



The study of the diversity of repeated sequences in *E. coli* strains isolated from Alborz province's water sources

Samaneh Shokoohi Mostafavi¹, Reza Ranjbar²

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

2. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2015/06/24

Accepted: 2015/11/16

Available online: 2016/10/16

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 10(6): 16-24

Corresponding author at:

Dr. Reza Ranjbar

Molecular Biology Research
Center, Baqiyatallah
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran

Tel: 0982182482556

Email:

ranjbarre@gmail.com

Abstract

Background and Aim: *E.coli* is a gram-negative bacillus from the family of Enterobacteriaceae. *E. coli* bacteria is used as a water indicator of urban sewage pollution. The repeating sequences, are replications of the genes or parts of them that are repeated. Tandem repeats may be available for the number of iterations in a different creature than other populations, which are called as consequent replications with variable numbers. The purpose of this study was to evaluate the diversity of repeated sequences of *ms06* and *ms23* loci in *E. coli* strains isolated from water resources in Alborz province.

Materials and Methods: A total of 72 *E.coli* isolates which obtained from water sources in Alborz, Iran, from September 2012 to October in 2013, were analyzed, then standard and biochemical tests were used to identify and isolate *E. coli* bacteria, after that, DNA extraction was performed by boiling method. The diversity of repeated sequences of *ms06* and *ms23* loci in *E. coli* was conducted using polymerase chain reaction.

Results: The current study showed that the locus *ms06* had five different alleles (1 repeat, 2 repeat, 3 repeat, 4 repeat, 5 repeat) and locus *ms23* showed four alleles (1 repeat, 2 repeat, 2.5 repeat). It is also founded that *ms23* loci contain a null allele.

Conclusions: This is the first study on the diversity of repeated sequences in *E.coli* strains isolated from water resources in Alborz. In this study, the variation of repeated sequences was high.

KeyWords: *Escherichia coli*, Repeated sequences, Polymerase Chain Reaction, Alborz province

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Shokoohi Mostafavi S, Ranjbar R. The study of the diversity of repeated sequences in *E. coli* strains isolated from Alborz province's water sources. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 16-24



Farnam Inc.

بررسی میزان تنوع توالی‌های تکرارشونده در سویه‌های *اشریشیا کلی* جدا شده از منابع آب استان البرز

سمانه شکوهی مصطفوی^۱، رضا رنجبر^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۰۳

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

میکروبیولوژی مولکولی

IJMM 1395; 10(6): 16-24

نویسنده مسئول:

دکتر رضا رنجبر

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی،

دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۸۲۴۸۲۵۵۶

پست الکترونیک:

Ranjbarrr@gmail.com

مقدمه

زمینه و اهداف: *اشریشیا کلی* (*E. coli*) باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. باکتری *E. coli* به عنوان شاخص آلودگی آب شهری به فاضلاب استفاده می‌شود. توالی‌های تکرارشونده، تکرارهایی از خود ژن‌ها یا قسمت‌هایی از آن‌ها است که تکرار شده‌اند. تکرارهای پشت سرهم ممکن از نظر تعداد تکرارها در یک موجود نسبت به سایر جمعیت‌های آن موجود متفاوت باشند، که در اصطلاح به آن‌ها، تکرارهای پشت سرهم با تعداد متغیر می‌گویند. هدف از این مطالعه بررسی میزان تنوع توالی‌های تکرارشونده مربوط به دو لوکوس مهم یعنی *ms06* و *ms23* در *E. coli* های جدا شده از منابع آب استان البرز است.

مواد و روش کار: تعداد ۷۲ ایزوله جدا شده *E. coli* که از مهرماه سال ۹۱ تا مهرماه سال ۹۲، از منابع آب استان البرز جمع‌آوری شده بودند مورد بررسی قرار گرفت و از آزمون‌های بیوشیمیایی و استاندارد جهت شناسایی و جداسازی باکتری *E. coli* استفاده شد و پس از آن استخراج ژنوم به وسیله روش جوشاندن صورت گرفت. بررسی میزان تنوع توالی‌های تکرارشونده مربوط به دو لوکوس *ms06* و *ms23* در *E. coli* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از انجام الکتروفورز در ۲ لوکوس *ms06* و *ms23* نشان داد که لوکوس *ms06* دارای ۵ نوع الل متفاوت (۱ تکرار، ۲ تکرار، ۳ تکرار، ۴ تکرار، ۵ تکرار) و لوکوس *ms23* دارای ۴ نوع الل متفاوت (۱ تکرار، ۲ تکرار، ۳ تکرار، ۴ تکرار) می‌باشد و نیز لوکوس *ms23*، دارای الل *null* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر برای اولین بار بر روی *E. coli* های جدا شده از منابع آب استان البرز انجام شده است. میزان تنوع توالی‌های تکرارشونده در سویه‌های مورد بررسی بالا بود.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، توالی‌های تکرارشونده، واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، استان البرز

