

پلاسمید رپلیکون تایپینگ سروتپ های O2، O6 و O157 باکتری/شریشیاکلای با استفاده از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار (PBRT)

آرزو کشتگر (MSc)^۱، احمد راشکی (PhD)^{۲*}، فاطمه حدادی (PhD)^۱

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه پاتوفیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت: ۹۶/۱۰/۶، اصلاح: ۹۶/۱۲/۱۵، پذیرش: ۹۷/۱/۶

خلاصه

سابقه و هدف: امروزه از روش PCR مبتنی بر تکثیر گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی در مطالعات اپیدمیولوژیکی برای توصیف انتشار صفاتی چون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه استفاده می شود. علی رغم نقش حیاتی پلاسمید ها در انتقال عوامل بیماری زا، مطالعات چندانی روی نوع پلاسمیدهای حمل شده توسط سروتپ های باکتری/شریشیاکلای انجام نگرفته است. هدف اصلی این مطالعه دسته بندی پلاسمید های سروتپ های O2، O6 و O157 باکتری/شریشیاکلای بر اساس گروه های ناسازگار عمده پلاسمیدی به روش Multiplex-PCR می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۴۰ ایزوله/شریشیاکلای متعلق به سروتپ های O2، O6 و O157 به منظور شناسایی ۸ رپلیکون پلاسمیدی (*IncFIB* *IncN*، *IncI1* *IncFIA* *IncFIC* *IncFIIA* *IncB/O* *FreP*، Multiplex – PCR انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که امپلیکون Fre با ۸٪ و رپلیکون های *IncN*(25%)، *IncI1*(50%)، *IncB/O*(53%)، *IncFIA*(60%)، *IncFIB*(78%) در بین ۴۰ ایزوله مورد مطالعه مشاهده شد. رپلیکون *IncFIIA* و *IncFIC* در هیچکدام از ایزوله ها مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه بیانگر تنوع بالای گروه های ناسازگار پلاسمیدی در بین ایزوله های مورد مطالعه بود.

واژه های کلیدی: پلاسمید، Multiplex-PCR، رپلیکون.

مقدمه

به طور طبیعی پلاسمید های باکتریایی عناصر خود تکثیر شونده و متنوعی هستند که صفاتی چون مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین، ماندگاری و سازگاری در محیط و حدت را برای باکتری ها رمزگذاری می کنند(۱و۲). همچنین پلاسمیدها عامل اصلی انتقال افقی ژن ها (HGT) هستند که نقش مهمی در سازگاری باکتری نسبت به تغییرات محیطی دارند(۳). علاوه بر این، پلاسمید ها می توانند به پویایی ژنوم باکتری از طریق حمل عناصر قابل انتقال و ترانسپوزون ها و الحاق آنها در کروموزوم باکتری (نوترکیبی همسان و یا غیر همسان) کمک کنند(۱). به دلیل نقش آنها در HGT (۱)، به ویژه در رابطه با ظهور و انتشار مقاومت های ضد میکروبی (۴و۵) توجه زیادی به شناسایی و طبقه بندی پلاسمید های باکتریایی شده است. به طور معمول پلاسمید ها را بر اساس ناسازگاری آنها با یکدیگر (صفتی در ارتباط با تکثیر و یا همانند سازی پلاسمید ها) طبقه بندی می کنند(۶). تایپینگ پلاسمید ها بر اساس ناسازگاری (Inc) بر این واقعیت استوار است که دو پلاسمیدی

که توالی دخیل در همانند سازی و جدا سازی DNA مشابه ای دارند قادر به تکثیر در یک میزبان نیستند(۶). از آنجاییکه تایپینگ ناسازگاری (Inc) بر اساس فاکتورهای همانند سازی آنها است، بنابر این از اصطلاحات Inc و Rep برای توصیف انواع پلاسمیدها در یک میزبان استفاده می شود (۷و۸). در حال حاضر ۲۷ گروه ناسازگار (Inc) در میان خانواده انتروباکتریاسه شناسایی شده است. طبقه بندی پلاسمیدها براساس گروه های ناسازگار به دلیل نقش آنها در مقاومت های آنتی بیوتیکی و انتقال فاکتور های بیماری زا بسیار مطلوب و کاربردی است (۱۰-۱۵و۲). متأسفانه، مطالعه بر اساس ناسازگاری فیزیکی به ویژه هنگامی که به جمعیت باکتری های بزرگ اعمال می شود، خسته کننده و زمان بر است. در سال ۱۹۸۸ در مطالعه ای Couturier و همکاران از روش هیبریداسیون برای تایپینگ مقایسه ای پلاسمیدهای باکتریایی براساس نوع همانند سازی آنها از ۱۹ پروب مرتبط با ۱۹ گروه ناسازگار مختلف استفاده کردند. اگر چه این روش نشان دهنده

