



Molecular typing *E. coli* O157:H7 isolates using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) - PCR technique and the relationship genetic and antibiotic resistance patterns

Sedigheh Mokhtari¹, Yahya Tahamtan², Mohammad Kargar³, Keyvan Tadayon⁴, Elham Moazamian⁵

¹Ph.D student, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. ²Associate Professor, Microbiology Department, Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. ³Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. ⁴Associate Professor, Department of Veterinary Aerobic Bacterial Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. ⁵Assistant Professor, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Escherichia coli* O157:H7 is one of the main foodborne pathogen that cause severe gastrointestinal issues and death. Cattle are the major reservoir for *E. coli* O157:H7. During the slaughtering process, *E. coli* O157:H7 enter to food chain. Identifying the source of contamination plays important role in the control of bacteria. The purpose of this study is molecular typing and determining of genetic relationships among *E. coli* O157:H7 isolates using RAPD-PCR technique and investigating the relationship between their genetic and antibiotic resistance patterns.

Materials & methods: The Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to evaluate genetic relationship among the isolates and the results was analyzed by NTSYSpc software. Antibiotic susceptibility of the isolates was examined through disc diffusion method.

Results: The most isolates showed sensitivity to seven antibiotics and resistance were observed in six strains. DNA fingerprinting showed 10 genetic patterns. The isolates from different sources were clustered based on the similarity in RAPD pattern. The strains contain different DNA pattern and high genetic distance, showed different patterns of antibiotic susceptibility.

Conclusion: The genomic diversity showed distinct profiles of DNA in strains with the same clonal relationships and different patterns of antibiotic resistance were revealed. Therefore determining the clonal relationships of isolates with RAPD PCR technique, simultaneous using of antibiotic resistance patterns and molecular typing can be effective in detecting isolates and infection control.

Keyword: RAPD, molecular typing, antibiotic resistance, *E. coli* O157:H7.

Received: 21 August 2022

Revised: 27 October 2022

Accepted: 2 January 2023

Correspondence to: Yahya Tahamtan

Tel: +98 9177117940

E-mail: yahyatahamtab@yahoo.com

Journal of Microbial World 2023, 15(4): 282-293

DOI:10.30495/jmw.2022.1969083.2041



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تایپینگ مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی جدایه‌های E.coli O157:H7 با تکنیک RAPD-PCR

و ارتباط الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنتیکی آنها

صدیقه مختاری^۱، یحیی تهمتن^{۲*}، محمد کارگر^۳، کیوان تدین^۴، الهام معظمیان^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ^۲ دانشیار، بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. ^۳ استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. ^۴ دانشیار، بخش هوازی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ^۵ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیاکلی O157:H7 پاتوژن مهم غذایی است که منجر به بیماری‌های شدید گوارشی و مرگ می‌شود. گاو مخزن اصلی این باکتری می‌باشد و طی مراحل کشتار وارد زنجیره غذایی می‌شود. شناسایی منبع آلودگی نقش مهمی در کنترل باکتری ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه، تایپینگ مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی جدایه‌های E.coli O157:H7 با تکنیک RAPD-PCR و بررسی ارتباط الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنتیکی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور تعیین روابط ژنتیکی جدایه‌ها از تکنیک RAPD استفاده شد. باندهای حاصل از واکنش، ردیابی و پروفایل‌های متعددی از DNA ترسیم شد. نتایج با نرم افزار NTSYSpc آنالیز و ارتباط ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه تعیین گردید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تکنیک دیسک دیفیوژن بررسی شد.

یافته‌ها: اکثر جدایه‌ها به هفت آنتی‌بیوتیک حساسیت نشان دادند و در شش سویه مقاومت مشاهده شد. انگشت نگاری DNA، ۱۰ الگوی ژنتیکی را نشان داد. جدایه‌ها از منابع مختلف بر اساس شباهت در الگوی RAPD خوشه‌بندی شدند. سویه‌ها حاوی الگوی DNA متفاوت و فاصله ژنتیکی بالا، الگوهای متفاوتی از حساسیت آنتی‌بیوتیکی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنومی متعدد، پروفایل‌های متمایزی از DNA را در سویه‌های با روابط کلونال یکسان نشان داد و الگوهای متفاوت از مقاومت آنتی‌بیوتیکی آشکار شد. از این رو استفاده همزمان از الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تایپینگ مولکولی با تکنیک RAPD-PCR می‌تواند در ردیابی جدایه‌ها و کنترل عفونت موثر باشد.

کلید واژه: RAPD، تایپینگ مولکولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، E.coli O157:H7.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۳۰

مقدمه

غذایی را در انسان ایجاد می‌کند (۳و۴). توکسین‌های شیگا عامل مهم بیماری‌زایی محسوب می‌شوند و به واسطه‌ی داشتن فاکتورهای بیماری‌زایی (۵) و دوز عفونت‌زایی کم (CFU 10-100)، پایداری در محیط و مقاومت بالا به روش‌های درمانی، خطر بزرگی برای سلامتی انسان به شمار می‌آیند (۶و۷). تظاهرات بالینی ناشی از فعالیت این سروتیپ،

Escherichia coli O157:H7 یکی از سروتیپ‌های اشریشیاکلی تولید کننده‌ی شیگاتوکسین (Shig toxin-producing) Escherichia coli می‌باشد (۱و۲) که بیماری‌های ناشی از مواد

* آدرس برای مکاتبه: بخش باکتری شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹۴۰
پست الکترونیک: yahyatahamtab@yahoo.com



