Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

ORIGINAL ARTICLE

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

Hamzeh Asadi[1],
Reza Yari[2],
Mohsen Zargar[1]

[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).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۴ اسفند سال ۱۳۹۴ (۱۲۳-۱۱۴)

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 اشرسیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری 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. انگشت نگاری 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 ادراری بعد از عفونت‌های تنفسی، جزءشایع‌ترین عفونت‌هاست. که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارد، به طوری که این عفونت در زنان نسبت به مردان بسیار شایع‌تر است. در کودکان هم احتمال این

مولف مسئول: حمزه اسدی– بروجرد– دانشگاه آزاد اسلامی Email: hamzehasadi@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

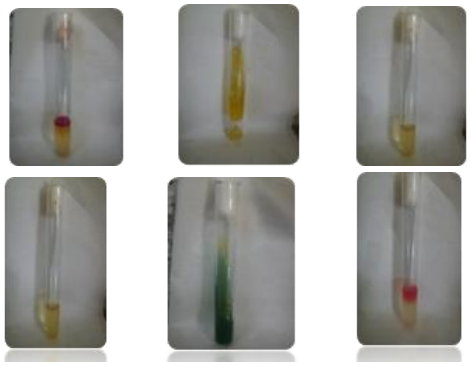
عفونت وجود دارد، دختران در سنین ۴ الی ۸ سال، احتمال عفونت بیش‌تری نسبت به پسران دارند، به‌طوری که ۳ تا ۵ درصد دختران و ۱ درصد پسران به این عفونت مبتلا می‌شوند(۱). حدود ۸۵ درصد این عفونت‌ها، توسط یک باکتری طبیعی روده‌ای به نام اشریشیاکلی، ایجاد می‌شود. باکتری اشریشیاکلی جز خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این خانواده گروه بزرگ و ناهمگونی از باسیل‌های گرم منفی روده‌ای می‌باشند که به‌طور 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 روش‌هایPCR، 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(۳،۲). با توجه به این‌که 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 شده اند، سویه های اصلی هستند یا این که سویه‌های اکتسابی جدید هستند. در این تحقیق برآنیم که با روش RAPD-PCR که تاکنون در شهر بروجرد صورت نگرفته است، به بررسی ملکولی این باکتری بپردازیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه بر اساس مطالعات گذشته(۵،۴)، 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 (تصویرشماره ۱). جدایه‌های روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از ۲۴–۱۸ 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

دستورالعمل کیت استخراج DNA (سیناکلون) (Cat No. PR881613)، میکروتیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه درسانتریفیوژ با ۷۵۰۰g قرار دادیم، مایع‌رویی را کاملاً از رسوب باکتری دور ریخته و به هر کدام از میکروتیوب‌ها، 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 محیط‌های بیوشیمیایی

بررسی کمی DNA ژنومیک: در روش ژل الکتروفورز، مقدار ۵µl 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 ۲ml 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 نمونه‌ها 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 DNA الگو به مقدار ۲ میکرولیتر اضافه گردید. ترکیب مواد لازم در قالب یک واکنش ۲۵ میکرولیتری برای هر نمونه طبق جدول شماره ۱ می‌باشد:

جدول شماره ۱: مقدار و غلظت اجزای واکنش

اجزای واکنش	غلظت محلول ذخیره	مقدار مورد نیاز برای حجم کل ۲۵ µl
Steriled ddH_2O	-	۱۳ µl
PCR buffer	۱۰ X	۲/۵ µl
$MgCl_2$	۵۰mM	۱/۵ µl
dNTP	۱۰ mM	۰/۵ µl
Primer	۱۰ µl	۵ µl
Taq polymerase	۵ U/µl	۰/۵ µl
DNA	-	۲ µl