این مقاله حاصل پایان نامه آرزو کشتگر دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵۰۳۴۱۹ دانشگاه علوم پزشکی زابل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر احمد راشکی

آدرس: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۰۵۴-۲۴۸۲۲۲۵۰

E-mail: ah_rashki@usal.es

استخراج DNA ژنومی: ابتدا ایزوله ها در محیط کشت LB (شرکت HiMedia کشورهند) براث کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (Labnet International, Inc) گرمگذاری گردید. سپس باکتری از محیط مایع با کمک سانتریفوژ (ایندورف کشور آلمان) جدا گردید. سلول ها طی دو مرحله با محلول PBS ۱٪ شستشوی داده شد. سپس سلول های شستشوی داده شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به صورت سوسپانسیون در آمدند. سوسپانسیون سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸°C جوشانده شد. پس از سانتریفوژ کردن، محلول رویی حاوی DNA برای انجام Multiplex-PCR در بروت منفی ۲۰°C ذخیره گردید.

شناسایی وجود رپلیکون پلاسمید ها: برای شناسایی وجود رپلیکون پلاسمید های (I1, FIA, FIC, FIIA, B/o, Frep, FIB, N) در ایزوله های /شریشی کلاسی جدا شده از پرایمرها (جدول ۱) و روش Multiplex – PCR در سه پانل: پانل ۱ (B/o و FIC)، پانل ۲ (FIB, FIA و FIIA) و پانل ۳ (Frep, I1 و N) استفاده شد (۷).

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ایندورف کشور آلمان) انجام گردید. برای انجام فرایند PCR آنزیم Mastermix RED (شرکت آپلیکون) از شرکت پیشگام خریداری شد. در این واکنش ۲ میکرولیتر از DNA باکتری (DNA الگو) ۸ میکرولیتر از Mastermix RED و ۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۲۰ پیکو مول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود.

واسرشتگی اولیه (Initial Deneturation) در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل تکثیر شامل واسرشتگی (Deneturation) در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (Annealing) به DNA پلاسمیدی (DNA الگو) در ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و طولیل شدن رشته الگو (Extension) در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و طولیل شدن نهایی (Final Extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد و قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر ۱۰۰ Ladder (شرکت فرمنتاز) ارزیابی گردید (شکل ۱).

یافته ها

تعداد ۴۰ ایزوله باکتری /شریشی کلاسی متعلق به سروتیپ های O2, O6 و O157 جهت دسته بندی براساس رپلیکون پلاسمیدشان مورد مطالعه قرار گرفت. از ۴۰ ایزوله مورد مطالعه، رپلیکون پلاسمید Frep با ۸۸٪ بیشترین فراوانی و رپلیکون پلاسمید IncN با ۲۵٪ کمترین فراوانی را داشت. همچنین رپلیکون های IncFIC, IncFIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. فراوانی رپلیکون پلاسمیدهای I1, IncB/O, IncFIA, IncFIB در ۴۰ ایزوله به ترتیب ۵۰٪، ۵۳٪، ۶۰٪، ۷۸٪ مشاهده گردید (نمودار ۱). همچنین رپلیکون، IncN IncI1 و B/OInc در سروتیپ O157، رپلیکون Frep در سروتیپ O6 و رپلیکون IncFIA و IncFIB در سروتیپ O2 بیشترین حضور را داشتند. ارتباط معنی داری بین سروتیپ و نوع پلاسمیدها مشاهده نشد (نمودار ۲).

