دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۳، صفحه ۲۷۷ - ۲۶۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017;20(3): 267-277

شناسایی باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *rfbE* و *stx2b*

مصطفی بخشی [۱]، فیروز ابراهیمی [۱]، شهرام نظریان [۱*]، یوسف تاروردی‌زاده [۱]، داود صادقی [۱]

[۱] مرکز علم و فناوری زیستی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۸/۱۷- پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۲۰)

چکیده

زمینه: باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 جزء پاتوژن‌های روده‌ای می‌باشد که آسیب‌های جدی را بر دستگاه گوارش پدید می‌آورد. شناسایی این باکتری که قابلیت تولید توکسین را داراست و عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود، عموماً از طریق کشت بر روی محیط سوربیتول مکانکی آگار انجام می‌شود که آزمونی زمانبر است. هدف از انجام این پژوهش فراهم ساختن روشی سریع و دقیق به منظور شناسایی این باکتری با استفاده از روش مولکولی مبتنی بر تکنیک PCR بود.

مواد و روش‌ها: ژن‌های *rfbE* و *stx2b* برای شناسایی اختصاصی *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 انتخاب شدند و پس از طراحی پرایمرهای اختصاصی، تکثیر ژن‌ها توسط PCR صورت پذیرفت. از محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار برای بررسی قابلیت رشد کلنی‌های انتخاب شده طی فرآیند PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: با ظهور باندهای مربوط به ژن‌های *rfbE* و *stx2b* بر روی ژل آگارز تأیید گردید که پرایمرهای طراحی شده توانسته‌اند به خوبی وجود ژن *rfbE* و توکسین شیگا را در نمونه متعلق به باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 شناسایی نمایند. کلنی‌های انتخاب شده طی PCR قابلیت رشد بر روی محیط سوربیتول مکانکی آگار را داشتند.

نتیجه‌گیری: مشخص گردید که ما می‌توانیم روشی سریع، دقیق و نسبتاً راحت را برای شناسایی پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 با استفاده از تکنیک PCR و وجود پرایمرهای اختصاصی نسبت به سایر روش‌های موجود فراهم کنیم.

واژگان کلیدی: شناسایی *اشریشیا کلی* سویه O157:H7، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژن *rfbE*، ژن *stx2b*

* تهران، اتوبان شهید بابایی، بعد از پل لشکرک، دانشگاه جامع امام حسین (ع). مرکز علم و فناوری زیستی

E-mail: kpnazari@ihu.ac.ir

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 میکروارگانیسمی است که از طریق فرآورده‌های غذایی و آب آلوده به انسان منتقل می‌شود و پس از لانه گزینی در روده، منجر به آسیب‌های شدیدی همچون کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic Colitis) و سندرم ادراری خونریزی دهنده (Hemolytic Uremic Syndrome) می‌شود (۱). کودکان، قربانیان اصلی ابتلا به این پاتوژن بوده و بیش از ۵ میلیون مرگ ومیر در سال خصوصاً در کودکان زیر ۵ سال گزارش می‌شود. در باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 ژن کد کننده آنتی ژن O157 توسط کلاستر ۱۲ ژنی کد می‌شود. از مجموع این تعداد ژن، ۶ ژن مسئول بیوسنتز قند – باز می‌باشند. پروتئین کد شده توسط ۴ ژن دیگر نیز جهت انتقال قند مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین‌های فلیپاز و انتقال دهنده آنتی ژن O نیز توسط دو ژن دیگر کد می‌شوند. پروتئین کد شده توسط ژن *rfbE* در گروه پروتئین‌های دخیل در بیوسنتز قند – باز قرار دارد و در مسیر سنتز LPS باکتری ایفای نقش می‌کند (۲ و ۳). به محض اتصال باکتری به موکوس روده، میکروارگانیسم شروع به رشد و ترشح مجموعه‌ای از محصولات خارج سلولی می‌کند که شامل سیتوتوکسین‌های بالقوه‌ای است که تحت عنوان شیگاتوکسین شناخته می‌شوند. توکسین شیگا فاکتور بیماری‌زای حیاتی در بیماری‌های ناشی از باکتری‌های STEC می‌باشد. دو نوع از این توکسین‌ها تحت عناوین Stx1 و Stx2، به شکل دقیق شناسایی شده‌اند. (۴ و ۵). مولکول‌های Stx همگی دارای ساختار A1B5 هستند (یک هتروهگزامر که یک زیر واحد A با وزن کمتر از ۳۲ کیلو دالتون به شکل غیرکوالانسی با پنتامر زیرواحدهای B، هر یک به وزن مولکولی ۷/۷ کیلودالتون، مرتبط است). اگرچه آنها دارای مکانیسم عمل مشابهی هستند، تنها ۵۵ درصد شباهت در توالی آمینواسیدی بین زیر واحدهای A شیگا توکسین‌های ۱ و ۲ وجود دارد. زیرواحد A دارای فعالیت آنزیمی است که به توکسین این قابلیت را اعطا می‌کند که یک باز آدنین ویژه را در RNA ریبوزومی ۲۸s موجود در زیرواحد بزرگ (۶۰S) را برش دهد و در نتیجه از سنتز پروتئین ممانعت کند. آپوپتوز می‌تواند در ادامه مهار سنتز پروتئین پدید آید (۵). دسته زیرواحدهای B از توکسین شیگا به گیرنده‌های گلیکولیپیدی ویژه‌ای بر سطح سلول‌ها متصل می‌شود و امکان دخول مولکول توکسین را فراهم می‌کند. توکسین‌های شیگا به گلوبوتری آسیل سرامید (Gb3) متصل می‌شوند. (۵ و ۶). توکسین Stx2 حدود ۱۰۰۰ برابر سمیت بیشتری برای سلول‌های اندوتلیال میکروعروق کلیوی نسبت به Stx1 دارد (۵).

