

Design and Optimization of PCR Assay for Rapid Detection of Enterotoxigenic and Enteraggregative Pathotypes of *E. coli*

Mohammad Soleimani¹, Abbas Morovvati^{2*}, Ali Javadi³

¹Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

²Department of Microbiology, Young Researchers & Elite Club, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

³Department of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Abbas Morovvati,
Department of Microbiology,
Qom Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran.

Email:
abbasmorovvati@gmail.com

Received: 21 Dec, 2015

Accepted: 14 Mar, 2016

Abstract

Background and Objectives: *Escherichia coli* is one of the most important causative agents of acute diarrheal disease in the world. Diarrheal diseases are one of the main causes of mortality among children in developing countries. The aim of this study was to develop a PCR technique for diagnosis of specific virulence genes of Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and Enteraggregative *E. coli* (EAEC).

Methods: In this study, specific genes ST and LT were used for diagnosis of ETEC pathotype and AAF/II specific gene was used for diagnosis of EAEC pathotype. The PCR technique was designed and optimized for these three genes. The reaction products were cloned in pTZ57R/T vector as positive control. The primers' sensitivity was determined by measurement of detection limit, and primers' specificity was evaluated using other bacterial genomes.

Results: According to the results of the PCR products analysis using agarose gel electrophoresis, the bands for AAF/II, LT, and ST were obtained 384, 459, and 150 bp, respectively. Also, the reaction of the genomes of control bacteria using the designed primers was negative. The detection limit based on copy number for ST, LT, and genes, was obtained 390, 1500, and 2500 copies, respectively.

Conclusion: Considering the findings of this study, design of these assays in Iran is a progress in the improving rapid and accurate diagnosis of pathogens and detection of *E. coli* pathotypes.

Keywords: *Escherichia coli*; Polymerase chain reaction; Dysentery.

طراحی و بهینه‌سازی تست PCR برای تشخیص سریع پاتوتایپ‌های انترواگریگتیو و انتروتوکسی ژنیک/شرشیاکلی

محمد سلیمانی^۱، عباس مروتی^{۲*}، علی جوادی^۳

چکیده

زمینه و هدف: /شرشیاکلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری اسهالی حاد در دنیا مطرح است. بیماری‌های اسهالی یکی از علل اصلی مرگ و میر در میان کودکان کشورهای درحال توسعه می‌باشند. این مطالعه با هدف توسعه تکنیک PCR برای تشخیص اختصاصی ژن‌های ویرولانسی پاتوتایپ‌های انتروتوکسی ژنیک /شرشیاکلی (EPEC) و انترواگریگتیو و /شرشیاکلی (EAEC) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه برای تشخیص پاتوتایپ‌ها EAEC-EPEC، از ژن‌های اختصاصی *st* و *lt* (برای تشخیص پاتوتایپ EPEC) و از ژن اختصاصی *aaafII* (برای شناسایی پاتوتایپ EAEC) استفاده شد. این تکنیک PCR برای این سه ژن طراحی و بهینه گردید. محصولات واکنش برای هر یک از این ژن‌ها، در وکتور pTZ57R/T به‌عنوان کنترل مثبت، کلون و مورد استفاده قرار گرفت. میزان حساسیت پرایمرها با محاسبه کمترین میزان تشخیص (Limit of Detection) و استفاده از ژنوم سایر باکتری‌ها به‌عنوان بررسی اختصاصیت پرایمرها ارزیابی شد.

یافته‌ها: با توجه به نتایج آنالیز محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز باندهای مورد نظر برای ژن *aaafII* و *lt* و *st* به ترتیب ۳۸۴، ۴۵۹ و ۱۵۰ جفت باز به دست آمد. همچنین واکنش ژنوم باکتری‌های کنترل با پرایمرهای طراحی شده، منفی بود. حد تشخیص براساس تعداد کپی برای ژن‌های *st*، *lt* و *aaafII* به ترتیب برابر ۳۹۰، ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ کپی به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، طراحی این گونه تست‌ها در ایران به‌عنوان یک پیشرفت در زمینه بهبود تشخیص سریع و دقیق پاتوژن‌ها و تفکیک در نوع پاتوتایپ‌های /شرشیاکلی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: /شرشیاکلی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز؛ اسهال.

