

Genetic Variation of Escherichia coli Bacteria Isolated from Urinary Tract Infections Using RAPD-PCR

Hamzeh Asadi¹,

Reza Yari²,

Mohsen Zargar¹

¹ MSc in Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Borujerd Branch, Borujerd, Iran.

(Received August 1, 2014 ; Accepted August 31, 2015)

Abstract

Background and purpose: *E. coli* bacteria is detected by culture, serology and molecular methods. In molecular methods PCR products are created using little random primers. The main purpose of this research was to study the genetic diversity of *Escherichia coli* bacteria. Also, the propinquity of isolated bacteria with two common strains of Enteropathogenic *E. coli* (St.₁) and Enterohaemorrhagic *E. coli* (St.₂) was studied.

Materials and methods: An experimental study was performed in which 50 *E. coli* bacteria were isolated from urine samples and re-identified using biochemical tests. DNA was extracted by a kit and PCR products were evaluated after electrophoresis. The matrix of one/zero of bands was entered in Excel and studied by NTSYS_{PC}2.02 and MVSP 3.2 programs.

Results: Eight primers were used from which 129 bands were produced. The highest number of bands were produced by primer 2 (n=24). We observed 42 polymorphic bands, 10 common bands in all primers, and 22 special bands in each primer. The largest band appeared in primer 1 (17.3 kb) and the smallest band was observed in primers 7 and 8 (80 bp). Based on UPGMA dendrogram pattern and PCoA 3D ordination, four isolates including 33, 47, 48 and 50 showed relative genetic propinquity with St.₁ and St.₂.

Conclusion: Drawing PCoA 3D ordination showed high genetic diversity in isolates, indicating different pollution centers in spreading the bacteria. Fingerprinting of isolates showed high repeatability in technique illustrating its high degree of accuracy and reliability.

Keywords: *Escherichia coli*, Random Amplified Polymorphic DNA Technique, genetic variation

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(134): 114-123 (Persian).

مطالعه تنوع ژنتیکی باکتری‌های *Escherichia coli* جداسازی شده از نمونه های عفونت اداری با استفاده از RAPD-PCR

حمزه اسدی^۱
رضا یاری^۲
محسن زرگر^۱

چکیده

سابقه و هدف: راه‌های تشخیص باکتری *E. coli*، کشت، روش‌های سرولوژی و ملکولی می‌باشد. در روش مولکولی با استفاده از پرایمرهای کوچک تصادفی، اقدام به تولید محصولات PCR می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی در باکتری‌های اشریشیاکلی می‌باشد. هم‌چنین با استفاده از دو سویه شایع *Enteropathogenic E. coli* (St.1) و *Enterohaemorrhagic E. coli* (St.2)، میزان قرابت باکتری‌های جداسازی شده با این دو سویه نیز مطالعه می‌گردد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ی تجربی حاضر ۵۰ نمونه باکتری اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های اداری با آزمایشات بیوشیمیایی تعیین هویت مجدد شدند. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت انجام شد و محصولات حاصل از PCR پس از الکتروفورز ارزیابی شدند. ماتریس یک/صفر باندها در Excel وارد و سپس با کمک برنامه‌های NTSYS_{PC}2.02 و MVSP 3.2 مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مجموع از ۸ پرایمر، ۱۲۹ باند تولید شد. بیش‌ترین تعداد باند تولیدی، مربوط به پرایمر ۲ با ۲۴ باند می‌باشد. ۴۲ باند پلی‌مورف، ۱۰ باند مشترک در تمام پرایمرها و ۲۲ باند اختصاصی ویژه هر یک از پرایمرها به دست آمد. بزرگ‌ترین باند به اندازه ۷/۳ Kb مربوط به پرایمر یک و کوچک‌ترین باند به اندازه ۸۰ Kp مربوط به پرایمرهای ۷ و ۸ می‌باشد. براساس الگوی دندروگرام UPGMA و الگوی رسته‌بندی سه بعدی PCoA، ایزوله‌های ۳۳، ۴۷، ۴۸ و ۵۰ قرابت ژنتیکی نسبی با دو سویه استاندارد St.1 و St.2 از خود نشان دادند.

استنتاج: ایزوله‌ها با ترسیم رسته‌بندی سه بعدی PCoA، تنوع ژنتیکی بالایی را از خود نشان دادند که بیانگر وجود تنوع مراکز آلودگی در انتشار باکتری‌های مورد نظر می‌باشد. انگشت‌نگاری ایزوله‌ها با این روش، قدرت تکرارپذیری بالایی را نشان داد و این می‌تواند درجه بالایی از اطمینان و صحت را در مورد این تکنیک نشان دهد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی

مقدمه

عفونت دستگاه اداری بعد از عفونت‌های تنفسی، سن قرار دارد، به طوری که این عفونت در زنان نسبت به مردان بسیار شایع تر است. در کودکان هم احتمال این جزء شایع‌ترین عفونت‌هاست. که تحت تأثیر جنسیت و

Email: hamzhasadi@yahoo.com

مؤلف مسئول: حمزه اسدی - بروجرد - دانشگاه آزاد اسلامی

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۵/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۹