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

اشریشیا کلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. این باکتری، ۱/۰ درصد فلور روده را به خود اختصاص داده است. *E. coli* طبیعتاً غیر بیماری‌زا است، ولیکن برخی از انواع آن با به دست آوردن عوامل ویروالانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها و ترانسپوزن‌ها و باکتریوفازها و لوکوس‌های پاتوژنیسیته می‌توانند باعث بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شوند. همچنین *E. coli* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه است (۱). در محیط‌های آبی تعیین منبع آلودگی مدفوعی، همواره از اهمیت زیادی برخوردار بوده است.

اشریشیا کلی به مدت کافی در شرایط مختلف آبی زنده مانده، به راحتی جداسازی و شمارش شده و مورد شناسایی قرار می‌گیرد. به همین دلیل از این باکتری به عنوان شاخص کیفیت و سلامت آب آشامیدنی استفاده می‌گردد. این دستورالعمل توسط سازمان حفاظت زیست ایالات متحده آمریکا توصیه شده است (۴-۲). علاوه بر این، *E. coli* می‌تواند شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را بین جمعیت‌های انسانی و حیوانی منتقل نماید. بنابراین، آب مسیری است که از راه آن، شاخص‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به اکوسیستم‌های باکتریایی محیطی منتقل می‌شوند (۵). راه انتقال این باکتری از طریق مسیر مدفوعی - دهانی از یک فرد به فرد دیگر است (۶). یکی از مهم‌ترین ناقلین انتقال این باکتری آب می‌باشد

توالی های تکرارشونده (Tandem repeats)، الگوهای از اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) هستند که در چندین کپی (نسخه) در ژنوم موجودات قرار دارند. توالی های تکرارهای پشت سرهم زمانی اتفاق می افتند که تعداد ۲ یا بیشتری از نوکلئوتیدها در مجاورت یکدیگر (بدون فاصله) تکرار شوند (۱۶). تکرارهای پشت سرهم ممکن است در یک موجود (مانند انسان) نسبت به سایر جمعیت های آن موجود، از نظر تعداد تکرارها متفاوت باشند که در اصطلاح به آن ها، تکرارهای پشت سرهم با تعداد متغیر (Variable Number Tandem Repeat) می گویند. همین ویژگی جالب باعث شده است که از زمان کشف این توالی های خاص، از آن ها در ژنتیک، زیست شناسی، تحقیقات پزشکی جنایی و انگشتنگاری DNA استفاده شود (۱۷). این توالی ها ابتدا در ژنوم جانداران یوکاریوتی مانند انسان کشف شدند، اما بعدها مشخص شد که حتی پروکاریوت ها مانند باکتری ها نیز چنین توالی هایی در ژنوم خود دارند. هرگونه یا جنس، توالی های VNTR مخصوص به خود را دارد که کاملاً متفاوت از گونه ها یا جنس های دیگر است. توالی های VNTR به علت سُر خوردن آنزیم DNA پلی مراز در هنگام همانندسازی ژنوم به وجود می آیند و همین امر موجب تنوع در تعداد تکرارهای VNTR می شود (۱). در ایران مطالعات بسیاری در زمینه شناسایی /شریشیکلی در آب و بررسی ابعاد گوناگون زیستی آن با روش های مولکولی انجام گرفته است (۱۸)، اما تاکنون در مورد بررسی تنوع توالی های تکرارشونده در سویه های /شریشیکلی جدا شده از منابع آب، گزارشی در این راستا مشاهده نشده است. نظر به نقش غیرقابل انکار آب به عنوان یک عامل استراتژیک بسیار مهم در انتقال عوامل پاتوژن، بررسی حضور و همچنین تایپینگ آن ها می تواند از اولین راهکارهای شناسایی و کنترل این عوامل باشد. (۱۹) به دنبال بروز یک همه گیری ناشی از استفاده از آب آلوده، توجه به ابعاد اپیدمیولوژیک در شناخت عامل ایجاد آلودگی، منبع، مخزن و چگونگی انتقال و انتشار آن و به دنبال آن جهت دهی اقدامات محافظتی و درمانی و کاهش منبع آلودگی بسیار حائز اهمیت است (۱۸).