^۱گروه میکروبی‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

^۲گروه میکروبی‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

^۳گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

عباس مروتی، گروه میکروبی‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
abbasmorovvati@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Soleimani M, Morovvati A, Javadi A. Design and optimization of pcr assay for rapid detection of enterotoxigenic and enteroaggregative pathotypes of *E. Coli*. Qom Univ Med Sci. J 2016;10(10):25-33. [Full Text in Persian]

مقدمه

اشرشیاکلی، یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای است که اغلب به‌عنوان باکتری‌های کومنسال به شمار می‌رود. این باکتری مهم‌ترین علت بیماری‌های روده‌ای و اسهالی است. بیماری‌های اسهالی خود یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در میان کودکان کشورهای در حال توسعه می‌باشد و حدوداً در هر سال، ۲/۵ میلیون نفر در اثر این بیماری، جان خود را از دست می‌دهند (۲،۱). باکتری *E. coli* براساس فاکتورهای ویروالانس، به پاتوتایپ‌های مختلف در ۶ گروه شامل: اشرشیاکلی‌های *E. Enterohemorrhagic*، *E. enterotoxigenic (ETEC)*، *E. Enteropathogenic (EPEC)*، *E. enteroaggregative (EAEC)*، *E. enteroinvasive (EIEC)* و *E. diffuse adhering (DAEC)* طبقه‌بندی می‌شود (۴،۳). تشخیص و شناسایی هر یک از این پاتوتایپ‌ها به بررسی معیارهای اپیدمیولوژی، پاتوبیولوژی و ایجاد تمایز در نوع بیماری‌زایی آنها کمک می‌کند. هر یک از این پاتوتایپ‌ها با یک یا چند ژن ویروالانس شناسایی می‌شوند، برای مثال پاتوتایپ *EHEC* (با تولید توکسین همانند شیکا)، به‌عنوان یک عامل اصلی در ایجاد بیماری‌های اسهالی، با سندرم کولیت هموراژیک (HC) و Thrombocytopenia و سندرم HUS در ارتباط است. همچنین این پاتوتایپ، توانایی تولید توکسین‌های وروتوکسین و بیان ژن *eaeA* برای اتصال به پروتئین‌های پوششی را دارا می‌باشد. *EHEC* دارای سروتایپ O157H7 بوده که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیددی در ایجاد بیماری به‌صورت اپیدمی به شمار می‌رود (۶،۵). پاتوتایپ *EPEC* عامل ایجاد بیماری اسهال همراه با تب و استفراغ است که این بیماری اغلب در کودکان کشورهای در حال پیشرفت دیده می‌شود (۷). همچنین پاتوتایپ *ETEC* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری اسهالی مسافرتی، بیشتر در کودکان کشورهای پیشرفته و یا مناطق فقیرنشین بروز می‌کند (۸). پاتوتایپ *ETEC* که اغلب در کودکان گزارش شده، یکی از پاتوتایپ‌های تولیدکننده توکسین حساس به حرارت (heat-labile LT-1 and LT-2) و توکسین مقاوم به حرارت (heat-stable STII، heat-stable STI) است (۹). برای اولین بار، پاتوتایپ *EAEC* در اثر اتصال به سلول‌های HEp-2، شناسایی و

مشخص گردید ژن *AAF-II* اکثراً در بیماری‌زایی آن نقش دارد که توسط پلازمید pAA کد شده و با اتصال به لوکوس‌های روده‌ای منجر به اسهال می‌شود. پلازمید AA در این باکتری با کد کردن ژن‌های *aafII* باعث ایجاد و توانایی اتصال پاتوتایپ به پوشش روده می‌شود (۱۰). پاتوتایپ‌های *EIEC* و *DAEC* نیز در بین پاتوتایپ‌ها، کمتر باعث بروز بیماری می‌شوند (۱۱). تشخیص پاتوتایپ‌های *E. coli* در کشورهای در حال توسعه، بسیار محدود بوده و امکان‌پذیر نیست؛ زیرا روش‌های میکروبی‌شناسی سنتی قادر به ایجاد تمایز در بین این سویه‌ها نبوده و این روش‌ها اغلب بسیار وقت‌گیر و طاقت‌فرسا می‌باشد. ولی با ظهور تکنیک‌های مولکولی در کشورهای مختلف، این امکان برای تشخیص این پاتوتایپ‌ها از یکدیگر وجود دارد. مطالعات و تکنیک‌های مختلفی برای تشخیص این پاتوتایپ‌ها انجام شده، ولی این روش‌ها متدهایی نیستند که در آزمایشگاه‌های تشخیصی قابل اجرا باشند (۴،۳).