عفونت وجود دارد، دختران در سنین ۴ الی ۸ سال، احتمال عفونت بیش تری نسبت به پسران دارند، به طوری که ۳ تا ۵ درصد دختران و ۱ درصد پسران به این عفونت مبتلا می‌شوند (۱). حدود ۸۵ درصد این عفونت‌ها، توسط یک باکتری طبیعی روده‌ای به نام اشریشیاکلی، ایجاد می‌شود. باکتری اشریشیاکلی جز خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این خانواده گروه بزرگ و ناهمگونی از باسیل‌های گرم منفی روده‌ای می‌باشند که به طور طبیعی در روده انسان و حیوانات سکونت دارند (۱). از روش‌های تشخیصی برای این باکتری می‌توان کشت، روش‌های سرولوژی، کشت سلولی و روش‌های ملکولی را نام برد. از روش‌های ملکولی، PCR می‌باشد که دارای حساسیت بالایی نسبت به روش‌های دیگر است. یکی از روش‌های PCR، روش RAPD-PCR می‌باشد که با استفاده از پرایمرهای کوچک تصادفی به تولید محصولات PCR می‌پردازد. این روش دارای مزیت‌هایی نسبت به سایر نشانگرها می‌باشد که شامل هزینه کم‌تر نسبت به سایر تکنیک‌های دیگر، نمونه برداری تصادفی از بسیاری از جایگاه‌های ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت ساخت و طراحی پرایمر، امکان بررسی همزمان چندین ژن در ژنوم نمونه‌ها، سرعت نسبتاً زیاد برای بررسی تعداد زیاد نمونه، عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو، عدم نیاز به مقدار زیاد DNA الگو، امکان بررسی گونه‌های مختلف با پرایمرهای یکسان و مطالعه تعداد زیادی نمونه در مدت کوتاه‌تر نسبت به سایر روش‌ها ذکر کرد. نشانگرهای ملکولی RAPD کاربرد فراوانی دارند که از جمله آن می‌توان به بررسی ژنوتایپینگ، بررسی ژنتیک جمعیت، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین پیوستگی با صفات مطلوب، بررسی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی، ژنوتیپ‌های مختلف باکتریایی، انگشت نگاری DNA، غربالگری تعداد بسیاری از نمونه‌ها در مدت کوتاه و شناسایی و بررسی تفاوت‌ها در سطح سوش‌ها اشاره کرد (۲،۳).

توجه به این که اشریشیاکلی، یک پاتوژن شایع عفونت‌های ادراری است و از سوی دیگر، به علت سرعت بالای نوترکیبی ژنتیکی مربوط به Variable accessory genome در بین سویه‌های اشریشیاکلی، برای تخمین رابطه Clonal ایزوله‌ها، به منظور ارزیابی منبع عفونت و مسیر انتقال این پاتوژن و پیشگیری‌های بهداشتی، باید از بین روش‌های PCR، یک روش تایپینگ سریع انتخاب نمود. تکنیک RAPD که اختصاراً Rapid نیز گفته می‌شود، روشی است که به دلیل سادگی، حساسیت، انعطاف‌پذیری، هزینه پایین و زمان کوتاه انجام آن، در سال‌های اخیر توجه زیادی به آن شده است (۲). RAPD-PCR نشان می‌دهد چگونه انتقال سویه‌ها بین بیماران رخ می‌دهد و سویه‌هایی که پس از درمان آنتی‌بیوتیکی پدیدار شده‌اند، سویه‌های اصلی هستند یا این که سویه‌های اکتسابی جدید هستند. در این تحقیق برآینم که با روش RAPD-PCR که تاکنون در شهر بروجرد صورت نگرفته است، به بررسی ملکولی این باکتری پردازیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بر اساس مطالعات گذشته (۴،۵)، ۵۰ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از ادرار میانی بیماران با عفونت ادراری مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های مناطق ۱ و ۲ شهرستان بروجرد، از شهریور تا اسفند سال ۱۳۹۲، که طی ۲۴ ساعت گذشته مصرف آنتی‌بیوتیک نداشته‌اند، در شرایط استریل نمونه‌برداری و در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد انتقال داده شدند. نمونه‌های فوق جهت تأیید تشخیص و خالص‌سازی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد، مورد تعیین هویت مجدد قرار گرفتند (تصویر شماره ۱). جدایه‌های روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، چند کلنی از باکتری به محیط LB تلقیح شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بر اساس

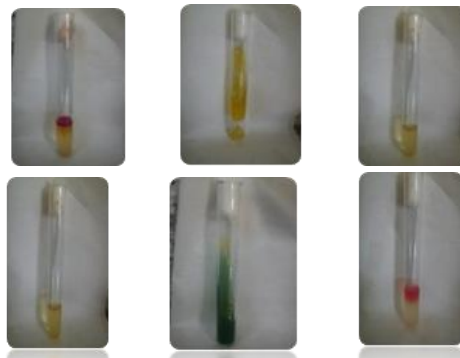
DNA الگو به مقدار ۲ میکرولیتر اضافه گردید. ترکیب مواد لازم در قالب یک واکنش ۲۵ میکرولیتری برای هر نمونه طبق جدول شماره ۱ می باشد:

