

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

Reza Hakimi Alni¹, Navab Ghobadi², Maryam Najafi Asl³, Aram Sharifi³

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

¹ **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

² Department of Agriculture (Animal science), Payame Noor university, Tehran, Iran.

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

ژنوتایپینگ /شریشیاکلی های جدا شده از نمونه های بیمارستانی و آبی با استفاده از روش ERIC-PCR، در شهرستان همدان

رضا حکیمی آلنی^۱، نواب قبادی^۲، مریم نجفی اصل^۳، آرام شریفی^۳

چکیده

زمینه و هدف: تایپینگ سریع و دقیق /شریشیاکلی برای اطلاع از اپیدمیولوژی و کنترل بیماری های ناشی از آن، امری لازم و ضروری می باشد. هدف مطالعه حاضر، تعیین ارتباط ژنتیکی احتمالی در بین جدایه های با منابع انسانی و آبی /شریشیاکلی با استفاده از روش ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) بود.

روش تحقیق: این مطالعه توصیفی- تحلیلی، در سال های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ انجام گرفت. جامعه هدف در این مطالعه، ۴۵ جدایه /شریشیاکلی (۲۵ جدایه بیمارستانی و ۲۰ جدایه از استخر شنای سر بسته) بود که همه آنها با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مولکولی تأیید شدند و در ادامه با تکنیک ERIC-PCR مورد تایپینگ قرار گرفتند.

یافته ها: به طور کلی در الکتروفورز محصول ERIC-PCR، ۳ 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 ایزوله های مورد مطالعه دیده شد که شامل ۱۲ پروفایل در بین جدایه های انسانی و ۱۰ پروفایل در بین جدایه های آبی بود و همچنین یک پروفایل بین آنها مشترک بود. براساس نتایج دندروگرام، ۲ گروه اصلی و ۷ دسته (A تا G) مشاهده شد.

نتیجه گیری: تمامی جدایه های مورد مطالعه با استفاده از روش ERIC-PCR قابل تایپ بودند و همچنین میزان تنوع ژنتیکی بالایی در بین جدایه های مورد مطالعه دیده شد. وجود پروفایل مشترک در بین جدایه های آبی و انسانی، نشان دهنده چرخش احتمالی این جدایه ها بین انسان-آب-انسان می باشد.

واژه های کلیدی: /شریشیاکلی؛ ERIC-PCR؛ انسان؛ آب استخر

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

دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۴

^۱ نویسنده مسؤول؛ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

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

تلفن: ۰۹۸۹۳۵۶۰۲۳۴۲۵+ پست الکترونیکی: Reza.hakimi77@yahoo.com، R.hakimi91@basu.ac.ir

^۲ گروه کشاورزی (علوم دامی)، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

مقدمه

اعضای خانواده انتروباکتریاسه، جزء مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به حساب می‌آیند. *اشریشیاکلی*، یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه 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: *استافیلوکوکوس*ها، *کلبسیلا*، *پروتئوس*، *انتروباکتر*، *سودوموناس* و ... باعث این نوع عفونت می‌شوند؛ اما *اشریشیاکلی* رایج‌ترین عامل ایجادکننده عفونت مجاری ادراری است و ۸۰ 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 مدفوعی آب در نظر گرفته می‌شود (۳).

با توجه به گستره وسیع *اشریشیاکلی* در انسان، حیوانات و محیط، تعیین میزان ارتباط ژنتیکی بین سویه‌های جدا شده 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.

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 *اشریشیاکلی* استفاده می‌شود (۸).

یکی از تکنیک‌های مولکولی، روش ERIC-PCR است که اولین بار توسط Lupski و همکاران برای تایپینگ میکروارگانیزم‌ها به کار برده شد. در این روش، توالی محافظت‌شده تکراری بین ژنی *انتروباکتریایی*، 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 بانندی 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 *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع مختلف، در ارتباطدهی دقیق بین آن‌ها حائز اهمیت است. اثبات ارتباطات کلون‌های *اشریشیاکلی* به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی را پیدا کرده؛ سویه‌های عفونی را از سویه‌های غیر عفونی متمایز نموده و در نهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نماییم. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی تنوع ژنتیکی و بررسی میزان ارتباط ژنتیکی سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع انسانی و آبی در شهر همدان بود.

روش تحقیق

جمع‌آوری جدایه‌ها:

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

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 ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix آمپلیکون، یک میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) از DNA الگو، یک میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از پرایمر AP-7 و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، انجام گرفت. همچنین برنامه حرارتی شامل واسرشت 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 ERIC-PCR به طریقه فوق، داده‌ها وارد نرم‌افزار NTSYS-PC شد و ابتدا ضریب تشابه جاکارد در بین ایزوله‌ها محاسبه شد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA انجام گرفت؛ سپس با رسم دندروگرام، میزان تشابه بین ایزوله‌ها 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 بیوشیمیایی (تست اکسیداز، کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، کشت در محیط TSI، SIM، EMB، اوره‌آز، مک‌کانکی و ...) مورد سنجش قرار گرفتند (۱۱).

