقات انجام گرفته در سال ۲۰۱۴ توسط Tan و همکاران حدود ۸۵/۷۱ درصد باکتری‌های *E. coli* جداسازی شده از پوست انسان مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپسیلین و کلرامفنیکل و ۵۷ درصد آن‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سولفومتوگازول، آمپسیلین و تریمتوپریم می‌باشند که این امر می‌تواند بیماری‌های ناشی از این باکتری را در انسان افزایش دهد (۱۴). هم‌چنین برخی از محققین پراکنده‌گی سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* را در بین موجودات مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند. به عنوان مثال رژیم غذایی میزبان، حجم بدن میزبان و شرایط آب و هوایی را بر روی میزان پراکنده‌گی و شیوع گروه‌های مختلف این باکتری موثر اعلام نموده‌اند (۱۵). علاوه بر این بررسی بر روی سویه‌های جداسازی شده از پرندگان و پستانداران نشان داد که شیوع گروه‌های D و B1 در پرندگان و شیوع گروه‌های A و B1 در پستانداران، مخصوصاً سگسانان و

[/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) استفاده شد. بعد از آن گروه‌بندی سویه‌ها براساس الگوی اشاره شده در گزارش Clermont و همکاران انجام گرفت (جدول شماره ۱). هم‌چنین گروه‌بندی سویه‌های مختلف توالی‌های آن‌ها توسط نرم‌افزار mega 5.05 و با روش clustal W هم‌رديف گردیدند، سپس با همین نرم‌افزار برای نقاط پلی‌مورف به طول حداکثر ۱۰۰۰ جفت باز درختچه فیلوژنی ترسیم گردید تا منطقه پلی‌مورفی که گروه‌های مختلف باکتری *E. Coli* را به خوبی از هم تفکیک می‌نماید مشخص گردد. بعد از انتخاب این ناحیه مناسب برای شناسایی توالی فوق، از نرم‌افزار BLAST موسسه NCBI استفاده گردید.

تعیین حجم نمونه و گروه‌بندی نمونه‌ها

در مطالعه حاضر نمونه‌های موجود از نواحی و منابع مختلف جمع‌آوری گردید و نمونه‌ها به صورتی انتخاب شده‌اند که از هر گروه چند نمونه در درختچه فیلوژنی ذکر شود؛ هم‌چنین با توجه به در دسترس نبودن برخی از گروه‌ها، از مطالعات بیوانفورماتیکی جهت حل این مشکل کمک گرفته شد. در مجموع ۲۰ نمونه انتخاب شدند به صورتی که نمایندگانی از کلیه گروه‌ها در درختچه فیلوژنی وجود داشته باشند. با این وجود، توجه به این نکته ضروری می‌باشد که این مطالعه تلفیقی از داده‌های دو روش بیوانفورماتیک و داده‌های آزمایشگاهی می‌باشد که داده‌های بیوانفورماتیکی تکمیل‌کننده داده‌های آزمایشگاهی هستند؛ به همین دلیل نیازی به استفاده از حجم بالای نمونه نمی‌باشد؛ زیرا داده‌های بیوانفورماتیکی تاییدکننده داده‌های آزمایشگاهی بوده و باعث افزایش قدرت مارکر انتخاب شده می‌گردند. از سویی نشانگری که در این مطالعه به کار رفته

با توجه این که میزان پاتوژنسته و میزان گروه‌های مختلف باکتری *E. coli* و هم‌چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین گروه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (۲۱) و هر گروه باکتریایی می‌تواند فاکتورهای حدت مخصوص خود را حمل نمایند (۲۲)، بنابراین شناسایی گروه‌های مختلف باکتری *E. coli* و تفکیک گروه‌های مختلف آن می‌تواند در درمان بیماری‌هایی که توسط این باکتری ایجاد می‌شوند و هم‌چنین کشف منبع اصلی آلودگی محیط مانند منابع آبی ضروری باشد (۲۳). روشی که به صورت معمول برای شناسایی گروه‌های مختلف باکتری *E. coli* به کار گرفته می‌شود روش Clermont و همکاران می‌باشد که دلیل وجود نوترکیبی فراوان در باکتری *E. coli* و امکان بروز جهش در محل اتصال آغازگرها از دقت روش مذکور می‌کاهد (۲۴). هم‌چنین به دلیل تشابه الگوی باندهای حاصل از واکنش زنجیره پلیمرز، این روش قادر به تفکیک دو گروه E و D از یکدیگر نمی‌باشد (۲۵). به این دلایل در این بررسی هدف یافتن روشی سریع، آسان و مطمئن جهت شناسایی دقیق گروه‌های مختلف باکتری *E. coli* به وسیله تعیین توالی ناحیه‌ای پلی‌مورف از ژنوم این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دریافت توالی سویه‌های مختلف و گروه‌بندی آن‌ها

