تحقیقی

# تشخیص توکسین حساس به حرارت باکتری *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک با استفاده از تکنیک PCR-ELISA

**پانته‌آ اسفندیاری[۱]، دکتر جعفر امانی*[۲]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی[۳]، دکتر محمدمهدی فرقانی[٤]، سیدعلی میرحسینی[٥]**

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ۲- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج). ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج). ٤- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ٥- دانشجوی دکتری توکسین‌های میکروبی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).*

## چکیده

**زمینه و هدف :** *اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایع‌ترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا است. باکتری ETEC در سطح سلول‌های اپی‌تلیالی روده کوچک کلنیزه شده و بعد انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) و یا حساس به حرارت (LT) را ترشح می‌کند که با ورود به سلول‌ها باعث خروج آب و الکترولیت از سلول‌های اپی‌تلیالی روده شده و نهایتاً موجب اسهال می‌گردد. این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک با استفاده از تکنیک PCR-ELISA انجام شد.*

**روش بررسی :** *در این مطالعه توصیفی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و با کمک روش PCR-ELISA تشخیص توکسین LT باکتری ETEC انجام شد. در این روش محصولات نشاندار شده توسط دیگوکسیژنین، به کف ظرف‌های دارای استرپتاویدین متتقل و به کمک آنتی‌بادی ضد دیگوکسی ژنین کونژوگه شناسایی شدند. همچنین از کاوشگر داخلی نشاندار با بیوتین برای تایید محصولات PCR استفاده گردید.*

**یافته‌ها :** *توکسین LT با کمک روش PCR-ELISA شناسایی شد و میزان حساسیت آن ۱/۹ نانوگرم بود. همچنین این روش هیچگونه واکنش متقاطع با باکتری‌هایی از این خانواده نداشت.*

**نتیجه‌گیری :** *روش PCR-ELISA ۱۰۰ برابر حساس‌تر از روش PCR معمولی بوده و به‌دلیل عدم نیاز به ژل آگارز و دستگاه الکتروفورز می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های قدیمی باشد.*

**کلید واژه‌ها :** *اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک ، انتروتوکسین LT ، PCR-ELISA*

* نویسنده مسؤول : دکتر جعفر امانی ، پست الکترونیکی **jafar.amani@gmail.com**

نشانی : تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، بعد از خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی

صندوق پستی ۵۴۸۷-۱۹۳۹۵، تلفن ۸۲۴۸۲۵۴۹-۰۲۱ ، نمابر ۸۲۴۸۲۵۴۹

**وصول مقاله : ۱۳۹۳/۳/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۳/۶/۱۵ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۳/۷/۷**

Archive of SID

## مقدمه

با وجود پیشرفت‌های عمده بهداشتی در قرن حاضر هنوز هم عفونت‌های اسهالی از نگرانی‌های بزرگ مجامع در سراسر جهان محسوب می‌شوند. به‌طوری که بیماری‌های حاصل از ابتلاء به این عفونت‌ها سالانه سبب مرگ و میر تقریباً ۳ میلیون نفر در سراسر جهان می‌شود (۱). در این بین باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) شایع‌ترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا است (۲). ETEC مهم‌ترین عامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال جهانگردانی است که به مناطق گرمسیری و اندمیک مسافرت می‌کنند (۳و۴) و نیز عامل مرگ و میر ناشی از اسهال در میان کودکان زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه است. اسهال مسافران اغلب نیازی به درمان آنتی‌بیوتیکی ندارد و فقط باید اتلاف آب و الکترولیت جبران گردد و کمتر از یک هفته بهبود می‌یابند. باکتری ETEC از طریق آب و غذای آلوده وارد بدن انسان می‌شود. عوامل ویرولانس اختصاصی مانند انتروتوکسین‌ها و عوامل کلنیزاسیون، ETEC را از سایر گروه‌های *اشریشیاکلی* ایجاد کننده اسهال متمایز می‌سازد. روش شناسایی ETEC بر مبنای انتروتوکسین مقاوم به حرارت (Heat-Stable Toxin: ST) و یا حساس به حرارت (Heat-Labile Toxin: LT) استوار است. تشخیص LT در یک