پیشرفت قابل توجهی در تایپینگ پلاسمیدها بود، اما روش زمان گیر و خسته کننده و ناسازگار با رویکردهای فعلی از روش های مطلوب بود (۶). در تحقیقی که توسط Carattoli و همکاران انجام شد از یک روش ساده و کاربردی تایپینگ رپلیکون مبتنی بر PCR (PCR-based replicon typing) برای طبقه بندی ۱۸ گروه ناسازگاری پلاسمید در خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد (۸). اگرچه این روش تا حد زیادی نسبت به روش های قبلی ساده تر بود، اما با توجه به داشتن مرحله Multiplex-PCR و سه PCR ساده می تواند برای مطالعه پلاسمیدهای جمعیت های بزرگ باکتریایی خسته کننده و پر هزینه باشد که در این مطالعه نیز از این روش استفاده شده است. /شریشی کلاسی خارج روده ای باعث بیماری های مختلفی در انسان و حیوان می شود. این گروه به طور معمول دارای پلاسمید های مرتبط با بیماری زایی و مقاومت ضد میکروبی هستند (۱۲ و ۱۱).

این موضوع در سویه های /شریشی کلاسی مولد عفونت ادراری یا /شریشی کلاسی یورپاتوزنیک (UPEC) که باعث بیماری های سیستمیت و نفريت چرکی در انسان و حیوان می شود صادق است که دارای تعداد زیادی پلاسمید می باشند. اخیرا توسط محققین گزارش شده است که حضور پلاسمید های بیماری زا ColV و ColBM در /شریشی کلاسی خارج روده ای مشخصه تعریف شده ای از پاتوتیپ بودن آنها است. سویه های UPEC علت اصلی عفونت های دستگاه ادراری از جمله سیستمیت و پیلونفریت هستند. در این باکتری ها، گروه O-serogroups مربوط به مشخصات عامل ویرولانز در هر سویه است. مطالعات قبلی نشان داد که سرگروه های O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 و O83 به ترتیب با سویه های UPEC مرتبط هستند و شیوع سروتایپ های مختلف در مناطق مختلف متفاوت است (۱۳).

تحقیقات نشان داده که پلاسمیدهای یافت شده در این باکتری ها متعلق به گروه ناسازگار IncFIB هستند که در ژنوم خود دارای نواحی خیلی محافظت شده ای چون FIB replicon، اپرون ColV و یا ColBM و چندین اپرون حاوی ژن های بیماری زا و ژن های دخیل در کسب و انتقال آهن می باشند. علاوه بر این، این نوع پلاسمیدها و دیگر پلاسمیدهای که مقاومت آنتی بیوتیکی را رمزگذاری می کنند در باکتری های UPEC یافت شده اند (۱۵ و ۱۴ و ۲۰). با توجه به شیوع عفونت ادراری و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در جمعیت های مختلف انسانی و نیز به دلیل سهل انگاری در درمان این نوع عفونت ها، مشکلات جبران ناپذیری در آینده رخ خواهد داد.

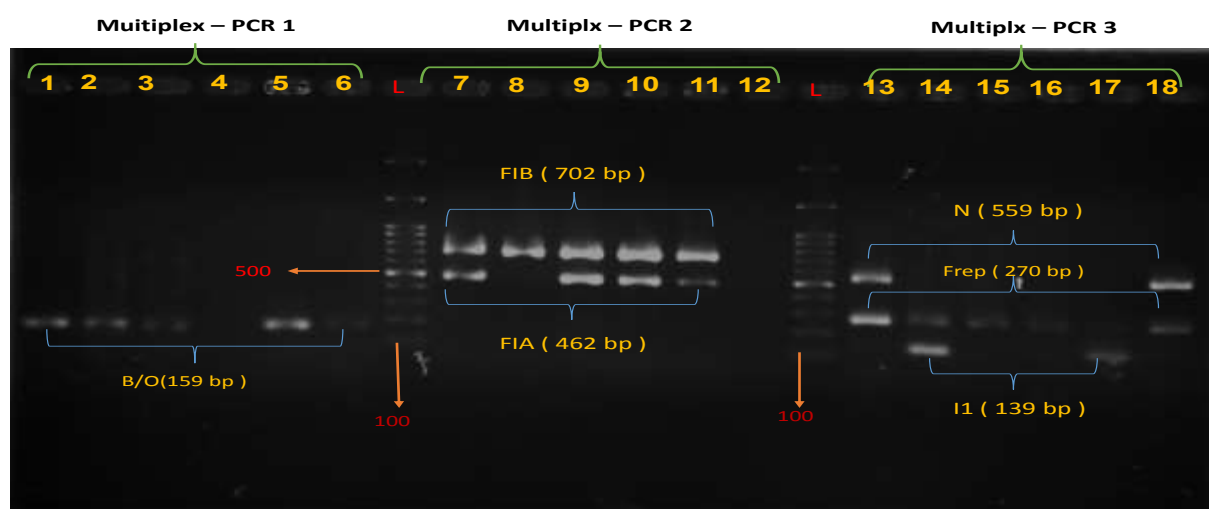
بنابراین ضرورت انجام غربالگری، شناسایی و طبقه بندی پلاسمیدها جهت بررسی های اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب عفونت های ادراری حائز اهمیت می باشد. بنابراین مطالعه حاضر جهت دسته بندی سروتیپ های O2, O6 و O157 باکتری /شریشی کلاسی جدا شده از عفونت های ادراری بر اساس رپلیکون پلاسمید به روش Multiplex-PCR صورت گرفت.

