(مقالهٔ پژوهشی)

شناسایی ژنهای *pap*، *fim*، *sfa* و *afa* در سویه های اشریشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در کرمان به روش PCR چند گانه

مهدی زیدآبادی نژاد [۱]، کیومرث امینی [۲*]

۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی.

۲-استادیار گروه میکروبیولوژی.

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:

کیومرث امینی؛ دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: عفونت دستگاه ادراری دومین عامل شایع عفونت در بدن انسان می باشد. در میان عوامل عفونت دستگاه ادراری *اشریشیاکلی* شایع ترین باکتری عامل عفونت ادراری در هر دو جنس می باشد.

روش بررسی: در این بررسی ۲۰۰ نمونه ی ادراری جهت شناسایی *اشریشیاکلی* کشت داده شد. جدایه‌ها بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد تشخیص داده شد و DNA استخراج شده از جدایه‌های تأیید شده به منظور تعیین ژن‌های *papEF*، *fimH*، *afaBC* و sfa/*focDE* به روش Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مجموع، از ۱۱۰ جدایه ی *اشریشیاکلی* از نمونه‌های ادراری کشت داده شده شناسایی گردید. بررسی ژنوتیپی ژن‌های حدت نشان داد که ۴۲/۵ درصد از جدایه‌ها حداقل یکی از ۴ ژن حدت را دارا بودند. ژن *papEF* با ۲۱/۸۱ درصد بیشترین فراوانی و ژن های *sfa/focDE* و *fimH* به ترتیب ۴/۵۴ و ۲/۷۷ و ژن *afaBC* (۱/۸۱ درصد) کمترین درصد فراوانی داشتند. ۳۲ جدایه (معادل ۲۹/۰۹ درصد) واجد هر دو ژن *papEF* و *afaBC* بودند.

نتیجه‌گیری: عفونت های دستگاه ادراری، از نگرانی‌های بهداشتی گسترده ایی محسوب می شود که منطبق بر مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد. علت تفاوت نتایج با سایر مطالعات می‌تواند به دلیل تفاوت مناطق جداسازی نمونه‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، ژن‌های بیماریزا، عفونت مجاری ادراری.

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۲/۲۷ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۶/۵/۱۸** **اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۵/۲۱**

مقدمه

عفونت مجرای ادراری نوعی پاسخ التهابی این مجرا نسبت به تهاجم عوامل عفونی از جمله باکتری‌ها می‌باشد. میکروارگانیزم‌های مختلف قادر هستند از راه مجرای ادراری وارد مثانه شده و با طی مسیری به سمت کلیه ها حرکت کنند. چنانچه قسمت های تحتانی مجرای ادراری مانند پیش آب راه و مثانه درگیر شوند عفونت را التهاب مثانه (سیستیت) گویند و بیمار از سوزش و درد در هنگام خروج ادرار رنج می‌برد(۱). *اشریشیاکلی* عضوی از خانواده انتروباکتریاسیه می باشد که توانایی کلونیزه شدن و دوام در زیست گاه های متعدد محیطی و جانوری را دارد (۲). سویه های *اشریشیاکلی* بیماری زای خارج روده ای می توانند در محل هایی مانند خون، سیستم اعصاب مرکزی، و سیستم ادراری کلونیزه شده و سبب بیماری شوند. سویه های UPEC شایع ترین سویه های عامل بیماری در انسان هستند(۳). این سویه ها دارای تیپ I فیمبریه هستند که غالباً به چسبیدن به نسج مخاطی واژن و مجاری ادراری تمایل دارند. عوامل چسبنده در سویه های UPEC شامل پیلی S، خانواده Dr، پیلی P تیپ I فیمبریه هستند که تیپ I فیمبریه بیش تر در ارتباط با ایجاد سیستیت توسط سویه های حامل است. برای بیان تیپ I فیمبریه، حداقل ۹ ژن که در دسته *ژنی fim* قرار دارند، نیاز است. مطالعات نشان داده اند که fimH برای جذب باکتری به داخل سلول اپی تلیال مثانه لازم است (۴). *E.coli* جزء فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم محسوب می شود (۵ و ۶). این باکتری ها اگرچه معمولاً بی ضرر می باشند، چندین سویه از *E.coli* عوامل ژنتیکی (ژنهای ویرولانس) را به دست آورده‌اند که به آنها خاصیت بیماری‌زایی برای انسان و حیوان می بخشد (۷ و ۸). این پاتوژنها مسئول ایجاد چند نوع عفونت بالینی مثل بیماریهای انتریک و اسهالی، عفونتهای دستگاه ادرار، سپسیس و مننژیت هستند.