www.SID.ir

سویه باکتری دلیل ETEC بودن آن است. باکتری ETEC در سطح سلول‌های اپی‌تلیالی روده کوچک کلنیزه شده و بعد انتروتوکسین مقاوم یا حساس به حرارت را ترشح می‌کند (۵و۶) که با ورود به سلول‌ها باعث خروج آب و الکترولیت از سلول‌های اپی‌تلیالی روده شده و نهایتاً موجب اسهال می‌گردد. انتروتوکسین LT با وزن ملکولی تقریبی ۸۶ کیلودالتون از نظر ساختاری و عملکردی مشابه توکسین ویبریو کلرا (CT) است (۵و۷) و از یک زیرواحد A به وزن ملکولی ۲۸ کیلودالتون و پنج زیرواحد B به وزن ملکولی ۵۷ کیلو دالتون (هر زیر واحد ۱۱/۵ کیلودالتون) تشکیل شده است (۲و۷). هرکدام از این زیر واحدها به عنوان یک پلی‌پپتید پیش‌ساز سنتز می‌شوند. زیر واحد A دارای فعالیت توکسیک و زیر واحد B مسؤول اتصال توکسین به گیرنده GMI موجود در سطح انتروسیت‌های روده است. در اتصال توکسین ۵ زیرواحد B به ۵ گیرنده GML متصل می‌شوند (۸). سپس کمپلکس GML-LT به درون سلول اندوسیتوز گشته و زیرواحد A با اثر سمی منجر به ترشح آب و الکترولیت و مهار جذب یون‌های نمک از سلول‌های رأس ویلی گشته و باعث اسهال می‌شود (۹و۱۰). در سال‌های اخیر از روش‌های مختلف PCR برای تشخیص سویه‌های مختلف ETEC استفاده شده است (۵). روش مرسوم برای شناسایی و بررسی محصولات PCR، استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و دورگه‌سازی (Hybridization) است. همه این روش‌ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان، محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیص و همچنین مواد سمی همچون اتیدیدم برماید و ژل آگارز هستند. روش PCR-ELISA جایگزینی مناسب برای موارد یاد شده است. زیرا سرعت و حساسیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری فراهم می‌آورد. استفاده از دیگوکسی‌ژنین (DIG) یک روش تشخیص مناسب و غیررادیواکتیوی برای تشخیص محصولات PCR فراهم کرده است. در این روش محصولات نشاندار شده توسط دیگوکسی‌ژنین را به کمک آنتی‌بادی ضد دیگوکسی‌ژنین کونژوگه (Anti DIG) با آنزیم پراکسیداز شناسایی می‌کند. این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT باکتری *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک با استفاده از تکنیک PCR-ELISA انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی سویه باکتری ETEC مولدLT بدون کدبین‌المللی از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهران تهیه و تست‌های بیوشیمیایی تاییدی مربوط به ETEC انجام شد. همچنین سویه موردنظر از لحاظ تولید توکسین ارزیابی گردید.

**استخراج DNA:** برای تهیه DNA ژنومی باکتری از روش CTAB–NaCl استفاده شد. ابتدا کلنی‌های باکتری در محیط اختصاصی کشت داده شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از سلول‌های باکتریای کشت داده شده در محیط کشت LB مایع را برداشته و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نمودیم. رسوب سلولی حاصل را در بافر TE (Tris-EDTA) حل کرده و به آن ۳۰ میکرولیتر SDS ۱۰درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. سپس به آن ۱۰۰ میکرولیتر 5MNaCl و ۸۰ میکرولیتر CTAB-NaCl اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. هم حجم مخلوط به آن ایزو آمیل الکل-کلروفرم اضافه و آن را با دور ۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی را برداشته و هم حجم فاز رویی به آن فنل و مخلوط ایزو آمیل الکل به همراه کلروفرم اضافه کردیم و ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ شد و به فاز رویی ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و ۱۲ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و به رسوب آن ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰درصد اضافه شد. سپس ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و فاز رویی را دور ریخته و رسوب آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گذاشتیم تا کاملاً خشک شد. سپس رسوب را در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل و برای حذف RNA احتمالی ۵ میکرولیتر RNase A به آن اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم.

**واکنش PCR:** پس از مطالعات انجام گرفته بر روی ژنوم باکتری و با توجه به این که عامل اصلی ایجاد بیماری سم باکتری (LT) است؛ در مرحله اول کار بر روی ژن این توکسین برای شناسایی متمرکز گردید. به همین دلیل ژن زیر واحدA که بخش کاتالتیک است؛ جداسازی و از روی آن اقدام به طراحی یک جفت پرایمر برای تکثیر قطعه ژن *ltA* کردیم. برای تکثیر قطعه ژنی، نیاز به تهیه یک جفت پرایمر مناسب برای هر ژن بود. سپس پرایمرهای طراحی شده توسط نرم‌افزارهای کامپیوتری DNASIS ، BLAST و Oligo آنالیز و پس از حصول اطمینان از مطلوب بودن آنها سفارش ساخت به شرکت سینا کلون داده شد (جدول یک). این پرایمرها از نقطه نظر Tm ، ΔG ، تشکیل لوپ و پرایمر دایمر بررسی شدند. واکنش PCR برای تکثیر ژن *lt* در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر ۰/۵ یونیت از آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناکلون)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، غلظت یک میلی‌مولار MgCl2 و غلظت‌های متفاوت از DNA ژنومی بود. هر چرخه PCR شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه،



