**مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی**
دوره ۲۱، شماره ۳، پاییز ۹۰، صفحات ۱۸۳ تا ۱۸۷

**Original Article**

# شناسایی ژن‌های پلازمیدی aatA , aggR , aap در میان عفونت‌های اشریشیا کلی دستگاه ادراری در آزمایشگاه‌های غرب تهران

**ندا مریخی[۱]، علی ناظمی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]،شهرآشوب شریفی[۴] ، محمد اسکندری[۴]**

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، کارشناس ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
[۲] استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
[۳] استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] کارشناس ژنتیک، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

## چکیده

**سابقه و هدف:** *عفونت ادراری با اشریشیاکولی یکی از عفونتهای باکتریایی بسیار شایع می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی توزیع سه ژن بیماری‌زای aggR ، aap و aatA و پیوستگی آن با ژن stbA در عفونت‌های (Uropathogenic Echerichia coli) UPEC بود.*

**روش بررسی:** *۲۴۴ نمونه E.coli از افراد مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه‌های بالینی غرب تهران در سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید. جداسازی باکتری E.coli بر اساس روشهای آزمایشگاهی استاندارد انجام گرفت. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، حضور ژن‌های بیماری‌زای aap ، aggR ، aatA و stbA به روش PCR بررسی گردید.*

**یافته‌ها:** *از میان ۲۴۴ نمونه UPEC، ۱۰۴ نمونه فاقد این سه ژن بیماری‌زا بودند، درحالی که در ۱۴ نمونه ژن stbA مشاهده گردید. به علاوه، از میان ۱۴۰ نمونه UPEC دارای ژن بیماری‌زا، ۹۴ نمونه (۴۶/۶ درصد) ژن aap، ۵۲ نمونه (۲۳ درصد)ژن aggR و ۸۰ نمونه (۳۵/۴ درصد) ژن aatA را به تنهایی یا همراه با یکدیگر حمل می‌کردند. همچنین حضور ژن stbA در ۱۴۰ نمونه حاوی ژن یا ژن‌های بیماری‌زا پایدار نبوده و تنها در ۴۴ نمونه مشاهده گردید.*

**نتیجه‌گیری:** *نتایج ما نشان می‌دهد الگوی ابراز ژن‌های بیماری‌زای پلازمیدی aggR، aap و aatA در E.coli در قسمت‌های بالینی مختلف تغییر می‌نماید. این سه ژن بیماری زا از مکان اصلی روی پلازمید خارج شده و در مکان دیگری قرار گرفته است. به هرحال این مطالعه نشان می‌دهد که هر سه ژن aap , aggR و aatA تنها به سویه‌های EAEC محدود نمی‌شود.*

**واژگان کلیدی:** *عفونت‌های دستگاه ادراری، Uropathogenic Echerichia coli ، پلازمید pAA.*

## مقدمه

سندرم عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در کلیه گروه‌های سنی می‌باشد. بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف جهان نشان داده که اغلب علت UTI، باکتری‌های روده‌ای (خانواده انتروباکتریاسه) بوده که در بین آنها اشرشیاکلی شایع‌ترین می‌باشد (۵-۱). در این عفونت‌ها، باکتری‌های مدفوعی در ابتدای مجرای ادراری مجتمع شده و سپس از طریق این مجرا به قسمت‌های فوقانی‌تر سیستم ادراری همچون مثانه و کلیه نفوذ کرده و عفونت ایجاد می‌نماید. با توجه به منشاء روده‌ای این باکتری‌ها و تغییر مکان آنها به خارج از دستگاه گوارش ممکن است با توجه به تغییر شرایط و انتقال افقی، تفاوت‌های ژنتیکی را درمیان سویه‌های باکتری *E.coli* ایجاد نماید (۵،۶). یکی از سویه‌های بیماریزای *E.coli* در دستگاه گوارش (EAEC) Enteroaggregative

**آدرس نویسنده مسئول:** تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دکتر علی ناظمی
(**email**: a_nazemi@tonekaboniau.ac.ir)

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۸۹/۶/۱۷
**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۸۹/۱۲/۲۴