در بین تکنیک‌های موجود برای تشخیص، PCR به‌عنوان یک تکنیک قابل اعتماد، حساس و دقیق می‌تواند یک روش مناسب در جهت تشخیص و کنترل بیماری‌های ناشی از این پاتوتایپ‌ها باشد. اخیراً، روش‌های PCR برای تشخیص چند ژن در مورد چند پاتوژن با یکدیگر استفاده می‌شود که تکنیکی بسیار حساس و اختصاصی برای شناسایی این پاتوتایپ‌ها می‌باشد (۳).

این مطالعه با هدف طراحی تکنیک PCR تشخیص سریع مولکولی، برای شناسایی پاتوتایپ‌های *E. coli* با استفاده از ژن *aafIII* (در تشخیص پاتوتایپ *EAEC*) و با استفاده از ژن‌های *lt* و *st* (در شناسایی پاتوتایپ *ETEC*) انجام شد.

روش بررسی

ژنوم سوش‌های باکتریایی پاتوتایپ‌های *E. enterotoxigenic* و *E. Enteroaggregative* از انستیتو پاستور ایران، تهیه و از آن به‌عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده گردید. لیست و مشخصات باکتری‌های کنترل منفی مورد استفاده در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: لیست باکتری‌های استفاده‌شده به‌عنوان کنترل منفی

نام ارگانسیم	شماره دسترسی
شیگلا سونه‌ای	ATCC 9290
کلبسیلا پنومونیه	ATCC 7881
باسیلوس سوبتلیس	ATCC 6051
استافیلوکوکوس ارئوس	ATCC 25923
اتروکوکوس فکالیس	ATCC 29212
سالمونلا تیفی	ATCC 700931

سکانس پرایمرها، مکان آنها بر روی ژنوم و اندازه قطعات تکثیرشده در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی نهایی پرایمرهای طراحی‌شده و اطمینان از اختصاصی بودن آنها از سرویس (Basic Local Alignment Search Tool) BLAST سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) استفاده گردید.

در این مطالعه، ژن‌های هدف گذاری‌شده شامل: ژن‌های *st* و *lt* بر روی پلازمیدهای LT و ST در پاتوتایپ *EPEC* و ژن *aafII* در پاتوتایپ *EAEC* مورد بررسی قرار گرفت. طراحی پرایمرها به کمک نرم‌افزار CLC Sequence viewer نسخه ۶ و ساخت پرایمرها آن نیز توسط شرکت سیناکلون انجام شد.

جدول شماره ۲: توالی پرایمرها، طول محصول واکنش و دمای واکنش

مرجع	طول محصول (bp)	Tm (°C)	Primer sequence	نام پرایمر	Targeted gene	Pathotype
پژوهش حاضر	۳۸۴	۵۹/۸۰	ACTCTCCAGGCTTTGCCCACTGA	F-aafII	<i>aafII</i>	<i>EAEC</i>
		۵۹/۷۱	TGCTGTGCGGTATCTGCGGGA	R-aafII		
پژوهش حاضر	۱۸۲	۵۸/۰۰	TGTGCACACGGAGCTCCTCA	F-eltA(Lt)	<i>eltA (Lt)</i>	<i>EPEC</i>
		۵۹/۰۵	TGTTGACTGCCCGGGACTTCG	R-eltA(Lt)		
پژوهش حاضر	۱۵۰	۵۸/۳۶	AGCATGCTTTGGCGCCCAAA	F- STII (St)	<i>STII (St)</i>	<i>EPEC</i>
		۵۷/۸۵	CGTCTTGCGTTAGGACATTGTCACA	R- STII (St)		

