انگشت‌نگاری ژنتیکی جدایه‌های باکتری *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده از حیوانات باغ وحش کرمان با روش ERIC-PCR

لاله سعادت[١]، مازیار جاجرمی[٢]، ندا اسکندرزاده*[٣]، رضا قنبرپور[٤]

١- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
٢- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
٣- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
٤- استاد، گروه میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

دریافت مقاله: ٢٣ دی ١٤٠١، بازنگری: ٠٩ اسفند ١٤٠١، پذیرش نهایی: ٠٩ اردیبهشت ١٤٠٢

چکیده

انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* در یک زیستگاه می‌تواند کمک شایانی به درک ما از تنوع ژنتیکی و چرخش آنها در میزبان‌های مختلف کند. در این مطالعه، تعداد ۴۸ نمونه مدفوع از ۲۴ نوع گونه حیوان سالم در باغ وحش کرمان توسط سوآپ استریل جمع‌آوری شد. پس از جداسازی *اشریشیاکلی*، سویه‌ها با روش ERIC-PCR، انگشت‌نگاری ژنتیکی شده و الگوی باندهای به‌دست آمده از الکتروفورز با نرم‌افزار Gel Quest کالیبره و تجزیه و تحلیل شد. در گام بعد، شباهت انواع ERIC با ترسیم درخت فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار Cluster Viz با استفاده از الگوریتم UPGMA نشان داده شد. در این روش با قطع تشابه ≤۹۰ درصد، ۲۲ کلون مورد شناسایی قرار گرفت؛ الگوی ERIC جدایه‌های کبوتر با یک جدایه از طاووس، همچنین جدایه‌های شترمرغ با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف شباهت ۱۰۰ درصدی را در الگوی ERIC نشان دادند. با توجه به اینکه چندین سویه جدا شده از میزبان‌های مختلف با گونه‌های متفاوت دارای شباهت ۱۰۰ درصد در الگوی ERIC بودند، می‌توان نتیجه گرفت به علت نزدیک بودن این گونه‌های مختلف حیوانی در یک زیستگاه مانند باغ وحش، باعث شده است که این سویه‌ها در بین حیوانات مختلف در گردش باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، ERIC-PCR، باغ وحش*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: eskandarzade@uk.ac.ir

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از گونه‌های باکتری با تنوع ژنتیکی بسیار بالااست که منجر به سازگاری سویه‌های *اشریشیاکلی* با زیستگاه‌ها و شرایط متفاوت شده است (۱، ۲). باکتری *اشریشیاکلی* در قسمت‌های انتهایی دستگاه گوارش انسان و حیوانات سالم به‌صورت همزیست و غیر بیماری‌زا یافت می‌شود، ولی برخی از سویه‌های آن می‌توانند به‌صورت پاتوژنی فرصت‌طلب موجب مسمومیت‌های غذایی و اسهال شوند (۳-۵). این باکتری علاوه بر این‌که عضوی از میکروفلور دستگاه گوارش حیوانات اهلی به‌ویژه نشخوارکنندگانی مانند گاو و گوسفند است، ساکن دستگاه گوارش حیوانات وحشی نیز می‌باشد. همچنین سویه‌های پاتوژن *اشریشیاکلی* در طیف گسترده‌ای از پستانداران، پرندگان، ماهی‌ها و چندین حشره شناسایی شده است (۶-۸).

در باغ وحش جمعیت کوچکی متشکل از میزبان‌های مختلف در کنار یکدیگر زندگی می‌کنند و همه روزه در تماس مستقیم با انسان‌ها در رده‌های سنی مختلف به‌ویژه کودکان هستند که امکان انتقال پاتوتیپ‌های بیماری‌زا را فراهم می‌کنند. در گزارش بندر و شولمن، شیوع بیماری مشترک انسان و دام در انسان با سویه‌ی O157، با تماس با حیوانات باغ وحش‌ها، مزارع و پارک‌های جانورشناسی مرتبط است (۹). جدا از انتقال به انسان، باغ وحش‌ها ممکن است انتقال باکتری‌های مقاوم یا ژن‌های مقاومت را به سایر حیوانات در محیط زیست تسهیل کنند زیرا حیوانات اغلب در طول برنامه‌های اصلاح نژاد مبادله می‌شوند و یا حیوانات باغ وحش و فرزندان آنها در طبیعت رها می‌شوند (۱۰). بررسی تنوع ژنتیکی در میان سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* در یک محیط مخصوصاً مکان‌هایی که حیونات و انسان در تماس با یکدیگر هستند مانند دامداری‌ها، پارک‌های جنگلی و باغ وحش‌ها می‌تواند اطلاعات اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی با ارزشی را در مورد رفتار میکروارگانیسم در میزبان‌های مختلف ارائه دهد (۱۱، ۱۲).