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 می‌کند و در نتیجه امکان آلودگی، کم‌تر خواهد بود. برای تهیه مخلوط اصلی، حجم کل آن با در نظر گرفتن تعداد نمونه‌ها به علاوه یک واکنش بیش‌تر (جهت تأمین مقادیر اتلاف شده در هنگام توزیع)، محاسبه شد. پس از اضافه کردن هر یک از مواد واکنش، آن‌ها را ورتکس کرده تا کاملاً مخلوط شوند که این حجم نهایی، مخلوط اصلی را تشکیل می‌دهد. برای هر نمونه، یک میکروتیوپ ۰/۲ میکرولیتری در نظر گرفته شد و به میزان ۲۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی به آن‌ها اضافه گردید. سپس ۲ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده طبق شماره مربوط به هر نمونه، به ویال‌ها اضافه شد. این ویال‌های آماده جهت انجام واکنش PCR، به دستگاه ترموسایکلر مدل Ependorf 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 توالی‌تصادفی دارند(جدول شماره۳) که به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت سیناکلون- ایران خریداری شدند.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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

نام مرحله	دما (^{0}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 مورداستفاده در واکنش RAPD

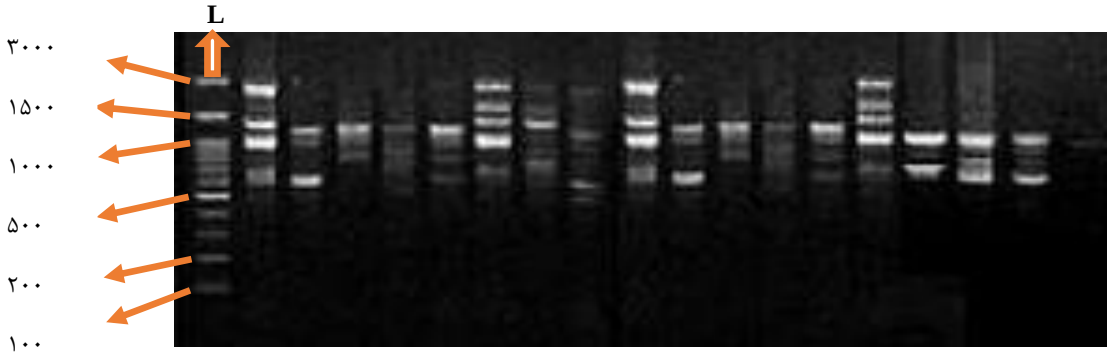
شماره	ترادف
۱	5'-AAGAGCCCGT-3'
۲	5'-CCGCAGCCAA-3'
۵	5'-GTGGATGCGA-3'
۶	5'-CAATGCGTCT-3'
۷	5'-AGAAGCGATG-3'
۸	5'-TGCCGAGCTC-3'
۹	5'-GTGATCGCAG-3'
۱۰	5'-CCGAATTCCC-3'

روش انجام الکتروفورز: ۵ میکرولیتر از امپلیکون با یک میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و محلول حاصل داخل چاهک‌ها بارگذاری شدند. در چاهک اول DNA Marker و بقیه چاهک‌ها سایر نمونه‌ها اضافه گردید. درب تانک را بسته و به منبع جریان برق وصل گردید. ولتاژ مورد استفاده برای الکتروفورز با توجه به فاصله بین دو الکترود تعیین می‌شود. بهترین شرایط بین ۱ تا ۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر فاصله بین الکترودها می‌باشد. پس از زمان معین (معمولاً حدود ۳۰ دقیقه)، دستگاه تأمین جریان برق خاموش و ژل خارج گردید.

وارد کردن داده‌ها: 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 می‌شود، سپس از باندها عکس گرفته شد (تصویر شماره ۲) و با محاسبات چشمی و نیز نرم‌افزار Band Leader 3، اندازه باندها با توجه به اندازه باندهای مارکر DNA محاسبه شده در نرم‌افزار 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 باندی 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 پلی‌مورف می‌باشند که بزرگ‌ترین باند تولیدی، توسط پرایمر یک به میزان Kb ۷/۳ بود. کوچک‌ترین الگوی باندی با ۸۰bp به پرایمرهای ۷ و ۸ اختصاص داشت. تعداد باندهایی که ویژه تنها یک نوع پرایمر بوده و در سایر پرایمرها این الگوی باندی ظاهر نشده، ۲۲ باند می‌باشد. تعداد باند مشترک که در همه پرایمرها حضور دارد، ۱۰ باند می‌باشد که در الگوی RAPD مشخص می‌باشند. در تحقیق حاضر با استفاده از برنامه‌های NTSYSpc و MVSP 3.2، دندروگرام‌ها و رسته‌بندی دو بعدی و سه بعدی باندها (و نمودار شماره ۱ و ۲) به دست آمد.