هدف از انجام این پژوهش این است که برای اولین بار سویه های /شریشیکلی را از نظر تنوع توالی های تکرارشونده و ال های غالب آن، مورد بررسی قرار دهیم تا اولاً درک صحیحی از میزان تنوع جمعیتی ایزوله های /شریشیکلی داشته باشیم و ثانیاً بتوانیم در آینده، از این لوکوس ها جهت تمایز و بررسی قرابت

و حضور این باکتری در آب و مواد غذایی نشان دهنده آلودگی اخیر آن نمونه با مدفوع و حضور احتمالی سایر پاتوژن های خطرناک می باشد (۷، ۸). از بین عوامل باکتریایی بیماری زا، /شریشیکلی مولد اسهال (DEC) در این دسته بندی جایگاه ویژه ای داشته و یکی از عوامل مهم اسهال اپیدمیک و اندمیک در جهان می باشد (۹). /شریشیکلی EPEC عامل بیماری اسهال نوزادان به صورت تک گیر و همه گیر در کشورهای در حال توسعه بوده و از قدیمی ترین پاتوتایپ های شناسایی شده /شریشیکلی می باشند که در روده کوچک تکثیر یافته و اساساً باعث اسهال حاد و غیرخونی می گردند. این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث به هم ریختگی ساختار در سلول گردیده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در سطح روده می شود (۱۰). /شریشیکلی ETEC تولید دو نوع انترتوکسین (حساس به حرارت LT و مقاوم به حرارت ST) می نماید که با تولید این انترتوکسین باعث ترشح مایعات به داخل روده شده و اسهال آبکی ایجاد نماید. سویه های ETEC یکی از اصلی ترین عوامل اسهال در مسافران می باشد. آب و مواد غذایی آلوده از مهم ترین عوامل انتقال بیماری می باشد (۱۱). /شریشیکلی EHEC باعث ایجاد اسهال خونی و کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می شوند. از خصوصیات اصلی سویه های EHEC تولید توکسین های stx1 و stx2 می باشد. مهم ترین سروتایپ شایع آن O157:H7 می باشد. آب و مواد غذایی و سبزیجات از مهم ترین راه های انتقال بیماری می باشند. از ویژگی بارز این سویه ها اهمیت آن ها در عوارض بالینی بسیار وخیم به ویژه در کودکان می باشد (۱۲). /شریشیکلی های EIEC می توانند هم اسهال آبکی و هم اسهال خونی که شبیه دیسانتری می باشد را ایجاد نمایند. این گونه سبب تهاجم به سلول های اپی تلایال روده و تخریب و مرگ سلول ها می شوند. بیشتر همه گیری های ایجاد شده توسط سویه های EIEC از طریق آب و مواد غذایی بوده است (۱۳). از آنجایی که سویه های DEC از *E. coli* غیر بیماری زا (که به طور معمول در مدفوع انسان یافت می شوند) قابل تمیز و جداسازی نمی باشد، نمی توان تنها بر اساس معیارهای بیوشیمیایی و کشت این سویه ها را شناسایی کرد، لذا در بررسی نمونه های آب به ویژه آب آشامیدنی که توسط *E. coli* آلوده می شوند، نمی توان بیماری زا بودن و یا نبودن آن را شناسایی نمود (۱۴). اسهال، تهوع، استفراغ، کرامپ شکمی از علائم ابتلا به باکتری *E. coli* است (۱۵).

ژنتیکی و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی این ایزوله‌ها در آلودگی آب‌ها استفاده نماییم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، جامعه موردبررسی که از مهرماه ۹۱ تا مهر ۹۲ جمع‌آوری شده است. بر طبق مطالعات قبلی همه‌گیری‌شناسی مولکولی مشابه، تعداد ۱۰۰ نمونه آب از منابع آب استان البرز، آب‌های سطحی مانند چشمه‌ها، ورودی تصفیه‌خانه رجایی شهر (طالقان) که منبع آن از طالقان است، ورودی تصفیه‌خانه بیلقان (کرج) که منبع آن از رودخانه کرج و تعدادی از چاه‌های شهرستان کرج موردبررسی قرار گرفت که از این تعداد در ۷۲ مورد ایزوله‌های /شریشیالکی قابل جداسازی و موردبررسی قرار گرفت. جمع‌آوری و جداسازی و شناسایی نمونه‌ها توسط کارشناس میکروبیولوژی آب و فاضلاب صورت گرفته است و فقط برای اطمینان بیشتر یکبار دیگر بر روی محیط کشت آئوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای 35 ± 0.5 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و سپس با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد (IMViC) اندول، متیل رد، و وگس پروسکوئر مورد آنالیز قرار گرفتند.

