



شناسایی جدایه‌های *شرشیا کلی* جدا شده از آب سواحل بوشهر با روش PCR

زهره رحیمی^{۱*} (MSc)، عباس بهادر^۲ (PhD)، مسعود عظیم‌زاده^۱ (MSc)، محمدعلی حقیقی^۱ (PhD) و^{۳*}

^۱ گروه میکروپزشناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۲ گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۳ - پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۹)

چکیده

زمینه: تشخیص با روش‌های استاندارد نتوانسته است تمام مشکلات تشخیصی *شرشیا کلی* را حل نماید. اما با گسترش مطالعات ژنومیک، به نظر می‌رسد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توان کافی برای حل این مشکل را داشته باشد. هدف از این مطالعه تشخیص جدایه‌های محیطی *شرشیا کلی* با کاربرد روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای قطعات ژن‌های *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* بود. مواد و روش‌ها: شناسایی ملکولی *شرشیا کلی* با آزمایش‌های PCR و پرایمرهای چهارگانه فوق بر روی DNA ژنومی تخلیص شده از ۱۲۰ جدایه محیطی *شرشیا کلی* به همراه سویه‌های استاندارد شیگلا و سویه‌های انتروهموراژیک *شرشیا کلی* به عنوان کنترل انجام شد. کلیه جدایه‌های محیطی مورد استفاده در یک مطالعه قبلی از آب سواحل بوشهر جداسازی و با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی شناسایی شده و سپس جهت مطالعات بعدی در دمای منفی ۷۰ نگهداری شده‌اند.

یافته‌ها: پرایمرها قدرت شناسایی اهداف خود را در جدایه‌های محیطی و سویه‌های استاندارد داشتند. مشخص گردید به‌طور هم‌زمان چهار قطعه مربوط به ژن‌های *lacY* و *cyd*، *uidA*، *lacZ* فقط در جدایه‌ها و سویه‌های *شرشیا کلی* وجود دارند. این روش PCR قدرت جداسازی *شرشیا کلی* را از شیگلا، به‌عنوان نزدیک‌ترین جنس فیلوژنیک، داشته و برخلاف روش‌های کلاسیک، توانست سویه انتروهموراژیک را به عنوان *شرشیا کلی* تشخیص دهد.

نتیجه‌گیری: روش PCR طراحی شده برای قطعات ژن‌های *lacY* و *cyd*، *uidA*، *lacZ* دقت لازم برای شناسایی و جداسازی *شرشیا کلی* از گونه‌های بسیار مشابه را داشته بنابراین به‌عنوان یک روش ملکولی قابل اطمینان در تشخیص *شرشیا کلی* معرفی می‌گردد.

واژگان کلیدی: *شرشیا کلی*، میکروارگانیسم شاهد، شناسایی مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

^{**}بوشهر، گروه میکروپزشناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

Email: mahaghighy@gmail.com

*ORCID: 0000-0001-9191-5633

**ORCID: 0000-0003-1876-3658

مقدمه

تشخیص *اشرشیا کلی* از جنبه‌های مختلف پزشکی و محیطی برای سلامت انسان مهم است. *اشرشیا کلی* باکتری فلورای غالب روده انسان و سایر حیوانات خون گرم است (۱). تکوین سویه‌های بیماری‌زا از این باکتری سبب توسعه بیماری‌زایی این باکتری شده به‌طوری‌که علاوه بر عفونت‌های بیمارستانی، به عنوان عامل بعضی از عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای انسان نیز شناخته شده است (۲). گسترش جوامع بشری در کنار سواحل سبب ورود فاضلاب‌ها به آب دریاها به‌ویژه در مناطق در حال توسعه شده و این آلودگی سلامت انسان و اکوسیستم دریاها را به خطر انداخته است (۳). شناسایی *اشرشیا کلی* به‌عنوان مهم‌ترین شاخص آلودگی مدفوعی، اهمیت بسزایی در پایش مستمر اکوسیستم آب و مدیریت آلودگی آب سواحل دارد (۳ و ۴). تشخیص *اشرشیا کلی* در منابع آب بر اساس روش لوله‌های تخمیری (Multiple tube fermentation) نیاز به شناسایی کلنی‌های جدا شده و مشکوک به *اشرشیا کلی* از لوله‌های تخمیری با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی دارد (۵). روش‌های استاندارد مورد استفاده در تشخیص *اشرشیا کلی* بر اساس کشت و رشد بر روی محیط‌های انتخابی، تخمیر لاکتوز و آزمایش‌های بیوشیمیایی است (۱، ۴ و ۶). گرچه این روش‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند اما دارای محدودیت‌هایی از قبیل اختصاصیت پایین، دوره نگهداری طولانی (۷۲-۴۸ ساعت)، امکان آلودگی با سایر باکتری‌ها و عدم توانایی تشخیص سویه‌های *اشرشیا کلی* زنده غیرقابل کشت می‌باشند (۱ و ۴). حجم زیاد آزمایش‌های تشخیصی در روش‌های استاندارد، پایش مستمر شناسایی آلودگی منابع آب محیطی را دشوار نموده و نیاز به روش‌های قابل اطمینان

