

## **Genotyping of *Escherichia coli* isolated from human and water samples using ERIC-PCR method in Hamadan city**

**Reza Hakimi Alni<sup>1</sup>, Navab Ghobadi<sup>2</sup>, Maryam Najafi Asl<sup>3</sup>, Aram Sharifi<sup>3</sup>**

**Background and Aim:** Rapid and precise typing of *E.coli* is a prerequisite for epidemiological surveillance and controlling of infection caused by this bacterium. The present study was conducted to determine the molecular diversity of *E.coli strains* isolated from human and swimming pools samples using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) method.

**Materials and Methods:** This was descriptive-analytic study was conducted, from 2014 to 2016. The target population in this study were 45 isolates of *E.coli* (25 isolates from human, 20 isolates from swimming pools sample), all of which were confirmed by biochemical and molecular methods. They were then classified using the ERIC-PCR technique.

**Results:** Generally, in ERIC-PCR product electrophoresis, 3-7 different bands were observed in the range of 100 to 1500 bp. A total of 21 ERIC-PCR profiles were found among all of the studied isolates, that included 12 profiles among human isolates and 10 profiles among swimming pools isolates, and there was one similar profile between them. Based on the results of the dendrogram, 2 main clusters and 7 categories (A to G) were observed.

**Conclusion:** All isolates were typed using ERIC-PCR and high genetic diversity was observed among the isolates. On the other hand, the presence of common profiles among both sources indicates the possible rotation of these isolates between human-water-humans.

**Key Words:** Escherichia coli; ERIC-PCR; Human; Pool water

*Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2018; 25(4): 297-306.*

*Received: April 17, 2018*

*Accepted: October 16, 2018*

---

<sup>1</sup> Corresponding author; Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.  
Tel: +989356023425 Email: Reza.hakimi77@yahoo.com, R.hakimi91@basu.ac.ir

<sup>2</sup> Department of Agriculture (Animal science), Payame Noor university, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

# ژنوتایپینگ اشریشیاکلی‌های جداده از نمونه‌های بیمارستانی و آبی با استفاده از روش ERIC-PCR، در شهرستان همدان

رضا حکیمی آلنی<sup>۱</sup>، نواب قبادی<sup>۲</sup>، مریم نجفی اصل<sup>۳</sup>، آرام شریفی<sup>۳</sup>

## چکیده

زمینه و هدف: تایپینگ سریع و دقیق اشریشیاکلی برای اطلاع از اپیدیمولوزی و کنترل بیماری‌های ناشی از آن، امری لازم و ضروری می‌باشد. هدف مطالعه حاضر، تعیین ارتباط ژنتیکی احتمالی در بین جدایه‌های با منابع انسانی و آبی/اشریشیاکلی با استفاده از روش ERIC-PCR.

روش تحقیق: این مطالعه توصیفی- تحلیلی، در سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ انجام گرفت. جامعه هدف در این مطالعه، ۴۵ جدایه اشریشیاکلی (۲۵ جدایه بیمارستانی و ۲۰ جدایه از استخراج شنای سربسته) بود که همه آنها با استفاده از روش‌های بیوشیمیابی و مولکولی تأیید شدند و در ادامه با تکنیک ERIC-PCR مورد تایپینگ قرار گرفتند.

یافته‌ها: به طور کلی در الکتروفورز محصول ERIC-PCR<sup>۳</sup> تا ۷ باند مختلف در محدوده کمتر از ۱۰۰ تا بیشتر از ۱۵۰۰ جفت باز مشاهده گردید. در مجموع ۲۳ پروفایل ERIC-PCR در بین اینزولهای مورد مطالعه دیده شد که شامل ۱۲ پروفایل در بین جدایه‌های انسانی و ۱۰ پروفایل در بین جدایه‌های آبی بود و همچنین یک پروفایل بین آنها مشترک بود. براساس نتایج دندروگرام، ۲ گروه اصلی و ۷ دسته (A تا G) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تمامی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش ERIC-PCR قابل تایپ بودند و همچنین میزان تنوع ژنتیکی بالای در بین جدایه‌های مورد مطالعه دیده شد. وجود پروفایل مشترک در بین جدایه‌های آبی و انسانی، نشان‌دهنده چرخش احتمالی این جدایه‌ها بین انسان-آب-انسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی؛ ERIC-PCR؛ انسان؛ آب استخراج

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیرجند. ۱۳۹۷؛ (۴)۲۵: ۲۹۷-۳۰۶.

دربافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۴

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول؛ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعالی سینا، همدان، ایران.

آدرس: همدان - میدان فلسطین - ابتدای بلوار غبار همدانی - روبروی سازمان انتقال خون استان همدان - دانشکده پیرادامپزشکی

تلفن: +۹۸۹۳۵۶۰۲۳۴۲۵ پست الکترونیکی: R.hakimi91@basu.ac.ir, Reza.hakimi77@yahoo.com

<sup>۲</sup> گروه کشاورزی (علوم دامی)، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعالی سینا، همدان، ایران.

**مقدمه**

این روش‌ها نسبت به روش‌های کلاسیک تیپ‌بندی، از قدرت تمایز و تکرارپذیری خیلی بالایی برخوردار هستند و در حال حاضر، بیشتر از این روش‌ها برای تیپ‌بندی باکتری‌ها از جمله /شریشیاکلی استفاده می‌شود (۸).

یکی از تکنیک‌های مولکولی، روش ERIC-PCR است که اولین بار توسط Lupski و همکاران برای تایپینگ میکروارگانیسم‌ها به کار برده شد. در این روش، توالی محافظت‌شده تکراری بین ژنی آنترباکتریایی، برای دسته‌بندی به کار برده می‌شود. این توالی‌ها به صورت غیرکدکننده و بین ژنی بوده و اندازه آن ۱۲۶ جفت باز می‌باشد (۹). با توجه به اینکه مطابق نظر Versalovic، این توالی‌ها در طول تکامل باکتری برخلاف ژن‌های محافظت‌شده، دچار تغییرات و دگرگونی‌هایی شده‌اند و از طرف دیگر، تعداد این توالی‌ها بین جنس، گونه و سویه‌های باکتری متفاوت می‌باشد؛ بنابراین هر ایزوله دارای الگوی باندی متفاوت از دیگران و مختص به خود می‌باشد و این ویژگی به عنوان یک هدف مناسب برای تمایز مولکولی جدایه‌های مختلف باکتری‌ها به حساب می‌آید (۱۰).

به کارگیری روش‌های تایپینگ برای تیپ‌بندی /شریشیاکلی جداسده از منابع مختلف، در ارتباط‌دهی دقیق بین آن‌ها حائز اهمیت است. اثبات ارتباطات کلون‌های /شریشیاکلی به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی را پیدا کرده؛ سویه‌های عفونی را از سویه‌های غیر عفونی متمایز نموده و درنهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نماییم. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی تنوع ژنتیکی و بررسی میزان ارتباط ژنتیکی سویه‌های /شریشیاکلی جداسده از منابع انسانی و آبی در شهر همدان بود.

**روش تحقیق****جمع آوری جدایه‌ها:**

این پژوهش، یک مطالعه توصیفی- تحلیلی بود که در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ انجام گردید. جامعه هدف در این

اعضای خانواده انترباکتریا سه، جزء مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به حساب می‌آیند. /شریشیاکلی، یک باسیل گرم منفی از خانواده انترباکتریا سه است و به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و همچنین عفونت مجاری ادراری در انسان می‌باشد (۱). عفونت دستگاه ادراری، بعد از عفونت‌های تنفسی شایع‌ترین و فراوان‌ترین عفونت‌های باکتریایی به حساب می‌آید. باکتری‌های مختلفی از جمله: استافیلکوکوس‌ها، کلیسیلا، پروتئوس، انترباکتر، سودوموناس و ... باعث این نوع عفونت می‌شوند؛ اما /شریشیاکلی رایج‌ترین عامل ایجاد‌کننده عفونت مجاری ادراری است و درصد آنها را شامل می‌گردد. این بیماری در هر دو جنس وجود داشته و سنین مختلفی از نوزاد تا افراد سالخورده را درگیر می‌کند (۲)؛ از طرف دیگر این باکتری به عنوان شاخص آلودگی منابع آبی محسوب شده و وجود آن در آب، به عنوان آلودگی مدفعی آب در نظر گرفته می‌شود (۳).