روش‌های قدیمی براساس تایپ‌بندی فنوتیپی و روش‌های جدید براساس ترکیبات ژنومی باکتری‌ها عمل می‌کند. روش‌هایی که اساس آن‌ها DNA باکتریایی است تکنیک‌های قدرتمندی هستند که شامل Restriction fragment length Pulsed-field gel polymorphism-polymerase (RFLP) amplified polymorphic DNA و electrophoresis (PFGE) Random (RAPD) می‌باشد. در تکنیک RAPD، قدرت افتراق، آسان بودن تکنیک و آنالیز آن، مقرون به صرفه بودن در وقت و هزینه می‌تواند موجب می‌شود تا گزینه‌ی مناسبی برای استفاده باشد (۱۳). هدف از این مطالعه تایپینگ مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی جدایه‌های E.coli O157:H7 از منابع حیوانی مختلف با تکنیک RAPD با به کارگیری الیگونوکلوئید ۱۲۸۳ و ارتباط الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و شناسایی نمونه‌ها: نمونه‌ها از لاشه و رکتوم حیوانات اهلی با استفاده از سوآب استریل در محیط تریپتیک سوی برات (TSB) جمع‌آوری و فوراً در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی E.coli O157:H7 از نمونه‌ها در آزمایشگاه میکروبی شناسی موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز انجام گرفت. نمونه‌ها در ۵ میلی‌لیتر تریپتیک سوی برات در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار و محیط آگار خوندار جهت جداسازی E.coli O157:H7 استفاده شد. برای افتراق این سروتیپ به محیط سوربیتول مک کانکی آگار سفکسیم و تلوریت پتاسیم اضافه شد (۱۴ و ۱۵). ۲۱ سویه از نمونه رکتوم و لاشه گاو، گوسفند و بز در مزارع و کشتارگاه‌های چندین شهر مختلف جداسازی شد. یک سویه نیز از نمونه‌ی جدا شده از قوطی آبمیوه به‌دست آمد. سویه‌ی استاندارد EDL93 از مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز تهیه و به عنوان کنترل مثبت به کار برده شد.

ب) استخراج DNA: سویه‌های جدا شده روی محیط آگار خوندار کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴

اختلالات گوارشی، سندرم اورمی همولیتیک، نارسایی کلیوی و در نهایت مرگ را در بر می‌گیرد. گاو‌ها مخزن مهم این پاتوتیپ هستند و آن را به عنوان کامنسال در سیستم گوارشی خود حمل می‌کنند (۸ و ۷). سایر نشخوارکنندگان و حیوانات اهلی از قبیل گوسفند، بز، ماکیان و خوک نیز حامل‌های دیگر این سروتیپ محسوب می‌شوند (۹ و ۴). و از طریق مدفوع خود آن را در محیط دفع می‌کنند (۳ و ۵ و ۹). در طول فرآیندهای کشتار در کشتارگاه‌ها، فرایندهای بسته‌بندی و عرضه محصولات گوشتی اگر پروتکل‌های بهداشتی رعایت نشود باکتری می‌تواند وارد چرخه‌ی غذایی شود و هنگام مصرف گوشت و فرآورده‌های گوشتی به صورت نیم پز و یا خام انسان را با مشکلات و اختلالات گوارشی مواجه سازد (۳ و ۶). از طرفی استفاده از کودهای حیوانی می‌تواند این باکتری را از طریق خاک وارد آب‌های زیرزمینی و کشاورزی کند و باعث آلودگی آب نوشیدنی و محصولات کشاورزی شود. از این رو آلودگی‌های غذایی از مسیرهای مهم انتقال باکتری شناخته شده است (۶ و ۱۰). یکی از انتخاب‌های مهم درمانی در مواجهه با عوارض ناشی از باکتری‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک می‌باشد. در سال‌های اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مورد پاتوتیپ‌های E.coli افزایش یافته است (۳). الگوهای مقاومت بر اساس موقعیت جغرافیایی، مکانی و زمانی متغیر است. بنابراین پایش و آزمایش در فواصل مداوم زمانی و مکانی اهمیت دارد. به طور کلی سویه‌های E.coli عامل عفونت باکتریایی جدی در جوامع بهداشتی هستند و به واسطه‌ی دارا بودن پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار متفاوت دارند. عناصر ژنتیکی متحرک از قبیل ترانسپوزون، اینتگرون و پلاسمید می‌توانند در انتقال ژن‌های دخیل در مقاومت موثر باشند (۷ و ۱۱ و ۱۳). برقراری ارتباط بین جدایه‌های مختلف باکتریایی به‌منظور شناسایی منابع آلودگی و انتشار پاتوژن‌ها، میزان تغییر باکتری در طول زمان و در نتیجه کنترل، درمان، پیشگیری و کاهش خطرات مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک به‌سزایی می‌کند (۱۲ و ۱۳). روش‌های تایپ‌بندی متعددی جهت بررسی اپیدمیولوژیکی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.

جدول ۱: پرایمرهای ردیابی ژنهای *stx1* و *stx2* و *rfO157* و انگشت نگاری DNA.

منبع	توالی پرایمر (۵'—۳')		
	forward	Reverse	
<i>Rib</i> (O157P)	CGTGATGATGTTGAGTTG	AGATTGGTTGGCATTACTG	۱۷
<i>Stx1</i>	TTCGCTCTGCAATAG GTA	TTCCCCAGTTCAATGTAA GAT	۱۶
<i>Stx2</i>	GTGCCTGTACTGGGTTTTTCTTC	AGGGGTCGATATCTCTGTCC	۱۶
۱۲۸۳ اولیگومر	GCGATCCCA		۲۰

د) آنالیز و انگشت نگاری الگوهای DNA: قطعات تکثیر و آشکار شده از محصول با وزن مولکولی بالا به پایین اندازه گیری و باندهای ایجاد شده در همی سروتپ ها حضور و غیاب شدند. حضور باند به صورت "۱" و عدم حضور باند به صورت "۰" مشخص گردید. نتایج وارد اکسل (Microsoft Office 2018) شد و به صورت دندروگرام توسط نرم افزار NTSYS-pc 2.10 و با روش UPGMA ترسیم و سروتپ‌های مختلف بر اساس میزان حساسیت در الگوی RAPD با استفاده از پرایمر اولیگونوکلئوتیدی در خوشه‌های متعددی واقع شدند.