جدول شماره ۱: مقدار و غلظت اجزای واکنش

مقدار مورد نیاز برای حجم کل ۲۵ μl	غلظت محلول ذخیره	اجزای واکنش
۱۳ μl	-	Steriled ddH ₂ O
۲/۵ μl	۱۰ X	PCR buffer
۱/۵ μl	۵۰ mM	MgCl ₂
۰/۵ μl	۱۰ mM	dNTP
۵ μl	۱۰ μl	Primer
۰/۵ μl	۵ U/ μl	Taq polymerase
۲ μl	-	DNA

برای انجام PCR از روش مخلوط اصلی (master mix) استفاده کردیم. با این روش از تلف شدن مواد جلوگیری شده، دقت عمل افزایش یافته و موارد انتقال مواد کاهش پیدا می کند و در نتیجه امکان آلودگی، کم تر خواهد بود. برای تهیه مخلوط اصلی، حجم کل آن با در نظر گرفتن تعداد نمونه ها به علاوه یک واکنش بیش تر (جهت تأمین مقادیر اتلاف شده در هنگام توزیع)، محاسبه شد. پس از اضافه کردن هر یک از مواد واکنش، آن ها را ورتکس کرده تا کاملاً مخلوط شوند که این حجم نهایی، مخلوط اصلی را تشکیل می دهد. برای هر نمونه، یک میکروتیوپ ۰/۲ میکرولیتری در نظر گرفته شد و به میزان ۲۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی به آن ها اضافه گردید. سپس ۲ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده طبق شماره مربوط به هر نمونه، به ویال ها اضافه شد. این ویال های آماده جهت انجام واکنش PCR، به دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf منتقل شده و طبق برنامه داده شده به آن، تغییرات دمایی جهت انجام مراحل PCR به منظور تکثیر DNA هدف انجام گرفت. برنامه دمایی - زمانی برای همه ایزوله مانند برنامه جدول شماره ۲ بهینه سازی و اجرا شد. پرایمرهای استفاده شده در این تکنیک کوتاه بوده (10 mers) و همگی توالی تصادفی دارند (جدول شماره ۳) که به صورت لیوفلیزه از شرکت سیناکلون - ایران خریداری شدند.

دستورالعمل کیت استخراج DNA (سیناکلون) (Cat No. PR881613)، میکروتیوپ ها را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با ۷۵۰۰g قرار دادیم، مایع رویی را کاملاً از رسوب باکتری دور ریخته و به هر کدام از میکروتیوپ ها، ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز و ۵ میکرولیتر از آنزیم پروتئاز اضافه شد. سپس ورتکس کرده و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و ادامه کار براساس دستورالعمل کیت انجام شد.



تصویر شماره ۱: تشخیص باکتری اشریشیاکلی با استفاده از محیط های بیوشیمیایی

بررسی کمی DNA ژنومیک: در روش ژل الکتروفورز، مقدار ۵ μl از نمونه DNA در ژل آگارز ۰/۷ درصد بارگذاری شد و در میدان الکتریکی با ولتاژ ۸۰، الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه UVI-Doc، عکس برداری شده و مورد بررسی قرار گرفت. در روش طیف سنجی نیز ۱۰ μl از نمونه DNA با ۲ ml آب مقطر دو بار تقطیر، مخلوط شده و جذب نوری در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. بهترین کیفیت DNA دارای جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۶ تا ۱/۸ خواهد بود.

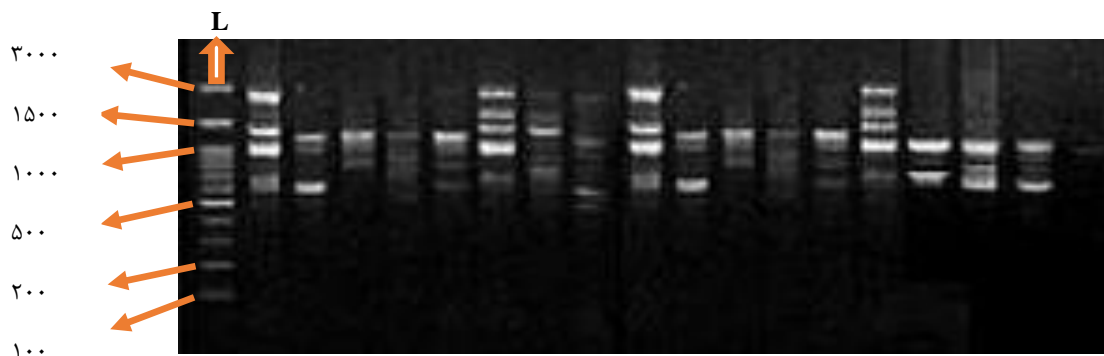
$$\text{OD optimum: } 1.8 \geq \frac{260}{280} \geq 1.6$$

برای تمامی نمونه ها دو روش فوق انجام پذیرفت (۶). تکثیر DNA استخراج شده با استفاده از واکنش RAPD-PCR برای هر واکنش PCR، حجم ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که در آن حجم، مخلوط اصلی ۲۳ میکرولیتر و DNA استخراج شده به عنوان

(تصویر شماره ۲) و با محاسبات چشمی و نیز نرم افزار Band Leader 3، اندازه باندها با توجه به اندازه باندهای مارکر DNA محاسبه شده در نرم افزار Excel و SPSS وارد شد. سپس حضور یا عدم حضور هر باند برای هر ایزوله به صورت ماتریس ۱ و ۰ وارد برنامه شده و از آن برای ترسیم درختچه های ژنوتایپینگ توسط NTSYSpc و MVSP 3.2 استفاده گردید.