با توجه به گستره وسیع /شریشیاکلی در انسان، حیوانات و محیط، تعیین میزان ارتباط ژنتیکی بین سویه‌های جداسده از منابع مختلف در کنترل بیماری‌های ناشی از آن، اهمیت بالایی دارد. برای دستیابی به چنین اهدافی، معمولاً باکتری‌ها را با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، مورد دسته‌بندی و تایپینگ قرار می‌دهند (۴). در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ و سروتیپ باکتریوفاژ یا باکتریوسین، تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی‌بیوتیک، برای تایپینگ باکتری‌ها استفاده می‌شد؛ ولی امروزه با پیشرفت علوم بیولوژی و مولکولی، روش‌های مولکولی از جمله تایپینگ بر اساس آنالیز توالی ژن‌های خاص، روش‌های تیپ‌بندی بر پایه PCR و تکنیک‌های الکتروفورز برای آنالیز کروموزوم استفاده می‌شود (۵-۷). روش‌های تایپینگ مولکولی، انقلابی در مطالعه تنوع سویه‌ها و مطالعه اپیدمیولوژی و نحوه انتشار عفونت در بین مناطق و کشورهای مختلف ایجاد کرده است.

محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد.

### آزمون ERIC-PCR

برای انجام ERIC-PCR، تمام DNA ۴۵ جدایه اشریشیاکلی با استفاده از پرایمرهای ERIC (جدول ۱) که قبلاً توسط Versalovic و همکاران (۲۰۰۷) به کار برده شده بود، مورد تکثیر قرار گرفتند (۱۰). واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix آمپلیکون، یک میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) از DNA الگو، یک میکرولیتر ۵۰ پیکومول) از پرایمر ۷ AP و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، انجام گرفت. همچنین برنامه حرارتی شامل واسرت است ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه و ۳۲ سیکل تکثیری شامل: ۹۲ درجه برای یک دقیقه، ۵۵ درجه برای ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه برای مدت ۱/۵ دقیقه بود و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۸ دقیقه اعمال شد.

در ادامه محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. برای رسم دندروگرام، ابتدا داده‌ها به صورت صفر و یک در برنامه Excel ذخیره شد؛ به این صورت که در هر اندازه خاص وجود باند با کد «صفر» و عدم وجود باند با کد «یک» مشخص شد. در ادامه بعد از ارزش‌گذاری نشانگرهای NTSYS-ERIC-PCR به طریقه فوق، داده‌ها وارد نرم‌افزار PC شد و ابتدا ضریب تشابه جاکارد در بین ایزووله‌ها محاسبه شد و گروه‌بندی ژنوتایپ‌ها با استفاده از روش UPGMA انجام گرفت؛ سپس با رسم دندروگرام، میزان تشابه بین ایزووله‌ها نشان داده شد (۱۴).

مطالعه، ۴۵ جدایه اشریشیاکلی بود که ۲۵ جدایه از بخش میکروبیولوژی بیمارستان شهید بهشتی گرفته شده بود و ۲۰ جدایه از نمونه‌های آب استخرهای شهرستان همدان جداسازی شده بود. اگرچه این جدایه‌ها قبلاً به عنوان جنس اشریشیاکلی تأیید شده بودند؛ اما برای اطمینان کار، دوباره تمام جدایه‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیابی (تست اکسیداز، کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط TSI، EMB، SIM، اوره‌آز، مک‌کانکی و ...) مورد سنجش قرار گرفتند (۱۱).

### استخراج DNA و تأیید مولکولی جدایه‌های اشریشیاکلی:

ابتدا DNA تمام ۴۵ جدایه، با استفاده از روش فلکلروفرم استخراج شد (۱۲). در ادامه از روش PCR برای جستجوی ژن *UspA* (جهت تأیید ژنوتایپی جدایه‌ها) که قبلاً توسط Chen و همکاران ارائه شده بود، استفاده گردید (۱۳) (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ۲x.Ampliqon-( Master mix شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (USA PM, ۲/۵ میکرولیتر SinaClon BioScience الگو و ۹ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. همچنین برنامه حرارتی برای واکنش PCR شامل واسرت است ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکثیری شامل ۹۲ درجه برای یک دقیقه، ۷۰ درجه برای ۰۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای مدت ۰۰ ثانیه بود و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۸ دقیقه اعمال شد. در ادامه

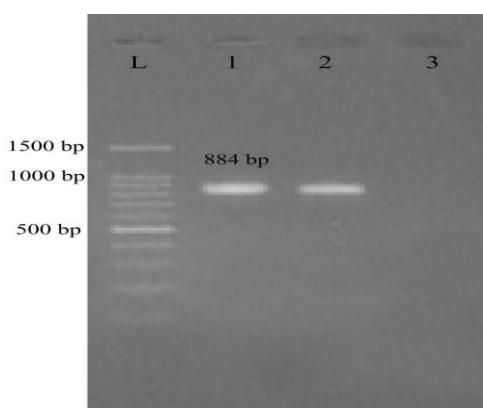
جدول ۱- پرایمرهای به کار رفته برای انجام PCR