ه) سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی: تست حساسیت آنتی بیوتیک توسط روش دیسک دیفیوژن انجام شد. مطابق با پروتکل ۲۰۲۱ موسسه استانداردهای آزمایشگاهی کلینیکی (Clinical and Laboratory Standard Institute) CLSI اندکی تغییر از کلاس‌های مختلف آنتی بیوتیک، دیسک‌های آنتی بیوتیک سفالکسین (۳۰ میکروگرم) نوروفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، لینکواسپکتین، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم) و داکسی سیلین (۳۰ میکروگرم) مورد آزمایش قرار گرفت (۲۱ و ۲۲).

نتایج

۲۲ سروتپ که همگی دارای یک یا هر دو توکسین بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌هایی که از منابع و مکان‌های

ساعت گرمخانه گذاری شدند. استخراج DNA با روش جوشاندن انجام گرفت. کلنی باکتری در محیط لوریا برتانی کشت و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و سپس سانتریفوژ در دور ۷۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه انجام شد. پلیت‌های باکتریایی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. پس از بردن روی یخ و ایجاد شوک سرمایی، سوسپانسیون باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی جمع آوری و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام تست‌های مولکولی نگهداری شد (۱۶ و ۱۵).

آشکار سازی ژن‌های شیگاتوکسین E.coli O157:H7 پرایمرهای لازم در ردیابی ژن‌های *stx1* و *stx2* و *rfO157* توسط شرکت یوروفین ژنومیک آلمان سنتز شد، توالی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. سایزهای مورد انتظار بعد از تکثیر و انجام واکنش PCR، ۵۵۵ جفت باز برای *stx1*، ۱۱۸ جفت باز برای *stx2* و ۴۲۰ جفت باز برای *rfO157* مورد انتظار بود (۱۷ و ۱۶ و ۱۵).

ج) انگشت نگاری ژنتیکی: تکنیک RAPD برای تکثیر قطعات کوتاه تکراری DNA با استفاده از الیگونوکلئوتید ۱۰ جفت بازی به عنوان پرایمر به کار برده شد (جدول ۱). تکثیر DNA باکتریایی و واکنش RAPD در حجم ۵۰ میکرولیتر بافر شامل ۲.۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۸ میکرومولار پرایمر، ۲ واحد آنزیم DNA تک پلیمراز، ۱ میلی مولار از هر dNTP و ۵ میکرولیتر DNA کامل E.coli O157:H7 انجام شد. برنامه جهت تکثیر ۴۵ سیکل، دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه ترموسیکلر تنظیم شد. بعد از انجام واکنش RAPD، محصولات واکنش از طریق الکتروفورز روی ژل ۱/۲ درصد آگارز در بافر Tris-acetate-EDTA (TAE) حاوی ۱ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۹۰ ولت آشکار شد. محصولات تحت نور ماوراء بنفش به وسیله دستگاه ژل داگ (company Kodak، آمریکا) (۱۸ و ۱۹ و ۲۰).

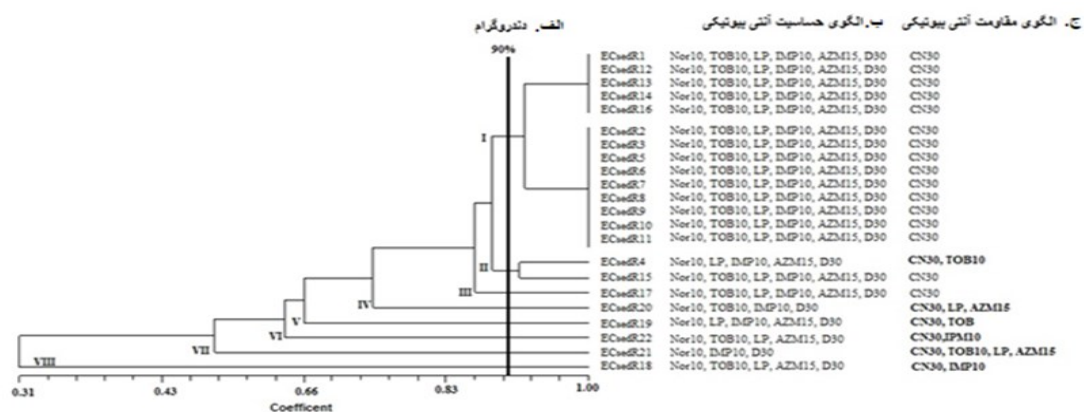
۱۵ جدایه با ضریب تشابه ۹۰٪ در یک خوشه قرار گرفتند که منابع و مکان‌های جداسازی متفاوتی با هم داشتند و همگی آن‌ها الگوی حساسیت یکسان نسبت به ۷ آنتی بیوتیک را نشان دادند (شکل ۱. الف و ب).

جدایه‌های ECsedR4 و ECsedR15 در یک خوشه دسته‌بندی شدند و تفاوت الگوی مقاومت آنتی بیوتیک مربوط به تویرامایسین در این دو متفاوت بود (شکل ۱. ب و ج).

