پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیستم، شماره ۱، پی در پی ۱۰۳، صفحات ۳۸ تا ۴۴
فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۸/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳

تایپینگ *E. coli* های جدا شده از نمونه‌های آب سطحی ورودی به تصفیه‌خانه‌های شهر تهران به روش ERIC-PCR

دکتر عباس اخوان سپهی*[۱]، کامبیز داوری[۲]، لیلی اختری[۳]

۱. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲. مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

چکیده

سابقه و هدف: تایپینگ سویه‌های باکتریایی، یکی از روش‌های مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک است. بدین منظور در این تحقیق از تکنیک ERIC-PCR جهت بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های *E. coli* جدا شده از آب ورودی به تصفیه‌خانه‌های شهر تهران استفاده شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۶ ایزوله *E. coli* طی دوره‌ی یک ساله، از بین ۱۹۳۹ نمونه ورودی تصفیه‌خانه‌های آب شهر تهران مطابق با روش‌های استاندارد جداسازی شد و با روش ERIC PCR اثر انگشت ژنومیک آنها تعیین و با رسم دندروگرام بر اساس UPGMA، خوشه‌های ترسیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: تعداد ۱۰۶ ایزوله *E. coli* وارد این تحقیق شد و از بابت توالی‌های ERIC، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که راندمان ERIC-PCR در تعیین اثر انگشت بسیار بالا است، چرا که همه‌ی سویه‌ها با این روش قابل تایپ‌بندی بودند. در مجموع، تعداد ۳۲ باند در محدوده‌ی ۱۶۳ تا ۳۲۰۰ به‌دست آمد که به واسطه‌ی آنها، سویه‌ها در ۹ خوشه قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: با بررسی نحوه‌ی توزیع ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های آب ورودی به هر یک از تصفیه‌خانه‌ها در خوشه‌ها، مشخص گردید که با توجه به تنوع بسیار بالای ژنتیکی ایزوله‌های مختلف *E. coli* که از منابع مختلف وارد آب شده‌اند، نمی‌توان الگوی خوشه‌ای خاصی را برای هر یک از تصفیه‌خانه‌ها در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: ژنوتایپینگ، اثر انگشت ژنومیک، *E. coli*، ERIC

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Akhavan Sepahi A, Davari K, Akhtari L. Typing of *E. coli* isolated from influent of Tehran province treatment plants surface water by ERIC-PCR. Pejouhandeh 2015;20(1):38-44.

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژی، نتایج مفید و ارزشمندی را در خصوص چگونگی انتقال میکروارگانیسم‌ها، بروز اپیدمی‌ها، تعیین هویت تیپ‌های بیماری‌زا و تمایز سویه‌های میکروبی در اختیار محققین قرار می‌دهد. تایپینگ می‌تواند به صورت فنوتیپی و یا ژنوتیپی انجام پذیرد. روش‌های فنوتیپی که مبنای آنها خصوصیات بیوشیمیایی است به دلایلی همچون قدرت تکرارپذیری کم و سرعت و قدرت افتراق پایین، به تدریج منسوخ شده و جای خود را به روش‌های ژنوتیپی داده‌اند. در روش‌های ژنوتیپی که معیار خصوصیات ژنومی میکروارگانیسم‌ها است، از توالی‌های خاص موجود در اسید نوکلئیک (DNA و RNA) میکروارگانیسم استفاده می‌گردد. به عبارت بهتر، با شناسایی این توالی‌ها به روش‌های مختلف همچون تکثیر به روش PCR و یا برش توسط آنزیم‌های با اثر محدود، می‌توان اثر انگشت ژنومی میکروارگانیسم را شناسایی نمود. یکی از این توالی‌های خاص که با روش PCR تکثیر می‌شود، توالی‌های محافظت شده‌ی تکراری بین ژنی انتروباکتریایی ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) است. این توالی‌های کوتاه، حفاظت شده و غیرکدکننده، به طول bp ۱۲۶ بوده و برای اولین بار توسط Lupski و همکاران، شناسایی و به عنوان ابزاری قدرتمند در تایپینگ مولکولی میکروارگانیسم‌ها، ارایه شد (۱).