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۲ انجام شد، توالی کامل ۶۰ سویه مختلف باکتری *E. Coli* از پایگاه داده موسسه بین‌المللی NCBI به آدرس الکترونیکی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> جمع‌آوری گردید و سپس جهت تفکیک گروه‌های مختلف باکتری‌ها از یکدیگر به وسیله روش مولتی پلکس PCR از نرم‌افزار blast primer این موسسه با آدرس الکترونیکی

جدول شماره ۱: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش مولتی پلکس PCR برای هر یک از ژن‌ها

ژن مورد بررسی	توالی آغازگر فرورارد	توالی آغازگر معکوس
<i>ChuA</i>	5-TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3	5-GACGAACCA ACGGTCAGGAT-3
<i>YjaA</i>	5-TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG-3	5-ATGGAGAATGCGTTCTCAAC-3
<i>TspE4C2</i>	5-GAGTAATGTCCGGGGCATTCA-3	5-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3

DNA ژنومی که با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. آغازگرهای طراحی شده توسط نرم افزار oligo 7 که جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفته شامل توالی 5-TCGCTTTCTTATATCTTCGGCA-3 آغازگر پیوسته و توالی 5-GTTGTCGTAATGAATGCTGCCG-3 آغازگر معکوس می باشد.

بعد از انجام تکثیر قطعه فوق محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده گردید و بعد از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر توالی یابی قطعه فوق برای هر ۲۰ نمونه، توسط دستگاه توالی یاب اتوماتیک انجام گرفت. سپس برای تعیین گروه نمونه های مورد بررسی، توالی نمونه های مورد با نمونه های دریافت شده از موسسه NCBI توسط نرم افزار oligo 5 و با روش clustal W هم ردیف گردیدند؛ سپس با همین نرم افزار درختچه فیلوژنی neighbor joining ترسیم گردید.

شناسایی گروه فیلوژنی نمونه های مورد بررسی با روش مولتی پلکس PCR

جهت مقایسه روش ارائه شده در این بررسی با روش مولتی پلکس PCR، شناسایی گروه ها بر اساس ۲۰ نمونه مورد بررسی با روش مولتی پلکس PCR ارائه شده توسط Clermont و همکاران انجام گرفت (۲). آغازگرهای مورد استفاده بر اساس مقاله مرجع در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است. برنامه دمایی واکنش PCR شامل واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سبس ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه جهت واسرشت، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه جهت تکثیر برای تکثیر نهایی ۷ دقیقه دمای ۹۴ درجه مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۱۰۰Mm، ۰/۶ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰Mm، ۲۰ pmol از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taq polymerase و یک میکرولیتر از

است حاصل بیش از ۴ ماه بررسی های بیوانفورماتیکی بر روی ۵ مگا باز ژنوم سویه های غیر دست ورزی شده باکتری *E. Coli* می باشد تا بهترین و پلی مورف ترین ناحیه ژنوم این باکتری جهت بندی انتخاب شود؛ اما اگر این قطعه بدون مطالعات بیوانفورماتیکی و به صورت تصادفی انتخاب می گردید نیاز به حجم بالاتری از نمونه می بود؛ لذا در این بررسی مطالعات بیوانفورماتیکی دقیق نیاز به حجم بالای نمونه را مرتفع ساخته است. هم چنین تعداد ۶۰ نمونه به وسیله بیوانفورماتیک با هر دو روش مولتی پلکس PCR و روش ترسیم درختچه فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته اند که نتایج این بررسی تا حد زیادی با یکدیگر منطبق می باشد و موارد اندکی که اختلاف وجود دارد به دلیل نقص سیستم مولتی پلکس PCR و دقت بیش تر روش تعیین توالی می باشد که در قسمت بحث به آن پرداخته شده است.

