Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Detection of *stx*1 gene in *Shigella dysenteriae* from Mazandaran province clinical samples by PCR-ELISA method

Askary Ahmadpour[1], Esmail Fatahi[1], Jafar Amani[2], Abbas Ali Imani Fooladi[2], Aghil Tabar Molahassan[3]

1.Department of Biology, Islamic Azad University Amol branch, Amol, Iran
2.Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3.Department of Immunology, Islamic Azad University Babol branch, Babol, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/09/02
Accepted: 2016/10/19
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(5): 11-19

Corresponding author at:

Dr. Jafar Amani

Aplied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982182482549

Email:
Jafar.amani@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Among *Enterobacteriaceae*, *Shigella dysenteriae* produce a shiga toxin, and have cytotoxicity, enterotoxin and neurotoxin activity. The toxin causes diseases such as diarrhea, gastroenteritis, intravascular coagulation disorder. Today diarrhea is the most important challenge for the human health. The classic and conventional microbiological detection methods are sensitive and specificity, but there are limitations. This study was designed between Bahman 93 and Farvardin 94 to identify *S. dysenteriae* in shortest time and the amount of toxin Stx1 with high sensitivity and specificity using PCR-ELISA method.

Materials and Methods: The *stx1* sequence (490bp) as a target gene was amplified by Dig-dUTP labeled, then product was coating on microplate and detection was done using an antibody against digoxigenin conjugated. Also the specificity and sensitivity of the method were examined by clinical specimens.

Results: Sensitivity detection of bacteria in the samples was 1.56 pg using genomic DNA for *S. dysenteriae* and specificity of technique didn't show acceptable OD in other species of *Enterobacteriaceae* family. ELISA had significant absorption for genomic DNA Up to dilution 0.156 pg. As well as among 70 clinical samples which were analyzed, 3 samples contained the *stx1* gene.

Conclusions: Efficiency PCR-ELISA techniques showed that it was simple, faster, high specific and sensitive methods. This technique is more suitable than culture and PCR method also it was easy can apply in each medical laboratory.

KeyWords: *Shigella dysenteriae*, Shiga toxin, Digoxigenin, PCR-ELISA

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ahmadpour A, Fatahi E, Amani J, Imani Fooladi AA, Tabar Molahassan A. Detection of *stx*1 gene in *Shigella dysenteriae* from Mazandaran province clinical samples by PCR-ELISA method. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5):11-19

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

تشخیص ژن *stx1* از *شیگلا دیسانتریه* جدا شده از نمونه‌های بالینی در استان مازندران با استفاده از روش PCR-ELISA

عسکری احمدپور[۱]، اسماعیل فتاحی[۱]، جعفر امانی[۲]، عباسعلی ایمانی فولادی[۲]، عقیل تبار ملاحسن[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا... آملی، آمل، ایران
۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۱

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(5): 11-19

نویسنده مسئول:

دکتر جعفر امانی

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۸۲۴۸۲۵۴۹

پست الکترونیک:

Jafar.amani@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: در میان باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، *شیگلا دیسانتریه* به دلیل تولید توکسین پروتئینی تحت عنوان شیگاتوکسین با داشتن فعالیت سیتوتوکسینی و نوروتوکسینی موجب بیماری‌هایی اسهال، گاستروانتریت و اختلال انعقاد داخل عروقی می‌شود که امروزه به‌عنوان مهم‌ترین چالش برای سلامتی انسان‌ها مطرح می‌باشند. هرچند روش‌های کلاسیک و متداول میکروبیولوژی برای تشخیص حساس و اختصاصی می‌باشند، اما محدودیت‌های خاص خود رادارند، لذا این مطالعه به‌منظور رفع محدودیت‌ها و شناسایی توکسین Stx1 در کمترین زمان و میزان در *شیگلا دیسا نتریه* با حساسیت و اختصاصیت بالا به‌وسیله تکنیک PCR-ELISA در بازه زمانی بهمن ۹۳ تا فرودین ۹٤ انجام شد.

مواد و روش کار: توالی *stx1* (۴۹۰bp) به‌عنوان ژن هدف با استفاده از DIG-dUTP نشان‌دار تکثیر و سپس محصول نشان‌دار شده کف میکروپلیت الیزا کوت شده و درنهایت با استفاده از آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین کانژوگه شناسایی انجام شد. همچنین حساسیت و اختصاصیت این تکنیک با نمونه‌های بالینی موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: حساسیت تشخیص باکتری در نمونه بررسی‌شده با استفاده از *DNA* ژنومی ***pg*** ۱/٥٦ برای شیگلا دیسانتریه تعیین و در بررسی اختصاصیت این تکنیک به‌غیراز *شیگلا دیسانتریه* دیگرگونه‌های خانواده انتروباکتریاسه جذب قابل قبولی نداشتند. الیزا مربوط **به** *DNA* ژنومی تا رقت ۰/۱٥٦ پیکوگرم از جذب معنی‌داری داشت. از ۷۰ نمونه بالینی موردبررسی، ۳ نمونه حاوی ژن ***stx1*** با این تکنیک شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: کارایی تکنیک PCR-ELISA نشان داد علاوه بر سادگی، سریع بودن و برخورداری از حساسیت واختصاصیت بالا جایگزینی مناسب برای روش کشت و PCR می‌باشد و به‌راحتی قابلیت کاربردی شدن در هر آزمایشگاه طبی را دارد.