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر عباس اخوان سپهی؛ دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی؛ تلفن: ۰۹۱۲۱۵۴۷۱۶۶؛ پست الکترونیک: Akhavansepahy@gmail.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]

تعداد توالی‌های ERIC بین جنس، گونه و حتی سویه، بسیار متفاوت است. برای مثال Hulton و Higgins اعلام کردند که سویه *E. coli* K-12 واجد حدود ۳۰ کپی از این توالی است در حالی‌که *S. enterica* Typhimurium LT2 واجد ۱۵۰ و *Photorhabdus luminescens* واجد ۷۰۰ کپی از این توالی می‌باشد. در نتیجه‌ی ERIC-PCR، پرایمرهای اختصاصی به این توالی‌ها متصل شده و باندهایی با طول‌های مختلف ایجاد می‌کنند (۲). نکته‌ی قابل توجه در خصوص توالی‌های ERIC آن است که مطابق با نظر Versalovic، این توالی‌ها که به عنوان توالی‌های غیرکدکننده‌ی بین ژنی شناخته می‌شوند، بر خلاف ژن‌های اصلی (Essential genes) که طی فرآیندهای تکاملی تقریباً دست نخورده هستند، دچار تغییرات متعدد شده و از این‌رو، هر ایزوله‌ی باکتریایی، واجد الگوی باندی متفاوت از دیگران و مختص به خود می‌باشد (۵-۳). به همین دلیل، از این تکنیک، به منظور تعیین اثر انگشت ژنومی باکتریایی نیز استفاده می‌شود (۶).

با وجود تکنیک‌های مختلف در ژنوتایپینگ مولکولی نظیر ژل الکتروفورز در میدان ضربان‌دار (که به عنوان تکنیک طلایی در ژنوتایپیگ در نظر گرفته می‌شود)، MLST و غیره، در مقایسه با این تکنیک‌ها، نتایج حاصل از ژنوتایپینگ مولکولی با ERIC-PCR، از بابت هزینه به مراتب اقتصادی‌تر، از بابت زمان بسیار سریع‌تر و از بابت کارایی قابل مقایسه است، به گونه‌ای که مطابق با نظر برخی محققین مانند Panagiota، در برخی ارگانیسم ها، ERIC-PCR قدرت افتراق‌دهی بالاتری نسبت به سایر روش‌ها دارد. با این حال، برخی دیگر، تکرار پذیری ERIC-PCR را زیر سؤال می‌برند (۷). با توجه به اهمیت ردیابی کانون و منشأ آلودگی در منابع آب (۸)، تعیین هویت ژنتیکی عوامل میکروبی و بررسی رابطه‌ی فیلوژنتیکی ایزوله‌های جدا شده از یک منبع و از طرفی با علم به تحقیقات و نتایج پیشین، تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر انگشت ژنومی و بررسی ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از نمونه‌های آب سطحی شهر تهران به روش ERIC-PCR از جایگاه‌های ورودی و خروجی تصفیه‌خانه‌های شهر تهران، صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

دوره‌ی نمونه‌برداری در این تحقیق، یک ساله و از اول مهرماه سال ۱۳۹۱ تا اول مهرماه سال ۱۳۹۲ به طول انجامید. طی این دوره، ۱۰ جایگاه ورودی و خروجی تصفیه‌خانه‌های شهر تهران اعم از تصفیه‌خانه‌ی شماره ۱، تصفیه‌خانه شماره۲، تصفیه‌خانه‌های شماره ۳ و ۴، تصفیه‌خانه‌ی شماره ۵ و آبگیر بیلقان، مورد پایش باکتریولوژیک (شناسایی *E. coli*) قرار گرفتند. نمونه‌برداری بر اساس استاندارد ملی شماره ۴۲۰۸ انجام شد. مطابق با این استاندارد، حجم حدود ml ۲۰۰ آب در شیشه‌های استریل حاوی تیوسولفات سدیم ۳٪ (در خصوص نمونه‌های ورودی و خروجی از تصفیه‌خانه‌هایی که واجد کلر می‌باشند) ریخته شده و به سرعت در کلمن حاوی یخ به آزمایشگاه میکروبی منتقل شده است (۹).