یکی از عمده‌ترین چالش‌های شناسایی این باکتری این است که با روش‌های متداول میکروب‌شناسی در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی به سختی قابل جداسازی و شناسایی می‌باشد. به طور معمول از محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار و یا روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی همچون تست‌های سرولوژی و جداسازی ایمنومغناطیسی (IMS) برای شناسایی این باکتری در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده می‌شود. اما این روش‌ها بدلیل نواقصی که دارند ممکن است در شناسایی نهایی پاتوژن خطا ایجاد کنند. به عنوان نمونه برخی دیگر از سویه‌های *اشریشیا کلی* O157 نیز قادر به تخمیر سوربیتول می‌باشند (۷) و همچنین ممکن است باکتری آنتی ژن سطحی خود را طی جهش از دست بدهد و یا بدلیل بروز واکنش کراس با سایر باکتری‌ها، شناسایی آن با استفاده از روش سرولوژی ممکن نگردد (۸). لازم به ذکر است که هر دو روش مذکور قادر به شناسایی سویه‌های مولد توکسین نمی‌باشند (۹). بنابراین توسعه

روش‌های مولکولی جهت استفاده برای شناسایی پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 ضروری می‌باشد. روش‌های مولکولی استفاده شده برای شناسایی این پاتوژن عمدتاً در سه دسته کلی جای می‌گیرند که عبارتند از: تکنیک‌های مبتنی بر ژنوم (همچون RFLP، RAPD)، تکنیک‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (همچون M-PCR، R-PCR) و تکنیک‌های آشکارسازی (همچون Microarray، بیوسنسور) (۱۰). به نظر می‌رسد در بین تکنیک‌های مذکور، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با در نظر گرفتن مؤلفه‌های زمان و هزینه برای شناسایی یک پاتوژن نسبت به سایر تکنیک‌ها ارجحیت دارد.

پوتالینگاما و نیودیتا (Puttalingamma & Niveditha) در یک مطالعه فهرستی از ژن‌هایی که برای شناسایی مولکولی *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 در پژوهش‌های مختلف استفاده و بهینه شده‌اند را تهیه نمودند که عبارتند از: *stx1*، *stx2*، *eaeA*، *hly A*، *espP*، *wzyO157*، *chu* و *ehx* (۱۱). هرچند مطالعه مولکولی این پاتوژن از طریق ژن‌های دیگری همچون *rfbE*، *fliC* و *uidA* نیز عمومیت دارد (۱۲).

سازمان جهانی بهداشت به تمامی کشورهای جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه پایش باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 را به عنوان یک اولویت تحقیقاتی پیشنهاد نموده است. بر همین اساس و با توجه به دُز عفونی اندک این باکتری، پایش مستمر و همزمان انواع نمونه‌های مواد غذایی و کلینیکی در کشور حائز اهمیت می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش طراحی روشی دقیق برای شناسایی پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی بود.