یافته ها

۴۲ نفر (۸۴ درصد) مبتلایان مؤنث و ۸ نفر (۱۶ درصد) مذکر بودند. با توجه به الگوی RAPD (تصویر شماره ۳)، از ۸ پرایمر مورد استفاده، تعداد کل الگوی باندهای ۴۲ باند توسط ۵۲ ایزوله و سویه استاندارد به دست آمد (لازم به یادآوری است در تحقیق حاضر از کنترل مثبت و منفی استفاده نشده است). از این میان، ۲۰ الگوی باند پلی مورف می باشند که بزرگ ترین باند تولیدی، توسط پرایمر یک به میزان ۷/۳ Kb بود. کوچک ترین الگوی باندهای با ۸۰ bp به پرایمرهای ۷ و ۸ اختصاص داشت. تعداد باندهایی که ویژه تنها یک نوع پرایمر بوده و در سایر پرایمرها این الگوی باندهای ظاهر نشده، ۲۲ باند می باشد. تعداد باند مشترک که در همه پرایمرها حضور دارد، ۱۰ باند می باشد که در الگوی RAPD مشخص می باشند. در تحقیق حاضر با استفاده از برنامه های NTSYSpc و MVSP 3.2، دندروگرامها و رسته بندی دو بعدی و سه بعدی باندها (و نمودار شماره ۱ و ۲) به دست آمد.



تصویر شماره ۲: نمونه ژل الکتروفورز محصول PCR (امپلیکون های) حاصل از تکثیر با کمک پرایمر شماره ۱۰

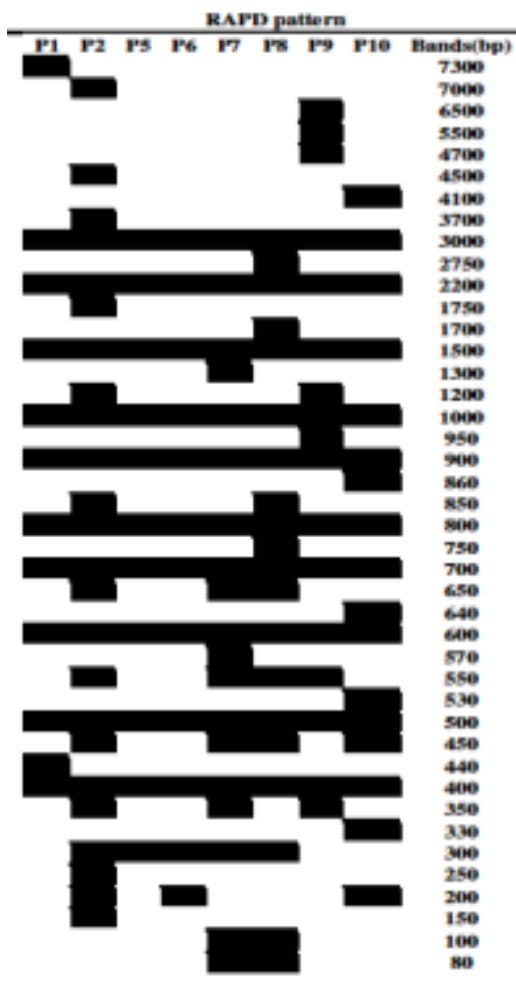
جدول شماره ۲: برنامه دمایی - زمانی بهینه شده پرایمرها در واکنش

نام مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تکرار سیکل
Initial Denaturation	۹۶	۳	۱
Denaturation	۹۴	۱	
Annealing	۳۶	۱	۴۴
Extension	۷۲	۱	
Final Extension	۷۲	۵	۱

جدول شماره ۳: ترادف پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RAPD

شماره	ترادف
۱	5'-AAGAGCCCGT-3'
۲	5'-CCGCAGCCAA-3'
۵	5'-GTGGATGCGA-3'
۶	5'-CAATGCGTCT-3'
۷	5'-AGAAGCGATG-3'
۸	5'-TGCCGAGCTC-3'
۹	5'-GTGATCGCAG-3'
۱۰	5'-CCGAATCCC-3'

