Archive of SID

بررسی فراوانی ژن های Ace، Zot، tcpA و ctxA در سویه های ویبریوکلرای جدا شده از اپیدمی تابستان سال ۱۳۸٤ ایران با روش PCR

عباس ملکی[۱]، ایرج پاکزاد[۲]، شیوا حسینی[۱]، رضا رنجبر[۳]، محمدرضا پور شفیع[٤]،رضا محبی[۲]، سبحان غفوریان[۲]، علی همتیان[۲]، نورخدا صادقی فرد[۲*]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۳) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

٤) گروه میکروبیولوژی،انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۵ تاریخ پذیرش:۸۹/۹/٦

چکیده

مقدمه: ویبریوکلرا نوعی باکتری گرم منفی و عامل وبا است. مهم ترین فاکتور پاتوژنی ویبریوکلرا انتروتوکسینی به نام کلراتوکسین است که عامل بروز اسهال می باشد. علاوه بر کلراتوکسین و توکسین های جانبی همانند zot و ace، یکی دیگر از مهم ترین فاکتور های پاتوژنی ویبریوکلرا پیلی می باشد که در اتصال وکلونیزاسیون نقش کلیدی داشته و به tcp معروف است.

مواد و روش ها: سویه ها در محیط اختصاصی کشت داده شدند. پس از انکوباسیون، کلنی های ظاهر شده با روش های بیوشیمیایی و سرولوژی تعیین هویت گردیدند. در مرحله بعد، پس از کشت سویه ها روی محیط LB و انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از رسوب به دست آمده جهت استخراج DNA استفاده گردید. در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حضور یا عدم حضور ژن های zot، ace، tcpA و ctxA با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: در سی و نه سویه مورد مطالعه، پس از انجام PCR، فراوانی ژن های Zot، Ace، tcpAو ctxA به ترتیب برابر بود با ۳۹ (۱۰۰ درصد)، ۳۹ (۱۰۰ درصد)، ۳۲ (۸۴/۶۱ درصد) و ۳۵ (۸۹/۷۴ درصد).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می توان استنباط نمود که وجود ژن های ace و zot در سویه های ویبریوکلرای فاقد ژن ctxA در بیماری زایی باکتری اهمیت دارد.

واژه های کلیدی: ویبریوکلرا، ctxA، tcpA، Ace، Zot

***نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: sadeghifard@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویبریوکلرا نوعی باکتری گرم منفی و عامل بروز بیماری وبا می باشد. کلراتوکسین مهم ترین فاکتور پاتوژنی ویبریوکلرا انتروتوکسینی است که باعث بروز اسهال می گردد،(۱). گر چه کلراتوکسین مهم ترین فاکتور پاتوژنی باکتری است، مطالعات متعدد نشان می دهد که برخی سویه های فاقد کلراتوکسین نیز قادر به ایجاد وبا می باشند که این مسئله به شناسایی توکسین های جدید در ویبریوکلرا منجر گردید،(۲). علاوه بر کلرا توکسین و توکسین های جانبی همانند Zot و Ace، یکی دیگر از مهم ترین فاکتورهای پاتوژنی ویبریوکلرا پیلی می باشد که در اتصال و کلونیزاسیون نقشی کلیدی داشته و به tcp معروف است،(۳). توکسین های Zot و Ace از توکسین های فرعی ویبریوکلرا O1 می باشند و توسط جایگاه ژنومی CTX کد می شوند،(۴). Zot باعث تخریب اتصالات محکم می شود. این تخریب باعث می شود تا ارتباط بین سلول های مخاطی روده قطع شده و نفوذ پذیری روده بیشتر شود. Zot باعث ایجاد اسهال آبکی خفیف می شود،(۵،۶). انتروتوکسین فرعی وبا یا Ace، اختلاف پتانسیل سراسر اپیتلیوم روده ای را افزایش داده و در انتقال یون تغییراتی ایجاد می کند،(۷). این توکسین توسط Trucksis و همکارانش شناخته شده است. این پژوهشگران اثبات کردند که قالب ژن که مستقیما در بالا دست ژن Zot قرار دارد، می تواند باعث افزایش ناگهانی جریان مایعات در داخل حفره ی روده شود،(۸). پیلی ویبریوکلرا از نوع تیپ IV بوده و باعث ایجاد ساختار دسته مانند(bundle form) می شود. این پیلی ها را TCP نیز می نامند، زیرا بیان آن هم زمان با توکسین وبا تنظیم می شود. TCP مهم ترین ساختار اتصالی باکتری به سلول های اپیتلیال روده است،(۹،۱۰،۱۱). فاکتور کلو نیزاسیون پیلی(TCP) دارای محلی است که مانند یک رسپتور برای فاژ CTX عمل می نماید و خودش توسط باکتریو فاژ لیزوژنیک VPI کد می شود،(۱۲). هدف از انجام این تحقیق بررسی فراوانی وجود ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA در سویه های ویبریوکلرا جدا شده از بیماران مبتلا به وبا ناشی از اپیدمی تابستان سال ۱۳۸۴ ایران با روش PCR می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت: باکتری های ویبریوکلرا ناشی از اپیدمی تابستان سال ۱۳۸۴ ایران از مراکز بیمارستانی استان هایی که مواردی از وبا مشاهده شده بود(گلستان، قم، تهران، همدان، سیستان و بلوچستان) تهیه گردیدند. نمونه ها در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام شد. باکتری هایی که روی مولر هینتون آگار رشد کرده بودند، در محیط اختصاصی TCBS (مرک آلمان) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از مشاهده کلنی های مورد نظر، تست های تاییدی از جمله تست دکربوکسیلاسیون اسید های آمینه، تست تخمیر قندهای آرابینوز و سوکروز و تست VP(وگس پروسکوئر) و تست های سرولوژی همانند آگلوتیناسیون با آنتی سرم گروه O1 و سروتایپینگ گروه O1 انجام گردید.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA، ابتدا یک کلونی از باکتری در محیط LB به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و پس از پایان انکوباسیون، محیط مایع کشت داده شده به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