**جدول ۱**- مشخصات پرایمرها

| ژن | توالی پرایمر( از 5َ به ۳َ ) | طول قطعه تکثیر شده(bp) | غلظت بر حسب پیکومول |
|---|---|---|---|
| *aap* | F CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG | ۳۱۰ | ۱۰ |
| | R AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC | | |
| *aggR* | F CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA | ۴۵۷ | ۱۵ |
| | R AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG | | |
| *aatA* | F CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT | ۶۲۹ | ۲۰ |
| | R CAATGT ATA GAA ATC CGC TGT T | | |
| *StbA* | F CAAACCTGGCTATTGCTC | ۲۰۰ | ۱۰ |
| | R ATCCACTATTACATCATCGAAC | | |

F: forward ،R: reverse

*E.coli* می‌باشد که منجر به اسهال شدید و پایدار می‌گردد (۷). اکثر ژن‌های بیماری‌زای EAEC همچون ژن‌های فیمبریا، انتروتوکسین، *aggR*، *aap* و *aatA* بر روی پلاسمید ۵۵۹۸۹ جفت بازی (pAA) قرار گرفته‌اند. میزان حضور این پلازمید در باکتری‌های EAEC بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد. ژن *aap* پروتئین anti-aggregation را تولید می‌نماید که یک کپسول پرتئینی را در سطح باکتری تشکیل می‌دهد و منجر به پراکنده سازی باکتری می‌گردد. ژن *aatA* یک پروتئین غشایی را تولید می‌نماید که بخشی از سیستم انتقال دهنده -*aat* PABCE می‌باشد که در جابجایی پروتئین‌های بیماری‌زا از جمله *aap* ضروری است. ژن *aggR* یک فعال کننده رونویسی برای چندین ژن بیماری‌زا را تولید می‌نماید (۱۰-۸). با توجه به حضور ترانسپوزون‌های زیاد بر روی این پلاسمید حضور این ژن‌ها رابطه مستقیمی با حضور پلاسمید ندارد. درعوض ژن *stbA* (Stable plasmid inheritance protein A) یکی دیگر از ژن‌های واقع بر پلاسمید pAA می‌باشد که نقشی در بیماری زایی ندارد (۸). محصول این ژن پروتئینی است که برای توارث پلاسمیدهای با تعداد نسخه‌های اندک در سلول‌های دختری ضروری است. بنابراین حفظ این ژن در انتقال پلاسمید به سلول‌های دختری لازم است و در نتیجه این گونه می‌توان استدلال نمود که حضور آن رابطه مستقیم با حضور پلازمید دارد. در اینجا ما توزیع این سه ژن بیماری‌زا و پیوستگی آنها را با پلازمید pAA در عفونت‌های UPEC بررسی می‌نماییم.

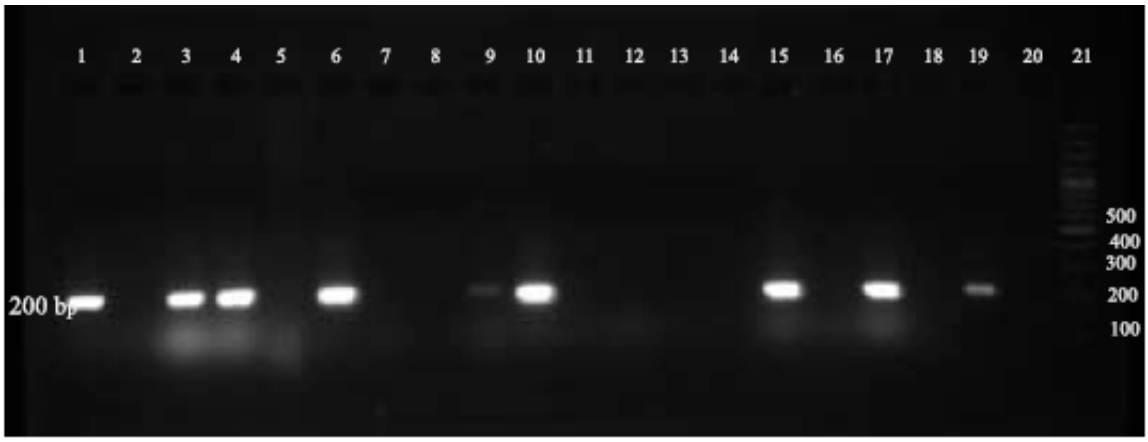
در این مطالعه، حضور این چهار ژن از طریق تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روشها

۲۴۴ نمونه Uropathogenic *Echerichia coli* در طی یک سال (۱۳۸۷-۱۳۸۸) پس از کشت در محیط EMB و آگارخوندار از نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری با شمارش کلونی (CFU) 100000< در هر میلی‌لیتر (بالاترین حد عفونت) جمع‌آوری شد. سپس سویه‌های *E.coli* جداشده و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی IMVIC و کیت تجاری API (Rapid 20E,Biomerieux,USA) (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) تائید شد.