بررسی تنوع ژنتیکی در *اشریشیاکلی* به کمک روش‌های مولکولی انگشت‌نگاری ژنوم امکان‌پذیر است. بنابراین هدف از انگشت‌نگاری ژنوم یا تایپینگ، تشخیص تفاوت اثر انگشت DNA داخل گونه‌ای و ارتباط کلونال در بین سویه‌های باکتریایی است. به‌منظور انگشت‌نگاری ژنتیکی روش‌های متعددی مانند AFLP PCR، RAPD، PFGE و غیره وجود دارد که از بین آنها ERIC-PCR به دلیل پروتکل ساده و قدرت افتراق، بیشترین کاربرد را دارد (۱۳-۱۵). روش ERIC-PCR بر اساس حضور توالی‌های تکراری غیر کدکننده ۱۷ الی ۳۱۷ جفت بازی که توالی محافظت شده میان ژنی بین باکتریایی ERIC نام دارند، بنا شده است. تنوع قابل توجهی از نظر تعداد کپی و طول در توالی‌های ERIC در میان سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی* وجود دارد. این تنوع فرایندهای تکامل را در میان سویه‌های باکتریایی در یک گونه خاص مانند *اشریشیاکلی* تداعی می‌کند، بنابراین امکان طراحی پرایمر برای PCR به‌عنوان بیومارکر تنوع ژنتیکی سویه‌ها و یا بررسی ارتباط تکاملی باکتری را فراهم آورده است. انتظار می‌رود که تفاوت در تعداد و محل توالی‌های ERIC بین سویه‌های باکتریایی منجر به مشاهده‌ی تفاوت بین سویه‌ها از نظر تعداد و اندازه محصولات PCR شود که در نهایت منجر به تفاوت در الگوهای باند در الکتروفورز می‌شود. الگوهای ظاهر شده که به آنها اریک تایپ می‌گویند، برای ارزیابی نزدیکی فیلوژنتیک با کمک انواع نرم‌افزارهای مختلف بکار می‌رود(۱۷، ۱۶، ۱۴). استفاده از اطلاعات تایپینگ مولکولی مانند ERIC تایپ نیازی به تعیین توالی ندارد و در مقایسه با روش‌های سنتی میکروبیولوژیک مانند آزمایشات بیوشیمیایی، تایپ باکتریوفاژ و سروتیپ، پیشرفته‌تر بوده و قابلیت تکرارپذیری و قدرت تمایز بالا را پوشش می‌دهد (۱۳).

مطالعات در زمینه اپیدمیولوژی و میکروبیولوژی در زمینه چرخش میکروارگانیسم‌ها در بین حیوانات باغ وحش بسیار نادر است (۱۸-۲۰). بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی شباهت ژنتیکی سویه‌های باکتری

اشریشیاکلی در بین میزبان‌های مختلف در حیوانات باغ وحش کرمان از طریق بررسی توزیع توالی محافظت شده میان ژنی بین باکتریایی یا توالی‌های ERIC می‌باشد. از آنجایی‌که تاکنون پژوهش مشابهی در منطقه‌ی مورد مطالعه انجام نشده است، این مطالعه فرضیه حضور شباهت‌های ژنتیکی میان سویه‌های جدا شده از حیوانات یک باغ وحش را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: جامعه‌ی مورد مطالعه، سویه‌های *اشریشیاکلی* جمع‌آوری شده در سال ۱۳۹۸ از نمونه‌های مدفوع حیوانات سالم باغ وحش واقع در حاشیه شرقی شهر کرمان می‌باشد. در زمان نمونه‌گیری، در این باغ وحش ۳۱ گونه حیوان مختلف نگهداری می‌شده است. در این مطالعه تعداد ۴۸ نمونه مدفوع از ۲۴ نوع گونه حیوان سالم باغ وحش (از هر گونه ۲ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از حیوانات عقاب، الاغ، خروس محلی، خر مینیاتوری، گرگ، خرس، سیخور، شتر، خوکچه هندی، شیر، طوطی سبز، پونی، شاهین، میمون رزوس، بز کوهی، کبوتر، طاووس، شترمرغ، یاکریم، قرقی، شاه بوف، مرغ شاخدار، آهو و کاسکو توسط سوآپ استریل جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در محیط انتقالی آیمیس (اوکسوید، انگلستان) در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی ارسال گردید. لازم به ذکر است که مطالعه به تائید کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان رسید.

جداسازی و تائید بیوشیمیایی باکتری: در آزمایشگاه از کشت هر نمونه در محیط مک‌کانکی، یک کلنی تک صورتی رنگ (لاکتوز مثبت) به‌عنوان یک جدایه‌ی مشکوک به *اشریشیاکلی* انتخاب شده و توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های IMViC (Voges-Proskauer، methyl red، indole، citrate) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد. به‌منظور ایجاد حرارت از دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه استفاده شد. در نهایت مایع رویی میکروتیوب‌ها پس از سانتریفیوژ شدن به‌عنوان منبع DNA برای مراحل بعدی ذخیره شدند (۸، ۲۱).

انگشت‌نگاری از طریق ERIC-PCR : برای درک بهتر رابطه کلونال بین سویه‌های *اشریشیاکلی*، همه ۴۸ سویه *اشریشیاکلی* برای انگشت‌نگاری از طریق ERIC-PCR انتخاب شدند. این روش با استفاده از یک جفت پرایمر به نام ERIC1 و ERIC2 که در جدول شماره ۱ آورده شده است، انجام شد (۲۲).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در روش ERIC-PCR