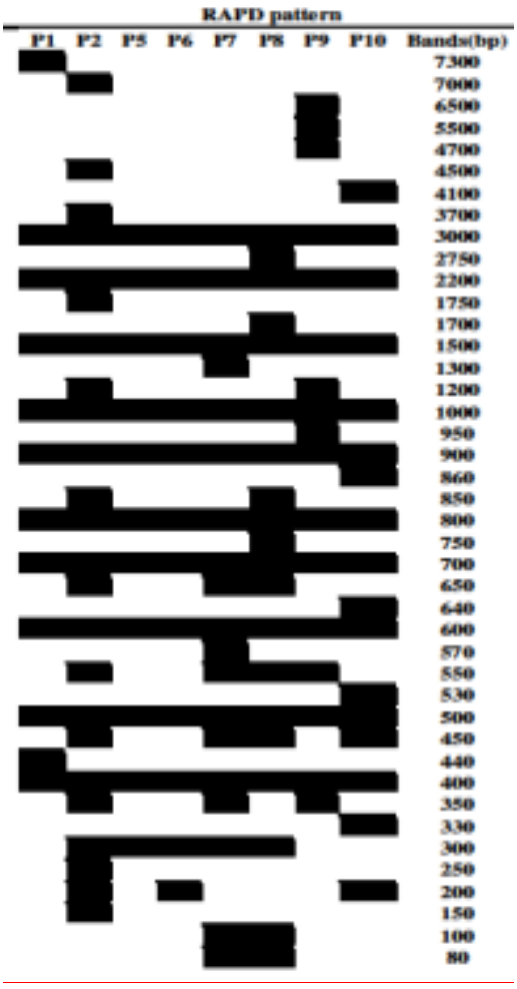


تصویر شماره ۲: نمونه ژل الکتروفورز محصول PCR (امپلیکون های) حاصل از تکثیر با کمک پرایمر شماره ۱۰

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

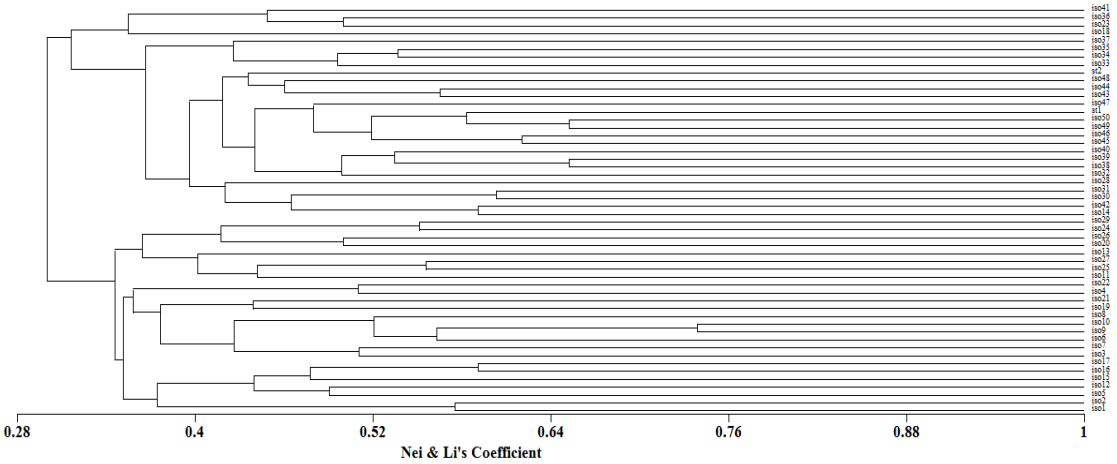
با توجه به نمودار دندروگرام، UPGMA دو خوشه اصلی تشکیل شده است که در خوشه بالایی ($St._1$) و ($St._2$) قرار گرفته اند و نزدیک ترین ایزوله‌ها به هم دو ایزوله ۹ و ۱۰ هستند که در یک خوشه قرار گرفته و با فلش مشخص شده است.