جهت استخراج DNA از کیت Diatom استفاده شد که بر مبنای استفاده از GuSCN-Silica Gel طراحی شده است.

PCR: پس از استخراج DNA، هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰- نگهداری گردید. سکانس پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعات ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA که در مطالعات قبلی طراحی گردیده اند را در قسمت زیر نشان داده ایم،(۱۳،۱۴). این پرایمرها طوری طراحی شده اند که قادرند قطعه ای به طول ۳۰۱ جفت باز برای ژن ctxA، قطعه ای به طول ۴۵۱ جفت باز برای ژن tcpA، قطعه ای به طول ۶۰۰ جفت باز

www.SID.ir

Archive of SID

برای ژن Ace و قطعه ای به طول ۹۴۷ جفت باز برای ژن zot را تکثیر نمایند.

پرایمرهای ژن ctxA

پرایمر پیشرو:
F 5' – CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG – 3'

پرایمر معکوس:
R 5' – TCT ATC CTC GTA GCC CCT ATT AAC G-3'

پرایمر های ژن tcpA:

پرایمر پیشرو:
5'- CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG–3'

پرایمر معکوس:
R 5' – CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG – 3'

پرایمرهای ژن Ace:

پرایمر پیشرو:
F 5'-AGA GCG CTG CAT TTA TCC TTA TTG -3'

پرایمر معکوس:
R 5'-AAC TCG GTC TCG GCC TCT CGT ATC-3'

پرایمر های ژن Zot:

پرایمر پیشرو:
F 5'-TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T-3'

پرایمر معکوس:
R 5'-AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A-3'

واکنش PCR برای ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA: جهت تکثیر قطعه مورد نظر، از ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA در یک حجم ۵۰ میکرولیتری ۲/۵ واحد از آنزیم taq پلی مراز، همراه ۵۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از دزوکسی نوکلئوتید های چهار گانه، یک میکرولیتر از DNA الگو، ۱/۵ میلی مولار کلریدمنیزیم، ۱۰ میلی مولار Tris–Hcl (pH 8/3) و ۵۰ میلی مولار کلریدپتاسیم استفاده گردید.

لوله ها را در ترموسایکلر برای ژن های Zot، tcpA و ctxA با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت و در پایان جهت تکثیر قطعات ناتمام در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

واکنش PCR برای ژن Ace همانند برنامه بالا انجام گرفت با این تفاوت که دمای مرحله اتصال پرایمرها(annealing) ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه استفاده شد.

حدود ۱۵–۵ میکرولیتر از محصول به دست آمده از PCR در ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و سپس باند ها با استفاده از UV ترانس لومیناتور مشاهده گردیدند.

