Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

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

Samira Rami[1],
Jafar Amani[2],
Tayebeh Saleh[3]

[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)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۷۰ اسفند سال ۱۳۹۷ (۵۵-۴۳)

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

سمیرا رامی[۱]
جعفر امانی[۲]
طیبه صالح[۳]

چکیده

سابقه و هدف: *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، یکی از شایع‌ترین علل اسهال مزمن در کودکان و نوزادان می باشد. یکی از روش‌های مرسوم جهت تشخیص گونه‌های مختلف *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد که به دلیل استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید دارای معایبی از قبیل صرف زمان، محدودیت در تشخیص تعداد نمونه‌ها و هم‌چنین سمی بودن اتیدیوم بروماید و ژل آگارز می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تکنیک PCR-ELISA جهت تشخیص باکتری *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کف پلیت الایزا 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 آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین برای شناسایی محصول استفاده شد و واکنش با دستگاه نور سنج اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *eae* *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک تکثیر شد که نتیجه آن یک قطعه به طول bp ۹۹۹ بود. نتایج حاصل از PCR-ELISA نشان داد که این تکنیک هیچ واکنش متقاطعی با باکتری‌های هم خانواده خود ندارد و هم‌چنین میزان حساسیت آن ۱۱ پیکوگرم ارزیابی شد.

استنتاج: تکنیک PCR-ELISA روشی حساس و دقیق بوده که برای شناسایی عوامل بیماری‌زا با استفاده از ژن اختصاصی آن باکتری به کار می رود. این تکنیک می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکنیک‌های قدیمی زمان بر با حساسیت کمتر و هزینه بیش‌تر باشد.

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

مقدمه

یکی از مهم‌ترین سروتیپ‌های *اشرشیاکلی*، سویه‌های انتروپاتوژنیک هستند که از علل اصلی اسهال در کودکان، در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. این سویه‌ها برای اولین بار در طی سال‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۵۰ گزارش شدند. اتصال به سلول‌های جداره روده و تخریب پرزهای روده‌ای از مهم‌ترین ویژگی‌های این

مولف 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

www.SID.ir

Archive of SID

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(۵،۴). *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 تخمین‌زده شده‌است(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(۵،۴). 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 سر گروه‌های EPEC قرار بگیرند(۱۳،۱۲). 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 FormingPili) می‌باشد که اغلب شامل سروتیپ‌های O127:H6، O125:H6، O119:H6 O127:H6، O55:H6 است. سویه‌های انتروپاتوژنیک آتیپیک، به سویه‌هایی طلاق می‌شود که دارای ژن *eae* بوده و فاقد ژن *Bfp* باشند، که شامل دیگر سروتیپ‌ها از قبیل O126:H2، O114: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 رنگ‌آمیزی 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

www.SID.ir

Archive of SID

(PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) جایگزینی مناسب برای موارد یاد شده است زیرا دیگر نیاز به استفاده از رنگ های سرطان زا بر طرف می‌شود. همچنین سرعت و حساسیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری‌زا فراهم می‌آورد. 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 می‌شود. همچنین آنتی‌بادی peroxidase Anti-DIG جهت شناسایی نهایی میان کنش بین پروب و محصول PCR با استفاده از روش الایزا استفاده می‌گردد. محصولات تولید شده در ظرف‌های پوشیده از استرپتو آویدین (Streptoavidin) ریخته شده که بر اساس تمایل شدید آویدین (Avidin) و بیوتین (Biotin) به سطح ظرف می‌چسبند. در نهایت قطعه تکثیر یافته حاوی دیگوکسیژنین با کمک آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین کونژوگه (Conjugated) با آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) شناسایی می‌شود. در این مطالعه از ژن *eae* که ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی باکتری *اشرشیاکلی* انترپاتوژنیک می‌باشد استفاده شد. ژن *eae* توسط اپرون پلی‌سیسترونیک LEE 5 کد شده و محصول این ژن، یک پروتئین اتصالی به نام اینتیمین است که جزء دسته پروتئین‌های غشاء خارجی (OMP) می‌باشد(۲۲-۱۸). با توجه به اهمیت بیماری‌زایی *اشرشیاکلی* انترپاتوژنیک و احتمال آلودگی نوزادان و کودکان به این عامل بیماری‌زا در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به کمک روش PCR-ELISA تشخیص سریع باکتری *اشرشیاکلی* انترپاتوژنیک مورد بررسی قرار گرفت.

