

Detection of Specific *eae* Gene from Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-ELISA

Samira Rami¹,
Jafar Amani²,
Tayebeh Saleh³

¹ MSc in Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ghiamdasht Branch, Tehran, Iran

² Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ghiamdasht Branch, Tehran, Iran

(Received May 9, 2018 ; Accepted August 27, 2018)

Abstract

Background and purpose: Enteropathogenic *Escherichia coli* from *Enterobacteriaceae* family is one of the most common causes of chronic diarrhea in children and infants. Polymerase Chain Reaction (PCR) method is commonly used for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* species, but there are some disadvantages with this method due to the use of gel electrophoresis and staining with ethidium bromide, including being time consuming, limits on the number of samples, and toxicity of ethidium bromide. The aim of this study was to evaluate the PCR-ELISA technique for detection of enteropathogenic *E.coli*.

Materials and methods: In this study, Streptavidin was loaded in ELISA plate, and a specific Biotinylated probe was used to connect the PCR product. Biotinylated probe was connected to Streptavidin and the amplified gene was attached to the probe. Finally, the digoxigenin antibodies were used to identify the PCR product. The reaction was measured with an ELISA reader.

Results: *eae* of enteropathogenic *Escherichia coli* was amplified using the gene specific primers which resulted in a fragment of a 999 bp. The results of PCR-ELISA showed that this technique does not cross-react with the bacteria in their families and its sensitivity was 11 pg.

Conclusion: PCR-ELISA technique is an accurate and rapid test for detection of infectious agents by the specific gene. PCR-ELISA could be used as an alternative method instead of time-consuming, less sensitive, and expensive techniques.

Keywords: Enterobacteriaceae, enteropathogenic *Escherichia coli*, *eae*, PCR-ELISA

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (170): 43-55 (Persian).

* Corresponding Author: Jafar Amani - Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: jafar.amani@gmail.com)

تشخیص ژن اختصاصی *eae* باکتری انتروپاتوژنیک/شرشیاکلی با استفاده از روش نوین PCR-ELISA

سمیرا رامی^۱جعفر امانی^۲طیبه صالح^۳

چکیده

سابقه و هدف: شرشیاکلی انتروپاتوژنیک از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، یکی از شایع ترین علل اسهال مزمن در کودکان و نوزادان می باشد. یکی از روش های مرسوم جهت تشخیص گونه های مختلف/شرشیاکلی انتروپاتوژنیک، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) می باشد که به دلیل استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید دارای معایبی از قبیل صرف زمان، محدودیت در تشخیص تعداد نمونه ها و هم چنین سمی بودن اتیدیوم بروماید و ژل آگارز می باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تکنیک PCR-ELISA جهت تشخیص باکتری/شرشیاکلی انتروپاتوژنیک انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، کف پلیت الیزا استرپتو آویدین بارگذاری گردید و با استفاده از پروب اختصاصی که قسمت ابتدای آن بیوتینه شده بود، جهت اتصال به ژن *eae* تکثیر شده با روش PCR استفاده گردید. بیوتین متصل به پروب به استرپتو آویدین متصل شده، و ژن تکثیر یافته نیز به پروب اختصاصی متصل گردید. در نهایت از آنتی بادی ضد دیگو کسیرنن برای شناسایی محصول استفاده شد و واکنش با دستگاه نور سنج اندازه گیری گردید.

یافته ها: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *eae*/شرشیاکلی انتروپاتوژنیک تکثیر شد که نتیجه آن یک قطعه به طول ۹۹۹ bp بود. نتایج حاصل از PCR-ELISA نشان داد که این تکنیک هیچ واکنش متقاطع با باکتری های هم خانواده خود ندارد و هم چنین میزان حساسیت آن ۱۱ پیکوگرم ارزیابی شد.

استنتاج: تکنیک PCR-ELISA روشی حساس و دقیق بوده که برای شناسایی عوامل بیماری زا با استفاده از ژن اختصاصی آن باکتری به کار می رود. این تکنیک می تواند جایگزین مناسبی برای تکنیک های قدیمی زمان بر با حساسیت کمتر و هزینه بیش تر باشد.

واژه های کلیدی: انتروباکتریاسه، شرشیاکلی، انتروپاتوژنیک، *eae*، PCR-ELISA

مقدمه

یکی از مهم ترین سروتیپ های/شرشیاکلی، سویه های انتروپاتوژنیک هستند که از علل اصلی اسهال در کودکان، در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود. این سویه ها برای اولین بار در طی سال های ۱۹۴۰ تا ۱۹۵۰ گزارش شدند. اتصال به سلول های جداره روده و تخریب پرزهای روده ای از مهم ترین ویژگی های این

مؤلف مسئول: جعفر امانی - تهران: میدان ونک، خیابان ملاصدرا، بعد از خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) E-mail:jafar.amani@gmail.com

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قیامدشت، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قیامدشت، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۳/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۵