www.SID.ir

جدول ۱ : پرایمرها و پروب طراحی شده از ژن lt

| تعداد نوکلئوتید | توالی نوکلئوتید | |
|---|---|---|
| ۲۱ باز | ATGCCCAGAGGGCATAATGAG | EsLAF: |
| ۲۴باز | GATATATTGTGCTCAGATTCTGGG | EsLAR: |
| ۱۹باز | Biotin-GTTTCTGCGT TAGGTGGAA | EsLAP: |

جدول ۲ : نحوه اجرای واکنش PCR برای تکثیر ژن lt

| مرحله | | درجه حرارت (سانتی‌گراد) | زمان | تعداد سیکل |
|---|---|---|---|---|
| مرحله اول | دناتوره شدن اولیه | ۹۵ | ۵ دقیقه | ۱ |
| مرحله دوم (دناتوره شدن) | ثانویه | ۹۵ | ۱ دقیقه | ۳۳ |
| | اتصال | ۶۳ | ۴۵ ثانیه | |
| | تکثیر | ۷۲ | ۱ دقیقه | |
| مرحله سوم | تکثیر نهایی | ۷۲ | ۵ دقیقه | ۱ |

واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) در ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. همچنین واکنش PCR در ۳۵ سیکل انجام شد (جدول ۲). برای مشاهده محصول، ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR درون چاهک‌های ژل آگاروز یک درصد تهیه شده از بافر TBE، الکتروفورز شد. برای تعیین اندازه محصول از نشانگر 100 bp plus ladder ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. سپس ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تصویر ژل با استفاده از دستگاه Gel document تهیه گردید. برای تایید ژن تکثیر یافته (*ltA*) و شناسایی محصول PCR همانند طراحی پرایمر بعد از به‌دست آوردن سکانس ژنی *ltA* از بانک ژنی اقدام به طراحی پروب نمودیم. پروب موردنظر قسمت میانی ژن *ltA* است. این پروب با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo و Primer 3 – BLAST DNASIS که به‌منظور بررسی برخی ویژگی پروب مانند دمای Tm، درصد GC، احتمال تشکیل لوپ انجام شد. بدین ترتیب که در پروب مورد بررسی اختلاف زیادی در دمای Tm مشاهده نشد. درصد GC پروب در حد طبیعی بود. تشکیل لوپ نیز با $\Delta G$ پایین و در اکثر موارد نزدیک صفر مشاهده شد که در اتصال پروب تداخلی ایجاد نمی کرد. پس از تایید نهایی بازهای موجود در انتهای ′۵ پروب با بیوتین نشاندار شد و به نام اختصاری EsLAP نامگذاری گردید. سپس برای ساخت به شرکت سینا کلون سفارش داده شد.

**PCR-ELISA :** ابتدا ۵ میکرولیتر استرپتاویدین با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک A، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین با ۹۰ میکرولیتر بافر پوششی (Coating Buffer) در چاهک B، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR عادی (غیر نشاندار) با ۹۰ میکرولیتر بافر پوششی در چاهک C و D، ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوششی (Ag –) در چاهک 5E میکرولیتر محصول PCR عادی با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی ریخته شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس چاهک‌ها را سه مرتبه با بافر PBST (فسفات سالین حاوی ۰/۰۵درصد توین) شستشو دادیم. مرحله بعد به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر Blacking Buffer اضافه کردیم و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. چاهک‌ها را همانند مرحله قبلی شستشو دادیم. همزمان با این مرحله ۲۰ میکرولیتر محصول PCR نشاندار شده با DIG را در ۸۰ میکرولیتر بافر دورگه‌سازی (SSC) ریخته و به مدت ۵ دقیقه جوشاندیم و به آن یک پیکومول پروب نشاندار که انتهای ۵ آن بیوتینیله شده اضافه و به مدت یک ساعت در ۵۵ درجه سانتی گراد قرار دادیم. سپس این مخلوط را روی چاهک A ریخته، یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد از ۳ بار شستشو با بافر PBST مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد دیگوکسی ژنین نشاندار با پراکسیداز با رقت ۱/۱۰۰۰ به هر کدام از چاهک‌ها اضافه کردیم. سپس یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد پس از شستشوی مجدد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (۵ میلی گرم OPD در ۴ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات با pH مساوی ۵ ، به‌همراه ۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰درصد) به هر چاهک اضافه کردیم و چند دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری نمودیم. برای توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار استفاده شد. سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه ELISA Reader در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد (۱۱).