روش انجام الکتروفورز: ۵ میکرولیتر از امپلیکون با یک میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و محلول حاصل داخل چاهک ها بار گذاری شدند. در چاهک اول DNA Marker و بقیه چاهک ها سایر نمونه ها اضافه گردید. درب تانک را بسته و به منبع جریان برق وصل گردید. ولتاژ مورد استفاده برای الکتروفورز با توجه به فاصله بین دو الکتروود تعیین می شود. بهترین شرایط بین ۱ تا ۵ ولت به ازای هر سانتی متر فاصله بین الکتروودها می باشد. پس از زمان معین (معمولاً حدود ۳۰ دقیقه)، دستگاه تأمین جریان برق خاموش و ژل خارج گردید. وارد کردن داده ها: پس از اتمام الکتروفورز، ژل را در آورده و بر روی صفحه دستگاه (UV Gel doc) قرار داده شد. اشعه UV ضمن عبور از ژل، باعث نمایان شدن باندهای DNA می شود، سپس از باندها عکس گرفته شد

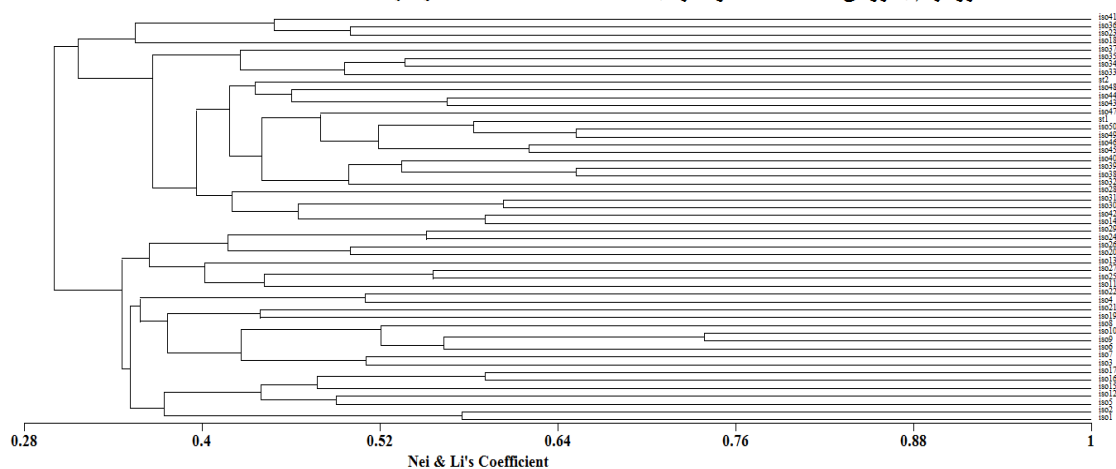


تصویر شماره ۳: الگوی RAPD باندهای تولیدی توسط ۱۵۰ ایزوله و نمونه های استاندارد St.1 و St.2 با استفاده از هشت پرایمر تصادفی

با توجه به نمودار دندروگرام، UPGMA دو خوشه اصلی تشکیل شده است که در خوشه بالایی (St.1) و (St.2) قرار گرفته اند و نزدیک ترین ایزوله ها به هم دو ایزوله ۹ و ۱۰ هستند که در یک خوشه قرار گرفته و با فلش مشخص شده است.

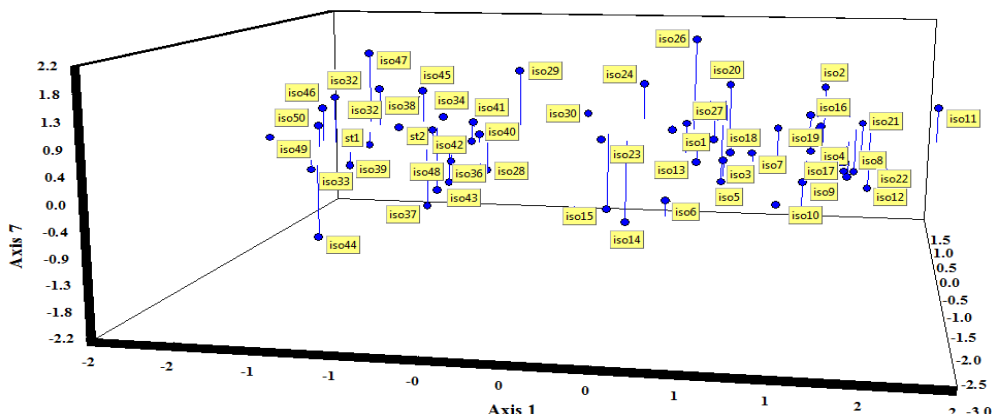
براساس الگوی PCoA، در حالات دو بعدی و سه بعدی با ضرایب مختلف شاهد قرابت ژنتیکی سویه های استاندارد St.1 و St.2 با ایزوله های ۲۸، ۳۲، ۳۳، ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۴، ۳۹، ۴۹، ۵۰، ۴۱، ۴۳، ۳۷، ۳۴، ۳۶، ۴۰ و ۴۸ می باشیم و در سوی دیگر رسته بندی، شاهد قرابت ژنتیکی سایر ایزوله ها با یکدیگر می باشیم که بیانگر آن است که احتمالاً ایزوله های مورد مطالعه از سایر گروه های باکتری اشریشیاکلی به جز EPEC (St.1) و EHEC (St.2) می باشند. هم چنین داده های الگوی PCoA مؤید نتایج خوشه بندی با روش UPGMA مجموع ۸ پرایمر می باشد. نمونه های ۴۷، ۴۸، ۵۰ و ۳۳ در الگوی دندروگرام در نزدیکی نمونه استاندارد St.1 و St.2 قرار گرفته است که می توان گفت احتمالاً خویشاوندی بیش تری بین این نمونه ها و EPEC و EHEC وجود دارد.