باکتری‌ها می‌باشد (۳-۱). امروزه یکی از بیش‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی باکتری‌های روده‌ای می‌باشند و اکثر میکرو ارگانیسم‌های به‌دست آمده از عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به داروهای ضد باکتریایی می‌باشند (۴-۵). *اشرشیاکلی*، باسیلی، بسیار کوچک، کوتاه و گرم منفی است. بیش‌تر سویه‌ها، توانایی حرکت دارند و دارای فاکتورهای چسبندگی اختصاصی و بسیار متعدد می‌باشند. بیش‌تر گونه‌ها به واسطه پیلی به سطوح خاص متصل شده و در نتیجه این اتصال، بقای باکتری در بافت‌های خاص میزبان موثر می‌گردد (۶). باکتری *اشرشیاکلی* دارای ژنومی حلقوی با اندازه‌ی ۴/۶ مگا باز بوده و محتوای گوانین به علاوه سیتوزین (C+G) آن، حدود ۳۹ تا ۵۹ درصد تخمین زده شده است (۷). خصوصیات مربوط به بیماری‌زایی باکتری می‌تواند از طریق پلاسمید و یا سایر عناصر ژنتیکی قابل انتقال به دست آید. این ویژگی سبب می‌شود که باکتری در میزبان‌های ویژه به گونه‌های سلولی خاصی حمله کند، بچسبد و یا توکسین تولید کند (۴-۵). بیش‌ترین شیوع عفونت سویه‌های *اشرشیاکلی* انتروپاتوژن (*EPEC*, *Enteropathogenic E. coli*) در کودکان و در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد (۸). انتقال باکتری از راه دهانی - مدفوعی می‌باشد و حتی پتانسیل انتقال آن از هوا نیز دیده شده است. به نظر می‌رسد کودکان با علامت و بدون علامت به عنوان مخزن این سویه‌ها عمل کرده و در افراد سالم با دوز بالا، اسهال ایجاد کند (۷). این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث به هم ریختگی ساختار در سلول گردیده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک A/E در سطح روده می‌شود که با این عمل پدیده جذب و دفع روده مختل می‌گردد (۹). اسهال ایجاد شده توسط این سویه‌ها، آبکی و به صورت حاد بوده و گزارشاتی هم از اسهال مزمن وجود دارد (۱۰). سایر علایم به جز اسهال شامل استفراغ، بالا رفتن درجه حرارت بدن (تب) و از دست دادن مایعات بدن می‌باشد (۱۱-۸). *EPEC* در سال ۱۹۹۵ توسط Neter برای نشان دادن ارتباط بین سروگروپ‌های

O در *اشرشیاکلی*‌های مرتبط با اسهال مطرح گردید (۷). سازمان بهداشت جهانی WHO پیشنهاد کرد که سویه‌های *EPEC* در ۱۲ دسته مختلف از جمله، O26، O55، O56، O111، O114، O119، O125، O127، O126، O128، O142، O158 به عنوان سرگروه‌های *EPEC* قرار بگیرند (۱۲، ۱۳). سویه‌های *EPEC* را می‌توان به دو گروه فیلوژنتیکی تقسیم‌بندی کرد که هر گروه سروتیپ‌های خاصی را شامل می‌شوند. سویه‌های انتروپاتوژنیک تیپیک، به سویه‌هایی گفته می‌شود که دارای دو ژن به نام‌های *eae* و ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی *Bfb*، (*Bundel Forming Pili*) می‌باشد که اغلب شامل سروتیپ‌های O125:H6، O127:H6، O119:H6، O127:H6، O55:H6 است. سویه‌های انتروپاتوژنیک آتیپیک، به سویه‌هایی طلاق می‌شود که دارای ژن *eae* بوده و فاقد ژن *Bfb* باشند، که شامل دیگر سروتیپ‌ها از قبیل O114:H2، O126:H2، O111:H2، O128:H2 می‌باشد (۱۴). مخزن اصلی *tEPEC* تنها انسان بوده و مخزن سویه‌های *aEPEC* علاوه بر انسان، حیوانات مختلفی همچون خرگوش، میمون، گوسفند و سگ می‌باشد که فرضیه مخزن بودن حیوانات برای سویه‌های *EPEC* که در ارتباط با انسان می‌باشد و یا به عنوان مخزن غذایی استفاده می‌شود را تایید می‌کند (۱۷-۱۵). روش‌های مختلفی جهت تشخیص باکتری‌ها وجود دارد، اما روش‌هایی که بر پایه ژنوم و DNA هستند تکنیک‌های بهتری جهت تشخیص می‌باشند. روش مرسوم برای شناسایی و بررسی محصولات PCR استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (*Ethidium bromide*) و درگه‌سازی (*Hybridization*) است که علاوه بر زمان بر بودن، از مواد سمی مانند اتیدیوم بروماید نیز در این روش استفاده می‌شود. هرچند امروزه به جای استفاده از اتیدیوم بروماید از رنگ‌های *safe* استفاده می‌شود، اما با این وجود استفاده از این رنگ‌ها دقت و حساسیت اتیدیوم بروماید را ندارد. روش *PCR-ELISA*

مواد و روش ها

تهیه گونه های باکتری

در این مطالعه تجربی با کد اخلاق ۵۴/۲ در تاریخ ۹۶/۸/۲۳، از آزمایشگاه رفرانس/شرشیاکلی انستیتو پاستور ایران سویه باکتری Enteropathogenic E. coli (EPEC) با شماره استاندارد ATCC 35218 تهیه و تست های بیوشیمیایی مربوط به آن قبلاً انجام، و باکتری به صورت تأیید نهایی، تحویل گرفته شد.