استخراج DNA و تأیید مولکولی جدایه‌های اشریشیاکلی:

ابتدا DNA تمام ۴۵ جدایه، با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج شد (۱۲). در ادامه از روش PCR برای جستجوی ژن *UspA* (جهت تأیید ژنوتیپی جدایه‌ها) که قبلاً توسط Chen و همکاران ارائه شده بود، استفاده گردید (۱۳) (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (-Ampliqon 2x, USA)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (PM، SinaClon BioScience ۲۵)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۹ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. همچنین برنامه حرارتی برای واکنش PCR شامل واسرشت ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکثیری شامل ۹۲ درجه برای یک دقیقه، ۷۰ درجه برای ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای مدت ۶۰ 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 الیگونوکلوئیدی (5'-3')	اندازه محصول PCR (جفت باز)
ERIC-R ERIC-F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	۱۵۰۰ > تا < ۱۵۰۰
UspA -R UspA -F	CCGATACGCTGCCAATCAGT ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	۸۸۴

سنجش قدرت تمایز:

برای سنجش قدرت تمایز، از معادله Simpson's Index Diversity (معادله ۱) استفاده گردید. در این روش، N تعداد

$$D = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

کل سویه‌های مورد مطالعه، S تعداد تیپ‌های ژنتیکی به‌دست آمده و nj تعداد سویه‌های متعلق به تیپ j می‌باشد (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 به‌عنوان جنس /تشریشاکلی 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).

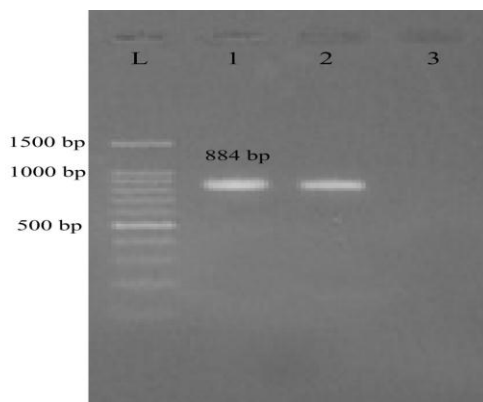
نتایج ERIC-PCR:

برای انجام ERIC-PCR، با توجه به اهمیت غلظت DNA استخراج‌شده، ابتدا با استفاده از نانودارپ غلظت DNA تمام جدایه‌ها سنجیده شد. نتایج DNA استخراج‌شده 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 یک‌درصد، 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؛

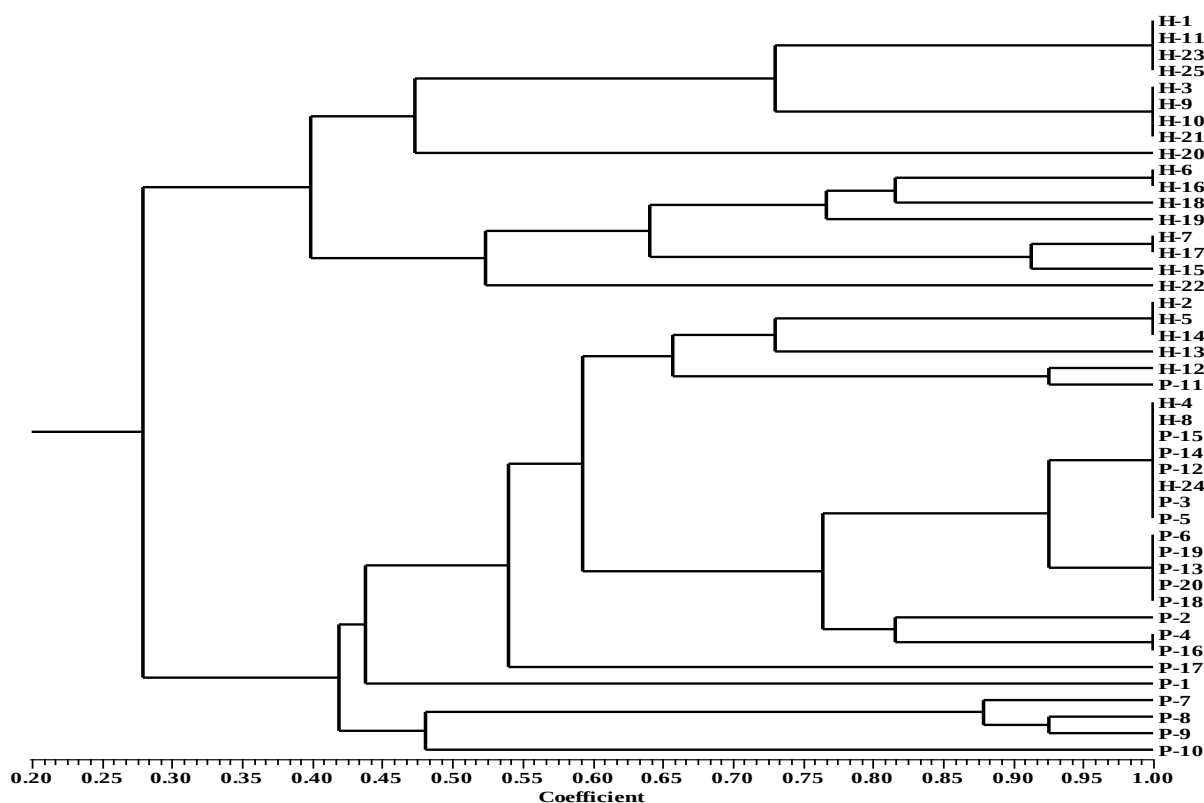
به‌طوری‌که ۳-۸ باند مختلف در محدوده ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز ایجاد کردند که در بین آن‌ها باند ۱۸۰ جفت باز در همه جدایه‌ها دیده شد و باندهای ۸۰۰ و ۹۰۰ جفت باز تنها در تعداد محدودی از جدایه‌ها مشاهده گردید. در مجموع ۲۳ پروفایل ERIC-PCR در بین ایزوله‌های مورد مطالعه دیده شد که شامل ۱۲ پروفایل در بین جدایه‌های انسانی و ۱۰ پروفایل در بین جدایه‌های آبی بود و همچنین یک پروفایل بین آنها مشترک بود.