استخراج ژنوم باکتری

پس از جداسازی و تعیین هویت ایزوله‌های باکتریایی، با استفاده از روش جوشاندن، ژنوم باکتریایی استخراج گردید (۲۰). بدین منظور، مقداری کلنی تک به‌واسطه لوپ در ۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیرشده در درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر حل شدند، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب داغ انکوبه گردیدند بعدازآن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی (به‌عنوان ژنوم استخراج‌شده) با استفاده از سمپلر جمع کرده و در یک میکروتیوپ جدید جمع‌آوری شدند. سپس بعد از انجام آنالیزهای

کیفی و کمی به‌عنوان DNA الگو برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورداستفاده قرار گرفت.

مراحل انجام PCR

در این مطالعه از ۲ لوکوس *ms06* و *ms23* به دلیل اینکه، یکی از مهم‌ترین لوکوس‌های موجود بین سایر لوکوس‌های *E.coli* می‌باشند، برای بررسی میزان تنوع توالی‌های تکرارشونده در سویه‌های *E.coli* جداسازی شده از منابع آب استان البرز استفاده شده است. بر اساس پروتوکل Gorge و همکاران جفت پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر لوکوس‌های VNTR طبق جدول شماره ۱ انتخاب و جهت تهیه به شرکت (pishgam, Iran) سفارش داده شد (۲۱). واکنش PCR برای هر لوکوس VNTR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف ساخته کشور آمریکا انجام گرفت. اجزا و غلظت ترکیبات موجود در PCR عبارتند از: ۲ میکروگرم DNA استخراج‌شده، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (ساخته کمپانی Ampliqon کشور دانمارک) واجد Taq DNA polymerase به همراه بافر (2X) dNTP و کلرید منیزیم (pishgam, Iran)، ۱۰ پیکومول از زوج پرایمرهای R و F (pishgam, Iran) و آب مقطر دو بار تقطیر.

برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر برای تمامی لوکوس‌ها به‌صورت زیر است:

۱. واسرشت اولیه: دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه
۲. واسرشت: دمای 93°C به مدت ۱ دقیقه
۳. اتصال: دمای 55°C برای تمامی لوکوس‌های VNTR به مدت ۱ دقیقه
۴. گسترش: دمای 72°C به مدت ۱ دقیقه
۵. تعداد دورها: ۳۵ چرخه
۶. گسترش نهایی: 72°C به مدت ۷ دقیقه

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر لوکوس‌های VNTR

اندازه تکرار Tandem Repeat (TR) size, bp	پرایمرها ($5' \rightarrow 3'$)	لوکوس
39 (bp)	F: AAA CGG GAG AGC CGG TTA TT R: TGT TGG TAC AAC GGC TCC TG	ms06
375 (bp)	F: GCT CCG CTG ATT GAC TCC TT R: CGG TTG CTC GAC CAC TAA CA	ms23

الکتروفورز محصولات VNTR

بعد از اتمام PCR و تکثیر ژن، برای بررسی و مشاهده باندهای حاصل از محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از یک سایز مارکر اختصاصی (DNA ladder 100 bp) انجام شد. سپس ژلها در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و باندهای DNA با استفاده از دستگاه ژل داک مدل BioRad XR (ساخت کشور آمریکا) و نرم افزار ۴,۰ Image lab مشاهده و ارزیابی گردیدند.

محاسبه اندازه و تعداد تکرارهای VNTR

تعداد تکرار در هر لوکوس را می توان با تفریق اندازه محصول PCR از مجموع مناطق دربرگیرنده چپ و راست و تقسیم عدد حاصل بر اندازه تکرار محاسبه نمود. اگر محصول VNTR تکثیر نیافت، یکبار دیگر PCR برای ایزوله مزبور تکرار می گردد. در صورتی که مجدداً هیچ گونه تکثیری مشاهده نشد، ال مزبور به صورت تهی (null) در نظر گرفته می شود. این امر ممکن است به دلیل عدم وجود لوکوس VNTR یا موتاسیون در جایگاه اتصال پرایمرها اتفاق افتاده باشد (۲۲).

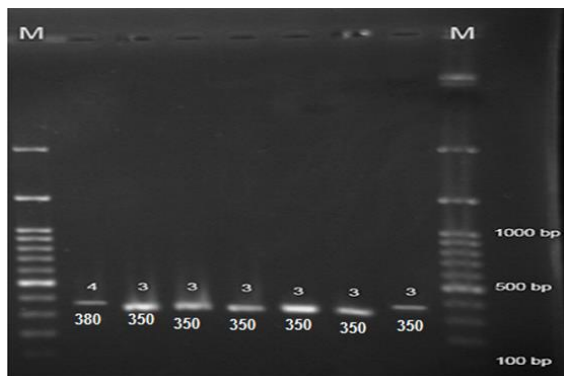
از نمونه های /شریشیاکلی مولد عفونت ادراری واجد لوکوس های موردبررسی که در مطالعه قبلی موردبررسی قرار گرفته بودند به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده واقع شد.