تخلیص DNA ژنومی از باکتری

به منظور دستیابی به DNA ژنومی باکتری، تک کلنی باکتری به ۵ میلی لیتر از محیط مایع LB منتقل شده و به مدت ۱۲-۶ ساعت در ۱۵۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. زمانی که OD محیط کشت مایع حاوی باکتری رشد کرده و از ۰/۷ به حدود ۰/۷ رسید، گرما دهی متوقف شد. ۱/۵ میلی لیتر از کشت فوق به تیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری در پوش دار منتقل شد و به مدت ۵-۲ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول (TE و توین ۲۰ (۱ درصد) با تکان های شدید، طوری که مخلوط یکنواختی حاصل گردد حل شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه درون آب جوش جوشانده شد و بعد از توقف جوشاندن، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر در دمای ۲۰- سانتی گراد قرار گرفت. پس از اتمام زمان تعیین شده از فریزر خارج شد و مخلوط حاصل به مدت ۵-۲ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاصل به آرامی به وسیله سمپلر به تیوب دیگری منتقل شد (۲۳). ژن هدف، آغازگرها و کاوشگر مورد استفاده ژن eae که ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی باکتری /شرشیاکلی انتروپاتوزنیک می باشد به عنوان توالی هدف PCR انتخاب و با استفاده از نرم افزارهای DNAsis و Oligo 5 آغازگرها مورد نظر طراحی و آنالیز گردید.

(PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) جایگزینی مناسب برای موارد یاد شده است زیرا دیگر نیاز به استفاده از رنگ های سرطان زا بر طرف می شود. همچنین سرعت و حساسیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی های اختصاصی ژن بیماری زا فراهم می آورد. استفاده از دیگوکسیژنین (Digoxigenin)، روش تشخیصی مناسب و غیر رادیواکتیوی را برای تشخیص محصولات PCR در قالب پلیت الایزا فراهم می کند. در این روش، آغازگرهای اختصاصی و پروب اختصاصی ناحیه مشخصی از ژن هدف که در ناحیه 5' با بیوتین برچسب گذاری، و به همراه نوکلئوتیدهای digoxigenin-11-dUTP یا DIG-dUTP در واکنش PCR جهت استفاده در سنتز ناحیه مشخصی از ژن هدف به کار رفته است که منجر به ورود این ترکیبات به ساختار محصولات PCR می شود. همچنین آنتی بادی peroxidase Anti-DIG جهت شناسایی نهایی میان کنش بین پروب و محصول PCR با استفاده از روش الایزا استفاده می گردد. محصولات تولید شده در ظرف های پوشیده از استرپتو آویدین (Streptoavidin) ریخته شده که بر اساس تمایل شدید آویدین (Avidin) و بیوتین (Biotin) به سطح ظرف می چسبند. در نهایت قطعه تکثیر یافته حاوی دیگوکسیژنین با کمک آنتی بادی ضد دیگوکسیژنین کونژوگه (Conjugated) با آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) شناسایی می شود. در این مطالعه از ژن eae که ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی باکتری /شرشیاکلی انتروپاتوزنیک می باشد استفاده شد. ژن eae توسط اپرون پلی سیستمونیک ۵ LEE کد شده و محصول این ژن، یک پروتئین اتصالی به نام اینتیمین است که جزء دسته پروتئین های غشاء خارجی (OMP) می باشد (۱۸-۲۲). با توجه به اهمیت بیماری زایی /شرشیاکلی انتروپاتوزنیک و احتمال آلودگی نوزادان و کودکان به این عامل بیماری زا در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به کمک روش PCR-ELISA تشخیص سریع باکتری /شرشیاکلی انتروپاتوزنیک مورد بررسی قرار گرفت.

آغازگر فرادست، CTGAACGGCGATTACGCGAA و آغازگر فرودست، GCCAGACGATACGATCCAGACC در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت که منجر به تکثیر قطعه ۹۹۹ جفت بازی شد. برای تأیید محصول PCR از کاوشگر طراحی شده Biotin- ATGGCTTCGATATCCGTTTTAATG استفاده گردید. این کاوشگر مکمل قسمتی از ژن *eae* بوده و در انتهای 5' دارای نشان بیوتین می باشد. همچنین توالی آن درست در وسط ژن قرار گرفته است، که با استفاده از سرور Primer3 plus طراحی شد. این الیگو نوکلئوتیدها به وسیله شرکت ژن فن آوران ساخته شدند.

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر تهیه شد که شامل ۲ میکرو لیتر DNA الگو (۱۰۰ نانو گرم)، یک میکرو لیتر کلرید منیزیم، (با غلظت نهایی ۵۰ میکرومول/ میلی لیتر)، یک میکرو لیتر dNTP (از هر کدام از بازها با غلظت ۲۵ میلی مولار/ میکرو لیتر)، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR10X، ۰/۵ میکرو لیتر معادل یک یونیت آنزیم Taq DNA Polymerase، یک میکرو لیتر از هر پرایمر (با غلظت اولیه ۱۰ پیکو مول/ میکرو لیتر) و ۱۶ میکرو لیتر آب مقطر دو بار تقطیر (DDW) بوده است. نحوه اجرای هر چرخه PCR شامل، واسرشتگی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (هر یک به مدت ۱ دقیقه) و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بوده است که انجام گرفت. ۵ میکرو لیتر از محصول واکنش PCR درون چاهک های ژل ۱ درصد الکتروفورز شدند. به منظور تعیین اندازه محصول PCR از نشانگر ۱۰۰bp (Fermentas) استفاده شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (BioRad, Hercules) مشاهده شد.

