

تحقیقی

تشخیص توکسین حساس به حرارت باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک با استفاده از تکنیک PCR-ELISA

پانته آسفنبداری^۱، دکتر جعفر امانی*^۲، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی^۳، دکتر محمدمهدی فرقانی^۴، سیدعلی میرحسینی^۵

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 بقیه الله (عج). ۴- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ۵- دانشجوی دکتری توکسین های میکروبی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).

چکیده

زمینه و هدف: اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایع ترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا است. باکتری ETEC در سطح سلول های اپی تلیالی روده کوچک کلنیزه شده و بعد انتروتوکسین مقاوم به حرارت (ST) و یا حساس به حرارت (LT) را ترشح می کند که با ورود به سلول ها باعث خروج آب و الکترولیت از سلول های اپی تلیالی روده شده و نهایتاً موجب اسهال می گردد. این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT باکتری اشریشیا کلی 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 ظرف های دارای استریتوایدین منتقل و به کمک آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین کونژوگه شناسایی شدند. همچنین از کاوشگر داخلی نشاندار با بیوتین برای تایید محصولات PCR استفاده گردید.

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

نتیجه گیری: روش PCR-ELISA ۱۰۰ برابر حساس تر از روش PCR معمولی بوده و به دلیل عدم نیاز به ژل آگارز و دستگاه الکتروفورز می تواند جایگزین مناسبی برای روش های قدیمی باشد.

کلید واژه ها: اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک، انتروتوکسین LT، PCR-ELISA

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

نشانی: تهران، میدان نیک، 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

مقدمه

مرگ و میر ناشی از اسهال در میان کودکان زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه است. اسهال مسافران اغلب نیازی به درمان آنتی بیوتیکی ندارد و فقط باید اتلاف آب و الکترولیت جبران گردد و کمتر از یک هفته بهبود می یابند. باکتری ETEC از طریق آب و غذای آلوده وارد بدن انسان می شود. عوامل ویروالاس اختصاصی مانند انتروتوکسین ها و عوامل کلینزاسیون، ETEC را از سایر گروه های اشریشیا کلی ایجاد کننده اسهال متمایز می سازد. 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

با وجود پیشرفت های عمده بهداشتی در قرن حاضر هنوز هم عفونت های اسهالی از نگرانی های بزرگ مجامع در سراسر جهان محسوب می شوند. به طوری که بیماری های حاصل از ابتلاء به این عفونت ها سالانه سبب مرگ و میر تقریباً ۳ میلیون نفر در سراسر جهان می شود (۱). در این بین باکتری اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic Escherichia coli: ETEC) شایع ترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا است (۲). ETEC مهم ترین عامل باکتریایی ایجاد کننده اسهال جهانگردانی است که به مناطق گرمسیری و اندمیک مسافرت می کنند (۳ و ۴) و نیز عامل

اختصاصی کشت داده شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر از سلول های باکتریای کشت داده شده در محیط کشت LB مایع را برداشته و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. رسوب سلولی حاصل را در بافر TE (Tris-EDTA) حل کرده و به آن ۳۰ میکرو لیتر SDS ۱۰ درصد و ۳ میکرو لیتر پروتیناز K اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم. سپس به آن ۱۰۰ میکرو لیتر 5M NaCl و ۸۰ میکرو لیتر CTAB-NaCl اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. هم حجم مخلوط به آن ایزو آمیل الکل-کلروفرم اضافه و آن را با دور rpm ۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی را برداشته و هم حجم فاز رویی به آن فل و مخلوط ایزو آمیل الکل به همراه کلروفرم اضافه کردیم و ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ شد و به فاز رویی ۵۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول اضافه و ۱۲ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و به رسوب آن ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. سپس ۱۰ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و فاز رویی را دور ریخته و رسوب آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد گذاشتیم تا کاملاً خشک شد. سپس رسوب را در ۵۰ میکرو لیتر بافر TE حل و برای حذف RNA احتمالی ۵ میکرو لیتر RNase A به آن اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 واحد A که بخش کاتالیتیک 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 نرم افزارهای 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 G_c ، T_m ، تشکیل لوپ و پرایمر دایمر بررسی شدند. واکنش PCR برای تکثیر ژن *lt* در حجم ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر ۰/۵ یونیت از آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سینا کلون)، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR ۱۰X، غلظت یک میلی مولار $MgCl_2$ و غلظت های متفاوت از DNA ژنومی بود. هر چرخه PCR شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه،

