دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و یکم، شماره ۵، صفحه ۳۹۲ - ۳۸۳ (آذر و دی ۱۳۹۷)

Iran South Med J 2018;21(5): 383-392

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

زهرا رحیمی (MSc)[۱*]، عباس بهادر (PhD)[۲]، مسعود عظیم‌زاده (MSc)[۱]، محمدعلی حقیقی (PhD)[۱ و ۳]**

[۱] گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، 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 *اشرشیا کلی* را حل نماید. اما با گسترش مطالعات ژنومیک، به نظر می‌رسد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توان کافی برای حل این مشکل را داشته باشد. هدف از این مطالعه تشخیص جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی* با کاربرد روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای قطعات ژن‌های *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* بود.

مواد و روش‌ها: شناسایی ملکولی *اشرشیا کلی* با آزمایش‌های PCR و پرایمرهای چهارگانه فوق بر روی DNA ژنومی تخلیص شده از ۱۲۰ جدایه محیطی *اشرشیا کلی* به همراه سویه‌های استاندارد *شیگلا* و سویه‌های انتروهموراژیک *اشرشیا 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 *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* فقط در جدایه‌ها و سویه‌های *اشرشیا کلی* وجود دارند. این روش PCR قدرت جداسازی *اشرشیا کلی* را از *شیگلا*، به‌عنوان نزدیک‌ترین جنس فیلوژنیک، داشته و برخلاف روش‌های کلاسیک، توانست سویه انتروهموراژیک را به عنوان *اشرشیا کلی* تشخیص دهد.

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

واژگان کلیدی: *اشرشیا کلی*، میکروارگانیسم شاهد، شناسایی مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

[**] بوشهر، گروه میکروب‌شناسی 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 توسعهٔ 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 درحال‌توسعه 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 بتاگالاکتوزیداز 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، ۱۱و 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 *اشرشیا 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 *اشرشیا کلی* را ندارد (۱ و ۶). هوراکاوا و همکاران به‌منظور افزایش اختصاصیت شناسایی *اشرشیا کلی* در مطالعه دیگری ژن *lacY*، کد کننده لاکتوز پرمئاز، را به مجموعهٔ 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 *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* اختصاصیت و اعتبار لازم برای شناسایی *اشرشیا کلی* در تمامی سویه‌های مختلف محیطی و کلینیکی از سایر باکتری‌های مشابه را دارد به‌طوری‌که می‌تواند *اشرشیا کلی* و *شیگلا* که از نظر فیزیولوژیکی و ژنتیکی خویشاوندی نزدیکی با هم دارند را افتراق دهد (۱۳). تشخیص *اشرشیا کلی* با روش PCR در طی مطالعات قبلی در ایران گزارش‌شده است. دهقان و همکاران از دو ژن *lacZ* و *uidA* و ابطحی و همکاران از ژن 16SrRNA برای شناسایی *اشرشیا کلی* استفاده کردند (۱۴ و ۱۵). نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که این روش‌ها از اختصاصیت کافی برای شناسایی *اشرشیا* کلی در نمونه‌های آب و سایر نمونه‌ها برخوردار نمی‌باشند (۱ و ۱۵).

هدف از مطالعه حاضر کاربرد PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* برای تشخیص جدایه‌های محیطی *اشرشیا 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 *اشرشیا کلی* که در یک مطالعه قبلی از مناطق مختلف سواحل بوشهر جدا شده بودند استفاده شد. جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی* از زمان جداسازی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در بانک میکروبی گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شده‌اند. از سویه‌های کلینیکی انتروهموراژیک *اشرشیا کلی* (G4S42، G4S45)، *شیگلا فلکسنری* ATCC12022 و *شیگلا سونئی* ATCC 9290 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

روش بیوشیمیایی تعیین هویت جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی*