تکنیک PCR-ELISA برای شناسایی محصولات نشاندار شده با دیگوکسیژنین، از کیت شناسایی PCR- DIG Detection استفاده شد. کف چاهک ها با استرپتو آویدین پوشانده، و سپس با PBST سه مرتبه شستشو انجام شد. برای تهیه محلول بلاکینگ (Blocking)، ۳۰ میلی گرم skim milk در یک میلی لیتر PBST حل گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول بلاکینگ اضافه شد. پلیت الایزا به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ °C قرار گرفت. سپس پروب بیوتینه به هر چاهک افزوده شد، قبل از وارد نمودن محصول PCR به جریان واکنش، به وسیله عمل جوشاندن تک رشته ای شد و بعد به چاهک ها اضافه شد. در نهایت Anti-DIG به چاهک ها منتقل گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. سه مرتبه با PBST شستشو صورت پذیرفت و ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترا به هر چاهک افزوده شد. به محض رنگ گرفتن نمونه با استفاده از ۱۰۰ میکرو لیتر اسید سولفوریک ۲ مولار واکنش متوقف گردید. جذب نوری با استفاده از سنجش الایزا (ELISA Reader) (DYNEX Technologies) در ۴۹۲ نانو متر خوانده شد و سپس با استفاده از نتایج نورسنجی میزان سطح حداقل (cut off) تعیین گردید (۲۵،۲۴).

تعیین حساسیت تکنیک PCR-ELISA

برای این منظور، از محصولات PCR ژن *eae* نشاندار پس از تعیین غلظت سریال رقت بر حسب نانو گرم تهیه و یک چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بقیه مراحل همانند بند قبل صورت پذیرفت و توسط دستگاه خواننده الایزا (ELISA reader) اندازه گیری شد.

تعیین میزان اختصاصیت تکنیک PCR-ELISA

برای بررسی اختصاصیت از دیگر باکتری ها از جمله *Vibrio cholera*، *Enterotoxigenic Escherichia coli*، *Acinetobacter*، *Klebsiella pneumonia* و گونه ای از باکتری EPEC به وسیله آغازگرهای طراحی شده PCR بر

روی آن‌ها صورت پذیرفت و سپس مورد آزمون PCR-ELISA قرار گرفتند.

یافته ها

بررسی محصول PCR، با استفاده از ژنوم استخراج شده تکثیر قطعه ۹۹۹ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده انجام گرفت. به منظور تایید محصول PCR، ۵ میکرو لیتر از آن را روی ژل آگارز ۱ درصد برده و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و سائز مارکر از صحت قطعه ۹۹۹ جفت بازی و آغازگرهای طراحی شده اطمینان حاصل گردید (تصویر شماره ۱).

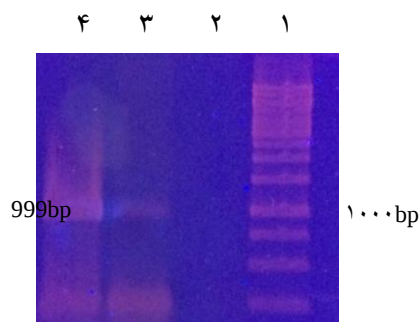
برای تایید محصول PCR DIG-labeled، هر دو PCR معمولی و DIG-labeled بر روی آگارز یک درصد برده شد. قطعه نشاندار شده به علت وزن مولکولی بیشتر، کمی بالاتر از محصول PCR معمولی قرار گرفت (تصویر شماره ۲).

برای بررسی حساسیت آغازگرهای طراحی شده، از ژنوم سریال رقت ۲۰۰ نانو گرم تا ۱۱ پیکو گرم با استفاده از بافر TE تهیه گردید. از رقت های تهیه شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد و طبق دستورالعمل فوق واکنش PCR صورت پذیرفت. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. حداقل DNA ژنومی از باکتری/شرشیاکلی انتروپاتوژنیک مورد استفاده در PCR که باند قابل رویتی روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید ایجاد نمود، ۰/۹ پیکو گرم بوده است (تصویر شماره ۳).

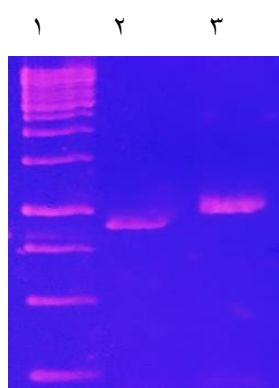
بررسی اختصاصیت آغازگرها

برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد، و بعد محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردید که در نتیجه استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه ۹۹۹ جفت بازی از باکتری/شرشیاکلی انتروپاتوژنیک شد و هیچ بانندی از

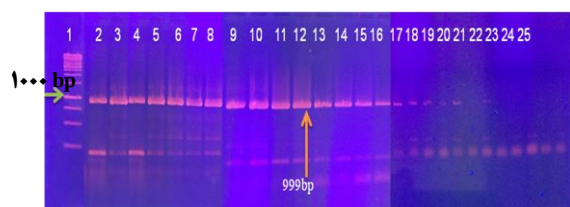
باکتری های خانواده انتروباکتریاسه بر روی ژل آگارز مشاهده نگردید. تصویر شماره ۴ اختصاصیت واکنش PCR جهت شناسایی EPEC را نشان می دهد.



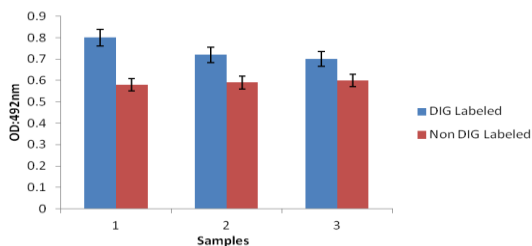
تصویر شماره ۱: تصویر ژل آگارز مربوط به محصول PCR ژن eae، ستون ۱: نشانگر اندازه DNA، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ۳: محصول واکنش PCR ژن eae استخراج شده به روش A، ستون ۴: محصول واکنش PCR ژن eae استخراج شده به روش B.



