گزارش کوتاه
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، مهر ۱۳۹۷، ۶۸۸-۶۸۱

بررسی فراوانی ژن‌های Necrotizing factor type 1 و Hemolysin در بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از بیماران بیمارستان روحانی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۶: یک گزارش کوتاه

امیرحسین شعبانی[۱]، اکرم امینی[۲]، امیرمرتضی ابراهیم‌زاده نامور[۳]

دریافت مقاله: ۹۷/۶/۱۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۶/۲۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۷/۲ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۴

چکیده

زمینه و هدف: در حال حاضر *اشریشیاکلی* به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های باکتریایی مجاری ادراری در نظر گرفته می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، تعیین فراوانی ژن‌های Necrotizing factor type 1; CNF1 و Hemolysin; Hly در بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از بیماران بیمارستان روحانی شهرستان بابل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، ۸۲ سویه *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تست آنتی‌بیوگرام انجام و DNA باکتری استخراج و فراوانی ژن‌های CNF1 و Hly به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به اریترومایسین (۷۱/۹ درصد) ۵۹ و ایمی‌پنم (۰ درصد) بود. هم‌چنین درصد سویه‌های مقاوم به چند دارو ۳۱/۷ درصد و فراوانی ژن‌های CNF1 و Hly به ترتیب ۲۸ درصد و ۳۲/۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، فراوانی ژن‌های CNF1 و Hly در بین سویه‌های مورد مطالعه، مشابه با مطالعات دیگر بود.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، عفونت ادراری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

اشریشیاکلی یکی از مهم‌ترین علل عفونت‌های مجاری ادراری محسوب می‌شود [۱]. علاوه بر التهاب مثانه و پیلونفریت می‌توان به طیف وسیعی از دیگر عفونت‌ها از قبیل پنومونی، استئومیلیت، سپسیس و عفونت‌های بیمارستانی نیز اشاره نمود. اتصال باکتری به گیرنده‌های اپیتلیال اولین و مهم‌ترین مرحله در کلونیزاسیون این ارگانیسم محسوب می‌گردد، لذا فاکتورهای بیماری‌زای دخیل در چسبندگی در ایجاد این نوع از عفونت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند [۲].

۱- دانشجوی پزشکی،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
تلفن: ۳۲۱۹۹۵۹۲-۰۱۱، دورنگار: ۳۲۱۹۹۹۳۶-۰۱۱، پست الکترونیکی: amirmortezanamvar@gmail.com

علاوه بر فاکتورهای چسبندگی، توکسین‌ها نیز از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی محسوب می‌شوند که می‌توان به CNF1 (Cytotoxic necrotizing factor type 1) و Hly (Hemolysin) اشاره نمود. فاکتور CNF1 یک توکسین ۱۱۵ کیلو دالتونی از نوع AB توکسین‌ها است که توانایی کاتالیز جایگاه فعال گلوتامین از خانواده Rho از GTPase را دارد [۳]. اکثر سویه‌های اشریشیاکلی حاوی ژن Cnf1 با پتانسیل تولید فاکتور سایتوتوکسیک نکروزان فاکتور نوع یک باعث فعالیت مداوم Rho GTPases، RhoA، Rac1 و Cdc42 خواهند شد، از این رو سویه‌های مذکور در ایجاد عفونت‌های ادراری پایدار، التهاب حاد پروستات و افزایش سطح پلی مورفونوکلئرها سهم به‌سزایی را خواهند داشت [۴].

توکسین Hly یک پروتئین حساس به پروتئین بوده که عملکرد آن ایجاد منافذ متعدد در غشاء سلول‌های مختلف سلول‌های پستانداران به خصوص اریتروسیت‌ها است [۵]. سویه‌های حامل ژن‌های مذکور در ایجاد التهاب‌های مجاری ادراری نقش مهمی را ایفاء می‌کنند، به طوری‌که التهاب مثانه از مهم‌ترین علائم بالینی این سویه‌ها می‌باشد [۶]. توکسین حاصل از این ژن در تخریب سلول‌های مخاطی، کاهش اثر دهی سلول‌های ایمنی، القاء آپوپتوز لنفوسیت‌های T، نوتروفیل‌ها و سلول‌های کلیوی و افزایش دسترسی به مواد مغذی میزبان نقش قابل توجهی را ایفاء می‌کند [۷].