دندروگرام با روش UPGMA و ضریب Nei & Li با استفاده از برنامه MVSP ver. 3.1



نمودار شماره ۱: دندروگرام UPGMA مجموع هشت پرایمر و ضریب Nei & Li

رسته بندی سه بعدی PCoA با نرم افزار MVSP ver. 3.1



نمودار شماره ۲: رسته بندی سه بعدی PCoA مجموع هشت پرایمر

بحث

عفونت دستگاه ادراری بعد از عفونت های تنفسی، شایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان می باشد. عفونت دستگاه ادراری یک عفونت مجرای ادراری، مثانه و یا کلیه ها می باشد که ساختارهای اصلی دستگاه ادراری هستند (۷). این عفونت اغلب عفونت بالارونده می باشد، به طوری که پیشابراه را آلوده می کند و سپس به سمت مثانه حرکت می کند و ایجاد التهاب مثانه می کند که به آن سیستیت می گویند. در برخی موارد، عفونت باعث پیلونفریت می شود که با درد پهلو، تب، تهوع و استفراغ همراه است (۸). این عفونت در تمام افراد از نوزادان تا افراد پیر و در هر دو جنس دیده می شود؛ اما در زنان نسبت به مردان بیماری شایع تر است. هم چنین در مردان بعد از سن ۵۰ سالگی، در بیماران گیرنده کلیه و در افراد دارای ناهنجاری های ساختاری یا فیزیولوژیک دستگاه ادراری، شیوع بیش تری دارد. برخی از خانم ها ممکن است به ندرت یا هرگز این عفونت را تجربه نکنند، اما برخی دیگر ممکن است چندین بار مبتلا شوند، تا جایی که ۲۰ تا ۳۰ درصد زنان به طور مکرر به عفونت ادراری مبتلا می شوند. در کودکان هم احتمال این عفونت وجود دارد. دختران به خصوص بین سنین ۴ تا ۸ سال احتمال عفونت بیش تری نسبت به پسران دارند، به طوری که ۳ تا ۵ درصد دختران و ۱ درصد پسرها به

این عفونت مبتلا می شوند (۹). شایع ترین باکتری های عامل عفونت مجاری ادراری استافیلوکوک ها، کلبسیلا، سودوموناس، انتروباکتر، سیتروباکتر، پروتئوس و اشریشیاکلی می باشند. حدود ۸۰ تا ۸۵ درصد عفونت دستگاه ادراری توسط اشریشیاکلی ایجاد می شود (۱۰). مطالعات اپیدمیولوژیک که انجام می شود، می تواند بر اساس خصوصیات فنوتیپی یا ژنوتیپی باکتری اشریشیاکلی باشد. خصوصیات فنوتیپی (بیوشیمیایی و آنتی ژن)، می توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، لذا استفاده از آزمون های فنوتیپی، گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می شود. ردیابی اشریشیاکلی، در نمونه های بالینی با روش های استاندارد فنوتیپی نیز کاری مشکل و وقت گیر می باشد. از طرفی روش های فنوتیپی حساسیت و قدرت تشخیص و افتراق لازم برای مطالعات اپیدمیولوژیک را ندارند. بنابراین در سال های اخیر روش های تشخیصی زود بازده بر پایه ژنوتیپ باکتری که بسیار دقیق و حساس بوده و نسبت به روش های فنوتیپی کم تر تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می گیرند، رواج یافته است (۱۱). روش های ملکولی، قدرت تشخیص و تکرارپذیری بالاتری نسبت به تست های فنوتیپی دارند و این پیشرفت به دلیل توانایی آن ها در تعیین تفاوت های ژنومی کوچک و ثبات ملکولی بالا در مقایسه با

پروفایل‌های فنوتیپی برای همان گونه‌های باکتریایی است. در دو دهه اخیر، روش‌های مبتنی بر PCR، نقش مهمی در تایپینگ باکتریایی ایفا کرده‌اند. روش‌های ملکولی از نظر قدرت تشخیص، سهولت اجرا، میزان بازده، سرعت، هزینه و پارامترهای دیگر بسیار متنوع هستند. انتخاب یک تکنیک ملکولی بر خلاف روش‌های فنوتیپی، بهتر است با در نظر گرفتن این پارامترها انجام شود. روش‌های مختلف ملکولی از جمله هیبریداسیون DNA، تعیین درصد G+C در ژنوم، RFLP، بررسی توالی 16S rRNA و RAPD-PCR برای ارزیابی ژنوتایپینگ و طبقه‌بندی ژنوتایپینگ باکتری‌ها وجود دارد (۸). به علت سرعت بالای نوترکیبی ژنتیکی مربوط به Variable accessory genome در بین سویه‌های اشیشیاکلی، برای تخمین رابطه Clonal ایزوله‌ها، به منظور ارزیابی منبع عفونت و مسیر انتقال این پاتوژن و پیشگیری‌های بهداشتی، باید از بین روش‌های PCR، یک روش تایپینگ سریع انتخاب نمود (۱۲). تکنیک RAPD که اختصاراً Rapid نیز گفته می‌شود، روشی است که به دلیل سادگی، حساسیت، انعطاف‌پذیری، هزینه پایین و زمان کوتاه انجام آن در سال‌های اخیر توجه زیادی به آن شده است (۲). RAPD-PCR نشان می‌دهد چگونه انتقال سویه‌ها بین بیماران رخ می‌دهد و سویه‌هایی که پس از درمان آنتی‌بیوتیکی پدیدار شده‌اند، سویه‌های اصلی هستند یا این که سویه‌های اکتسابی جدید هستند.