یافته ها

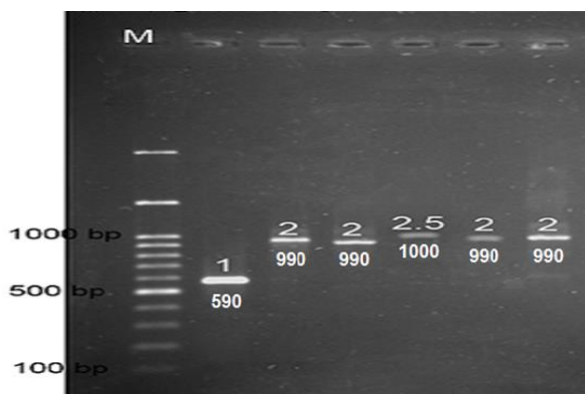
در این مطالعه تعداد ۷۲ ایزوله /شریشیاکلی که طی سال های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ از منابع آب استان البرز، آب های سطحی مانند چشمه ها، ورودی تصفیه خانه رجایی شهر (طالقان) که منبع آن از طالقان است، ورودی تصفیه خانه بیلقان (کرج) که منبع آن از رودخانه کرج و تعدادی از چاه های شهرستان کرج جدا شده بود، از نظر تنوع الی ۲ لوکوس VNTR موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از انجام الکتروفورز در ۲ لوکوس ms06 و ms23 نشان داد که لوکوس ms06 دارای ۵ نوع ال متفاوت (۱ تکرار، ۲ تکرار، ۳ تکرار، ۴ تکرار، ۵ تکرار) و لوکوس ms23 دارای ۴ نوع ال متفاوت (۱ تکرار، ۲ تکرار، ۲/۵ تکرار) می باشد و نیز لوکوس ms23 دارای ال null می باشد.

جدول ۲: ویژگی های هر یک از لوکوس های VNTR در جمعیت ایزوله های *E. coli*

ال غالب	تعداد ال های متفاوت	لوکوس VNTR
۲ تکرار	۵	ms06
۲ تکرار	۴	ms23



تصویر ۱: تصویری از ژل الکتروفورز محصولات VNTR نمونه های *E. coli* در این ژل، به خوبی، تنوع اندازه ای محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوس ms06 مشخص است. اعداد بالای محصولات لوکوس های VNTR، بیانگر تعداد تکرارها و اعداد پایین محصولات، اندازه محصول PCR می باشد. در ستون های M، از سایز مارکر 100 bp plus استفاده شده است.



تصویر ۲: تصویری از ژل الکتروفورز محصولات VNTR نمونه های *E. coli* در این ژل، به خوبی، تنوع اندازه ای محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوس ms23 مشخص است. اعداد بالای محصولات لوکوس های VNTR، بیانگر تعداد تکرارها و اعداد پایین محصولات، اندازه محصول PCR می باشد. در ستون های M، از سایز مارکر 100 bp plus استفاده شده است.

بحث

در جنس *Escherichia* گونه‌ای به نام *E.coli* وجود دارد که موضوع بیشتر تحقیقات دانشمندان را به خود اختصاص داده است. این ارگانیسم میکروفلور روده بزرگ بوده و در میان میکروفلور نرمال از آن جهت منحصربه‌فرد است که شایع‌ترین عامل جدا شده از عفونت‌های انسانی است و سبب عفونت‌های زخمی، دستگاه ادراری، ذات‌الریه، مننژیت، سپتی سمی و ... می‌شود (۲۳). در چند سال اخیر، مطالعات گوناگونی در ارتباط با تنوع ال‌های VNTR در ایزوله‌های /شریشیکلی انجام گرفته است که این مطالعات غالباً به بررسی پاتوتیپ EHEC و STEC به‌ویژه سروتیپ *E.coli* O157:H7 پرداخته‌اند (۲۵، ۲۴) و تاکنون مطالعاتی در ارتباط با تنوع ال‌های VNTR در ایزوله‌های /شریشیکلی جدا شده از منابع آبی صورت نگرفته است به همین دلیل هیچ‌گونه شباهتی از لحاظ جامعه نمونه با مطالعات ذکر شده وجود ندارد و در بحث فقط به‌منظور بیان مطالعاتی که بر روی تنوع ال‌های VNTR در ایزوله‌های /شریشیا کلی انجام گرفته است، اشاره نموده‌ایم.