کلمات کلیدی: *شیگلا دیسانتریه*، شیگاتوکسین، دیگوکسیژنین، PCR-ELISA

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

از میان باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، *شیگلادیسانتریه* مهم‌ترین باکتری است که تولید توکسین پروتئینی تحت عنوان شیگاتوکسین (Stx) می‌نماید. این توکسین توسط ژن‌های کروموزومی کد شده (۵-۱) و با دارا بودن فعالیت سیتوتوکسینی، انتروتوکسینی ونوروتوکسینی امروزه به‌عنوان مهم‌ترین چالش برای سلامتی انسان ها مطرح می‌باشد (۲). این توکسین پروتئینی ازلحاظ ساختمانی متعلق به گروه AB5 توکسین بوده، قسمت B توکسین به‌صورت پنتامریک، غیر توکسیک می‌باشد که به‌طور اختصاصی از طریق یک گیرنده گلیکولیپیدی به نام Gb3 به سطح سلول هدف متصل و سپس از طریق فرایند اندوسیتوز به‌صورت یک وزیکول به داخل سلول منتقل می‌شود (۳). پس از برش پیوند پپتیدی توسط آنزیم فورین در بخش A، قطعه A1 که به‌عنوان بخش کاتالتیک این توکسین محسوب می‌شود آزاد و پس از فعال شدن وارد سیتوزول شده و با فعالیت

N–گلیکوزیدازی با حذف یک باز آدنین از 28SrRNA در زیر واحد ۶۰s ریبوزومی با جلوگیری از طویل شدن زنجیره پپتیدی فرآیند پروتئین‌سازی را در سلول مهار کرده و بدین‌وسیله موجب فراهم شدن مرگ سلولی در میزبان می‌شود (۴). انتقال این بیماری در مرحله اول از طریق دستان آلوده و از طریق دهان – مدفوع می‌باشد. منابع آب، مواد غذایی، سبزیجات ومیوه ها نقش مهمی در انتقال دارند (۶). عفونت‌های ایجادشده توسط این توکسین به‌صورت جهانی انتشار و عموما در کشورهای درحال‌توسعه و آسیای مرکزی و بنگلادش شیوع آن از میزان بالایی برخوردار می باشد و در ایران به‌صورت اندمیک شیوع دارد (۷). نه‌تنها *شیگلا دیسانتریه* بلکه برخی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مانند *E.coli* O157:H7، *انتروباکترکلوآکه* (*Enterobacter cloacae*)، *سیتروباکتر فروندی* (*Citrobacter freundii*)، *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)، *آئروموناس کاوئی* (*Aeromonas caviae*) و دیگر استرین‌های اشریشیاکلی مانند O89:H19، O146:H21، O126:H8، O146:H21، ONT:H19، O128:H2 قادر به تولید شیگاتوکسین می‌باشند (۸). تمام گروه‌های سنی در معرض آلودگی به توکسین *شیگلا دیسانتریه* قرار داشته و عموماً ۷۵ درصد کودکان زیر ۵ سال به دلیل ضعف سیستم ایمنی، حساس‌ترین گروه سنی در معرض این توکیسن می‌باشند (۹). دیسانتری، اسهال، گاستروانتریت، تشنج، انسفالوپاتی، فلج عصبی، اختلال انعقاد داخل عروقی، کم‌خونی شدید، تعدیل سیستم ایمنی، سندروم Ekiri و Hus از مهم‌ترین بیماری‌هایی می‌باشند که توسط توکسین *شیگلا دیسانتریه* ایجاد که موجب مرگ‌ومیر می‌شوند (۱۰). برای تشخیص روش‌های کشت، سرولوژی و ملکولی از مهم‌ترین روش‌های تشخیصی محسوب می‌شوند، اما این روش‌های کلاسیک و ملکولی هرچند از اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردارند به دلیل محدودیت‌هایی خاص ازجمله صرف زمان، هزینه زیاد و محدودیت در استفاده از تعداد زیاد نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان در زمان اپیدمی و بکارگیری مواد سرطان‌زا کمتر موردتوجه واقع‌شده‌اند (۱۱). برای رفع این محدودیت‌های تشخیصی تکنیکی بر اساس PCR-ELISA طراحی، که علاوه برداشتن حساسیت، اختصاصیت بالا محدودیت‌های موجود رفع می‌گردد. در این تکنیک با طراحی پرایمر اختصاصی ژن Stx و تکثیر محصول با DIG-dUTP، محصول نشان‌دار شده در کف پلیت های میکروتیتر کوت و جهت شناسایی محصول از پروب اختصاصی طراحی‌شده که بابیوتین نشان‌دار و به‌طور اختصاصی با قطعه نشان‌دار شده با DIG هیبرید می‌شود استفاده، که با اضافه نمودن آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین کانژوکه با آنزیم پراکسیداز، ژن Stx قابلیت شناسایی درکمترین زمان ممکن با حساسیت بالارا دارد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

سویه‌های استاندارد *شیگلادیسانتریه* با شناسه بین‌المللی RITCC1875 از دانشگاه شاهد، *شیگلا فلکسنری*، *شیگلا سونئی*، *ویبریوکلرا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *E.coli* O157:H7 از مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهیه و با استفاده از روش‌های کشت، تست‌های بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی مورد تائید مجدد قرار گرفتند.