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 *اشرشیاکلی* انستیتو پاستور ایران سویه باکتری EnteropathogenicE. *coli* (EPEC) با شماره استاندارد ATCC 35218 تهیه و تست‌های 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 rpm ۱۵۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. زمانی که OD محیط کشت مایع حاوی باکتری رشد کرده و از nm ۶۰۰ به حدود ۰/۷ رسید، گرما دهی متوقف شد. ۱/۵میلی لیتر از کشت فوق به تیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری در پوش دار منتقل شد و به مدت ۵-۲ دقیقه در rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاصل در ۲۰۰ ماکرو لیتر از محلول (TE و توین ۲۰ (۱ درصد) با تکان‌های 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- سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام زمان تعیین شده از فریزر خارج شد و مخلوط حاصل به مدت ۵-۲ دقیقه در rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصل به آرامی به وسیله سمپلر به تیوپ دیگری منتقل شد(۲۳). ژن هدف، آغازگرها و کاوشگر مورد استفاده ژن *eae* که ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی باکتری *اشرشیاکلی* انترپاتوژنیک می باشد به عنوان توالی هدف PCR انتخاب و با استفاده از نرم‌افزارهای DNAsis و Oligo 5آغازگر ها مورد نظر طراحی و آنالیز گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

آغـازگر فرادسـت، CTGAACGGCGATTACGCGAA و آغازگر فرودسـت، GCCAGACGATACGATCCAGACC در واکـنش PCR مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت کـه منجـر بـه تکثیـر قطعـه ۹۹۹ جفـت بـازی شـد. بـرای تأییـد محصـول PCR از کاوشـگر طراحـی شـده Biotin– ATGGCTTCGATATCCGTTTTAATG استفاده گردید. این کاوشگر مکمل قسمتی از ژن *eae* بـوده و در انتهـای '5 دارای نشـان بیـوتین مـی‌باشـد. همچنـین توالی آن درست در وسط ژن قرار گرفتـه اسـت، کـه بـا استفاده از سرور Primer3 plus طراحی شد. ایـن الیگـو نوکلئوتیدها به‌وسیله شرکت ژن فن آوران ساخته شدند.

واکنش PCR

واکنش PCR در حجـم نهـایی ۲۵ میکـرو لیترتهیـه شد که شامل۲ میکرو لیتر DNA الگو (۱۰۰ نـانو گـرم)، یک میکـرو لیتـر کلریـد منیـزیم، (بـا غلظـت نهـایی ۵۰ میکرومول/ میلی‌لیتر)، یـک میکـرو لیتـر dNTP (از هـر کدام از بازها با غلظت ۲۵ میلی‌مولار/ میکرو لیتـر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۰/۵ میکـرو لیتـر معـادل یـک یونیت آنزیم Taq DNA Polymerase، یک میکرو لیتـر از هر پرایمر (با غلظت اولیـه ۱۰ پیکـو مـول/میکرو لیتـر) و ۱۶ میکرو لیتـر آب مقطـر دو بـار تقطیـر (DDW) بـوده است. نحوه اجرای هر چرخـه PCR شـامل، واسرشـتگی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بـه مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (هر یک به مدت ۱ دقیقـه) و نهایتاً تکثیر در دمای ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۵ دقیقه بوده است که انجام گرفـت. ۵ میکرولیتـر از محصـول واکنش PCR درون چاهک‌های ژل ۱ درصـد الکتروفـورز شدند. به منظور تعیین انـدازه محصـول PCR از نشـانگر ۱۰۰bp (Fermentas) استفاده شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (BioRad, Hercules) مشاهده شد.