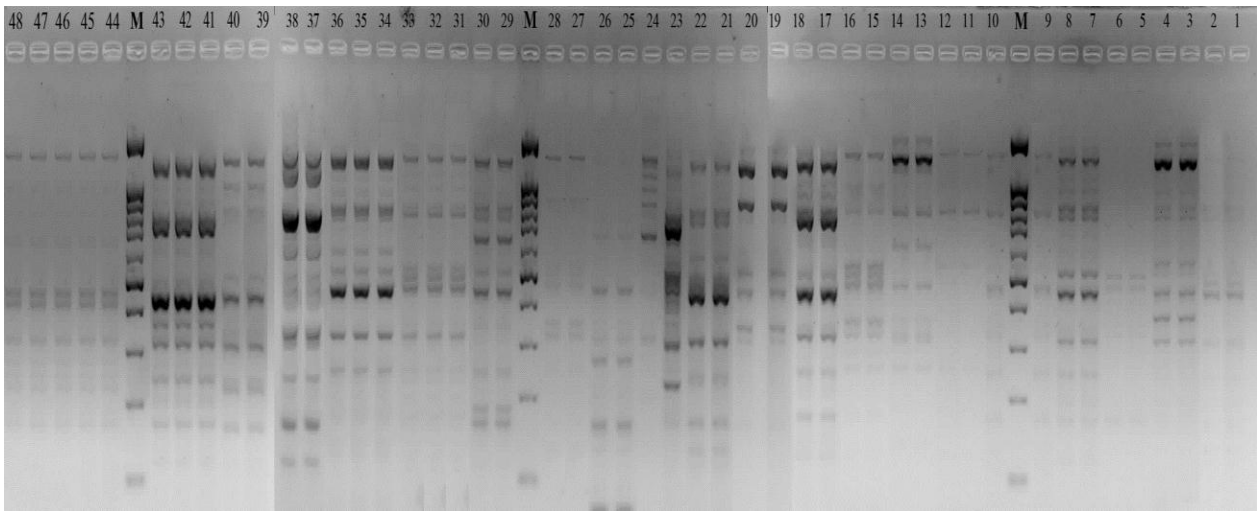
PCR	Gene	Primers	Sequences (5'→ 3')	Fragment size (bp)
ERIC	Enterobacterial repetitive sequences	ERIC1 ERIC2	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	Random

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای تهیه مخلوط PCR، به ازای هر نمونه، مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده‌ی شرکت پارس توس (ایران)، مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۶ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج و درون میکروتیوب ریخته شد و با آب مقطر استریل حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر (بیوراد، ایالات متحده) گذاشته شدند و از برنامه‌ی دمایی، مطابق جدول ۱ برای انجام PCR استفاده شد (جدول شماره ۲).

جدول ۲: برنامه‌ی دمایی جهت انجام ERIC-PCR

واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال پرایمرها	طویل شدن	طویل شدن انتهایی
۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه	۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۸۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه
۱ بار	۳۰ بار تکرار			۱ بار

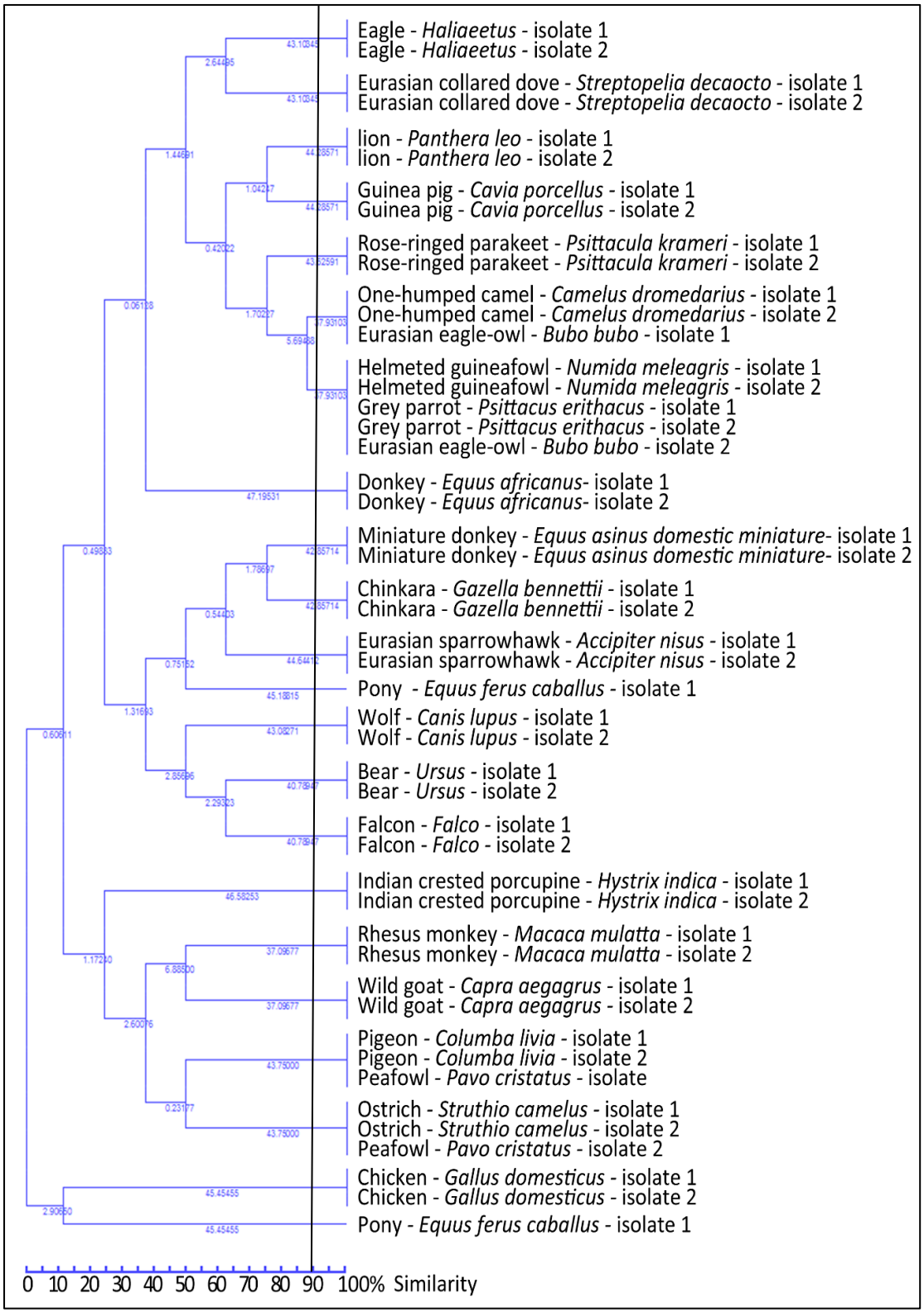
به دست آوردن الگوی ERIC و ترسیم درخت فیلوژنی: برای شناسایی سویه‌هایی که از نظر ژن‌ها و توالی‌های مورد نظر مثبت بودند، تمامی محصولات ERIC-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، الکتروفورز گردید. تصاویر باندها توسط سیستم تصویربرداری ژل داک ۱۰۰۰ (ویلبر لورمات، فرانسه) ثبت شد و از آن عکس‌برداری شد. الگوی باندهای تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Gel Quest کالیبره و تجزیه و تحلیل شد و داده‌های اثر انگشت ERIC، بسته به حضور یا عدم حضور هر باند به یک کد باینری تبدیل شد (صفر: عدم حضور یک باند و یک: حضور باند). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، شباهت انواع ERIC با ترسیم درخت فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار Cluster Viz با استفاده از گروه جفتی بدون وزن با خوشه‌بندی میانگین ریاضی (UPGMA) نشان داده شد.