در مرحله بعدی، DNA تام با استفاده از روش Boiling از باکتری‌ها استخراج گردید. جهت تکثیر سه ژن بیماری‌زای *aggR*، *aap* و *aatA* از پرایمرهای به کار گرفته شده توسط Cerna و همکارانش در Multiplex-PCR استفاده شد (۸). تکثیر ژن *stbA* با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به کمک نرم‌افزار Gene Runner ( GenBank accession no. CU928159) به طور مجزا اجرا گردید (جدول ۱).

واکنش Multiplex-PCR درحجم ۵۰ میکرولیترشامل ۲ واحد آنزیم Taq، ۱ میلی‌مولار بافر آنزیم (۵۰ میلی‌مولار کلریدپتاسیم، ۱۰ میلی‌مولار تریس (pH=8.3)، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۸ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول هر یک از سه جفت پرایمر و ۲۰۰ نانوگرم DNA انجام شد. تکثیر با

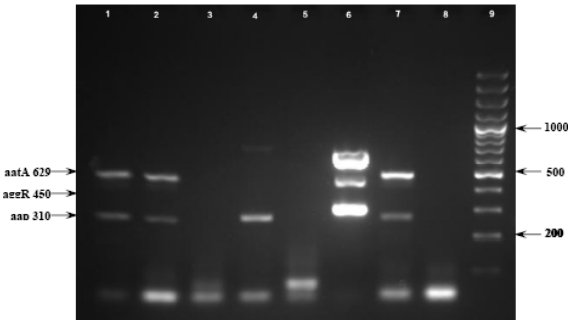



**شکل ۲**- نتیجه تکثیر ژن *stbA* در نمونه‌های UPEC بر روی ژل آگاروز ۲٪. خطوط ۱-۱۹ محصول PCR برخی از نمونه ها، خط ۲۰ کنترل منفی و خط ۲۱ نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی.

دستگاه ترموسیکلر (Eppendorf, Germany) طبق برنامه دناتوراسیون اولیه ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دور تکرار شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. واکنش PCR برای تکثیر ژن stbA در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ واحد آنزیم Taq، ۰/۵ میلی مولار بافر آنزیم (۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۱۰ میلی مولار تریس (pH=8.3)، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول پرایمر و ۲۰۰ نانوگرم DNA انجام شد. تکثیر با دستگاه ترموسیکلر طبق برنامه دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دور تکرار شامل ۳۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. جهت بررسی محصول PCR، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده گردید. به منظور تایید قطعات تکثیری محصول PCR تعیین توالی شد و توسط Blast Tool مقایسه و تایید گردید.

## یافته‌ها

در این تحقیق، ۲۴۴ نمونه E.coli از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تکثیر سه ژن بیماری-زای aggR، aap و aatA برخی از نمونه‌ها در شکل ۱ نمایش داده شده است. نتیجه تکثیر ژن stbA برخی از نمونه‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است.




**شکل ۱**- نتیجه تکثیر ژن‌های بیماریزای *aggR*، *aap* و *aatA* بر روی ژل آگاروز ۲٪. خطوط ۱ تا ۷ نمونه های *E.coli* جدا شده از بیمار، خط ۸ کنترل منفی و خط ۹ نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی.

از میان ۲۴۴ نمونه UPEC، ۱۰۴ نمونه هیچ یک از این سه ژن بیماری‌زا را نداشتند، در حالی که ۱۴ نمونه آنها حاوی ژن stbA بودند. به علاوه، از میان ۱۴۰ نمونه UPEC دارای ژن بیماری‌زا، ۹۴ نمونه (۴۶/۶ درصد) ژن aap، ۵۲ نمونه (۲۳ درصد) ژن aggR و ۸۰ نمونه (۳۵/۴ درصد) ژن aatA را به تنهایی یا همراه با ژن دیگر حمل می‌کردند (جدول ۲). همچنین در میان ۱۴۰ نمونه، تنها ۱۸ نمونه هر سه ژن aggR، aap و aatA را هم‌زمان حمل می‌کردند. همچنین حضور ژن stbA در ۱۴۰ نمونه حاوی ژن یا ژن‌های بیماری‌زا پایدار نبوده و تنها ۴۴ نمونه واجد این ژن بودند (جدول ۲).