شناسایی گروه فیلوژنی نمونه های مورد بررسی

پس از شناسایی ناحیه پلی مورف مورد نظر، از این ناحیه برای شناسایی گروه فیلوژنی ۲۰ نمونه باکتری *E. Coli* استفاده گردید به این صورت که ابتدا به وسیله نرم افزار oligo 7 آغازگرهای مورد نیاز جهت تکثیر این قطعه طراحی گردید و بعد از استخراج ژنوم باکتری ها به وسیله روش فنول کلروفرم، تکثیر این قطعه صورت گرفت. برنامه دمایی واکنش PCR بعد از بهینه سازی در شرایط آزمایشگاهی شامل واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سبس ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه جهت واسرشت، ۴۰ ثانیه در ۵۵ درجه جهت اتصال آغازگرها و ۷۰ ثانیه در ۷۲ درجه جهت تکثیر سبس برای تکثیر نهایی ۷ دقیقه دمای ۹۴ درجه مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۱۰۰Mm، ۰/۶ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰Mm، ۲۰ pmol از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taq polymerase و یک میکرولیتر از

جدول شماره ۲: نمونه‌های گرفته شده از موسسه NCBI و نمونه‌های

مورد بررسی در این تحقیق

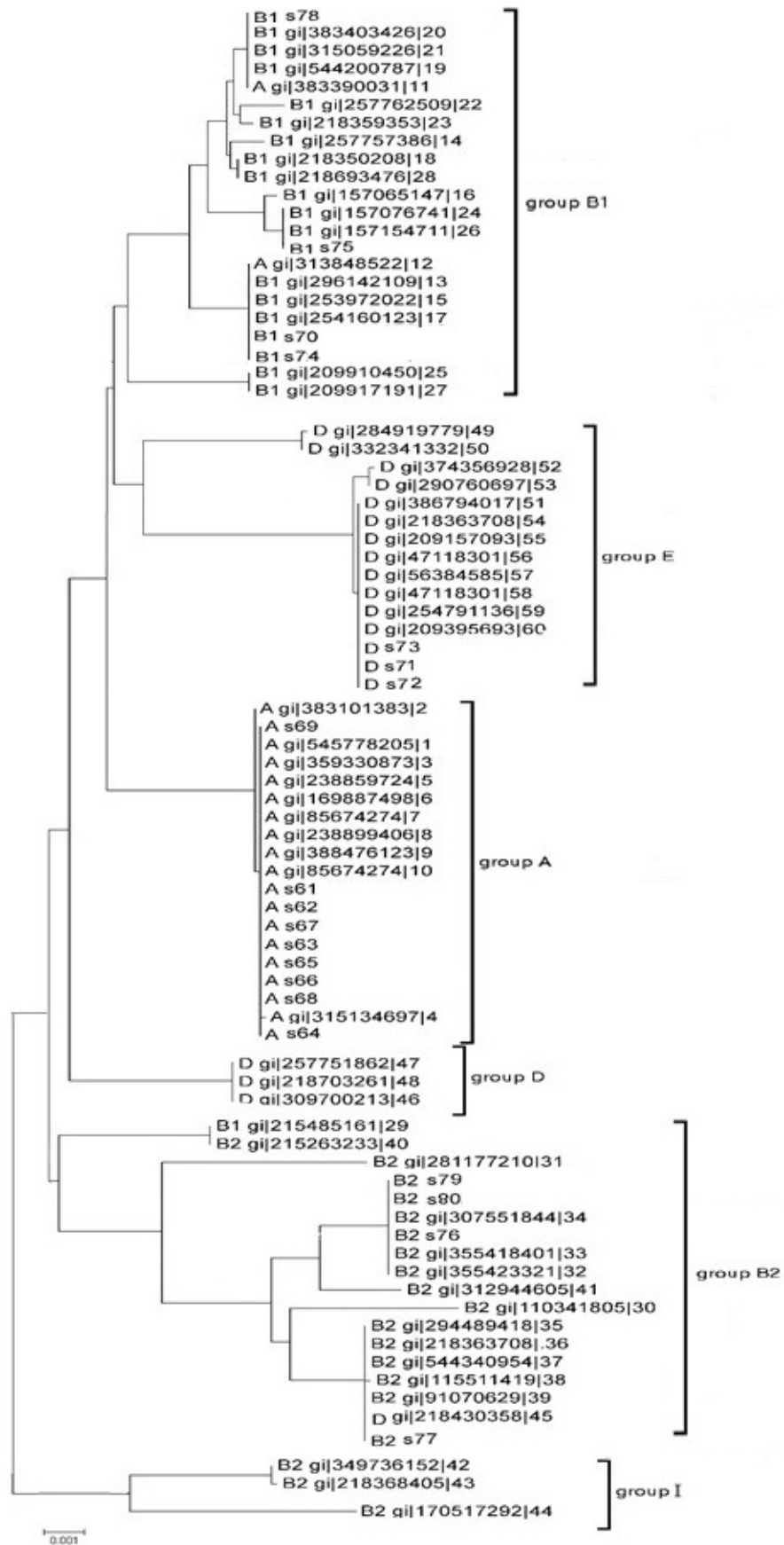
ردیف	شماره (gi)	گروه	ژن‌ها		
			Tsp	Yja	Chu
۱	545778205	A	منفی	منفی	منفی
۲	383101383	A	منفی	منفی	منفی
۳	359330873	A	منفی	منفی	منفی
۴	315134697	A	منفی	منفی	منفی
۵	238859724	A	منفی	منفی	منفی
۶	169887498	A	منفی	منفی	منفی
۷	85674274	A	منفی	منفی	منفی
۸	238899406	A	منفی	منفی	منفی
۹	388476123	A	منفی	منفی	منفی
۱۰	85674274	A	منفی	منفی	منفی
۱۱	383390031	A	منفی	منفی	منفی
۱۲	313848522	A	منفی	منفی	منفی
۱۳	296142109	B1	منفی	منفی	منفی
۱۴	257757386	B1	منفی	منفی	منفی
۱۵	253972022	B1	منفی	منفی	منفی
۱۶	157065147	B1	منفی	منفی	منفی
۱۷	254160123	B1	منفی	منفی	منفی
۱۸	218350208	B1	منفی	منفی	منفی
۱۹	544200787	B1	منفی	منفی	منفی
۲۰	383403426	B1	منفی	منفی	منفی
۲۱	315059226	B1	منفی	منفی	منفی
۲۲	257762509	B1	منفی	منفی	منفی
۲۳	218359353	B1	منفی	منفی	منفی
۲۴	157076741	B1	منفی	منفی	منفی
۲۵	209910450	B1	منفی	منفی	منفی
۲۶	157154711	B1	منفی	منفی	منفی
۲۷	209917191	B1	منفی	منفی	منفی