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

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 سیترات، 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 *شیگلا* درون محیط نوترینت مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت شیکر ۲۰۰RPM (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 الکتروفورز در ژل آگارز (Invitrogen) با غلظت‌های متفاوت (۱ الی ۲/۵ درصد) و با استفاده از بافر TAE، رنگ ایمن فلورسینه 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 Gel doc (BioDuc-It) ساخت شرکت BIO-RAD 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.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ملکولی سویه‌های محیطی *اشرشیاکلی*

پرایمر	توالی پرایمر ′3-′5	بهینه دمای Annealing(^{0}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)

آزمایش PCR

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

قرار گرفتند و در برنامه دوم ۳۰ سیکل متوالی از دمای ۹۴، دمای Anealing 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 با روش الکتروفورز در ژل اگارز 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.

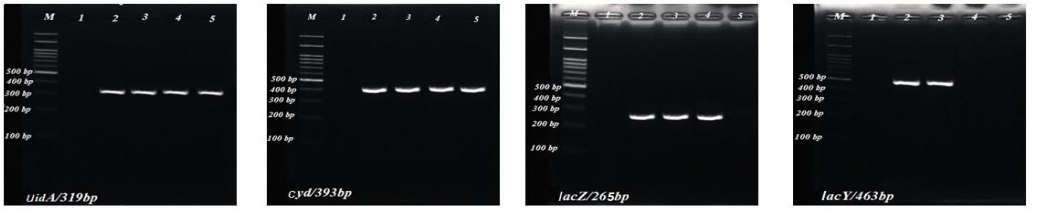
جدول ۲) واکنش‌گرهای PCR و حجم‌های مورد نیاز

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

یافته‌ها

اختصاصیت پرایمرها برای ژن‌های هدف

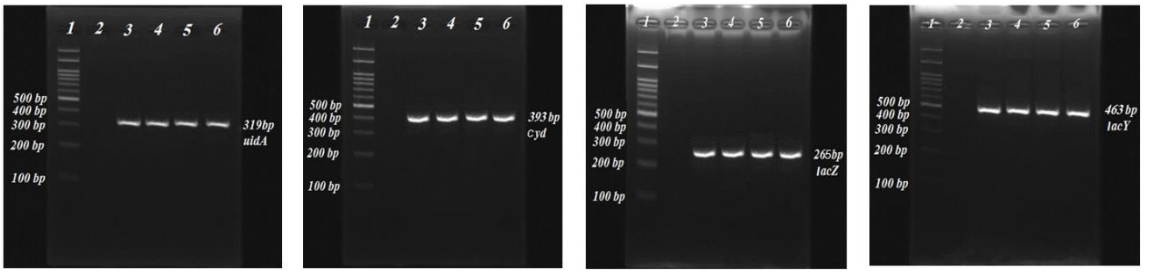
در آزمایش PCR با کاربرد هریک از پرایمرهای چهارگانه LacZ، UidA، Cyd و LacY مشخص گردید که این پرایمرها قدرت شناسایی ژن‌های هدف در DNA ژنومی استخراج شده از سویه‌های کنترل مثبت را داشته (شکل ۱) و محصولات PCR با وزن قابل پیش‌بینی تولید کردند (جدول ۱). نتایج به‌دست آمده همچنین نشان داد الگوی پاسخ PCR ژن‌های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



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

تشخیص جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی* با روش PCR

نتایج آزمایش PCR برای قطعات ژن‌های *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* بر روی DNA ژنومی تخلیص شده از ۱۲۰ جدایه محیطی *اشرشیا کلی*، سویه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد 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 LacZ، UidA، Cyd و LacY برای تشخیص جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی*. چاهک‌های شماره ۱: مارکر DM 2300، ۲: کنترل منفی، ۳: انترو هموراژیک *اشرشیا کلی* (G4S42) به عنوان کنترل مثبت، ۴: جدایه محیطی *اشرشیا کلی* ۵: جدایه محیطی *اشرشیا کلی* ۱۰۰ ۶: جدایه محیطی *اشرشیا کلی* ۲۳۰. جدایه‌های محیطی *اشرشیا کلی* همانند سویه کنترل مثبت دارای پاسخ مثبت PCR برای تمامی پرایمرهای تشخیصی هستند.