تکنیک PCR-ELISA برای شناسـایی محصـولات نشـاندار شـده بـا دیگوکسـیژنین، از کیـت شناسـایی PCR- DIG Detection استفاده شد. کف چاهک‌هـا بـا استرپتو آویدین پوشانده، و سـپس بـا PBST سـه مرتبـه شستشـو انجـام شـد. بـرای تهیـه محلـول بلاکینـگ (Blocking)، ۳۰ میلی‌گرم skim milk در یک میلی‌لیتر PBST حل گردید و به هر چاهـک ۱۰۰ میکـرو لیتـر از محلول بلاکینگ اضـافه شـد. پلیـت الایـزا بـه مـدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ °C قرار گرفت. سپس پروب بیوتینه بـه هـر چاهک افزوده شد، قبل از وارد نمودن محصول PCR به جریان واکنش، به وسیله عمل جوشـاندن تـک رشـته‌ای شد و بعد به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایـت Anti-DIG به چاهک‌ها منتقل گردیـد و بـه مـدت یـک سـاعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. سـه مرتبـه بـا PBST شستشـو صورت پذیرفت و ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترا به هر چاهـک افزوده شد. به محض رنگ گـرفتن نمونـه بـا اسـتفاده از ۱۰۰ میکرولیتـر اسـید سـولفوریک ۲ مـولار واکـنش متوقف گردید. جذب نوری با استفاده از سـنجش الایـزا (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* نشـاندار پس از تعیین غلظت سریال رقت بر حسب نانو گـرم تهیـه و یک چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفتـه شـد. بقیـه مراحل همانند بند قبل صـورت پـذیرفت و توسـط دسـتگاه خواننده الایزا (ELISA reader) اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان اختصاصیت تکنیک PCR-ELISA

برای بررسی اختصاصیت از دیگر بـاکتری‌هـا از جملـه *Vibrio cholera*، *Enterotoxigenic Escherichia coli*، *Acinetobacter Klebsiella pneumonia* و گونـه‌ای از باکتری EPEC به وسیله آغازگرهای طراحی شده PCR بـر

www.SID.ir

Archive of SID

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

یافته ها

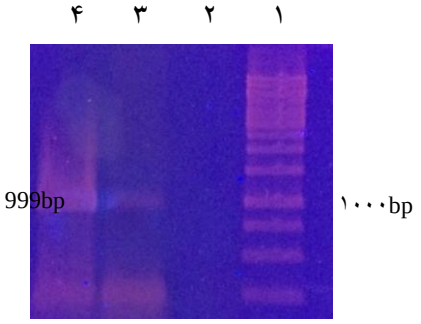
بررسی محصول PCR، با استفاده از ژنوم استخراج شده تکثیر قطعه ۹۹۹ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده انجام گرفت. به منظور تایید محصول PCR، ۵ میکرو لیتر از آن را روی ژل آگارز ۱ درصد برده و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و سایز مارکر از صحت قطعه ۹۹۹ جفت بازی و آغازگرهای طراحی شده اطمینان حاصل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

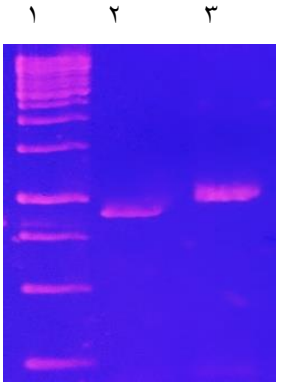
برای بررسی حساسیت آغازگرهای طراحی شده، از ژنوم سریال رقت ۲۰۰ نانو گرم تا ۱۱ پیکو گرم با استفاده از بافر TE تهیه گردید. از رقت های تهیه شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد و طبق دستورالعمل فوق واکنش PCR صورت پذیرفت. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. حداقل DNA ژنومی از باکتری *اشرشیاکلی* 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 آغازگر ها

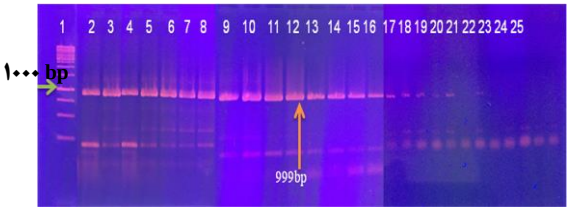
برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد، و بعد محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردید که در نتیجه استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه ۹۹۹ جفت بازی از باکتری *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک شد و هیچ باندی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه برروی 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.