سویه باکتری دلیل ETEC بودن آن است. باکتری ETEC در سطح سلول های اپی تلایالی روده کوچک کلنیزه شده و بعد اترتو توکسین مقاوم یا حساس به حرارت را ترشح می کند (۶۵) که با ورود به سلول ها باعث خروج آب و الکترو لیت از سلول های اپی تلایالی روده شده و نهایتاً موجب اسهال می گردد. اترتو توکسین LT با وزن ملکولی تقریبی ۸۶ کیلو دالتون از نظر ساختاری و عملکردی مشابه توکسین ویبریو کلرا (CT) است (۷۵) و از یک زیر واحد A به وزن ملکولی ۲۸ کیلو دالتون و پنج زیر واحد B به وزن ملکولی ۵۷ کیلو دالتون (هر زیر واحد ۱۱/۵ کیلو دالتون) تشکیل شده است (۷۲). هر کدام از این زیر واحدها به عنوان یک پلی پپتید پیش ساز سنتز می شوند. زیر واحد A دارای فعالیت توکسیک و زیر واحد B مسؤول اتصال توکسین به گیرنده GMI موجود در سطح اتروسیت های روده است. در اتصال توکسین ۵ زیر واحد B به ۵ گیرنده GML متصل می شوند (۸). سپس کمپلکس GML-LT به درون سلول اندوسیتوز گشته و زیر واحد A با اثر سمی منجر به ترشح آب و الکترو لیت و مهار جذب یون های نمک از سلول های رأس ویلی گشته و باعث اسهال می شود (۹ و ۱۰). در سال های اخیر از روش های مختلف PCR برای تشخیص سویه های مختلف ETEC استفاده شده است (۵). روش مرسوم برای شناسایی و بررسی محصولات PCR، استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم پروماید و دورگه سازی (Hybridization) است. همه این روش ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان، محدودیت در تعداد نمونه های تشخیص و همچنین مواد سمی همچون اتیدیوم 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 نوالی های اختصاصی ژن بیماری فراهم می آورد. استفاده از دیگو کسی ژنین (DIG) یک روش تشخیص مناسب و غیر رادیواکتیوی برای تشخیص محصولات PCR فراهم کرده است. در این روش محصولات نشاندار شده توسط دیگو کسی ژنین را به کمک آنتی بادی ضد دیگو کسی ژنین کونژوگه (Anti DIG) با آنزیم پراکسیداز شناسایی می کند. این مطالعه به منظور تشخیص توکسین LT باکتری / شریشیا کلی اترتو توکسیژنیک با استفاده از تکنیک PCR-ELISA انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی سویه باکتری ETEC مولد LT بدون کدبیین المللی از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهران تهیه و تست های بیوشیمیایی تاییدی مربوط به ETEC انجام شد. همچنین سویه مورد نظر از لحاظ تولید توکسین ارزیابی گردید.

استخراج DNA: برای تهیه DNA ژنومی باکتری از روش CTAB-NaCl استفاده شد. ابتدا کلنی های باکتری در محیط

جدول ۱: پرایمرها و پروب طراحی شده از ژن *lt*

تعداد نوکلئوتید	توالی نوکلئوتید	تعداد نوکلئوتید
۲۱ باز	<i>EsLAF:</i> ATGCCAGAGGGCATAATGAG	
۲۴ باز	<i>EsLAR:</i> GATATATTGTGCTCAGATTCTGGG	
۱۹ باز	<i>EsLAP:</i> Biotin-GTTTCTGCGT TAGGTGGAA	

جدول ۲: نحوه اجرای واکنش PCR برای تکثیر ژن *lt*

مرحله اول	داناتوره شدن اولیه	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
مرحله دوم (داناتوره شدن)	تانبویه	۹۵	۵ دقیقه	۱
	اتصال	۶۳	۱ دقیقه	۳۳
	تکثیر	۷۲	۴۵ ثانیه	
مرحله سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۱ دقیقه	۱

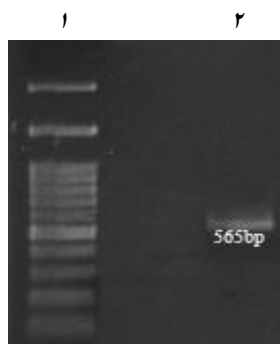
محصول PCR عادی با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس چاهکها را سه مرتبه با بافر PBST (فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توین) شستشو دادیم. مرحله بعد به هر کدام از چاهکها ۱۰۰ میکرولیتر Blacking Buffer اضافه کردیم و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه 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 دورگه سازی (SSC) ریخته و به مدت ۵ دقیقه جوشاندیم و به آن یک پیکومول پروب نشاندار که انتهای ۵ آن بیوتینیل 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 آنتی بادی 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 میلی لیتر بافر سیترات فسفات با pH مساوی ۵، به همراه ۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰ درصد) 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 دورگه سازی به کار رفت. نتایج نشان داد DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن *lt* باکتری