واکنش RAPD همان واکنش‌های PCR هستند، با این تفاوت که در تکنیک RAPD، توالی‌هایی از DNA تکثیر می‌شوند که در اصل برای محقق ناشناخته، یعنی تصادفی هستند. در PCR معمولی، یک جفت پرایمر استفاده می‌شود، اما در تکنیک RAPD، چندین کپی از یک پرایمر با همان توالی استفاده می‌شود. استفاده از یک تک پرایمر، منجر به تکثیر چندین قطعه از DNA، که به صورت تصادفی در میان ژنوم پراکنده‌اند، می‌شود. پرایمرهای استفاده شده در این

تکنیک، کوتاه بوده (۱۲mers-۸) و توالی تصادفی دارند (۱۳، ۱۴). از دیگر مزایای این روش، عدم نیاز به دانش اختصاصی قبلی در مورد توالی DNA اگانسیم هدف جهت طراحی و ساخت پرایمر است که نسبت به روش PFGE، تعداد بیش‌تری باند نشان داده و انجام آن ساده‌تر و سریع‌تر است، هزینه پایین و زمان انجام آن کوتاه بوده و نیازی به کاوشگر و مواد رادیواکتیو ندارد، نسبت به روش PFGE قدرت افتراق بین سویه‌های بیش‌تری دارد. در این تکنیک Whole genome به عنوان الگو قرار می‌گیرد، عدم نیاز به مراحل بلاتینگ یا هیبریداسیون، نیاز به میزان کمی DNA (۵ تا ۲۵ نانوگرم) و تکرارپذیری بالا دارد (که در تحقیق حاضر این تکرارپذیری با دو پرایمر استفاده شده در تحقیق مورد آزمایش قرار گرفت و نتایجی که از باندهای آن‌ها در دفعات مختلف حاصل می‌شد، به صورت قابل قبولی شباهت داشتند (۱۵، ۲)). برای نخستین بار در شهرستان بروجرد، تکنیک RAPD-PCR برای ایزوله‌های اشیشیا اکلائی جدا شده از عفونت‌های ادراری به کار گرفته شد و شرایط واکنش این نوع خاص PCR استانداردسازی و بهینه شد. اما نتایج تحقیق حاضر از بسیاری جهات با مطالعات قبل از آن همسویی دارد که نشان‌دهنده توانایی و قدرت این روش است که در این جا به آن‌ها مختصراً اشاره می‌شود. در مطالعه Abou-Dobara و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۳۹ نمونه جدا شده از عفونت‌های ادراری با استفاده از تکنیک RAPD-PCR بررسی شد که بزرگ‌ترین باند تولیدی ۱/۰۷۸Kb و کوچک‌ترین باند ۲۸۰bp گزارش شد و ۱۷ الگوی بانندی به دست آمد (۲). در سال ۲۰۰۸ Lobos و Padilla ۴۶ نمونه جدا شده از عفونت‌های ادراری، سپی سمی و اوتیتیس را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق از دو پرایمر 2H و 3H استفاده گردید. نتایج نشان داد که پرایمر 2H باندهایی در محدوده ۵۰۰bp تا ۴/۵Kb و پرایمر 3H در محدوده ۵۰۰bp تا ۶Kb دارد که در مجموع ۴۶ پروفایل RAPD مشاهده شد (۴). در

ارتباط بین نمونه‌ها و نمونه استاندارد St.1 و St.2 باشد. برای این منظور می‌توان از PCR ژن‌های اختصاصی دو سویه استاندارد و پنجاه ایزوله مورد بررسی استفاده کرد. در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به نتایج تحقیق، انگشت‌نگاری ایزوله‌ها با این روش، قدرت تکرارپذیری بالایی را نشان داد و این می‌تواند درجه بالایی از اطمینان و صحت را در مورد این تکنیک نشان دهد. در بین روش‌های ملکولی، روش RAPD-PCR، روش قابل اعتمادی است که با صحت بسیار بالا و به طور موفقیت آمیزی، در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ارگانسیم‌ها از جمله قارچ‌ها، ویروس‌ها و انواعی از گونه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات و راهنمایی‌های همکاران و اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، جناب آقای مهندس قریب و بیمارستان امام خمینی (ره) و دکتر شهید چمران شهرستان بروجرد سرکار خانم افتخاری و نجمه جودکی هم‌چنین خانم حاجی غلامی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

سال ۲۰۰۸، Khaldoon و همکاران با استفاده از ۹ پرایمر، ۵۶ الگوی متفاوت را به دست آوردند. تعداد کل باندهای به دست آمده، ۹۰ باند بود که در دو شاخه اصلی مشاهده شد (۱۶).