مواد و روش ها

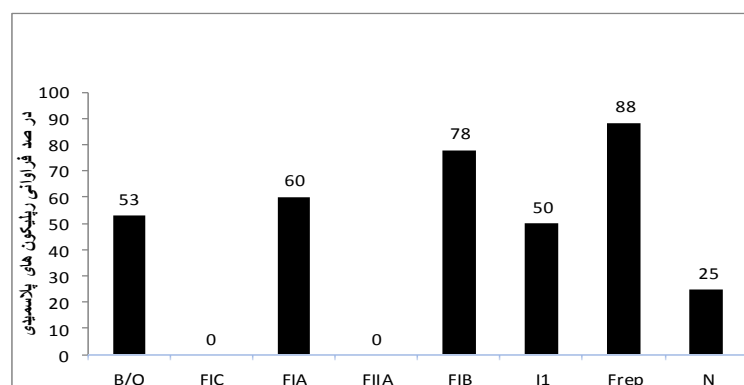
در این مطالعه توصیفی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه زابل با کد IR- OUZ-93.08، تعداد ۴۰ ایزوله /شریشی کلاسی متعلق به سروتیپ های O2, O6 و O157 جدا شده در مطالعات قبلی از بیماران مشکوک به عفونت ادراری در زابل مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷ و ۱۶).

جدول ۱. توالی پرایمرهای رپلیکون پلاسمیدهای باکتری *اشریشیا کالی*

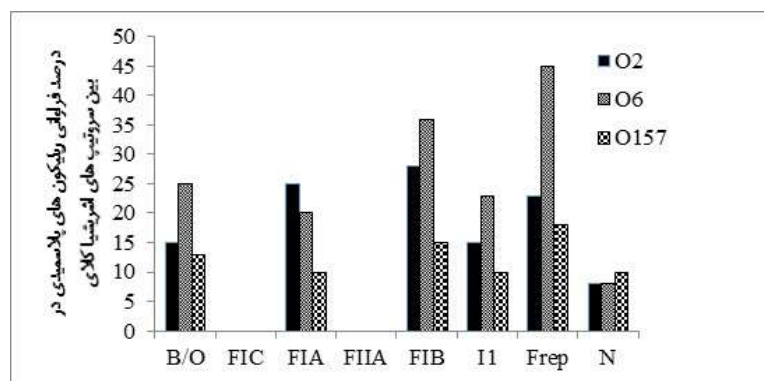
منبع	دما	اندازه (bp)	تعداد (نوکلوتید)	توالی پرایمر	پرایمر	رپلیکون پلاسمید
۷	۶۰	۱۵۹	۲۲	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAAC	F	B/O
	۶۰		۲۱	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	R	
۷	۶۰	۲۶۲	۲۲	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	F	FIC
	۶۰		۲۳	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	R	
۷	۶۰	۲۷۰	۱۸	CTGTCGTAAGCTGATGGC	F	FIIA
	۶۰		۱۹	CTCTGCCACAACTTCAGC	R	
۷	۶۰	۴۶۲	۲۳	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	F	FIA
	۶۰		۲۴	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	R	
۷	۶۰	۷۰۲	۲۴	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	F	FIB
	۶۰		۲۱	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	R	
۷	۶۰	۱۳۹	۱۹	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	F	I1
	۶۰		۲۱	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	R	
۷	۶۰	۲۷۰	۲۰	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	F	Frep
	۶۰		۲۰	GAAGATCAGTCACACCATCC	R	
۷	۶۰	۵۵۹	۲۰	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	F	N
	۶۰		۲۰	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	R	