مواد مورداستفاده

DIG-DUTP و کانژوکه مورداستفاده از شرکت Roche، آنزیم Taq DNA polymerase، Ladder 100bp از شرکت فرمنتاز، MgCl2، dNTP، Lysozyme، RnaseA، Proteinase K و آگارز از شرکت سینا کلون خریداری شد. همچنین پرایمرها و پروب مورداستفاده، توسط شرکت تکاپو زیست سنتز شدند.

تهیه DNA ژنومی باکتری

جهت تهیه DNA ژنومی از روش Boiling استفاده شد. پس از کشت *شیگلادیسانتریه* در محیط XLD منطقه اول کشت با لوب برداشته و به محیط کشت LB مایع تلقیح شد پس از رسیدن باکتری‌ها به فاز رشد لگاریتمی گرمادهی متوقف و ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتریایی به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی خارج و به رسوب سلولی حاصل، مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر TE اضافه و با ورتکس مخلوط گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از ورتکس (Vortex) مایع رویی (Supernatant) برداشته و به‌عنوان DNA الگو برای PCR استفاده شد.

انتخاب قطعهٔ ژنی و طراحی پرایمر و پروب مناسب

با توجه به اینکه عامل اصلی ایجاد بیماری توکسین Stx1 درشیگلادیسانتریه می‌باشد به همین جهت زیر واحد A به‌عنوان بخش کاتالتیک، سکانس آن از بانک ژنی استخراج و از روی آن اقدام به طراحی یک جفت پرایمر جهت تکثیر قطعه ژن Stx1

نموده و در ادامه به‌منظور تائید نهایی ژن‌های تکثیر یافته Stx1 و برای شناسایی محصول PCR اقدام به طراحی پروب نمودیم که باز موجود در انتهای '۵ پروب با بیوتین نشان‌دار و چنان تعریف شد که تشکیل ساختارهای ثانویه (ساختمان سنجاق سری) و نیز دایمر شدن پروب به حداقل برسد. همچنین ویژگی و کیفیت پرایمرها مانند درصد GC، دمای Tm، احتمال تشکیل لوپ، دلتا G (ΔG) و جفت‌شدگی پرایمرها در هر یک از جفت پرایمرهای پیشرو و معکوس، با استفاده از نرم‌افزارهای ملکولی Primer3، BLAST، IDT به‌طور مجزا موردبررسی قرار گرفتند.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به پرایمرها و پروب طراحی‌شده

پرایمروپروب	سکانس پرایمروپروب	جایگاه بر روی ژن کد کننده سم	تعداد نوکلئوتید
Ah stx1F	TTGTTTGCAGTTGATGTCAGAGG	۲۳۳-۲۱۰	۲۳
Ah stx1R	CAGGCAGGACACTACTCAACCTTC	۷۰۰-۶۷۶	۲۴
Ah stx1P	5'Biotin-TGTTGCAGGGATCAGTCGTACG-3'	۴۲۲-۴۴۴	۲۲

جداسازی و تکثیر ژن Stx1 با واکنش PCR و نشان‌دار نمودن محصول PCR

اجزای واکنش PCR جهت تکثیر ژن Stx1 در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/µL)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰pmol/ µL)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، X ۱۰، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر dNTP و ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر انجام شد و برای نشان‌دار نمودن محصولات بجای dNTP از DIG-dUTP استفاده شد. هر چرخه PCR شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، واسرشتگی در ۹۵ درجه ۴۵ ثانیه، اتصال (Annealing) در ۵۹ درجه ۴۵ ثانیه، تکثیر (Extension) در ۷۲ درجه‌یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه و با ۳۵ سیکل تکثیری صورت گرفت. واکنش PCR در ۳۰ چرخه دمایی مطابق با جدول (۲) انجام گرفت. جهت بررسی محصول PCR، محصول واکنش توسط ژل آگارز یک درصد به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۸۵ الکتروفورز شده و محصول PCR بعد از الکتروفورز زیر نور UV مشاهده و تصویری از ژل با استفاده از دستگاه Gel document تهیه گردید.