**تعیین حساسیت روش PCR-ELISA :** برای تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی ETEC که توانست توسط این روش شناسایی گردد؛ سریال رقت از DNA ژنومی تهیه و برای تعیین حساسیت با استفاده از روش PCR-ELISA ارزیابی صورت گرفت. همچنین برای تایید محصول PCR ژن *lt* باکتری ETEC روش دورگه‌سازی به‌کار رفت. نتایج نشان داد DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن *lt* باکتری



Archive of SID
www.SID.ir

ETEC بود.

**تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA :** برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از گونه‌های *E.coli* غیرانتروتوکسیژنیک و همچنین گونه‌های غیر *E.coli* استفاده شد که در نتیجه هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نگردید. همچنین در روش PCR-ELISA میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های باکتری ETEC بیش از حد مقادیر کنترل‌های واکنش بود. در حالی که جذب نوری باکتری‌های دیگر پایین‌تر از مقادیر کنترل بود.

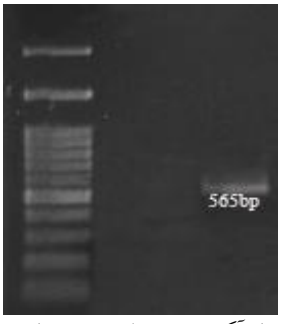
## یافته‌ها

ژن *lt* به عنوان یک هدف برای تشخیص باکتری ETEC انتخاب شد. شرایط مختلفی برای بهینه‌سازی واکنش PCR مورد آزمون قرار گرفتند که شامل دماهای مختلف اتصال آغازگرها (۵۷تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد)، غلظت‌های مختلف MgCl2، میزان dNTPs و غلظت‌های متفاوتی از آغازگرها بود. آزمایشات ما بهترین دمای اتصال را ۶۳ درجه سانتی‌گراد نشان داد که منجر به تکثیر قطعه ۵۶۵bp ژن موردنظر گردید. با کاهش دمای اتصال به تدریج باندهای حاصل از واکنش نیز ضعیف شدند. به‌علاوه باندهای ضعیف غیراختصاصی نیز ظاهر شد که این امر بیانگر اتصال غیراختصاصی پرایمرها در دمای پایین به نقاط دیگری از ژنوم بود. بالای ۶۳ درجه سانتی‌گراد نیز هیچ باندی ظاهر نشد. لذا برای ادامه کار دمای اتصال ۶۳ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. قطعه مذکور بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و با دستگاه ژل داکیومنت مشاهده شد (شکل یک) و غلظت آن با استفاده از نانودراپ تعیین گردید. همچنین به منظور تایید قطعات حاصل از واکنش PCR تعیین توالی قطعات تکثیر شده و مقایسه نتایج حاصل از آن با توالی قطعاتی که از بانک ژنوم استخراج شده بود؛ پس از بررسی محصولات بر روی ژل آگارز یک درصد، محصولات PCR ژن *lt* برای sequencing به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد و مورد تایید قرار گرفت.

در روش الایزا برای دستیابی به بهترین نتایج، مدت زمان انکوباسیون دورگه‌سازی محصول نشاندار شده، رقت آنتی‌بادی ضددیگوکسی ژنین و میزان توبین مورد استفاده، ارزیابی شد. همچنین در واکنش PCR-ELISA برای تایید ژن *lt* پروب اختصاصی استفاده گردید. نتایج نشان داد حداقل DNA ژنومی تکثیر یافته ۱/۹ نانوگرم است که توسط PCR-ELISA ژن *lt* شناسایی گردید.

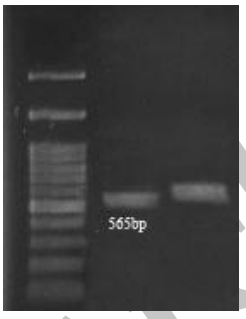
**تعیین حساسیت روش PCR-ELISA :** برای تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی ETEC که توانست توسط این روش شناسایی گردد؛ سریال رقت از DNA ژنومی تهیه و برای تعیین حساسیت با استفاده از روش PCR-ELISA ارزیابی صورت گرفت. برای تایید محصول PCR ژن *lt* باکتری ETEC روش دورگه‌سازی به‌کار برده شد و نتایج نشان داد که DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن *lt* باکتری ETEC است. پس از انجام واکنش PCR از روی DNA ژنومیک رقیق شده باکتری ETEC ، محصولات PCR توسط ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. نتیجه حاصل از الکتروفورز مطابق شکل ۳-الف بررسی شد. سپس نتایج محصول PCR با الیزا بررسی گردید. این آزمایش سه بار تکرار شد و نتیجه آن در شکل ۳-ب آمده است.