شکل ۱. تصویر الکتروفورز ژل آگارز. چاهک ۱ تا ۶ مربوط به رپلیکون پلاسمید B/O با ۱۵۹ جفت باز. چاهک ۷ تا ۱۲ مربوط به رپلیکون پلاسمید های FIA و FIB با ۴۶۲ و ۷۰۲ جفت باز. چاهک ۱۳ تا ۱۸ مربوط به رپلیکون پلاسمید های FIB با ۷۰۲ جفت باز. چاهک ۱۹ تا ۲۴ مربوط به رپلیکون پلاسمید های FIA و FIB با ۴۶۲ و ۷۰۲ جفت باز. چاهک ۲۵ تا ۳۰ مربوط به رپلیکون پلاسمید های I1 و N با ۱۳۹ و ۲۷۰ جفت باز. چاهک ۳۱ تا ۳۶ مربوط به رپلیکون پلاسمید های Frep و N با ۲۷۰ و ۵۵۹ جفت باز و چاهک ۳۷ تا ۴۲ مربوط به رپلیکون پلاسمید های I1 و N با ۱۳۹ و ۲۷۰ جفت باز.



نمودار ۱. درصد رپلیکون پلاسمید در بین ۴۰ ایزوله باکتری *اشریشیا کالی*



نمودار ۲. درصد رپلیکون پلاسمید در بین سروتایپ های ایزوله باکتری/شریشیاکلاهی

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که ۸٪ از ایزوله ها حاوی رپلیکون Frep و رپلیکون های Inc N, Inc I1, IncB/O, IncFIA, IncFIB به ترتیب در ۲۵٪، ۵۰٪، ۵۳٪، ۶۰٪ و ۷۸٪ ایزوله های مورد مطالعه مشاهده گردید. در مطالعه مشابهی که توسط Johnson و همکاران بر روی ایزوله های جدا شده از نمونه های ادراری و مدفوعی انجام گرفت آمپلیکون Frep بیشترین و IncN کمترین حضور را داشت که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۷). همچنین IncFIC و IncFIIA در هیچکدام از نمونه ها مشاهده نشد. در پژوهشی که Abraham و همکارانش بر روی ۴۴ ایزوله/شریشیاکلاهی یوروپاتونیک جدا شده از افرادی که دارای التهاب مثانه و پیلونفریت بودند، انجام دادند رپلیکون IncFIC و IncFIIA در هیچکدام از ایزوله ها مشاهده نشد (۱۸). همچنین در این مطالعه، از میان ۸ نوع رپلیکون مورد مطالعه، پلاسمیدهای متعلق به گروه IncF (IncFIB, IncFIA) با فراوانی ۲۴٪ و ۳۱٪ به ترتیب بیشتر از سایر گروه ها در بین ایزوله های جدا شده حضور داشتند. هم راستا با مطالعه حاضر Lyimo و همکاران نیز گزارش کردند که پلاسمیدهای متعلق به گروه IncF در اغلب ایزوله های مورد مطالعه شان مشاهده شد (۱۹). همچنین این گروه نشان دادند که پلاسمیدهای متعلق به گروه IncF دارای قابلیت یوغی گری بالایی هستند (۱۹). علاوه بر آن Yang و همکاران در مطالعه ای گزارش کردند که IncF شایعترین خانواده پلاسمیدی در بین پلاسمیدهای/شریشیاکلاهی است (۲۰). این گروه گزارش کردند که بیشتر پلاسمیدهای متعلق به IncF دارای ژن های مقاومت های چندگانه آنتی بیوتیکی هستند که نشان دهنده اهمیت آنها در انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی بین جمعیت های باکتریایی است. علاوه بر آن، این پلاسمید ها واجد سیستم addiction هستند که به ثبات و نگهداری آنها در میزبان باکتری ها تحت شرایط مختلف کمک می کند (۲۰) که خود می تواند دلیل بالا بودن فراوانی این گروه از پلاسمیدها در باکتری/شریشیاکلاهی مورد مطالعه باشد. در مطالعه حاضر، IncI1 در ۵۰٪ ایزوله های مورد بررسی مشاهده گردید که وقوع بالا پلاسمید IncI1 در میان ایزوله های بالینی اهمیت آن را در انتقال افقی و گسترده ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتری/شریشیاکلاهی را نشان می دهد (۲۱). طی مطالعه ای، Xia و همکاران گزارش کردند که پلاسمید IncI1 حامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی هستند و می توانند به مدت طولانی در فلور روده انسان و حیوانات باقی بمانند و تبدیل به یک مخزن برای انتقال مداوم این ژن ها در بین گونه های باکتریایی شوند (۲۲). همچنین در بررسی حاضر