جدول ۲: نحوه اجرای واکنش PCR جهت تکثیر ژن stx1

	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
۱	دناتوره شدن اولیه	۹۴ درجه	۳ دقیقه	۱ سیکل
۲	دناتوره شدن ثانویه	۹۴ درجه	۴۵ ثانیه	۳۲ سیکل
	اتصال	۵۹ درجه	۴۵ ثانیه	
	تکثیر	۷۲ درجه	۱ د قیقه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۷ دقیقه	۱ سیکل

شناسایی محصول نشان‌دار شده با تکنیک PCR-ELISA

ابتدا ۵ میکرولیتر استرپتاویدین با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی به چاهک A، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین 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، ۵ میکرولیتر محصول PCR عادی با ۹۵ میکرولیتر بافر پوششی ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کرده سپس چاهک‌ها را ۳ بار بافر PBST (فسفات سالین حاوی ۰/۰۵٪ توین) شستشو داده، مرحله بعد به هرکدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر BSA%3 به‌عنوان Blacking Buffer اضافه کرده و یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کرده نمودیم. سپس چاهک‌ها را ۳ بار با بافر PBST شستشو داده، هم‌زمان با این مرحله ۱۰ میکرولیتر محصول PCR نشان‌دار شده با DIG را در ۹۰ میکرولیتر بافر دورگه‌سازی (SSC) ریخته ۱۰ دقیقه می‌جوشانیم و سپس ۵ دقیقه داخل یخ قرار داده و به آن ۱۰ ماکرولیتر پروب نشان‌دار که انتهای ۵ آن

بیوتینیله شده اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۵۵ درجه قرار داده سپس این مخلوط را روی چاهک A ریخته، ۱ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده بعد از ۳ بار شستشو با بافر PBST مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین نشان‌دار با پراکسیداز با رقت ۱/۱۰۰۰ به هرکدام از چاهک‌ها اضافه کرده، ۱ ساعت در ۳۷ درجه قرار گرفت پس از شستشوی مجدد با ۱۰۰PBST میکرولیتر از محلول سوبسترا (۲ میلی‌گرم OPD+۱۰۰ میکرولیتر Detection buffer +۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۳۰٪) به هر چاهک اضافه و چند دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری گردید. برای توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲/۵ مولاراستفاده شد سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه (Bio-Rad) ELISA Reader در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد (۱۲).

تعیین حساسیت تکنیک PCR-ELISA با استفاده از محصول PCR

برای تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی *شیگلادیسانتریه* که می‌تواند توسط این روش شناسایی گردد پس از اندازه‌گیری جذب نوری سریال رقت از DNA ژنومی تهیه و جهت تعیین حساسیت، ابتدا با روش PCR و سپس استفاده با تکنیک PCR-ELISA ارزیابی صورت گرفت، همچنین برای تأیید محصول PCR ژن Stx1 باکتری *شیگلا دیسانتریه* روش دورگه‌سازی به‌کاربرده شد.

تعیین اختصاصیت تکنیک PCR-ELISA با استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای بررسی اختصاصی بودن این تکنیک با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده به همراه *شیگلا دیسانتریه* از دیگر سروگروه های شیگلا و باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مانند *سالمونلاتیفی*، *ویبریوکلرا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *E.coli* O157:H7 استفاده و سپس با تکنیک PCR-ELISA میزان جذب نوری هریک از سوش ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

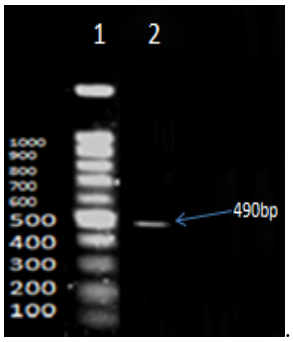
تشخیص نمونه‌های بالینی با استفاده از تکنیک PCR-ELISA

از ۷۰ نمونه بالینی مثبت حاصل از کشت مدفوع با هویت *شیگلادیسانتریه*، *سونئی*، *فلکسنری* مربوط به مراجعه‌کنندگان آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بیمارستان‌ها و مراکز خصوصی استان مازندران که درطی ۳ ماه از اسفند ۹۳ الی اردیبهشت ۹۴ جمع‌آوری‌شده بود، پس از کشت مجدد، تعیین هویت سویه‌ها، استخراج DNA، PCR انجام و سپس با تکنیک PCR-ELISA موردبررسی قرار گرفتند.

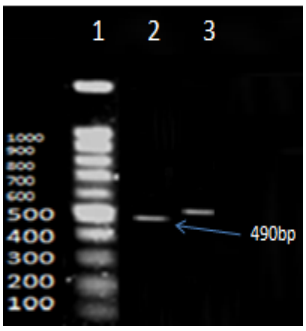
یافته‌ها

بررسی واکنش PCR و نشاندارشدن محصول PCR

واکنش PCR با DNA ژنومی استخراج‌شده سویه *شیگلادیسانتریه* باپرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده مطابق (شکل ۱) انجام گرفت تکثیر قطعه ۴۹۰ جفت بازی مربوط به ژن Stx1 می‌باشد که این دلیل بر صحت قطعات تکثیرشده ازلحاظ اندازه می‌باشد. همان‌طور که در (شکل ۲) نشان داده‌شده است پس از نشان‌دار شدن محصول، باندهای محصولات PCR نشان‌دار شده با DIG-dUTP نسبت به محصول PCR نشان‌دار نشده کمی بالاتر قرارگرفته است که علت این امر وجود دیگوکسیژنین در محصول PCR نشان‌دار شده می‌باشد که باعث سنگین شدن قطعه موردنظر گردیده است.