مواد و روش‌ها

استخراج توالی و طراحی پرایمر ژن *rfbE* و *stx2b* متعلق به باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7

در ابتدای کار نیاز به استخراج توالی دقیق ژن‌های هدف بود. لذا با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و داده‌های موجود در پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI استخراج توالی دقیق ژن‌های *rfbE* و *stx2b* انجام شد. برای اطمینان از صحت توالی‌های استخراج شده ارزیابی آنها با استفاده از جعبه ابزار BlastN در پایگاه بیوانفورماتیک NCBI صورت پذیرفت. پرایمرهای اختصاصی برای این ژن با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ طراحی شدند (۱۳) (جدول ۱). در ادامه به منظور اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مذکور از جعبه ابزار Blast استفاده گردید.

جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *rfbE* و *stx2b*

ژن	آغازگر	توالی	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
rfbE	پیشرو	5′ GTGCTTTTGATATTTTTCCGAGTAC 3′	۵۲/۸
	پیرو	5′ TTTATATCACGAAAACGTGAAATTG 3′	۴۹/۵
stx2b	پیشرو	5′ GAATTCAAAAAAATGTTCATGGCT 3′	۶۹/۱
	پیرو	5′ TATAAAGCTTTTAGTCGTTGTTGAACTGAAC 3′	۶۸/۱

آماده‌سازی و کشت مخلوط مجهولی از سویه‌های مختلف باکتری *اشریشیا کلی*

چند محیط کشت Luria Bertani(LB) مایع (Merck، آلمان) که هر یک محتوی سویه‌ای متفاوت از *اشریشیا کلی* بودند تحت شرایط استریل به یک میکروتیوب منتقل شدند. این سویه‌ها عبارت بودند از BL21، DH5α، STEC، EHEC و K12 و از کلکسیون باکتری مرکز علم و فناوری زیستی دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شدند. از مخلوط باکتریایی تهیه شده مقدار ۱۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی محیط LB آگار (Merck، آلمان) تحت شرایط استریل کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط LB آگار چند کلنی انتخاب و به محیط LB مایع انتقال داده شد. پس از اینکه رشد باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۷ رسید، میزان ۱ میلی‌لیتر از محتویات محیط کشت به میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد و ترسیب باکتری با انجام سانتریفوژ طی ۵ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. محیط کشت دور ریخته شد و رسوب سلولی در ۵۰ میکرولیتر آب استریل حل گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه جوشانده شدند. نمونه‌ها سانتریفیوژ شد و ۲ میکرولیتر از محلول روئی به عنوان الگو در فرآیند PCR استفاده گردید (۱۴). پرایمرهای پیشرو و پیرو هر کدام به میزان ۰/۴ پیکومول، نمک $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز با غلظت ۱۰X برای حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده واقع شدند.

چرخه‌های PCR بر روی دستگاه PCR ترموسایکلر (BioRad، ایالات متحده) به شرح زیر بود: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه طی ۵ دقیقه، واسرشتگی ثانویه در دمای ۹۴ درجه ظرف ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه برای ژن *rfbE* و دمای ۶۰ درجه برای ژن *stx2b* طی ۳۵ ثانیه، گسترش رشته جدید بواسطه فعالیت آنزیم پلیمراز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً یک مرحله گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه (۱۵).

لازم به ذکر است که تعداد چرخه‌ها برای تکثیر از مرحله واسرشتگی ثانویه تا مرحله گسترش رشته درحال سنتز ۳۰ تکرار بود. ژل آگارز (Invitrogen، ایالات متحده) ۱ درصد تهیه شد و نمونه‌ها در چاهک‌های مجزا الکتروفورز شدند (۱۶).

کشت کلنی‌های PCR مثبت بر روی محیط کشت انتخابی

نظر به اینکه پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 یک سویه با قابلیت رشد غیرتخمیری بر روی محیط حاوی قند سوربیتول می‌باشد، لذا از محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار (Sigma، ایالات متحده) به منظور ارزیابی قابلیت رشد کلنی‌هایی که نتیجه PCR آنها برای ژن‌های *rfbE* و *stx2b* مثبت شده بود، استفاده گردید. پس از کشت کلنی‌های مورد نظر، پلیت‌های کشت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

آنالیز آماری

مقایسه میانگین بین داده‌های آماری حاصل از کشت نمونه‌ها و PCR سویه‌ها با استفاده از آزمون t-test نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام شد.