فراوانی رپلیکون پلاسمید IncB/O و IncN به ترتیب ۵۳٪ و ۲۵٪ گزارش گردید. تحقیقات مختلف نشان داده است که پلاسمیدهای IncI1, A/C یا Inc N موجود در باکتری های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه عامل حمل و انتشار ژن های بتا-لاکتاماز وسیع الطیف در حیوانات و انسان ها هستند (۲۳-۲۵). در مطالعه ای که قبلا توسط Abdi و همکاران روی ایزوله های مطالعه حاضر صورت گرفت، میزان مقاومت به داروهای بتا-لاکتام آمپی سیلین، سفتری زوکسیم و سفکسیم به ترتیب ۹۲٪، ۷۴٪ و ۷۱٪ تعیین گردید (۲۶). نتایج این مطالعه نشان داد که ممکن است وجود پلاسمیدهای IncI1, A/C یا Inc N در این ایزوله ها عامل اصلی مقاومت بالا به آنتی بیوتیک های فوق باشند. آنالیز الگوی رپلیکون پلاسمیدی ایزوله های مورد مطالعه نشان داد که ۱ ایزوله واجد ۶ پلاسمید، ۷ ایزوله واجد ۵ و ۱۴ ایزوله واجد ۴ پلاسمید بودند که نشان دهنده تنوع بالای پلاسمیدی در ایزوله های مورد مطالعه است. در مطالعه ای که توسط Hopkines و همکارانش در انگلستان بر روی ۶۷ نمونه از خانواده انتروباکتریاسه (شریشیاکلاهی و سالمونلا) انجام شد، تنوع رپلیکون پلاسمید IncI1, IncFIA, IncFIB و IncN را گزارش کردند (۵). همچنین مطالعه ای توسط Zurfluh و همکارانش بر روی ایزوله های/شریشیاکلاهی صورت گرفت، تنوع رپلیکون پلاسمیدی نیز گزارش گردید (۲۷). مطالعه حاضر نشان داد که/شریشیاکلاهی جدا شده از نمونه های ادراری دارای چندین پلاسمید متعلق به رپلیکون های IncB/O, IncFIB, IncFIA, IncI1 و Frep می باشد.

باتوجه به اینکه روش مولکولی PBRT روش ساده و سریعی در شناسایی و طبقه بندی رپلیکون پلاسمیدهای ناسازگار سویه های/شریشیاکلاهی است و این مطالعه برای اولین بار در ایران در منطقه سیستان جهت پیگیری روند تکامل و گسترش پلاسمیدهای/شریشیاکلاهی مولد عفونت های ادراری انجام شد. همچنین این مطالعه جهت کسب اطلاعات بیشتر راجع به پاتوژن عفونت ها، کنترل عفونت های بیمارستانی و مطالعات اپیدمیولوژیکی کاربرد دارد، پیشنهاد می گردد که این مطالعه به صورت فراگیر در سایر قسمت های ایران نیز انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل بخاطر حمایت مالی از این طرح و همچنین از همه کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را انجام دادند، تشکر و قدردانی می گردد.

Replicon Typing of O2, O6, and O157 Serotypes of Escherichia Coli Using PCR Method Based on Plasmid Incompatibility Groups

A. Keshtgar (MSc)¹, A. Rashki (PhD)^{*2}, F. Hadadi (PhD)¹

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, I.R.Iran

2. Department of Pathobiology, Faculty of Vet-Medicine, University of Zabol, Zabol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(7); July 2018; PP: 40-6

Received: Dec 27th 2017, Revised: Mrch 6th 2018, Accepted: Mrch 21st 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Today, the PCR-based replicon typing of major plasmid incompatibility groups is used in epidemiological studies to describe the distribution of traits such as antibiotic resistance in the bacteria of *enterobacteriaceae* family. Despite the crucial role of plasmids in transmitting pathogens, little studies have been conducted on the type of plasmid transmitted by bacterial serotypes of *E. coli*. The main objective of this study was to classify plasmid O2, O6 and O157 serotypes of *E. coli* bacteria based on major plasmid incompatibility groups using multiplex-PCR method.