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی (۵'-۳')	اندازه محصول PCR (جفت باز)
ERIC-R ERIC-F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG	>۱۵۰ تا <۱۵۰
UspA -R UspA -F	CCGATACGCTGCCAATCAGT ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	۸۸۴

به طوری که ۸-۳ باند مختلف در محدوده  $>1500$  تا  $<1500$  جفت باز ایجاد کردند که در بین آنها باند ۱۸۰ جفت باز در همه جدایه‌ها دیده شد و باندهای ۸۰۰ و ۹۰۰ جفت باز تنها در تعداد محدودی از جدایه‌ها مشاهده گردید. در مجموع ۲۳ پروفایل ERIC-PCR در بین ایزوله‌های مورد مطالعه دیده شد که شامل ۱۲ پروفایل در بین جدایه‌های انسانی و ۱۰ پروفایل در بین جدایه‌های آبی بود و همچنین یک پروفایل بین آنها مشترک بود.

بر اساس دندروگرام، در میزان تشابه ۰-۳ درصد، دو گروه اصلی ایجاد شد که با اعداد یونانی I و II نام‌گذاری شدند. ایزوله‌های قرار گرفته در گروه II، شامل هر دو منبع بودند؛ اما در گروه I، تنها جدایه‌های انسانی جای داشتند (شکل ۲). از طرفی بر اساس میزان تشابه ۰-۷ درصد، جدایه‌های مورد مطالعه در ۷ دسته جای داشتند که در دسته‌های A، B، C، D، E، F و G به ترتیب: ۸، ۴، ۳، ۲، ۱۶ و ۳ جدایه قرار داشتند و بیشترین جدایه‌ها در دسته F قرار گرفته بودند. همچنین، تعدادی از جدایه‌های انسانی و آبی دارای پروفایل ERIC-PCR مشابه و یکسان بودند که در شکل ۳ پروفایل آن مشخص گردیده است. این پروفایل در دندروگرام ایجاد شده در گروه II و در دسته F قرار داشت.

شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *UspA*: ستون ۱: کنترل مثبت



(اشریشیاکلی ATCC25922): ستون ۲: جدایه مورد مطالعه؛ ستون ۳: کنترل منفی (آب مقطر)؛ ستون L: نردهان ژنی ۱۰۰ جفت بازی

### سنجدش قدرت تمایز:

برای سنجدش قدرت تمایز، از معادله Simpon's Index استفاده گردید. در این روش، N تعداد

$$D = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

کل سویه‌های مورد مطالعه، S تعداد تیپ‌های ژنتیکی بدست آمده و  $n_j$  تعداد سویه‌های متعلق به تیپ  $j$  باشد (۱۵). معادله (۱):

### آنالیز نتایج:

در نهایت داده‌ها با استفاده از نرمافزار SPSS (ویرایش ۱۹) با روش مربع کای، در حد معنی‌داری  $P < 0.05$  تجزیه و تحلیل شد.