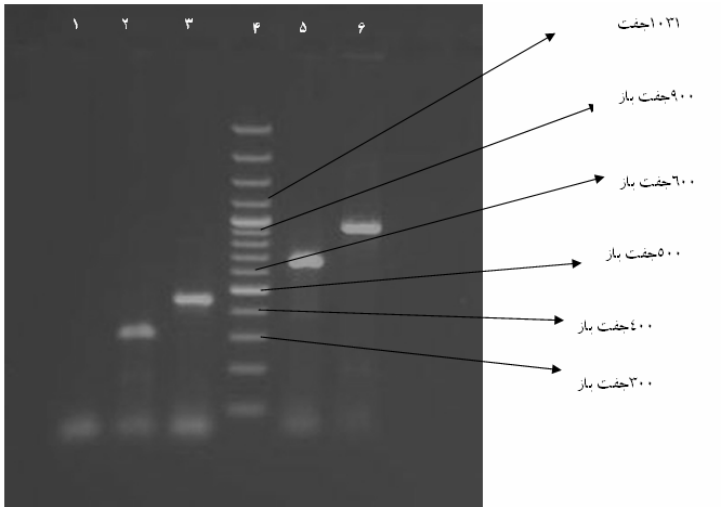
یافته های پژوهش

از سی و نه سویه ویبریوکلرا متعلق به اپیدمی وبای تابستان سال ۱۳۸۴ ایران، همگی به سروگروپ O1 و سروتایپ اینابا متعلق بودند. بعد از PCR، باند های به دست آمده با وزن ۳۰۱ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن ctxA، باندهای به دست آمده با وزن ۴۵۱ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن tcpA در نظر گرفته شدند باند های به دست آمده با وزن ۶۰۰ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن Ace و باند های به دست آمده با وزن ۹۴۷ جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن Zot در نظر گرفته شدند و به ترتیب به عنوان سویه های حمل کننده ژن های ctxA، tcpA، Ace و Zot مد نظر قرار گرفتند.(شکل ۱)

در کل در میان سی و نه سویه ویبریوکلرا O1 که PCR شدند، همگی حمل کننده ژن های Ace و Zot بودند، در سی و پنج سویه(۸۹/۷۴ درصد) ژن ctxA و در سی و سه سویه(۸۴/۶۱) ژن tcpA مشخص گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ . ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعات ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA از چپ به راست: ردیف ۱ به کنترل منفی، ردیف ۲ نمونه ctxA مثبت، ردیف ۳ نمونه tcpA مثبت، ردیف ٤ مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۵ نمونه ace مثبت و ردیف ٦ نمونه Zot مثبت مربوط می گردد.

بحث و نتیجه گیری

همان طور که در نتایج اشاره شد در تمامی سی و نه(۱۰۰ در صد) سویه ویبریوکلرا O1 که PCR شدند، ژن های Ace و Zot مشخص گردیدند، در سی و پنج سویه(۸۹/۷۴ درصد) ژن ctxA، و در سی و سه سویه(۸۴/۶۱ درصد) ژن tcpA مشخص گردید، اما این میزان با فراوانی این ژن ها در سویه های ویبریوکلرای جدا شده از کشور های مختلف فرق داشت.

Leal و همکاران در برزیل(۲۰۰۴) سویه های ویبریوکلرای O1 را با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند و حضور ژن های Ace، Zot، tcpA و ctxA را در این سویه ها با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده برای بررسی وجود ژن های ویرولانس ژن های Ace، Zot، tcpA و ctxA با روش PCR مشخص نمود که تمام سویه های مورد مطالعه دارای چهار ژن هستند.(۱۵)

در مطالعه ی محمدرضا پورشفیع و همکاران ۲۰۰۰، آنالیز مولکولی سویه های ویبریوکلرا جدا شده از بیماران عفونی در تهران مورد بررسی قرار گرفت. در آن مطالعه با استفاده از تکنیک PCR مشخص شد که صد درصد سویه های مورد مطالعه دارای ژن ویرولانس ctxA، ۱۰۰ درصد دارای ژن tcpA، ۹۷/۳ درصد سویه ها دارای ژن Ace و ۹۹/۱ درصد سویه های مورد مطالعه در آن بررسی دارای ژن Zot بودند.(۱۶)