۱ ۲



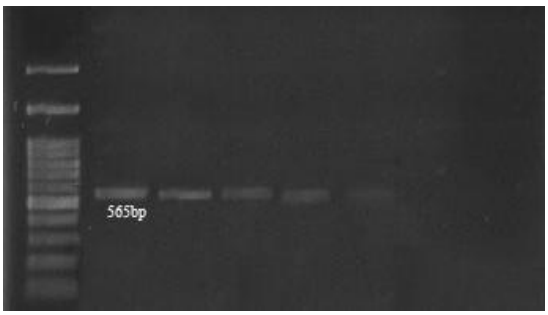

***شکل ۱ : ژل آگاروز مربوط به محصول PCR ژن lt***
***ستون ۱: نشانگر اندازه 100bp plus DNA***
***ستون ۲: محصول واکنش PCR ژن lt***

۱ ۲ ۳




***شکل ۲ : ژل آگاروز مربوط به محصولات PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین. ستون ۱: نشانگر 100bp plus DNA، ستون ۲ : محصول واکنش PCR ژن lt، ستون ۳ : محصول واکنش PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین***

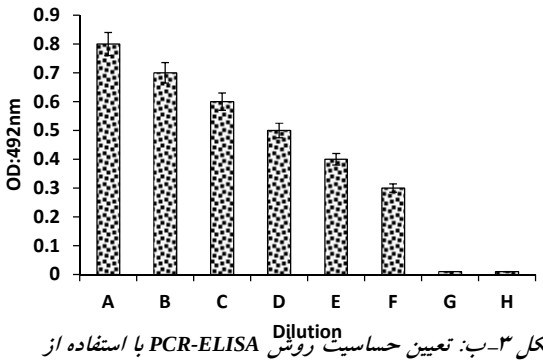
۱ ۲ ۳ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨



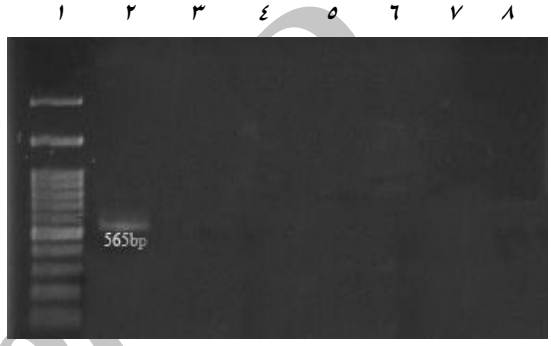

***شکل ۳- الف: تصویر ژل آگارز مربوط به تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومی ETEC***
***ستون ۱ : اندازه مارکر 100bp plus DNA ، ستون ۲ تا ۸ : به ترتیب محصول PCR ۶۰ نانوگرم تا ۱/۹ نانوگرم از DNA ژنومی***



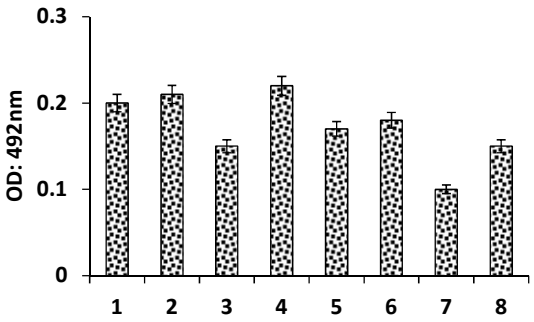
www.SID.ir
Archive of SID




*شکل ۳-ب: تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از محصول PCR ژن lt*
*A-H) سریال رقت از ۶۰ng تا ۱/۹ ng*




*شکل ٤-الف : ژل آگارز مربوط به تعیین اختصاصیت روش PCR با استفاده از باکتری‌های مختلف*
*۱) اندازه مارکر 100bp plus DNA، ۲) محصول PCR نشاندار نشده ژن lt ، ۳) محصول PCR حاصل از شیگلا دیسانتریه، ٤) محصول PCR حاصل از کلبسیلا، ٥) محصول PCR حاصل از ویبریوکلرا، ٦) محصول PCR حاصل از سودوموناس آئروجینوزا، ۷) محصول PCR حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس، ۸) محصول PCR حاصل از سالمونلا پاراتیفی*




