

بررسی فراوانی ژن های Ace، Zot، tcpA و ctxA در سویه های ویبریوکلارای جدا شده از اپیدمی تابستان سال 1384 ایران با روش PCR

عباس ملکی¹، ایرج پاکزاد²، شیوا حسینی¹، رضا رنجبر³، محمدرضا پور شفیق⁴، رضا محبی²، سبحان غفوریان²، علی همتیان²، نورخدا صادقی فرد^{2*}

- (1) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
- (2) گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- (3) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه (الله عجل) تهران
- (4) گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران

تاریخ پذیرش: 89/9/6

تاریخ دریافت: 88/8/15

چکیده

مقدمه: ویبریوکلارا نوعی باکتری گرم منفی و عامل وبا است. مهم ترین فاکتور پاتوژنی ویبریوکلارا انتروتوکسینی به نام کلراتوکسین است که عامل بروز اسهال می باشد. علاوه بر کلراتوکسین و توکسین های جانبی همانند Zot و ace، یکی دیگر از مهم ترین فاکتور های پاتوژنی ویبریوکلارا پیلی می باشد که در اتصال و کلونیزاسیون نقش کلیدی داشته و به tcp معروف است.

مواد و روش ها: سویه ها در محیط اختصاصی کشت داده شدند. پس از انکوباسیون، کلنی های ظاهر شده با روش های بیوشیمیایی و سرولوژی تعیین هویت گردیدند. در مرحله بعد، پس از کشت سویه ها روی محیط LB و انکوباسیون به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد، از رسوب به دست آمده جهت استخراج DNA استفاده گردید. در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حضور یا عدم حضور ژن های ace، zot، tcpA و ctxA با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: در سی و نه سویه مورد مطالعه، پس از انجام PCR، فراوانی ژن های Zot، Ace، tcpA و ctxA به ترتیب برابر بود با 39 (100 درصد)، 39 (100 درصد)، 32 (84/61 درصد) و 35 (89/74 درصد).
بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می توان استنباط نمود که وجود ژن های ace و zot در سویه های ویبریوکلارای فاقد ژن ctxA در بیماری زایی باکتری اهمیت دارد.

واژه های کلیدی: ویبریوکلارا، ctxA، tcpA، Ace، Zot

*نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

ویبریوکلا نوعی باکتری گرم منفی و عامل بروز بیماری وبا می باشد. کلراتوکسین مهم ترین فاکتور پاتوژنی ویبریوکلا انترتوکسینی است که باعث بروز اسهال می گردد،(1). گر چه کلراتوکسین مهم ترین فاکتور پاتوژنی باکتری است، مطالعات متعدد نشان می دهد که برخی سویه های فاقد کلراتوکسین نیز قادر به ایجاد وبا می باشند که این مسئله به شناسایی توکسین های جدید در ویبریوکلا منجر گردید،(2). علاوه بر کلرا توکسین و توکسین های جانبی همانند *Zot* و *Ace*، یکی دیگر از مهم ترین فاکتورهای پاتوژنی ویبریوکلا پیلی می باشد که در اتصال و کلونیزاسیون نقشی کلیدی داشته و به *tcp* معروف است،(3). توکسین های *Zot* و *Ace* از توکسین های فرعی ویبریوکلا O¹ می باشند و توسط جایگاه ژنومی CTX کد می شوند،(4). *Zot* باعث تخریب اتصالات محکم می شود. این تخریب باعث می شود تا ارتباط بین سلول های مخاطی روده ایجاد اسهال آبی خفیف می شود،(5,6). انترتوکسین فرعی وبا یا *Ace*، اختلاف پتانسیل سراسر اپیتلیوم روده ای را افزایش داده و در انتقال یون تغییراتی ایجاد می کند،(7). این توکسین توسط Trucksis و همکارانش شناخته شده است. این پژوهشگران اثبات کردند که قالب ژن که مستقیماً در بالا دست ژن *Zot* قرار دارد، می تواند باعث افزایش ناگهانی جریان مایعات در داخل حفره ی روده شود،(8). پیلی ویبریوکلا از نوع تیپ IV بوده و باعث ایجاد ساختار دسته مانند (bundle form) می شود. این پیلی ها را TCP نیز می نامند، زیرا بیان آن هم زمان با توکسین وبا تنظیم می شود. TCP مهم ترین ساختار اتصالی باکتری به سلول های اپیتلیال روده است،(9,10,11). فاکتور کلو نیزاسیون پیلی (TCP) دارای محلی است که مانند یک رسپتور برای فاژ CTX عمل می نماید و خودش توسط باکتریو فاژ لیزوژنیکی VPI کد می شود،(12). هدف از انجام این تحقیق بررسی فراوانی وجود ژن های *Zot*، *Ace*، *tcpA* و *ctxA* در سویه های ویبریوکلا جدا شده از بیماران مبتلا به وبا