در مطالعه ی محمدرضا پورشفیع و همکاران ۲۰۰۲، مشخصات مولکولی و فنوتیپی سویه های ویبریو کلرا در ایران مورد بررسی قرار گرفت. در آن مطالعه، دویست ایزوله ی کلینیکی از ویبریوکلرا سروگروپ های non-O1 ، O1 و non-O139 از استان های مختلف ایران جمع آوری شده بودند. آنالیز PCR ویبریوکلرا O1 نشان داد که ژن های کد کننده ctx، tcp، Ace و Zot، در ۵۵ تا ۹۷ درصد ایزوله های ویبریوکلرا در استان های مختلف وجود دارند. در ۵۸ سویه جدا شده از تهران، ژن های tcpA، ctxA، Ace و Zot به ترتیب در ۹۲ درصد، ۷۸ درصد، ۹۲ درصد و ۱۰۰ درصد ایزوله ها وجود داشت. در ۲۹ سویه جدا شده از کاشان که همگی متعلق به ویبریوکلرای

www.SID.ir

Archive of SID

غیرO1 و غیرO139 بودند، فقط ۹ درصد دارای ژن tcpA و بقیه فاقد ژن های مورد نظر بودند. از ۶۰ سویه جدا شده از استان خوزستان، ژن های tcpA، ctxA، Ace و ژن Zot به ترتیب در ۸۱ درصد، ۵۸ درصد، ۷۹ درصد و ۹۷ درصد ایزوله ها وجود داشتند. از ۴۴ سویه جدا شده از استان کرمان، ژن های tcpA، ctxA، Ace و ژن Zot به ترتیب در ۹۷ درصد، ۵۵ درصد، ۶۷ درصد و ۱۰۰ درصد ایزوله ها وجود داشتند،(۱۷). در مطالعه ای که ما با روش PCR روی سویه های ویبریوکلرای O1 جدا شده از اپیدمی تابستان سال ۱۳۸۴ ایران برای بررسی وجود یا عدم وجود ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA انجام دادیم، مشخص شد که تمام سویه ها دارای ژن Ace و Zot بودند، ۳۰ نمونه دارای هر چهار ژن مورد مطالعه بودند(۷۶/۹۲ درصد)، ۵ نمونه دارای ctxA مثبت و tcpA منفی بودند(۱۲/۸۲ درصد)، ۳ نمونه دارای ctxA منفی و tcpA مثبت(۷/۶۹ درصد) و ۱ نمونه ctxA منفی و tcpA منفی(۲/۵۶ درصد) بودند.

References

1-Albert MJ, Siddique AK, Islam MS. Large outbreak of clinical cholera due to Vibrio cholerae non-O1 in Bangladesh. Lancet 1993; 341: 704.

2-Karaolis DK, Somara S, Maneval Jr, Johnson JA & Kaper JB. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. Nature 1999; 399: 375-9.

3-Boyd EF & Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic Vibrio cholerae non-O1/non-O139 serogroup isolates. Microbiology 2002; 148: 1655-66.

4-Colombo MM, Mstrandrea S, Santona A, et al. Distribution of the ace, zot, and ctxA toxin genes in clinical and environmental Vibrio cholerae. J infect Dis 1994; 170: 750-1.

5-Mukhopadhyay AK, Chakrabrty S, Takeda Y, Nair GB & Berg DE. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX phi prophage in environmental strains of Vibrio cholerae. J Bact 2001; 183: 4737-46.

6-Baudry B, Fasano A, Ketley J & Kaper J. Cloning of gene (zot) encoding a new toxin produced by Vibrio cholerae. Infect Immun 1992; 60: 428-34.

7-Bear CE, Kartner RJ, Bridges TJ, Jensen M, Ramjeesingh & Riordan JR. Purlification and function reconstitution of the cystic fibrosis traansmembrane conductance regulator (CFTR). Cell 1992; 68: 809-18.

8-Karasawa T, Mihara T, Kurazono H, et al. Distribution of the zot (zonula occludens toxin) gene among strains of Vibrio cholerae O1 and non O1. Microbiol Lett 1993; 106: 143-6.

9-Faast R, Ogierman MA, Stroeher UH, Manning PA. Nucleotide sequence of the structural gene, tcpA, for a major pilin subunit of Vibrio cholerae. Gene 85, 227–231. Iredell JR, Manning PA. Biotype-specific tcpA genes in Vibrio cholerae. FEMS Microbiol Lett 1994; 121: 47–54.