ECsedR20، ECsedR19، ECsedR18 و ECsedR22، شباهت الگوی RAPD کمتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند و در خوشه‌های جداگانه‌ی تک عضوی قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این ۵ جدایه‌ی ذکر شده متفاوت از سایر جدایه‌ها نشان داده شد (شکل ۱. ب و ج). به طوری که میزان شباهت ECsedR18، ۳۱٪ کمترین ضریب تشابه و سپس ECsedR21 با ضریب تشابه حدود ۵۰٪، ECsedR22 با ضریب تشابه کمتر از ۶۶٪، ECsedR19 و ECsedR20 ضریب تشابه حدود ۶۹٪ را نسبت به سایر خوشه‌ها نشان دادند. بیشترین میزان شباهت مربوط به خوشه‌های I و II با ضریب تشابه ۹۰٪ گزارش شد که بجز سویه‌ی ECsedR4 همگی الگوی حساسیت و مقاومت

متفاوتی جداسازی شدند در یک خوشه کنار هم قرار گرفتند و شباهت ۱۰۰٪ در الگوی DNA نشان دادند. همچنین آن‌هایی که از منابع و مکان‌های یکسان جداسازی شده بود الگوی ژنتیکی RAPD متفاوت را آشکار ساختند و در خوشه‌های مجزا از هم قرار گرفتند (شکل ۱ الف).

حساسیت جدایه‌ها به ۷ آنتی بیوتیک از خانواده‌های متفاوت مورد هدف واقع شد. همه‌ی جدایه‌ها به داکسی سیلین و نورفلوکساسین حساس بودند و همگی به سفالکسین مقاومت نشان دادند. ۱۶ جدایه نسبت به ۷ گروه آنتی بیوتیکی حساسیت نشان دادند. مقاومت به آنتی بیوتیک در ECsedR4 نسبت به تویرامایسین، جدایه‌ی ECsedR20 (جدا شده از بطری آبمیوه) نسبت به لینکومایسین و آزیترومایسین آشکار شد. این جدایه از منطقه جغرافیایی و منبع متفاوتی نسبت به سایر جدایه‌ها جداسازی شد. همچنین جدایه‌ی ECsedR19 مقاومت به تویرامایسین را نشان داد و مقاومت به آنتی بیوتیک آزیترومایسین و تویرامایسین به وضوح در جدایه‌ی ECsedR21 مشاهده شد. جدایه‌های ECsedR18 و ECsedR22 مقاومت به تویرامایسین و ایمی پنم را نشان دادند (شکل ۱. ب و ج).



شکل ۱: الف. دندروگرام حاصل از دسته‌بندی ژنتیکی جدایه‌های *E.coli* O157:H7. خوشه‌بندی ۲۲ جدایه در ۸ خوشه (I-VIII) براساس تشابه ۹۰٪ براساس الگوی ژنوتایپینگ RAPD. ب. حساسیت جدایه‌ها به ۷ آنتی بیوتیک. تفاوت در حساسیت آنتی بیوتیکی در خوشه‌هایی با ضریب تشابه کمتر و فاصله ژنتیکی بیشتر در خوشه‌های (II, III, IV, V, VI, VII, VIII) و ECsedR4 در خوشه‌ی II. ج. الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌هایی با ضریب تشابه کمتر نسبت به سایر جدایه‌ها.

سروتیپ‌های O157 به وجود می‌آید که مقاومت آنتی بیوتیکی را در این جدایه‌ها متمایز سازد. در مطالعه‌ای که توسط سواردانا (Suardana) و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد با بکارگیری ۱۰ پرایمر جدایه‌های E.coli O157:H7 که از مدفوع گاو، جوجه و گوشت جداسازی شده بود را با تکنیک RAPD از هم افتراق دادند و باندهای پلی مورفی متعددی توسط این پرایمرها ایجاد شد که بخوبی جدایه‌ها از هم متمایز شدند (۲۶). هوپکین (Hopkin) و هیلتون (Hilton) در سال ۲۰۰۱ با استفاده از RAPD پروفایل‌های متعددی در /شرشیاکلی‌های مولد شیگا توکسین مشاهده کردند و بین سویه‌های مشابه تمایز ایجاد شد. آن‌ها نشان دادند که این تکنیک با بکارگیری پرایمرهای مناسب روشی آسان و کارآمد برای تایپینگ مولکولی محسوب می‌شود (۱۸).

وایدوویک (Vidovic) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مرکز تحقیقات دانشگاه ساسکاچوای کانادا، از پرایمر ۱۲۸۳ برای افتراق ۱۹۴ جدایه‌ی E. coli O157 جدا شده از مدفوع گاو و خوراک دام استفاده کردند جدایه‌ها در ۳ خوشه دسته‌بندی شدند. براساس تعداد و الگوی باندهای حاصل از RAPD، ۳۹ پروفایل مختلف ایجاد شد (۲۰). در مطالعه حاضر ترسیم ۸ خوشه و ۱۰ پروفایل ژنی برای ۲۲ جدایه، تأییدی بر قدرت افتراق پرایمر استفاده شده با تکنیک RAPD و نمایانگر تنوع ژنتیکی بالا در این سویه می‌باشد که با نتایج مطالعات محققان ذکر شده مطابقت دارد.

دلیل اینکه جدایه‌ها با استفاده از پرایمرها باندهای متفاوتی را ایجاد می‌کنند یا برخی توالی‌ها را تکثیر نمی‌کنند می‌تواند عدم وجود توالی مکمل در DNA و یا تکثیر تعداد محدودی از توالی‌ها با سایز متفاوت باشد، در حالی که برخی پرایمرها ممکن است مکان‌های مختلف ژنوم را تکثیر دهند. بنابراین بین سویه‌ها تمایز ایجاد می‌شود (۵). نتایج تحقیقات ویلیامز (Williams) و رادو (Radu) بیان می‌کند که قدرت RAPD PCR در ایجاد تمایز و ایجاد پروفایل‌های متعدد، وابسته به انتخاب پرایمر مناسب می‌باشد که تنوع ژنتیکی را آشکار می‌سازد و نهایتاً در شناسایی منبع جدایه‌ها موثر است. در پژوهش

آنتی بیوتیکی یکسانی را نشان دادند. از ژنوتایپینگ مولکولی جدایه‌ها با انگشت نگاری الگوی DNA و آنالیز RAPD، ۸ خوشه مجزا با خط برش ۹۰٪ و ۵ الگوی مقاومت آنتی بیوتیک ایجاد شد (شکل ۱ الف).