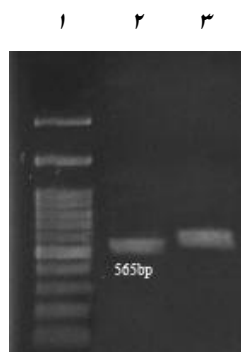
واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) در ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. همچنین واکنش PCR در ۳۵ سیکل انجام شد (جدول ۲). برای مشاهده محصول، ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR درون چاهکهای ژل آگاروز یک درصد تهیه شده از بافر TBE، الکتروفورز شد. برای تعیین اندازه محصول از نشانگر plus ladder bp 100 ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. سپس ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی 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 به دست آوردن سکانس ژنی *ltA* از بانک ژنی اقدام به طراحی پروب نمودیم. پروب مورد نظر قسمت میانی ژن *ltA* است. این پروب با استفاده از نرم افزارهای Oligo و BLAST DNASIS - Primer 3 که به منظور 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 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 استرپتواویدین 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 E میکرولیتر

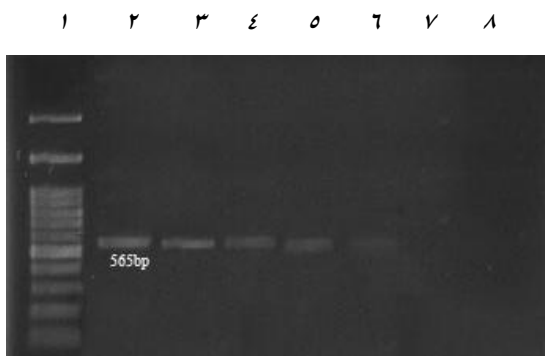
lt باکتری ETEC روش دورگه‌سازی به کار برده شد و نتایج نشان داد که DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن *lt* باکتری ETEC است. پس از انجام واکنش PCR از روی DNA ژنومیک رقیق شده باکتری ETEC، محصولات PCR توسط ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. نتیجه حاصل از الکتروفورز مطابق شکل ۳-الف بررسی شد. سپس نتایج محصول PCR با الیزا بررسی گردید. این آزمایش سه بار تکرار شد و نتیجه آن در شکل ۳-ب آمده است.



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



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



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

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 (۵۷ تا 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 مورد نظر 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 داکيومنت 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 الیزا برای دستیابی به بهترین نتایج، مدت زمان انکوباسیون دورگه‌سازی محصول نشاندار شده، رقت آنتی‌بادی ضد دیگنوسی ژن و میزان توین 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

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).

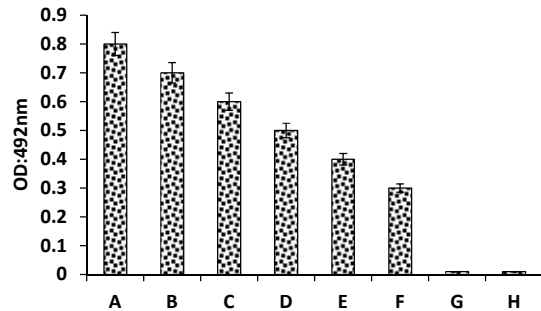
بحث

روش‌های متداول میکروبیولوژی که برای شناسایی باکتری ETEC به کار 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 رنگ آمیزی 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.

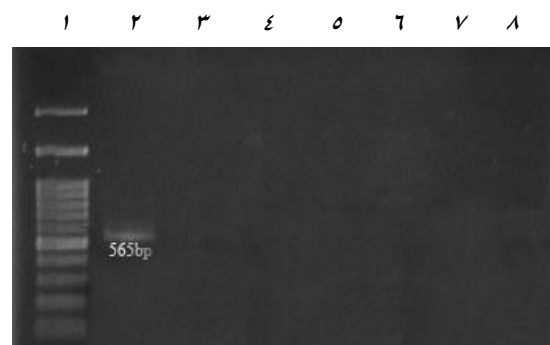
در مطالعه Lang و همکاران از روش Multiplex PCR برای تشخیص توکسین LT باکتری ETEC و توکسین شیگلا استفاده شد (۱۳). O'Meara و همکاران در ایرلند تکنیک رنگ‌سنجی همراه با PCR را برای تشخیص توکسین LT باکتری ETEC به کار بردند (۱۴). این تحقیقات بر روی نمونه‌های انسانی انجام گرفت. همچنین آزمایشاتی روی نمونه‌های 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 ویبریو کلرا به روش PCR-ELISA صورت گرفته است (۱۹-۱۱)؛ اما تاکنون گزارشی از شناسایی ETEC به روش PCR-ELISA ارائه نشده و به نظر می‌رسد که چنین پژوهشی برای اولین بار انجام شده است.