۲۸	218693476	B1	منفی	منفی	منفی
۲۹	215485161	B1	منفی	منفی	منفی
۳۰	110341805	B2	منفی	منفی	منفی
۳۱	281177210	B2	منفی	منفی	منفی
۳۲	355423321	B2	منفی	منفی	منفی
۳۳	355418401	B2	منفی	منفی	منفی
۳۴	307551844	B2	منفی	منفی	منفی
۳۵	294489418	B2	منفی	منفی	منفی
۳۶	218363708	B2	منفی	منفی	منفی
۳۷	544340954	B2	منفی	منفی	منفی
۳۸	115511419	B2	منفی	منفی	منفی
۳۹	91070629	B2	منفی	منفی	منفی
۴۰	215263233	B2	منفی	منفی	منفی
۴۱	312944605	B2	منفی	منفی	منفی
۴۲	349736152	B2	منفی	منفی	منفی
۴۳	218368405	B2	منفی	منفی	منفی
۴۴	170517292	B2	منفی	منفی	منفی
۴۵	218430358	D	منفی	منفی	منفی
۴۶	309700213	D	منفی	منفی	منفی
۴۷	257751862	D	منفی	منفی	منفی
۴۸	218703261	D	منفی	منفی	منفی
۴۹	284919779	D	منفی	منفی	منفی
۵۰	332341332	D	منفی	منفی	منفی
۵۱	386794017	D	منفی	منفی	منفی
۵۲	374356928	D	منفی	منفی	منفی
۵۳	290760697	D	منفی	منفی	منفی
۵۴	218363708	D	منفی	منفی	منفی
۵۵	209157093	D	منفی	منفی	منفی
۵۶	47118301	D	منفی	منفی	منفی
۵۷	56384585	D	منفی	منفی	منفی
۵۸	47118301	D	منفی	منفی	منفی
۵۹	254791136	D	منفی	منفی	منفی
۶۰	209395693	D	منفی	منفی	منفی
۶۱	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۲	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۳	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۴	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۵	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۶	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۷	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۸	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۶۹	مطالعه حاضر	A	منفی	منفی	منفی
۷۰	مطالعه حاضر	B1	منفی	منفی	منفی
۷۱	مطالعه حاضر	D	منفی	منفی	منفی
۷۲	مطالعه حاضر	D	منفی	منفی	منفی
۷۳	مطالعه حاضر	D	منفی	منفی	منفی
۷۴	مطالعه حاضر	B1	منفی	منفی	منفی
۷۵	مطالعه حاضر	B1	منفی	منفی	منفی
۷۶	مطالعه حاضر	B2	منفی	منفی	منفی
۷۷	مطالعه حاضر	B2	منفی	منفی	منفی
۷۸	مطالعه حاضر	B1	منفی	منفی	منفی
۷۹	مطالعه حاضر	B2	منفی	منفی	منفی
۸۰	مطالعه حاضر	B2	منفی	منفی	منفی