بحث

گاو و سایر حیوانات اهلی منبع تغذیه‌ی میلیاردها انسان در سراسر دنیا محسوب می‌شوند اما می‌توانند مخزن عوامل عفونی و مقاومت آنتی بیوتیکی باشند (۷ و ۲۳). اگرچه حدود ۳۵ سال از اولین شیوع E.coli O157:H7 با منشاء غذایی می‌گذرد اما هنوز پیشگیری و کنترل /شرشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شیگاتوکسین (STEC) با منشا گاو به دلیل شیوع گسترده‌ی آن، حضورفاکتورهای بیماری‌زایی متعدد، بیماری‌زایی و مکانیسم‌های پایداری و بقا، مشکل است و کنترل را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین وجود فاکتورهای بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی چشمگیر میان سویه‌های E.coli O157:H7 به‌عنوان سویه‌ای که انسان را درگیر می‌کند یک چالش مهم محسوب می‌شود (۷ و ۲۴).

تکنیک انگشت‌نگاری باکتریایی و شناسایی رابطه‌ی کلونال جدایه‌ها با تکنیک RAPD به‌طورگسترده در بررسی و دسته بندی‌های اپیدمیولوژیکی به‌عنوان ابزار کارآمدی در افتراق کلونال پاتوژن‌ها کاربرد دارد. این روش تایپینگ مولکولی میزان تنوع میان سروتیپ‌ها را بر اساس الگوی‌های باند حاصل از توالی‌های تکرارشونده‌ی کوتاه میان جدایه‌ها نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر، براساس الگوهای باند ایجاد شده در جدایه‌ها، ۸ خوشه و ۱۰ پروفایل ژنی ایجاد شد. جدایه‌های واقع در خوشه I ضریب تشابه صد در صد در الگوی RAPD داشتند و به نظر می‌رسد از یک کلون یکسان منشا گرفته‌اند.

۲ جدایه در خوشه II و سایر جدایه‌ها با وجود اینکه از منابع یکسان جداسازی شده بودند ولی در الگوی ژنتیکی تفاوت داشتند و بر همین اساس درخوشه‌های مجزایی از هم دسته‌بندی شدند. این امر بیان کننده‌ی ایجاد پلی مورفیسم و موتاسیون در ژنوم باکتری‌ها است (۲۵). بنابراین تنوع ژنتیکی به میزانی در

و پرایمر دیگر ۲۷ خوشه ایجاد شد. نتایج مطالعه آن‌ها ارتباط و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها در منابع مختلف را به وضوح نشان داد (۵). در مطالعه حاضر ارتباط ژنتیکی سویه‌های جدا شده از مکان‌های جغرافیایی و منابع مختلف در خوشه‌ی I با دو پروفایل RAPD با ضریب تشابه ۱۰۰ درصد و تنوع ژنتیکی در جدایه‌های واقع در سایر خوشه‌ها بخوبی نشان داده شده است.

اثر بخشی آنتی بیوتیک‌ها در مقابل این سویه در انسان به دلیل تحریک ترشح شینگاتوکسین‌ها بحث برانگیز و مورد توافق نیست اما مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده در مقابل /شیریشیاکلی‌های تولید کننده‌ی شینگا توکسین جدا شده از گاو و انسان نیز می‌تواند استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در کنترل عفونت‌های ناشی از آن در انسان را محدود کند. اگر چه آنتی بیوتیک‌ها برای از بین بردن STEC در گاو استفاده نمی‌شوند، تنوع زیاد این سویه‌ها و وجود ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در STEC می‌تواند پروسه‌ی انتخاب آنتی بیوتیک مناسب را مشکل و یا به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی کمک کند (۷).

به نظر می‌رسد وجود ژن‌ها و عناصر ژنتیکی متحرک می‌تواند به آسانی میان جدایه‌ها منتقل شود. از این رو در مطالعات انجام شده توسط محققان مقاومت /شیریشیاکلی به اسپکتینومایسین و ترکیبات آن تأیید و علت آن وجود یک کاست ژنی عنوان شده است. مقاومت به فلوروکینون‌ها از جمله نورفلوکساسین در اثر موتاسیون کروموزومی (در ژن gyr A) و مقاومت به سفالوسپورین‌ها و سایر آنتی بیوتیک‌ها بخاطر وجود ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک (بتالاکتاماز) رخ می‌دهد (۱۱). چندین آنتی بیوتیک از قبیل آزیترومایسین و ایمی‌پنم ترشح شینگاتوکسین از سویه‌ی باکتری را تحریک نمی‌کند بنابراین در درمان مراحل اولیه STEC و بیماری‌های ناشی از آن از جمله سندروم اورمی همولیتیک (HUS) پیشنهاد شده است (۷).