جداسازی *E. coli* بر اساس روش‌های استاندارد مندرج در APHA/AWWA/WEF ۲۰۱۲ صورت گرفت (۱۰). به طور خلاصه، ml ۱۰۰ از نمونه به محیط کشت P/A براث تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (مرحله احتمالی). نمونه‌های مثبت در مرحله احتمالی، به محیط کشت تأییدی (BGBL broth) و در صورت مثبت بودن، متعاقباً به محیط کشت تکمیلی (EC broth) تلقیح شدند. نمونه‌های مثبت در مرحله‌ی تکمیلی (کلی فرم‌های گرماپای) به صورت خطی، روی محیط کشت EMB agar کشت داده شده و کلنی‌های واجد جلای فلزی به عنوان *E. coli* احتمالی، وارد آزمون IMViC و تست بتاگلوکورونیداز شدند. پس از شناسایی و جداسازی ایزوله‌های *E. coli*، کلیه‌ی ایزوله‌ها به صورت کشت خالص تا زمان انجام آزمون‌های مولکولی، به همراه ۲۰٪ گلیسرول در دیپ‌فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند.

پس از پایان دوره‌ی یک ساله، نمونه‌برداری و جداسازی *E. coli*، ایزوله‌ها از دمای ۷۰- درجه خارج شده و روی محیط BHI، احیا شدند. کلنی‌های تک، حاصل از هر کشت خطی روی این محیط کشت، با استفاده از کیت استخراج ستونی DNA AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, South Korea) و مطابق با دستورالعمل‌های ضمیمه، متحمل استخراج DNA شده و کیفیت آنها با بررسی در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام ERIC-PCR نمونه‌های DNA با استفاده از پرایمرهای ERIC1R 5´-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3´ و ERIC2 5´-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3´ تکثیر داده شدند (۴). به منظور تکثیر توالی‌های اختصاصی ERIC، از دستگاه ترموسایکلر ABI verity 96 استفاده شد. حجم واکنش PCR، ۲۵ µl متشکل از ۱۲/۵ µlمستر میکس ۲X، ۱ µl از DNA الگو، ۱ µl از پرایمرهای دوگانه‌ی ERIC

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]

مطابق با توصیه‌ی Versalovic 1994 به غلظت حدود pmol ۱۰ و مابقی، آب مقطر مخصوص PCR بوده است. برنامه‌ی دمایی چرخه‌ی حرارتی شامل ۳ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل که در آنها یک دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و دمای پایانی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود.

پس از اتمام چرخه‌ی تکثیر، به منظور جداسازی باندها، هر یک از محصولات PCR با استفاده از آگاروز ۱٪ و رنگ SYBR green، با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۶۰ دقیقه، الکتروفورز شده و توسط دستگاه ژل داک Gel Doc™ XR+ (BIORAD) و نرم افزار Image Lab™ مورد عکس‌برداری و ارزیابی قرار گرفتند.

برای ترسیم دندروگرام الگوی ERIC-PCR، محاسبه نحوه قرارگیری باندها در ژل بر اساس وزن مولکولی آنها و مقایسه با مارکر مولکولی و شمارش باندها برای هر نمونه صورت گرفت. سپس به باندهای موجود در هر پروفایل، عدد ۱ و باندهای غایب، عدد صفر نسبت داده شد. پروفایل صفر و یک برای هر ایزوله در ابتدا وارد نرم افزار اکسل شده و به منظور تبدیل به فرمت nex وارد نرم افزار Mesquite و در نهایت فایل خروجی این نرم افزار به منظور ترسیم دندروگرام به روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) وارد نرم افزار PAUP 4.0 گردید (۱۱).