**جدول ۲**- نتایج حضور یا عدم حضور ژن‌های *aatA*، *aap*، *aggR* و *stbA* در UPEC از طریق PCR (n=۲۴۴).

| *stab* | *aggR* | *aap* | *aatA* | تعداد نمونه‌ها |
|---|---|---|---|---|
| ۱۴/۱۰۴(+) | (_) | (_) | (_) | ۱۰۴ |
| ۶/۲۶(+) | (_) | (+) | (_) | ۲۶ |
| ۸/۱۸(+) | (+) | (_) | (_) | ۱۸ |
| ۴/۲۸(+) | (_) | (_) | (+) | ۲۸ |
| ۲/۱۶(+) | (+) | (+) | (_) | ۱۶ |
| ۱۲/۳۴(+) | (_) | (+) | (+) | ۳۴ |
| ۱۲/۱۸(+) | (+) | (+) | (+) | ۱۸ |
| | ۵۲ | ۹۴ | ۸۰ | جمع تعداد هر ژن پاتوژن= ۲۲۶ |

## بحث

سویه‌های پاتوژن اشرشیاکلی EAEC به عنوان عامل اسهال و UPEC به عنوان عامل عفونت دستگاه ادراری عوامل بیماری‌زای مشترکی از جمله چسبندگی فیمبریه را به همراه دارند (۱). در سویه‌های UPEC، ژن‌های *kps*، *afa*، *sfa*، *auf*، *pap*، *usp*، *ireA*، *prs*، *aer*، *cnf* و *hly* از جمله ژن‌های شرکت کننده در بیماری‌زایی سویه‌های UPEC و ژن‌های *aap* ، *aatA*، *aggc*، *agg3c*، *aggR*، *eae*، *ehly*، *iha*، *irp2*، *lpfA*، *pet*، *pic*، *pils*، *shf* و *astA* جزء ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های EAEC به شمار می‌آیند (۴-۲، ۱۱). در تحقیقات Abe و همکارانش نشان داده شد که سویه‌های UPEC ممکن است به طور اکتسابی خصوصیات سویه‌های EAEC را داشته باشد که از این طریق به اشتراک برخی از ژن‌ها در بین این دوسویه می‌توان پی برد (۱). در تحقیقات Cerna وهمکارانش مشخص گردید که از ۲۸سویه EAEC بررسی شده، ۲۴ (۸۶ درصد) دارای ژن‌های پلازمیدی مورد نظر بودند (۲۳ سویه دارای هر سه ژن پلاسمیدی *aatA*، *aggR* و *aap* بودند و یک سویه تنها حاوی ژن *aap* بود. از ۷۰ ژن شناسایی شده توسط PCR، ۲۳ (۳۲/۸ درصد) ژن *aggR*، ۲۳ (۳۲/۸ درصد) ژن *aatA* (AA) و ۲۴ (۳۴/۴ درصد) ژن *aap* بودند (۸). در مطالعات Gadsden و همکارانش (۱۲) نشان داده شد که سویه‌های UPEC بر خلاف EAEC فاقد ژن‌های *aatA*، *aggR* و *aap* می‌باشند، در حالی که نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که از ۲۴۴ نمونه UPEC، ۱۴۰ (۵۷/۴ درصد) نمونه‌ها حاوی یک، دو یا هر سه ژن *aatA*، *aggR* و *aap* بودند و در مجموع از ۲۲۶ مورد ژن شناسایی شده توسط PCR در تمامی ۲۴۴ نمونه، ۹۴ (۴۶/۶ درصد) مورد ژن *aap*، ۵۲ (۲۳ درصد) مورد ژن *aggR* و ۸۰ (۳۵/۴ درصد) مورد ژن *aatA* را حمل می‌کردند. در تحقیقات Monteiro و همکارانش (۱۳) نشان داده شد که ژن *aap* منحصر به سویه‌های EAEC نمی‌شود که تا حدودی با نتایج ما مطابقت دارد. همچنین در این مطالعه به منظور تعیین حضور پلازمید pAA از ژن تثبیت کننده *stbA* با کمک تکنیک PCR استفاده گردید. آنچه جالب توجه به نظر می‌رسد تغییر الگوی ژن‌های پلازمیدی *aap*، *aggR* و *aatA* (از ۸۶ درصد به ۵۷/۴ درصد)، پس از تغییر مکان آنها از روده به دستگاه ادراری می‌باشد. همچنین این مطالعه نشان می‌دهد با توجه به پلازمیدی بودن این ژن‌ها، آنها از پلازمید خارج شده و در مکان دیگری قرار گرفته (احتمالا درون ژنوم باکتری یا حتی پلازمیدهای دیگر) و پیوستگی این ژن‌ها با پلازمید pAA به میزان زیادی از بین رفته است. به طوری که از میان ۱۴۰ نمونه حاوی ژن‌های *aggR*، *aap* و *aatA* تنها ۴۴ نمونه دارای ژن *stbA* بودند و همچنین در ۱۴نمونه فاقد ژن‌های *aggR*، *aap* و *aatA* ژن *stbA* یافت گردید. به هر حال این مطالعه نشان می‌دهد که هر سه ژن *aggR*، *aap* و *aatA* و حتی پلازمید pAA تنها به سویه‌های EAEC محدود نمی‌شود. این استدلال با توجه به وجود ترانسپوزون‌های بی‌شمار بر روی این پلازمید و سایر قطعات ژنتیکی و همچنین کاهش فشار تکاملی و تغییر الگو ژنی منطقی به نظر می‌رسد. همان طور که در مقدمه ذکر گردید این ژن‌ها در پراکنده‌سازی باکتری (*aap*)، درانتقال پروتئین‌های بیماری‌زا (*aatA*) و فعال کننده رونویسی ژن‌های پاتوژن (*aggR*) در باکتری‌های Enteroaggregative *E.coli* (EAEC) که منجر به اسهال شدید می‌شوند، نقش دارند. مشاهده درصد بالای حضور این ژن‌ها در سویه‌های UPEC نشان می‌دهد که این ژن‌ها نه تنها خاص سویه‌های EAEC نبوده، بلکه در پاتوژنز سایر سویه‌ها (مسیرهای دیگر القاء بیماری) نیز نقش دارند. بنابر این با شناسایی هر چه بیشتر ژن‌های پاتوژن اصلی که در چندین مسیر در بیماری‌زایی نقش دارند، می‌توان راهکارهای درمانی (همچون تولید واکسن) را برای هدف قرار داد. این مطالعه اولین گزارش از بررسی این ژن‌های پاتوژن در سویه‌های UPEC و همین طور وضعیت پیوستگی این ژن‌ها با پلازمید pAA می‌باشد.