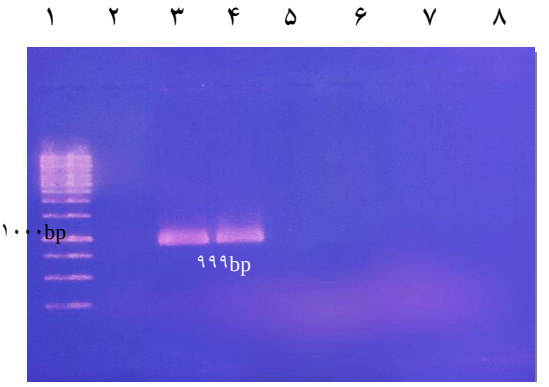
تصویر شماره ۲: تصویر ژل آگارز مربوط به نشاندارکردن محصول PCR ژنومی EPEC به‌وسیله DIG-dUTP، ۱: نشانگر اندازه DNA، ۲: محصول PCR نشاندار نشده، ۳: EPEC محصول PCR نشاندار شده EPEC.



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

www.SID.ir

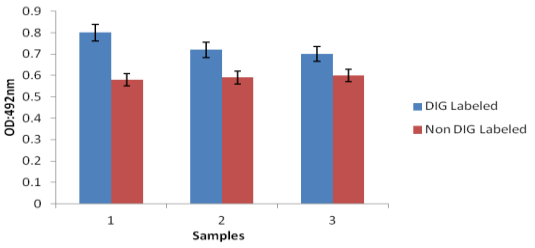
Archive of SID



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 پنومونیه*، ۷: *ویبریو کلرا*، ۸: *استیتوباکتر*

بررسی اندازه گیری PCR-ELISA

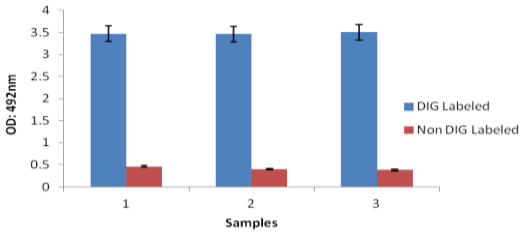
در جهت اندازه‌گیری دقت PCR-ELISA، از هر دو محصول PCR معمولی و DIG-labeled استفاده گردید. همچنین دو نمونه کنترل گذاشته شد که یکی منهای محصول PCR و دیگری منهای Anti-DIG بوده است. به محض رنگ گرفتن کنترل‌ها، همه نمونه‌ها متوقف گردید. نمونه های DIG-labeled تقریباً جذب نوری، ۲ برابر بیشتر از نمونه های عادی نشان دادند. میل ترکیبی بالای آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین سبب استفاده گسترده این ماده در آزمایشات ایمونولوژی گردیده است. آنتی‌بادی به راحتی محصول PCR و DIG-labeled را شناسایی کرده در نتیجه سبب افزایش دقت اندازه‌گیری می‌شود. اندازه گیری PCR-ELISA به صورت مقایسه ای در پلیت های فاقد آویدین (حاوی PBS) پس از نشاندار نمودن محصولات PCR، آزمایش انجام و جذب آن در ۴۹۲ نانو متر 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، آشکارسازی پلیت‌های میکروتیتر حاوی PBS (فاقد آویدین) با استفاده از محصول ژن *eae* را نشان می دهد.



نمودار شماره ۱: آشکار سازی پلیت های میکروتیتر حاوی PBS (فاقد آویدین) با استفاده ازمحصول ژن، *eae* به‌صورت مقایسه‌ای محصول PCR نشان دار شده و نشان دار نشده

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

پس از نشان دار نمودن محصولات PCR، آزمایش انجام و جذب آن در ۴۹۲ نانو متر 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).