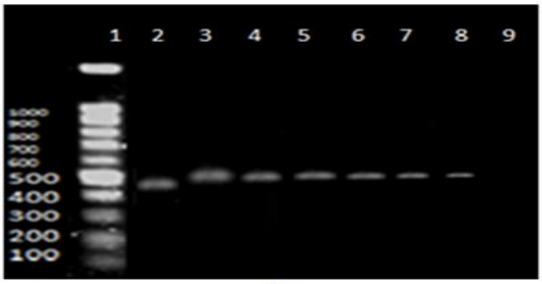
شکل ۱: واکنش PCR با ژنوم استخراج‌شده از *شیگلا دیسانتری*
ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (100bp DNA Ladder)، ستون ۲: محصول PCR از ژنوم *Shigella dysenteriae* (قطعه ۴۹۰bp مربوط به ژن stx1 است)



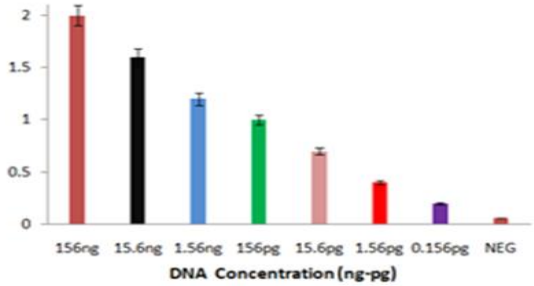
شکل ۲: تصویر ژل آگارز مربوط به نشان‌دار کردن محصول PCR ژنومیک *شیگلا دیسانتریه* به‌وسیله DIG-dUTP. ۱: سایز مارکر ۲: محصول PCR نشان‌دار نشده (stx1) ۳: محصول PCR نشان‌دار شده (stx1)

تعیین حساسیت تکنیک PCR-ELISA با استفاده از DNA ژنومی

پس از تهیه رقت‌های مختلف از DNA ژنومی حداقل غلظت DNA ژنومی که باعث آلودگی می‌شود باروش PCR برابر با pg ۱/۵۶ بوده (شکل ۳ الف) درحالی‌که ۰/۱۵۶ پیکوگرم کمترین غلظت DNA ژنومی می‌باشد (شکل ۳ ب) که از جذب نوری قابل قبولی با تکنیک الیزا برخوردار می‌باشد.



الف



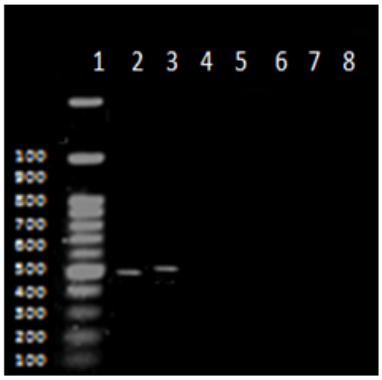
ب

شکل ۳: بررسی میزان حساسیت تکنیک PCR-ELISA

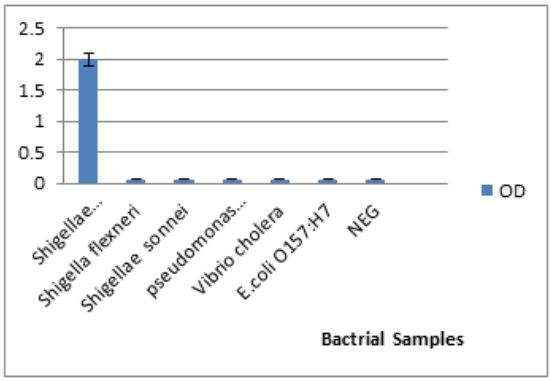
الف) تصویر ژل آگارز مربوط به بررسی میزان حساسیت تکنیک PCR-ELISA با نمونه DNA ژنومی *شیگلا دیسانتریه* ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- ۱۵۶ng محصول PCR نشان‌دار نشده ۳ تا ۹ رقت ۱۵۶ng تا pg ۰/۱۵۶ محصول PCR نشان‌دار شده. ب) تعیین حساسیت PCR-ELISA با استفاده از محصول PCR ژن Stx1

تعیین اختصاصیت تکنیک PCR-ELISA

در این روش برای بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی‌شده علاوه بر *شیگلادیسانتریه* و *شیگلاسونئی* و *فلکسنری* از دیگر سویه‌های خانواده انتروباکتریاسه استفاده شد که به‌غیراز *شیگلادیسانتریه* هیچ باندی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (شکل ۴ الف) و در بررسی با درروش PCR-ELISA میزان جذب نوری در نمونه *شیگلادیسانتریه* از میزان جذب بالاتری برخوردار درحالی‌که جذب نوری دیگر سویه‌ها پایین‌تر از مقادیر کنترل بود (شکل ۴ ب).