*شکل ٤-ب: تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA با استفاده از باکتری‌های مختلف*
*۱) شیگلا دیسانتریه، ۲) کلبسیلا، ۳) ویبریوکلرا، ٤) سودوموناس آئروجینوزا، ٥) استافیلوکوکوس اورئوس، ٦) سالمونلا پاراتیفی، ۷و۸) کنترل (Ag- و Ab-)*

**تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA :** برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده مقدار ثابتی از نمونه DNA ژنومی خالص‌سازی شده از باکتری‌های ETEC، ویبریوکلرا، سالمونلا پاراتیفی، شیگلا دیسانتریه، سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا و به عنوان الگو برداشته و برنامه PCR با پروتکل‌های قبلی و در ۳۵ سیکل انجام شد. پس از انجام واکنش و الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل آگارز یک درصد، نتیجه مطابق شکل ۴-الف نشان داده شد. همچنین در روش PCR-ELISA میزان جذب نوری حاصل از نمونه‌های باکتری‌های مختلف پایین‌تر از مقادیر کنترل بود (شکل ۴-ب).

## بحث

روش‌های متداول میکروبیولوژی که برای شناسایی باکتری ETEC به‌کار برده می‌شوند شامل روش‌های کلاسیک کشت، سرولوژی و نیز روش‌های ملکولی از جمله PCR است (۱۲). روش PCR با وجود متداول بودن، معایبی از جمله استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با مواد سمی همچون اتیدیوم بروماید برای آشکارسازی محصولات تکثیر شده دارد. علاوه بر این همه این روش‌ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیص هستند. در این تحقیق روش PCR-ELISA برای شناسایی باکتری ETEC به کار گرفته شد. PCR-ELISA بسیاری از معایب و محدودیت‌های موجود در روش‌های دیگر از جمله PCR را بر طرف ساخته است. زیرا سرعت و اختصاصیت قابل قبولی را در تشخیص مقادیر اندک توالی‌های اختصاصی ژن بیماری فراهم می‌آورد. همچنین از ویژگی‌های بارز این روش تشخیصی امکان آنالیز همزمان تعداد زیادی نمونه‌ها با استفاده از میکروظرف‌های ۹۶ خانه است.

در مطالعه Lang و همکاران از روش Multiplex PCR برای تشخیص توکسین LT باکتری ETEC و توکسین شیگلا استفاده شد (۱۳). O'Meara و همکاران در ایرلند تکنیک رنگ‌سنجی همراه با PCR را برای تشخیص توکسین LT باکتری ETEC به‌کار بردند (۱۴). این تحقیقات بر روی نمونه‌های انسانی انجام گرفت. همچنین آزمایشاتی روی نمونه‌های گوساله برای شناسایی این باکتری صورت گرفته است. Blanco و همکاران (۱۵) و Rajkhowa و همکاران (۱۶) با استفاده از روش PCR پرایمرهای تخصصی طراحی شده برای ژن *lt* توانستند توکسین LT باکتری ETEC را در گوساله‌های مبتلا به اسهال پیدا کنند.

تحقیقاتی در مورد خانواده انتروباکتریاسه از جمله سالمونلا، شیگلا و ویبریوکلرا به روش PCR-ELISA صورت گرفته است (۱۹-۱۱)؛ اما تاکنون گزارشی از شناسایی ETEC به روش PCR-ELISA ارایه نشده و به‌نظر می‌رسد که چنین پژوهشی برای اولین بار انجام شده است.

تحقیقاتی در زمینه تشخیص با استفاده از متد PCR-ELISA انجام شده است. Jones و همکاران برای تشخیص زودهنگام عفونت

Archive of SID


www.SID.ir

تهـاجمی آسـپرژیلوس ریـوی در بیمـاران نـوتروپنی از تکنیـک PCR-ELISA استفاده کردنـد (۲۰). Machado و همکـاران (۲۱) و Laoboonchai و همکاران (۲۲) برای تشخیص نمونه‌های مالاریا در تایلنـد از روش PCR-ELISA اسـتفاده کردنـد. Zhan و همکـاران مطالعه‌ای در تشخیص DNA هپاتیت B از سرم انسـانی بـا اسـتفاده از روش PCR-ELISA انجام دادنـد (۲۳). همچنـین Zhan روی DNA آدنوویروس به روش PCR-ELISA مطالعه دیگری انجام داده است (۲۴). در مطالعه Beifuss و همکاران تشخیص مستقیم از پـنج گونـه درماتوفیت شایع در نمونه‌هـای بـالینی طـی ۲۴ سـاعت بـا اسـتفاده از روش PCR-ELISA انجـام شـد (۲۵). Kim و همکـاران حضـور DNA مایکوپلاسـما در بافـت سـرطان تخمـدان را توسـط تکنیـک PCR-ELISA تشخیص دادنـد (۲۶). نصـیری و همکـاران نیـز روش PCR-ELISA را در مطالعـه خـود بـه‌کـار بردنـد. آنهـا روش allotyping را بـرای تشـخیص چهـار گـروه از آلـل‌هـای HLA DRB1*01 بـا اسـتفاده از PCR و محلـول هیبریداسـیون در ظرف‌های میکروتیتر توسعه دادند (۲۷).