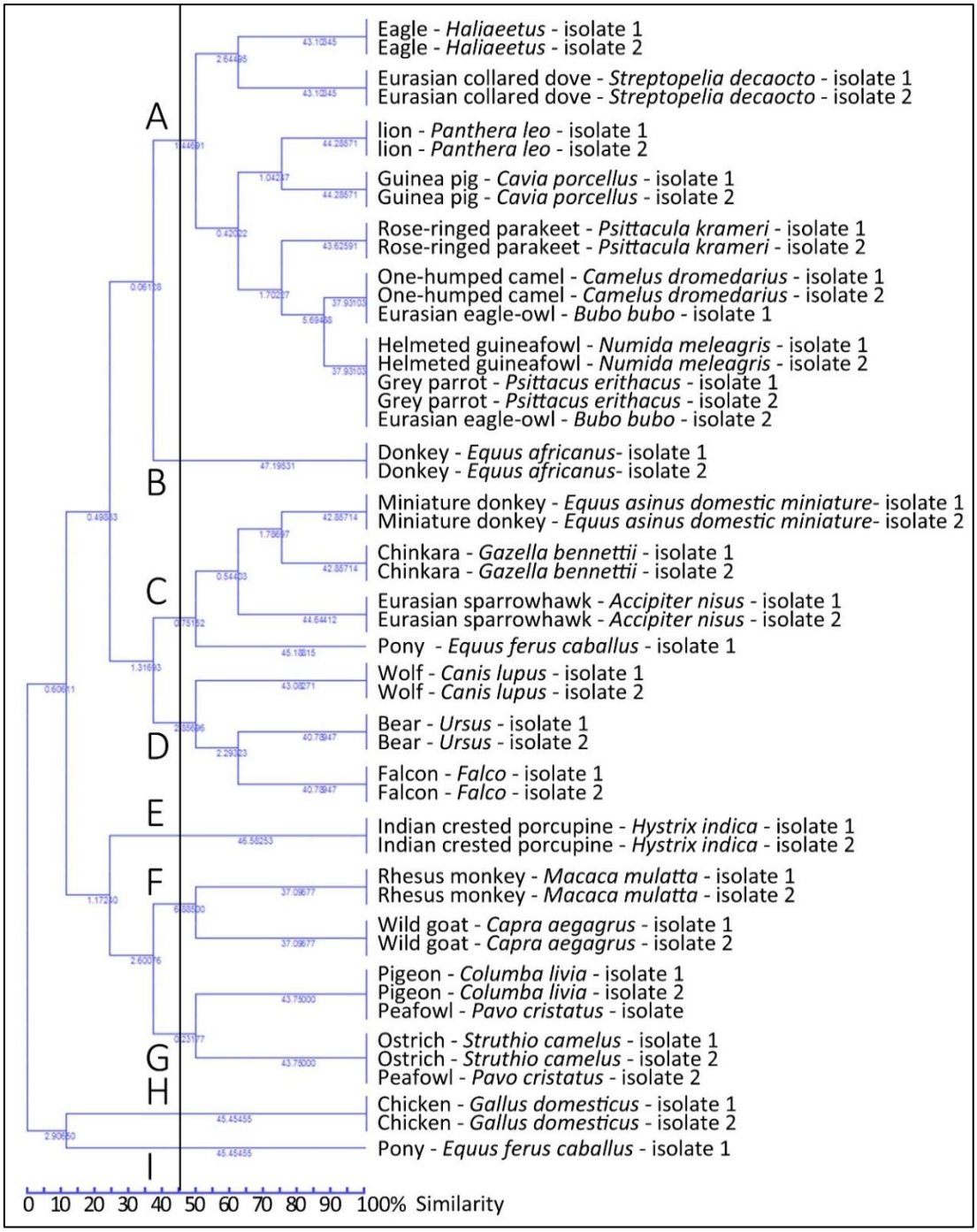
شکل ۱- باندهای الکتروفورز به‌دست آمده در ERIC-PCR ۲۴ گونه مختلف حیوانی از باغ وحش شهر کرمان. باندهای M، مارکر DNA می‌باشند.