10-Boyd EF, Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic Vibrio cholerae non-O1/non-O139 serogroup isolates. Microbiology 2002; 148: 1655–66.

10-Ramamurthy T, Bag PK, Pal A. Virulence patterns of Vibrio cholerae non-O1 strains isolated from hospitalized patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. J med Microbiol 1993; 39: 310-7.

11-Vital Brazil JM, Alves RM, Rivera IN. Prevalence of virulenceassociated genes in clinical and environmental Vibrio cholerae strains isolated in Brazil between 1991 and 1999. FEMS Microbiol Lett 2002; 215: 15-21.

12-Mukhopadhyay AK, Chakaraborty S, Takeda Y, Nair GB & Berg DE. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX phi prophage in environmental strains of Vibrio cholerae. J Bact 2001; 183: 4737-46.

13-Keasler SP & Hall RH. Detecting and biotyping Vibrio cholerae O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet 1993; 341: 1661.

14-Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, et al. Evaluation of RAPDbased typing scheme in a molecular epidemiology study

www.SID.ir

Archive of SID

of Vibrio cholerae O1, Brazil. J Appl Microbiol 2004; 96: 447-4.
15-Grace Nazareth Diogo Theophilo, Dália dos Prazeres Rodrigues, Nilma Cintra Leal, Ernesto Hofer. Distribution of virulence markers in clinical and environmental Vibrio cholerae non-O1/non-O139 strains isolated in brazil from 1991 to 2000. PMID: 16699625 [PubMed - indexed for MEDLINE] 2006; 48(2):65-70.
16-Pourshafie M, Grimont F, Kohestani S, Grimont P.A.D. A molecular and phenotypic study of Vibrio cholerae in Iran 2002. J Med Microbiol 2002; 51: 392-8.
17-Pourshafie M, Grimont F, Saifi M, Grimont P.A.D. Molecular epidemiological study of Vibrio cholerae islolates from infected patients in Tehran,Iran. J Med Microbiol 2000; 49:1085-90.

Frequency Analysis of Genes ctxA, tcpA, Ace and Zot in Vibrio Cholerae Isolated of Epidemy of Summer 2005 in Iran By PCR

Maleki A[1], Pakzad I[2], Hosseini Sh[1], Ranjbar R[3], Purshafie MR[4], Mohebi R[2], Ghafo'urian S[2], Hemateyan A[2], Sadeghi fard N[2]*

(Received: 6 Nov. 2009 Accepted: 27 Nov. 2010)

Abstract

Introduction: V. cholerae, a Gram-negative bacterium is the causative agent of Cholera. V. cholerae O1 produces cholera toxin (CT) which is responsible for diarrhea. The zonula occludens toxin (Zot) acts on intestinal tight junctions to increase intestinal permeability. The accessory cholera enterotoxin (Ace) increases the potential difference across intestinal epithelium and alters ion transport. V. cholerae athogenicity depends on a combination of factors known as ability to produce a cholera toxin (CT) and to adhere and colonize small intestine through colonization factor known as toxin-coregulatedpilus (TCP).

Material & Methods: Thirty nine El Tor variants were obtained from outbreaks during 2005 in Iran. After detection of isolates by biochemical methods, and serotyping, chromosomal DNA was extracted by standard phenol/chloroform method. The oligonucleotide primers for each of the selected virulence-associated factors were designed based on available GenBank sequences for V. cholerae O1 E1 Tor for all the genes. PCR assay was performed and the PCR product was run and visualized in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Findings: In the present study, PCR was used to detect the presence of ctxA, Zot, Ace, and tcpA genes on 39 V. cholerae strains isolated from the summer epidemic 2005 in Iran. With the specific primers, the V. cholerae isolates were analysed by PCR for the presence of tcpA, ctxA, Ace and Zot genes. PCR showed that the genes encoding cholera toxin (ctxA), toxin co-regulated pilus (tcpA), accessory cholera enterotoxin (Ace) and zonula occludens toxin (Zot) were present in 89.74%, 84.6%, 100% and 100% of the isolates, respectively.

Discussion & Conclusion: The results of our study confirm that strains without ctxA gene, Ace and Zot genes are important and can be the causative agent of cholera.

Keyword: Vibrio cholerae, ctxA, tcpA, Ace, Zot

1. Dept of Microbiology, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
3. Mollecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

www.SID.ir