بحث

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 تبادلات 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 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 میکروارگانیزم 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

که همگی سعی بر تشخیص سریع و قابل‌اعتماد جنس و گونه *اشرشیا کلی* داشته‌اند. شناسایی ملکولی با روش PCR بر اساس کاربرد ۲ ژن (*uidA*، *lacZ*) و ۳ ژن (*cyd*، *uidA*، *lacZ*) دقت کافی برای تشخیص *اشرشیا 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 *اشرشیا 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 بتاگلوکورونیداز که از صفات ویژه باکتری *اشرشیا 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 *اشرشیا 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 *اشرشیا کلی* را ندارد. ژن *cyd* کد کننده کمپلکس سیتوکروم‌های bd به‌عنوان یکی از دو آنزیم اکسیداز زنجیره تنفسی نیز علاوه بر *اشرشیا 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 *cyd*، *uidA*، *lacZ* توان کافی برای شناسایی *اشرشیا کلی* را ندارد (شکل ۱). آنزیم پرمئاز محصول اختصاصی ژن *lacY* در *اشرشیا کلی* است که در انتقال لاکتوز از غشای سلولی باکتری نقش دارد.

هوراکاوا و همکاران از ژن *lacY* به همراه ژن‌های *lacZ*، *uidA* و *cyd* به منظور افزایش دقت تشخیص و افتراق باکتری *اشرشیا کلی* از باکتری‌های مشابه نظیر *شیگلا* استفاده کردند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که طراحی روش PCR مبتنی بر ۴ ژن *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* از دقت لازم برای تشخیص جدایه‌های محیطی و کلینیکی برخوردار (۱) بوده و می‌تواند جدایه‌های مختلف *اشرشیا 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 *اشرشیا 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 مطالعهٔ حاضر بر مبنای استفاده همزمان از ۴ ژن *lacZ*، *uidA*، *cyd* و *lacY* بر روی سویه‌های استاندارد و ۱۲۰ جدایه محیطی *اشرشیا 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 *اشرشیا 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 مطالعهٔ حاضر استفاده از این ۴ پرایمر را برای تشخیص جدایه‌های *اشرشیا کلی* در آینده پیشنهاد می‌کند. بر اساس دقت و سرعت مطلوب این روش ملکولی در شناسایی *اشرشیا کلی* در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات، به نظر می‌رسد این روش با

کم کردن مدت زمان و حجم کارهای آزمایشگاهی روشی مناسب برای پایش آلودگی‌های *اشرشیا کلی* در منابع مختلف از قبیل آب‌های محیطی باشد و بتواند در برنامه‌ریزی و مدیریت پیشگیری از گسترش آلودگی اکوسیستم‌های آبی مفید واقع شود.

نتیجه‌گیری

روش PCR با بکارگیری پرایمرهای LacZ، UidA، Cyd و LacY دقت کافی برای تشخیص باکتری *اشرشیا کلی* را دارد و می‌تواند آن را از شبیه‌ترین گونه نزدیک به خود یعنی *شیگلا* شناسایی کند. علاوه بر این سویه انتروهموراژیک *اشرشیا کلی* را که روش‌های کلاسیک قادر به شناسایی جنس و گونه آن نبودند با این روش قابل شناسایی می‌باشد. علاوه بر این، روش مذکور می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع و دقیق به منظور پایش مستمر *اشرشیا کلی* به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی در نمونه‌های مختلف به‌ویژه در کنار روش‌های کمی شمارش *اشرشیا کلی* در نمونه‌های آب مفید باشد.

سپاس و قدردانی

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

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

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 S*higella* 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: mahaghighy@gmail.com
*ORCID: 0000-0001-9191-5633
**ORCID: 0000-0003-1876-3658