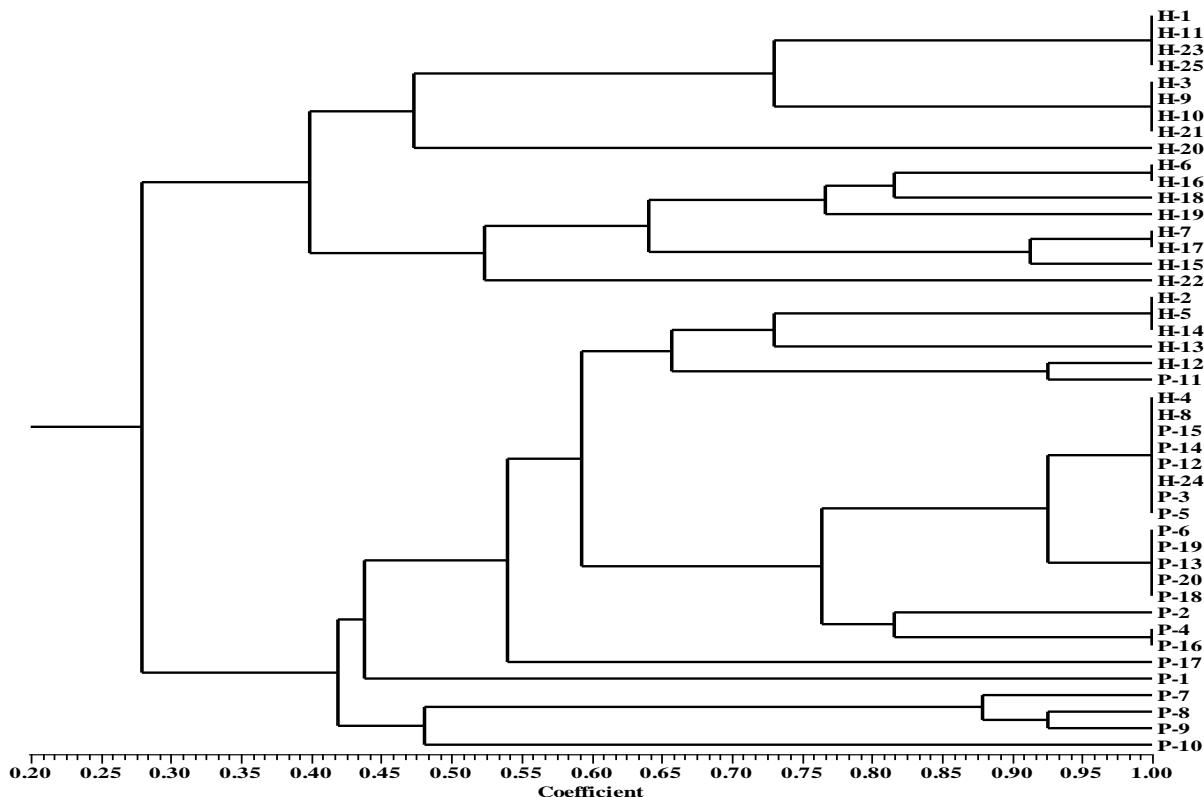
### یافته‌ها

#### شناسایی و تأیید جدایه‌ها:

با استفاده از روش‌های کشت و آزمایش‌های بیوشیمیایی، ۴۵ جدایه به عنوان جنس اشریشیاکلی تأیید شدند. آزمون مولکولی (شناسایی ژن *UspA*) نیز کاملاً با آزمون‌های بیوشیمیایی منطبق بود و در جستجوی این ژن با استفاده از آزمون PCR، همه جدایه‌ها از این نظر مثبت بودند و در الکتروفورز محصول PCR، باند ۸۸۴ جفت باز نشان داده شد (شکل ۱).

### نتایج ERIC-PCR

برای انجام ERIC-PCR، با توجه به اهمیت غلظت DNA استخراج شده، ابتدا با استفاده از نانودارپ غلظت DNA تمام جدایه‌ها سنجیده شد. نتایج DNA استخراج شده با روش فنل-کلروفرم کیفیت بالایی را نشان داد و در اندازه‌گیری آن با نانودارپ، ۳۰۰ ng تا ۸۰۰ ng در هر میکرولیتر گزارش شد؛ همچنین الکتروفورز ۱۰ میکرولیتر از آن در آگارز یک درصد، باند شارپ و بدون شکستگی را نشان داد. نتایج حاصل از ERIC-PCR نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از این روش قابل تایپ بودند؛



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ۴۵ جدایه اشريشياکلي جداسده از نمونه های انسانی (H1-H25) و آبی (P1-P20). نام گروه با حروف لاتین (A) تا (G) مشخص شده است.



شکل ۳- پروفایل حاصل از الکتروفورز محصول REIC-PCR در ۷۱ آگارز یکدرصد. ستون ۱ تا ۲۳ مربوط به جدایه های اشريشياکلي؛ ستون L (نرده بان ۰۰۱ جفت بازی)؛ ستون ۳: پروفایل مشترک جدایه های انسانی با آبی

نژدیکتر باشد، قدرت تمایز آن روش پایین می باشد. در این

#### نتایج بررسی قدرت تمایز و آنالیز داده ها:

مطالعه قدرت تمایز روش ERIC-PCR، ۹۵/۰ بود. همچنین

بر طبق معادله Simpon's Index Diversity، قدرت تمایز

از نظر آماری ( $P<0.05$ )، جدایه های انسانی و آبی به طور

هر روش بین عدد صفر تا یک نشان داده می شود؛ به این

معنی داری در دو گروه مشخص و جدا از هم قرار گرفته بودند

صورت که هر چه این عدد به یک نژدیکتر باشد،

$(P=0.024)$ .