الف



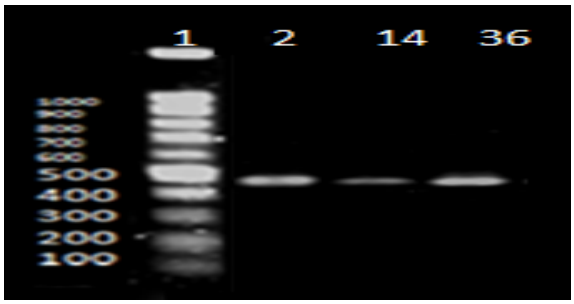
ب

شکل ۴: تعیین اختصاصیت PCR

الف) ژل آگارز مربوط به تعیین اختصاصیت PCR ژن Stx1: ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- محصول PCR نشان‌دار نشده ژن Stx1 شیگلا دیسانتریه ۳- محصول PCR نشان‌دار شده ژن Stx1 *شیگلا دیسانتریه* ۴- *شیگلا فلکسنری* ۵- *شیگلا سونئی* ۶- *سودوموناس آئروژینوزا* ۷- *ویبریوکلرا* ۸- *E.coli* O157:H7 ب) بررسی تعیین اختصاصیت روش PCR-ELISA

بررسی نمونه‌های بالینی با استفاده از تکنیک PCR-ELISA

برای کاربردی نمودن این تکنیک، تعداد ۷۰ نمونه بالینی که با هویت *شیگلادیسانتریه*، *فلکسنری* و *سونئی* که در طی سه ماه از اسفند ۹۳ تا اردیبهشت ۹۴ از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بیمارستان‌ها و مراکز خصوصی از استان مازندران جمع‌آوری و با این تکنیک موردبررسی قرار گرفتند ۳ نمونه حاوی ژن Stx1 بوده است که نتایج به‌دست‌آمده از PCR (شکل ۵ الف) نشان داد نمونه‌های مثبت از میزان جذب نوری قابل قبولی برخوردار می‌باشند همچنین این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از طریق کشت کاملاً مطابقت داشت.



شکل ۵: بررسی نمونه‌های بالینی حاوی ژن Stx1. ۱- نشانگر اندازه DNA ۲ تا ۴- PCR ژن Stx1 از نمونه‌های بالینی مثبت

بحث

از خانواده انتروباکتریاسه *شیگلادیسانتریه* تیپ ۱ که به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای روده‌ای در انسان محسوب می‌شود (۱۳) به دلیل تولیدتوکسینی بنام شیگاتوکسین که دارای خاصیت نوروتوکسیک، سیتوتوکسیک و انتروتوکسیک می‌باشد (۱۴) علت مهم مرگ‌ومیر در کودکان زیر ۵ سال و افراد مسن به دلیل ابتلا به بیماری‌هایی مانند تشنج، انسفالوپاتی، فلج عصبی، اختلال انعقاد داخل عروقی، کم‌خونی شدید، ترومبوسیتوپنی، تعدیل سیستم ایمنی، گاستروانتریت، سندروم Ekiri، Hus و دیسانتری می‌باشد (۱۰). ازآنجایی‌که این باکتری انتشار آن به‌صورت جهانی و در ایران به‌صورت اندمیک می‌باشد به‌عنوان تهدیدی جدی برای سلامت بخصوص در کودکان محسوب شده (۱۵)، لذا روش‌های شناسایی توکسین شیگا درشیگلا *دیسانتریه*، نحوه پیشگیری ودرمان آن‌ها از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار می‌باشد. روش‌های کلاسیک مانند کشت سلولی، الیزا و RPLA اگرچه از حساسیت بالایی در شناسایی این توکسین برخوردار می‌باشند، اما به دلیل داشتن معایبی از قبیل آهسته بودن، صرف وقت و هزینه زیاد، مشکل در استاندارد نمودن، نیاز به افراد باتجربه، محدودیت در اختیار داشتن امکاناتی نظیر کشت سلولی و آنتی‌توکسین مخصوص جهت خنثی‌سازی و نیاز به آنتی‌بادی‌های مونو و پلی کلونال ضد توکسین استفاده چندانی از آن نمی‌شود (۱۶-۱۷). روش‌های تشخیص ملکولی مانند PCR، Real time و دورگه‌سازی با توجه به پیشرفت‌های روزافزون در زمینه تشخیص توکسین شیگا هنوز دارای معایب می‌باشند. تکنیک ملکولی PCR که از سال ۱۹۸۹ (توسط Karch) تا حال که به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی شیگاتوکسین ها کاربرد دارد با توجه به اینکه از سرعت، اختصاصیت و حساسیت بیشتری نسبت به روش‌های گفته‌شده برخوردار می‌باشد به دلیل استفاده روزمره از ماده سرطان‌زای اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی ژل، خطر آلودگی کارکنان آزمایشگاهی و محیط را بالامی برد. همچنین محدودیت در تعداد نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان از دیگر مواردی است که تکنیک PCR را درزمانی که گسترش بیماری به‌صورت پاندمی و آندمی ظاهر می‌شود با مشکل روبرو ساخته است (۱۸). از سپتامبر ۲۰۰۱ توسط Fortin تا حال مطالعات متعددی در مورد جداسازی شیگاتوکسین ها با استفاده از روش Real time صورت گرفته است، اما با توجه به داشتن اختصاصیت ۱۰۰ درصدی و حساسیت بالای واکنش به دلیل ناتوانی این تکنیک در برآورد اندازه محصول تکثیرشده و استفاده از پروب‌های فلورسنس دار مخصوص و هزینه بالا و کمبود افراد ماهر و باتجربه این روش را با محدودیت مواجه نموده است (۱۹). روش دورگه‌سازی برای شناسایی شیگاتوکسین ها که درسال ۱۹۹۱ توسط Thomas و همکارانش ارائه شد با توجه به اینکه یک تکنیک مولکولی مؤثر، بسیار حساس و اختصاصی با استفاده از مواد غیر رادیواکتیو مانند دیگوکسیژنین و بیوتین می‌باشد، اما به دلیل عدم کارایی آن در مورد تعداد زیاد نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی موردتوجه واقع نشده است (۲۰). اگرچه محققین یکی پس از دیگری سعی در برطرف نمودن معایب روش‌های پیشین نموده‌اند، ولی تلاش برای روش‌های جدیدی که در آن برخی از معایب روش‌های قبلی برطرف شده باشد و یا نسبت به روش‌های قبل از حساسیت و سرعت عمل بیشتری برخوردار باشد، پیوسته مدنظر محققین بوده است. با توجه به نکات فوق در این تحقیق روش مولکولی بر پایه هیبریداسیون محصول PCR به همراه پروب اختصاصی طراحی‌شده تحت عنوان تکنیک PCR-ELISA باهدف رفع معایب گفته به دلیل ساده بودن مراحل کار که شامل انتقال،