Kawamori و همکاران در مطالعه‌ای بر روی اوروپاتوژن‌ها، ۱۹-۲۴ باند با وزن ملکولی ۳۰۰-۵۰۰ bp به دست آوردند (۱۷). Ejrnaes و همکاران نیز با مطالعه‌ای بر روی ۱۵۶ سویه اشیشیا کلی عامل عفونت ادراری، ۱۵-۱۰ باند با وزن ملکولی ۵۰ bp تا ۱/۲Kb به دست آوردند (۱). در سال ۲۰۰۹، Kilic و همکاران، ۴۸ سویه اشیشیا کلی جدا شده از مرغ‌های خانگی را با تکنیک RAPD-PCR مورد آزمایش قرار دادند. نتایج، ۹ الگوی متفاوت را نشان داد که حاکی از هتروژنیسیته بزرگی در بین سویه‌های اشیشیا کلی جدا شده از مرغ‌ها بود (۵). در سال ۲۰۰۳، Wan و همکاران با روش RAPD-PCR، ۳۸ سویه انتروپاتوژنیک جدا شده از بیماران اسهالی را مورد بررسی قرار دادند. دندروگرام مشاهده شده از نتایج RAPD-PCR جدایه‌ها را در ۲ خوشه مجزا قرار دادند (۱۸) که نتایج حاصل از مطالعات فوق، هم‌چنان که گفته شد، با نتایج تحقیق حاضر همخوانی قابل قبولی دارد. هدف بعدی می‌تواند یافتن چگونگی و چرایی این

References

1. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J clin microbiol* 2006; 44(5): 1776-1781.
2. Abou-Dobara MI, Deyab MA, Elsayy EM, Mohamed HH. Antibiotic susceptibility and genotype patterns of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infected patients. *Pol J Microbiol* 2010; 59(3): 207-212.
3. Aishah N. Random Amplified Polymorphic DNA-PCR polymerase chain reaction [RAPD-PCR] fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7. Institute of biological sciences faculty of science university Malaya. (2008).
4. Lobos O, Padilla C. Phenotypic characterization and genomic DNA polymorphisms of *Escherichia coli* strains isolated as the sole

- micro-organism from vaginal infections. *Microbiology* 2009; 155(pt 3): 825-830.
5. Kilic A, Muz A, Ertas HB, Ozbey G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Escherichia coli* isolated from chickens. *Saglık Bilimleri Veteriner Dergisi, Firat Üniversitesi* 2009; 23(1): 1-4.
 6. Stephenson FH. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. 2nd ed. London: London Academic; 2010.
 7. Haider G, Zehra N, Munir AA, Haider A. Risk factors of urinary tract infection in pregnancy. *J Pak Med Assoc* 2010; 60(3): 213-216.
 8. Meyrier A, Guibert J. Diagnosis and drug treatment of acute pyelonephritis. *Drugs* 1992; 44(3): 356-367.
 9. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of epidemiology* 2000; 10(8): 509-515.
 10. Verweij-van Vught AM, Van den Bosch JF, Namavar F, Sparrius M, MacLaren DM. K antigens of *Escherichia coli* and virulence in urinary-tract infection: studies in a mouse model. *J Med Microbiol* 1983; 16(2): 147-155.
 11. Eftekhari F, Khodadad A, Henry D, Speert DP. Isolation and genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* from Iranian patients with cystic fibrosis using RAPD-PCR. *Iranian Journal of Biotechnology (IJB)* 2003; 1(2): 95-100.
 12. Thangaraj M, Prem V, Ramesh T, Lipton AP. RAPD fingerprinting and demonstration of genetic variation in three pathogens isolated from mangrove environment. *Asian J. Biotechnol* 2011; 3(3): 269-274.
 13. Williams JG, Hanafey MK, Antoni Rafalski JA, Tingey SV. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 1993; 218: 704-740.
 14. Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME. *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM); 2011.
 15. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ, Prescott LM. *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Higher Education; 2008.
 16. AL-Darahi KF, Mahdi LK, AL-Naib KT, Jubreal J. Molecular characterization of *E. coli* O157:H7 strains using Random Amplified Polymorphic DNA [RAPD]. *Journal Dohuk University* 2008; 11(1): 198-205.
 17. Kawamori F, Hiroi M, Harada T, Ohata K, Sugiyama K, Masuda T, et al. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157: H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *J Med Microbiol* 2008; 57(pt 1): 58-63.
 18. Wan KF, Radu S, Cheah YK, Benjamin PG, Ling CM, Hon SF, et al. Antibiotic resistance, plasmid profile and RAPD-PCR analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(3): 620-626.