رنگ آمیزی و با ترانسلومیناتور مشاهده شد. لازم به ذکر است واکنش برای هر سه ژن نیز به‌صورت PCR تکی انجام گرفت. به‌منظور بررسی ویژگی پرایمرهای ژن‌های *st*، *lt* و *aafII* جهت تشخیص باکتری مورد نظر، واکنش PCR با شرایط فوق بر ژنوم استخراج‌شده باکتری‌های کنترل منفی انجام شد. همچنین به‌منظور اطمینان از قابلیت DNA استخراج‌شده در به‌کارگیری واکنش PCR و عدم وجود مهارکننده در آن، واکنش PCR بر روی ژن کروموزومی 16S rRNA که در تمام باکتری‌ها وجود دارد، براساس مطالعه Chiang انجام شد (۱۶). به‌منظور دستیابی به یک روش تشخیص مولکولی مناسب و مطمئن، وجود کنترل مثبت، امری مهم محسوب می‌شود که برای تهیه آن از روش کلونینگ محصولات PCR در وکتور مناسب استفاده گردید. از کیت BIONEER (ACCU Prep PCR Purification Kit)، برای آماده‌سازی و تخلیص محصول واکنش و اتصال محصول واکنش به T وکتور pTZ57R/T مطابق با روش سازنده

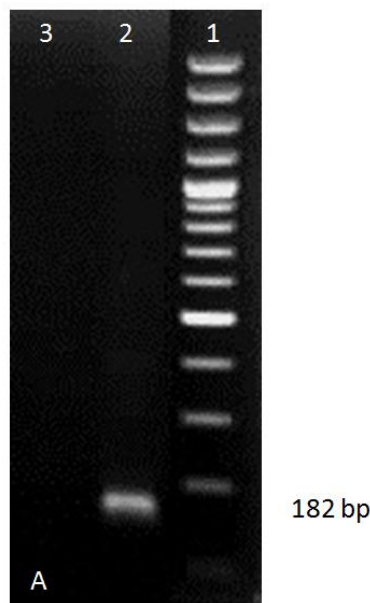
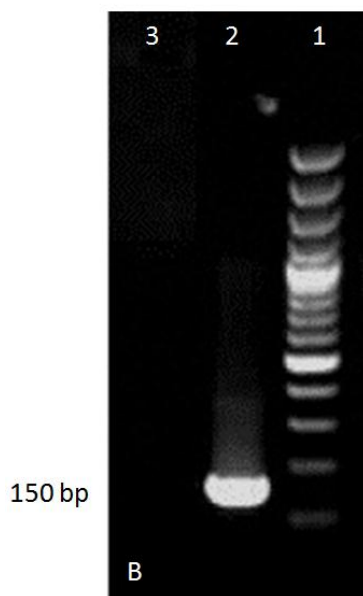
واکنش PCR جهت ارزیابی ۳ ژن هدف *st*، *lt* و *aafII* با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم ۱/۵ میلی‌مولار یون منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰۰ نانوگرم ژنوم باکتری، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای عقبی و جلویی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۵ سیکل در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. همچنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به‌عنوان کنترل منفی صورت گرفت. پس از اتمام واکنش تکثیر، ۷ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر XTBE ۰/۵ با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز گردید. در نهایت، به‌منظور رؤیت باندها مورد نظر، ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید،

پس از انجام واکنش TA کلونینگ در مورد قطعات *st*، *lt* و *aafII*، ابتدا غلظت پلاسمید حاوی اینسرت با اسپکتروفتومتر، مشخص و سپس جهت تعیین حساسیت واکنش، حداقل تعداد کپی از قطعه موردنظر که بتواند در واکنش PCR باند واضحی ایجاد کند، محاسبه گردید. به این ترتیب برای محاسبه حد تشخیص رقت‌های متوالی 10^{-1} - 10^{-10} حاوی اینسرت با غلظت مشخص تهیه شد. پس از انجام واکنش PCR روی رقت‌های متوالی پلاسمید، کمترین رقتی از آن که باند مشخص و واضحی را نشان داد، به عنوان حد تشخیص تعیین گردید. برای بررسی میزان اختصاصیت با پرایمرهای طراحی بر روی ژنوم باکتری کنترل منفی، واکنش PCR انجام گرفت.