یافته‌ها

توالی کد کننده ژن‌های کاندید برای شناسایی *اشریشیا کلی* سویه O157:H7

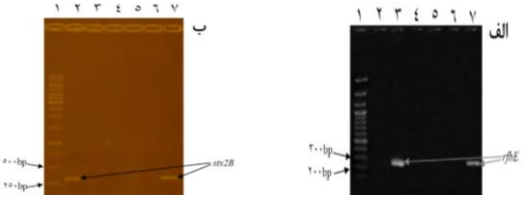
با استفاده از ابزارهای جستجو در پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI توالی دقیق نوکلئوتیدی *rfbE* و زیرواحد B توکسین شیگا با عدد دسترسی به ترتیب JQ907523.1 و DQ143183.1 استخراج شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن *rfbE* از بخشی از انتهای ′۳ ژن به نحوی انتخاب شدند که از نوکلئوتید ۸۰۷ تا ۷۸۳ برای طراحی پرایمر پیشرو و از نوکلئوتید ۵۶۸ تا ۵۹۲ برای طراحی پرایمر پیرو استفاده شد. علت معکوس بودن توالی پرایمرهای پیشرو و پیرو، نحوه ثبت توالی متعلق به ژن *rfbE* در پایگاه داده NCBI بود (توالی از ′۳ به ′۵ ثبت شده است). پرایمرهای طراحی شده برای ژن *stx2b* دقیقاً مطابق با پایانه‌های ′۵ و ′۳ ژن مذکور طراحی شدند به نحوی که قطعه تکثیر شونده بواسطه این پرایمرها مساوی با طول دقیق ژن *stx2b* باشد. در جدول ۲ مختصات دقیق مربوط به ژن‌ها و توالی‌های آمینواسیدی و نوکلئوتیدی آنها ذکر شده است.

جدول ۲) مختصات مربوط به توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی کدکننده زیرواحد B توکسین شیگا و آنتی ژن O

ژن	عدد دسترسی	توالی آمینواسیدی	توالی نوکلئوتیدی	طول توالی نوکلئوتیدی
stx2b	DQ143183.1	MKKMFMAVLFALVSVNAMAADCAKGKIEFS KYNENDTFTVKVAGKEYWTSRWNLQPLLQSA QLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFNND	5′AAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCA TTAGTTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATT GCGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCAAGT ATAATGAGAATGATACATTCACAGTAAAAG TGGCCGGAAAAGAGTACTGGACCAGTCGCT GGAATCTGCAACCGTTACTGCAAAGTGCTC AGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAAT CCAGTACCTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGC TGAAGTGCAGTTTAATAATGAC3′	۲۴۶bp
rfbE	JQ907523.1	KKSLHLALLALGISEGDEVIVPTLTYIASVNAIK YTGATPIFVDSDNETWQMSVSDIEQKITNKTK AIMCVHLYGHPCDMEQIVELAKSRNLFVIEDC AEAFGSKYKGKYVGTFGDISTFSFFGNKTITTG EGGMVVTNDKTLYDRCLHFKGQGLAVHRQY WHDVIGYNYRMTNICAAIGLAQLEQADDFISR KREIADIYKKNINSLVQVHKESKDVFHTYWMV SILTRTAEEREELRNHLADKLIETRPVFYPVHT MPMYSEKYQKHPIAEDLVGGG	5′AAAAAGTCTCTTCATTTAGCTTTGTTAGCG TTAGGTATATCGGAAGGAGATGAAGTTATT GTTCCAACACTGACATATATAGCATCAGTTA ATGCTATAAAATACACAGGAGCCACCCCCA TTTTCGTTGATTCAGATAATGAAACTTGGCA AATGTCTGTTAGTGACATAGAACAAAAAAT CACTAATAAAACTAAAGCTATTATGTGTGTC CATTTATACGGACATCCATGTGATATGGAAC AAATTGTAGAACTGGCCAAAAGTAGAAATT TGTTTGTAATTGAAGATTGCGCTGAAGCCTT TGGTTCTAAATATAAAGGTAAATATGTGGG AACATTTGGAGATATTTCTACTTTTAGCTTT TTTGGAAATAAAACTATTACTACAGGTGAA GGTGGAATGGTTGTCACGAATGACAAAACA CTTTATGACCGTTGTTTACATTTTAAAGGCC AAGGATTAGCTGTACATAGGCAATATTGGC ATGACGTTATAGGCTACAATTATAGGATGA CAAATATCTGCGCTGCTATAGGATTAGCCCA GTTAGAACAAGCTGATGATTTTATATCACGA AAACGTGAAATTGCTGATATTTATAAAAAA AATATCAACAGTCTTGTACAAGTCCACAAG GAAAGTAAAGATGTTTTTCACACTTATTGGA TGGTCTCAATTCTAACTAGGACCGCAGAGG AAAGAGAGGAATTAAGGAATCACCTTGCAG ATAAACTCATCGAAACAAGGCCAGTTTTTTA CCCTGTCCACACGATGCCAATGTACTCGGA AAAATATCAAAAGCACCCTATAGCTGAGGA TCTTGTGGGGGGGGGA3′	۸۳۷bp