افزایش وانکوباسیون می‌باشد وبه دلیل استفاده از پروب اختصاصی برای بالا بردن حساسیت واکنش و عدم به‌کارگیری مواد رادیواکتیو، جهت شناسایی سریع و اختصاصی توکسین شیگا در *شیگلا دیسانتریه* به‌عنوان یک روش شناسایی کم‌خطر، مناسب و قابل‌اعتماد برای اولین بار بکار گرفته شد. در سال ۲۰۰۱ برای اولین بار Beilei و همکارانش و در همین سال Fach و همکارانش با تکنیک PCR-ELISA در مدت ۵ ساعت با ۳۰ سیکل تکثیری با حساسیت $۱۰^{۶}$ از DNA ژنومی توانستند *E.coli* O157:H7 راشناسایی نمایند (**۲۱**). *E.coli* O157:H7 در سال ۲۰۰۲ توسط Daly و همکارانش با تکنیک PCR-ELISA در مدت ۵ ساعت با ۳۰-۳۵ سیکل تکثیری با حساسیت $۱۰^{۵}$ از DNA ژنومی شناسایی شد (**۲۲**). Morata و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که باکتری بروسلا با حساسیت $۱۰^{۸}$ از DNA ژنومی با ۳۰ سیکل تکثیری در مدت ۵ ساعت قابلیت شناسایی دارد (**۲۳**). در سال ۲۰۰۷ Mousavi و همکارانش توانستند باکتری *ویبریوکلرا* را با تکنیک PCR-ELISA در مدت ۴ ساعت با حداقل ۵ سیکل تکثیری و با حساسیت $۱۰^{۵}$ از DNA ژنومی مورد شناسایی قرار دهند (**۲۴**). *سالمونلا تیفی* در سال ۲۰۰۸ توسط Mousavi و همکارانش با تکنیک PCR-ELISA در مدت ۴ ساعت با ۳۰-۸ سیکل تکثیری با حساسیت $۱۰^{۷}$ از DNA ژنومی شناسایی شد (**۲۵**). Elmi و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* با حساسیت $۱۰^{۳}$ از DNA ژنومی با ۳۰ سیکل تکثیری در مدت ۵ ساعت قابلیت شناسایی دارد (**۲۶**). Esfandiyari و همکارانش در سال ۲۰۱۴ توانستند در مدت ۴ ساعت با ۱۰ سیکل تکثیری ژن LT توکسین را با حساسیت $۱۰^{۶}$ با این تکنیک شناسایی نمایند (**۲۷**)، اما نتایج ما در تحقیق حاضر نشان داد *شیگلادیسانتریه* در مدت ۴ ساعت با ۳۰ سیکل تکثیری و با حساسیت $۱۰^{۶}$ از DNA ژنومی با تکنیک PCR-ELISA قابلیت شناسایی دارد.