براساس خصوصیات بیماری‌زایی هر کدام از به آنها و علائم بالینی میزبان، سویه های بیماری‌زای *E.coli* به چندین گروه یا پاتوتایپ تقسیم می شوند (۹). UPEC عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری (UTI) در کشورهای توسعه یافته است (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). UTI رایج ترین بیماریهای عفونی انسان محسوب می‌شود (۱۴). در ایالات متحده آمریکا (USA) هر ساله ۱/۶ میلیون دلار هزینه صرف درمان این عفونت‌ها می‌گردد. تخمین زده می شود که ۵۰-۴۰٪ از زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یک بار UTI را تجربه می کنند(۱۵). این بیماری عفونی معمولاً با عفونت مثانه شروع می شود اما اغلب با فرا گرفتن کلیه ها توسعه پیدا می کند و سرانجام ممکن است منجر به نارسایی کلیوی شود و حتی به خون هم راه یابد (۱۳). توانایی UPEC برای ایجاد عفونت علائم دار دستگاه ادراری به دلیل وجود دو نوع عامل ویرولانسمی باشد: ادهسین ها(فیمبریه نوع I، P- فیمبریه، S- فیمبریه، F1C- فیمبریه و ...) و توکسین مانند همولیزین، فاکتور نکروز دهنده تومور) (۱۳، ۱۶ و ۱۷). UPEC دارای فاکتورهای اتصالی هستند به نام پیلی یا فیمبریه، که به آنها اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز کنند (۱۴). ادهسین ها آنتی ژنهای فیمبریالی هستند که باکتری را قادر می سازند تا به موکوس روده متصل شود(۱۸). از ادهسین های معمول موجود در UPEC می توان به P فیمبریا، فیمبریا نوع ۱، S فیمبریا، F1C فیمبریا و خانواده ادهسین Dr (۱۹) که شامل ادهسین Dr و ادهسین های فیمبریال می باشد، نام برد (۲۰). این فیمبریه‌ها، به ترتیب، توسط ژنهای *fim*, *sfa*, *foc*, *afa*, *pap*, کد می‌شوند(۲۱). در UPEC، فیمبریا نوع ۱ مهمترین عامل حدت است. تعدادی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه این ژن را تولید می کنند. فیمبریه نوع ۱ به وسیله بیش از ۹۰٪ سویه های *E.coli* بیان می‌شود

(۲۲). با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار و خانواده او رخ خواهد داد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف شناسایی ژنهای *pap*، *fim*، *sfa* و *afa* *اشریشیاکلی* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان کرمان به روش PCR چند گانه صورت پذیرفته است.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی- مقطعی (cross-sectional) از اردیبهشت لغایت مهر سال ۱۳۹۴ تعداد ۲۰۰ نمونه ادراری به صورت کاملا" تصادفی از افراد مبتلا به عفونت دستگاه ادراری از بیمارستان باهنر و سیدالشهدا کرمان در ظروف مخصوص جمع آوری ادرار و استریل جمع‌آوری گردید. نمونه های دارای 10^5 یا بیشتر از باکتری به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شد. نمونه ها بر روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار(مرک، آلمان) کشت داده و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه منتقل شدند. تمامی نمونه‌ها با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر اکسیداز، احیای نیترات، سیمون سیترات، واکنش TSI، اوره آز، اندول، حرکت، MR/VP و لیزین دکربوکسیلاز (مرک، آلمان) تعیین هویت شدند. جدایه های تعیین هویت شده در محیط عصاره قلب-مغز آگار(BHI)(مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت و در ۷۰-درجه سلسیوس نگهداری شدند تا در مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گیرند (۲۴-۲۳).