یافته‌ها

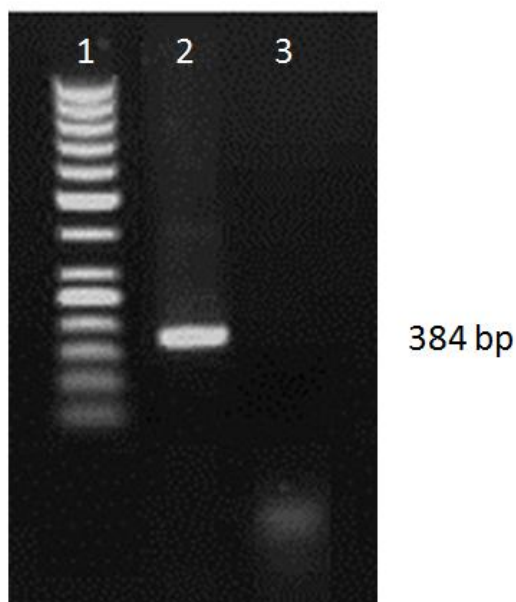
واکنش PCR مربوط به ۶ ژن *st* و *aafII* و نتایج واکنش PCR مربوط به ۳ ژن در دو شرایط Uniplex، مثبت بود. قطعات تکثیر یافته *st* و *aafII* به ترتیب با طول ۱۸۲bp، ۱۵۰bp، ۳۸۴bp، بر روی ژل مشخص گردید (شکل شماره ۱ و ۲).

کیت کلونینگ Fermentas (InstAclone PCR Cloning kit) انجام گرفت. پس از آماده‌سازی باکتری پذیرای *E. coli* JM 107 ترانسفورماسیون، انجام و در نهایت، باکتری ترانسفورم شده در محیط کشت (Merk) Luria- Bertani agar حاوی ۵- برومو ۴- کلرو ۳- ایندولیل بتا دی تیوگالاکتو پیرانوزید با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر [Isopropyl-، (Fermentas) (X-Gal)] (Ferments) (beta-D-(Thiogalactopyranoside;IPTG) با غلظت ۳۸/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نالیداکسیک اسید با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شدند. ارزیابی اولیه کلونینگ، بر اساس انتخاب پرگنه‌های سفید به عنوان موارد کنترل منفی انجام گرفت. جهت تأیید موارد مثبت و منفی، پس از تهیه ماتریکس از کشت‌های اولیه، واکنش Colony-PCR با شرایط ذکر شده در بالا برای هر یک از ژن‌ها انجام شد. همچنین به منظور تأیید نهایی کلون‌های دریافت‌کننده اینسرت، پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (ACCU Prep Plasmid Mini Extraction Kit) Bioneer، انجام شد. پلازمیدهای حاوی ژن‌های مورد نظر *pTZ57R/T st*، *pTZ57R/T aafII* و *pTZ57R/T lt* دارای ژن‌های *st*، *lt* و *aafII* می‌باشد.