تصویر شماره ۲: تصویر ژل آگارز مربوط به نشاندار کردن محصول PCR ژنومی EPEC به وسیله DIG-dUTP، ۱: نشانگر اندازه DNA، ۲: محصول PCR نشاندار نشده، ۳: EPEC محصول PCR نشاندار شده EPEC.



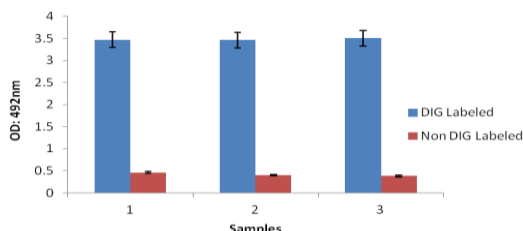
تصویر شماره ۳: تصویر ژل آگارز مربوط به تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومی EPEC، ۱: سائز مارکر ۲ تا ۴، ۲: به ترتیب محصول PCR ۲۰۰ نانو گرم تا ۰/۹ پیکو گرم از DNA ژنومی EPEC



نمودار شماره ۱: آشکار سازی پلید های میکروتیتر حاوی PBS (فاقد آویدین) با استفاده از محصول ژن *eae* به صورت مقایسه ای محصول PCR نشان دار شده و نشان دار نشده

اندازه گیری PCR-ELISA به صورت مقایسه ای در پلید های حاوی آویدین

پس از نشان دار نمودن محصولات PCR، آزمایش انجام و جذب آن در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader قرائت گردید. میزان OD قرائت شده محصول PCR نشان دار شده ژن برابر ۳/۱ بوده که این میزان OD قرائت شده در حد قابل قبولی بوده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: آشکار سازی پلید های میکروتیتر حاوی آویدین با استفاده از محصول ژن *eae* به صورت مقایسه ای محصول PCR نشان دار شده و نشان دار نشده

نتیجه حاصل از آشکار سازی محصول PCR از نمونه مستقیم باکتری به وسیله الیزا

پس از نشان دار نمودن محصولات PCR از نمونه مستقیم باکتری، مطابق آن چه در مواد و روش ها به آن اشاره شد، آزمایش انجام و جذب آن در ۴۹۲ nm توسط دستگاه ELISA Reader قرائت گردید. میزان OD قرائت شده محصول PCR نشان دار شده از نمونه مستقیم باکتری برابر ۳/۴ بوده که این میزان OD قرائت شده در حد قابل قبولی بوده است (نمودار شماره ۳).



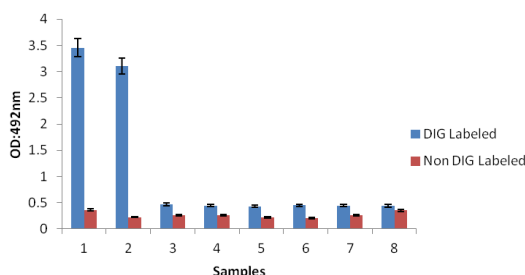
تصویر شماره ۴: اختصاصیت واکنش PCR جهت شناسایی EPEC
۱: سایز مارکر (DNA Ladder)، ۲: کنترل منفی، ۳: کنترل مثبت (گونه ای از EPEC)، ۴: EPEC، ۵: ETEC، ۶: کلبسیلا پونومونیه، ۷: ویبریو کلرا، ۸: اسینتوباکتر

بررسی اندازه گیری PCR-ELISA

در جهت اندازه گیری دقت PCR-ELISA، از هر دو محصول PCR معمولی و DIG-labeled استفاده گردید. همچنین دو نمونه کنترل گذاشته شد که یکی منهای محصول PCR و دیگری منهای Anti-DIG بوده است. به محض رنگ گرفتن کنترل ها، همه نمونه ها متوقف گردید. نمونه های DIG-labeled تقریباً جذب نوری، ۲ برابر بیشتر از نمونه های عادی نشان دادند. میل ترکیبی بالای آنتی بادی ضد دیگوکسیژنین سبب استفاده گسترده این ماده در آزمایشات ایمونولوژی گردیده است. آنتی بادی به راحتی محصول PCR و DIG-labeled را شناسایی کرده در نتیجه سبب افزایش دقت اندازه گیری می شود. اندازه گیری PCR-ELISA به صورت مقایسه ای در پلید های فاقد آویدین (حاوی PBS) پس از نشاندار نمودن محصولات PCR، آزمایش انجام و جذب آن در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader قرائت گردید. میزان OD قرائت شده محصول PCR نشاندار شده ژن برابر ۰/۷ بوده که این میزان OD قرائت شده در حد قابل قبول بوده است. نمودار شماره ۱، آشکار سازی پلید های میکروتیتر حاوی PBS (فاقد آویدین) با استفاده از محصول ژن *eae* را نشان می دهد.