استخراج DNA

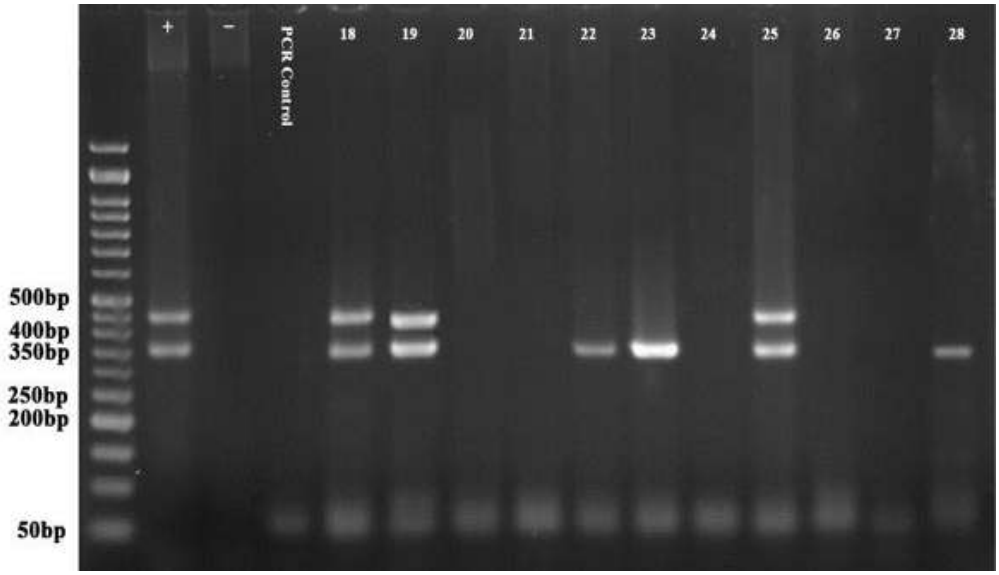
به منظور تکثیر ژنهای هدف؛ ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از کیت (CinnaPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر(Bio-Rad, USA) استفاده گردید. توالی الیگونوکلئوتیدی از آغازگرهای موجود استفاده در جدول یک استفاده شد (جدول۱)(۱۷). پس از BLAST آغازگرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، MgCl2 (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) در مقایسه با سویه استاندار *اشریشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۳ الکتروفورز گردید (۱۷).

جدول ۱: توالی الیگونوکلیوتئیدی استفاده شده در این تحقیق به عنوان پرایمر (۱۷)

پرایمر	توالی پرایمر (′۳→′۵)	اندازه محصول(bp)
Pap	1:GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AATA	۳۳۶
Sfa	1:CTCCG GAGAACTGGGTGCATCTTAC 2:CGG AGGAGT AA TTA CA AACCTGGCA	۴۱۰
afa	1:GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC 2:CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	۷۵۰
Fim	1: GTT GTT CTG TCG GCT CTG TC 2: TAA ATG TCG CAC CAT CCA G	۴۰۰

یافته ها

از ۲۰۰ نمونه‌ی اخذ شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری، ۱۱۰ *شریشیاکلی* جداسازی و مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که ۲۴ جدایه (۲۱/۸۱٪) دارای ژن *pap*، ۵ جدایه (۴/۵۴٪) دارای ژن *sfa*، ۳ جدایه نیز (۲/۷۷٪) دارای ژن *fimH* و ۱ جدایه (۱/۸۱٪) دارای ژن های *afa* بودند. ۳۲ جدایه (۲۹/۰۹٪) واجد هر دو ژن *papEF* و *afaBC* بودند. در شکل ۱ نتایج آنالیز مولکولی نشان داده شده است.



شکل ۲: نتیجه آزمایش (Multiplex-PCR) به ترتیب از چپ به راست: نشانگر bp ۵۰، شاهد مثبت، شاهد منفی، چاهک ۱۸، ۱۹ و ۲۵ جدایه های مثبت از نظر وجود ژن های pap و saf، چاهک های ۲۲، ۲۳ و ۲۸ جدایه های مثبت از نظر وجود ژن pap می باشد.