ناشی از اپیدمی تابستان سال 1384 ایران با روش PCR می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت: باکتری های ویبریوکلا ناشی از اپیدمی تابستان سال 1384 ایران از مراکز بیمارستانی استان هایی که مواردی از وبا مشاهده شده بود (گلستان، قم، تهران، همدان، سیستان و بلوچستان) تهیه گردیدند. نمونه ها در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام شد. باکتری هایی که روی مولر هینتون آگار رشد کرده بودند، در محیط اختصاصی TCBS (مرک آلمان) کشت داده و در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از مشاهده کلنی های مورد نظر، تست های تاییدی از جمله تست دکربوکسیلاسیون اسید های آمینه، تست تخمیر قندهای آرابینوز و سوکروز و تست VP (وگس پروسکوئر) و تست های سرولوژی همانند آگلوتیناسیون با آنتی سرم گروه O¹ و سروتایپینگ گروه O¹ انجام گردید.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA، ابتدا یک کلونی از باکتری در محیط LB به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه گردید و پس از پایان انکوباسیون، محیط مایع کشت داده شده به مدت 5 دقیقه در سانتریفیوژ با 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

جهت استخراج DNA از کیت Diatom استفاده شد که بر مبنای استفاده از GuSCN-Silica Gel طراحی شده است.

PCR: پس از استخراج DNA، هر نمونه تا انجام PCR در دمای 20- نگهداری گردید. سکانس پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعات ژن های *Zot*، *Ace*، *tcpA* و *ctxA* که در مطالعات قبلی طراحی گردیده اند را در قسمت زیر نشان داده ایم،(13,14). این پرایمرها طوری طراحی شده اند که قادرند قطعه ای به طول 301 جفت باز برای ژن *ctxA*، قطعه ای به طول 451 جفت باز برای ژن *tcpA*، قطعه ای به طول 600 جفت باز

سانتیگراد به مدت یک دقیقه و 72 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت و در پایان جهت تکثیر قطعات ناتمام در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انجام گردید.

واکنش PCR برای ژن Ace همانند برنامه بالا انجام گرفت با این تفاوت که دمای مرحله اتصال پرایمرها (annealing) 55 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه استفاده شد.

حدود 5-15 میکرولیتر از محصول به دست آمده از PCR در ژل آگارز 2 درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و سپس باند ها با استفاده از UV ترانس لومیناتور مشاهده گردیدند.

یافته های پژوهش

از سی و نه سویه ویبریوکلا متعلق به اپیدمی وبای تابستان سال 1384 ایران، همگی به سرگروپ O¹ و سروتایپ اینابا متعلق بودند. بعد از PCR، باند های به دست آمده با وزن 301 جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن *ctxA*، باندهای به دست آمده با وزن 451 جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن *tcpA* در نظر گرفته شدند باند های به دست آمده با وزن 600 جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن *Ace* و باند های به دست آمده با وزن 947 جفت باز به عنوان قطعه مورد نظر از ژن *Zot* در نظر گرفته شدند و به ترتیب به عنوان سویه های حمل کننده ژن های *ctxA*، *tcpA*، *Ace* و *Zot* مدنظر قرار گرفتند. (شکل 1) در کل در میان سی و نه سویه ویبریوکلا O¹ که PCR شدند، همگی حمل کننده ژن های *Ace* و *Zot* بودند، در سی و پنج سویه (89/74 درصد) ژن *ctxA* و در سی و سه سویه (84/61) ژن *tcpA* مشخص گردید.

برای ژن *Ace* و قطعه ای به طول 947 جفت باز برای ژن *Zot* را تکثیر نمایند.