اختصاصیت PCR-ELISA

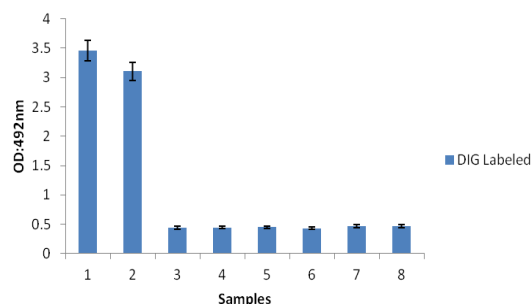
به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده، ژنوم باکتریهای مختلف از جمله، *اشرشیاکلی*، *انتروتوکسیژنیک*، *کلبسیلا پنومونیه*، *استینوباکتر بومانی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروجینوزا*، *ویبریوکلرا*، همچنین همراه با خود *اشرشیاکلی*، *انتروپاتوژنیک* استخراج گردید و مطابق روش ارائه شده صورت پذیرفت، که نتایج ارائه شده در نمودار شماره ۵ نشان دهنده عدم وجود واکنش بوده است. سطح قابل قبول برای تشخیص وجود *اشرشیاکلی* *انتروپاتوژنیک*، از نمونه های کنترل قابل اندازه گیری می باشد. از آنجا که محصولات واکنش PCR ژنوم سایر اعضای این خانواده سطح کمتری را نشان می دهد، می توان از اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده اطمینان حاصل کرد. پس از بررسی اختصاصیت با توجه به نمودار شماره ۵ می توان اطمینان حاصل کرد که توالی ژنی انتخاب شده در سایر اعضای این خانواده تکرار نشده است. نتیجه حاصل از این آزمایش با اطمینان خاطر بیشتری بیان خواهد شد.



نمودار شماره ۵: نتیجه حاصل از قرائت OD محصول PCR ژنوم باکتری های مختلف ۱ و ۲: *انتروپاتوژنیک/اشرشیاکلی*، ۳: *ویبریوکلرا*، ۴: *انتروتوکسیژنیک/اشرشیاکلی*، ۵: *کلبسیلا*، ۶: *استینوباکتر*، ۷: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۸: *سودوموناس آئروژینوزا*

بحث

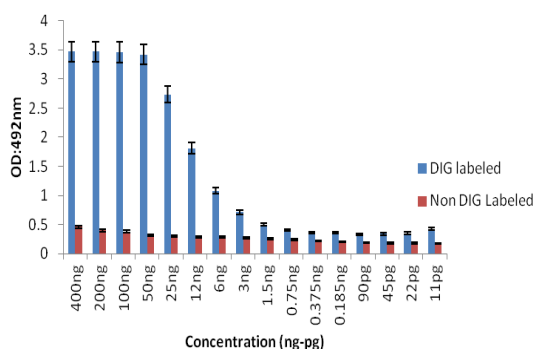
اسهال باکتریایی، جزء مهم ترین علل مرگ و میر در کشور های توسعه یافته می باشد (۲۶). بیماری های اسهالی که توسط پاتوژن های روده ای مختلف ایجاد می گردند، هنوز به عنوان یکی از موارد مشکل ساز برای



نمودار شماره ۳: نتیجه حاصل از آشکارسازی محصول PCR DIG-Labeled از نمونه مستقیم باکتری به وسیله الیزا

حساسیت PCR-ELISA

این آزمایش پایین ترین حد DNA ژنومی و آلودگی را، که می تواند در محیط کشت خالص با PCR-ELISA شناسایی کرد، مشخص می نماید. برای بررسی حساسیت این تکنیک از روش رقیق سازی استفاده شد، برای این منظور محصول PCR نشاندار شده به نسبت ۱/۲ رقیق شد و ۱۶ رقت مختلف از DNA ژنومی تهیه گردید. پس از نشان دار نمودن محصولات PCR حاصل از ژن *eae* آزمایش الیزا انجام گرفت و جذب آن در ۴۹۲ نانو متر توسط دستگاه نورسنجی قرائت گردید. نمودار شماره ۱ بیانگر نتایج به دست آمده از این مرحله می باشد که با کاهش غلظت، میزان OD کاهش یافته به طوری که آلودگی DNA تا ۱۱ پیکو گرم نیز قابل شناسایی بوده است. میزان سنجش در این قسمت از مطالعه با بهره گیری از نمونه های کنترل صورت گرفته است (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از محصول PCR ژن *eae* (سریال رقت از ۴۰۰ نانو گرم تا ۱۱ پیکو گرم)

بهداشت عمومی می‌باشند و سالانه موارد زیادی از بیماری‌ها را در کشورهای مختلف از جمله ایران ایجاد می‌کنند. /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک یکی از ۶ پاتو تایپ اصلی /شرشیاکلی اسهال زا است (۱۳). مشخصات EPEC با ایجاد ضایعات Attaching-Effacement در سلول‌های اپی تلیالی روده مشخص می‌شود. مشخصات تیپیک این ضایعات در سطح سلول و بازآرایی رشته‌های آکتین در سلول‌های اپی تلیال در محل اتصال باکتری به سلول است (۲۶، ۲۷). ژن‌های لازم برای ایجاد ضایعات A/E بر روی لوکوس کروموزومی LEE قرار دارند. یکی از مهم‌ترین این ژن‌ها، ژن *eae* می‌باشد که کدکننده فاکتور اتصالیتی می‌باشد. در مطالعات زیادی ارتباط بین سویه‌های EPEC و ایجاد اسهال گزارش شده است (۲۶، ۲۸، ۲۹). بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی باکتری EPEC، شناسایی باکتری توسط متدهای روتین آزمایشگاه‌ها صورت گرفته، از جمله به کارگیری تست‌های مولکولی PCR Multiplex و RealTime PCR می‌باشد (۳۰، ۳۱). هدف از این مطالعه شناسایی اختصاصی باکتری /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک توسط تکنیک PCR-ELISA می‌باشد. اخیراً تحقیقاتی بر روی سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه از طریق تکنیک PCR-ELISA از جمله کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا، شیگلا، ویبریوکلرا و اشرشیاکلی انتروتوکسینیک انجام گرفته است ولی تاکنون گزارشی، مبنی بر شناسایی /شرشیاکلی انتروپاتوژنیک از طریق این تکنیک اعلام نشده است (۳۲، ۳۳). تحقیقاتی در زمینه تشخیص با استفاده از متد PCR-ELISA انجام گرفته است.