یافته‌ها

در مجموع، تعداد ۱۹۳۹ نمونه‌ی آب از ورودی و خروجی جایگاه‌های فوق الذکر مورد آزمایش قرار گرفت که در این بین تعداد ۱۰۶ ایزوله‌ی *E. coli* جداسازی شد (جدول ۱). با توجه به انجام فرآیندهای تصفیه‌ی فیزیکی، شیمیایی و کلرزنی (غلظت کلر حدود ppm ۱)، هیچ یک از نمونه‌های خروجی واجد *E. coli* نبودند. آب ورودی به تصفیه‌خانه‌های شماره ۱ و ۲ به دلیل کلرزنی در محل آبگیر بیلقان و دارا بودن کلر آزد باقیمانده (میانگین ppm ۰/۵) نسبت به سایر تصفیه‌خانه‌ها، از بار میکروبی کمتری برخوردار بودند.

نتایج حاصل از تایپینگ مولکولی با ERIC-PCR منجر به ایجاد ۳۲ باند متفاوت از bp ۱۶۳تا bp ۳۲۰۰ شد که به واسطه‌ی این باندهای مختلف، ۱۰۵ پروفایل متفاوت از ۱۰۶ ایزوله‌ی *E. coli* ایجاد شد (جدول ۲).

فراوان‌ترین باندها به طول‌های bp ۲۹۰۰ و bp ۹۴۰، به ترتیب در ۵۷ و ۵۵ ایزوله مشاهده شد و کمترین باندها به طول‌های bp ۱۸۱ و bp ۱۶۳، به ترتیب در ۳ و ۴ ایزوله، مشاهده گردید. بیشترین تعداد باند (۱۶ باند) در ایزوله‌های شماره‌ی ۱۷ و ۴۷ و کمترین تعداد باند (۱ باند) در ایزوله شماره‌ی ۴۳ دیده شد (شکل ۱). بر اساس دندروگرام و در نظر گرفتن تشابه ۷۵٪ به عنوان معیار خوشه‌بندی، ۱۰۵ ایزوله در ۹ خوشه از E۱ تا E۹ تفکیک شدند. در بین ۹ خوشه، بزرگترین خوشه، E۱ با ۴۴ عضو و کوچکترین خوشه، E۶ با ۲ عضو می‌باشد (شکل ۲).

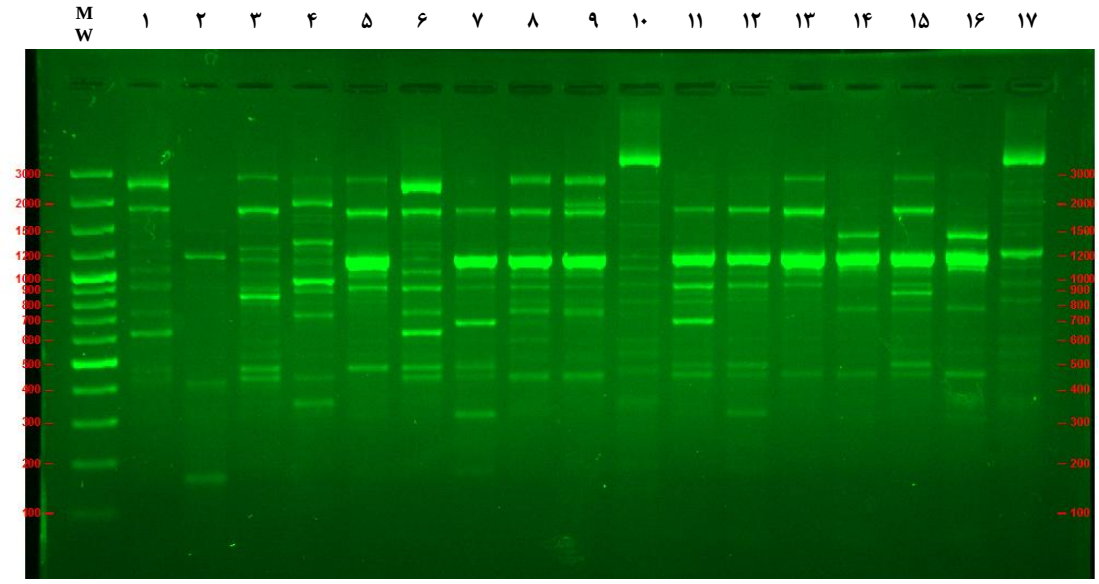
جدول ۱. جایگاه‌های نمونه‌برداری و تعداد سویه‌های *E. coli*