و سریع را مطرح می‌نماید. اصول روش‌های استاندارد بیوشیمیایی در تشخیص و افتراق جنس و گونه باکتری‌های کلی‌فرم و *اشرشیا کلی* بر اساس فعالیت آنزیم‌هایی نظیر بتا-دی گلوکورونیداز و بتا گالاکتوزیداز می‌باشد (۷)، در حالی‌که در مراحل تکوین بعضی از سویه‌های پاتوژن *اشرشیا کلی* نظیر سویه O157 هر چند ژن بتا-دی گلوکورونیداز (*uidA*) در آن‌ها حفظ شده ولی این ژن بیان نمی‌شود. لذا روش‌های استاندارد قادر به شناسایی این سویه به عنوان *اشرشیا کلی* نیستند (۱ و ۸). به دلیل وجود محدودیت در آزمایش‌های استاندارد، روش‌های ملکولی نظیر PCR از دو جنبه، یکی شناسایی باکتری *اشرشیا کلی* (۱) و دیگری شناسایی سویه‌های بیماری‌زای (پاتوتیپ) این باکتری مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹ و ۱۰). PCR یک تکنیک پیشرفته و سریع برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها است (۱، ۴ و ۶) و می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین، بر مشکلات روش‌های تشخیص استاندارد *اشرشیا کلی* غلبه کند. کاربرد PCR در شناسایی جنس و گونه باکتری‌های شاخص آلودگی مدفوعی و یا باکتری‌های کلی‌فرم اولین بار توسط بژ (Bej) و همکاران با استفاده از دو جفت پرایمر *Uida* و *LacZ* بررسی شد (۶، ۱۱ و ۱۲). در ادامه مشخص گردید که این دو ژن اختصاصی *اشرشیا کلی* نبوده، به‌طوری‌که ژن *lacZ*، ژن کد کننده بتا-دی گالاکتوزیداز، علاوه بر *اشرشیا کلی* در تمام باکتری‌های کلی‌فرم و ژن *uidA*، ژن کد کننده بتا-دی گلوکورونیداز، در ۹۴ درصد از سویه‌های *اشرشیا کلی* و همچنین در باکتری‌های *سالمونلا*، *شیگلا*، *فلاووباکترها* وجود دارد (۱ و ۴). در مطالعه مولینا (Molina) و همکاران برای افزایش اختصاصیت تشخیص ملکولی و ژنومی *اشرشیا کلی* از ژن *yaio* به