بحث

عفونت مجاری ادراری یکی از شایعترین بیماری های با منشاء باکتریال در انسان می باشد. شایع‌ترین عامل اتیولوژیک این بیماری باکتری *E.coli* بوده، که با وجود آنتی ژن‌ها و توکسین‌های مختلف دخالت کننده در ایجاد عفونت، مهمترین عامل ویرولانس در سویه‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* فیمبریه P می‌باشد (۲۶). در بین عوامل حدت در جدایه‌های بیماری زای *اشریشیاکلی* از موارد عفونت‌های ادراری، فیمبریه‌ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند. فیمبریه P به عنوان یکی از فیمبریه های مقاوم به مانوز است که بیشترین نقش را در ایجاد عفونت های ادراری داشته است(۲۸-۲۷). در مطالعه حاضر، فیمبریه P به عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های حدت به میزان ۲۱/۸۱ درصد شناسایی گردید. با توجه به اینکه حضور این فیمبریه به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خطر در بروز عفونت بالا رونده‌ی ادراری انسان محسوب می‌گردد، گزارش‌های زیادی در کشورهای مختلف در این زمینه وجود دارد (۲۹). در بررسی حاضر فیمبریه S به عنوان یکی از عوامل آدهزینی مورد بررسی قرار گرفت و فراوانی آن ۴/۵۴ درصد گزارش گردید. فراوانی ژن afa در مطالعه حاضر ۱/۸۱ درصد شناسایی شد. بر اساس نتایج این تحقیق ۴۲/۲ درصد از جدایه ها واجد ژن های حدت بودند. فرشاد و همکاران گزارش کردند که در جهرم فراوانی ژن‌های فیمبریه pap ۳۰/۲ درصد است و شیوع بیشتری نسبت به فیمبریه sfa (۱۸/۷۵ درصد) دارد(۳۰). در مطالعه دیگری که در شهر سائوپائولو برزیل توسط Tiba و همکاران انجام شد، فراوانی ژن‌های papE/F (۳۲/۷ درصد)، sfaD/E (۲۷/۸ درصد) و afaB/C (۶/۲ درصد) برآورده شده است(۳۱). فراوانی ژن‌های بررسی شده در مطالعه حاضر، همخوانی بیشتری با یافته های Arisoy و همکاران نشان می دهد (۳۲). به نظر می‌رسد ابتلا به عفونت‌های ادراری بیمارستانی که عامل ایجاد کننده‌ی آن *اشریشیاکلی* بود، در جنس مؤنث با طول دوره ی بستری و مدت زمان استفاده از سوند اداری مرتبط است (۱۳).

Blanco و همکاران در پژوهشی که در ارتباط با جداسازی ژن های حدت یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی* به وسیله آزمایش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از روش های فنوتیپ ژن های sfa، afa و pap بالاترین درصد را در عفونت های ادراری نشان دادند (۳۳). عربی و همکاران در پژوهشی بر روی ژنوتیپ فیمبریه مشترک در عفونت ادراری *اشریشیاکلی* از ۳۴۳ سویه باکتری *اشریشیاکلی* ایزوله شده، توزیع ژن‌های فیمبریه sfa، pap و afa بیشترین فراوانی را در تولید عفونت ادراری بعد از آزمایش PCR داشتند که به ترتیب ۸۷/۷ درصد (۳۰۱ مورد)، ۲۳/۹ درصد(۱۱۳ مورد) و ۱۶/۶ درصد (۵۷ مورد) می باشند (۳۴). به طور کلی می توان نتیجه گرفت که بر طبق مطالعات انجام شده و مقایسه آن با نتایج این پژوهش، میزان ژن pap در جدایه ها بیشترین درصد را به خود اختصاص داده اند و ژن های فیمبریه fimH و sfa سپس در رتبه های بعدی قرار گرفته اند. مطالعه توسط ناظمی و همکاران در سال ۹۰ روی توزیع فراوانی ژنهای کد کننده فیمبریه در E.coli جداشده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری صورت گرفت. میزان شیوع ژن های فیمبریه foc, (۱۷٪)، afa, (۱۰٪)، pap (۳۵٪) و fim (۹۴٪)، sfa, (۳۱٪) تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن pap و fim شایعترین ژنهای کد کننده فیمبریه در *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران می باشد که با این پژوهش که ژن *papEF* بیشترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داد هم خوانی دارد (۳۵). در بیشتر مطالعات، ژن های pap و sfa دارای ترکیب ژنی می‌باشند و مقایسه مطالعات پیشین با مطالعه ی اخیر نشان داد که بیشترین عفونت ادراری در زنان وجود دارد و بیشترین فراوانی مربوط به ژن های pap و sfa می‌باشد. مؤثرترین ژن در ایجاد عفونت

ادراری ژن pap می‌باشد. با توجه به این که حدود یک سوم از جدایه ها در این بررسی دارای ژن های فیمبریه ای بودند و بیشترین فراوانی مربوط به ژن pap و سپس sfa می باشد، نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه‌ی شناسایی ژن‌های فیمبریه‌ای در عفونت های ادراری انسان ضروری به نظر می رسد، دو سوم از جدایه ها بدون اینکه دارای ژن فیمبریه ای باشند قابلیت ایجاد بیماری را دارند.