نشان دهنده قدرت تمایز بالا می باشد و هر چه به صفر

## بحث

ERIC-PCR در تیپبندی اشريشیاکلی وجود دارد و این دو روش می‌توانند به عنوان تکنیک‌های خوبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژی این باکتری به کار برد شوند (۲۲). در مطالعه حاضر نیز روش ERIC-PCR، قدرت تمایز بالایی (۰/۹۵) داشت و توانست ۴۵ جدایه را در ۲۳ تیپ مختلف قرار دهد؛ همچنین در این روش جدایه‌های انسانی و آبی به طور معنی‌داری در دو گروه مختلف جای گرفتند که نشان از منشأ مختلف آنها داشت. در واقع این‌طور می‌توان گفت که سویه‌های مشخصی از اشريشیاکلی در محیط آب و بدن انسان وجود دارند که به آن عادت یافته‌اند و خود را با شرایط آن وفق داده‌اند.

در مطالعه حاضر، تعداد الگوهای باندی در هر دو منبع انسانی و آبی بالا بود؛ به طوری که ۱۳ الگوی ERIC در بین ۲۵ جدایه انسانی و ۱۱ الگوی ERIC در بین جدایه‌های آبی مشاهده گردید. در این زمینه، در مطالعه Sekhar و همکاران در سال ۲۰۱۷، ۱۳۴ سویه اشريشیاکلی جدایه از پرنده‌گان، با استفاده از روش ERIC-PCR مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در میان این جدایه‌ها وجود دارد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز اگر چه تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های مورد مطالعه بالا بود، اما پروفایل‌های مشترک بین جدایه‌های دو منبع نیز دیده شد. در واقع وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های اشريشیاکلی احتمالاً به دلیل انواع جهش‌ها و ژن‌های الحقیقی از طریق پلاسمیدهای مختلف باشد که موجب تنوع پروفایل ERIC در بین این جدایه‌ها می‌شود (۲۳، ۲۰). در یک مطالعه دیگر توسط da Silveira و همکاران (۲۰۰۲)، ۴۹ جدایه اشريشیاکلی از نمونه‌های مرغ‌های بیمار با ۷۹ جدایه از مرغ‌های به ظاهر سالم، با استفاده از تکنیک ERIC-PCR مورد تاییینگ قرار گرفت و در مجموع از ۷۹ جدایه مورد تاییینگ شده، ۸۶ پروفایل ERIC ایجاد شد (۲۳). Durmaz و همکاران (۲۰۱۵) در ترکیه، ۴۲ جدایه بالینی اشريشیاکلی را به روش ERIC-PCR تیپبندی کردند که در مجموع عگروه ایجاد شد که به نتایج

با اینکه تحقیقات زیادی در زمینه تاییینگ مولکولی اشريشیاکلی در سراسر جهان انجام شده است (۱۶، ۱۷)؛ اما مطالعات اندکی به صورت همزمان در بین جدایه‌های انسانی و آبی برای بررسی ارتباط دقیق بین آن‌ها در ایران وجود دارد. از این رو در مطالعه حاضر سعی شده است که ارتباط ژنتیکی اشريشیاکلی‌های جدایه از انسان و استخراج شنا، با استفاده از روش ERIC-PCR نشان داده شود تا احتمال منشأ آلدگی و نحوه توزیع این باکتری در منطقه مشخص گردد.

اگرچه روش‌های مولکولی زیادی برای تیپبندی اشريشیاکلی وجود دارد، اما بسیاری از آنها مانند روش MLST یا PFGE به هزینه بالا و دستگاه‌های گران‌قیمت نیاز دارند؛ اما روش‌های بر پایه PCR مانند روش ERIC-PCR از سادگی، سرعت و قدرت تمایز بالا برخوردار بوده و از این رو کاربرد وسیعی در تاییینگ باکتری‌ها از جمله آنتروباکتریاسه‌ها دارد (۱۸). در این روش با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای تکرارشونده به عنوان آغازگر سنتز DNA برای تاییینگ اشريشیاکلی استفاده می‌شود. برخلاف روش PCR معمولی که برای انجام دادن آن نیاز به اطلاعات دقیقی از توالی ژن یا DNA می‌باشد، در این روش نیازی به این اطلاعات نیست و همین مسئله موجب شده است که کاربری این روش، گسترده و وسیع گردد (۱۹).