از این مطالعه می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری نمود که روش PCR-ELISA نسبت به بقیه روش‌های تشخیصی دارای چندین مزیت می‌باشد: به دلیل ترکیب شدن محصول PCR با یک مرحله دورگه‌سازی صحت کار بالا می‌رود، استفاده از پلیت های میکروتیتر امکان بررسی ۹۶ نمونه به‌طور هم‌زمان وجود دارد و حساسیت و اختصاصیت آن بیشتر و زمان تشخیص کاهش به‌طوری‌که حساسیت این روش برای تشخیص سم Stx1 در *شیگلادیسانتریه* ۱۰۰ برابر بیشتر از روش الکتروفورز ژل آگارز بوده و در مدت ۴ ساعت شناسایی می‌شود. عدم نیاز به دستگاه ژل داکت، اتاق تاریک، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌های لکه‌گذاری ساترن و عدم استفاده از مواد گران‌قیمت که درروش Real-time بکار می‌رود از دیگر محاسن این تکنیک محسوب می‌شود. ازآنجاکه این تکنیک به‌راحتی قابلیت استاندارد شدن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی داشته و روشی سریع و در مدت‌زمان کوتاه قابل‌اجرا می‌باشد و در ضمن ریسک آلودگی برای کارکنان آزمایشگاه کاهش می‌یابد به نظر می‌رسد یک روش آزمایشگاهی مناسب و قابل‌اعتماد برای تشخیص شیگاتوکسین ها باشد.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا... آملی است.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Kim SH, Lee SR, Kim KS, Ko A, Kim E, Kim YH, Chang KT. Shiga toxin A subunit mutant of Escherichia coli O157:H7 releases outer membrane vesicles containing the B-pentameric complex. FEMS Immunol Med Microbiol 2010;58(3):412-20.
2. Cherla RP1, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. FEMS Microbiol Lett 2003; 228(2):159-66.
3. Lingwood CA1. Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. Methods Mol Med 2003;73:165-86.
4. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. Toxins 2010; 2(7):1612-45.
5. Huang A, Friesen J, Brunton JL. Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of

Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1987;169(9):4308-12.

6. Waren BR, Parsh ME, Schneider KR. Shigella as foodborne pathogen and current methods for detection in food. Crit Rev Food Sci Nutr 2006; 46(7):551-67.
7. Green MS, Block C, Cohen D, Slater PE. Our decades of shigellosis in Israel: epidemiology of a growing public health problem. Rev Infect Dis 1991;13(2):248-53.
8. Sandvig K. Shiga toxins. Toxicon 2001;39(11):1629-35.
9. Siegler RL. Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. JAMA 2003; 290(10):1379-81.
10. O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. Microbes Infect 2001;3(6):493-507.
11. Teel LD, Steinberg BR, Aronson NE, O'Brien AD. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated kidney failure in a 40-year-old patient and late diagnosis by novel bacteriologic and toxin detection methods. J Clin Microbiol 2003;41(7):3438-40.
12. Crowther JR. ELISA. Theory and practice. Methods Mol Biol. 1995;42:1-218.
13. Hesaraki M, Saadati S, Honari H, Olad G, Ranjbar R, Heiat M, Tat M. Induction of immune response against IpaD N-terminal region of Shigella dysenteriae in Guinea pigs. G3M 2011, 9(1): 2261-2266. [in persion]
14. Pina DG, Johannes L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications.Toxicon 2005;45(4):389-93.
15. MoezArdalan K, Zali MR, Dallal MM, Hemami MR, Salmanzadeh-Ahrabi S. Prevalence and pattern of antimicrobial resistance of Shigella species among patients with acute diarrhoea in Karaj, Tehran, Iran. Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2003;21(2):96-102. [in persion]
16. Feng P, Sandlin RC, Park CH, Wilson RA, Nishibuchi M. Identification of a rough strain of Escherichia coli O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2339-41.
17. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. J Clin Microbiol 1996; 34(11): 2812–2814.
18. Son I, Binet R, Maounounen-Laasri A, Lin A, Hammack TS, Kase JA. Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. Food Microbiol 2014;40:31-40.
19. Margot H, Cernela N, Iversen C, Zweifel C, Stephan R. Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of shiga toxin 1 and 2 gene subtypes and 2 gene subtypes. J Food Prot 2013;76(5):871-3.
20. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. J Clin Microbiol 1996;34(11):2812-4.
21. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains.J Appl Microbiol 2001;90(5):809-18.
22. Daly P, Collier T, Doyle S.PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. Lett Appl Microbiol 2002;34(3):222-6.
23. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Cárdenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 2003;41(1):144-8.
24. 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. [in persion]
25. Mousavi SL, Salimiyan J, Karimi Rahgerdi A, Amani J, Nazarian S, Ardestani H. A rapid and specific PCR–ELISA for detecting *Salmonella typhi*. Iranian J Clin Infect Dis 2006;1(3): 113-119. [in persion]
26. Elmi A, Forouzandeh M, Bojary MR. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in stool specimen by PCR-ELISA of ureC gene. MJMS 2011;13(4):67-76. [in persion]
27. 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):114-12. [in persion]