مطالعه بر روی مقاومت در مقابل کلاس‌های مختلف آنتی بیوتیکی از جمله کارباپنم‌ها، سفالوسپورین‌ها، تراسیکیلین‌ها، آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام‌ها در مناطق مختلف

حاضر با بکارگیری پرایمر ۱۲۸۳ الگوهای ژنتیکی متنوعی در سروتیپ‌های O157 ایجاد شد. مقاومت آنتی بیوتیکی متمایزی در جدایه‌هایی که تفاوت بیشتری در الگوی ژنتیکی داشتند مشاهده گردید که در شناسایی منبع، مکان جغرافیایی و روابط ژنتیکی میان جدایه‌های باکتریایی به منظور کنترل شیوع و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب، مفید می‌باشد (۲۷ و ۲۸). در تحقیق سعادتیان و همکاران نیز با بکارگیری تکنیک RAPD و استفاده از پرایمر اولیگونوکلوئوتیدی، تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های کلبسیلا و در نتیجه‌ی آن تفاوت در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر کاربرد RAPD با انتخاب پرایمر مناسب در تعیین تنوع ژنتیکی و تنوع الگوی مقاومت جدایه‌ها هم‌خوانی دارد (۲۹). در تحقیق چانسایرپورنچای (Chansiripornchai) و همکاران سال ۲۰۰۱، با بکارگیری دو پرایمر و آنالیز پروفایل‌های RAPD مربوط به ۵۵ جدایه‌ی به دست آمده از مرغ در دو منطقه‌ی جغرافیایی متفاوت از هم (تایلند و سوئد) ۵۰ نوع الگوی RAPD مشاهده شد و توانستند ارتباط ژنتیکی چشمگیری را میان سویه‌ها آشکار کنند (۳۰). در مطالعه‌ی دیگری که نیلسن (Nielsen) و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مرکز کنترل بیماری‌های عفونی دانمارک انجام دادند توانستند ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های ادراری و مدفوعی با آنالیز پروفایل‌های RAPD مشاهده کنند و به این نتیجه رسیدند که الگوهای ژنتیکی حاصل از سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مشابه سویه‌های موجود در فلور مدفوع بنابراین ارتباطی ژنتیکی میان آن‌ها تخمین زده شد و عنوان گردید که سویه‌ی مدفوعی منجر به درگیری سیستم ادراری شده است (۳۱).

در مطالعه‌ای که سال ۲۰۱۷ توسط فادل (Fadel) و همکاران در اسماعیلیه مصر انجام شد ۱۷۷ نمونه روده‌ای از ۴ گونه پرنده‌ی وحشی جمع‌آوری و STEC‌های جداسازی شده از این نمونه‌ها با تکنیک RAPD با دو پرایمر تیپ‌بندی شدند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که جدایه‌های STEC هتروژنوس هستند بدین معنا که پروفایل‌های ناهمگن و متنوعی را نشان دادند. به طوری که آنالیز داده‌های حاصل از کاربرد یک پرایمر ۳۰ خوشه

تقسیم شدند. بررسی‌ها نشان داد که الگوی ژنوتایپینگ و مقاومت آنتی بیوتیک در شهرهای مختلف ارتباط مشابهی داشتند. همچنین اکثر جدایه‌های کامنسال در یک خوشه قرار گرفتند (۳۶). در مطالعه‌ی حاضر همه نمونه‌ها حساسیت به لینکومایسین نشان دادند و الگوی حساسیت در جدایه‌های شهرهای مختلف تقریباً یکسان بود. اگر چه همه جدایه‌ها به استثنای ECsedR20 در مطالعه ما حساس به لینکومایسین بودند ولی در منابع و مکان‌های مختلف الگوی مشابهی از حساسیت را نشان دادند.

در مطالعه‌ای که توسط خان (Khan) و همکاران در سال ۲۰۰۲ در کلکته‌ی هند انجام گرفت، آنالیز سویه‌های STEC، ۷ کلاستر مهم را آشکار کرد. آنالیز ژنتیکی بیانگر ارتباط میان جدایه‌های انسانی و حیوانی بود به طوری که خوشه‌بندی سویه‌ها رابطه‌ی تکاملی بین آن‌ها را نشان داد. از ۱۵ آنتی بیوتیک، عموماً بیشترین مقاومت به آمپی سیلین و تتراسیکلین مشاهده شد و الگوی مقاومت بین سویه‌ها متفاوت بود. در مطالعه‌ی حاضر حساسیت همه‌ی جدایه‌ها به داکسی سیلین (از کلاس تتراسیکلین‌ها) مشاهده شد که این تفاوت الگوی مقاومت می‌تواند در مناطق مختلف متفاوت باشد. مشابه تحقیقات انجام گرفته، تیپ‌بندی سایر باکتری‌ها توسط تکنیک RAPD انجام شده است (۳۷). از جمله در مطالعه‌ی اولوبرود (Oluborode) در سال ۲۰۱۸، ۳۰ جدایه بالینی و ۱۸ جدایه محیطی سودوموناس اثرورینوزا در نیجریه جداسازی روابط کلونال جدایه‌ها با آنالیز داده‌های حاصل از RAPD مشخص شد. ۳۷ پروفایل و ۸ خوشه برای ۴۸ جدایه ترسیم شد. میزان تنوع ژنتیکی زیاد میان جدایه‌های سودوموناس اثرورینوزا‌هایی که دارای مقاومت به چند آنتی بیوتیک بودند گزارش شده است. با این وجود به نظر می‌رسد ارتباطی بین پروفایل‌های ژنتیکی و الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها وجود ندارد، زیرا هیچ ارتباطی بین پروفایل‌های ژنتیکی و الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده نشد (۳۸).

انجام و مقاومت چند دارویی STEC‌های جدا شده از حیوان و انسان گزارش شده است (۱۱ و ۳۲). در مطالعات بودندوئررفر (Bodendoerfer) و همکاران جدایه‌های E.coli کامنسال مقاومت به توبرامایسین را نشان داده‌اند (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر مقاومت به توبرامایسین در ۵ جدایه O157 مشاهده شد که با نتایج تحقیق بودندوئررفر مطابقت دارد. ۱۷ جدایه‌ی دیگر به توبرامایسین حساسیت نشان دادند.