در مطالعه Mazumder و Mohapatra (۲۰۰۸) و اردکانی و رنجبر (۲۰۱۶) نشان داده شد که روش ERIC-PCR، به عنوان یک ابزار قوی در تاییینگ اشريشیاکلی جدایشده از منابع مختلف به حساب می‌آید (۲۰، ۱۶)؛ به طوری که در مطالعه Sekhar و همکاران (۲۰۱۷)، قدرت تمایز این روش ۹۹/۰ گزارش شد (۲۱). Chirindze و همکاران (۲۰۱۸) هم نشان دادند که با رعایت شرایط استاندارد در انجام ERIC-PCR، این روش از تکرار پذیری خوبی برخوردار است (۱۷). در مطالعه Dalla-Costa و همکاران (۱۹۹۸)، نشان داده شد که رابطه خوبی بین روش ریبوتاییینگ و

این تیپ‌ها در شهرستان همدان از فراوانی بالاتری برخوردار گردند. با این همه، الگوی قرار گرفته در دسته F که مشترک بین منابع انسانی و آبی بود، به عنوان الگوی با فراوانی بالا (۸/۰) جای گرفته شد. این الگو را می‌توان به عنوان تیپ غالب و اپیدمی در شهر همدان در نظر گرفت؛ هر چند، انجام تحقیقات بیشتر با استفاده از روش‌های مولکولی دیگر مورد نیاز می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

وجود پروفایل مشترک بین منابع انسانی و آبی، حاکی از گردش تعدادی از سویه‌ها بین انسان-آب-انسان می‌باشد. هر چند از نظر تفاوت ژنتیکی بین جدایه‌های آبی و انسانی تفاوت معنی‌داری وجود داشت؛ اما وجود پروفایل مشترک بین این دو منبع نشان می‌دهد که جدایه‌های آبی توان بیماری‌زاوی داشته و از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت است. همچنین این مطالعه نشان داد که روش ERIC-PCR برای تایپینگ و دسته‌بندی اشریشیاکلی جداسده از منابع آبی و انسانی، قدرت تمایز خوبی داشته و کارآیی بالایی دارد.

### تقدیر و تشکر

نویسندها مقاله از مسئولین محترم استخراج‌های شهر همدان و مسئولین بیمارستان شهید بهشتی (بهویژه خانم ملاکیان) برای همکاری در گرفتن نمونه‌ها، نهایت تشکر و سپاس‌گزاری را دارند.

### تضاد منافع:

نویسندها این مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافعی در مقاله وجود ندارد.

مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد (۲۴). در مطالعه اردکانی و رنجبر نیز که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفت، ۹۶ جایه اشریشیاکلی بر اساس میزان تشابه ۷۰درصد در عگروه (E1-E6) جای گرفتند که در مقایسه با مطالعه ما از تنوع پایین‌تری برخوردار بودند (۱۶).

در مطالعه حاضر بر اساس دندروگرام رسم شده، در میزان تشابه بالای ۷۰درصد، ۷ دسته مختلف ایجاد شد که از A تا G نام‌گذاری شدند. بر این اساس، بیشتر سویه‌های جداسده از منابع انسانی در دسته جدایه‌های جای داشتند و به عبارتی تفاوت شاخصی بین سویه‌های جداسده از منابع آبی و انسانی دیده شد. با این همه در دسته F (گروه II)، جدایه‌های هر دو منبع انسانی و آبی وجود داشت که نشان از چرخش احتمالی این سویه‌ها و انتقال این جدایه‌ها به انسان از طریق آب داشت. در این مورد Mesa و همکاران (۲۰۰۶)، اشریشیاکلی جداسده از انسان، دام و غذا را با استفاده از روش ERIC-PCR تایپینگ کردند و نشان دادند که اشریشیاکلی می‌تواند از طریق افراد آلووده به این باکتری، به غذا انتقال یافته و در بین افراد جامعه پخش گردد (۲۵). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که احتمال آلوودگی آب استخراج از طریق انسان وجود دارد؛ از طرف دیگر با توجه به تفاوت ژنتیکی بین جدایه‌های انسانی و آبی، می‌توان گفت که یک تمایل ژنتیکی در ایجاد بیماری در بین سویه‌های اشریشیاکلی دیده شد و جدایه‌های ایجادکننده بیماری با جدایه‌های محیطی (آبی) تیپ ژنتیکی متفاوتی داشتند. این مسئله قبلاً در مورد سویه‌های ایجادکننده بیماری در حیوانات هم ذکر شده است؛ به این صورت که تیپ‌های ERIC خاصی از اشریشیاکلی، در پرنده‌گان موجب سپتیسمی شده است (۲۳).