پرایمرهای ژن *ctxA*:

پرایمر پیشرو:

3'-CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG-5'

پرایمر معکوس:

5'-TCT ATC CTC GTA GCC CCT ATT AAC G-3'

پرایمرهای ژن *tcpA*:

پرایمر پیشرو:

5'-CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG-3'

پرایمر معکوس:

3'-CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG-5'

پرایمرهای ژن *Ace*:

پرایمر پیشرو:

5'-AGA GCG CTG CAT TTA TCC TTA TTG-3'

پرایمر معکوس:

3'-AAC TCG GTC TCG GCC TCT CGT ATC-5'

پرایمرهای ژن *Zot*:

پرایمر پیشرو:

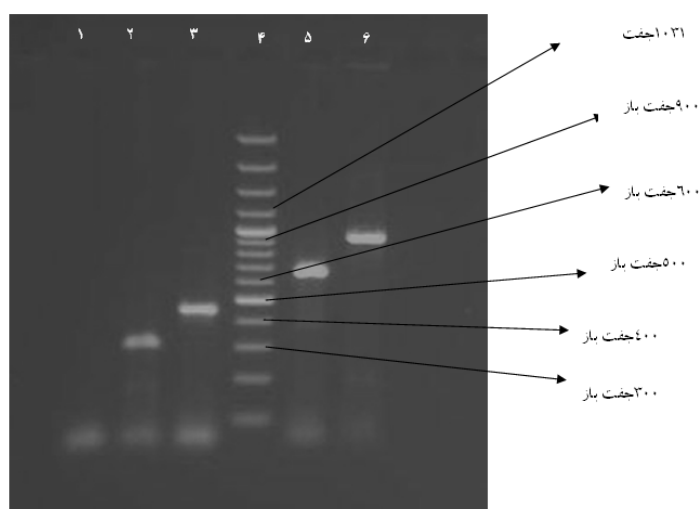
5'-TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T-3'

پرایمر معکوس:

3'-AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A-5'

واکنش PCR برای ژن های *Zot*، *Ace*، *tcpA* و *ctxA*: جهت تکثیر قطعه مورد نظر، از ژن های *Zot*، *Ace*، *tcpA* و *ctxA* در یک حجم 50 میکرولیتری 2/5 واحد از آنزیم *taq* پلی مراز، همراه 50 پیکومول از هر پرایمر، 200 میکرومولار از هر کدام از دزوکسی نوکلئوتید های چهار گانه، یک میکرولیتر از DNA الگو، 1/5 میلی مولار کلرید منیزیم، 10 میلی مولار Tris-Hcl (pH 8/3) و 50 میلی مولار کلرید پتاسیم استفاده گردید.

لوله ها را در ترموسایکلر برای ژن های *Zot*، *tcpA* و *ctxA* با دمای دناتوراسیون اولیه 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه و سپس 35 سیکل در 95 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، 52 درجه



شکل 1. ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعات ژن های *Ace*، *Zot*، *tcpA* و *ctxA* از چپ به راست: ردیف 1 به کنترل منفی، ردیف 2 نمونه *ctxA* مثبت، ردیف 3 نمونه *tcpA* مثبت، ردیف 4 مارکر مولکولی 100 جفت بازی، ردیف 5 نمونه *ace* مثبت و ردیف 6 نمونه *Zot* مثبت مربوط می گردد.

بحث و نتیجه گیری

آن مطالعه با استفاده از تکنیک PCR مشخص شد که صد درصد سویه های مورد مطالعه دارای ژن *tcpA*، *ctxA* و *Zot* است. درصد سویه های دارای ژن *ctxA* 100 درصد، *tcpA* 97/3 درصد و *Zot* 99/1 درصد است. سویه های مورد مطالعه در آن بررسی دارای ژن *Zot* بودند. (16)

در مطالعه ی محمدرضا پورشفیغ و همکاران 2002، مشخصات مولکولی و فنوتیپی سویه های ویبریو کلرا در ایران مورد بررسی قرار گرفت. در آن مطالعه، دویست ایزوله ی کلینیکی از ویبریوکلارا سرگروپ های *non-O1*، *O1* و *non-O139* از استان های مختلف ایران جمع آوری شده بودند. آنالیز PCR ویبریوکلارا *O1* نشان داد که ژن های *ctxA*، *tcpA*، *Zot* و *Ace* در 55 تا 97 درصد ایزوله های ویبریوکلارا در استان های مختلف وجود دارند. در 58 سویه جدا شده از تهران، ژن های *tcpA*، *ctxA*، *Ace* و *Zot* به ترتیب در 92 درصد، 78 درصد، 92 درصد و 100 درصد ایزوله ها وجود داشت. در 29 سویه جدا شده از کاشان که همگی متعلق به ویبریوکلارای

همان طور که در نتایج اشاره شد در تمامی سی و نه (100 درصد) سویه ویبریوکلارا *O1* که PCR شدند، ژن های *Ace* و *Zot* مشخص گردیدند، در سی و پنج سویه (89/74 درصد) ژن *ctxA*، و در سی و سه سویه (84/61 درصد) ژن *tcpA* مشخص گردید، اما این میزان با فراوانی این ژن ها در سویه های ویبریوکلارای جدا شده از کشور های مختلف فرق داشت.