بر اساس دندروگرام، در میزان تشابه ۳۰ 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 ۷۰ درصد، جدایه‌های مورد مطالعه در ۷ دسته جای داشتند که در دسته‌های A، B، C، D، E، F و G به‌ترتیب: ۸، ۴، ۳، 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.

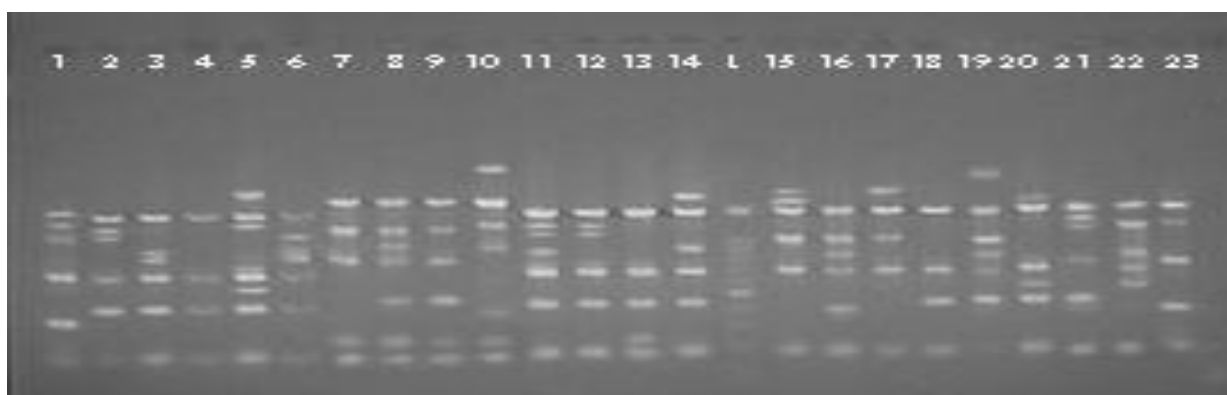
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *UspA*: ستون ۱: کنترل مثبت



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



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ۴۵ جدایه اشیریشیاکلی جداشده از نمونه‌های 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 ERIC-PCR در ژل آگارز یک درصد. ستون ۱ تا ۲۳ مربوط به جدایه‌های اشیریشیاکلی؛ ستون L (نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی)؛ ستون ۳: پروفایل مشترک جدایه‌های انسانی با آبی

نزدیکتر باشد، قدرت تمایز آن روش پایین می‌باشد. در این مطالعه قدرت تمایز روش ERIC-PCR، ۰/۹۵ بود. همچنین از نظر آماری ($P < 0/05$)، جدایه‌های انسانی و آبی به طور معنی‌داری در دو گروه مشخص و جدا از هم قرار گرفته بودند ($P = 0/024$).