## نتیجه‌گیری

از این تکنیک می‌تـوان ایـن‌طـور نتیجـه‌گیـری نمـود کـه روش PCR-ELISA نسـبت بـه بقیـه روش‌هـای تشخیصـی دارای چنـدین مزیت است. اول این که به‌دلیل ترکیب شدن محصول PCR با یـک مرحله دورگه‌سازی صحت کار بالا برده شده و دوم این که بـه‌دلیـل استفاده از پلیت‌های میکروتیتر امکان بررسـی نمونـه بیشـتری وجـود دارد. سوم این که حساسیت و اختصاصیت آن بیشتر است. به‌طـوری که حساسیت ایـن روش بـرای تشـخیص ETEC ۱۰۰ برابـر بیشـتر از روش الکتروفورز ژل آگارز است. عدم نیاز بـه دسـتگاه ژل داکـت، اتاق تاریک، امکان آلودگی کم نسـبت بـه روش‌هـای لکـه‌گـذاری ساترن و عدم استفاده از مواد گـران قیمـت کـه در روش Real-time به‌کار می‌روند؛ از دیگر محاسـن ایـن تکنیـک محسـوب مـی‌شـوند. همچنین این روش نشـان داد کـه حساسـیت PCR-ELISA بیشـتر از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و سنجش PCR است. از آنجا که این روش در مدت زمان کوتاه قابل اجرا است؛ لـذا روشـی نسـبتاً سـریع بوده و به راحتی استاندارد می‌گردد. همچنـین خطـر آلـودگی بـرای کارکنـان آزمایشـگاه کـاهش مـی‌یابـد. بـه‌نظـر مـی‌رسـد روش PCR-ELISA یک روش آزمایشگاهی مناسب و قابل اعتمـاد بـرای تشخیص ETEC است.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصـوب (شـماره ۱۱۵۸) مرکـز تحقیقـات میکروبیولـوژی کـاربردی دانشـگاه علـوم پزشـکی بقیه الله (عج) بود و با حمایت مالی آن مرکز به انجام رسید.

## References

1. Wennerås C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr. 2004 Dec;22(4):370-82.

2. Nicklasson M, Sjöling A, Lebens M, Tobias J, Janzon A, Brive L, et al. Mutations in the periplasmic chaperone leading to loss of surface expression of the colonization factor CS6 in enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) clinical isolates. Microb Pathog. 2008 Mar;44(3):246-54.

3. Steffen R, deBernardis C, Baños A. Travel epidemiology--a global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2003 Feb; 21(2): 89-95.

4. Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Traveling with infants and young children. Part III: travelers' diarrhea. J Travel Med. 2002 May-Jun; 9(3):141-50.

5. Menezes CA, Imamura SY, Trabulsi LR, Fernandes-Filho A, Martinez MB, Guth BE, et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic Escherichia coli. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Dec; 101(8):875-80.

6. Millar DG, Hirst TR. Cholera toxin and Escherichia coli enterotoxin B-subunits inhibit macrophage-mediated antigen processing and presentation: evidence for antigen persistence in non-acidic recycling endosomal compartments. Cell Microbiol. 2001 May; 3(5):311-29.

7. Dallas WS, Falkow S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin. Nature. 1980 Dec; 288(5790): 499-501.

8. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul; 18(3):465-83.

9. Hofstra H, Witholt B. Heat-labile enterotoxin in Escherichia coli. Kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin. J Biol Chem. 1985 Dec; 260(29):16037-44.

10. Pronk SE, Hofstra H, Groendijk H, Kingma J, Swarte MB, Dorner F, et al. Heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. Characterization of different crystal forms. J Biol Chem. 1985 Nov; 260(25):13580-4.

11. Ardestani H, Mousavi Gargari SL, Nazarian S, Amani J. [Rapid and Specific Detection of Salmonella typhimurium by PCR-ELISA]. Modares J Med Sci Pathol. 2007; 10(1): 51-62. [Article in Persian]

12. Tornieporth NG, John J, Salgado K, de Jesus P, Latham E, Melo M, et al. Differentiation of pathogenic Escherichia coli strains in Brazilian children by PCR. J Clin Microbiol. 1995 May; 33(5): 1371-4.