همراه ژن *lacZ* استفاده شد. اما نتایج آن‌ها نشان داد که ژن *yaio* در پاتوتیپ انتروهموراژیک / شرشیا کلی (O157:H7) وجود نداشته و با این روش شناسایی این پاتوتیپ مهم در آب امکان‌پذیر نبود (۴). بنابراین در تحقیقات انجام شده توسط هوراکاوا (Horakova) و همکاران علاوه بر ژن *lacZ* و *uidA* از ژن *cyd* که کد کننده سیتوکروم bd کمپلکس است، استفاده شد. نتایج آن‌ها نشان داد ژن *cyd* در سایر باکتری‌های روده‌ای نظیر *سراشیا مارسسنس*، *سالمونلا*، *سیتروباکتر فروندی*، *کلبسیلا پنمونیه*، *یرسینیا پستیس* و *روتلا* نیز وجود دارد بنابراین اختصاصیت لازم برای تشخیص / شرشیا کلی را ندارد (۱ و ۶). هوراکاوا و همکاران به منظور افزایش اختصاصیت شناسایی / شرشیا کلی در مطالعه دیگری ژن *lacY* کد کننده لاکتوز پرمناز، را به مجموعه سه ژن قبل اضافه کردند (۱). هرچند ژن *lacY* نیز در سایر باکتری‌های گرم منفی تخمیرکننده لاکتوز وجود دارد اما نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که آزمایش حضور همزمان ۴ ژن *uidA*، *lacZ*، *cyd* و *lacY* اختصاصیت و اعتبار لازم برای شناسایی / شرشیا کلی در تمامی سویه‌های مختلف محیطی و کلینیکی از سایر باکتری‌های مشابه را دارد به‌طوری‌که می‌تواند / شرشیا کلی و شیگلا که از نظر فیزیولوژیکی و ژنتیکی خویشاوندی نزدیکی با هم دارند را افتراق دهد (۱۳). تشخیص / شرشیا کلی با روش PCR در طی مطالعات قبلی در ایران گزارش شده است. دهقان و همکاران از دو ژن *uidA* و *lacZ* و ابطحی و همکاران از ژن 16SrRNA برای شناسایی / شرشیا کلی استفاده کردند (۱۴ و ۱۵). نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که این روش‌ها از اختصاصیت کافی برای شناسایی / شرشیا کلی در نمونه‌های آب و سایر

نمونه‌ها برخوردار نمی‌باشند (۱ و ۱۵).

هدف از مطالعه حاضر کاربرد PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *uidA*، *lacZ*، *cyd* و *lacY* برای تشخیص جدایه‌های محیطی / شرشیا کلی جدا شده از آب سواحل بوشهر و مقایسه آن با نتایج تشخیص با روش استاندارد باکتری‌شناسی بود.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه

این مطالعه توصیفی تحلیلی و از نوع مقطعی (Cross sectional) بوده و مطابق با قوانین تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با کد اخلاق در پژوهش: IR.BPUMS.REC.۱۳۹۴.۱۳۲ در فاصله سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ انجام شد.

جمع‌آوری سویه‌های باکتری

از ۱۲۰ جدایه محیطی / شرشیا کلی که در یک مطالعه قبلی از مناطق مختلف سواحل بوشهر جدا شده بودند استفاده شد. جدایه‌های محیطی / شرشیا کلی از زمان جداسازی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در بانک میکروبی گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شده‌اند. از سویه‌های کلینیکی انتروهموراژیک / شرشیا کلی (G4S45، G4S42)، شیگلا فلکسنری ATCC12022 و شیگلا سونئی ATCC 9290 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

روش بیوشیمیایی تعیین هویت جدایه‌های محیطی / شرشیا کلی

جداسازی و شناسایی جدایه‌های محیطی قبلاً توسط گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی بوشهر انجام شده

الکتروفورز در ژل آگارز (Invitrogen) با غلظت‌های متفاوت (۱ الی ۲/۵ درصد) و با استفاده از بافر TAE، رنگ ایمن فلورسین DNA (DS1000) ساخت کره، مارکرهای ملکولی DNA (SMOBiO-DM1100) و (SMOBiO-DM2300) ساخت کره در دمای اتاق و ولتاژ ۷۵ انجام شد. سپس نتایج الکتروفورز با روش عکس‌برداری تحت نور UV با کمک دستگاه BIO-RAD Gel doc (BioDuc-It) ساخت شرکت ذخیره و برای آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

آنالیز بیوانفورماتیک و ردیف بازی پرایمرها

ترادف و وزن محصولات حاصل از پلیمریزاسیون هر یک از پرایمرهای انتخاب شده قبل از سفارش، توسط نرم‌افزار بر خط پرایمر بلاست <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> در شبکه NCBI مورد پیش‌بینی اولیه قرار گرفت. جدول ۱ ترادف هر یک از پرایمرها را نشان می‌دهد. اختصاصیت پرایمرها با روش PCR و استفاده از سویه‌های کنترل برای ژن‌های هدف آزمایش شد.

است. در طی مراحل تشخیص از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی مربوط به شناسایی خانواده انتروباکتریاسه شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز، ONPG و کشت بر روی محیط‌های آزمایشگاهی TSI، سیمون سیترا، متیل رد، SIM، اوره، استفاده شد (کلیه مواد و محیط‌های کشت از شرکت Merck).