شناسایی کلنی‌های *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 با تکنیک PCR

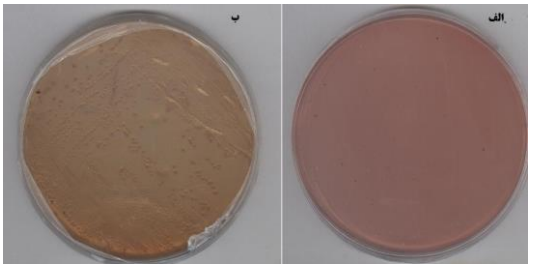
پس از انتخاب چند کلنی رشد یافته بر روی محیط کشت LB آگار که بر روی آن مخلوطی از سویه‌های مختلف باکتری‌های *اشریشیا کلی* کشت داده شده بودند و انتقال به محیط LB مایع، تمهیدات لازم برای انجام PCR مستقیم بر روی کلنی انجام شد. با انجام PCR و الکتروفورز هر یک از نمونه‌ها در ردیف‌های مجزا بر روی ژل آگارز ۱ درصد، باند مربوط به ژن‌های *rfbE* و *stx2b* در نواحی متناسب باتعداد جفت باز انتخاب شده از هر ژن در قیاس با نشانگر مولکولی DNA پس از رنگ‌آمیزی ژل توسط اتیدیوم بروماید (Sigma، ایالات متحده) و عکس‌برداری از آن توسط دستگاه Gel Doc (Biometra، آلمان) برای چند کلنی، مشخص گردید که پرایمرهای طراحی شده توانسته‌اند به خوبی سروتایپ O157:H7 که حاوی ژن‌های *rfbE* و *stx2b* می‌باشد را شناسایی نمایند (شکل ۱ الف و ب). در ردیف‌های ۲ و ۷ باند مربوط به ژن *stx2b* نمایان شده است که نشان می‌دهد کلنی‌های ۲ و ۷، باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 می‌باشند.



شکل ۱) الگوی الکتروفورز بررسی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. الف) ردیف ۱: نشانگر اندازه 100BP DNA LADDER PLUS، ردیف ۲: محصول تکثیر ژن *rfbE* به طول ۲۳۹ جفت باز. ب) ردیف ۱: نشانگر مولکولی DNA. ردیف‌های ۲ تا۷: کلنی‌های انتخاب شده از روی محیط LB جامد محتوی مخلوط سویه‌های مختلف باکتری *اشریشیا کلی*

رشد کلنی‌های انتخاب شده بر روی محیط کشت انتخابی

با کشت بر روی محیط اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار برای کلنی‌هایی که در فرآیند PCR انتخاب شده بودند و تشکیل کلنی‌های سفید رنگ و تغییر رنگ محیط کشت از قرمز به زرد که نشان دهنده قابلیت میکروارگانیسم رشد کرده بر روی آن برای استفاده از قند سوربیتول به شکل غیرتخمیری است مشخص گردید که کلنی‌های انتخاب و غربالگری شده در فرآیند مولکولی PCR باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 می‌باشند (شکل ۲).



شکل ۲) بررسی قابلیت رشد کلنی‌های انتخاب شده در فرآیند PCR بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار. الف) پتری دیش حاوی محیط سوربیتول مکانکی آگار که فاقد هر گونه کلنی و به رنگ قرمز. ب) پتری دیش حاوی محیط سوربیتول مکانکی آگار محتوی کلنی‌های رشد یافته و به رنگ محیط زرد

نتایج مربوط به آنالیز آماری نمونه‌ها بررسی شده به روش PCR و کشت انتخابی نشان داد که اختصاصیت هر دو روش یکسان بوده و تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (P>۰/۰۵). علی‌رغم یکسان بودن اختصاصیت هر دو روش، با اینحال روش تشخیصی PCR بهینه شده در این تحقیق از روش کشت انتخابی سریع‌تر می‌باشد.