در مطالعه‌ی حاضر مقاومت به سفالسپورین‌های نسل اول از جمله سفالکسین برای همه‌ی جدایه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصل از تحقیق بودندوئررفر و همکاران، حضور ژن مقاومت به بتالاکتاماز و مقاومت به سفالوسپورین‌ها را تأیید کرد. همچنین ماریالوئیس (Marialouis) و همکاران شواهدی مبنی بر مقاومت E.coli نسبت به این دسته آنتی بیوتیک‌ها مشاهده کردند که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر مقاومت به سفالکسین هم‌خوانی دارد (۳۳).

در مطالعه حاضر الگوهای مقاومت آنتی بیوتیک و آنالیز پروفایل‌های RAPD نشان داد که الگوی ژنتیکی متفاوت می‌تواند الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی متمایزی را آشکار سازد. به طوری که خوشه‌ی I شباهت ژنتیکی و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی کاملاً مشابهی با هم داشتند. همچنین جدایه‌هایی که نسبت به دو یا چند آنتی بیوتیک مقاومت داشتند، در خوشه‌های مجزایی از سایرین به صورت تک عضو قرار گرفتند. اگر چه در مطالعه‌ی کابوت (Cobbaut) و همکاران در سال ۲۰۱۱ الگوی ژنوتایپینگ حاصل از تکنیک PFGE و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ارتباطی نشان نداد (۳۴) ولی در تحقیق کیم (Kim) و همکارانش که در سال ۱۹۹۴ انجام گرفت آنالیز نتایج ژنوتایپینگ با روش RFLP نشان داد که از مجموع ۱۷۶ جدایه، ۱۳ جدایه به ۳ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند که این جدایه‌ها در ۹ کلون متفاوت واقع شده بودند (۳۵).

در مطالعه فاضل و همکاران در سال ۲۰۱۹، ۷۰ نمونه‌ی E.coli جداسازی و ژنوتایپینگ توسط RAPD انجام شد. در بررسی تست حساسیت به آنتی بیوتیک اکثر جدایه‌ها به لینکومایسین مقاوم بودند. بر اساس الگوی RAPD جدایه‌ها به ۴ خوشه

نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش حاضر روابط ژنتیکی میان جدایه‌های حاصل از منابع مختلف و ارتباط کلونال آن‌ها را آشکار ساخت همچنین تنوع ژنتیکی جدایه‌هایی با منبع یکسان و تفاوت در الگوی ژنتیکی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متمایزی را نشان داد. از این رو تعیین الگوی ژنتیکی و پایش مداوم جدایه‌های یک سویه با فواصل زمانی کم از منابع و مکان‌های مختلف در کنترل و پیشگیری از تظاهرات بالینی موثر است. با توجه به تغییر و تنوع ژنتیکی سروتیپ‌های E.coli O157:H7، تعیین روابط کلونال و منبع جغرافیایی جدایه‌ها با تکنیک RAPD PCR و استفاده هم‌زمان از الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تایپینگ مولکولی می‌تواند در انتخاب کارآمد روش‌های درمان و کنترل عفونت موثر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر معصومه حیاتی در بخش بیولوژی مولکولی موسسه‌ی تحقیقات واکس و سرم سازی رازی شیراز به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای پژوهش کمال امتنان را دارند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Elsayed M.S.A.E. Eldsouky S.M. Roshdy T. Bayoume A.M.A. Nasr G.M. Salama A.S. Akl B.A. Hasan A.S. Shahat A.K. Khashaba R.A. Abdelhalim W.A. Genetic and antimicrobial resistance profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from different sources in Egypt. BMC Microbiol. 2021; 21(1): 1-19.
2. Bumunang EW. Zaheer R. Stanford K. Laing C. Niu D. Guan LL. Chui L. Tarr GA. McAllister TA. Genomic analysis of shiga toxin-producing *E. coli* O157 cattle and clinical isolates from Alberta, Canada. Toxins. 2022 ; 31:14(9):603.
3. Haile A.F. Alonso S. Berhe N. Atoma T.B. Boyaka P.N. Grace D. Prevalence, Antibigram, and multidrug-resistant profile of *E. coli* O157: H7 in retail raw beef in Addis Ababa, Ethiopia. Front. Vet. Sci. 2022;9.
4. Ndegwa E.O. Brien D. Matthew K. Wang Z. Kim J. Shiga toxin subtypes, serogroups, phylogroups, RAPD genotypic diversity and select virulence markers of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* strains from goats in Mid-Atlantic US. Microorganisms. 2022; 10(9):1842
5. Fadel H.M. Afifi R. Al-Qabili D.M. Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. Vet. World. 2017; 10(9): 1118.
6. Iwu C.D. du Plessis E. Korsten L. Okoh A.I. Prevalence of *E. coli* O157: H7 strains in irrigation water and agricultural soil in two district municipalities in South Africa. Int J Environ Stud. 2021; 78(3): 474-483.