استخراج آنزیمی DNA ژنومی

یک کشت شبانه از کلنی‌های مجزای هر یک از جدایه‌های محیطی و سویه‌های استاندارد انتروهموراژیک اشرشیا کلی و شینگلا درون محیط نوترینت مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت شیکر ۲۰۰ RPM (Round per minute) تهیه شد. ژنوم باکتری‌ها از سوسپانسیون میکروبی به‌دست‌آمده در فاز رشد لگاریتمی بر اساس دستورالعمل کیت استخراج ژنوم باکتریایی شرکت Gene All ساخت کره استخراج گردید.

الکتروفورز در ژل آگارز

برای بررسی بازدهی تخلیص آنزیمی DNA در هر جدایه از روش الکتروفورز استفاده شد. مراحل

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ملکولی سویه‌های محیطی اشرشیا کلی			
پرایمر	توالی پرایمر 5'-3'	بهینه دمای Annealing (°C)	محصول PCR (bp)
UidA F UidA R	ATC GGC GAA ATT CCA TAC CTG GTT CTG CGA CGC TCA CAC C	۵۵	۳۱۹
LacY F LacY R	ACC AGA CCC AGC ACC AGA TAA G GCA CCT ACG ATG TTT TTG ACC A	۵۵	۴۶۳
LacZ F LacZ R	ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA	۵۸	۲۶۵
Cyd F Cyd R	CCG TAT CAT GGT GGC GTG TGG GCC GGC TGA GTA GTC GTG GAA G	۵۸	۳۹۳
R: Reverse primer. F: Forward primer			Reference(۱)

در جدول ۲ در حجم ۲۵ میکرولیتر و با حداقل دو بار تکرار انجام شد. واکنش پلیمریزاسیون DNA در سه برنامه متوالی توسط دستگاه ترموسایکلر مدل T100 ساخت شرکت BIO-RAD اجرا گردید. در برنامه اول نمونه‌ها در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه

آزمایش PCR

ابتدا با استفاده از PCR شیب دمایی (Temprature gradient PCR)، دمای مناسب آنیلینگ (Anealing) پرایمرها انتخاب گردید (جدول ۱). آزمایش PCR با استفاده از واکنش‌گرهای موجود

با روش الکتروفورز در ژل آگارز ۲/۵ درصد بررسی شدند. سپس نتایج حاصل از الکتروفورز با استفاده از نور UV توسط دستگاه Gel doc (BioDoc-It) ساخت شرکت BIO-RAD عکس برداری و برای آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

قرار گرفتند و در برنامه دوم ۳۰ سیکل متوالی از دمای ۹۴، دمای Annealing اختصاصی برای هر پرایمر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر یک به مدت ۳۰ ثانیه اجرا گردید. در پایان دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اضافه گردید. پس از خاتمه PCR، محصولات واکنش

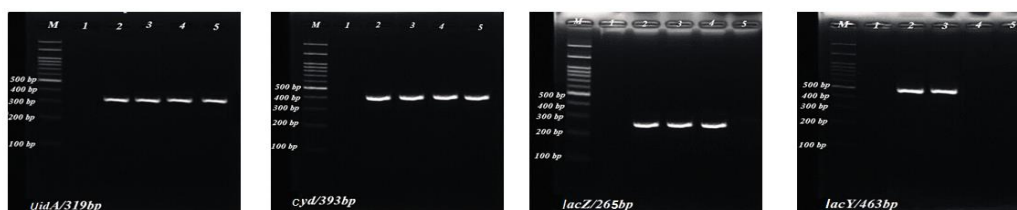
جدول ۲) واکنش‌گرهای PCR و حجم‌های مورد نیاز			
واکنش‌گرها	شرکت سازنده	غلظت	حجم به میکرو لیتر
Master Mix Red	آمپلیکون (Amplicon)	۲X	۹
Primer forward	ماکروژن (Macrogen)	۱۰p mol/μl	۱
Primer reverse	ماکروژن (Macrogen)	۱۰p mol/μl	۱
Genomic extracted DNA	کیت ژین آل (Gene-All)	۱/۲۰۰	۲
Sterile injection distilled water	دارو پخش	-	۱۲

یافته‌ها

lacY و *cyd*، *uidA*، *lacZ* می‌تواند اشرشیا کلی را با وجود شباهت ژنتیکی و فیزیولوژیکی زیاد از شیگلا تشخیص دهد. مطابق نتایج ارایه شده در شکل ۱ ژن‌های *uidA* و *cyd* در تمامی سویه‌های شیگلا و اشرشیا کلی مثبت می‌باشند. ژن *lacZ* در تمام سویه‌ها بجز شیگلا فلکسنسری در حالی که ژن *lacY* تنها در اشرشیا کلی مشاهده شد. در نتیجه، الگوی پاسخ مثبت هر چهار ژن فقط در باکتری اشرشیا کلی مشاهده شد (شکل ۱).