شکل شماره ۱: محصول واکنش برای پاتوتایپ *ETEC* ژن‌های *st* و *lt*

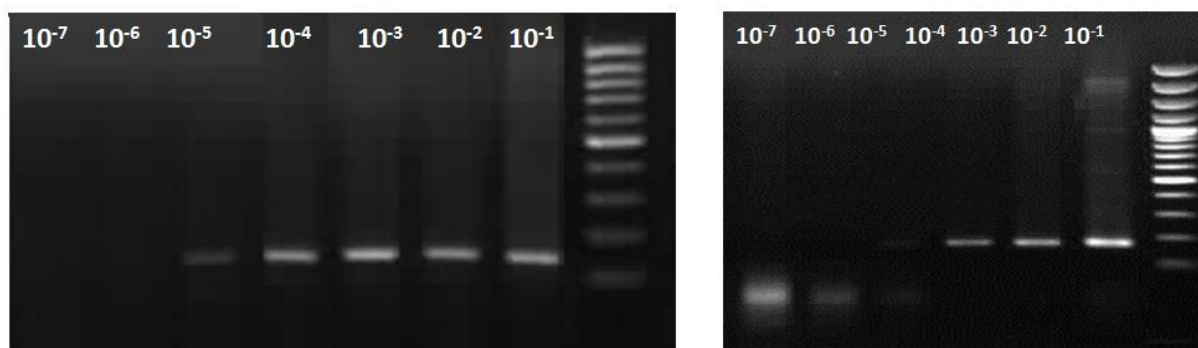
شکل B: مربوط به ژن *st* با اندازه محصول مورد نظر ۱۵۰ باز و شکل A: مربوط به ژن *lt* با اندازه محصول مورد نظر ۱۸۲ باز می‌باشد.



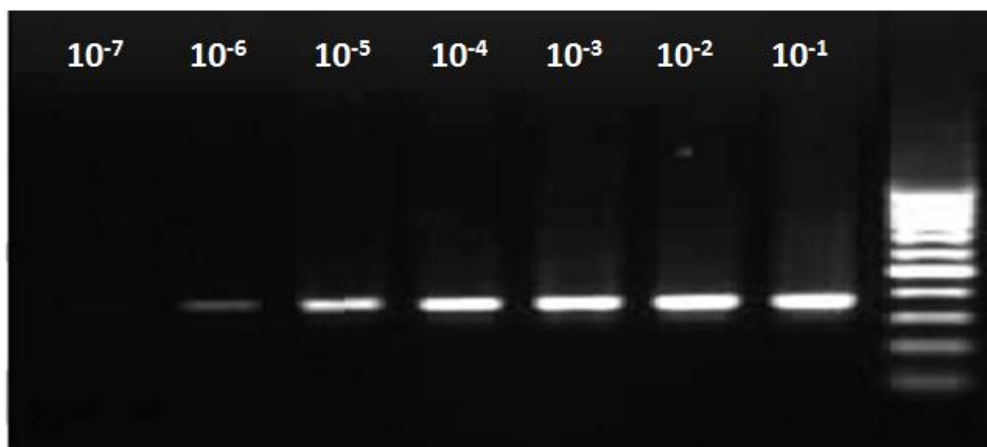
شکل شماره ۲: محصول واکنش برای پاتوتایپ *EAEC* ژن *aafII* که نشان‌دهنده تکثیر ۳۸۴ باز نمونه می‌باشد.

آخرین رقت از پلاسمید pTZ57R/T-aafII این عدد 10^{-5} را نشان می‌دهد که پرایمرهای طراحی شده قادر به ردیابی ۲۵۰۰ کپی از ژنوم در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند، در مورد پلاسمید pTZ57R/T-st، پلاسمید pTZ57R/T-lt، پلاسمید pTZ57R/T-lt، تعداد کپی قابل تشخیص مربوط به این ژن‌ها با پرایمرهای طراحی شده، قادر به ردیابی به ترتیب ۳۹۰ و ۱۵۰۰ کپی از ژن‌های هدف در یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری هستند (شکل‌های شماره ۳ و ۴). با توجه به نتایج حاصل و با استفاده از فرمول ذکر شده، کمترین تعداد کپی قابل تشخیص مربوط به هر دو ژن تعیین گردید.

واکنش PCR مربوط به ۳ ژن *st*، *lt* و *aafII* در تمام باکتری‌های کنترل منفی، باندی را ایجاد نکرد تا نشان‌دهنده ویژگی واکنش PCR در این مطالعه باشد. همچنین مثبت شدن واکنش PCR مربوط به ژن یونیورسال 16SrRNA با طول ۴۷۵bp، حضور ژنوم استخراج شده قابل PCR را تأیید کرد. واکنش PCR بر روی کلون‌های دریافت‌کننده اینسرت (کنترل مثبت) در مورد ژن‌های *st*، *lt* و *aafII* که به ترتیب pTZ57R/T-st، pTZ57R/T-lt و pTZ57R/T-aafII نامگذاری شده‌اند، مطابق انتظار بر روی ژل آگارز، باندهای مورد نظر را ایجاد کرده است.



