● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۳، ص۲۲۳-۲۱۵، ۱۳۸۸

مقالهٔ پژوهشی

بررسی ملکولی تأثیر تماس سطح جامد بر تغییر فاز تیپ یک فیمبریه در سرو گروه O۴۴ باکتری اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری

دکتر فرزانه حسینی*[۱]، مهدی معظمی گودرزی[۲]، دکتر بیژن بمبئی[۳]، دکتر سهیلا مرادی بیدهندی[۴]

خلاصه

مقدمه: فیمبریه‌ی تیپ ۱ عامل اتصال مهم در*E.coli* می‌باشد که در ارتباط با عفونت‌های ادراری‌یافت شده‌است. شناسایی ژن‌های کدکننده عوامل بیماری‌زا امری ضروری است. بررسی ژنوتیپی ملکولی تأثیر تماس سطح جامد روی تغییر فاز تیپ یک فیمبریه در سرو گروه‌های O از اهداف این بررسی بوده است.

روش: نمونه‌های *E.coli* جدا شده از ادرار بعد از تعیین هویت به روش سرولوژیکی سروتایپینگ شدند. ارزیابی فنوتیپی تغییر فاز تیپ‌یک فیمبریه از طریق آزمون هماگلوتیناسیون حساس به مانوز انجام پذیرفت. با روش PCR و اندونوکلئاز محدود الاثر *HinfI* تغییر فاز تیپ‌یک فیمبریه مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: از تعداد ۲۰۰ نمونه‌ی ادرار حدود ۱۵۸ کشت مثبت *E.coli* جدا شد که سروتیپO غالب آن‌ها سروتیپ O44 بود. با کشت بر روی محیط جامد ۵۱٪ از سویه‌ها هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز و ۴۹٪ از آنها هماگلوتیناسیون حساس به مانوز را نمایش دادند. در کشت بر روی محیط مایع به‌دلیل قرارگرفتن اپرون در حالت روشن ۶۸٪ از سویه‌ها هماگلوتیناسیون حساس به مانوز و ۳۲٪ از آن‌ها هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز را نمایش دادند. محصولات PCR مربوط به قطعات ۳۵۹bp و ۲۰۰ bp معرف نمونه‌هایی است که در آنها اپرون*fim* خاموش می‌باشد. در باند مربوط به قطعات۴۸۹ bp و ۷۰ bp اپرون *fim* در هر دو حالت روشن و خاموش مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: سویه‌های *E.coli* عامل عفونت‌های ادراری متعلق به تعداد محدودی از سروتیپ‌های O می‌باشند. فاکتورهای محیطی در تنظیم بیان اپرون‌های مولد فیمبریه در اشرشیاکلی نقش مهمی دارند. سویه‌های جدا شده از ادرار بعد از تلقیح در محیط کشت مایع موقعیت روشن اپرون فیمبریه و هماگلوتینین حساس به مانوز را نشان دادند. بیان تیپ یک فیمبریه و تاژه احتمالاً منعکس‌کننده یک میان کنش دینامیک ضروری میان اتصال و تحرک باکتری می‌باشند و سویه‌های حاضر در نمونه ادرار بیماران به علت عدم اتصال به اپی‌تلیال از نظر فعالیت ژن‌های فیمبریه تیپ یک غیر فعال می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی، سروتایپینگ، PCR