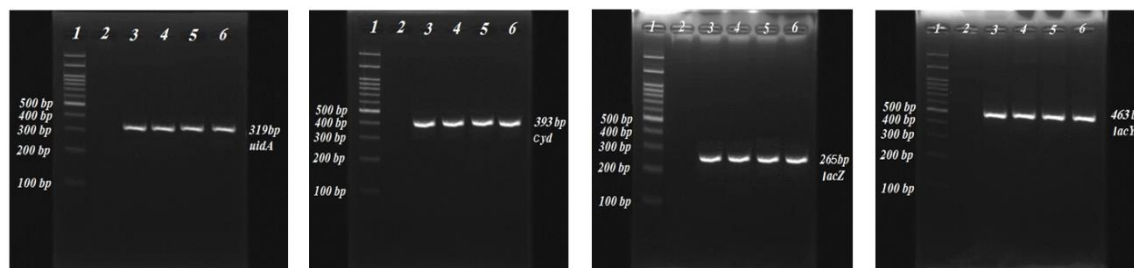
اختصاصیت پرایمرها برای ژن‌های هدف

در آزمایش PCR با کاربرد هریک از پرایمرهای چهارگانه *LacY*، *Uida*، *LacZ*، *Cyd* مشخص گردید که این پرایمرها قدرت شناسایی ژن‌های هدف در DNA ژنومی استخراج شده از سویه‌های کنترل مثبت را داشته (شکل ۱) و محصولات PCR با وزن قابل پیش‌بینی تولید کردند (جدول ۱). نتایج به‌دست آمده همچنین نشان داد الگوی پاسخ PCR ژن‌های



شکل ۱) اختصاصیت پرایمرهای تشخیصی، *LacY*، *Uida*، *LacZ*، *Cyd* در سویه‌های کنترل. M: مارکر مولکولی DM2300. ۱: کنترل منفی، ۲: اشرشیا فلکسنسری (ATCC9290)، ۳: اشرشیا کلی (G4S45)، ۴: شیگلا سونئی (G4S42)، ۵: شیگلا فلکسنسری (ATCC12022).

آزمایش دارای ژن‌های هدف بوده و به عنوان اشرشیا کلی شناسایی شدند. شکل ۲ نتایج پاسخ PCR ژن‌های مذکور را در کنار کنترل‌های مثبت و منفی در بعضی از جدایه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. تشخیص PCR با ژن‌های ۴ گانه با نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی جدایه‌های محیطی هماهنگ بود.



شکل ۲) الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای LacY و Cyd، UidA، LacZ برای تشخیص جدایه‌های محیطی اشرشیا کلی. چاهک‌های شماره ۱: مارکر DM 2300. ۲: کنترل منفی، ۳: انترو همورژیک اشرشیا کلی (G4S42) به عنوان کنترل مثبت، ۴: جدایه محیطی اشرشیا کلی ۵: جدایه محیطی اشرشیا کلی ۱۰۰: جدایه محیطی اشرشیا کلی ۲۳۰. جدایه‌های محیطی اشرشیا کلی همانند سویه کنترل مثبت دارای پاسخ مثبت PCR برای تمامی پرایمرهای تشخیصی هستند.

بحث

کلینیکی بویژه در مناطق در حال توسعه انجام شده است (۹ و ۱۰). علاوه بر این، تشخیص حضور کلی‌فرم‌ها بویژه اشرشیا کلی از جنبه‌های زیست محیطی، بهداشت آب و مواد غذایی دارای اهمیت می‌باشد. با توجه به اقلیم گرم و مرطوب و وجود زیستگاه‌های آب محیطی در منطقه بندر بوشهر، تشخیص اشرشیا کلی جهت پایش مستمر کنترل کیفی آب شرب و آب‌های ساحل بسیار حائز اهمیت است. تشخیص و افتراق کلی‌فرم‌ها و اشرشیا کلی بر اساس روش‌های استاندارد مبتنی بر تخمیر لاکتوز و آزمایش‌های بیوشیمیایی می‌باشد، اما هیچکدام توانایی پاسخ‌گویی به تمامی ابعاد تشخیصی اشرشیا کلی را ندارد (۱ و ۸). بنابراین تشخیص اولیه اشرشیا کلی علاوه بر مطالعات این میکروارگانیسم به عنوان شاخص شناسایی آلودگی آب و مواد غذایی، در شناسایی پاتوتیپ‌های بیماری‌زا نیز دارای اهمیت ویژه است (۱۶). تاکنون روش‌های ملکولی مختلفی بر مبنای PCR معرفی شده‌اند