نتایج

الگوهای به‌دست آمده از الکتروفورز در **Error! Reference source not found.** و درخت فیلوژنتیکی یا دندروگرام الگوهای ERIC با قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد و همچنین ۴۵ درصد به‌ترتیب در **Error! Reference source not found.** و ۳ نشان داده شده است. در درخت فیلوژنی، کلنی‌های موجود در قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد به‌عنوان کلنی‌های مرتبط از لحاظ ژنتیکی (۱۳) و کلنی‌های موجود در قطع تشابه ۴۵ درصد به‌عنوان معیار خوشه‌بندی کلون‌ها درنظر گرفته شد (۲۳). همچنین کلنی‌های موجود در قطع تشابه ۱۰۰ درصد به‌عنوان کلنی‌های یکسان درنظر گرفته شد.



شکل ۲- درخت فیلوژنی الگوهای ERIC-PCR از ۲۴ گونه مختلف حیوانی جمع‌آوری شده از باغ وحش شهر کرمان بر پایه‌ی الگوریتم UPGMA. بر اساس قطع تشابه ≤٪۹۰، ۲۲ کلون شناسایی شد. مقیاس در پائین دندروگرام شباهت ژنتیکی (٪) را نشان می‌دهد.



شکل ۳- درخت فیلوژنی الگوهای ERIC-PCR بر پایه‌ی الگوریتم UPGMA از ۲۴ گونه مختلف حیوانی جمع‌آوری شده از باغ وحش شهر کرمان با قطع تشابه ۴۵٪. در این روش ۸ خوشه (A، B، C، D، E، F، G و H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (A) دارای ۱۸ سویه‌ی *اشریشیاکلی* متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود. مقیاس در پائین دندروگرام شباهت ژنتیکی (٪) را نشان می‌دهد.

ارتباط کلونال جدایه‌های اشریشیاکلی با قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد: همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، با قطع تشابه بیش از ۹۰ درصد، بیست و دو کلون مورد شناسایی قرار گرفت؛ الگوی ERIC جدایه‌های کبوتر با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت، همچنین الگوی ERIC جدایه‌های شترمرغ با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی داشت. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از

شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف شباهت ۱۰۰ درصدی را در الگوی ERIC از خود نشان دادند.

ارتباط کلونال جدایه‌های اشریشیاکلی با قطع تشابه ۴۵ درصد: در دندروگرام حاصل از نتایج ERIC با قطع تشابه ۴۵ درصد، ۹ اریک تایپ مورد شناسایی قرار گرفت که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در این میزان از تشابه همه جدایه‌ها در یک خوشه قرار نگرفتند به‌طوری که ۸ خوشه (A، B، C، D، E، F، G و H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (خوشه A) دارای ۱۸ سویه‌ی *اشریشیاکلی* متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه‌ی هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی الگوهای رفتاری و شباهت‌های فیلوژنتیکی سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* در محیط باغ وحش که میزبان‌های متعدد حیوانی در تماس با انسان‌ها قرار دارند اهمیت بالایی دارد. در این مطالعه، از مدفوع ۲۴ گونه حیوان سالم شامل عقاب، الاغ، خروس محلی، خر مینیاتوری، گرگ، خرس، سیخور، شتر، خوکچه هندی، شیر، طوطی سبز، پونی، شاهین، میمون رزوس، بز کوهی، کبوتر، طاووس، شترمرغ، یاکریم، قرقی، شاه‌بوف، مرغ شاخدار، آهو و کاسکو در باغ وحش کرمان باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی و با روش ERIC-PCR، انگشت‌نگاری ژنتیکی شدند. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل با استفاده از روش UPGMA نشان داد که با قطع تشابه ۱۰۰ درصد، الگوی باندهای به‌دست آمده از الکتروفورز ۲۴ گونه حیوان در ۲۲ کلون قرار گرفتند که این خود نشان‌دهنده‌ی قرار گرفتن برخی جدایه‌ها از حیوانات مختلف در یک کلون می‌باشد. جدایه‌های مرغ شاخدار، کاسکو و یک جدایه از شاه‌بوف با شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر الگوی ERIC در کنار هم قرار گرفتند. الگوی ERIC جدایه‌های کبوتر و جدایه‌های شترمرغ با یک جدایه از طاووس، شباهت ۱۰۰ درصدی نشان دادند. همچنین قرابت ژنتیکی ۱۰۰ درصدی بین جدایه‌های شتر و یک جدایه از شاه‌بوف مشاهده شد. از طرف دیگر با دومین سطح خوشه‌بندی در شباهت ۴۵ درصد، ۸ خوشه (A، B، C، D، E، F، G و H) و ۱ کلون منفرد (I) شناسایی شد که بزرگترین خوشه (A) دارای ۱۸ سویه‌ی *اشریشیاکلی* (۷۵ درصد کل سویه‌ها) متعلق به میزبانان مختلفی چون عقاب، کبوتر، شیر، خوکچه هندی، طوطی سبز، شتر، شاه‌بوف، کاسکو و مرغ شاخدار بود. زیرشاخه‌های دیگری برگرفته از شاخه‌های اصلی در قطع تشابه‌های بالاتر از ۴۵ درصدی وجود داشت که در دندروگرام شکل ۳ قابل تشخیص می‌باشد. همپوشانی یکسان سویه‌ها نشان داد که کلون مشترک *اشرشیاکلی* بین پرندگان و پستانداران وجود دارد. بنابراین به نظر می‌رسد دریافت غذای یکسان و نگهداری حیوانات در نزدیکی به یکدیگر باعث چرخش این باکتری نه تنها در بین پرندگان مختلف، بلکه بین پستانداران و پرندگان شده است. دلیل این اتفاق می‌تواند اشتراک نگهبان باغ وحش نیز باشد که در این حالت باید توجه خاصی به رعایت بهداشت توسط افراد مراقب حیوانات شود.