شکل شماره ۳: میزان حد تشخیص برای ژن‌های *st* و *lt* در پاتوتایپ *ETEC* که 10^4 برای *st* در شکل A و 10^3 برای *lt* در شکل B را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۴: کمترین میزان تشخیص برای پاتوتایپ *EAEC* که 10^0 محاسبه شده است.

بحث

اشرشیاکلی به‌عنوان یک عامل مهم در ایجاد بیماری‌های اسهالی در سرتاسر دنیا به شمار می‌رود. تشخیص پاتوتایپ‌های این باکتری، نیازمند شناسایی فاکتورهای ویروالانس برای بررسی میزان مرگ و میر ناشی از این پاتوتایپ‌ها مهم است (۳). مطالعات مشابه نشان می‌دهد روش‌های مختلفی برای شناسایی این پاتوتایپ‌ها از جمله استفاده از تکنیک مولکولی PCR (به‌صورت اختصاصی) وجود دارد (۱۲). در این مطالعه یک تست بسیار حساس PCR که به‌منظور تشخیص این سه ژن در این دو پاتوتایپ در یک واکنش است، طراحی گردید. تکنیک PCR، یک تکنیک بسیار اختصاصی و با حساسیت بالا در مقایسه با تست‌های سنتی بوده که برای تشخیص فاکتورهای ویروالانس این پاتوتایپ‌ها به کار می‌رود (۱۳). در تست طراحی شده، شناسایی ژن‌های *st* و *lt* در پاتوتایپ *ETEC* و ژن *aafII* در پاتوتایپ *EAEC* امکان‌پذیر بود. این تکنیک برای تشخیص همزمان فاکتورهای ویروالانس در پاتوتایپ‌ها این باکتری بسیار مناسب است. مهم‌ترین بخش کار در این مطالعه، طراحی پرایمر بود که برای ژن *st* از ۲۰ سکانس و برای ژن *lt*، ۲۵ سکانس استفاده شد. ژن *aafII* از ۱۵ سکانس که از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شده بود با نرم‌افزارهای مربوطه همسان‌سازی شد و براساس نواحی کانسر و پرایمر، برای هر یک از این ژن‌ها طراحی گردید. مهم‌ترین نکته در طراحی تست؛ عدم ایجاد پرایمر دایمر، باندهای اضافی و داشتن دمای اتصال یکسان برای پرایمرها بود که باید توجه کرد در این تست در مقایسه با سایر مطالعات دیگر به آن

اهمیت داده شده است. در برخی مطالعات مانند مطالعه Roberto و همکاران (سال ۲۰۰۴) در بررسی پاتوتایپ‌های این باکتری در تست طراحی شده، اندازه باندها بسیار به هم نزدیک و در مواردی قابل تفکیک از یکدیگر نیستند (۷-۳). همچنین در این بررسی اختصاصیت پرایمرها با نمونه‌های ژنومی برخی از باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه* به‌عنوان کنترل منفی (که باعث ایجاد بیماری مشابه می‌شود) واکنش نشان نداد. بعد از بهینه‌سازی تست، محصول واکنش PCR در داخل پلازمید pTZ57R/T، کلون گردید و در این مطالعه به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در یک مطالعه مشابه دیگر که توسط Paton و همکاران (سال ۲۰۰۲) انجام شد برای کنترل مثبت تست، از DNA ژنومیک استفاده گردید (۱۲). نقطه ضعف در این تست، محدودیت آن با توجه به ناپایداری بودن و شکننده بودن DNA ژنومیک بوده که باعث می‌گردد تهیه رقت سریال به‌خوبی انجام نشود. با کلون کردن نمونه در داخل پلازمید علاوه بر استفاده به‌عنوان کنترل مثبت، امکان بررسی مقادیر دقیق پلازمید نیز فراهم می‌شود.