از آن جایی‌که اهمیت ژن‌های CNF1 و Hly به وضوح دیده می‌شود لذا هدف از انجام این طرح تعیین فراوانی ژن‌های CNF1 و Hly در بین سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بیمارستان روحانی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۶ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، طی مدت شش ماه (خرداد ماه ۱۳۹۶ الی آبان ۱۳۹۶) با مراجعه به آزمایشگاه بیمارستان آیت الله روحانی شهر بابل سویه‌های اشریشیاکلی جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ارسال گردید. هم‌چنین این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی بابل به شماره MUBABOL.HRI.REC.1395.248 می‌باشد. سویه‌ها ابتدا بر روی محیط مک گانکی آگار (مرک، آلمان) کشت و سپس به کمک تست‌هایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم تست اندول، کشت در محیط Triple Sugar Iron (مرک، آلمان)، سیمون سیترات (مرک، آلمان)، تست حرکت (مرک، آلمان) و تست اوره (مرک، آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه سویه‌ها در محیط Brain Heart Infusion حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند [۱].

تست مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپرو فلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) و تریمتوپریم-سولفامتاکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵

میکروگرم)، (Himedia-India) طبق معیارهای موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی انجام گردید [۸].

در ادامه DNA باکتری با استفاده از کیت تجاری (یکتا تجهیز، ایران) بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (جدول ۱).

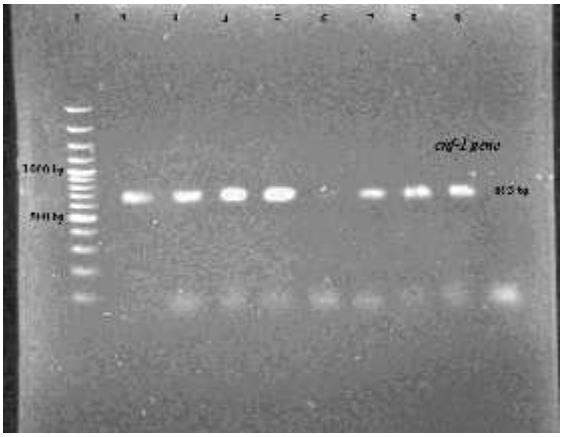
جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت بررسی ژن‌های CNF1 و Hly در ایزوله‌های‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بیمارستان روحانی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۶

ژن	پرایمر	سایز (bp)	منبع
CNF1	′۳′- TTATATAGTCGTCAAGATGGA-۵F: ′۳′- CACTAAGCTTTACAATATTGA-۵R:	۶۹۳	[۹]
Hly	′۳′- AGATTCTTGGGCATGTATCCT-۵F: ′۳′- TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT-۵R:	۵۶۵	[۹]

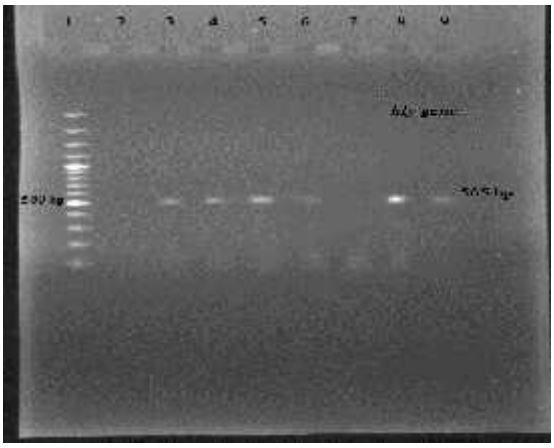
حجم نهایی برای هر یک از واکنش‌ها ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای annealing جهت تکثیر ژن CNF1 و Hly به ترتیب در دمای ۵۷ و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و مرحله extension در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام و پس از اتمام واکنش، محصول واکنش با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از دستگاه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

از مجموع ۸۲ سویه *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از آزمایشگاه بیمارستان آیت الله روحانی شهر بابل، ۴۲/۶ درصد و ۵۷/۴ درصد سویه‌ها به ترتیب از جنس مذکر و مونث ایزوله گردید. در روش دیسک دیفیوژن آگار مقاومت به اریترومایسین (۷۱/۹ درصد) ۵۹، جنتامایسین (۵۱/۲ درصد) ۴۲، سیپروفلوکساسین (۵۴/۸ درصد) ۴۵، اوفلوکساسین (۳۰/۴ درصد) ۲۵، نیتروفورانتوئین (۹/۷ درصد) ۸، توبرامایسین (۳۲/۹ درصد) ۲۷، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۶۹/۵ درصد) ۵۷، لووفلوکساسین (۱۳/۴ درصد) ۱۱ و ایمی‌پنم (۰ درصد) گزارش شد. در بین ایزوله‌های مورد مطالعه فراوانی سویه‌های مقاوم به چند دارو ۳۱/۷ درصد درصد به دست آمد. هم‌چنین فراوانی ژن‌های CNF1 و Hly در روش مولکولی به ترتیب ۲۸ درصد و ۳۲/۹ درصد تعیین گردید. تصاویر مربوط به PCR ژن‌های CNF1 و Hly در شکل ۱ و ۲ آورده شده است.