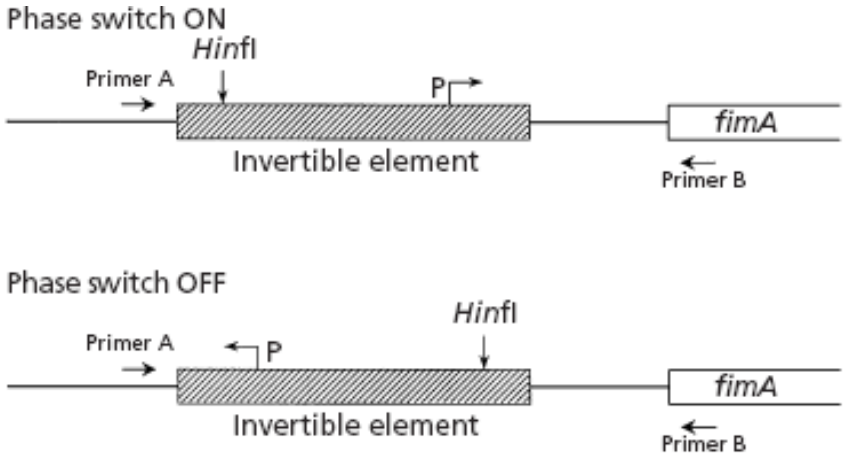
۱- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد تهران شمال ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد تهران شمال ۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی ۴- استادیار میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

***نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد تهران شمال ● **آدرس پست الکترونیک:** farzaneh953@yahoo.com.

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۷/۲۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۷/۱۰/۲۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۱۱/۹

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت ادراری باکتری اشریشیاکلی می‌باشد که از طریق اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه ادراری موجب افزایش قابلیت تکثیر و تهاجم به بافت کلیه می‌شود (۱). دو اندام سطحی تاژه و تیپ ۱ فیمبریه، از مهم‌ترین عوامل کلنیزاسیون این باکتری در دستگاه ادراری می‌باشند. تاژه موجب رانده شدن باکتری در لایه‌ی مخاطی شده و فیمبریه موجب اتصال آن به گیرنده‌های اختصاصی موجود در سطح سلول‌های اپی‌تلیال ادراری می‌شود (۲). تیپ‌یک فیمبریه تقریباً در اکثر سویه‌های بالینی جدا شده مشاهده می‌شود و نقش آن در تشکیل بیوفیلم به خوبی روشن شده‌است (۳). فیمبریه‌ی تیپ ۱ به گیرنده حاویD- مانوز متصل می‌شود و حضور قند D- مانوز مانع هماگلوتیناسیون اریتروسیت‌های انسانی توسط *E.coli* نمی‌شود و این اساس آزمون هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز (MRHA) می‌باشد (۴). بیان تیپ‌یک فیمبریه در *E.coli* تحت کنترل فرایند تغییر فاز می‌باشد. اپرون *fim* که مسؤول سنتز این نوع فیمبریه می‌باشد، شامل ژن‌های ساختاری *fimA,F,C,H* و ژن‌های تنظیمی *fimE,B* است. هم‌چنین ژن‌های *fimC,D* در ترکیب این نوع فیمبریه دخیل می‌باشند (۵). دو پروتئین *FIM B,E* با دارا بودن خاصیت ریکامبینازی قادر به تغییر در موقعیت قرارگیری توالی314bp معکوس‌شونده، موسوم به توالی کنترل در پروموتور نخستین ژن ساختاری *(fimA)* می‌باشند (۶). طول قطعات حاصل از برش خوردن ناحیه سوئیچ‌کننده در پروموتور اپرون *fim* توسط اندونوکلئاز محدودالاثر *HinfI* اساس تشخیص مولکولی بیان ویا عدم بیان اپرون *fim* در اشرشیاکلی می‌باشد (شکل ۱). پروتئین *FIM H* به‌عنوان پروتئین عامل اتصال به گیرنده‌های سطحی شامل قند D – مانوز می‌باشد. از این رو استفاده از سوسپانسیون این قند به‌عنوان عامل ممانعت‌کننده از اتصال *FIM H* اساس بررسی فنوتیپی بیان این نوع فیمبریه از طریق آزمون هماگلوتیناسیون حساس به مانوز می‌باشد (۷). با توجه به شیوع نسبتاً بالای باکتری *E.coli* در نمونه‌های ادراری و هم‌چنین کثرت عفونت‌های واجدیا فاقد علائم بالینی، بررسی عوامل مؤثر در بیماری‌زایی این باکتری ضروری می‌نماید.یکی از راه‌های پیشگیری از رویداد عفونت‌های ادراری توسط این باکتری درک الگوی تغییر فاز اپرون