Gorge و همکاران در سال ۲۰۰۸، در فرانسه ۷۸ ایزوله استاندارد شیگلا ۹ ایزوله شیگلا سونئی، ۱۹ ایزوله شیگلا فلکسنری، ۲۳ ایزوله شیگلا دیسانتری و ۲۷ ایزوله شیگلا بوییدی و ۱۱ ایزوله /شریشیکلی را از نظر تنوع ۱۵ لوکوس VNTR مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش توالی‌های تکرارشونده از تنوع بالایی برخوردار بودند، ولی در مقایسه با کار ما لوکوس‌های ms23 و ms06 دارای تنوع کمتری می‌باشد که این تفاوت می‌تواند به دلیل انتخاب لوکوس‌هایی باشد که اندازه تکرار کوتاهی داشتند و برای محاسبه دقیق اندازه محصولات PCR، نیاز به الکتروفورز لوله موئین بوده است و همچنین تفاوت در تعداد و نوع نمونه باشد. این پژوهش از نظر نوع لوکوس‌ها مشابه می‌باشد (۲۱).

Kawamori و همکاران در سال ۲۰۰۸، در ژاپن ۵۷ ایزوله /شریشیا کلی جدا شده از بیماران در استان Shizuoka را از نظر تنوع ۸ لوکوس VNTR مورد ارزیابی قرار دادند که در این پژوهش نیز لوکوس‌های VNTR دارای میزان تنوع بالایی بودند، ولی با مطالعه ما همخوانی نداشت که می‌تواند دلیل این تفاوت در تعداد و نوع نمونه و نوع لوکوس‌ها باشد (۲۶).

Bustamante و همکاران در آرژانتین در سال ۲۰۰۹، ۱۴ نمونه VTEC O157:H7 مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۹

جایگاه VNTR توسط روش PCR تکثیر شدند که ارزش تنوعی بین ۰/۴۹ الی ۰/۷۳ داشتند. این پژوهش با مطالعه ما به دلیل تفاوت در نوع نمونه و تعداد نمونه متفاوت بود. با این حال، وجود تعداد محدود ایزوله‌های مورد مطالعه، کاربرد پانل VNTR دیدگاه اولیه‌ای از تنوع بالای ژنتیکی ذاتی گونه‌های O157:H7 ایجاد می‌کند (۲۷).

Sekse و همکاران در سال ۲۰۱۱ در نروژ، *E. coli* O26:H11 انتروپاتوژنیک و *E.coli* O26:H11 تولیدکننده شینگاتوکسین را از نظر ۷ لوکوس VNTR مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی لوکوس‌های VNTR دارای تنوع بالایی بوده و همچنین لوکوس‌ها دارای ال‌های تپی نیز بودند. این مطالعه از نظر میزان تنوع تکرار با مطالعه ما همخوانی نداشت که می‌تواند دلیل این تفاوت در نوع نمونه و تعداد نمونه و نوع لوکوس انتخابی باشد (۲۸).

Bustamante و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آرژانتین ۲۰۲ ایزوله STEC جدا شده از منابع مختلف را از نظر تنوع ۸ لوکوس VNTR مورد ارزیابی قرار دادند. این تحقیق نشان داد که توالی‌های تکرارشونده دارای تعداد متغییر و میزان تنوع بالایی هستند، ولی از نظر میزان تنوع تکرار با این مطالعه مشابه نیست، که می‌تواند دلیل این تفاوت در نوع لوکوس‌ها و نمونه و تعداد نمونه باشد (۲۹).

Naseer و همکاران در سال ۲۰۱۲، یک‌صد ایزوله /شریشیکلی از نروژ (n=۳۷)، سوئد (n=۲۴)، انگلستان (n=۲۰) و اسپانیا (n=۱۹) را از نظر تنوع ۹ لوکوس VNTR مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش نیز لوکوس‌های VNTR دارای میزان تنوع بالایی بودند. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر تطابق نداشت که این تفاوت به دلیل تفاوت در نوع نمونه و اندازه لوکوس‌ها و همچنین نوع لوکوس‌ها می‌باشد (۳۰).

Byrne و همکاران در سال ۲۰۱۴، در انگلستان ۵۳۹ ایزوله *E.coli* O157 تولیدکننده شینگاتوکسین را از نظر تنوع ۸ لوکوس VNTR مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی به دلیل تعداد بالای نمونه‌ها میزان تنوع لوکوس‌های VNTR نیز بالا بود که این امر نشان‌دهنده تنوع بالای ژنتیکی ذاتی سویه O157 می‌باشد. نتایج این مطالعه با پژوهش ما متفاوت بود که دلیل این تفاوت استفاده از لوکوس‌هایی متفاوت و تفاوت در نوع نمونه بود (۳۱).