ردیف	محل نمونه برداری	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه کل کلی فرم مثبت	تعداد نمونه کلی فرم گرماپای مثبت	تعداد نمونه *E. coli* مثبت
۱	ورودی آب تصفیه خانه شماره ۱	۲۳۳	۸	۳	۱
۲	خروجی آب تصفیه خانه شماره ۱	۲۳۳	۰	۰	۰
۳	ورودی آب تصفیه خانه شماره ۲	۲۱۳	۱۴	۵	۲
۴	خروجی آب تصفیه خانه شماره ۲	۲۱۳	۰	۰	۰
۵	ورودی تصفیه خانه شماره ۳ و ۴	۲۴۰	۱۳۶	۱۲۵	۴۸
۶	خروجی تصفیه خانه شماره ۳ و ۴	۲۴۰	۰	۰	۰
۷	ورودی تصفیه خانه شماره ۵	۲۷۵	۱۸۳	۱۵۳	۴۲
۸	خروجی تصفیه خانه شماره ۵	۲۷۵	۰	۰	۰
۹	ورودی آبگیر بیلقان	۱۷	۱۷	۱۷	۱۳
	مجموع	۱۹۳۹	۳۵۸	۳۰۳	۱۰۶

جدول ۲. نتایج حاصل از تایپینگ مولکولی با روش ERIC-PCR

نوع تایپینگ	تعداد پروفایل غیرتکراری	تعداد پروفایل تکراری	حداقل تعداد باند	حداکثر تعداد باند	تنوع باندها	فراوان‌ترین باند	کمترین باند
ERIC- PCR	۱۰۵	۱	۱	۱۶	۳۲ عدد	۲۹۰۰ bp	۱۸۱ bp

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]



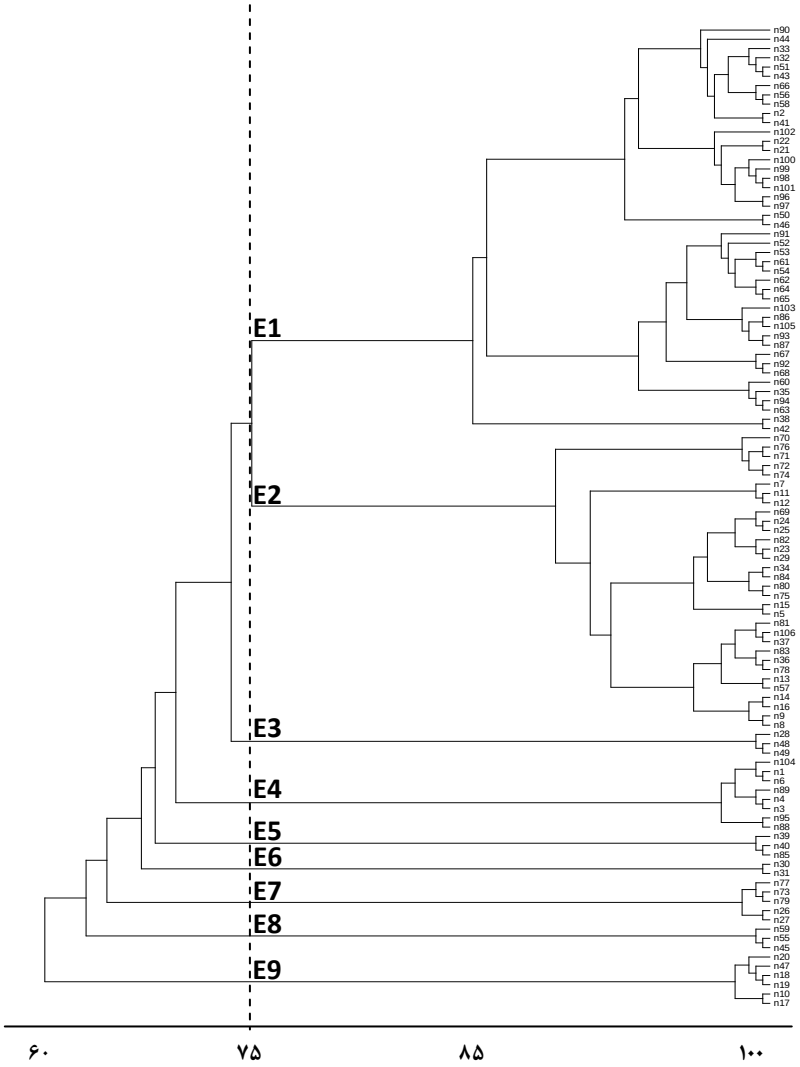
شکل ۱. اثر انگشت DNA ژنومی حاصل از تکثیر با پرایمرهای ERIC و جدا شده در آگاروز ۱٪. شماره ایزوله‌ها (۱ تا ۱۷) و خط‌کش مولکولی (شماره ۱: DNA-Ladder 100bp plus محصول شرکت Fermentas) در بالای شکل گنجانده شده است.