براساس الگوی PCoA، در حالات دو بعدی و سه بعدی با ضرایب مختلف شاهد قرابت ژنتیکی سویه‌های استاندارد $St._1$ و $St._2$ با ایزوله‌های ۲۸، ۳۲، ۳۳، ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۴، ۳۹، ۴۹، ۵۰، ۴۱، ۴۳، ۳۷، ۳۴، ۳۶، ۴۰ و ۴۸ می‌باشیم و در سوی دیگر رسته‌بندی، شاهد قرابت ژنتیکی سایر ایزوله‌ها با یکدیگر می‌باشیم که بیانگر آن است که احتمالاً ایزوله‌های مورد مطالعه از سایر گروه‌های باکتری اشریشیاکلی به جز EPEC($St._1$) و EHEC($St._2$) می‌باشند. هم‌چنین داده‌های الگوی PCoA مؤید نتایج خوشه بندی با روش UPGMA مجموع ۸ پرایمر می‌باشد. نمونه‌های ۴۷، ۴۸، ۵۰ و ۳۳ در الگوی دندروگرام در نزدیکی نمونه استاندارد $St._1$ و $St._2$ قرار گرفته است که می‌توان گفت احتمالاً خویشاوندی بیش‌تری بین این نمونه‌ها و EPEC و EHEC وجود دارد.



تصویر شماره ۳: الگوی RAPD باندهای تولیدی توسط ۵۰ ایزوله و نمونه های استاندارد $st._1$ و $st._2$ با استفاده از هشت پرایمر تصادفی

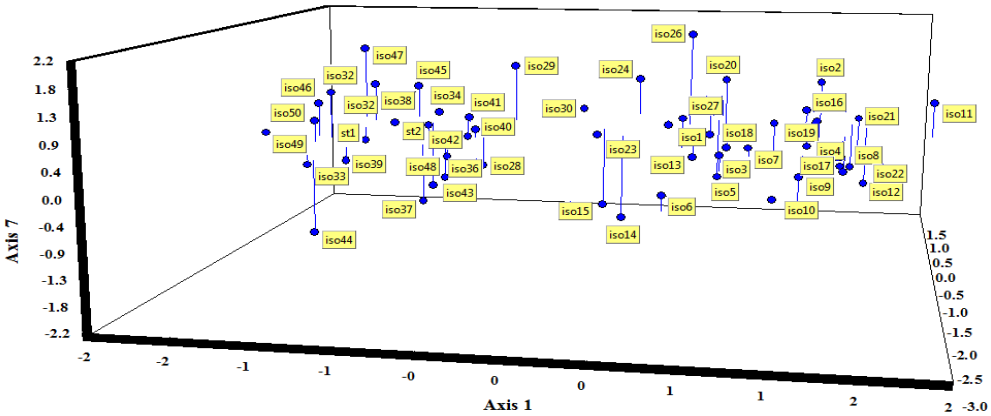
دندروگرام با روش UPGMA و ضریب Nei & Li با استفاده از برنامه MVSP ver. 3.1