بحث

جداسازی و تشخیص صحیح نقش مهمی را در درمان آسیب‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند. تکنیک‌های سنتی و مدرن می‌توانند ما را در دستیابی به این مهم یاری برسانند اما باید زمانبر بودن و وجود خطا را در کشت‌های افتراقی سنتی که گاهی تا چند روز به طول می‌انجامد مد نظر قرار داد.

امروزه با پیشرفت‌های شگرفی که در تکنیک‌های مدرن همچون PCR حاصل شده است، قابلیت شناسایی یک پاتوژن در سطح سویه و سروتایپ و همچنین در دُزهای بسیار پایین هم فراهم شده که این پدیده در زمینه بهبود کیفیت بهداشت عمومی بسیار امیدوار کننده می‌باشد. با توجه به جایگاه ویژه‌ای که پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به خود اختصاص داده است، ما را بر آن داشت تا در این پژوهش به ارائه راهکاری سریع و منطقی در شناسایی این پاتوژن بپردازیم. در تحقیقات انجام گرفته برای شناسایی این پاتوژن از طریق تکنیک‌های مولکولی، ژن‌های مختلفی مد نظر سایر پژوهشگران قرار گرفته است. به عنوان نمونه تهمتن و همکاران ژن هولوتوکسین STX2 را کاندید شناسایی قرار دادند و توانستند وجود باکتری را در نمونه‌های حاصل از کشتار دام‌های اهلی در شیراز شناسایی نمایند (۱۷). باید این نکته را مد نظر قرار داد که برخی از سروتایپ‌های *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 قابلیت تولید توکسین STX1 را دارند و تنها ۵۵ درصد شباهت بین زیرواحدهای A توکسین‌های شیگای ۱ و ۲ وجود دارد. بنابراین ممکن است با کاندید کردن ژن کامل یکی از توکسین‌ها در تشخیص پاتوژن خللی ایجاد شود. این امر برای تحقیق صورت پذیرفته توسط توکلی و همکاران که ژن *stx2a* را کاندید شناسایی خود قرار دادند نیز صدق می‌کند (۱۸). اگرچه عادلی و همکاران در شناسایی مولکولی پاتوژن مذکور با کاندید نمودن هر دو ژن *stx1* و *stx2* این اشکال را رفع نمودند و توانستند سویه‌هایی را که هر کدام فقط محتوی یکی از ژن‌های *stx1* و *stx2* بودند را شناسایی نمایند (۱۹). اما به نظر می‌رسد که کاندید نمودن ژن کدکننده توکسین شیگا به تنهایی برای شناسایی پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 به سبب هموlوژی بالایی که توالی آن با توالی ژن کد کننده توکسین شیگا توسط ژنوم باکتری *شیگلا دیسانتری* دارد و همچنین با توجه به علایم بالینی مشترکی که در پی آلودگی به این دو پاتوژن بروز می‌کند کار دقیقی نمی‌باشد. بنابراین انتخاب یک ژن اختصاصی دیگر همچون *rfbE* که منحصراً در ژنوم سروتایپ O157:H7 موجود بوده و آنتی ژن سطحی O را کد می‌کند به فرآیند شناسایی صحیح پاتوژن مذکور از طریق تکنیک PCR کمک شایانی می‌نماید. این نکته در پژوهش‌های انجام شده توسط عادلی و همکاران و کارگر و همکاران نیز مد نظر قرار گرفته است؛ اگرچه آنها علاوه بر ژن‌های کدکننده توکسین‌های شیگا، ژن *eaeA* (کد کننده پروتئین اینتیمین) را به عنوان کاندید دیگر برای شناسایی دقیق‌تر سویه O157:H7 باکتری *اشریشیا کلی* انتخاب کرده‌اند (۱۹و ۲۰). در برخی از پژوهش‌ها مانند مطالعه هو (Hu) و همکاران (۲۱)، فودا (Fode) و همکاران (۲۲) و کمپبل (Campbell) و همکاران (۲۳) ژن *rfbE* برای شناسایی مولکولی باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 از طریق تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ناگفته نماند که در تحقیقات متعدد ژن‌های دیگری که مختص به سروتایپ O157 می‌باشد به عنوان کاندید انتخاب شده‌اند که از آن جمله می‌توان به انتخاب ژن‌های *eaeA* توسط فراتامیکو (Fratamico) و استروباق (Strobaugh)(۲۴)، ژن *uidA* توسط ماتیس (Matise) و همکاران (۲۵)، ژن *fliCh7* توسط آیاز