Leal و همکاران در برزیل (2004) سویه های ویبریوکلارای *O1* را با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند و حضور ژن های *Ace*، *Zot*، *tcpA* و *ctxA* را در این سویه ها با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده برای بررسی وجود ژن های ویبرولانس ژن های *Ace*، *Zot*، *tcpA* و *ctxA* با روش PCR مشخص نمود که تمام سویه های مورد مطالعه دارای چهار ژن هستند. (15)

در مطالعه ی محمدرضا پورشفیغ و همکاران 2000، آنالیز مولکولی سویه های ویبریوکلارا جدا شده از بیماران عفونی در تهران مورد بررسی قرار گرفت. در

روی سویه های ویبریولکرای O¹ جدا شده از اپیدمی تابستان سال 1384 ایران برای بررسی وجود یا عدم وجود ژن های *Zot*، *Ace*، *tcpA* و *ctxA* انجام دادیم، مشخص شد که تمام سویه ها دارای ژن *Ace* و *Zot* بودند، 30 نمونه دارای هر چهار ژن مورد مطالعه بودند (76/92 درصد)، 5 نمونه دارای *ctxA* مثبت و *tcpA* منفی بودند (12/82 درصد)، 3 نمونه دارای *ctxA* منفی و *tcpA* مثبت (7/69 درصد) و 1 نمونه *ctxA* منفی و *tcpA* منفی (2/56 درصد) بودند.

References

۱-Albert MJ, Siddique AK, Islam MS. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O¹ in Bangladesh. *Lancet* ۱۹۹۳; ۳۴۱: ۷۰۴.
 ۲-Karaolis DK, Somara S, Maneval Jr, Johnson JA & Kaper JB. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* ۱۹۹۹; ۳۹۹: ۳۷۵-۹.
 ۳-Boyd EF & Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O¹/non-O¹³⁹ serogroup isolates. *Microbiology* ۲۰۰۲; ۱۴۸: ۱۶۵۵-۶۶.
 ۴-Colombo MM, Mstrandrea S, Santona A, et al. Distribution of the *ace*, *zot*, and *ctxA* toxin genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae*. *J infect Dis* ۱۹۹۴; ۱۷۰: ۷۵۰-۱.
 ۵-Mukhopadhyay AK, Chakrabarty S, Takeda Y, Nair GB & Berg DE. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX phi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J Bact* ۲۰۰۱; ۱۸۳: ۴۷۳۷-۴۶.
 ۶-Baudry B, Fasano A, Ketley J & Kaper J. Cloning of gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* ۱۹۹۲; ۶۰: ۴۲۸-۳۴.
 ۷-Bear CE, Kartner RJ, Bridges TJ, Jensen M, Ramjeesingh & Riordan JR. Purification and function reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* ۱۹۹۲; ۶۸: ۸۰۹-۱۸.
 ۸-Karasawa T, Mihara T, Kurazono H, et al. Distribution of the *zot* (*zonula occludens* toxin) gene among strains of *Vibrio*

غیر O¹ و غیر O¹³⁹ بودند، فقط 9 درصد دارای ژن *tcpA* و بقیه فاقد ژن های مورد نظر بودند. از 60 سویه جدا شده از استان خوزستان، ژن های *tcpA*، *ctxA*، *Ace* و ژن *Zot* به ترتیب در 81 درصد، 58 درصد، 79 درصد و 97 درصد ایزوله ها وجود داشتند. از 44 سویه جدا شده از استان کرمان، ژن های *tcpA*، *ctxA*، *Ace* و ژن *Zot* به ترتیب در 97 درصد، 55 درصد، 67 درصد و 100 درصد ایزوله ها وجود داشتند، (17). در مطالعه ای که ما با روش PCR