7. Mir R.A. Brunelle B.W. Alt D.P. Arthur T.M. Kudva I.T. Supershed *Escherichia coli* O157: H7 Has potential for increased persistence on the rectoanal junction squamous epithelial cells and antibiotic resistance. *Int.J. Microbiol.* 2020; 2020.
8. Kolodziejek AM. Minnich SA. Hovde CJ. *Escherichia coli* O157: H7 virulence factors and the ruminant reservoir. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2022;35(3):205-14.
9. Al-Ajmi D. Rahman S. Banu S. Occurrence virulence genes and antimicrobial profiles of *Escherichia coli* O157 isolated from ruminants slaughtered in Al Ain, United Arab Emirates. *BMC Microbiol.* 2020; 20(1): 1-10.
10. Haidari N. Tahamtan Y. Molaei H. The effect of adjuvants on the efficacy and safety of anti-diarrhea *Escherichia coli* O157: H7 vaccine. *JMW.* 2020;13(1):36-46 [persian].
11. Moran R.A. Anantham S. Holt K.E. Hall R.M. Prediction of antibiotic resistance from antibiotic resistance genes detected in antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* using PCR or WGS. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72(3): 700-704.
12. Dehkharghani A.D. Haghghat S. Farzami M.R. Douraghi M. Rahbar M. Subtyping β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with UTI by MLVA and PFGE methods. *IJBMS.* 2021; 24(4): 437.
13. Raeispour M and Ranjbar R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2018; 7(1): 1-9.
14. Tahamtan Y. Hayati M. Namavari MM. Moazeni GR. Improved sorbitol macConkey agar medium containing cefixime and potassium tellurite for isolation and diagnosis of *E. coli* O157: H7 from clinical case. *JMW.* 2009; 2(1):37-48 [Persian].
15. Nguyen T.T. Van Giau V. Vo T.K. Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. *3 Biotech.* 2016; 6 (2):1-9.
16. Franck S.M. Bosworth B.T. Moon H.W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (6):1795-1797.
17. Rashid R.A. Tabata T.A. Oatley M.J. Besser T.E. Tarr P.I. Moseley S.L. Expression of putative virulence factors of *Escherichia coli* O157: H7 differs in bovine and human infections. *Infect. Immun.* 2006; 74 (7):4142-4148.
18. Hopkins K.L. Hilton A.C. Restriction endonuclease analysis of RAPD-PCR amplicons derived from Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50 (1):90-95.
19. Madico G. Akopyants N.S. Berg D.E. Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157: H7 strains by using templates from boiled cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (6):1534-1536.

20. Vidovic S. Korber D.R. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles and pathogenicity determinants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(6): 4347-4355.
21. Bodendoerfer E. Marchesi M. Imkamp F. Courvalin P. Böttger E. Mancini S. Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside-non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 2020; 56 (1): 106- 109.
22. Weinstein MP. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021.
23. Tayh G. Boubaker SM. Khedher RB. Jbeli M, Chehida FB. Mamlouk A. Daaloul-Jedidi M. Messadi L. Prevalence virulence genes and antimicrobial profiles of *Escherichia coli* O157: H7 isolated from healthy cattle in Tunisia. *JIDC.* 2022;16(08):1308-16.
24. Mir R.A. Weppelmann T.A. Kang M. Bliss T.M. DiLorenzo N. Lamb G.C. Ahn S. Jeong K.C. Association between animal age and the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle. *Vet. Microbiol.* 2015; 175(2-4): 325-331.
25. Afshari A. Rad M. Seifi H.A. Ghazvini K. Genetic variation among *Escherichia coli* isolates from human and calves by using RAPD PCR. *Iran. J. Vet. Res.* 2016; 10(1): 33-40.
26. Suardana I.W. Artama W.T. Widadiah D.A. Mahardika I. Genetic diversity of *Escherichia coli* O157: H7 strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Int Res J Microbiol.* 2013; 4 (72): 8
27. Williams J.G.K. Kubelik A.R. Livak K.J. Rafalski J.A. Tingey S.V.'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res. Spec. Publ.* 1990; 18 (22):6531-6535.
28. Radu, S. Ling O.W. Rusul G. Karim M.I.A. Nishibuchi M. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol. Methods.* 2001; 46 (2):131-139.
29. Saadatian Farivar A. Nowroozi J. Eslami G. Sabokbar A. RAPD PCR profile, antibiotic resistance, prevalence of armA Gene, and detection of KPC enzyme in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2018;2018.
30. Chansiripornchai N. Ramasoota P. Sasipreeyajan J. Svenson S. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 2001; 80:75-83.
31. Nielsen K. Dynesen P. Larsen P. Fridodt-Moller N. Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy controls who have never had a urinary tract infection. *J of Med Micro.* 2014; 63:582–589.

32. Zhang S. Huang Y. Chen M. Yang G. Zhang J. Wu Q. Wang J. Ding Y. Ye Q. Lei T. Su Y. Characterization of Escherichia coli O157: non-H7 isolated from retail food in China and first report of mcr-1/IncI2-carrying colistin-resistant E. coli O157: H26 and E. coli O157: H4. Int. J. Food Microbiol. 2022; 378:109805.
33. Marialouis X.A. Santhanam A. Antibiotic resistance, RAPD-PCR typing of multiple drug resistant strains of Escherichia coli from urinary tract infection (UTI). JCDR. 2016; 10(3): pDC05.
34. Cobbaut K. Houf K. Boyen F. Haesebrouck F. De Zutter L. Genotyping and antimicrobial resistance patterns of Escherichia coli O157 originating from cattle farms. Foodborne Pathog. Dis. 2011; 8(6):719-724.
35. Kim H.H. Samadpour M. Grimm L. Clausen C.R. Besser T.E. Baylor M. Kobayashi J.M. Neill M.A. Schoenknecht F.D. Tarr P.I. Characteristics of antibiotic-resistant Escherichia coli O157: H7 in Washington State, 1984–1991. J. Infect. Dis. 1994; 170(6):1606-1609.
36. Fazel F. Jamshidi A. Khoramian B. Phenotypic and genotypic study on antimicrobial resistance patterns of E. coli isolates from bovine mastitis. Microb. Pathog. 2019; 132: 355-361.
37. Khan A and Yamasaki S. Prevalence and genetic profiling of virulence determinates of Non-O157 STEC isolate from cattle, beef and humans Calcutta India. Emerg Inf Dis. 2002; 8 (1): 54-62.
38. Oluborode O.B. Smith S.I. Seriki T.A. Fowora M. Ajayi A. Coker A.O. Antibiotic susceptibility pattern and molecular typing by PCR-RAPD analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Biotechnol. Lett. 2018; 46(4): 434-437.