همان‌طور که در دندروگرام ترسیمی نشان داده شده است (شکل شماره ۲)، تنوع بین جدایه‌های یک گونه حیوان نیز وجود داشت، به‌عنوان مثال با قطع تشابه ۱۰۰ درصد، دو جدایه از پونی به‌صورت دو کلون مجزا و کاملاً به‌صورت دور از هم در دندروگرام واقع شده‌اند. همین مسئله در مورد جدایه‌های شاه‌بوف و طاووس نیز صدق می‌کند. در دندروگرام ترسیمی (شکل شماره ۳)، یک جدایه از پونی (کلون I) به‌صورت خارج خوشه‌ای و منفرد قرار دارد در صورتی که جدایه دیگر از پونی در خوشه C به همراه جدایه‌های آهو و قرقی قرار گرفته است. با در نظر گرفتن این مسئله که در روش ژنوتایپینگ به روش ERIC-PCR، سویه‌هایی با میزان تشابه زیر ۸۵ درصد از نظر ژنتیکی نامرتبط در نظر گرفته می‌شوند (۲۴)، جدا بودن دو جدایه از پونی در قطع تشابه ۴۵ درصد،

نشان‌دهنده تنوع بالای باکتری *اشریشیاکلی* در این گونه حیوان است (شکل شماره ۳). همین مسئله در مورد جدایه‌های شاه‌بوف و طاووس نیز صدق می‌کند (شکل شماره ۲). هر دو جدایه مربوط به خروس محلی و هر دو جدایه مربوط به سیخور تشکیل خوشه‌های مجزای با نام‌های به‌ترتیب H و E داده‌اند. مسئله با اهمیت دیگر که در دندروگرام (شکل ۲ و ۳) مشخص است این است که هر دو جدایه از خروس محلی و یک جدایه از پونی به‌صورت کاملاً مجزا با سایر جدایه‌ها قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی قابل توجه باکتری *اشریشیاکلی* (تقریباً ۹۰ درصد) در این حیوانات با سایر حیوانات این مطالعه می‌باشد. همچنین بیشترین تفاوت ژنتیکی بین پونی و عقاب وجود داشت.

انتخاب کات‌آف قطع تشابه بر اساس تکرارپذیری طولانی مدت اثر انگشت به‌دست آمده با یک سویه مشخص *اشریشیاکلی* با استفاده از یک تکنیک ژنوتایپینگ خاص به‌دست می‌آید. به‌عنوان مثال کاسارز و همکاران با مقایسه ۴ روش ژنوتایپینگ نشان دادند که در روش ژنوتایپینگ به روش ERIC-PCR، سویه‌هایی با میزان تشابه زیر ۸۵ درصد از نظر ژنتیکی نامرتبط در نظر گرفته می‌شود (۲۴). در برخی مطالعات دیگر حداقل قرابت ژنتیکی ۹۰ درصد به‌عنوان کات‌آف برای سویه‌های مرتبط و کات‌آف ۵۰ درصد برای به‌دست آوردن خوشه‌های اصلی در نظر گرفته شده است (۱۳، ۱۴) که در مطالعه حاضر به‌منظور یافتن شباهت ژنتیکی از قطع تشابه بالاتر از ۹۰ درصد و برای خوشه‌بندی قطع تشابه ۴۵ درصد استفاده شد. در تصویر دندروگرام با کمتر شدن قطع تشابه، بزرگنمایی قرابت ژنتیکی کمتر شده و تعداد اریک تایپ‌ها کمتر می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش ERIC-PCR می‌تواند به‌عنوان روشی مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در طول دو دهه گذشته، چندین محقق از ERIC-PCR به‌عنوان یک روش تایپ مولکولی سریع برای تعیین روابط ژنتیکی بین چندین گونه باکتری جدا شده از مواد غذایی، نمونه‌های محیطی، نمونه‌های انسانی و غیره بهره برده‌اند (۷، ۸، ۲۵). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۷ توسط رنجبر و همکاران انجام شد نمونه مدفوع حیوانات سالم مانند مرغ، گاو و گوسفند طی یک سال (مهر ۱۳۹۱ تا مهر ۱۳۹۲) از دامداری‌های اطراف استان‌های تهران و البرز برای تعیین توزیع ERIC در سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده تهیه شد (۱۴). این محققان بیشترین فراوانی و تنوع در بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های مدفوع مرغ و گوسفند مشاهده کردند و ابراز داشتند که پروفایل‌های DNAبه وضوح از طریق الگوهای اثر انگشت خاص قابل تشخیص بودند. آنها بیان کردند روش ERIC-PCR رویکرد مناسبی برای تایپینگ مولکولی سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع مختلف حیوانی است (۱۴). السلطان و الهادی در سال ۲۰۲۲ از توالی‌های ERIC برای تعیین تنوع ژنتیکی در میان *اشریشیاکلی* جدا شده از انسان و گوشت منجمد وارداتی میگو و گاو استفاده کردند. در این مطالعه حداقل قرابت ژنتیکی ۹۰ درصد به‌عنوان کات‌آف برای سویه‌های مرتبط در نظر گرفته شد. نتایج آنها همپوشانی یکسان دو سویه *اشریشیاکلی* جدا شده از انسان‌های مبتلا به گاستروانتریت و سویه‌های جدا شده از گوشت گاو و میگو منجمد وارداتی را نشان داد که اهمیت این منابع را برای باکتری *اشریشیاکلی* بیماری‌زا در روده انسان برجسته کرد (۱۳). این محققین همچنین اثبات کردند که بکار بردن هزمان پرایمرهای ERIC1 و ERIC2 بهترین توانایی تمایز و تایپینگ برای بررسی اپیدمیولوژیک و تجزیه و تحلیل ژنتیکی در میان جمعیت سویه‌های *اشریشیاکلی* را دارد و استفاده از یک پرایمر ERIC منفرد نمی‌تواند برای تمایز بین سویه‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع مختلف بکار رود (۱۳). در مطالعه حاضر از دو پرایمرERIC همزمان استفاده شد.

یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم بررسی جدایه‌ها از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عدم انجام

سروتایپینگ بود. همچنین به‌منظور تجزیه و تحلیل بهتر داده‌ها می‌توان از روش‌های دیگر انگشت‌نگاری مانند AFLP به‌عنوان روش مکمل به‌منظور افزایش قدرت تفکیک استفاده کرد. اهمیت این اطلاعات در مدیریت شیوع و اقدامات پیشگیرانه، ارائه‌ی راهکارهای درمانی مناسب به‌ویژه در شیوع سویه‌های پاتوژن *اشریشیاکلی* ضروری است. با توجه به اینکه در این مطالعه چندین سویه جداشده از میزبان‌های مختلف با جنس‌های متفاوت دارای شباهت ۱۰۰ درصدی در الگوی ERIC بودند، می‌توان نتیجه گرفت به علت نزدیک بودن این جنس‌های مختلف حیوانی در یک زیستگاه، باعث شده است که این سویه‌ها در بین حیوانات مختلف در گردش باشد. بنابراین اگر این سویه‌ها حاوی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و یا سویه‌های پاتوژن باشند، از طریق مدفوع و فضولات حیوانات در محیط قرار می‌گیرند و توسط ذرات گرد و غبار برخواسته در هوا انتشار می‌یابند. همچنین تماس با سطوح و یا جابجایی وسایل موجود در کنار حیوانات توسط نگهبانان و یا رفت و آمد کارکنان، باعث انتشار آلودگی و انتقال به مواد غذایی سایر حیوانات شده و در نتیجه گونه‌های مختلف حیوانی این سویه‌های *اشریشیاکلی* را دریافت و کلونیزه می‌کنند. بنابراین برای به حداقل رساندن انتشار *اشریشیاکلی*، می‌توان توصیه کرد که اقدامات بهداشتی اضافی در باغ وحش‌ها، مانند محدودیت‌های بهداشتی در خوردن و آشامیدن و تأمین امکانات ضد عفونی به‌ویژه در نواحی نوازش برای بازدیدکنندگان باغ وحش و همچنین ضد عفونی مکرر سطوح و حذف مدفوع حیوانات اعمال شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را ابراز می‌نمایند.

References

1- Bagheri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Identification of colicinogenic Escherichia coli isolates from broiler car-casses and their inhibitory effect on E. coli pathotypes. *New Find Vet Microbiol*. 2023; 5(2): 31–40. [In Persion]

2- O'Boyle N, Douce GR, Farrell G, Rattray NJW, Schembri MA, Roe AJ, *et al.* Distinct ecological fitness factors coordinated by a conserved Escherichia coli regulator during systemic bloodstream infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2023; 120(1): e2212175120.

3- Lorrayne de Souza AM, Motta RG, Martinez AC, Orsi H, Hernandes RT, Rall VLM, et al. Virulence-encoding genes related to extraintestinal pathogenic E. coli and multidrug resistant pattern of strains isolated from neonatal calves with different severity scores of umbilical infections. *Microb Pathog.* 2023; 174: 105861.

4- Burgaya J, Marin J, Royer G, Condamine B, Gachet B, Clermont O, *et al.* The bacterial genetic determinants of Escherichia coli capacity to cause bloodstream infections in humans. *bioRxiv*. 2023; 2012–22.

5- Abdlla YA, Al-Sanjary RA. The molecular identification of diarrheagenic Escherichia coli (DEC) isolated from meat and meat products. *Iraqi J Vet Sci*. 2023; 37(1): 9–15.