Ranjbar و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران ۵۳ ایزوله شیگلا را از نظر تنوع ۸ لوکوس VNTR مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش توالی های تکرار شونده از تنوع بالایی برخوردار بودند و نتایج مطالعه آن ها با مطالعه حاضر تطابق داشت. علت تشابه این بررسی می تواند به دلیل قرابت نزدیک شیگلا با /شریشیاکلی و یکسان بودن لوکوس های انتخابی باشد (۲۰).

Ranjbar و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران ۴۷ ایزوله شیگلا سونئی را از نظر تنوع ۸ لوکوس VNTR مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش توالی های تکرار شونده از تنوع بالایی برخوردار بودند و نتایج مطالعه آن ها با مطالعه حاضر تطابق دارد. علت تشابه این بررسی تنوع می تواند به دلیل قرابت نزدیک شیگلا با /شریشیاکلی و همچنین استفاده از یک نوع لوکوس VNTR با اندازه های مشابه باشد، ولی از نظر نوع نمونه و تعداد نمونه با یکدیگر متفاوت می باشند (۳۲).

در پژوهش حاضر، ۷۲ ایزوله *E.coli* جداسده در طی حدود ۱ سال (از مهرماه سال ۹۱ تا مهرماه سال ۹۲) از نظر تنوع لوکوس های VNTR، بررسی شدند. در این تحقیق از ۲ لوکوس VNTR بر اساس مطالعه Gorge و همکاران انتخاب شد (۲۱). به طوری که لوکوس های VNTR انتخاب شده در مطالعه حاضر، از نظر اندازه تکرار مناسب هستند، بنابراین به راحتی از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز می توان اندازه آن ها را تخمین زد. در مطالعات قبلی، لوکوس هایی انتخاب می شدند که اندازه ی تکرار کوتاهی داشتند و برای محاسبه دقیق اندازه ی محصولات PCR، نیاز به الکتروفورز لوله موئین و یا تعیین توالی DNA بوده است که این امر، نیز موجب افزایش هزینه ها می شود. از سوی دیگر، سرعت تکامل VNTR های مختلف، متفاوت است. به طور معمول، لوکوس هایی که اندازه ی تکرار بزرگتری دارند، کندتر از لوکوس هایی که اندازه ی تکرار کوچکتری دارند، تغییر پیدا می کنند (۲۱). در تحقیق حاضر، سعی شد لوکوس هایی انتخاب شوند که سرعت تکاملی خیلی زیاد و یا خیلی کم نداشته باشند، همچنین از مارک هایی استفاده شد که به راحتی توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز، قابل تفکیک است. در این پژوهش لوکوس *ms06* بیشترین تعداد ال و لوکوس *ms23* کمترین تعداد ال را داشته اند و نیز لوکوس های *ms23* دارای ال تهی می باشد. این بررسی نشان داد که ایزوله های *E.coli* جداسده از منابع آب استان البرز دارای میزان تنوع نسبتاً بالایی از توالی های

تکرار شونده بوده است. این مسئله نشان می دهد که ایزوله های جداسده از منابع مختلف آبی استان البرز، از چند کلون (منشأ اجدادی) مختلف، نشأت گرفته اند. باین حال، برای ارزیابی صحیح تر و بهتر جمعیت ایزوله های *E.coli* نیاز به بررسی لوکوس های VNTR بیشتری می باشد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در ارتباط با تنوع لوکوس های VNTR در ایزوله های *E.coli* جداسده از منابع آبی در کشورمان انجام نگرفته است، سعی بر آن شد که در این پژوهش، تنوع لوکوس های فوق در جمعیت ایزوله های جداسده از منابع آبی، مورد بررسی قرار گیرد. در جمعیت ایزوله های موجود در این مطالعه احتمال دارد هم نمونه های بالینی و هم نمونه محیطی و غیر بالینی وجود داشته باشد همچنین ممکن است نمونه های غیر بالینی موجود در این جامعه به دلیل به دست آوردن عوامل ویروالانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها و ترانسپوزن ها و باکتریوفاژها و لوکوس های پاتوژنیسیته باعث بیماری زایی شوند، به همین دلیل بررسی تنوع توالی های تکرار شونده در سوبه های *E.coli* جداسده از منابع آب، برای بررسی های اپیدمیولوژیکی و بررسی قرابت ژنتیکی این ایزوله ها حائز اهمیت می باشد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که از لوکوس های VNTR استفاده شده، به خوبی می توان جهت تمایز و افتراق و تنوع ایزوله های *E.coli* در آلودگی آب ها و بررسی های اپیدمیولوژیکی استفاده نمود و پیشنهاد می شود در زمینه ی آلودگی آب ها توجه بیشتری به این تنوع صورت پذیرد. پژوهش حاضر برای اولین بار در کشور ایران صورت پذیرفته است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می باشد. با تشکر فراوان از همکاران شاغل در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی بیمارستان بقیه ... (عج) و جناب دکتر مجتبی معماریانی که در پیش برد این تحقیق همکاری ارزنده و سودمند داشته اند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروپزشکی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