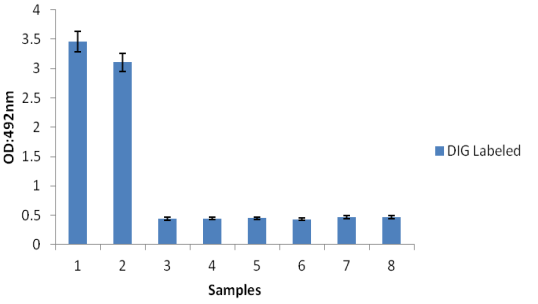
نمودار شماره ۲: آشکار سازی پلیت های میکروتیتر حاوی آویدین با استفاده از محصول ژن *eae* به صورت مقایسه ای محصول PCR نشان دار شده و نشان دار نشده

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).

www.SID.ir

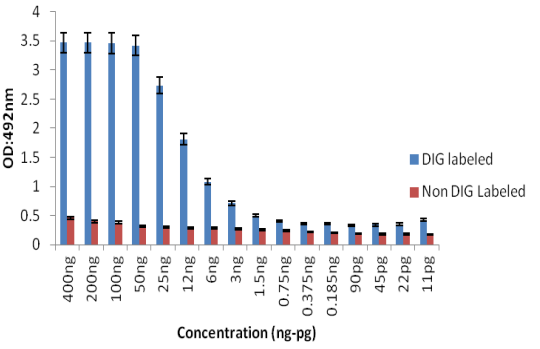
Archive of SID



نمودار شماره۳: نتیجه حاصل ازآشکارسازی محصول PCR DIG-Labeled از نمونه مستقیم باکتری به وسیله الیزا

حساسیت PCR-ELISA

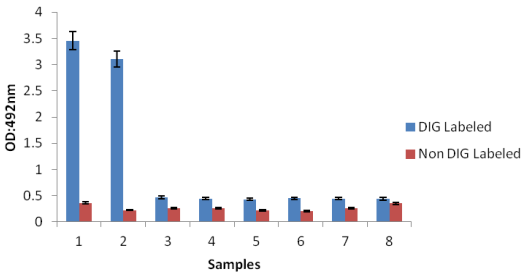
این آزمایش پایین‌ترین حد DNA ژنومی و آلودگی را، که می‌تواند در محیط کشت خالص با PCR-ELISA شناسایی کرد، مشخص می‌نماید. برای بررسی حساسیت این تکنیک از روش رقیق سازی استفاده شد، برای این منظور محصول PCR نشاندار شده به نسبت ۱/۲ رقیق شد و ۱۶رقت مختلف از DNA ژنومی تهیه گردید. پس از نشان دار نمودن محصولات PCR حاصل از ژن *eae* آزمایش الایزا 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 می‌باشد 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 بهره‌گیری از نمونه‌های 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)

اختصاصیت PCR-ELISA

به منظور بررسی اختصاصیت آغازگر های طراحی شده، ژنوم باکتری های مختلف از جمله، *اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، کلبسیلا پنومونیه، استینوباکتر بومانی، استافیلوکووس 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 اندازه‌گیری می‌باشد. از آن‌جا که محصولات واکنش PCR ژنوم سایر اعضای این خانواده سطح کم‌تری را نشان می‌دهد، می‌توان از اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده اطمینان حاصل کرد. پس از بررسی اختصاصیت با توجه به نمودار شماره ۵ می‌توان 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 مختلف۱ و ۲: انتروپاتوژنیک *اشرشیاکلی*، ۳: *ویبریوکلرا*، ۴: انتروتوکسیژنیک *اشرشیاکلی*، ۵: *کلبسیلا*، ۶: *استینوباکتر*، ۷: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۸: *سودوموناس آئروژینوزا*