بحث

E. coli یکی از شاخص‌های بهداشت و کیفیت باکتریولوژیک آب است که در بیشتر مراکز مرتبط با بهداشت آب، مورد پایش و شناسایی فنوتیپی قرار می‌گیرد (۱۰). در کنار شناسایی فنوتیپی، ژنوتایپینگ و بررسی اپیدمیولوژیک مولکولی به منظور شناسایی ایزوله‌های تکراری، تعیین اثر انگشت، ردیابی منشأ آلودگی و ... نیز می‌تواند از معیارهای مهم در پایش کیفی منابع آب باشد. تکنیک‌های مختلفی برای ژنوتایپینگ باکتری‌ها وجود دارد که مهترین آنها عبارت از تکنیک PFGE، رایبوتایپینگ، MLST و تایپینگ بر اساس توالی‌های تکراری محافظت شده، می‌باشند (۱۱).

روش‌های تعیین اثر انگشت ژنومی بر اساس توالی‌های تکراری برای اولین بار توسط دکتر لوپسکی در دانشگاه پزشکی بایلور (هوستون، تگزاس) ارایه و در تعیین تنوع ژنتیکی انواع سویه‌های میکروبی پزشکی، محیطی و صنعتی، با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته و نتایج قابل قبولی ارایه نموده است. علاوه بر بررسی تنوع ژنتیکی، این تکنیک توسط Louws (۱۹۹۶) و Versalovic (۱۹۹۷) به عنوان یک ابزار بسیار قدرتمند در شناسایی و طبقه‌بندی و نیز مطالعات اپیدمیولوژیک انواع باکتری‌ها، معرفی شده است (۱۲). این تکنیک کاربرد قابل قبولی در افتراق و کلاسه‌بندی باکترهای گرم مثبت و گرم منفی همچون باسیلوس سرئوس، سالمونلا، هلیکوباکتر پایلوری، انتروکوکوس و غیره داشته است (۲۱-۱۳). از کاربردهای دیگر این روش، می‌توان به شناسایی منشأ باکتریایی (MST) اشاره نمود. برای مثال، Mohapatra و Mazumder، از روش‌های وابسته به تکثیر توالی‌های تکراری (rep) به منظور بررسی منشأ اشریشا کولی جدا شده از منابع آبی استفاده نموده و در کنار تکنیک GTG5، تکنیک ERIC را به عنوان ابزار مولکولی جدید در شناسایی منشأ آلودگی، معرفی نمودند (۲۲). در یک تحقیق دیگر که توسط Mohapatra و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد، مشخص گردید که روش تایپینگ ERIC قابلیت بالایی در تعیین منشأ اشرشیا کولی جدا شده از منابع مختلف اعم از انسان و ماکیان و پرندگان وحشی دارد (۲۳). به منظور بررسی ERIC در ژنوتایپینگ در این تحقیق، ۱۰۶ ایزوله‌ی *E. coli* پس از پایش ۱۹۳۹ نمونه‌ی آب، وارد فاز ژنوتایپینگ شدند. نکته‌ی قابل تأمل در جداسازی ایزوله‌ها، راندمان بالای مراحل مختلف تصفیه است، چرا که تمامی ایزوله‌ها، از جایگاه‌های ورودی ۵ تصفیه‌خانه‌ی آب شهر تهران، جدا شدند. با نگاهی به تعداد پروفایل‌های حاصل از ERIC-PCR، می‌توان این تکنیک را به عنوان یکی از قدرتمندترین ابزار ژنوتایپینگ نام برد چرا که در بین ۱۰۶ ایزوله، ۱۰۵ پروفایل متفاوت حاصل شد و ثابت کرد که این توالی‌های تکراریِ محافظت شده، با یک الگوی خاص و منحصر به فرد در ایزوله‌های *E. coli* توزیع گردیده و تکامل زمانی باعث شده است که نحوه‌ی پراکندگی این توالی‌ها در جنس، گونه و حتی سویه‌ها، متفاوت و منحصر به فرد باشد. در این بررسی، پس از انجام ERIC-PCR، اثر انگشت ژنومیک هر یک از ایزوله‌ها به دست آمد. آنالیز