(Ayaz) و همکاران (۲۶) اشاره نمود. تکنیک‌های مولکولی دیگری همچون Real Time PCR، پروب‌های مولکولی فلورسنس و هیبریداسیون فلورسنس و پپتید نوکلئیک اسید (PNA-FISH) که مستلزم صرف هزینه و زمان بیشتری در قیاس با PCR مستقیم هستند نیز توسط برخی از محققین برای شناسایی پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 مورد استفاده واقع شده‌اند (۳۰-۲۷). آنچه که درپژوهش حاضر مد نظر واقع شد این بود که بتوان با کاندید کردن چند ژن هم وجود پاتوژن *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 و هم قابلیت تولید توکسین توسط پاتوژن شناسایی شده اثبات گردد. لذا ژن‌های *rfbE* و *stx2b* به ترتیب با توجه به اختصاصی بودن و توالی حفاظت شده‌ای که در هر دو توکسین ۱ و ۲ داشتند انتخاب و شناسایی پاتوژن مذکور از طریق تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده صورت پذیرفت. از طریق الکتروفورز محصولات PCR و مشخص شدن باندهای DNA پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قطعاتی با اندازه‌های مورد انتظار در برخی از کلنی‌ها حاصل شد که نشان می‌داد، پرایمرهای طراحی شده به خوبی وجود ژن‌های کاندید را در کلنی‌های O157:H7 شناسایی و تکثیر می‌کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این واقعیت بود که پرایمرهای اختصاصی طراحی شده قادر هستند به خوبی کلنی‌های *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 را از سایر کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت، طی فرآیند PCR افتراق دهند. می‌توان به این نکته اذعان داشت که پس از ارزیابی میزان حساسیت این پرایمرها برای ژن‌های هدف استفاده از این دو جفت پرایمر را می‌توان برای آنالیز نمونه‌های غذایی و کلینیکی کاربردی نمود.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم پژوهش دانشگاه جامع امام حسین (ع) به سبب حمایت‌های مادی و معنوی از این پژوهش را اعلام می‌داریم.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(1): 5-14.

2.Tarr PI, Schoening LM, Yea YL, et al. Acquisition of the rfb-gnd Cluster in Evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. J Bacteriol 2000; 182(21): 6183-91.

3.Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, et al. Development of Primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl Environ Microbiol 1999; 65(7): 2954-60.

4.Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci 2007; 85(13 Suppl): E45-62.

5.Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. J Appl Microbiol 2000; 88(5): 729-45.

6.Guth B, Prado V, Rivas M. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. In: Torres AG, ed. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Sharjah: Bentham, Science Publishers, 2010, 65-83.

7.Ojeda A, Prado V, Martinez J, et al. Sorbitol-

negative phenotype Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. J Clin Microbiol 1995; 33(8): 2199-201.

8.Noveir MR, Dogan HB, Kadir Halkman A. A note on *Escherichia coli* O157:H7 serotype in Turkish meat products. Meat Sci 2000; 56(4): 331-5.

9.Saeed AY, Ibrahim KS. Identification of *Escherichia coli* O157 in sheep and goats using PCR technique. IOSR-JAVS 2013; 6(2): 30-2.

10.Tamerat N, Muktar Y, Shiferaw D. Application of molecular diagnostic techniques for the detection of *E. coli* O157:H7: a review. J Vet Sci Technol 2016; 7(362): 1-9.

11.Puttalingamma V, Niveditha S. A review: detection of *Escherichia coli* O157:H7. Int J Pharm Pharm Sci Res 2014; 4(3): 49-52.

12.Farajzadeh Sheikh A, Rostami S, Amin M, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef hamburgers in Khuzestan Province, Iran. Afr J Microbiol Res 2013; 7(5): 413-7.

13.Rychlik W. OLIGO 7 Primer Analysis Software. In: Yuryev A, editors. PCR Primer Design, Totowa: Humana Press, 2007, 35-59.

14.Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, et al. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. Jpn J Infect Dis 2014; 67(2): 78-85.

15.Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. Arch Clin Infect Dis 2009; 4(2): 97-103.

16.Mesapogu S, Jillepalli CM, Arora DK. Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods and Principles. In: Arora DK, Das S, Sukumar M, editors. Analyzing microbes: Manual of molecular biology techniques. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 73-91.

17.Tahamtan YE, Puorbakhsh SA, Shekarforoush SS. PCR detection of *Escherichi coli* O157:H7 directed from slaughtered cattle in Shiraz, Iran. Arch Razi Ins 2006; 61(1):1-6.