ستون اول: شماره اختصاص یافته به هر نمونه، ستون دوم: شماره اختصاصی هر نمونه در پایگاه اطلاعاتی موسسه (gi)، ستون ۳ تا ۵: نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های *chuA*، *yjaA* و *TspE4C2*

میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰،۲۰ Mm با هر یک از آغازگرها، یک واحد آنزیم *Taq polymerase* و یک میکرولیتر از DNA ژنومی که با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. پس از انجام واکنش PCR نمونه‌های مورد بررسی بر روی ژل آگارز ۱/۵ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از بررسی ۶۰ نمونه دریافت شده از موسسه NCBI و بررسی الگوهای بان‌دینگ در واکنش PCR مجازی، مشخص گردید که ۱۲ عدد از نمونه‌ها به گروه A، ۱۷ عدد به گروه B1، ۱۶ عدد به گروه B2 و ۱۵ عدد به گروه D تعلق دارند (جدول شماره ۲). در درختچه فیلوژنتیکی رسم شده نیز گروه‌های اشاره شده به خوبی از هم تفکیک شده‌اند (تصویر شماره ۱). به غیر از ۴ عدد از نمونه‌ها که گروه‌بندی حاصل از واکنش PCR مجازی با گروه‌بندی فیلوژنتیکی حاصل از بررسی توالی قطعه پلی مورف متفاوت می‌باشد، سایر نمونه‌ها در هر دو روش گروه‌بندی، در گروه‌های یکسان قرار گرفته‌اند. هم‌چنین در درختچه فیلوژنتیکی گروه E که جزء گروه‌های کم‌تر شناخته شده با کتری *E. Coli* می‌باشد نیز از سایر گروه‌ها تفکیک شده است و نمونه‌هایی از این گروه که به اشتباه توسط واکنش PCR در گروه D قرار داده شده بودند به خوبی از نمونه‌های گروه D تفکیک گردیده‌اند. البته سایر گروه‌های فیلوژنتیکی مانند C، E و F نیز در این درختچه از یکدیگر تفکیک شده‌اند اما به دلیل شباهت‌های این گروه‌ها مانند شدت بیماری‌زایی با گروه‌های شناخته شده اصلی، آن‌ها را جزء گروه‌های اصلی محسوب نمودیم به صورتی که گروه F در گروه اصلی B2 و گروه C در گروه اصلی B1 محسوب گردیده‌اند. با بررسی توالی مورد استفاده در این تحقیق با نرم‌افزار blast مشخص گردید که توالی مربوطه به ژن هموسرین کیناز $\{thrB\}$ با E value برابر ۰/۰ می‌باشد.



تصویر شماره ۱: درختچه از رسم شده بر اساس توالی ژن *thxB*.

در این بررسی گروه‌بندی ۲۰ نمونه باکتری *E. Coli* نیز با دو روش گروه‌بندی توسط PCR و رسم درختچه فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. الگوی باندینگ این ۲۰ نمونه در واکنش PCR در تصویر شماره ۲ قابل مشاهده می‌باشد که براساس واکنش PCR ۹ عدد از نمونه‌ها به گروه A، چهار عدد از نمونه‌ها به گروه B2، چهار عدد به گروه B1 و سه عدد به گروه D تعلق داشتند. پس از تعیین توالی و رسم درختچه توسط گروه‌بندی این نمونه‌ها در هر دو روش مشابه یکدیگر می‌باشد. گروه تعیین شده به وسیله روش مولتی‌پلکس PCR قبل از شماره دسترسی هر نمونه ذکر شده است (۲۰ نمونه تعیین توالی شده و توالی‌های گرفته شده از بانک جهانی بعد از MULTIALIGN شدن به صورت یک درختچه فیلوژنتیکی نشان داده شده‌اند).