شکل ۱. *دو جهت‌گیری مختلف توالی معکوس شونده در پروموتور ژن fim A در دو فاز روشن و خاموش و موقعیت قرارگیری پرایمرها (۷)*

کد کننده‌ی آن در ارتباط با فاکتورهای محیطی در سطح *In vitro* و *In vivo* خواهد بود (۳). در این پژوهش نقش فاکتور تماس با سطح جامد در ارتباط با بیان این عامل بیماری‌زا در میان سروتیپ‌های O در جدایه‌های UPEC این باکتری در *In vitro* مورد بررسی قرارگرفته و با درک نقش این فاکتور محیطی روی تغییر فاز تیپ‌یک فیمبریه، الگویی جهت اعمال کنترل روی بیان اپرون *fim* در سویه‌های UPEC از طریق تغییر فاکتورهای محیطی ارائه می‌شود و ارتباط بیان تیپ‌یک فیمبریه و تاژه که هر دو از عوامل تهاجمی باکتری *E.coli* می‌باشند نشان داده شده‌است. جهت بررسی فنوتیپی سویه‌های *E.coli* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری، آزمون هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز که در ارتباط با عوامل بیماری‌زایی این سویه‌ها می‌باشد انجام پذیرفته و تشخیص ملکولی بیان ژن تیپ‌یک فیمبریه در پروموتور اپرون *fim* توسط اندونوکلئاز *HinfI* در شایع‌ترین سروتیپ گروه O مورد بررسی قرارگرفته‌است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌ها و سروتایپینگ: نمونه‌های ادراری از ۵ مرکز بهداشتی درمانی در شهر تهران جمع‌آوری گردیدند. حدود ۲۰۰ نمونه‌ی کشت ادرار از نظر وجود باکتری اشریشیاکلی از طریق کیت تشخیصی Hi25 Entrobacteriacea Identification kit ساخت شرکت Hi media مورد بررسی قرارگرفتند. پس از تعیین هویت کشت‌های به‌دست‌آمده، جهت سروتایپینگ آنتی‌ژن O سویه‌های مورد آزمون در محیط Tripticase Soy Broth (شرکت Difco) در ۳۷ درجه به مدت ۱۰ ساعت گرماگذاری شدند. سلول‌های باکتریایی از طریق سانتریفیوژ جدا شده و در سرم فیزیولوژی از آن‌ها سوسپانسیون تهیه گردید. سوسپانسیون‌های سلولی به مدت‌یک ساعت اتوکلاو شدند. قطره‌ای از هر کدام از سوسپانسیون‌ها ابتدا با آنتی‌سرم پلی‌والان سروتیپ‌های O (شرکت Difco وMAST) و در صورت آگلوتینه نمودن، با آنتی‌سرم منووالان همان گروه مجاور گردید. سویه کنترل مورد استفاده *E.coli* O157:H7 ATCC43895 بوده است.

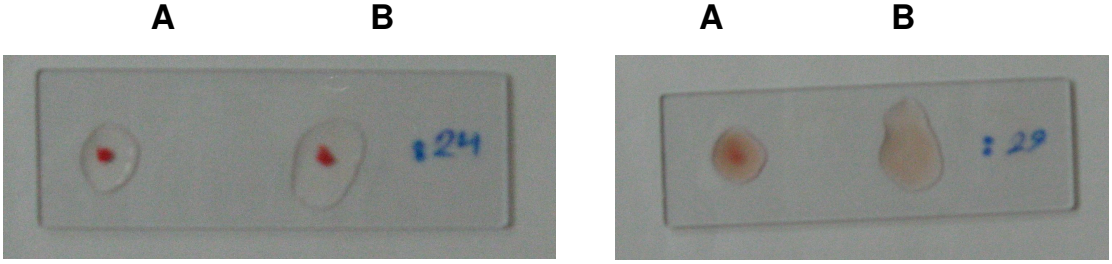
ارزیابی فنوتیپی تغییر فاز تیپ‌یک فیمبریه: به این منظور ابتدا به شکل موازی سویه‌های جدا شده به‌ترتیب در محیط‌های کشت TSA (Tripticase Soy Agar) و TSB (Tripticase Soy Broth) کشت داده شدند (۲۴-۱۸ساعت در ۳۷°C). کشت هریک از سویه‌ها در این محیط‌ها شش الی هشت مرتبه به‌صورت کشت شبانه تجدید گردید. برای آزمون هماگلوتیناسیون حساس به مانوز از خون گروه O انسانی (MRHA) استفاده شد. سوسپانسیون خون ۲٪ پس از سه مرتبه شستشو با بافرفسفات سالین تهیه گردید. از هر کدام از سویه‌ها در بافرفسفات سالین سوسپانسیون با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. محلول ۵٪ قند D- ما نوز در مجاورت سوسپانسیون خون و باکتری تهیه شده قرارگرفت.