نتیجه‌گیری

عفونت‌های دستگاه ادراری، از نگرانی‌های بهداشتی گسترده‌یی محسوب می‌شود که منطبق بر مناطق جغرافیایی متفاوت می‌باشد. عفونت‌های باکتریایی دستگاه ادراری همراه با توسعه ی گونه های مقاوم در برابر درمان آنتی بیوتیکی در تمام گروه های سنی یافت می شوند. با توجه به شیوع بالای عفونت‌های مجاری ادراری و افزایش بروز پدیده مقاومت در این ایزوله‌ها، بررسی دوره‌ای و مداوم میزان مقاومت و مکانیسم ایجاد مقاومت در باکتریها می‌تواند در انتخاب مناسب‌ترین گزینه درمانی موثر باشد.

منابع

1-Eslami M, Najar Peerayeh S. Phenotypic and genotypic identification of TEM, PER and VEB beta lactamase genes in the clinical *Escherichia coli* strains. Arak medical university journal. 2012; 15(1); 1-9.

2-Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections. In: morbidity and economic costs. Dis Mon. 2003; 49: 53-70.

3-Klumpp J, Weiser C, Sengupta S, Forrestal G, Batler A, Schaeffer J. Uropathogenic E. coli potentiates type I pilus-induced apoptosis by suppressing NF-KB.Infect Immun.2001. 6689-96.

4-Salyers A, Whitt D. Bacterial pathogenesis.In : A molecular approach. 2thed.Washington DC.AMS Press; 2002.534-542.

5-West DM, Sprigings KA, Cassar C, Wakeley PR, Sawyer J, and Davies RH. Rapid detection of Escherichia coli virulence factor gene using multiplex real-time TaqMan1 PCR assays. Vet Microbiol. 2007; 122: 323–33.

6-Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, and Denamur E. The Link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. Infect Immun. 2009; 546–553.

7-Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, and Harel J. Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulence gene detection with DNAmicroarrays. J Clin Microbiol. 2003; 2113–2125.

8-Ulett G, Mabbett A, Fung Kh, Webb R, and Schembri M. The role of F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli in biofilm formation. J Microbiol. 2007; 2321-2331.

9-Schwan W, Lee J, Lenard F, Matthews B, andBeck M. Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and Type 1 pilus expression in uropathogenic Escherichia coli. Infect Immun. 2002; 1391–1402.

10-Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Esherichia coli . Pans. 2002; 17020-17024.

11-Raksha R, Srinivasa H, and Macaden RS. Occurrence and characterization of uropathogenic Escherichia coli urinary tract infections. Indian J Med Microbiol. 2003; 21(2): 102- 107.

12-Matiuzzi da Costa M, Drescher G,Maboni F,Weber Sh, de Avila Botton S, Henning Vainstein M, Schrank IS, and Castagna de Vargas A. Virulence factors and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from urinary tract of swine in southern of brazile . Brazilian J Microbiol. 2008; 39:741-743.

13-Sorsa J. Characterization of genomic diversity in extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) and development of a diagnostic DNA microarray for the differentiation of ExPEC isolates causing urinary tract infections. Acad Disser Gene Microbiol. 2007; 1-16.

14-Santo E, Macedo C, and Marin JM. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from a university hospital in ribeirao preto, sao paulo, brazile. Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(4):185-188.