18.Tavakoli HR, Ghorban Alizadegan M, Najafi A, et al. Detection of toxicogenic *E.coli* 0157:H7 by PCR. Iran J Infect Dis Trop Med 2010; 15(49): 49-53. (Persian)

19.Adeli Z, Firoozeh F, Zibaei M, et al. Prevalence of Shiga toxin and Intimine genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from urine samples in Lorestan, Iran. Feyz 2013; 17(2): 188-94. (Persian)

20.Kargar M, Daneshvar M, Homayoun M. Surveillance of Virulence Markers and Antibiotic Resistance of Shiga toxin Producing *E.coli* O157:H7 Strains from Meats Purchase in Shiraz. Iran South Med J 2011; 14 (2) :76-83 (Persian)

21.Hu Y, Zhang Q, Meitzler JC. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. J Appl Microbiol 1999; 87(6): 867-76.

22.Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, et al. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157: H7. Lett Appl Microbiol 2003; 37(3): 239-43.

23.Campbell GR, Prosser J, Glover A, et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. J Appl Microbiol 2001; 91(6): 1004-10.

24.Fratamico PM, Strobaugh TP. Simultaneous detection of Salmonella spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J Ind Microbiol Biot 1998; 21(3): 92-8.

25.Matise I, Shelton M, Phillips G, et al. Sensitive PCR Method for Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 and Other Shiga toxin-producing Bacteria in Ground Meat. Swine Res Rep 1997; 33: 1-6.

26.Ayaz ND, Copuroglu G, Ormeci E, et al. Presence of Staphylococcus aureus and Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Meat in Agri, Turkey Int J Enteric Pathog 2016; 29: 1-7.

27.Fortin NY, Mulchandani A, Chen W. Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction and Molecular Beacons for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7. Anal Biochem 2001; 289: 281-288.
28.Khatami F, Heidari M, Khatami M. Rapid Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by Fluorescent Amplification–Based Specific Hybridization (FLASH) PCR. Iran Red Crescent Med J 2012; 14(9): 594-8.
29.Atabakhsh P, Amin MM, Mortazavi H, et al. Identification of Total and Fecal Coliforms and Heterotrophic to Microbiological Method and *E. coli* O157:H7 to Immunological, and Real Time PCR Methods in Isfahan Water Treatment Plant. Iran J Health & Environ 2010; 3(3): 335-46. (Persian)
30.Almeida C. Sousa JM, Rocha R, et al. Detection of *Escherichia coli* O157 by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA-FISH) and Comparison to a Standard Culture Method. Appl Environ Microb 2013; 79(20): 6293-6300.

Original Article

Identification of *E. coli* O157:H7 by Using Specific Primers for *rfbE* and *stx2b* Genes

M. Bakhshi[1], F. Ebrahimi [1], SH. Nazarian [1*], Y.Tarverdizade [1], D. Sadeghi [1]

[1] Department of Biology, School of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

(Received 7 Nov 2016 Accepted 9 Jan 2017)

Abstract

Background: *E. coli* O157:H7 is one of the intestinal pathogens which can cause severe lesions in the gastrointestinal system. These bacteria can produce toxins and are the main cause of hospital infections. Their detection is usually done by culture on sorbitol-MacConkey agar which is a time-consuming test. The aim of this study was to develop a rapid, yet accurate method to identify this bacterium using a PCR based technique.

Material and Methods: *rfbE* and *stx2b* genes were selected for identification of specific *E. coli* O157:H7 strain. Then amplification was performed by PCR following designing specific primers. Sorbitol-MacConkey agar was used to verification of growth ability of selected colonies during PCR.

Results: By the appearance of the bonds belong to *rfbE* and *stx2B* genes on an agarose gel, the ability of designed primers for gene detection in samples of *E .coli* O157:H7 was verified. A sorbitol-MacConkey agar medium was used to evaluate the growing potency of colonies selected during PCR.

Conclusion: In this study we demonstrated that we could develop a fast, accurate, and relatively comfortable method for detection of *E. coli* O157:H7 strain by using PCR technique and specific primers instead of using current methods.

Key words: Identification *of E. coli* O157:H7 strain, polymerase chain reaction, *rfbE* gene, *stx2b* gene

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Bakhshi M, Ebrahimi F, Nazarian SH, Tarverdizade Y, Sadeghi D. Identification of E. coli O157:H7 by Using Specific Primers for rfbE and stx2b Genes. Iran South Med J 2017; 20(3): 267-277

Copyright © 2017 Bakhshi, 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*: Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran. Email: kpnazari@ihu.ac.ir