شکل ۱- PCR مربوط به ژن CNF1 در بین ایزوله‌های اشریشیا- کلی جدا شده از بیمارستان روحانی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۶
شماره ۱- 100 bp DNA size marker، شماره ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ سویه‌های دارای ژن CNF1



شکل ۲- PCR مربوط به ژن Hly در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیمارستان روحانی شهرستان بابل در سال ۱۳۹۶
شماره ۱: 100 bp DNA size marker، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹ سویه‌های دارای ژن Hly

بحث

از آن جایی‌که وجود فاکتورهای متعدد در ظهور سویه‌های دارای پتانسیل بالای بیماری‌زایی بسیار مشهود است، لذا ارزیابی ژنتیکی و بررسی میزان مقاومت چنین سویه‌هایی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد [۱۰]. انتشار این سویه‌ها در مراکز درمانی می‌تواند منجر به اپیدمی‌گردد [۱۰]، بنابراین تشخیص سریع و کنترل این موارد از مهم‌ترین استراتژی‌های درمانی محسوب می‌گردد. در مطالعه حاضر بیشترین میزان مقاومت به اریترومایسین و تری متوپریم-سولفامتوکسازول اختصاص یافت، در حالی که درصد حساسیت به نیتروفورانتوئین و ایمی‌پنم قابل توجه بود، اما با این وجود شیوع سویه‌های مقاوم به چند دارو زنگ خطر مهمی‌محسوب می‌شود، زیرا در مطالعات مشابه نتایج متفاوتی دیده می‌شود که ممکن است ناشی از سیاست‌های درمانی مختلف، انتشار سویه‌ها و یا رعایت اصول بهداشتی در مراکز مختلف درمانی باشد. در مطالعه حاضر درصد فراوانی ژن CNF1 ۲۸ درصد و فراوانی ژن Hly ۳۲/۹ درصد گزارش گردید. این درحالی است که در مطالعه Tarchouna و همکاران در تونس میزان فراوانی ژن Hly و CNF1 به ترتیب ۱۹ و ۳ درصد اعلام شد [۱۱]. در مطالعه Asadi و همکاران که در شیراز صورت گرفت، فراوانی ژن Hly ۲۳/۳ درصد گزارش گردید [۱۲]. از طرفی Galane و همکارش در آفریقای جنوبی فراوانی ژن CNF1 را ۲/۲ درصد گزارش کردند [۱۳]. در مطالعه Farshad و همکاران فراوانی ژن Hly و CNF1 به ترتیب ۱۳/۵ درصد و ۲۲/۹ درصد ارزیابی شد [۱۴].

مطالعه Marini و همکارانش نشان داد که سویه‌های حاوی ژن‌های CNF1 و Hly توانایی بالقوه‌ای در ایجاد عوارض سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های Hela دارند [۱۵]. با توجه به تحقیقات انجام شده اولین مرحله برای بیماری‌زایی اتصال باکتری به دیواره سلول‌های سنگفرشی مجاری ادراری می‌باشد که فیمبریه و فاکتورهای اتصالی نقش کلیدی را بر عهده دارند. همچنین ارتباط مستقیمی بین پیلونفریت، عفونت‌های پیچیده ادراری و حضور

ژن‌های کد کننده فاکتورهای چسبندگی گزارش گردیده، لذا تشخیص سریع ایزوله‌های مذکور می‌تواند در درمان این سویه‌ها سهم به‌سزایی داشته باشد [۱۵].

تفاوت در فراوانی ژن‌های بیماری‌زا و هم‌چنین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعات مختلف ممکن است به علت تعداد سویه‌های مورد مطالعه و هم‌چنین پراکندگی سویه‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی باشد، لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی تعداد سویه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مطالعه اخیر نشان داد فراوانی ژن‌های Hly و CNF1 در بین ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران دچار عفونت ادراری به ترتیب ۳۲/۹ درصد و ۲۸ درصد می‌باشدکه تا حدودی با مقالات مشابه هم‌خوانی دارد. از طرفی ظهور سویه‌های مقاوم به چند داروی اشریشیاکلی بیماری‌زای دستگاه ادراری نیز می‌تواند تهدیدی جدی در درمان این نوع از سویه‌ها محسوب شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح دانشجویی است، لذا نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند که از معاونت محترم پژوهشی و هم‌چنین پرسنل آزمایشگاه بیمارستان‌های آیت الله روحانی و جناب آقای باقری جهت همکاری‌های انجام گرفته تشکر و قدردانی نمایند.