در این مطالعه در مجموع ۱۵ کلني تکي در بین ۴۵ جدایه مورد مطالعه مشاهده گردید که نشان از گستره ژنتیکی اشریشیاکلی در منابع مورد مطالعه دارد؛ در واقع می‌توان این جدایه‌ها را به عنوان سویه‌های نوظهور قلمداد کرد که در حال حاضر از فراوانی پایینی برخوردار هستند و احتمالاً در آینده

## منابع:

- 1- Sabir S, Ahmad Anjum A, Ijaz T, Asad Ali M, Ur Rehman Khan M, Nawaz M. Isolation and antibiotic susceptibility of *E. coli* from urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Pak J Med Sci.* 2014; 30(2): 389-92.
- 2- Fan NC, Chen HH, Chen CL, Ou LS, Lin TY, Tsai MH, et al. Rise of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014; 47(5): 399-405.
- 3- Bain R, Cronk R, Hossain R, Bonjour S, Onda K, Wright J, et al. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Trop Med Int Health.* 2014; 19(8): 917-27.
- 4- Kolenda R, Burdakiewicz M, Schierack P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 23.
- 5- Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol.* 2008; 190(20): 6881-93.
- 6- Hakimi Alni R, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of different origins based on the polymorphism of the spa gene: characterization of a novel spa type. *3 Biotech.* 2018; 8(1): 58.
- 7- Shahcheraghi F, Aslani MM, Mahmoudi H, Karimitabar Z, Solgi H, Bahador A, et al. Molecular study of carbapenemase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems and determining their clonal relationship using pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol.* 2017; 66(5): 570-76.
- 8- Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2818-24.
- 9- Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* 1992; 174(14): 4525-9.
- 10- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpiting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(24): 6823-31.
- 11- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaffer MA. Medical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Elsevier Health Sciences; 2015.
- 12- He F. *E. coli* genomic DNA extraction. 2011. Bio-protocol. Available at: [www.bio-protocol.org/e97](http://www.bio-protocol.org/e97). Jul 20, 2011.
- 13- Chen J, Griffiths MW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 27(6): 369-71.
- 14- James Rohlf F. NTSYS-pc NT. Multivariate Analysis System. Version 2.10 e. New York: Applied Biostatistics. Inc; 2000.
- 15- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(11): 2465-6.
- 16- Ardakani MA, Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electron Physician.* 2016; 8(4): 2291-6.
- 17- Chirindze LM, Zimba TF, Sekyere JO, Govinden U, Chenia HY, Sundsfjord A, et al. Faecal colonization of *E. coli* and *Klebsiella* spp. producing extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC in Mozambican university students. *BMC Infect Dis.* 2018; 18(1): 244
- 18- Yuan W, Chai TJ, Miao ZM. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Sci Total Environ.* 2010; 408(6): 1446-50.
- 19- Jurkovič D, Križková L, Sojka M, Takáčová M, Dušinský R, Krajkovič J, et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *Int J Food Microbiol.* 2007; 116(1): 82-7.

- 20- Mohapatra B, Mazumder A. Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments. *Water Sci Technol.* 2008; 58(3): 537-47.
- 21- Sekhar MS, Sharif NM, Rao TS, Metta M. Genotyping of virulent *Escherichia coli* obtained from poultry and poultry farm workers using enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction. *Vet World.* 2017; 10(11): 1292-6.
- 22- Dalla-Costa LM, Irino K, Rodrigues J, Rivera IN, Trabulsi L. Characterisation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J Med Microbiol.* 1998; 47(3): 227-34.
- 23- da Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IA, Leite DS, de Castro AF, et al. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet Microbiol.* 2002; 89(4): 323-8.
- 24- Durmaz S, Banu Buyukunal Bal E, Gunaydin M, Yula E, Percin D. Detection of  $\beta$ -lactamase genes, ERIC-PCR typing and phylogenetic groups of ESBL producing quinolone resistant clinical *Escherichia coli* isolates. *Biomedical Research.* 2015; 26(1): 43-50.
- 25- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, Gonzalez JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(1): 211-5.