تشخیص جدایه‌های محیطی اشرشیا کلی با روش

PCR

نتایج آزمایش PCR برای قطعات ژن‌های *uidA*، *lacZ* و *cyd* بر روی DNA ژنومی تخلیص شده از ۱۲۰ جدایه محیطی اشرشیا کلی، سویه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد

پدیده انتقال افقی ژن (Gene horizontal transfer) هر چند سبب تکامل و تکوین سویه‌ها و گونه‌های جدید می‌گردد ولی مشکلاتی را نیز در تشخیص، هم از جنبه شناسایی اشرشیا کلی از دیگر جنس‌های کلی‌فرم یا باکتری‌های هم منشأ با آن نظیر شیگلا و هم از جنبه شناسایی سویه‌های بیماری‌زای اشرشیا کلی از یکدیگر ایجاد کرده است. تشخیص باکتری اشرشیا کلی از ابعاد مختلفی حایز اهمیت است اما تبدلات ژنتیکی به همراه حفظ شدن ژن‌های ضروری اشرشیا کلی در بسیاری از باکتری‌ها بویژه در کلی‌فرم‌ها و سایر باکتری‌های مشابه، تشخیص را پیچیده و دشوار کرده است (۴). شناسایی پاتوتیپ‌های اشرشیا کلی که توانایی ایجاد انواعی از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای در انسان را دارند از لحاظ کلینیکی، حایز اهمیت بوده (۱) و تحقیقات متعددی برای شناسایی ملکولی آن‌ها در نمونه‌های

که همگی سعی بر تشخیص سریع و قابل اعتماد جنس و گونه /شرشیا کلی داشته‌اند. شناسایی ملکولی با روش PCR بر اساس کاربرد ۲ ژن (*lacZ uidA*) و ۳ ژن (*lacZ uidA cyd*) دقت کافی برای تشخیص /شرشیا کلی را نداشته و همگی منجر به تشکیل پاسخ‌های کاذب می‌شدند (۶) این قبیل اشتباه در تشخیص می‌تواند به دلیل حفاظت‌شدگی ژن‌های هدف در باکتری‌های دیگر و یا شباهت متابولیسمی و خویشاوندی نزدیک /شرشیا کلی با شیگلا باشد (۱۳).

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، ژن *lacZ* کد کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز که از بارزترین ویژگی‌های باکتری‌های کلی‌فرم می‌باشد در سویه‌های شیگلا سونئی نیز مشاهده شد (شکل ۱). همچنین ژن *uidA* کد کننده آنزیم بتاگالوکورونیداز که از صفات ویژه باکتری /شرشیا کلی فرض می‌شود، در سویه‌های شیگلا سونئی و شیگلا فلکسنری حضور داشت (شکل ۱). بنابراین نتایج این مطالعه اختصاصی نبودن دو ژن *uidA* و *lacZ* در تشخیص /شرشیا کلی را تأیید کرده و همسو با نتایج برخی مطالعات دیگر (۱، ۶ و ۱۱) نشان داد که استفاده هم زمان این ۲ ژن به تنهایی قدرت تشخیص دقیق /شرشیا کلی را ندارد. ژن *cyd* کد کننده کمپلکس سیتوکروم‌های *bd* به‌عنوان یکی از دو آنزیم اکسیداز زنجیره تنفسی نیز علاوه بر /شرشیا کلی در سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه نظیر شیگلا گزارش شده است (۱). در مطالعه حاضر نیز وجود این ژن در سویه‌های شیگلا سونئی و شیگلا فلکسنری نشان داد که استفاده از ترکیب سه ژن *lacZ uidA cyd* توان کافی برای شناسایی /شرشیا کلی را ندارد (شکل ۱). آنزیم پرمئاز محصول اختصاصی ژن *lacY* در /شرشیا کلی است که در انتقال لاکتوز از غشای سلولی باکتری نقش دارد.