نتایج بررسی قدرت تمایز و آنالیز داده‌ها:

بر طبق معادله Simpson's Index Diversity، قدرت تمایز هر روش بین عدد صفر تا یک نشان داده می‌شود؛ به این صورت که هر چه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده قدرت تمایز بالا می‌باشد و هر چه به صفر

بحث

با اینکه تحقیقات زیادی در زمینه تایپینگ مولکولی *اشریشیاکلی* 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 *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از انسان و استخر شنا، با استفاده از روش ERIC-PCR نشان داده شود تا احتمال منشأ آلودگی و نحوه توزیع این باکتری در منطقه مشخص گردد.

اگرچه روش‌های مولکولی زیادی برای تیپ‌بندی *اشریشیاکلی* وجود دارد، اما بسیاری از آنها مانند روش MLST یا PFGE به هزینه بالا و دستگاه‌های گران قیمت نیاز دارد؛ اما روش‌های بر پایه PCR مانند روش-ERIC از سادگی، سرعت و قدرت تمایز بالا برخوردار بوده و از این رو کاربرد وسیعی در تایپینگ باکتری‌ها از جمله آنتروباکتریاسه‌ها دارد (۱۸). در این روش با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای تکرار شونده به عنوان آغازگر سنتز DNA، برای تایپینگ *اشریشیاکلی* استفاده می‌شود. برخلاف روش PCR معمولی که برای انجام دادن آن نیاز به اطلاعات دقیقی از توالی ژن یا DNAی هدف 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 Mohapatra و Mazumder (۲۰۰۸) و اردکانی و رنجبر (۲۰۱۶) نشان داده شد که روش ERIC-PCR، به عنوان یک ابزار قوی در تایپینگ *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع مختلف به حساب می‌آید (۱۶، ۲۰)؛ به طوری که در مطالعه Sekhar و همکاران (۲۰۱۷)، قدرت تمایز این روش ۰/۹۹۹ گزارش شد (۲۱). Chirindze و همکاران (۲۰۱۸) هم نشان دادند که با رعایت شرایط استاندارد در انجام ERIC-PCR، این روش از تکرارپذیری خوبی برخوردار است (۱۷). در مطالعه Dalla-Costa و همکاران (۱۹۹۸)، نشان داده شد که رابطه خوبی بین روش ریبوتایپینگ و

ERIC-PCR در تیپ‌بندی *اشریشیاکلی* وجود دارد و این دو روش می‌توانند به عنوان تکنیک‌های خوبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژی این باکتری به کار برده 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 این طور می‌توان گفت که سویه‌های مشخصی از *اشریشیاکلی* 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 بانندی 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 *اشریشیاکلی* جدا شده از پرندگان، 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 *اشریشیاکلی* احتمالاً به دلیل انواع جهش‌ها و ژن‌های الحاقی 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 *اشریشیاکلی* از نمونه‌های مرغ‌های بیمار با ۷۹ جدایه از مرغ‌های به ظاهر سالم، با استفاده از تکنیک ERIC-PCR مورد تایپینگ قرار گرفت و در مجموع از ۷۹ جدایه مورد تایپینگ شده، ۶۸ پروفایل ERIC ایجاد شد (۲۳). Durmaz و همکاران (۲۰۱۵) در ترکیه، ۴۲ جدایه بالینی *اشریشیاکلی* را به روش ERIC-PCR تیپ‌بندی کردند که در مجموع ۶ گروه ایجاد شد که به نتایج

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، به‌عنوان الگوی با فراوانی بالا (۸ جدایه) در نظر گرفته شد. این الگو را می‌توان به‌عنوان 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 بیماری‌زایی 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 کارایی بالایی دارد.

تقدیر و تشکر

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

تضاد منافع:

نویسندگان 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 جدایه اشریشیاکلی بر اساس میزان تشابه ۷۰ درصد در ۶ گروه (E1-E6) جای گرفتند که در مقایسه با مطالعه ما از تنوع پایین‌تری برخوردار بودند (۱۶).

در مطالعه حاضر بر اساس دندروگرام رسم‌شده، در میزان تشابه بالای ۷۰ درصد، ۷ دسته مختلف ایجاد شد که از A تا G نام‌گذاری شدند. بر این اساس، بیشتر سویه‌های جداسده از منابع انسانی در دسته جداگانه‌ای 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 آلوده به این باکتری، به غذا انتقال یافته و در بین افراد جامعه پخش گردد (۲۵). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که احتمال آلودگی آب استخر 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 پرندگان موجب سپتی‌سمی شده است (۲۳).

در این مطالعه در مجموع ۱۵ کلنی تکی 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 به‌عنوان 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 β -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, Burdukiewicz 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- β -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 fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823-31.
- 11- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 8th ed. Elsevier Health Sciences; 2015.
- 12- He F. *E. coli* genomic DNA extraction. 2011. Bio-protocol. Available at: 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, Dušínský R, Krajčovič 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 β -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 β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(1): 211-5.