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]



شکل ۲. دندروگرام رابطه‌ی فیلوژنتیکی میان ۱۰۶ ایزوله *E. coli* جدا شده از منابع آب سطحی تهران. شماره‌ی ایزوله‌ها در سمت راست شکل گنجانده شده است. خط‌چین، معیار خوشه‌بندی بر اساس تشابه ۷۵٪ است.

خوشه‌ای داده‌های حاصل از روش‌های فوق، با استفاده از روش UPGMA و معیار تشابه ۷۵٪ نشان داد که این ایزوله‌ها در خوشه‌های مختلف از E۱ تا E۹ قرار دارند. بر اساس بررسی دندروگرام و خوشه‌بندی‌ها، مشخص شد که نحوه‌ی پراکندگی ایزوله‌ها در خوشه‌های ۹ گانه، وابسته به ژنوتایپ خاصی نیست. برای مثال، ایزوله‌های جدا شده از ورودی تصفیه‌خانه‌ی شماره‌ی ۵ (۴۱ ایزوله) در ۷ خوشه دیده می‌شود. از طرفی، با درنظرگرفتن زمان جداسازی ایزوله‌ها (از ابتدای مهر ۹۱ تا ۹۲)، مجدداً ایزوله‌ها در یک دوره‌ی زمانی در خوشه‌های خاص قرار نمی‌گیرند. این نتیجه در نگاه اول، با نتایج مطالعات Mohapatra و همکاران (۲۳)، Gevers و همکاران (۲۴) و McLellan و همکاران (۲۵) در تناقض است. به عنوان مثال، Mohapatra و همکاران نشان دادند که توالی‌های تکراری، دارای قابلیت طبقه‌بندی و افتراق سویه‌های *E. coli* انسانی از غیر انسانی می‌باشند (۲۳). همچنین، بر اساس نتایج Gevers و همکاران، توالی‌های تکراری می‌توانند در دسته‌بندی انواع ایزوله‌های لاکتوباسیلوس‌ها مؤثر باشند (۲۴). در تحقیق McLellan و همکاران نیز از اثر انگشت ژنتیکی ایزوله‌های *E. coli* مختلف، به منظور افتراق منشأ جداسازی (انسان، مرغ و سگ) استفاده شده است (۲۵). در یک تحقیق دیگر که توسط Puente-Redondo و همکاران (۲۰۰۰) انجام گرفت، توالی‌های تکراری، دارای قابلیت خوشه‌بندی و افتراق سویه‌های فرانسیلا تولارنسیس جدا شده از منابع مختلف مانند انسان، خرگوش، کنه و موش صحرایی بودند (۲۶). همین نتایج، بیانگر قابلیت این روش در تعیین منشأ جداسازی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از محققین معتقدند که تکنیک ERIC-PCR

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]