بحث

در این بررسی از دورش مختلف برای تعیین گروه‌های باکتری اشرشیاکلی استفاده گردیده است. روش اول که روش مرسوم تعیین گروه می‌باشد در سال ۲۰۰۰ توسط Clermont و همکاران ارائه گردید که بر پایه تکثیر هم زمان سه قطعه ژنومی در یک واکنش مولتی‌پلکس PCR می‌باشد و روش دوم گروه‌بندی براساس اختلاف در توالی قطعه‌ای پلی‌مورف از ژن *thrB* می‌باشد (۲). در روش اول به دلیل این که تکثیر سه قطعه باید هم زمان صورت بگیرد یافتن غلظت بهینه مواد و هم چنین دمای مناسب در هر آزمایشگاه زمان بر می‌باشد.

از طرفی به دلیل وجود رقابت بین پرایمرها برای اتصال به توالی DNA و وجود اختلاف در دماهای اتصال ممکن است در برخی از نمونه‌ها برخی از ژن‌ها تکثیر نگردند (۲۶) و سبب بروز خطا در تشخیص گروه صحیح گردند. اما در روش تعیین توالی به دلیل تکثیر به قطعه منحصر به فرد با دمای اتصال معلوم، این مشکل عدم تکثیر قطعه وجود ندارد. از دیگر مشکلات گروه اول ناتوانی در تفکیک گروه E و گروه D از یکدیگر می‌باشد که هر دوی این گروه‌ها به دلیل دارا بودن الگوی بانندی یکسان جزء یک گروه محسوب می‌شوند (۲۷) اما در روش تعیین توالی به دلیل پلی‌مورف بودن قطعه تکثیر شده گروه‌های E و D به خوبی از یکدیگر تفکیک می‌گردند. اشکال دیگر روش اول در نبود کنترل مثبت می‌باشد که امکان دارد یک نمونه به دلیل اشتباه در مراحل گذاشتن PCR یا اشتباهات سهوی هیچ بانندی نشان ندهد (۲۸) که سبب می‌شود این نمونه به اشتباه در گروه A قرار گیرد؛ اما در روش تعیین توالی به دلیل این که تکثیر باید حتما صورت گیرد و سپس تعیین توالی گردد از بروز این گونه خطاها جلوگیری می‌شود. برای تعیین گروه نمونه‌های گرفته شده از پایگاه داده‌ای موسسه NCBI از تکنیک PCR مجازی انجام گرفت که بعد از رسم درختچه توسط قطعه ژن *thrB* گروه‌بندی تمامی نمونه‌ها به غیر از ۴ عدد از آن‌ها در هر دو روش یکسان بود که نشان‌دهنده صحت استفاده از توالی ژن *thrB* در تعیین گروه‌های باکتری *E. coli* می‌باشد. البته توجه به این نکته ضروری می‌باشد که تعیین توالی ژن



تصویر شماره ۲: الگوی حاصل از واکنش در ۱۰ نمونه مورد بررسی. L: لدر، N: کنترل منفی

انجام نشده است (۲۹). با این حال با بررسی‌های فیلوژنتیکی، ناحیه 16S-23S rRNA را جهت تعیین برخی گروه‌های باکتری *E. Coli* مناسب معرفی نموده‌اند (۳۰). که از این روش بیش‌تر جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی بین باکتری‌های مختلف استفاده می‌گردد. در سال ۲۰۱۱ نیز Sims و همکارش تعیین توالی چندین ژن مختلف را جهت بررسی گروه‌بندی سویه‌های باکتری *E. Coli* پیشنهاد کردند که بررسی چندین ژن مختلف زمان‌بر و هزینه‌برتر از بررسی یک توالی پلی مورف می‌باشد (۲۸). در سال ۲۰۱۳ نیز Clermont و همکاران با استفاده از توالی یابی ۱۳ قطعه مختلف و هم‌چنین روش مولتی‌پلکس PCR اقدام به شناسایی گروه‌های مختلف باکتری *E. Coli* از یکدیگر نمودند که در برخی از نمونه‌ها بین دو روش شناسایی اختلاف وجود داشت (۲). در بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۴ توسط Olivier و همکاران انجام گرفت با استفاده از روش تکثیر آلل‌های اختصاصی به وسیله PCR توانستند ۹ زیر گروه از گروه B2 باکتری *E. Coli* را از هم تفکیک نمایند (۳۱). در مطالعه حاضر نیز توالی ژن *thrB* توانسته زیر گروه‌های این گروه را از یکدیگر تفکیک نماید و علاوه بر آن سایر گروه‌ها را نیز از هم تفکیک نماید.