6- Askari A, Ghanbarpour R, Akhtardanesh B, Aflatoonian MR, Sharifi H, Jajarmi M, *et al.* Detection of zoonotic diarrheagenic pathotypes of Escherichia coli in healthy household dogs. *Iran J Microbiol*. 2020; 12(6): 522. [In Persion]

7- Jajarmi M, Fooladi AAI, Badouei MA, Ahmadi A. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from cattle in Iran. *Microb Pathog*. 2017; 109: 274–9. [In Persion]

8- Jajarmi M, Askari Badouei M, Imani Fooladi AA, Ghanbarpour R, Ahmadi A. Pathogenic potential of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Vet Res*. 2018; 14(1): 1–8. [In Persion]

9- Bender JB, Shulman SA. Reports of zoonotic disease outbreaks associated with animal exhibits and availability of recommendations for

preventing zoonotic disease transmission from animals to people in such settings. *J Am Vet Med Assoc*. 2004; 224(7): 1105–9.

10- Sherwen SL, Hemsworth PH, Butler KL, Fanson K V, Magrath MJL. Impacts of visitor number on Kangaroos housed in free-range exhibits. *Zoo Biol*. 2015; 34(4): 287–95.

11- Vale AP, Cousins C, Tzora A, McCarron M, Green A, Molloy S, *et al.* Molecular characterization of fecal escherichia coli isolated from zoo animals. *J Zoo Wildl Med*. 2020; 50(4): 813.

12- Schlager S, Lepuschitz S, Ruppitsch W, Ableitner O, Pietzka A, Neubauer S, *et al.* Petting zoos as sources of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) infections. *Int J Med Microbiol*. 2018; 308(7): 927–32.

13- Alsultan A, Elhadi N. Evaluation of ERIC-PCR method for determining genetic diversity among Escherichia coli isolated from human and retail imported frozen shrimp and beef. *Int J Food Contam*. 2022; 9(1): 12.

14- Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of Escherichia coli strains isolated from different animal stool specimens. *Iran J Pathol.* 2017; 12(1): 25. [In Persion]

15- Shnaiderman-Torban A, Steinman A, Meidan G, Paitan Y, Abu Ahmad W, Navon-Venezia S. Petting zoo animals as an emerging reservoir of extended-spectrum β-lactamase and ampC-producing Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*. 2019; 10: 2488.

16- Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of Escherichia coli by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran J Microbiol.* 2013; 5(2): 126–31. [In Persion]

17- De Gregorio E, Silvestro G, Petrillo M, Carlomagno MS, Di Nocera PP. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in yersiniae: Genomic organization and functional properties. *J Bacteriol.* 2005; 187(23): 7945–54.

18- Ishihara K, Hosokawa Y, Makita K, Noda J, Ueno H, Muramatsu Y, *et al.* Factors associated with antimicrobial-resistant Escherichia coli in zoo animals. *Res Vet Sci.* 2012; 93(2): 574–80.

19- De Witte C, Vereecke N, Theuns S, De Ruyck C, Vercammen F, Bouts T, *et al.* Presence of broad-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Zoo Mammals. *Microorganisms.* 2021; 9(4): 834.

20- Wang Y, He T, Han J, Wang J, Foley SL, Yang G, *et al.* Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal Escherichia coli isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet Microbiol*. 2012; 159(1–2): 53–9.

21- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology E-Book. *Elsevier Health Sciences*. 2013.

22- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823–31.

23- Ibrahim DR, Dodd CER, Stekel DJ, Ramsden SJ, Hobman JL. Multidrug resistant, extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016; 92(4).

24- Casarez EA, Pillai SD, Mott JB, Vargas M, Dean KE, Di Giovanni GD. Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets. J Appl Microbiol. 2007; 103(2): 350–64.

25- Fuentes Castillo D, Navas Suárez PE, Gondim MF, Esposito F, Sacristán C, Fontana H, *et al.* Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing Escherichia coli ST58 causing fatal colibacillosis in critically endangered Brazilian merganser (Mergus octosetaceus). *Transbound Emerg Dis*. 2021; 68(2): 258–66.

Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* bacterial isolated from Kerman zoo animals using ERIC-PCR

Laleh Saadat[1], Maziar Jajarmi[2], Neda Eskandarzade[3*], Reza Ghanbarpour[4]

1- DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3- Assistant professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4- Professor, Molecular Microbiology Research Group, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Receive: January 13, 2023; Revise: February 28, 2023; Accept: April 29, 2023

Summary

Genetic fingerprinting of *Escherichia coli* strains in one habitat can significantly help our understanding of genetic diversity and circulation in different hosts. In this study, 48 stool samples were collected from 24 healthy zoo animal species in Kerman zoo by sterile swab. After the isolation of *Escherichia coli*, the strains were genetically fingerprinted by the ERIC-PCR method, and the bond patterns obtained from electrophoresis were calibrated and analyzed with Gel Quest software. In the next step, the similarity of ERIC templates was determined by drawing a phylogenetic tree by Cluster Viz software using the UPGMA algorithm. In this method, 22 clones were identified with a ≥95% similarity cutoff; The ERIC pattern of pigeon isolates had 100% similarity with a peacock isolate, and the ERIC pattern of ostrich isolates had 100% similarity with one peacock isolate. The isolates of horned chicken, casco, and one isolate of the tawny owl were grouped together with 100% similarity in terms of ERIC pattern. Also, camel isolates and one isolate from a tawny owl showed 100% similarity in the ERIC pattern. Considering that several strains isolated from different hosts with different species had 100% similarity in the ERIC pattern, it can be concluded that due to the proximity of different animal species in the same habitat such as a zoo, these strains circulated among different animals.

***Key words**: Escherichia coli, ERIC-PCR, Zoo*