**تشکر و قدردانی**

بدین وسیله از کلیه کسانی که در اجرای این پروژه ما را یـاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

## *REFERENCES*

1. Sesti Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E.coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 52: 397-406.
2. Park HK, Jung YJ, Chae HC, Shin YJ, Woo SY, Park HS, Lee SJ. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. Scand J Urol Nephrol 2009; 43: 51-57.
3. Buckles EL, Mougeot B, Molina A, Lockatell CV, Johnson DE, Drachenberg CB, et al. Identification and Characterization of a Novel Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Fimbrial Gene Cluster. Infect Immun 2004; 72: 3890-901.
4. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HT. Defining Genomic Islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 2007; 189: 3532–46.
5. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 2005; 295: 383–404.
6. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experiment Mol Pathol 2008; 85: 11–19.
7. Weintraub A. Enteriaggregative *Escherichia coil*: epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol 2007; 56: 4-5.
8. Cerna JF, Nataro JP, Garica TE. Multiplex PCR for Detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia Coli* strains. J Clin Microbiol 2003; 41: 2138-40.
9. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggreative *Escherichia coil*. J Med Microbiol 2006; 55: 1303-11.
10. Imuta N, Nishi J, Tokuda K, Fujiyama R, Manago K, Iwashita M, et al. The *Escherichia coli* efflux pump TolC promotes aggregation of enteroaggregative *E. coli* 042. Infect Immun 2008; 76: 1247–56.
11. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New Adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. Infect Immun 2008; 76: 3281-92.
12. Gadsden FW, Johnson JR, Wain J, Okeke IN. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. Emerg Infect Dis 2007; 13: 757-60.
13. Monteiro BT, Camposb LC, Sircilia MP, Franzolina MR, Bevilacquaa LF, Nataroc JP, et al. The dispersin-encoding gene (aap) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 81–84.