یکی از نقایص روش PCR نبود کنترل مثبت می‌باشد و در مقالاتی که به روش PCR نمونه‌ها را گروه‌بندی کرده‌اند به کنترل مثبت اشاره‌ای نکرده‌اند؛ که این مورد می‌تواند از محدودیت‌های مطالعه حاضر باشد؛ با این حال در این تحقیق به دلیل منطبق بودن الگوهای باندها با الگوهای جهانی و هم‌چنین توالی یابی نمونه‌ها، نیازی به کنترل مثبت نمی‌باشد. هم‌چنین زمان‌بر بودن و هزینه‌بر بودن روش تعیین توالی از محدودیت‌های مطالعه حاضر است ولی ذکر این نکته ضروری است که تکنیک‌های تعیین توالی به سرعت در حال بهبود می‌باشند و موسسه‌های بین‌المللی فراوانی در حال بررسی تکنیک‌های توالی یابی جهت ارزان‌تر و سریع‌تر نمودن آن می‌باشند به صورتی که امکان تعیین توالی ژنوم تمام

thrB جهت تفکیک گروه‌های مختلف باکتری مناسب می‌باشد و استفاده نتایج حاصل از این تعیین توالی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی نیازمند بررسی‌های دیگر و استفاده از توالی یابی نواحی دیگر نیز می‌باشد. ۴ نمونه‌ای که در دو روش دارای اختلاف می‌باشند شامل نمونه‌های شماره ۱۱ با شماره دسترسی 383390031، نمونه شماره ۱۲ با شماره دسترسی 313848522، نمونه شماره ۲۹ با شماره دسترسی 215485161 و نمونه شماره ۴۵ با شماره دسترسی 218430358 می‌باشند. نمونه‌های شماره ۱۱ و ۱۲ در گروه‌بندی با روش PCR در گروه A قرار گرفتند ولی در درختچه رسم گردیده در گروه B1 قرار گرفته‌اند، تفاوت این گروه در روش PCR، تکثیر ژن *TspE4C2* در گروه B1 می‌باشد و از آن جایی که بیش از ۷۰ درصد سویه‌های گروه A ژن *YjaA* را نیز دارا می‌باشند می‌توان به این نتیجه رسید که عدم تکثیر ژن *TspE4C2* به دلایلی مانند از دست رفتن جایگاه اتصال آغازگرها به دلیل جهش‌های نقطه‌ای و یا نوترکیبی می‌باشد که سبب شده این نمونه به اشتباه در روش PCR در گروه B1 قرار بگیرد. نمونه ۲۹ در روش مبتنی بر PCR در گروه B1 قرار گرفته ولی در روش تعیین توالی در گروه B2 قرار گرفته است که به نظر می‌رسد عدم تکثیر ژن *Chua* به دلایل ذکر شده سبب گردیده تا این نمونه به اشتباه در گروه B1 قرار بگیرد. نمونه بعدی نمونه ۴۵ می‌باشد که در روش مبتنی بر PCR در گروه D قرار گرفته اما در روش تعیین توالی در گروه B2 قرار گرفته است. در مورد این نمونه نیز به نظر می‌رسد عدم تکثیر ژن *YjaA* سبب شده تا این نمونه به اشتباه در گروه D قرار بگیرد.

تا کنون بررسی‌های اندکی در جهت گروه‌بندی باکتری *E. Coli* با استفاده از تعیین توالی صورت گرفته است. به عنوان مثال برای تفکیک باکتری‌های *Salmonella*، *Shigella* و باکتری *Escherichia coli* از تعیین توالی ژن *gyrB* استفاده شده است که در این روش با وجود تعیین روابط فیلوژنتیکی این سه باکتری، تفکیک گروه‌های مختلف باکتری *E. Coli* از یکدیگر

به گروه‌بندی دقیق باکتری *E. Coli* نظیر دستورزی‌های ژنتیکی جهت تولید داروهای نو ترکیب علیه گروه‌های مختلف باکتری *E. Coli* دارد استفاده نمود.