References

[1] Shabani AH, Amini A, Ebrahimzadeh Namvar A. The frequency of *pap* and *sfa* genes among *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients of Rouhani hospital in babol, Iran. *JBUMS* 2018; 20(3): 64-8.

[2] Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. *Microbiology Spectrum* 2015; 3(4): UTI-0015-2012.

[3] Lerm M, G Schmidt, Aktories K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 188(1): 1-6.

[4] Davis JM, Rasmussen SB, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates

polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* 2005; 73(9): 5301-10.

[5] Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM, O'Brien AD. Hemolysin of Uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun* 2008; 76(7): 2978-90.

[6] Real JM, Munro P, Buisson-Touati C, Lemichez E, P Boquet, Landraud L. Specificity of immunomodulator secretion in urinary samples in response to infection by alpha-hemolysin and CNF1 bearing uropathogenic *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007; 37(1): 22-5.

[7] Los FC, Randis TM, Aroian RV, Ratner AJ. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77(2):173–207.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement CLSI document M100-18 Wayne, 2016.

[9] Mladin C, Usein C, Chifiriuc M, Palade A, Slavu C, Negut M, Damian M. Genetic analysis of virulence and pathogenicity features of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patietns with neurogenic bladder. *Rom Biotechnol Lett* 2009; 14(6): 4900-5.

[10] Terlizzi Maria E., Gribaudo G, Maffei Massimo E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol* 2017; 15(8): 1566.

[11] Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of Uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis* 2013; 17(6): e450–3.

[12] Asadi I, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, GhorbaniDalini S. The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* with Antibiotic Resistance. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(5): e9936.

[13] Galane P, Le Roux M. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Isolated from Young South African Children with Diarrhoeal

Diseases. *J Health* Popul *Nutr* 2001; 19(1): 31-8.

[14] Farshad S, Emamghorashi F. The Prevalence of Virulence Genes of *E. coli* Strains Isolated from Children with Urinary Tract Infection. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20(4): 613-7.

[15] Marini RP, Taylor NS, Liang AY, Knox KA, Peña JA, Schauer DB, Fox JG. Characterization of hemolytic *Escherichia coli* strains in ferrets: recognition of candidate virulence factor CNF1. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5904-8.

Frequency of Necrotizing Factor Type 1 and Hemolysin Genes Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospitalized Patients of Rouhani Hospital in Babol, IRAN in 2017: A Short Report

A. Shabani[1], A. Amini[2], A. Ebrahimzadeh Namvar[3]

Received: 08/09/2018 Sent for Revision: 18/09/2018 Received Revised Manuscript: 24/09/2018 Accepted: 26/09/2018

Background and Objectives: Currently, *Escherichia coli* is considered as one of the main causes of bacterial urinary tract infections. The aim of this study was evaluating the frequency of necrotizing factor type 1 **(**CNF1) and hemolysin (Hly) genes among *E. coli* strains isolated from hospitalized patients of Rouhani Hospital in Babol city.

Materials and Methods: In this descriptive study, a total of 82 *E. coli* strains were evaluated. Thereafter, antibiogram test was performed and DNA of the bacteria was extracted and the frequency of CNF1 and Hly genes was determined by the help of polymerase chain reaction.

Results: With antibiotic susceptibility testing, resistance to Erythromycin and Imipenem was reported 59 (71.9%) and 0%, respectively. Also, the percentage of multi drug resistant strains was 31.7%. The frequency of CNF1 and Hly genes was reported as 28% and 32.9%, respectively.

Conclusion: According to the results, the frequency of CNF1 and Hly genes among the studied strains was similar to some related studies.

Key words: *Escherichia coli*, Urinary tract infections, Polymerase chain reaction

Funding: This study was funded by a grant (no. 3870) from the Research Council of Babol University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Babol University of Medical Sciences approved the study (MUBABOL.HRI.REC.1395.248).

How to cite this article: Shabani A, Amini A, Ebrahimzadeh Namvar A. Frequency of Necrotizing Factor Type 1 and Hemolysin Genes Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospitalized Patients of Rouhani Hospital in Babol, IRAN in 2017: A Short Report. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (7): 681-8. [Farsi]

1- Student of Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, ORCID: 0000-0002-0979-6063
2- MSc of Medical Microbiology, Dept. of Microbiology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran ORCID: 0000-0003-4130-2008
3- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, ORCID: 0000-0003-2654-9643
(Corresponding Author) Tel: (011) 32199592, Fax: (011) 3219993, E-mail: amirmorteza.namvar@gmail.com