قابلیت خوشه‌بندی قابل توجهی دارد هرچند که این انتظار در تحقیق ما محقق نشد. علت این امر را می‌توان این‌گونه توجیه نمود که با توجه به ورود انواع سویه‌های *E. coli* با منشأ انسانی و یا حیوانی، انواع پاتوتایپ‌ها، انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و غیره، آب‌های سطحی می‌توانند دریافت کننده‌ی انواع میکروارگانیسم‌ها بوده و از این‌رو آب به عنوان یک محیط غیرانتخابی می‌تواند ژنوتایپ و فنوتایپ‌های مختلف انواع میکروارگانیسم‌ها را دریافت کند و به همین دلیل نمی‌توان ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از یک منبع مشخص آب را منحصر به خوشه‌ی خاصی دانست. بنابراین، نتیجه‌ی نهایی این تحقیق را این‌گونه می‌توان بیان نمود که ERIC-PCR یک تکنیک قدرتمند در تعیین اثر انگشت باکتری‌هایی همچون *E. coli* است ولی با توجه به تنوع بسیار بالای انواع ایزوله‌های ورودی به آب، نه تنها ERIC-PCR بلکه تکنیک‌های دیگر همچون PFGE نیز قابلیت چندانی در خوشه‌بندی ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از آب را ندارند.

تشکر و قدردانی

در پیشبرد این پروژه، آقای روح الله خیری و خانم مریم اصغری کمک شایانی کرده‌اند که بدین‌وسیله از ایشان تقدیر و تشکر می‌گردد.

REFERENCES

1. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J Bacteriol 1992; 174: 4525-9.

2. Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences, a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol 1991; 5: 825-34.

3. 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: 6823-31.

4. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol 1994; 5: 25-40.

5. Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res 1990; 18(22): 6503-8.

6. Bachellier S, Clément JM, Hofnung M. Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey. Res Microbiol 1999; 150: 627-39.

7. Grammenou P, Spiliopoulou I, Sazakli E, Papapetropoulou M. PFGE analysis of enterococci isolates from recreational and drinking water in Greece. J Water Health 2006; 4(2): 263-9.

8. Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. Appl Environ Microbiol 2011; 68: 5796-803.

9. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Water quality- sampling for microbiological examination of water - Code of practice. Tehran: ISIRI 1386. (Full Text in Persian)

10. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Microbiological examination. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: DC: American Public Health Association; 2012.

11. Meacham KJ, Zhand L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 5224-26.

12. Louws FJ, Bell J, Medina-Mora CM, Smart CD, Opgenorth D, Ishimaru CA, *et al*. Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. Phytopathology; 88(8): 862-8.

13. Pinna A, Sechi LA, Zanetti S, Usai D, Delogu G, Cappuccirelli P, *et al*. Bacillus cereus keratitis associated with contact lens wear. Ophthalmology 2011; 108 (10): 1830-4.

14. Millemann Y, Lesage-Descauses MC, Lafont JP, Chaslus-Dancla E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of Salmonella. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 14(2-3): 129-34.

15. Kerouanton A, Brisabois A, Grout J, Picard B. Molecular epidemiological tools for Salmonella Dublin typing. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 14(1): 25-9.

16. Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella enteritidis* isolates from Poland. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002; 49(4): 163-8.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]

17. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, Zutter LD, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3615-23.

18. Ibekwe M, Fendri I, Ben Hassena A, Grosset N, Barkallah M, Khannous L, *et al*. Genetic diversity of food-isolated Salmonella strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). PLoS One 2013; 8(12): e81315. doi: 10.1371/journal.pone.0081315

19. Kwon DH, El-Zaatari FA, Woo JS, Perng CL, Graham DY, Go MF. REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori* strains. Dig Dis Sci 1998; 43(5): 980-7.

20. Stumpf AN, Roggenkamp A, Hoffmann H. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the Enterobacter cloacae complex. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53(1): 9-16.

21. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii complex. J Med Microbiol 1996; 44(6): 482-9.

22. Mohapatra BR, 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.

23. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. FEMS Microbiol Lett 2007; 277(1): 98-106.

24. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identication of Lactobacillus species. FEMS Microbiol Lett 2001; 205(1): 31-6.

25. McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. Appl Environ Microbiol 2003; 69(5): 2587-94.

26. de la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutiérrez-Martín CB, García-Peña FJ, Rodríguez Ferri EF. Comparison of different PCR approaches for typing of Francisella tularensis strains. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1016-22.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-07]