مطالعه Laoboonchai و همکاران که در سال ۲۰۰۱ که برای تشخیص نمونه‌های مالاریا در تایلند انجام پذیرفت (۳۴) و در مطالعات Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵، جهت تشخیص ژن HBx هپاتیت B از روش PCR-ELISA استفاده گردید (۳۵). احمدی در سال ۱۳۸۵، برای تشخیص سریع ویبریوکلرا O1 از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز-الایزا (PCR-ELISA) استفاده کرد (۳۶).

در مطالعه موسوی و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی تشخیص باکتری ویبریوکلرا، از تکنیک PCR-ELISA استفاده شد که نشان دهنده یک پیشرفت قابل توجه نسبت به روش‌های جایگزین وقت گیر برای تشخیص این پاتوژن بوده است. اختصاصیت PCR با استفاده از ۱۰ سویه باکتریایی و ۵۰ نمونه از جنوب ایران تعیین شد و حد تشخیص ۰/۵ پیکو گرم از DNA ژنومی و ۵ سلول باکتریایی بود (۳۷).

اردستانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ بر روی تشخیص باکتری سالمونلاتیفی موریوم از طریق سیستم PCR-ELISA استفاده کردند که این روش در غربالگری وسیع با توجه به حساسیت بالا می‌تواند ضمن تشخیص اختصاصی‌تر، جایگزین خوبی برای PCR باشد (۳۸). در مطالعه‌ی نوروزی و همکاران در سال ۱۳۸۷ از سیستم PCR-ELISA ژن *RE* توکسوپلازما گوندی در مدت ۴ ساعت و با حساسیت بالا مورد شناسایی قرار گرفت و در این مطالعه کارایی PCR-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش عوامل دیگر دخالت ندارند و بر اساس نتایج این مطالعه، از مزیت‌های این روش سریع و حساس و دقیق و ساده بودن آن است، بنابراین می‌توان از این روش تشخیص استفاده کرد (۳۹). در مطالعه اسفندیاری و همکاران، با استفاده از روش PCR-ELISA توکسین LT باکتری /شرشیاکلی انتروتوکسینیک تشخیص داده شد که نتایج خوبی را نشان داد (۴۰).

امینی راد و همکاران در سال ۱۳۹۶ با استفاده از تکنیک PCR-ELISA باکتری /اسیتوباکتر بائومانی را جداسازی و شناسایی کردند (۴۱).

در مطالعه‌ی که شناسایی پاپیلو ویروس با به کارگیری این تکنیک در سال ۲۰۱۱ در ایران انجام گرفت، نشان داده شد PCR-ELISA به تنهایی روشی حساس‌تر و دقیق‌تری در مقایسه با PCR، می‌باشد (۴۲). در مطالعه Nasiri و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز روش PCR-ELISA را در مطالعه خود به کار بردند، آن‌ها روش allotyping را برای تشخیص ۴ گروه از

کار می‌روند، از دیگر محاسن این تکنیک محسوب می‌شوند. این روش نشان داد که حساسیت PCR-ELISA بیش‌تر از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و سنجش PCR است. این روش از Real-time PCR دقیق‌تر و حساس‌تر نیست ولی کم‌هزینه‌تر می‌باشد و جهت کاربردی شدن در آزمایشگاهی تشخیصی مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. از آن‌جا که این روش در مدت زمان کوتاه قابل اجرا می‌باشد، روشی نسبتاً سریع بوده و به راحتی هم استاندارد می‌گردد. در ضمن ریسک آلودگی برای پرسنل آزمایشگاه کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد روش PCR-ELISA یک روش آزمایشگاهی مناسب و قابل اعتماد برای تشخیص EPEC می‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر (کد اخلاق ۵۴/۲ تاریخ ۹۶/۸/۲۳) مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشت بیوتکنولوژی گرایش میکروبی مصوب دانشکده علوم پایه گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق است.

References

1. Rezai MS, Bagheri-nesami M, Hajalibeig A, Ahangarkani F. Multidrug and cross-resistance pattern of ESBL-producing enterobacteriaceae agents of nosocomial infections in intensive care units. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26(144): 39-49 (Persian).
2. Bagheri-Nesami M, Rafiei A, Eslami G, Ahangarkani F, Rezai MS, Nikkhah A, et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamases and integrons among Enterobacteriaceae in device-associated infections: multicenter study in north of Iran. Antimicrob Resist Infect Control 2016; 5(1): 52.
3. Ahanjan M, Naderi F, Solimani A. Prevalence of Beta-lactamases Genes and Antibiotic Resistance Pattern of Klebsiella pneumoniae Isolated from Teaching Hospitals, Sari, Iran, 2014. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149): 79-87 (Persian).
4. Kanarat S. Symptoms, treatments, and health consequences of waterborne zoonotic diseases. Waterborne Zoonoses. 2004: 136.
5. Donnenberg MS. Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Massachusetts: Elsevier, Academic Press; 2002.
6. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book. 8th ed. Edinburgh: Elsevier Health Sciences; 2015.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic escherichia coli. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 142-201.

8. Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhao HS, Morais MB, et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2): 645-648.
9. Unsworth KE, Mazurkiewicz P, Senf F, Zettl M, McNiven M, Way M, et al. Dynamin is required for F actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Microbiol* 2007; 9(2): 438-449.
10. Scaletsky IC, Pedroso MZ, Fagundes-Neto U. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. *Infect Immun* 1996; 64(11): 4876-4881.
11. Donnenberg MS. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Massachusetts: Science Direct, Academic press; 2002.
12. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(6): 545-552.
13. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 297(2): 137-149.
14. Donnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 2001; 107(5): 539-548.
15. Muza-Moons MM, Koutsouris A, Hecht G. Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infect Immun* 2003; 71(12): 7069-7078.
16. Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* 2005; 106(1-2): 87-95.
17. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 365-378.
18. Bertin Y, Boukhors K, Livrelli V, Martin C. Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(1): 61-68.
19. Phillips AD, Girón J, Hicks S, Dougan G, Frankel G. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology* 2000; 146(6): 1333-1344.
20. Rumer L, Jores J, Kirsch P, Cavnagac Y, Zehmke K, Wieler LH. Dissemination of pheU-and pheV-located genomic islands among enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* and their possible role in the horizontal transfer of the locus of enterocyte effacement (LEE). *Int J Med Microbiol* 2003; 292(7-8): 463-475.
21. Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews S. Intimin and the host cell—is it bound to end in Tir (s)? *Trends Microbiol* 2001; 9(5): 214-218.
22. Orden JA, Yuste M, Cid D, Piacesi T, Martinez S, Ruiz-Santa-Quiteria JA, et al. Typing of the eae and espB genes of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from ruminants. *Vet Microbiol* 2003; 96(2): 203-215.
23. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is

- compatible with direct PCR amplification. PCR Methods Appl 1995; 4(6): 368-370.
24. Sails AD, Bolton FJ, Fox AJ, Wareing DR, Greenway DL. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol 2002; 68(3): 1319-1324.
 25. Cabrera L, De Witte J, Victor B, Vermeiren L, Zimic M, Brandt J, et al. Specific detection and identification of African trypanosomes in bovine peripheral blood by means of a PCR-ELISA assay. Vet Parasitol 2009; 164(2-4): 111-117.
 26. Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3703-3711.
 27. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Ch 2005; 49(5): 2137-2139.
 28. Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP, Morais MB. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 2009; 47(11): 3756-3759.
 29. Tayebbeh F, Amani J, Nazarian SH, Moradyar M, Mirhosseini A. Molecular Diagnosis of Clinically Isolated *Klebsiella pneumoniae* Strains by PCR-ELISA. J Appl Biotech Rep 2016; 3(4): 501-505.
 30. Gomes TA, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BE, Vaz TM, et al. Adhesin-encoding genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3334-3337.
 31. Yang JR, Wu FT, Tsai JL, Mu JJ, Lin LF, Chen KL, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3620-3625.
 32. Reid SD, Betting DJ, Whittam TS. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2719-2722.
 33. Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C. Detection of heat stable and heat labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrhoeic faecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction. J Appl Microbiol 2009; 106(2): 455-458.
 34. Laoboonchai A, Kawamoto F, Thanosingha N, Kojima S, Scott Miller RR, Kain KC, et al. PCR based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. Trop Med Int Health 2001; 6(6): 458-462.
 35. Zhan Q, Chen Y, Lin Y, Xiao W. Studies on the detection of HBV DNA from human serum by PCR-ELISA technique. Progr Biotechnol 2001; 21(6): 54-56.
 36. Ahmadi Sh, Sarvari R, Musavi ML, Solaymani J, Karimi Rahjardi A, Nazarian SH, et al. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 by PCR. Medical Kousar 2005; 11(1): 41-50 (Persian).
 37. Mousavi SL, NAZARIAN S, Amani J, Rahgerdi AK. Rapid screening of toxigenic *vibrio cholerae* O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iran Biomed J 2008; 12(1): 15-21 (Persian).

38. Ardestani H, Mudavi Gargary L, Nazaarian Sh, Amani J. Rapid detection of *Salmonella typhimurium* by PCR-ELISA. *Modarres Med J* 2008; 10(1): 51-62 (Persian).
39. Norouzi R, Dalimi A, Forouzandeh M, Ghaffarifar F. Application of PCR-ELISA method based on RE domain for diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected rat (*Rattus norvegicus*). *Pathobiol Res* 2008; 11(1,2): 99-107 (Persian).
40. Esfandiari P, Amani J, Imani Fooladi AA, Forghanifard MM, Mirhossaini SA. Detection of heat-labile toxin in enterotoxigenic *Escherichia coli* using PCR-ELISA technique. *J Gorgan Univ Med Sci* 2015; 17(3): 114-121 (Persian).
41. Amini Rad S, Amani J, Imani Fooladi A, Saeedi P, Moosazadeh Moghadam M. Detection of *Acinetobacter baumannii* by PCR-ELISA method. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2017; 19(2): 6-16 (Persian).
42. Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi KN, Jahanzad E. Detection of human Papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS). *Iranian J Microbiol* 2011; 3(4): 177-182.
43. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Pourfath AA, Rahbarizadeh F. Development of PCR-ELISA technique for determination of HLA DRB1* 01 group alleles. *Iranian J Biotech* 2004; 2(3): 164-169 (Persian).