ارزیابی ملکولی تغییر فاز تیپ‌یک فیمبریه: پرایمرA باتوالی 5' GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG 3' و پرایمرB با توالی 5' AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG 3' برای تکثیر توالی 559bp که شامل ناحیه سوئیچ‌کننده اپرون *fim* می‌باشد، مورد استفاده قرارگرفت (۷). تخلیص DNA کروموزومی با استفاده از کیت تخلیص شرکت Roche انجام پذیرفت. مخلوط واکنش PCR طبق دستورالعمل کیت PCR شرکت Roche در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر آماده گردید. واکنش PCR در سه مرحله شامل دناتوراسیون اولیه در حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد، برای مدت یک دقیقه با ۴۰ سیکل دناتوراسیون با حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ادامه‌یافت. مرحله اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد

برای ۷۰ ثانیه و در نهایت مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷۰ ثانیه به اجرا در آمد. مراحل PCR بایک طویل‌سازی انتهایی در حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و برای مدت سه دقیقه به اجرا در آمد. پس از پایان واکنش PCR، محصول آن توسط اندونوکلئاز محدودالاثر *HinfI* (شرکت Metabion) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، تحت فرایند Digestion قرارگرفت. پس از این مرحله محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. در نهایت رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آشکارسازی توسط تابش فرابنفش انجام پذیرفت.

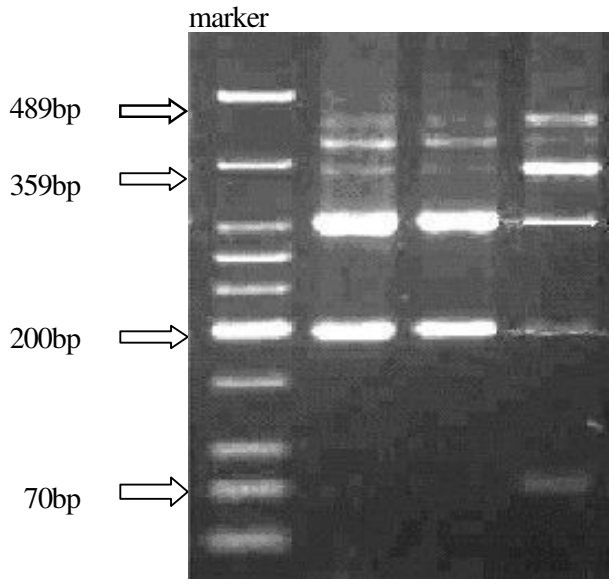
نتایج

از تعداد ۲۰۰ نمونه جمع‌آوری شده حدود ۱۵۸ مورد از نظر *E.coli* مثبت بودند. سروتیپ‌های شناسایی شده شامل O26,O44,O55,O86,O114,O126 بودند. بیشترین فراوانی را در این میان دو سروتیپ O26,O44 داشتند. شیوع سروتیپ‌های O26,O44,O55 ,O114,O126 و O86 به‌ترتیب ۳۴٪، ۱۰٪، ۲۳٪، ۸۹٪، ۸۶٪ و ۱۴٪ بود. در این میان ارزیابی فنوتیپی ملکولی روی سروتیپ O44 به‌عنوان شایع‌ترین سروتیپ مورد اجرا گذاشته شد. نتایج بررسی فنوتیپی سروتیپ O44 در اثر تجدید کشت روی محیط TSA و TSB نشان داد که در اثر تجدید کشت روی محیط حاوی آگار ۵۱٪ از نمونه‌ها هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز و ۴۹٪ از آنها هماگلوتیناسیون حساس به مانوز را داشته‌اند. از سوسپانسیون ۵٪ قند D– مانوز به‌عنوان عامل ممانعت‌کننده از هماگلوتیناسیون استفاده گردید (شکل۲). سویه‌ی جداشده در صورت عرضه‌ی تیپ یک فیمبریه، قبل از مجاورت با خون، در مجاورت با محلول ۵٪ D – مانوز قادر به آگلوتینه نمودن RBC گروه خونی O نخواهد بود. در عین حال در صورت تجدید کشت نمونه‌ها روی محیط مایع ۶۸٪ از نمونه‌ها هماگلوتیناسیون حساس به مانوز و ۳۲٪ از آن‌ها هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز را نمایش دادند. در ۸۹٪ از موارد تأییدکننده نتایج بررسی ملکولی نشان داد قطعات حاصل از برش محصول PCR، باندهای ۴۸۹ و ۷۰ جفت بازی مربوط به حالت روشن اپرون و قطعات ۳۵۹ و ۲۰۰ جفت بازی در حالت خاموش می‌باشند که به‌ترتیب در تلقیح سویه‌ها در محیط‌های مایع و جامد مشاهده شده‌است (شکل ۳).



شکل ۲. *هماگلوتیناسیون حساس به مانوز و هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز*

A: مجاورت باکتری و خون در غیاب مانوز B: مجاورت باکتری و خون در حضور مانوز



شکل ۳. *تعیین جهت گیری ناحیه سوئیچ کننده اپرون fim در پرو موتور ژن fim A براساس برش محصول PCR با اندونوکلئاز Hinf I . A و B باند مربوط به قطعات ۳۵۹bp و ۲۰۰ bp که معرف نمونه هایی است که در آنها اپرون fimخاموش می باشد. C. باند مربوط به قطعات ۴۸۹ bp و ۷۰bp نمونه هایی که در آنها اپرون fimدر هر دو حالت روشن و خاموش تعیین شده است.*

بحث

اشرشیاکلی رایج‌ترین کوکو باسیل گرم منفی در میان اعضای فلور میکروبی روده انسان است. صرف نظر از عفونت‌های گوارشی این باکتری، رایج‌ترین عفونت خارج روده‌ای آن، عفونت ادراری است. کمتر از ۱۲٪ از مردان و ۲۰٪ از زنان در طول زندگی خود دست کم‌یک بار عفونت حاد ادراری را تجربه می‌کنند (۱،۲). در خلال آغاز یک عفونت، در هریک از مکان‌های اکولوژیک میزبانی یک جمعیت هتروژن باکتریایی حضور دارد. این عدم تجانس باعث خواهد شد که عفونت با جمعیت‌های غالب باکتریایی گسترش‌یابد. این عدم تجانس امکان غلبه کردن بر شرایط غیر قابل پیش‌بینی میزبان‌ها و نیچ‌های متفاوت را فراهم می‌کند (۸). تغییرات فنوتیپیک سطحی باکتری منعکس‌کننده فرایندهای تنظیمی اختصاصی، متناسب با شرایط محیطی است. تحقیقات Snyder و همکاران نشان داده است که الگوهای متفاوت بیان فیمبریه بستگی به شرایط محیطی و رشد نظیر دما، محیط کشت و pH دارد و تغییر فاز مشاهده شده در عفونت‌های ادراری در نتیجه تفاوت محل استقرار آن‌ها می‌باشد (۹). دستگاه ادراری مثالی از یک محیط متنوع می‌باشد و عامل بیماری‌زای موفق در محیط‌های مجرای ادراری، مثانه و کلیه‌ها باید حاوی ادهسین‌های خاصی باشد که محرک پاسخ ایمنی التهابی هستند (۱۰). Schwan و همکاران در یک بررسی به نقش مهم فاکتورهای محیطی در تنظیم بیان اپرون‌های مولد فیمبریه

در اشرشیاکلی اشاره نموده‌اند (۱۱). Stenqvist و همکاران نقش تیپ‌یک فیمبریه در سیستیت‌های باکتریایی و تشکیل بیوفیلم‌های دستگاه ادراری را نشان داده و عنوان نمودند که فاکتورهای میزبانی و خصوصیات سطوح در ارتباط با باکتری، نقش مهمی در تنظیم بیان اپرون‌های مولد فیمبریه ایفا می‌نمایند. در محیط دارای آگار(جامد) باکتری توانایی تحرک خود را از دست می‌دهد، از سوی دیگر نشان داده شده‌است که بیان شدن اپرون *fla* که مسؤول سنتز تاژه می‌باشد، در ویرولانس اشرشیاکلی‌های پاتوژن مؤثر می‌باشد. علاوه براین بیان تاژه وتیپ یک فیمبریه برای تشکیل بیوفیلم ضروری می‌باشند. مدارکی دال بر وجود نوعی تنظیم Co – Ordinate میان این دو تیپ ارگانل در دسترس می‌باشد (۱۲). Lane و همکاران نشان دادند که *E.coli* متحرک قادر به بیان فیمبریه‌ی زیادی نخواهد بود. نتایج PCR این محققان نشان داد که بیان تیپ یک فیمبریه منجر به کاهش رونویسی ژن فلاژلین زیرواحد fliC می‌گردد (۱۳). Struve و Krogfelt بیان تیپ‌یک فیمبریه را در شرایط *in vivo* نشان دادند و عنوان نمودند که به هنگام عفونت تغییر فاز رخ می‌دهد (۶). پژوهش حاضر نشان داد زمانی که نمونه‌ها روی محیط کشت مایع تلقیح می‌گردد، بیان تیپ یک فیمبریه رو به افزایش می‌گذارد اما زمانی که نمونه‌ها روی محیط آگار دار تلقیح می‌گردد، نتایج معکوس حاصل می‌گردد. هنگامی‌که اپرون *fim* در موقعیت روشن است باکتری توانایی تحرک دارد و در حالت خاموش اپرون *fim* سویه‌های جدا شده متحرک بودند و این در حالی است که خاموش شدن اپرون *fim* به مفهوم افزایش بیان اپرون *pap* (کدکننده‌ی فیمبریه‌ی p) می‌باشد. قطعات حاصل از برش محصول PCR با نتایج حاصل از محققان قابل مقایسه می‌باشد (۲،۱۰،۱۱،۱۳). مدارکی در دست می‌باشد، که نشان می‌دهد در صورتی که باکتری در تماس با سطح جامد قرار گیرد، فاکتور تهاجمی فیمبریه‌ی تیپ یک را از دست خواهد داد. اما در صورتی که واجد اپرون *pap* در ژنوم خود باشد، احتمال بیان شدن این اپرون به دنبال خاموش شدن اپرون *fim* افزایش خواهدیافت. مفهوم آن این است که اگر جدایه‌های اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری، حاوی اطلاعات ژنتیکی لازم باشند، در تماس با سطوح مایع تیپ یک فیمبریه و در تماس با سطوح جامد فیمبریه‌ی P را عرضه خواهند کرد. نتیجه‌ی چنین رویدادی به‌ترتیب افزایش احتمال رخ داد سیستیت‌های باکتریایی (نواحی تحتانی دستگاه ادراری با سطوح مایع بیشتر) و پیلونفریت (نواحی فوقانی دستگاه ادراری با سطوح جامد بیشتر) خواهدبود (۱۰).

تحقیقات Boudeau و همکاران نشان داد که اتصال به واسطه تیپ‌یک فیمبریه در توانایی تهاجم این باکتری ضروری می‌باشد. حتی حذف‌شدن ژن mot B که به‌طور طبیعی جهت چرخش تاژه مورد نیاز می‌باشد، باعث ایجاد نقص در بیان تیپ‌یک فیمبریه در سویه جهش یافته می‌گردد. پایه‌های مولکولی چنین تنظیمی‌ناشناخته است. اما این‌گونه به نظر می‌رسد چنین تنظیمی در سطح ناحیه سوئیچ‌کننده *fim* و یا روی بیان‌شدن ریکامبینازها عمل می‌کند (۱۴). در این بررسی نشان داده شد که چنین مدارکی موید حضور نوعی شبکه تنظیمی‌هم عرضی برای کنترل عوامل ویرولانس می‌باشد. بیان شدن تیپ‌یک فیمبریه و تاژه منعکس‌کننده یک میان کنش دینامیک

ضروری میان اتصال و تحرک باکتری می‌باشند. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، مدارکی دال بر بیان شدن این فاکتورها به‌صورت هم‌عرض در اختیار می‌باشد. به این ترتیب حضور آگار در محیط مانع تحرک باکتری از طریق تنظیم منفی اپرون *fla* در اشرشیاکلی می‌باشد. اما از سوی دیگر تنظیم منفی این اپرون، خود عامل تنظیم منفی اپرون *fim* خواهد بود. در عین حال در محیط براث سیگنال‌های محیطی باعث تحریک بیان اپرون *fla* و در نتیجه تحریک بیان اپرون *fim* می‌گردد. این روی داد به معنای تنظیم هم عرض اپرون‌های *fla* و *fim* در باکتری اشرشیاکلی می‌باشد (۸). Xia و همکاران تنظیم متقاطع میان اپرون‌های *fim* و *pap* با توجه به فرایند تغییر فاز در بیان تیپ‌یک فیمبریه را نشان دادند (۱۵). بررسی بیان ژن‌های کدکننده‌ی عوامل بیماری‌زا در سروتیپ‌های شایع O باکتری اشرشیاکلی همواره مورد توجه محققان زیادی بوده است (۱۵،۱۶). در این پژوهش با توجه به تفاوت شیوع سروتیپ‌ها در جوامع مختلف، بیان تیپ‌یک فیمبریه و تاژه در سروتیپ شایع مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاصل با تحقیق Andrew و همکاران قابل مقایسه می‌باشد. این محققان نشان دادند که تنها سویه‌های O26 و O118 که از شایع‌ترین سروتیپ‌ها بودند قادر به بیان تیپ‌یک فیمبریه در حالت فاقد تحرک می‌باشند (۱۵،۱۷،۱۸). یافتن و درک چنین فرایندهای تنظیمی همراه با سایر فاکتورهای محیطی - میزبانی در آینده‌ای نه چندان دور امکان جایگزینی در مان‌های اکولوژیک محور را با درمان‌های تهاجم محور نظیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها که خود زمینه‌ساز انتخاب سویه‌های مقاوم می‌باشند فراهم خواهدنمود. از این طریق مکانیسم‌های بیان متقاطع میان ارگانل‌های سطحی، فراهم‌کننده بینش جامع‌تر و وسیع‌تر در مورد بیماری‌زایی باکتری اشرشیاکلی و حتی پیشگیری از آن خواهد بود.

Molecular Study of Phase Variation of Type 1 Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* O44 Serotypes during Touching with Solid Surfaces

Hosseini F., Ph.D.[1*], Moazzamee Goudarzee M., B.Sc.[2], Bembai B., Ph.D.[3], Moradi Bidhendi S., Ph.D.[4]

1. Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University North of Tehran Branch, Tehran, Iran
2. Master Student of Microbiology, Islamic Azad University North of Tehran Branch, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran, Iran.

* Corresponding author, e-mail: farzaneh953@yahoo.com

(Received 20 Oct. 2008 Accepted 29 Jan 2009)

Abstract

Background & Aims: *T*ype 1 fimbriae is the most common adhesion factor in urine tract infection. In this Study, presence of virulence genes in isolated strains of uropathogenic *E.Coli,* O serotyping and molecular detection of phase variation of type 1 fimbriae were assessed during solid surfaces exposure.

Methods: Isolated *E.coli* from urine samples of patients were serotyped by using serologic methods. Phenotypic estimation of phase variation was applied by mannose – resistant hemagglutination (MRHA). *Fim* opron phase variation was studied by *HinFI* digestion and PCR reaction.

Results: For all 158 *E.coli* strains, the most occurrences belonged to O_{44}. Forty nine percent of the isolates were mannose-sensitive and expressed *fim* operon in agar medium. While, 51% of strains were resistant to mannose in the same position. In Broth medium 68% of isolates were mannose-sensitive and 32% were mannose-resistant. PCR products with 359bp and 200bp long fragment demonstrated ON position and those with 489bp and 70bp long fragment indicated ON and OFF positions.

Conclusion: Uropathologic *E.coli* strains posses few number of O serotypes. Environmental factors play an important role in regulation of fimberiae operon expression. Strains recovered from these urine samples, however, were shown capable to switch the *fim* operon to the ON position after culture in broth medium. Type 1 fimbrial expression and flagella motility are probably representative of an essential dynamic interplay between bacterial adhesion and motility. The strains present in urine samples but nonattached to the epithelium are inactive for type 1 fimbriae expression.

Keywords: *Escherichia coli***,** Serotyping, PCR

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(3): 215-223

References

1. Lipsky BA. Urinary tract infections in men. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Ann Intern Med* 1989; 110(2): 138-50.
2. Johnson J.R., Stamm W.E.. Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1989; 111(11): 906-17.
3. Johnson J.R, stell A.L. Extended Virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181: 261-72.

4. Duguid JP, Old D.C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae, In: Beachey E. H. (editor.), Bacterial adherence, receptors and recognition. London, Chapman and Hall, 1980; PP185–216.

5. Klemm P. Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J* 1986; 5(6): 1389–93.

6. Struve C, Krogfelt K.A. *In vivo* detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology* 1999; 145(Part 10): 2683–90.

7. Gally DL, Bogan J.A, Eisenstein BI, Blomfield I.C. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* 1993; 175(19): 6186–93.

8. Snyder JA, Lloyd A.L, Lockatell C.V, Johnson D.E, Mobley HL. Role of phase variation of type 1 fimbriae in an uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect Immun* 2006; 74(2): 1387–93.

9. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003; 48(3): 781–94.

10. Backhed F, Alsen B, Roche N, Angstrom J, von Euler A, Breimer M.E, et al. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277(20): 18198-205.

11. Schwan W.R., Lee J.L, Lenard F. A, Matthews B. T, Beck M.T. Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002; 70(3): 1391–1402.

12. Stenqvist K, Sandberg T, Lidin-Janson G, Orskov F, Orskov I, Svanborg-Eden C. Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates from pregnant women. *J Infect Dis*1987; 156(6): 870–7.

13. Lane M.C, Simms A.N, Mobley H.L. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; 189(15): 5523–33.

14. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; 39(5): 1272–84.

15. Xia Y, Gally D, Forsman-Semb K, Uhlin BE. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* 2000; 19(7): 1450–7.

16. Godaly G, Frendeus B, Proudfoot A, Svensson M, Klemm P, Svanborg C. Role of fimbriae-mediated adherence for neutrophil migration across *Escherichia coli*-infected epithelial cell layers. *Mol Microbiol* 1998; 30(4): 725-35

17. Bryan A, Roesch P, Davis L, Moritz R, Pellett S, Welch RA. Regulation of type 1 fimbriae by unlinked fimB- and fimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *Infect Immun* 2006; 74(2): 1072–83

18. Roe A.J, Currie C, Smith D.G.E, Gally D.L. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiol* 2001; 147: 145-52.