هوراکاوا و همکاران از ژن *lacY* به همراه ژن‌های *uidA*، *lacZ* و *cyd* به منظور افزایش دقت تشخیص و افتراق باکتری /شرشیا کلی از باکتری‌های مشابه نظیر شیگلا استفاده کردند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که طراحی روش PCR مبتنی بر ۴ ژن *uidA*، *lacZ*، *cyd* و *lacY* از دقت لازم برای تشخیص جدایه‌های محیطی و کلینیکی برخوردار (۱) بوده و می‌تواند جدایه‌های مختلف /شرشیا کلی را از سایر باکتری‌های مشابه نظیر شیگلا شناسایی کند. در مطالعه حاضر نیز نتایج مشابه حاصل شد و به دلیل فقدان ژن *lacY* در سویه‌های شیگلا سونئی و شیگلا فلکسنری، اختصاصیت این ژن در باکتری /شرشیا کلی نشان داده شد (شکل ۱). در برخی مطالعات دیگر نیز به عدم حضور ژن *lacY* در گونه‌های شیگلا فلکسنری و شیگلا دیسنتری اشاره شده است (۱۷). بر اساس نتایج مطالعه حاضر بر مبنای استفاده همزمان از ۴ ژن *uidA*، *lacZ*، *cyd* و *lacY* بر روی سویه‌های استاندارد و ۱۲۰ جدایه محیطی /شرشیا کلی جدا شده از آب سواحل بوشهر مشخص شد که پرایمرهای به کار برده شده برای قطعاتی از ژن‌های ۴ گانه به‌طور اختصاصی می‌توانند جایگاه‌های هدف خود را شناسایی کنند (شکل ۲). در نتیجه، الگوی پاسخ مثبت PCR برای هر ۴ ژن توان کافی برای تشخیص صحیح جدایه‌های مختلف /شرشیا کلی را دارد. کاربرد روش‌های ملکولی در ایران توسط ابطحی و همچنین دهقان و همکاران (۱۵ و ۱۸) دقت کافی برای جلوگیری از پاسخ مثبت و منفی کاذب را نداشتند. نتایج مطالعه حاضر استفاده از این ۴ پرایمر را برای تشخیص جدایه‌های /شرشیا کلی در آینده پیشنهاد می‌کند. بر اساس دقت و سرعت مطلوب این روش ملکولی در شناسایی /شرشیا کلی در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات، به نظر می‌رسد این روش با

دقیق به منظور پایش مستمر /اشرشیا کلی به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی در نمونه های مختلف به ویژه در کنار روش های کمی شمارش /اشرشیا کلی در نمونه های آب مفید باشد.

سپاس و قدردانی

این مقاله منتج شده از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا رحیمی می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با کد مالی ۹۴-۳-۱۲۵ صورت گرفته است. نویسندگان مقاله بدین وسیله از مسئولین محترم به جهت تأمین بودجه طرح و تهیه امکانات تقدیر و قدردانی می نمایند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

کم کردن مدت زمان و حجم کارهای آزمایشگاهی روشی مناسب برای پایش آلودگی های /اشرشیا کلی در منابع مختلف از قبیل آب های محیطی باشد و بتواند در برنامه ریزی و مدیریت پیشگیری از گسترش آلودگی اکوسیستم های آبی مفید واقع شود.

نتیجه گیری

روش PCR با بکارگیری پرایمرهای UidA, LacZ, Cyd و LacY دقت کافی برای تشخیص باکتری /اشرشیا کلی را دارد و می تواند آن را از شبیه ترین گونه نزدیک به خود یعنی شیگلا شناسایی کند. علاوه بر این سویه انتروهموراژیک /اشرشیا کلی را که روش های کلاسیک قادر به شناسایی جنس و گونه آن نبودند با این روش قابل شناسایی می باشد. علاوه بر این، روش مذکور می تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع و

References:

1. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -d-glucuronidase, and β -d-galactosidase. J Appl Microbiol 2008; 105(4): 970-6.
2. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8(1): 26-38.
3. Moresco V, Viancelli A, Nascimento MA, et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. Mar Pollut Bull 2012; 64(1): 40-8.
4. Molina F, Lopez-Acedo E, Tabla R, et al. Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. BMC Biotechnol 2015; 15(48): 1-9.
5. Rompre A, Servais P, Baudart J, et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J Microbiol Methods 2002; 49(1): 31-54.
6. Horáková K, Mlejnková H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial faecal indicators in water samples using PCR. Water Sci Technol 2006; 54(3): 135-40.
7. Augoustinos MT, Grabow NA, Genthe B, et al. An Improved Membrane Filtration Method for Enumeration of Faecal Coliforms and E. Coli by a Fluorogenic β -Glucuronidase Assay. Water Science and Technology 1993; 27(3-4): 267-70.
8. Monday SR, Whittam TS, Feng PC. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the gusA gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis 2001; 184(7): 918-21.
9. Abbasi P, Kargar M, Doosti A, et al. Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

- using multiplex Real-Time PCR assays for stx1, stx2, eaeA. Iran J Microbiol 2014; 6(3): 169-74.
10. Abbasi P, Kargar M, Doosti A, et al. Molecular Detection of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Strains Associated with Diarrhea in Shiraz, Iran. Arch Pediatr Infect Dis 2017; 5(2): e37629.
11. Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, et al. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Appl Environ Microbiol 1990; 56(2): 307-14.
12. Bej AK, McCarty SC, Atlas R. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. Appl Environ Microbiol 1991; 57(8): 2429-32.
13. Løbersli I, Wester A, Kristiansen Å, et al. Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli*. Eur J Microbiol Immunol (Bp) 2016; 6(3): 197-205.
14. Dehghan F, Zolfaghari MR, Arjomandzadegan M, et al. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probably Number). Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4(5): 404-9.
15. Abtahi H, Ghannadzadeh M, Salmanian AH, et al. Improvement of PCR in detection of coliform in water pollution. AMUJ 2008; 11(3): 1-7.
16. Almeida C, Soares F. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): a 20 years of sanitary survey. Mar Pollut Bull 2012; 64(2): 252-62.
17. Ito H, Kido N, Arakawa Y, et al. Possible mechanisms underlying the slow lactose fermentation phenotype in *Shigella* spp. Appl Environ Microbiol 1991; 57(10): 2912-7.
18. Dehghan F, Zolfaghari MR, Arjomandzadegan M, et al. Comparison of PCR with Standard Method (MPN) for detection of bacterial contamination in drinking water. Iran South Med J 2014; 17(5): 867-78. (Persian)

Original Article

PCR Identification of *Escherichia coli* Isolated from Bushehr Coastal Water

Z. Rahimi (MSc)^{1*}, A. Bahador (PhD)², M. Azimzadeh (MSc)¹,
MA. Haghighi (PhD)^{1,3**}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

² Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 13 Jan, 2018 Accepted 29 Apr, 2018)

Abstract

Background: Standard methods of identification have not been able to solve all issues concerning *E. coli*. With the development of genomic studies, PCR appears promising to deal with the shortcomings. This study aimed to utilize PCR with specific primers for *lacZ*, *uidA*, *cyd*, and *lacY* gene segments to identify environmental *E. coli* isolates.

Materials and methods: PCR and the aforementioned four primers were used for molecular identification of *E. coli* on purified genome DNA from 120 environmental *E. coli* isolates, standard strains of *Shigella*, and Enterohaemorrhagic *E. coli* strain as controls. All environmental *E. coli* isolates were isolated from Bushehr coastal areas and identified in a previous study by standard bacteriological methods and then preserved in -70 °C for further studies.

Results: The primers successfully showed their ability to identify the targets in environmental isolates and standard strains. It is shown that the four PCR fragments related to *lacZ*, *uidA*, *cyd*, and *lacY* genes were observed only for *E. coli* isolates and strains.

Conclusion: PCR method proved capable to distinguish *E. coli* from *Shigella* as the most phylogenetically related genus and contrary to the classical methods, it could detect enterohaemorrhagic strains as *Escherichia coli*.

Keywords: *Escherichia coli*. Indicator microorganism, Molecular identification, Polymerase Chain Reaction

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Rahimi Z, Bahador A, Azimzadeh M, Haghighi MA. PCR Identification of *Escherichia coli* Isolated from Bushehr Coastal Water. Iran South Med J 2018; 21(5): 383-392

Copyright © 2018 Rahimi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

****Address for correspondence:** The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: mahaghghi@gmail.com

*ORCID: 0000-0001-9191-5633

**ORCID: 0000-0003-1876-3658

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>