در مطالعه حاضر، برای ارزیابی حساسیت تست، کمترین میزان تشخیص (LOD) بررسی گردید. در این روش برخلاف اغلب مطالعات که از CFU (Colony Forming Unit) برای بررسی و تعیین واحدهای کلونی‌ساز استفاده می‌شود پس از کشت باکتری و بررسی میزان OD محیط کشت، از محیط رقت تهیه شده و واکنش PCR استفاده شد که مهم‌ترین نقطه ضعف این روش، نیازمندی به باکتری زنده است.

یکدیگر به‌وسیله تست‌های انجام‌شده و با بررسی میزان اختصاصیت و حساسیت تکنیک طراحی‌شده، می‌توان از آن برای تشخیص در کلینیک و در گام بعدی به‌عنوان یک کیت تشخیصی در مراکز درمانی (برای تشخیص بیماری‌های حاصله از این پاتوتایپ) استفاده کرد. با ارائه این تست به‌عنوان یک معیار در تشخیص می‌توان گام رو به جلو برای موفقیت و پیشرفت در تشخیص عوامل عفونی مهم برداشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی مسئولان و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی و آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، واحد قم که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر می‌نمایم.

بعد از کلون کردن نمونه‌ها و آماده‌شدن پلازمیدها، در نهایت در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری، میزان LOD برای ژن *st* برابر ۳۹۰ کپی، برای *lt* برابر ۱۵۰۰ کپی و برای *aafII* برابر با ۲۵۰۰ کپی به‌دست آمد (۱۵). در مطالعات Nguyen و همکاران (سال ۲۰۰۵)، میزان تشخیص واکنش برای تست طراحی‌شده برابر با 10^3 CFU محاسبه شد (۱۴-۱۳). همچنین در مطالعات KONG و همکاران (در سال ۱۹۹۹) نیز میزان حد تشخیص تست برای شناسایی این پاتوتایپ‌ها در هر میلی‌لیتر برابر با 10^6 CFU به دست آمد (۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد با طراحی این تکنیک برای تشخیص پاتوتایپ‌های *اشرشیاکلی* و برای تفکیک این پاتوتایپ‌ها از

References:

1. Makobe CK, Sang WK, Kikvi G, Kariuki S. Molecular characterization of virulence factors in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from children in Nairobi, Kenya. *J Infect Dev Ctries* 2012;6(8):598-604.
2. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006;254(1):12-8.
3. Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1787-89.
4. Morin N, Santiago AE, Ernst RK, Guillot SJ, Nataro JP. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2013;81(1):122-32.
5. Ke Xin Yu, Thong KL. Multiplex PCR for simultaneous detection of virulence genes in *Escherichia coli*. *Malaysian J Sci* 2009;28(1):1-14.
6. Kong RYC, So CL, Law WF, Wu RSS. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. *Marine Pollution Bull* 1999;38:1207-15.
7. Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5362-65.
8. Trabuasi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002;8(5):508-13.
9. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1752-7.
10. Miqdady MS, Jiang ZD, Nataro JP, DuPont HL. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* with formalin-preserved HEP-2 Cells. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):3066-67.

11. Soleimani M, Morovvati A, Hosseini SZ, Zolfaghari MR. Design of an improved multiplex PCR method for diagnosis of enterohaemorrhagic E.coli and enteropathogenic E.coli pathotypes. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2012;5(2):106-11.
12. Paton AW, Paton JC. Multiplex PCR for direct detection of shiga toxigenic escherichia coli strains producing the novel subtilase cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2944-7.
13. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrhegenic Escherichia coli from young children in hanoi, vietnam. *J Clin Microbiol* 2005;43(2):755-60.
14. Arif S, Salih LIF. Identification of different categories of diarrhegenic escherichia coli in stool samples by using multiplex PCR technique. *Asian J Med Sci* 2010;2(5):237-43.
15. Sharifi Yazdi MK, Akbari A, Soltan DMM. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eae) and invasive plasmid antigen H(ipaH) genes in diarrhegenic Escherichia coli. *African J Biotechnol* 2011;10(2):1522-6.
16. Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of Bacillus spp., Escherichia coli, Salmonella spp, Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. *Int J Food Microbiol* 2006;107(2):131-7.