cholerae O¹ and non O¹. *Microbiol Lett* ۱۹۹۳; ۱۰۶: ۱۴۳-۶.
 ۹-Faast R, Ogierman MA, Stroehner UH, Manning PA. Nucleotide sequence of the structural gene, *tcpA*, for a major pilin subunit of *Vibrio cholerae*. *Gene* ۸۵, ۲۲۷-۲۳۱. Iredell JR, Manning PA. Biotype-specific *tcpA* genes in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* ۱۹۹۴; ۱۲۱: ۴۷-۵۴.
 ۱۰-Boyd EF, Waldor MK. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O¹/non-O¹³⁹ serogroup isolates. *Microbiology* ۲۰۰۲; ۱۴۸: ۱۶۵۵-۶۶.
 ۱۰-Ramamurthy T, Bag PK, Pal A. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O¹ strains isolated from hospitalized patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J med Microbiol* ۱۹۹۳; ۳۹: ۳۱۰-۷.
 ۱۱-Vital Brazil JM, Alves RM, Rivera IN. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between ۱۹۹۱ and ۱۹۹۹. *FEMS Microbiol Lett* ۲۰۰۲; ۲۱۵: ۱۵-۲۱.
 ۱۲-Mukhopadhyay AK, Chakarabarty S, Takeda Y, Nair GB & Berg DE. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX phi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J Bact* ۲۰۰۱; ۱۸۳: ۴۷۳۷-۴۶.
 ۱۳-Keasler SP & Hall RH. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O¹ with multiplex polymerase chain reaction. *Lancet* ۱۹۹۳; ۳۴۱: ۱۶۶۱.
 ۱۴-Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, et al. Evaluation of RAPDbased typing scheme in a molecular epidemiology study

of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. J Appl Microbiol 2004; 96: 447-4.

15-Grace Nazareth Diogo Theophilo, Dália dos Prazeres Rodrigues, Nilma Cintra Leal, Ernesto Hofer. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. PMID: 16699625 [PubMed - indexed for MEDLINE] 2006; 48(2):65-70.

16-Pourshafie M, Grimont F, Kohestani S, Grimont P.A.D. A molecular and phenotypic study of *Vibrio cholerae* in Iran 2002. J Med Microbiol 2002; 51: 392-8.

17-Pourshafie M, Grimont F, Saifi M, Grimont P.A.D. Molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* isolates from infected patients in Tehran, Iran. J Med Microbiol 2000; 49:1085-90.

Frequency Analysis of Genes ctxA, tcpA, Ace and Zot in *Vibrio Cholerae* Isolated of Epidemic of Summer 2005 in Iran By PCR

Maleki A¹, Pakzad P², Hosseini Sh¹, Ranjbar R³, Purshafie MR⁴, Mohebi R², Ghafo'urian S², Hemateyan A², Sadeghi fard N^{2*}

(Received: 6 Nov. 2009 Accepted: 27 Nov. 2010)

Abstract

Introduction: *V. cholerae*, a Gram-negative bacterium is the causative agent of Cholera. *V. cholerae* O1 produces cholera toxin (CT) which is responsible for diarrhea. The zonula occludens toxin (Zot) acts on intestinal tight junctions to increase intestinal permeability. The accessory cholera enterotoxin (Ace) increases the potential difference across intestinal epithelium and alters ion transport. *V. cholerae* pathogenicity depends on a combination of factors known as ability to produce a cholera toxin (CT) and to adhere and colonize small intestine through colonization factor known as toxin-coregulated pilus (TCP).

Material & Methods: Thirty nine El Tor variants were obtained from outbreaks during 2005 in Iran. After detection of isolates by biochemical methods, and serotyping, chromosomal DNA was extracted by standard phenol/chloroform method. The oligonucleotide primers for each of the selected virulence-associated factors were designed based on available GenBank sequences for *V. cholerae* O1 E1

Tor for all the genes. PCR assay was performed and the PCR product was run and visualized in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Findings: In the present study, PCR was used to detect the presence of ctxA, Zot, Ace, and tcpA genes on 39 *V. cholerae* strains isolated from the summer epidemic 2005 in Iran. With the specific primers, the *V. cholerae* isolates were analysed by PCR for the presence of tcpA, ctxA, Ace and Zot genes. PCR showed that the genes encoding cholera toxin (ctxA), toxin co-regulated pilus (tcpA), accessory cholera enterotoxin (Ace) and zonula occludens toxin (Zot) were present in 89.74%, 84.6%, 100% and 100% of the isolates, respectively.

Discussion & Conclusion: The results of our study confirm that strains without ctxA gene, Ace and Zot genes are important and can be the causative agent of cholera.

Keyword: *Vibrio cholerae*, ctxA, tcpA, Ace, Zot

1. Dept of Microbiology, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

2. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Dept of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*(corresponding author)

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences