مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

ردیابی فاکتورهای حدت ایزوله‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک از نمونه‌های سواب بالای واژن زنان نازا

فرهاد صفرپور دهکردی [۱]، حسن ممتاز [۲]، صدیقه اسماعیل زاده [۳]، مریم خیاط خامنه ای [۴]، عماد یاحقی [۵]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. مرکز تخصصی نازایی و ناباروری فاطمه زهرا بابل، بابل، ایران
۴. گروه زنان و مامایی ، دانشگاه علوم پزشکی آجا ، تهران ، ایران
۵. دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۲/۰۷/۱۰
پذیرش:۱۳۹۲/۱۰/۱۰
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۲۰
موضوع:
عفونت های بیمارستانی

IJMM 1392; 7(4): P 1-8

نویسنده مسئول:
دکتر فرهاد صفرپور دهکردی
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
تلفن: ۰۹۳۶۵۸۱۹۴۹۱
پست الکترونیک:
Phd.farhad@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: ایزوله‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک به‌عنوان معمول‌ترین دلیل عفونت‌های دستگاه ادراری، می‌توانند به دستگاه تناسلی انتقال پیدا کنند. فاکتورهای حدت متفاوت این باکتری‌ها سبب اتصال، حمله و آسیب به اپی تلیوم تناسلی می‌شوند. این مطالعه به‌منظور ردیابی فاکتورهای حدت ایزوله‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از سواب های بالا واژن زنان نازا انجام گرفت.

مواد و روش کار: در کل ۷۰ و ۳۰ نمونه سواب واژنی به ترتیب از زنان نازا و زایا اخذ شد. تمام نمونه‌ها کشت داده شدند و نمونه‌های مثبت برای ردیابی برخی از فاکتورهای حدت باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک با استفاده از واکنش PCR ارزیابی شدند.

یافته‌ها: سیزده نمونه از ۷۰ نمونه سواب بالای واژن زنان نازا ازنظر باکتری مثبت بودند (۱۸/۵۷٪). هیچ نمونه *اشریشیا کلی* مثبتی در زنان زایا وجود نداشت. هشت نمونه از نمونه‌های مثبت متعلق به زنان نازایی بود که سابقه عفونت‌های ادراری را داشتند (۶۱/۵۳٪). فراوان‌ترین ژن‌های حدت ردیابی شده *papGI* (۶۱/۸۴٪)، *set-1* (۹۲/۷۶٪)، *papGII* (۵۳/۶۱٪)، *papGIII* (۸۴/۵۳٪) و *sen* (۸۴/۵۳٪)، بودند.

نتیجه‌گیری: ایزوله‌های *اشریشیا کلی* بالای واژن ژن‌های حدت سوش های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک را داشتند. عفونت‌های دستگاه ادراری باید به‌خوبی درمان شوند تا از انتقال بالارونده آنها به واژن جلوگیری به عمل آید. مطالعات بیشتری به‌منظور مشخص کردن جنبه‌های اپیدمیولوژیکی *اشریشیا کلی* های یوروپاتوژنیک در ناحیه بالای واژن زنان نازا باید انجام پذیرد.

کلمات کلیدی : *اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک، فاکتورهای حدت، زنان نازا، سواب های بالای واژنی*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

از اوایل زندگی انسان تاکنون، افزایش تعداد جوامع بشری، شکل‌گیری شهرها و کشورها و در نهایت امروزه قدرت یک کشور و ثبات آن در یک منطقه، همگی مدیون افزایش جمعیت و تولیدمثل می‌باشند. علاوه بر این، مسائل روحی و روانی‌ای که در اثر مشکلات تولیدمثلی برای زوج‌های جوان به وجود می‌آید، می‌توانند جبران‌ناپذیر باشند. گزارش‌های پیشین نشان داده است که نازایی می‌تواند موجب طلاق، خودکشی، احساس گناه و سرزنش، استرس و افسردگی در زنان شود (۳-۱). متأسفانه امروزه نازایی یکی از جدی‌ترین مسائل پیش روی زوج‌های جوان است. به‌طور متوسط حدود ۷۲/۴ میلیون زن در سراسر دنیا با مشکل نازایی روبرو هستند (۳-۱). از طرفی حدود ۳۰٪ از عوامل ایجادکننده نازایی در زنان و مردان ناشناخته هستند (۳-۱). اهمیت نازایی در زنان به دلیل پیچیدگی‌هایی که در اپیدمیولوژی بروز نازایی وجود دارد، به‌مراتب مهم‌تر از مردان است؛ بنابراین

یافتن عوامل جدیدی که می‌توانند به شکل بالقوه سبب ایجاد نازایی در زنان شوند، بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

علاوه بر عوامل هورمونی، آناتومیکی و مادرزادی که سبب بروز نازایی در زنان می‌شوند، عوامل عفونی متفاوتی از جمله *کلامیدیا تراکوماتیس* (۴)، *تریکوموناس واژینالیس* (۵)، *کاندیدا آلبیکنس*(۶)، *نیسریا گونورهه آ* (۶)، *مایکوپلاسما هومینیس* (۷)، *اوره اپلاسما اوره آلیتیکوم* (۷)، *گاردنرلا واژینالیس* (۸) و *توکسوپلاسما گوندی* (۹) به‌عنوان پاتوژن‌های اصلی ایجادگر عفونت‌های تناسلی و نازایی در زنان به شمار می‌روند. اخیراً باکتری *اشریشیا کلی* در بررسی‌هایی کم‌وبیش پراکنده و محدود علاوه بر این‌که از ناحیه گردن رحم زنان نازا با عامل ناشناخته جداسازی شده است (۱۴-۱۰)، عامل پایومترا در زنان معرفی گردیده است (۱۴-۱۰).

باکتری *اشریشیا کلی* پاتوژن ادراری (UPEC-یوروپاتوژنیک) اصلی‌ترین عامل ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری (UTIs) در انسان و خصوصاً زنان است (۱۵). سوش های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک مسئول ۹۰-۷۰٪ از عفونت‌های ادراری در زنان هستند (۱۶). به دلیل نزدیک بودن مجرای ادراری با دستگاه تناسلی در زنان، همواره امکان انتقال عوامل عفونی از دستگاه ادراری به تناسلی و برعکس وجود دارد (۱۷). در صورت تحقق این موضوع، باکتری *اشریشیاکلی* پاتوژن ادراری به‌واسطه فاکتورهای حدت متفاوتی ازجمله فیمبریه P (pap)، فیمبریه S (sfa)، فیمبریه مربوط به اتصال باکتری (afa)، همولیزین (hly)، فاکتور نکروز دهنده سایتوتوکسیک (cnf-1)، آئروباکتین (eae)، فاکتور fim (Fimbriae) و فاکتورهای حدت usp (Uropathogenic Specific Protein)، sigA (Sigma factor)، set-1 (Shigella enterotoxin 1)، sen (Shigella enterotoxin)، kspmt (جز ماکر های ExPEC و کد کننده کپسول باکتری) و astA (Arginine succinyltransferase یا EAST1 toxin)، می‌تواند موجب ایجاد آسیب در ناحیه واژن زنان و بروز مشکل شود. یکسری از ژن‌های ذکرشده وظیفه اصلی را در اتصال باکتری به مخاط و سطوح اپی تلیومی مجاری ادراری دارند (fim، sfa، afa، pap) و سایر ژن ها نقش‌های اساسی در حمله و آسیب به سطوح مخاطی (hly، sfa، usp، set-1، eae و astA)، بروز واکنش‌های التهابی (pap، hly، sfa و usp)، تجزیه سلول‌های هسته‌دار و آپوپتوزیس سلول‌های بیگانه‌خوار (hly) و در نهایت بروز پیلونفریت، عفونت مجاری ادراری و التهاب مثانه (pap، fim، usp، sfa، afa، hly، astA، eae، kspnt، sen و sigA) دارند (۱۵، ۱۷). بررسی‌ها نشان‌دهنده افت سیستم ایمنی مخاطی در ناحیه واژن زنان نازا هستند (۱۸، ۱۹)؛ بنابراین نفوذ، اتصال و حمله باکتری *اشریشیا کلی* پاتوژن ادراری به این ناحیه در مقایسه با زنان زایا فوق‌العاده بیشتر خواهد شد.

ازاین‌رو منطقی به نظر می‌رسد که مطالعه حاضر را به‌منظور جداسازی و بررسی فراوانی فاکتورهای حدت *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک از ناحیه بالای واژن زنان نازا، انجام دهیم.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌ها و جداسازی و تائید حضور *اشریشیا کلی*

به‌منظور انجام این مطالعه مقطعی (Cross-sectional) در تابستان ۱۳۹۲ در یک دوره ۳ ماهه، ۷۰ نمونه سواب از ناحیه بالای واژن زنان نازا و ۳۰ نمونه سواب از ناحیه بالای واژن زنان زایا که به مرکز باروری و ناباروری فاطمه زهرا بابل مراجعه کرده بودند، اخذ گردید. زنان نازا همگی نازایی اولیه داشتند و تحت درمان قرار نگرفته بودند. هیچ‌کدام از زنان زایا مشکل نازایی یا ناباروری نداشتند و صرفاً برای چکاب معمول به مرکز مراجعه کرده بودند. به‌منظور نمونه‌گیری ابتدا با استفاده از اسپکلوم، دیواره قدامی واژن (محل مجرای ادرار) پوشیده می‌شود و سواب هایی که با سرم فیزیولوژی استریل مرطوب شده بودند، به‌اندازه ۱۰ سانتی‌متر در قسمت بالای واژن فرورفته و نمونه‌ها بدون تماس با دیواره‌ها و قسمت خارجی، اخذ شدند. تمام سواب های اخذشده ابتدا در محیط آب پپتونه قلیایی (مرک، آلمان) تلقیح شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. سپس در عرض ۱۰-۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس و با رعایت شرایط استریل به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی و بیماری‌های عفونی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه در محیط Mac Conkey agar (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. کلنی‌های تیپیک رشد کرده که دارای خصوصیات ظاهری *اشریشیا کلی* بودند (کلنی‌های صورتی‌رنگ)، با آنس استریل برداشته‌شده و دوباره در محیط آگار خون‌دار کشت و گرم‌خانه گذاری شدند (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس). درنهایت کلنی‌های رشد

کرده در محیط آگار خون‌دار به محیط EMB agar (Merck, Germany) انتقال یافتند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. کلنی‌های سبز متالیک رشد کرده در محیط EMB agar به‌عنوان باکتری *اشریشیا کلی* تیپیک موردپذیرش قرار گرفتند. باکتری‌های تائید شده با آزمون‌های بیوشیمیایی اندول، متیل رد، سیترات، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI و تست اوره آز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور تائید تشخیص از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طراحی‌شده توسط Sabat و همکاران (**۲۰**) استفاده شد.

استخراج DNA

باکتری‌های رشد کرده در طول یک‌شب در محیط Trypticase Soy Agar (TSA, Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند و DNA ژنومی به‌وسیله کیت استخراج DNA (شرکت فرمنتاز لیتوانی) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ردیابی ژن‌های حدت *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک

فراوانی هر یک از ژن‌های حدت *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک با استفاده از چندین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفت. لیست پرایمر های مورداستفاده برای ردیابی ژن‌های حدت سوش های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از زنان نازا در جدول ۱ آمده است (**۲۱**). اجزا هر یک از واکنش‌های PCR، حجم واکنش و برنامه حرارتی در جدول ۲ آمده است (**۱۵**). در تمام واکنش‌های PCR از دستگاه PCR ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان (Eppendorf Mastercycler-Nethel-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)، استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند، سپس ژل‌ها توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و نوارهای DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی گردیدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون‌های آماری مربع کای و فیشر تجزیه‌وتحلیل گردید و اختلافات آماری بین حضور و فراوانی انواع فاکتورهای حدت در سویه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک جداشده از زنان نازا بر پایه ضریب اطمینان ۹۵٪ (P-value<۰/۰۵) موردبررسی قرار گرفت (**۱۵**).

اصول اخلاقی

در بررسی حاضر نمونه‌های سواب بالای واژنی از زنانی نازا و زایایی که برای کمک به انجام این مطالعه داوطلب شده بودند و رضایت‌نامه مربوط به نمونه‌گیری را تکمیل کرده بودند، اخذ گردید. تمام هماهنگی‌های لازم بین مرکز نازایی و ناباروری فاطمه زهرا بابل و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام پذیرفت.

یافته‌ها

در بررسی حاضر به‌منظور قرار دادن کنترل برای آزمایش، ۳۰ نمونه سواب نیز از زنانی که زایا بودند و صرفاً برای چکاب به مرکز نازایی و ناباروری مراجعه کرده بودند، اخذ گردید. فراوانی باکتری اشریشیا کلی جداسازی شده از زنان نازا و زایا در جدول ۳ آمده است. بررسی حاضر نشان داد که هیچ‌کدام از زنان نازا آلوده به باکتری اشریشیا کلی نبودند. از کل ۷۰ نمونه سوابی که از زنان نازا اخذ گردید، ۱۳ نمونه (۱۸/۵۷ درصد) آلوده با باکتری اشریشیا کلی بودند (جدول ۳).

فراوانی فاکتورهای حدت یوروپاتوژنیک در *اشریشیاکلی*‌های جداسازی شده از زنان نازا در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که فاکتورهای papGI، set-1، papGII، papGIII و sen به ترتیب با فراوانی ۸۴/۶۱٪، ۷۶/۹۲٪، ۶۱/۵۳٪ ۵۳/۸۴٪ و ۵۳/۸۴٪ شایع‌ترین فاکتورهای حدت *اشریشیا کلی‌های* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از سواب های بالای واژن زنان نازا بودند. ژن‌های حدت kspmT ۶۹/۷٪ و sap۳۸/۱۵٪ کم‌ترین فراوانی را در *اشریشیاکلی* های یوروپاتوژنیک جداسازی شده از زنان نازا داشتند (جدول ۳). از ۱۳ نمونه‌ای که از زنان نازا اخذشده بود، هشت نمونه مربوط به زنانی بوده است که سابقه عفونت ادراری داشته‌اند (۶۱/۵۳٪). اختلاف آماری معنی دار در حد P<0/05

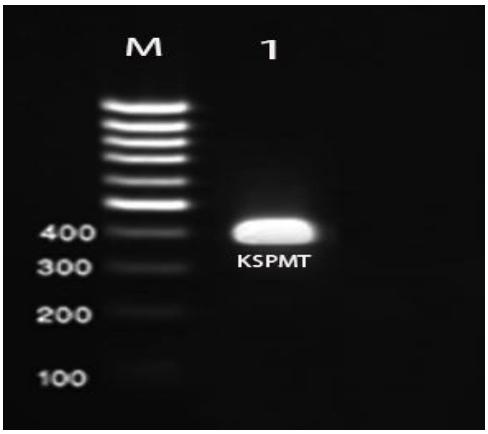
جدول ۱: لیست پرایمر های مورداستفاده برای ردیابی ژن‌های حدت در *اشریشیا کلی‌های* یوروپاتوژنیک جداشده از زنان نازا

ژن هدف	توالی پرایمر (’5-3’)	اندازه محصول (bp)	منابع
set-1	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAATGACG	147	(21)
sen	ATGTGCCTGCTATTATTTAT CATAATAATAAGCGGTCAGC	799	(21)
astA	ATGCCATCAACACAGTATAT GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	110	(21)
sigA	TCCTCGGTATTATTTTATCC CGTAACCCCTGTTGTTTCCAC	408	(21)
sap	TACCCTCCACAACAGAGAATG TACCCTCCACAACAGAGAATG	832	(21)
papGI	TCGTGCTGAGGTCCGGAATTT TGGCATCCCCCAACATTATCG	461	(22)
papGII	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT CGGGCCCCCAAGTAACTCG	190	(22)
papGIII	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG CCACCAAATGACCATGCCAGAC	258	(22)
kpsmT	CCATCGATACGATCATTGCACG ATTGCAAGGTAGTTCAGACTCA	400	(23)

جدول ۲: حجم، فرایند دمایی و تعداد سیکل واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (**۱۵**).

ژن‌های هدف	برنامه PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
usp	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 2 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 30 s 58 ^{0C} ---------- 30 s 73 ^{0C} ---------- 30 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 10 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM $Mgcl_2$ 200 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template
kpsmT	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 10 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 60 s 60 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 1.5 mM $Mgcl_2$ 250 µM dNTP (Fermentas) 1.25 pmoL of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 4 µL DNA template
papGI, papGII, papGIII	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 2 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 60 s 69 ^{0C} ---------- 30 s 72 ^{0C} ---------- 2 min 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 10 min	5 µL PCR buffer 10X 1.25 mM $Mgcl_2$ 100 µM dNTP (Fermentas) 1 µM of each primers F & R 1.5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3.5 µL DNA template
sen, set1, astA, sigA, sap	1 cycle: 94 ^{0C} ---------- 3 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 30 s 55 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 60 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 5 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM $Mgcl_2$ 150 µM dNTP (Fermentas) 0.5 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template

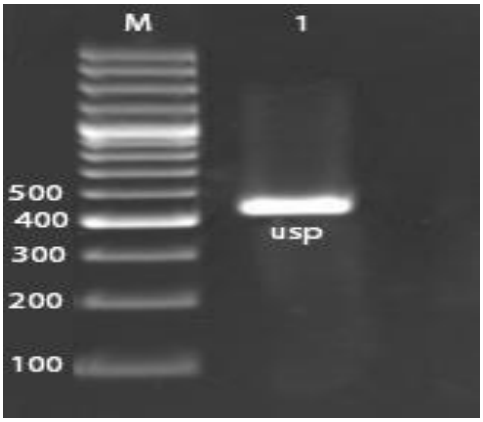
بین میزان شیوع ژن‌هایkspmT و sigA با ژن‌های papGI و set-1 مشاهده شد. به‌منظور تائید تشخیص، محصول PCR به‌دست‌آمده از هرکدام از نمونه‌های مثبت ازنظر حضور باکتری و فاکتورهای حدت، توالی یابی شدند. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از تکنیک BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های بررسی حاضر با موارد ثبت‌شده در بانک ژنی مشابهت داشتند.



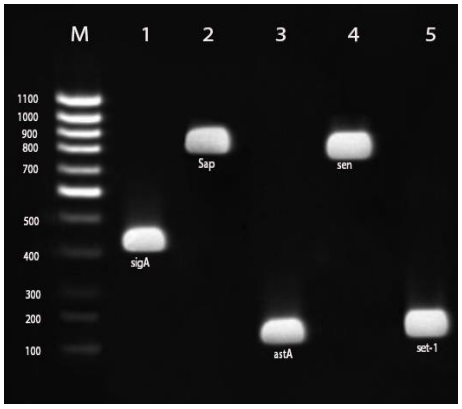
شکل ۱: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور ردیابی ژن حدت.:M مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, GmbH, Germany. 100-3000 bp) و ۱: نمونه مثبت.

جدول3: فراوانی باکتری اشریشیا کلی و فاکتورهای حدت یوروپاتوژنیک در زنان نازا

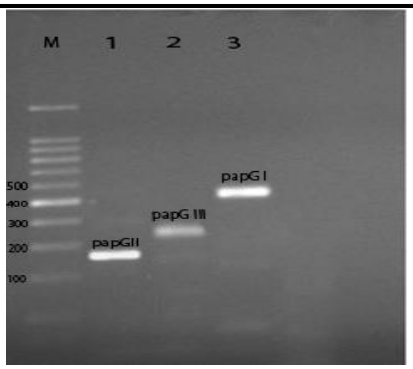
نوع نمونه (تعداد)	نمونه‌های مثبت (٪)	فراوانی فاکتورهای حدت (٪)									
		kspmT	***usp***	***astA***	***sen***	***Set-1***	***sigA***	***sap***	***papGI***	***papGII***	***papGIII***
زنان نازا (۷۰)	۱۳ (۱۸/۵۷)	۱ (۷/۶۹)	۳ (۲۳/۰۷)	۴ (۳۰/۷۶)	۷ (۵۳/۸۴)	۱۰ (۷۶/۹۲)	۵ (۳۸/۴۶)	۲ (۱۵/۳۸)	۱۱ (۸۴/۶۱)	۸ (۶۱/۵۳)	۷ (۵۳/۸۴)
زنان زایا (۳۰)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
کل (۱۰۰)	۱۳ (۱۳)	۱ (۷/۶۹)	۳ (۲۳/۰۷)	۴ (۳۰/۷۶)	۷ (۵۳/۸۴)	۱۰ (۷۶/۹۲)	۵ (۳۸/۴۶)	۲ (۱۵/۳۸)	۱۱ (۸۴/۶۱)	۸ (۶۱/۵۳)	۷ (۵۳/۸۴)



شکل ۲: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور ردیابی ژن حدت.:M مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, GmbH, Germany. 100-3000 bp) و ۱: نمونه مثبت.



شکل ۳: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور ردیابی ژن‌های حدت.:M مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, GmbH, Germany. 100-3000 bp) و ۵-۱: نمونه مثبت.



شکل ۴: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور ردیابی ژن‌های حدت:M. مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, GmbH, Germany, 100-3000 bp) و ۳-۱: نمونه مثبت.

بحث

بررسی حاضر برای اولین بار در جهان به‌منظور جداسازی باکتری اشریشیاکلی و ردیابی مولکولی فاکتورهای حدت یوروپاتوژنیک papGI، papGII، papGIII، usp، kspmT، astA، sigA، sen، set-1 و sap از سوش های جداسازی شده از زنان نازا انجام پذیرفت. نتایج ما نشان داد که تمام ۱۳ سویه اشریشیا کلی جداسازی شده درروش کشت، با روش PCR تائید شدند. درنتیجه باکتری‌هایی که در ناحیه بالای واژن زنان نازا حضور داشتند زنده و قابلیت رشد داشتند. فراوانی بالای ژن‌های حدت بررسی‌شده که تماماً در بررسی‌های Momtaz و همکاران (۱۵) و Soto و همکاران (۲۱) به‌عنوان فاکتورهای حدت یوروپاتوژنیک و عامل ایجاد آسیب به اپی تلیوم مجاری ادراری برشمرده شده بودند، نیز بیانگر توانایی‌های بالقوه باکتری‌های جداسازی شده برای ایجاد آسیب به نواحی بالای واژن زنان نازا است.

ژن‌های pap ردیابی شده در بررسی حاضر وظیفه اتصال به لایه موکوسی، ماتریکس بافتی و تولید سایتوکین را دارند (۲۴). اتصال آنها به گیرنده‌های اپی تلیال سبب تولید سرامید و فعالیت شدید علیه گیرنده TLR-4 ۴ (Toll-like Receptors)، می‌شود (۲۵). TLR-4 وظیفه اصلی را در القا و شروع پاسخ‌های ایمنی بر عهده دارد (۲۵). این رخداد سبب بروز واکنش‌های آماسی و افزایش درد می‌شود (۲۵). وظایف دیگری همچون القاء آپوپتوزیس سلول‌های ایمنی، اتصال به سلول‌های اپی تلیال مجاری ادراری، تسهیل در نفوذ و پخش عفونت، تداخل با عمل فاگوسیتوز سلول‌های ایمنی چندهسته‌ای و تخریب سلول‌های مثانه، برای سایر فاکتورهای حدت باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک در نظر گرفته‌شده است (۱۶).

در کل ۱۸/۵۷٪ از زنان نازا در بررسی حاضر آلوده به باکتری اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک بودند. Umolu و همکاران (۲۰۰۶) (۲۶) نشان دادند که ۲۵٪ از سواب های بالای واژن زنان آلوده به باکتری اشریشیا کلی بوده است که از نتایج بررسی ما بیشتر است. همچنین فراوانی باکتری اشریشیا کلی در نمونه‌های سواب بالای واژن زنان پاکستان (۲۷) و ژاپن (۲۸) به ترتیب ۲۸٪ و ۳/۴۱٪ بوده است. فراوانی‌های متفاوتی که برای باکتری اشریشیا کلی در نمونه‌های سواب بالای واژنی زنان در بررسی‌های متفاوت به‌دست‌آمده است احتمالاً به دلیل نوع نمونه‌های اخذشده (نازا یا زایا بودن، آبستن یا غیر آبستن، ازدواج‌کرده یا نکرده، طلاق گرفته یا متأهل و ...)، روش نمونه‌گیری، روش انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی و سطح فرهنگ جوامع، می‌باشد.

بیش از نیمی از زنان بررسی حاضر سابقه عفونت‌های ادراری داشتند. نتایج بررسی پیشین نشان می‌دهد که احتمال جایگزین شدن باکتری اشریشیا کلی در ناحیه واژن زنانی که از عفونت‌های ادراری راجعه رنج می‌برند به‌مراتب بیشتر از زنان سالم است (۷) که خود می‌تواند تأییدی بر یافته‌های ما باشد.نتایج بررسی Obata-Yasuoka و همکاران (۲۸) نشان داد که ۴۵، ۲۲، ۱۹، ۷۸، ۳۲ و ۴۴٪ از *اشریشیا کلی‌های* جداسازی شده از ناحیه واژنی زنان ازنظر حضور ژن‌های حدت pap، hly، cnf-1، PAI، ibeA و k1، مثبت بودند که در مورد ژن pap با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. حضور بالای ژن‌های pap، usp، set-1 و sen در بررسی‌های Momtaz و همکاران (۱۵)، Foxman (2003)و Johnson (۲۹)، گزارش‌شده است. در بررسی Birosová و همکاران (۳۰) فاکتورهای حدت hly، cnf-1، pap و sfa در سوش های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از سواب های واژنی زنان مبتلا به عفونت‌های ادراری، ردیابی شدند. فراوانی فاکتورهای حدت afa، fim، irp2، hly، iuc، cnf-1 و pap در سوش های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از واژن زنان بالغ در رومانی (۳۱) به ترتیب ۵، ۹۸، ۸۵، ۵۲، ۵۱، ۴۸ و ۴۳ درصد گزارش شد که با نتایج بررسی حاضر مشابهت دارد. در بررسی مشابه دیگری Guiral و همکاران (۳۲) فراوانی فاکتورهای حدت hly، cnf-1، sat1، pap، sfa، iha، iuc و iroN را در سوش های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از زنان آبستن به ترتیب ۴۲، ۴۲، ۱۳، ۵۲، ۲۵، ۱۷، ۳۳ و ۶۵ درصد گزارش نمودند. نکته قابل‌توجه در بررسی آنها فراوانی بیشتر فاکتورهای حدت در زنان آبستن نسبت به زنان غیر آبستن بوده است. نتایج بررسی حاضر نشان‌دهنده

حضور بالای فاکتورهای papGI، papGII و papGIII (به ترتیب ۸۴/۶۱، ۶۱/۵۳ و ۵۳/۸۴٪) در سوش های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک جداسازی شده از ناحیه بالای واژن زنان نازا بود. بررسی مشابه دیگری بر روی زنان باسابقه عفونت‌های ادراری (**۳۳**) نشان داد که فراوانی فاکتورهای papGI، papGII و papGIII به ترتیب ۴۱، ۱۰ و ۱۵٪ بوده است که با نتایج ما مشابهت دارد. نتایج مشابه دیگری در مورد شیوع بالای ژن‌های گروه pap در سوش های جداسازی شده از ناحیه واژن زنان در بررسی‌های Guiral و همکاران (**۳۲**)، Birosová و همکاران (**۳۰**) و Usein و همکاران (**۳۱**) گزارش‌شده است.

بررسی حاضر نشان‌دهنده فراوانی بالای باکتری *اشریشیا کلی* در نمونه‌های سواب بالای واژن اخذشده از زنان نازا می‌باشد. در کل ۱۸/۵۷٪ از زنان نازا آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* بودند. فاکتورهای حدت یوروپاتوژنیک papGI، papGII، papGIII، usp، kspmT، astA، sigA، sen، set-1 و sap نیز فراوانی زیادی در موارد مثبت داشتند. در بررسی حاضر فراوان‌ترین فاکتور حدت papGI ۶۴/۸۱٪ و کمیاب‌ترین فاکتور حدت kspmt ۶۹/۷٪ بود. احتمالاً حضور بالاتر ژن‌های گروه pap که در بررسی ما و مطالعه های پیشین به‌مراتب از سوش های *اشریشیاکلی* ناحیه واژنی زنان گزارش شد می‌تواند مؤید این موضوع باشد که *اشریشیاکلی* های ناحیه بالای واژن زنان P فیمبیره فعالی دارند و از این طریق به راحتی می‌توانند به مخاط ناحیه اتصال یابند و پاسخ‌های التهابی را القا کنند. ازآنجایی‌که منبع اصلی باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک دستگاه ادراری است و فاصله بین دستگاه ادراری و تناسلی در زنان بسیار نزدیک است لذا به نظر می‌رسد که منبع اصلی *اشریشیاکلی* های یوروپاتوژنیک بررسی ما دستگاه ادراری بوده است. وجود سابقه عفونت‌های ادراری در ۶۱/۵۳٪ از زنان آلوده در بررسی حاضر می‌تواند تأییدی بر این ادعا باشد. در کل نویسندگان بررسی حاضر انجام مطالعات بیشتر به‌منظور جداسازی و خصوصیت یابی باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک از ناحیه واژن زنان نازا را پیشنهاد می‌کنند. در صورت امکان توالی یابی *اشریشیاکلی* های جداشده از ناحیه بالای واژن زنان نازا و نمونه‌های ادرار آنها می‌تواند برای تائید حضور *اشریشیاکلی* های یوروپاتوژنیک در ناحیه بالای واژن، بسیار کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر کمال تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای دکتر میرنژاد معاون پژوهشی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) و سرکار خانم دکتر صدیقه اسماعیل‌زاده مدیر مرکز باروری و ناباروری بیمارستان فاطمه الزهرا بابل، اعلام می‌دارند.

References

1. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: The case of ART in developing countries. In: Report of a meeting on "Medical, Ethical, and Social Aspects of Assisted Reproduction. Vayena E, Rowe P, Griffin D. Geneva. 2nd ed. WHO; 2001.p. 16-21. 2001.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human Reproduction. 2007;22(6):1506-1512.
3. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Human Reproduction Update. 2008;14(6):605-621.
4. Siemer J, Theile O, Larbi Y, Fasching PA, Danso KA, Kreienberg R, Essig A. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for infertility among women in Ghana, West Africa. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;78(2):323-7.
5. Sharma P, Malla N, Gupta I, Ganguly NK, Mahajan RC. Prevalence of trichomoniasis in symptomatic and asymptomatic subjects using different contraceptive devices. Indian Journal of Medical Microbiology. 1988;6(4):315-322.
6. Okonofua FE, Ako-Nai KA, Dighitoghi MD. Lower genital tract infections in infertile Nigerian women compared with controls. Genitourinary Medicine. 1995;71(3):163–168.
7. Grześko J, Elias M, Maczyńska B, Kasprzykowska U, Tłaczała M, Goluda M. Frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in cervical canal and the Douglas pouch of infertile and fertile women. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia. 2007;59(2):169-75
8. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Gamerre M, Bretelle F.High vaginal concentrations of *Atopobiumvaginae and Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. Obstetrics and Gynecology. 2010;115(1):134-140.
9. Al-Hindi A, Al-Helou T, Al-Helou Y.S eroprevalence of *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus, rubella virus and *Chlamydia trachomatis* among infertile women attending in vitro fertilization center, Gaza strip, Palestine. Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 2010;40(2):451-458
10. Elegbe IA, Adefioye AA, Elegbe I.Aerobic urethral flora of women with infertility and gynecologic problems. International Journal of Gynaecology and Obstetrics. 1983;21(3):241-245.
11. Prabha V, TeenaDhir A, Kaur S. Bacteriological Study of the Cervix of Females Suffering from Unexplained Infertility. American Journal of Biomedical Science. 2011;3(2):84-89.

12. Anchana Devi C, Ranjani A, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Ramanidevi T. Surveillance of multidrug resistant bacteria pathogens from female infertility cases. African Journal of Biotechnology. 2013;12(5):412-413.
13. Ekhaise FO, Richard FR. Common Bacterial Isolates Associated with Semen of Men Complaining of Infertility in University of Benin Teaching Hospital (U.B.T.H), Benin City, Nigeria. World Journal of Medical Science. 2008;3(1):28-33.
14. Okonofua FE. Female and male infertility in Nigeria. Study on the epidemiology of infertility in Nigeria with the special references to the role of genital tract infections and sexual and reproductive risk factors. Department of Public Health Services, Division of International Health, Stockholm; Karolinska University Press; 2005.
15. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013;12:8.
16. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Disease-a-Month. 2002;113(Suppl 1A):5S-13S
17. Stamey TA, Sexton CC. The role of vaginal colonization with enterobacteriaceae in recurrent urinary infections. Journal of Urology. 1975;113(2):214-277.
18. Kornats'ka AH. Local humoral immunity in women with combined forms of infertility. Likars'ka sprava's. 1998;(4):82-84.
19. Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, Beagley K, Knox CL. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. Human Reproduction. 2011;26(7):1799-1812.
20. Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM. Selective and sensitivemethod for PCRamplification of *Escherichia coli* 16SrRNAgenesin soil. Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(2):844–849.
21. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. Microbial Pathogenesis. 2009;47(6):305-307.
22. Johnson JR, Brown JJ. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal (alpha 1-4) Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases. 1996;173(4):920-926.
23. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors iroN, iha, kpsMT, ompT and usp in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. Journal of Urology. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2490-2493.
24. Godaly G, Bergsten G, Frendéus B, Hang L, Hedlund M, Karpman D, Samuelsson P, Svensson M, Otto G, Wullt B, Svanborg C. Innate defences and resistance to gram negative mucosal infection. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2000;485(3):9-24.
25. .۲۵Fischer H, Ellstr¨om P, Ekstr¨om K, Gustafsson L, Gustafsson M, Svanborg C.Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. Cellular Microbiology. 2007;9(5):1239-51.
26. Umolu PI, Omigie O, Tatfeng Y, Omorogbe FI, Aisabokhale F, Ugbodagah OP. Antimicrobial Susceptibility and Plasmid Profiles of Escherichia coli Isolates Obtained from Different Human Clinical Specimens in Lagos – Nigeria. Journal of American Science. 2006;2(4):70-76.
27. Kazi YF, Saleem S, Kazi N. Investigation of vaginal microbiota in sexually active women using hormonal contraceptives in Pakistan. BMC Urology. 2012;12:22.
28. Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H. Vaginal *E. coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal E. coli. Microbiology. 2002;148(Pt 9):2745-2752.
29. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews. 1991;4(1):80-128
30. Birosová E, Siegfried L, Kmet'ová M, Makara A, Ostró A, Gresová A, Urdzík P, Liptáková A, Molokácová M, Bártl R,Valanský L. Detection of virulence factors in alpha-haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from various clinical materials. Clinical Microbiology and Infection. 2004;10(6):569-573.
31. Usein C, Grigore LA, Georgescu RM, Bãltoiu MC, Condei1 M, Teleman MD. Phylogenetic background and extraintestinal virulence genotypes of *Escherichia coli* vaginal strains isolated from adult women. Revista Română de Medicină de Laborator. 2011;19(1/4):37-45.
32. Guiral E, Bosch J, Vila J, Soto SM. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. FEMS Microbiology Letters. 2011;314(2):170-173.
33. Petkovsek Z1, Elersic K, Gubina M, Zgur-Bertok D, Starcic Erjavec M. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(6):1811-7.