بحث

اسهال باکتریایی، جزء مهم‌ترین علل مرگ و میر در کشور های توسعه یافته می‌باشد(۲۶). بیماری‌های اسهالی که توسط پاتوژن‌های روده‌ای مختلف ایجاد می‌گردند، هنوز به عنوان یکی از موارد مشکل‌ساز برای

www.SID.ir

Archive of SID

بهداشت عمومی می‌باشند و سالانه موارد زیادی از بیماری‌ها را در کشورهای مختلف از جمله ایران ایجاد می‌کنند. *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک یکی از ۶ پاتو تایپ اصلی *اشرشیاکلی* اسهال زا است(۱۳). مشخصات EPEC با ایجاد ضایعات Attaching-Effacement در سلول‌های اپی‌تلیالی 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(۲۷،۲۶). 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 اتصالی اینتیمین می‌باشد. در مطالعات زیادی ارتباط بین سویه‌های EPEC و ایجاد اسهال گزارش شده است(۲۹،۲۸،۲۶). در 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 می باشد(۳۱،۳۰). هدف از این مطالعه شناسایی اختصاصی باکتری *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک توسط تکنیک PCR-ELISA می‌باشد. اخیرا تحقیقاتی بر روی سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه از طریق تکنیک PCR-ELISA از جمله *کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا، شیگلا، ویبریوکلرا و اشرشیاکلی* انتروتوکسیژنیک انجام گرفته است ولی تاکنون گزارشی، مبنی بر شناسایی *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک از طریق این تکنیک اعلام نشده است(۳۳،۳۲). 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 زنجیره‌ی پلیمراز- الایزا (PCR-ELISA) استفاده کرد(۳۶).

در مطالعه موسوی و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی تشخیص باکتری *ویبریو کلرا*، 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 توکسوپلاسما گوندی* در مدت ۴ ساعت و با حساسیت بالا مورد شناسایی قرارگرفت 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 *اشرشیاکلی* انتروتوکسیژنیک تشخیص داده شد که نتایج خوبی را نشان داد(۴۰).

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

در مطالعه ای 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

www.SID.ir

Archive of SID

آلل‌های HLA DRB1*01 با استفاده از PCR و محلول هیبریداسیون در ظرف‌های میکروتیتر توسعه دادند(۴۳). با توجه به مطالب ذکر شده هدف نهایی این مطالعه، ارائه مسیر سریع و دقیق برای شناسایی *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک می‌باشد. با توجه به شیوع ناگهانی اسهال حاد در کودکان در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، شناسایی آن در مقادیر بسیار ناچیز به منظور جلوگیری شیوع بیش‌تر، بسیار حائز اهمیت می‌باشد(۱۷).

روش PCR-ELISA نسبت به بقیه روش‌های تشخیصی دارای چندین مزیت می‌باشد. از مزیت‌های این روش می‌توان به، بالا رفتن صحت کار به دلیل ترکیب شدن محصول PCR با یک مرحله دورگه‌سازی، امکان بررسی نمونهٔ بیش‌تر به دلیل استفاده از پلیت‌های میکروتیتر و حساسیت و اختصاصیت بیش‌تر آن به‌طوری که حساسیت این روش برای تشخیص ۱۰۰ EPEC برابر بیش‌تر از روش الکتروفورز ژل آگارز می‌باشد، اشاره کرد. عدم نیاز به دستگاه ژل داکت، اتاق تاریک، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌های لکه‌گذاری ساترن و عدم استفاده از مواد گران قیمت که در روش Real-time به 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 کم هزینه‌تر می‌باشد و جهت کاربردی شدن در آزمایشگاهی تشخیصی مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. از آن جا که این روش در مدت زمان کوتاه قابل اجرا می‌باشد، روشی نسبتا 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 رشته 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, Solimanii 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.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Scaletsky IC, Fabbricotti 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. Hernandes 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, Giròn 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, Cavignac 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, Martınez 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

www.SID.ir

Archive of SID

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. Tayebeh F, Amani J,Nazarian SH, Moradyar M, Mirhosseani A. Molecular Diagnosis of Clinically Isolated Klebsiella pneumonia Strains by PCR-ELISA. J Appl Biotech Rep 2016; 3(4): 501-505.
30. Gomes TA, Hernandes 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, Thanoosingha 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).

www.SID.ir

Archive of SID

38. Ardestani H, Mudavi Gargary L,Nazaarian Sh, Amani J . Rapid detedction of Salmonella typhimorium 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 Uuniv 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).

www.SID.ir