15-Snyder J, Haugen B, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan E, Johnson D, Welch R, and Mobley H. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic Escherichia coli. Infect Immun. 2005; 7588–7596.
16-Alex P, Stouracova K, Hamric J, and Rychlik I. Gene typing of the colonization K88 (F4) in enterotoxigenic E.coli strains isolated from diarrhoeic piglets. Vet Med- Czech .2001; 46-49.
17-Birosova E, Siegfried L, Kmetova M, Makara A, Ostro A, Gresova A, et al. Detection of virulence factors in ahaemolytic Escherichia coli strains isolated from various clinical materials. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 569–573.
18-Blanco M, Leonel L, Blanco J, Dahbi Gh, Mora A, Cecilia L, Gonzلlez E, and Blanco J. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic Escherichia coli isolated fromCuban pigs with diarrhea. Int Microbiol. 2006; 9:53-60.
19-Mulvey M. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. Cell Microbiol. 2002; 4(5): 257–271.
20-Riberio M, Yano Tand Silva Leite D. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Inst Med trop Sao Paulo. 2008; 50(5):255-260.
21-Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, and Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic Escherichia coli to adhere to and invade bladder epithelial cells. Immunol Med Microbiol. 2002; 33: 23-26.
22-Soderhall M. The importance of Escherichia coli fimbriae in urinary tract infection. Department of Nephrology. 2001; 1-8.
23-Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: with student consult. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2012.
24-Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. Afr J Microbiol Res 2012; 6(39): 6811-6.
25-Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, and Yoshida O. Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol 1995; 12(2): 85-90.
26-Hosseini F, Goudarzi M, Bambaea B, Moradibid Hendi S. Molecular study of the impact of solid surface on type one fimbriae phase variation in *E. coli* serogroups O44 causing urinary tract infection. Kerman medical university journal. 2009; 16(3): 215-223. [In Persian]
27-Terai A, Yamamoto S, Mitsumori K, Okada Y, Kurazono H, Takeda Y, et al. Escherichia coli virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis. Int J Urol 1997; 4(3): 289-94.
28-Gunther NW, Snyder JA, Lockatell V, Blomfield I, Johnson DE, Mobley HL. Assessment of virulence of uropathogenic Escherichia coli type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. Infect Immun 2002; 70(7): 3344-54.
29-Ishitoya S, Yamamoto S, Mitsumori K, Ogawa O, Terai A. Non-secretor status is associated with female acute uncomplicated pyelonephritis. BJU Int 2002; 89(9): 851-4.
30-Farshad S, Emamghoraishi F, Japoni A. Association of virulent genes hly, sfa, cnf-1 and pap with antibiotic sensitivity in Escherichia coli strains isolated from children with community-acquired UTI. Iran Red Crescent Med J 2010; 12(1): 33-7.
31-Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008;
50(5): 255-60.
32-Arisoy M, Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsoy ED, et al. Detection of virulence factors of Escherichia coli from children by multiplex polymerase chain reaction. Int J Clin Pract 2006; 60(2): 170-3.
33-Blanco M, Blanco JE, Rodriguez E, Abalia I, Alonso MP, and Blanco J. Detection of virulence genes in uropathogenic Escherichia coli by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. Journal of Microbiological Methods 1997; 31(12): 37-43.
34-Arabi Sh, Tohidi F, Naderi S, Nazemi A. The common fimbarie genotyping in uropathogenic Escherichia coli. Annals of Biological Research 2012; 3(10): 4951-4.
35-Nazemi A, Naderi M, Jafarpour M, Miri Nargesi MS, Sharifi S. Distribution of fimbriae genes encoding in *E.coli* isolated from patients with urinary tract infection. Laboratory Journal. 2011; 4(2): 121-129.

Detection of *pap*, *fim*, *sfa* and *afa* Genes in *Eschreshia Coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infection by Multiplex-PCR in Kerman, Iran

Mehdi Zeidabadi Nejad [1], Kumarss Amini [2*]

1-MSc Department of Microbiology.
2-Assistant Professor of Microbiology.

1-Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
2- Assistant Professor of Microbiology.
Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

**Corresponding author:*
Kumarss Amini; Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Tel: +989125454074

Abstract

Background and Objective: Urinary tract infection is the second most common infection in the human body. Among the causes of urinary tract infections, *E. coli* is one of the most common urinary tract pathogens in both genders.

Subjects and Methods: In this study, 200 urine samples to detect *E. coli* were cultured. Isolates were identified by standard biochemical tests and DNA extracted from isolates confirmed to determine the genes *papEF*, *fimH*, *afaBC* and *sfa*/*focDE* by Multiplex-PCR (Multiplex-polymerase chain reaction) method.

Results: In total, 110 *E. coli* strains from urine samples cultured were identified. The genotype virulence genes showed that 42.5 % of the isolates at least one of the four acuity type gene. *PapEF* gene with 21.81 % was the most frequent gene. While *sfa* and *focDE* genes had 4.54 and 2.77 % frequencies respectively. Thirty two samples (29.09%) had both *fimH* and *afaBC* genes.

Conclusion: Urinary tract infections are considered as a widespread health concern that is consistent with different geographic regions. The reason for the difference in results with other studies can be due to the difference in sample isolation regions.

Keywords: *Eschreshia coli, V*irulence genes, Urinary tract infection.

►*Please cite this paper as:*
Zeidabadi Nejad M, Amini K. Detection of pap, fim, sfa and afa Genes in Eschreshia Coli Strains Isolated from Urinary Tract Infection by Multiplex-PCR in Kerman. Jundishapur Sci Med J 2017; 16(4):393-400.

Received: May 16, 2016 **Revised: Aug 9, 2017** **Accepted: Aug 12, 2017**