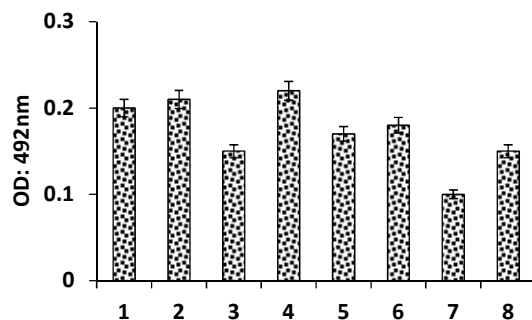
تحقیقاتی در زمینه تشخیص با استفاده از متد PCR-ELISA انجام شده است. Jones و همکاران برای تشخیص زودهنگام عفونت



شکل ۳-ب: تعیین حساسیت روش PCR-ELISA با استفاده از محصول PCR ژن *lt* سریال رقت از ۶۰ng تا ۱/۴



شکل ۴-الف: ژل آگارز مربوط به تعیین اختصاصیت روش PCR با استفاده از باکتری‌های مختلف (۱) اندازه مارکر ۱۰۰bp plus DNA (۲) محصول PCR نشاندار نشده ژن *lt* (۳) محصول PCR حاصل از شیگلا دیسانتریه، (۴) محصول PCR حاصل از کلبسیلا، (۵) محصول PCR حاصل از ویبریوکلرا، (۶) محصول PCR حاصل از سودوموناس آئروجینوزا، (۷) محصول PCR حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس، (۸) محصول PCR حاصل از سالمونلا پاراتیفی



شکل ۴-ب: تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA با استفاده از باکتری‌های مختلف (۱) شیگلا دیسانتریه، (۲) کلبسیلا، (۳) ویبریوکلرا، (۴) سودوموناس آئروجینوزا، (۵) استافیلوکوکوس اورئوس، (۶) سالمونلا پاراتیفی، (۷) کنترل (Ag- و Ab-) (۸)

تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA: برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده مقدار ثابتی از نمونه DNA ژنومی خالص سازی شده از باکتری‌های ETEC، ویبریوکلرا، سالمونلا

مرحله دورگه‌سازی صحت کار بالا برده شده و دوم این که به دلیل استفاده از پلیت‌های میکروتیتر امکان بررسی نمونه بیشتری وجود دارد. سوم این که حساسیت و اختصاصیت آن بیشتر است. به طوری که حساسیت این روش برای تشخیص ETEC ۱۰۰ برابر بیشتر از روش الکتروفورز ژل آگارز است. 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. همچنین این روش نشان داد که حساسیت PCR-ELISA بیشتر از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و سنجش PCR است. از آنجا که این روش در مدت زمان کوتاه قابل اجرا است؛ لذا روشی نسبتاً سریع بوده و به راحتی استاندارد می‌گردد. همچنین خطر آلودگی برای کارکنان آزمایشگاه کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد روش PCR-ELISA یک روش آزمایشگاهی مناسب و قابل اعتماد برای تشخیص ETEC است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۱۱۵۸) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی 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:

تهاجمی آسپرژیلوس ریوی در بیماران نوتروپنی از تکنیک PCR-ELISA استفاده کردند (۲۰). Machado و همکاران (۲۱) و Laoboonchai و همکاران (۲۲) برای تشخیص نمونه‌های مالاریا در تایلند از روش PCR-ELISA استفاده کردند. Zhan و همکاران مطالعه‌ای در تشخیص DNA هپاتیت B از سرم انسانی با استفاده از روش PCR-ELISA انجام دادند (۲۳). همچنین Zhan روی DNA آدنوویروس به روش PCR-ELISA مطالعه دیگری انجام داده است (۲۴). در مطالعه Beifuss و همکاران تشخیص مستقیم از پنج گونه درماتوفیت شایع در نمونه‌های بالینی طی ۲۴ ساعت با استفاده از روش PCR-ELISA انجام شد (۲۵). Kim و همکاران حضور DNA مایکوپلاسما در بافت سرطان تخمدان را توسط تکنیک PCR-ELISA تشخیص دادند (۲۶). نصیری و همکاران نیز روش PCR-ELISA را در مطالعه خود به کار بردند. آنها روش *allotyping* را برای تشخیص چهار گروه از آلل‌های HLA DRB1*01 و محلول هیبریداسیون در طرف‌های میکروتیتر توسعه دادند (۲۷).

نتیجه‌گیری

از این تکنیک می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری نمود که روش PCR-ELISA نسبت به بقیه روش‌های تشخیصی دارای چندین مزیت است. اول این که به دلیل ترکیب شدن محصول PCR با یک

- 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.

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, 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 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.

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

¹Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran and Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ²Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁴Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ⁵Ph.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