1. Aertsen A, Anoir beek K, Spiegeleer D.P. Heat Shock Protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherchia Coli*. J APPL Environ Microbiol 2004; 70(5): 260-66.
2. Blanch AR, Belanche-Munoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F, et al. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. J Appl Environ Microbiol 2006; 72(9):5915-26.
3. McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR, Lukasik JO. Detection of humanderived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. Appl Environ Microbiol 2006; 72(12):7567-7574.
4. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. Chemosphere 2009; 75(4):417-34.
5. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201.
6. Jawetz, Melnick, Adleberg. Medical microbiology. 27th ed. Appleton & Lange; 2013.
7. Chao KK, Chao CC, Chao WL. Evaluation of colilert-18 for Detection of Coliforms and *E.coli* in subtropical freshwater. Appl Environ Microbiol 2004;70(2):1242-44.
8. Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, et al. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. J Clin Microbiol 2005;43(8):3636-41.
9. Prère MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O. Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. J Pathol Biol (Paris) 2006;54(10):600-2.
10. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BE, Balan A, Sbrogio-Almeida ME, et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. J Bacteriol 2008;190(7):2400-2410.
11. Welinder-Olsson C, Stenqvist K, Badenfors M, Brandberg A, Floren K, Holm M, et al. EHEC outbreak among staff at a children's hospital: use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. J Epidemiol Infect 2004; 132:43.
12. van den Beld MJ, Reubsaet FA. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31(6):899-904.
13. Nataro JP. Diarrhea among children in developing countries. J Adv Exp Med Biol 2013; 764:73-80.
14. Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. J BMC Microbiol 2011; 11:142-152.
15. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). J FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 49(1):22-7.
16. Moller A, Brinkmann B. PCR-VNTRs (PCR-Variable Number of Tandem Repeats) in forensic science. J Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1995; 41(5):715-24.
17. Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. J Mol Biol Evol 1987; 4(3):203-21.
18. Borges LG, Virginia DV, Gertrudes C. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. J FEMS Microbiol Eco 2003; 45: 173-180.
19. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerd K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. J. Clin Microbiol 2005; 43: 3615-3623.
20. Ranjbar R, Memariani M, Memariani H. Diversity of Variable Number Tandem Repeat Loci in *Shigella* Species Isolated From Pediatric Patients. Int J Mol Cell Med; Summer 2015, 4(3):1-8.
21. Gorge O, Lopez S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse V, Vergnaud G. Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing *Shigella* spp. J Clin Microbiol 2008; 46(3):1026-36.
22. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Moller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill 2013; 18(35):20565.
23. Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. J BMC Microbiol 2011; 11:142-152.
24. Jenke C, Harmsen D, Weniger T, Rothganger J, Hyytia-Trees E, Bielaszewska M, et al. Phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987-2008. J Emerg Infect Dis 2010; 16(4):610-6.

25. Bustamante AV, Sanso AM, Lucchesi PM, Parma AE. Genetic diversity of O157:H7 and non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* from Argentina inferred from multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *Int J Med Microbiol* 2010; 300(4):212-7.
26. Kawamori F, Hiroi M, Harada T, Ohata K, Sugiyama K, Masuda T and Ohashi N. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *J Med Microbiol* 2008; 57(1): 58–63.
27. Bustamante AV, Lucchesi MA, Parma AE. Molecular characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli* o157:H7 isolates from argentina by multiple-loci VNTR analysis (MLVA), Brazilian *J of Microbiol* 2009; 40: 927-932.
28. Sekse C, Sunde M, Lindstedt BA, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS. Potentially Human-Pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian Sheep Flocks. *J APPL. ENVIRON. MICROBIOL* 2011;77(14) 4949–4958.
29. Bustamante AV, Sanso AM, Alberto E, Parma AE, Lucchesi PM. Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *J published Microbiol* 2012;2(111):1-4.
30. Naseer U, Olsson-Liljequist BE, Woodford N, Dhanji H, Canto' n R, et al. Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis for Rapid and Accurate Typing of Virulent Multidrug Resistant *Escherichia coli* Clones. *J PLoS ONE* 2012;7(7): 1-6.
31. Byrne L, Elson R, Dallman TJ, Perry N, Ashton P, et al. Evaluating the Use of Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* O157 as a Routine Public Health Tool in England. *J PLoS ONE* 2014; 9(1): 1-6.
32. Ranjbar R, Memariani M. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for genotyping of *Shigella sonnei* strains isolated from pediatric patients. *J GHBB* 2015;8(3):225-232.