METHODS: This descriptive study was performed on 40 isolates of *E. coli* related to O6, O2 and O157 serotypes to identify 8 plasmid replicons (*IncN*, *IncFIB*, *FreP*, *IncB/O*, *IncFIIA*, *IncFIC*, *IncFIA*, *IncI1*) by multiplex-PCR method.

RESULTS: The results showed that the amplicon of *Fre* (88%), and replicons of *IncFIB* (78%), *IncFIA* (60%), *IncB/O* (53%), *IncI1* (50%), *IncN* (25%) were observed in 40 studied isolates. *IncFIC* and *IncFIIA* replicons were not observed in any of the isolates.

CONCLUSION: The results of this study indicated a high diversity of plasmid incompatibility groups among the studied isolates.

KEY WORDS: *Plasmid, Multiplex-PCR, Replicon.*

Please cite this article as follows:

Keshtgar A, Rashki A, Hadadi F. Replicon typing of O2, O6, and O157 serotypes of Escherichia coli using PCR method based on plasmid incompatibility groups. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(7): 40-6.

* Corresponding Author: A. Rashki (PhD)

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Vet-Medicine, University of Zabol, Zabol, I.R.Iran

Tel: +98 54 24822250

E-mail: ah_rashki@usal.es

References

1. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):722-32.
2. Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, et al. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis.* 2002;46(2):342-52.
3. Smets BF, Barkay T. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):675-8.
4. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(10):4168-77.
5. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3203-6.
6. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988;52(3):375-95.
7. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1976-83.
8. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.
9. Boyd D, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1714-22.
10. Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M, Parkhill J, Taylor DE. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid.* 2004;52(3):182-202.
11. Dobrindt U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):357-71.
12. Klumpp DJ, Weiser AC, Sengupta S, Forrestal SG, Batler RA, Schaeffer AJ. Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. *Infect Immun.* 2001;69(11):6689-95.
13. Sharma S, Kaur N, Malhotra S, Madan P, Ahmad W, Hans C. Serotyping and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Tract Infections in Pediatric Population in a Tertiary Care Hospital. *J Pathogens.* 2016;2016:2548517.
14. Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK. Complete DNA sequence of a Col BM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol.* 2006;188(16):5975-83.
15. Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, et al. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2010;78(5):1931-42.
16. Rashki A, Abdi HA, Shookohi M. Prevalence of Genes Encoding Outer Membrane Virulence Factors Among Fecal *Escherichia coli* Isolates. *Int J Basic Sci Med.* 2017;2(1):52-7.
17. Rashki A, Abdi HA. O-serotyping of *Escherichia coli* Strains isolated from Patients With Urinary Tract Infection in Southeast of Iran. *Int J Enteric Pathog.* 2014;2(4):e20968.
18. Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):1027-30.
19. Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Temba S, Kipasika H, Smith W, et al. IncF Plasmids Are Commonly Carried by Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated from Drinking Water Sources in Northern Tanzania. *Int J Microbiol.* 2016;2016:3103672.

20. Yang QE, Sun J, Li L, Deng H, Liu BT, Fang LX, et al. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front Microbiol.* 2015;6:964.
21. Johnson TJ, Shepard SM, Rivet B, Danzeisen JL, Carattoli A. Comparative genomics and phylogeny of the IncI1 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid.* 2011;66(3):144-51.
22. Xia L, Liu Y, Xia S, Kudinha T, Xiao SN, Zhong NS, et al. Prevalence of ST1193 clone and IncI1/ST16 plasmid in *E. coli* isolates carrying blaCTX-M-55 gene from urinary tract infections patients in China. *Sci Rep.* 2017;7:44866.
23. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(5):1872-5.
24. Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, et al. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene blaCTX-M-1 in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(10):4484-6.
25. Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(6):1229-33.
26. Abdi HA, Rashki GM. Virulence Genes, Genetic Diversity, Antimicrobial Susceptibility and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates. *Int J Enteric Pathog.* 2015;3(3):e25692.
27. Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M. Replicon typing of plasmids carrying bla CTX-M-1 in *Enterobacteriaceae* of animal, environmental and human origin. *Front Microbiol.* 2014;5:555.