در مجموع تعیین گروه سویه مختلف باکتری *E. Coli* با روش تعیین توالی نسبت به روش مولتی پلکس PCR، دقیق تر و مطمئن می‌باشد و از مزیت‌های تعیین گروه به روش تعیین توالی می‌توان به دقت بالا در تفکیک گروه‌های مختلف از یکدیگر و تفکیک کردن سویه‌های باکتری *E. Coli* از سایر باکتری‌ها مخصوصاً سویه‌های باکتری سالمونلا اشاره نمود.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان به خاطر ایجاد زمینه اجرای این تحقیق در آزمایشگاه آن مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

افراد فراهم گردد؛ بنابراین هنگامی که بتوان به سرعت تمام ژنوم یک فرد را توالی یابی نمود توالی‌یابی یک قطعه کوچک بسیار سریع و کم هزینه تر خواهد بود.

در انتها ذکر این نکته حائز اهمیت است که CLSI برای همه گروه‌ها، آنتی‌بیوتیک مشابهی را پیشنهاد می‌کند؛ اما بنا بر دلایلی مانند حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های معرفی شده و یا در دسترس نبودن آنتی‌بیوتیک، نیاز به آنتی‌بیوتیک جدید احساس می‌گردد؛ بنابراین برای استفاده از آنتی‌بیوتیک جدید، نیازمند گروه‌بندی می‌باشیم. از طرفی بنا بر توصیه CLSI در شرایط عادی درمان و در مراحل اولیه می‌توان، از آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهاد شده جهت درمان استفاده نمود اما در شرایط پیچیده‌تر بیماری که نیاز به تعیین گروه باکتری می‌باشد، روش تعیین توالی ارجحیت دارد. هم‌چنین نتایج این مقاله تنها جنبه درمانی ندارد و می‌توان در این بررسی از مارکر پیشنهاد شده جهت اهداف دیگر که نیاز

References

1. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 2003; 149(PT12): 3575-3586.
2. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5(1): 58-65.
3. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1990; 172(11): 6175-6181.
4. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 1984; 157(2): 690-693.
5. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51(5): 873-884.
6. Akond MA, Hassan SMR, Alam S, Shirin M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am J Environ Sci* 2009; 5(1): 47-52.
7. Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol* 2007, 9(9): 2274-2288.

8. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Bioland Evol* 1998; 15(1): 6-16.
9. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 2001; 183(1): 78-88.
10. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181(1): 261-272.
11. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahim N, Bingen E, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999; 67(2): 546-553.
12. Bingen E, Picard B, Brahim N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 1998; 177(3): 642-650.
13. Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun* 1997; 65(7): 2685-2692.
14. Tan SL, Lee HY, Mahyudin NA. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food Con* 2014; 44: 203-207.
15. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 2003; 149(12): 3575-3586.
16. Osugui L, 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): 242-247.
17. Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 2006; 8(11): 1975-1984.
18. Soares LS, Almeida RC, Cerqueira ES, Carvalho JS, Nunes IL. Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Con* 2012; 27(1): 206-213.
19. Tang Y, Li F, Tan B, Liu G, Kong X, Hardwidge PR, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection induces intestinal epithelial cell autophagy. *Vet Microbiol* 2014; 171(1-2): 160-164.
20. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(10): 4555-4558.
21. Wagner S, Gally DL, Argyle SA. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and *ampC*-replicons. *Vet Microbiol* 2014; 169(3-4): 171-178.
22. Liu Y, Liu G, Liu W, Liu Y, Ali T, Chen W, et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. *Res Microbiol* 2014; 165(4): 273-277.

-
23. Power ML, Littlefield-Wyer J, Gordon DM, Veal DA, Slade MB. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol* 2005; 7(5): 631-640.
 24. Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M, Joerger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *J Microbiol Methods* 2007; 70(2): 227-235.
 25. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 2008; 10(10): 2484-2496.
 26. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Vet Microbiol* 2012; 154(3-4): 305-315.
 27. Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Ben Redjeb S. Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis. *Pathol Biol* 2012; 60(5): 270-274.
 28. Sims GE, Kim SH. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli* /*Shigella* group by feature frequency profiles (FFPs). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(20): 8329-8334.
 29. Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8): 2779-2785.
 30. Magray MS, Kumar A, Rawat AK, Srivastava S. Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bioinformatics* 2011; 6(10): 370-371.
 31. Clermont O, Christenson JK, Daubié AS, Gordon DM, Denamur E. Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 subtyping, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing. *J Microbiol Methods* 2014; 101: 24-27.