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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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 عفونت‌های تنفسی، شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان می‌باشد. عفونت دستگاه ادراری یک عفونت مجرای ادراری، مثانه و یا کلیه‌ها می‌باشد که ساختارهای اصلی دستگاه ادراری هستند(۷). این عفونت اغلب عفونت بالارونده می‌باشد، به طوری که پیشابراه را آلوده می‌کند و سپس به سمت مثانه حرکت می‌کند و ایجاد التهاب مثانه می‌کند که به آن سیستیت می‌گویند. در برخی موارد، عفونت باعث پیلونفریت می‌شود 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 می‌شود؛ اما در زنان نسبت به مردان بیماری شایع‌تر است. هم‌چنین در مردان بعد از سن ۵۰ سالگی، در بیماران گیرنده کلیه و در افراد دارای ناهنجاری‌های ساختاری یا فیزیولوژیک دستگاه ادراری، شیوع بیش‌تری دارد. برخی از خانم‌ها ممکن است به‌ندرت 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 می‌شوند. در کودکان هم احتمال این عفونت وجود دارد. دختران به خصوص بین سنین ۴ تا ۸ سال احتمال عفونت بیش‌تری نسبت به پسران دارند، به‌طوری که ۳ تا ۵ درصد دختران و ۱ درصد پسرها به این عفونت مبتلا می‌شوند(۹). شایع‌ترین باکتری‌های عامل عفونت مجاری ادراری استافیلوکوک‌ها، کلبسیلا، سودوموناس، انتروباکتر، سیتروباکتر، پروتئوس و اشریشیاکلی می‌باشند. حدود ۸۰ تا ۸۵ درصد عفونت دستگاه ادراری توسط اشریشیاکلی ایجاد می‌شود(۱۰). مطالعات اپیدمیوژیکی که انجام می‌شود، می‌تواند بر اساس خصوصیات فنوتیپی یا ژنوتیپی باکتری اشریشیاکلی باشد. خصوصیات فنوتیپی (بیوشیمایی و آنتی ژن)، می‌توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش‌های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، لذا استفاده از آزمون‌های فنوتیپی، گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می‌شود. ردیابی اشریشیاکلی، در نمونه های بالینی با روش‌های استاندارد فنوتیپی نیز کاری مشکل و وقت گیر می‌باشد. از طرفی روش‌های فنوتیپی حساسیت و قدرت تشخیص و افتراق لازم برای مطالعات اپیدمیولوژیک را ندارند. بنابراین در سال‌های اخیر روش‌های تشخیصی زود بازده بر پایه ژنوتیپ باکتری که بسیار دقیق و حساس بوده و نسبت به روش‌های فنوتیپی کم‌تر تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرند، رواج یافته است(۱۱). روش‌های ملکولی، قدرت تشخیص و تکرارپذیری بالاتری نسبت به تست‌های فنوتیپی دارند و این پیشرفت به دلیل توانایی آن‌ها در تعیین تفاوت‌های ژنومی کوچک و ثبات ملکولی بالا در مقایسه با

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

پروفایل‌های فنوتیپی برای همان گونه های 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 16SrRNA 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 اشریشیاکلی، برای تخمین رابطه Clonal ایزوله‌ها، به منظور ارزیابی منبع عفونت و مسیر انتقال این پاتوژن و پیشگیری های 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 (۸-۱۲mers) و توالی تصادفی دارند(۱۴،۱۳). از دیگر مزایای این روش، عدم نیاز به دانش اختصاصی قبلی در مورد توالی DNA ارگانیسم 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 سویه‌ای 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، ۰ تکنیک RAPD-PCR برای ایزوله‌های اشریشیا اکلای 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 می شود. 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 بزرگ ترین باند تولیدی ۱/۰۷۸Kb و کوچک ترین باند ۲۸۰bp گزارش شد و ۱۷ الگوی باندی به دست آمد(۲). در سال ۲۰۰۸ Lobos و Padilla ۴۶ نمونه جدا شده از عفونت‌های ادراری، سپتی 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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، ۲۴-۱۹ باند با وزن ملکولی ۳۰۰۰-۵۰۰bp به دست آوردند(۱۷). Ejrnaes و همکاران نیز با مطالعه‌ای بر روی ۱۵۶ سویه اشریشیا کلی عامل عفونت ادراری، ۱۵-۱۰ باند با وزن ملکولی ۵۰bp تا ۱/۲Kb به دست آوردند(۱). در سال ۲۰۰۹، Kilic و همکاران، ۴۸ سویه اشریشیاکلی جدا شده از مرغ‌های خانگی را با تکنیک RAPD-PCR مورد آزمایش قرار دادند. نتایج، ۹ الگوی باندی متفاوت را نشان داد که حاکی از هتروژنیسیتی بزرگی در بین سویه‌های اشریشیاکلی 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، هم چنان که گفته شد، با نتایج تحقیق حاضر همخوانی قابل قبولی دارد. هدف بعدی می‌تواند یافتن چگونگی و چرایی این ارتباط بین نمونه‌ها و نمونه استاندارد $St._1$ و $St._2$ باشد. برای این منظور می توان از PCR ژن‌های اختصاصی دو سویه استاندارد و پنجاه ایزوله مورد بررسی استفاده کرد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باتوجه به نتایج تحقیق، انگشت نگاری 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 موفقیت‌آمیزی، در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، ویروس‌ها و انواعی از گونه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

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

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, Elsawy 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 sciecces 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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, Fırat 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. Eftekhar 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: Amer 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.