13. Lang AL, Tsai Y-L, Mayer CL, Patton KC, Palmer CJ. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and shiga-like toxin I and II genes in Escherichia coli isolated from natural waters. Appl Environ Microb. 1994; 60(9):3145-9.

14. O'Meara D, O'Shaughnessy E, Cryan B, Fanning S. Colorimetric detection of heat-labile toxin-encoding gene of enterotoxigenic Escherichia coli by PCR. J Clin Microbiol. 1995 Jul; 33(7): 1957-60.

15. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, et al. Prevalence and characteristics of Escherichia coli serotype O157:H7 and other verotoxin-producing E. coli in healthy cattle. Epidemiol Infect. 1996 Oct; 117(2):251-7.

Archive of SID



www.SID.ir

16. 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 Feb;106(2):455-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04013.x

17. Manzano M, Cocolin L, Astori G, Pipan C, Botta GA, Cantoni C, et al. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of Salmonella serovars in food. Mol Cell Probes. 1998 Aug;12(4):227-34.

18. Luk JM, Kongmuang U, Tsang RS, Lindberg AA. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. J Clin Microbiol. 1997 Mar; 35(3): 714-18.

19. 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 Jan;12(1):15-21.

20. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgenstern GR, et al. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. J Clin Pathol. 1998 Sep;51(9):652-6.

21. Machado RL, Garret DO, Adagu IS, Warhurst DC, Póvoa MM. Simplified diagnosis of malaria infection: GFM/PCR/ELISA a simplified nucleic acid amplification technique by PCR/ELISA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998 Sep-Oct;40(5):333-4.

22. 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 Jun;6(6):458-62.

23. Zhan Q, Chen Y, Lin Y, Xiao W. Studies on the detection of HBV DNA from human serum by PCR-ELISA technique. Progress in Biotechnology. 2001; 21(6):54-6.

24. Zhan Q. Studies on the adenovirus DNA by PCR-ELISA technique. Hebei Medicine. 2003; 9(5): 385-87.

25. Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, et al. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. Mycoses. 2011 Mar; 54(2):137-45. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01771.x.

26. Kim JH, Na JH, Lee MH, Um JY, Kim YM, Kim YT, et al. Presence of mycoplasma DNA in ovarian cancer tissue: detection by PCR-ELISA technique. Korean J Gynecol Oncol. 1998; 9(1): 70-8.

27. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Pourfath Elah AA, Rahbarizadeh F. Development of PCR-ELISA technique for determination of HLA DRB1* 01 group alleles. Iran J Biotech. 2004; 2(3): 164-9.

Archive of SID



www.SID.ir

**Original Paper**

# Detection of heat-labile toxin in enterotoxigenic *Escherichia coli* using PCR-ELISA technique

**Esfandiari P (M.Sc)[1], Amani J (Ph.D)*[2], Imani Fooladi AA (Ph.D)[3]
Forghanifard MM (Ph.D)[4], Mirhossaini SA (M.Sc)[5]**

**[1]Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran and Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. [2]Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. [5]Ph.D Candidate in Bacterial Toxin, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.**

## Abstract

**Background and Objective:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are the most common agent which causes diarrhea, worldwide. ETEC is colonized along the cells and then producing heat-labile (LT) and heat-stable enterotoxigenic which enter into intestinal epithelial cells and causes water and electrolyte loss from intestinal epithelial cells and eventually cause diarrhea.This study was done to detect the heat-labile toxin in Enterotoxigenic *Escherichia coli* using PCR-ELISA technique.

**Methods:** In this descriptive study, DIG-labeled PCR products were bounded to streptoavidin-coated wells of a microtiter plate and detected by anti-DIG–peroxidase conjugate. The biotin-labeled internal probe was used for verification of PCR products.

**Results:** Heat-labile toxin was detected by PCR-ELISA method. The sensitivity of heat-labile toxin was 1.9 ng. This method did not cross-react with bacteria from this variety.

**Conclusion:** PCR-ELISA method is 100 times more sensitive than conventional PCR method and due to lack of agarose gel and electrophoresis device it can be a good alternative to traditional method.

**Keywords:** Enterotoxigenic *Escherichia coli*, PCR-ELISA, Heat-labile enterotoxin

*** Corresponding Author: Amani J (Ph.D), E-mail: jafar.amani@gmail.com**

**Received** 9 Jun 2014 **Revised** 6 Sep 2014 **Accepted** 29 Sep 2014

Archive of SID

Cite this article as: 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 Uni Med Sci. 2015; 17(3): 114-121. [Article in Persian]

www.SID.ir