

## БИОАНАГААХ

### Шига токсин ялгаруулагч *Escherichia coli*-ийг ялган дүйх ПГУ болон LAMP аргачлалыг харьцуулсан дүн

Нямтуяа Н.<sup>1</sup>, Сарантуяа Ж.<sup>2</sup>, Мөнхдэлгэр Я.<sup>2</sup>, Амгаланзаяа Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль, Биоанагаахын сургууль  
<sup>2</sup>"Этүгэн", АУИС

Цахим шуудан: [tuyatuyakana@gmail.com](mailto:tuyatuyakana@gmail.com)

#### Abstract

#### A comparison of PCR and LAMP methods for detecting shiga toxin producing *Escherichia coli*

Nyamtuuya N.<sup>1</sup>, Sarantuya J.<sup>2</sup>, Munkhdelger Ya.<sup>2</sup>, Amgalanzaya D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MNUMS, School of Biomedicine

<sup>2</sup>"Etugen" University,

E-mail: [tuyatuyakana@gmail.com](mailto:tuyatuyakana@gmail.com)

#### Introduction:

PCR to detect and amplify the virulence genes of STEC is specific and more sensitive, however, it takes five to six hours for whole test procedure and requires special lab instruments such as thermocycler. Loop-mediated isothermal amplification is a simple, rapid, specific and cost-effective nucleic acid amplification method by using four to six primers when compared to PCR, nucleic acid sequence-based amplification, self-sustained sequence replication and strand displacement amplification.

#### Goal

Detection and comparison of STEC by PCR and LAMP

#### Materials and Methods

In our study, we analyzed comparison of PCR and LAMP results on standard strain used quality control strain solution which diluted 1pg/μL DNA, 10 pg/μL DNA, 100 pg/μL DNA, 1 ng/μL DNA, 10 ng/μL DNA, and 100 ng/μL DNA concentration from LB agar cultures.

#### Research ethics

Permission to submit the survey was granted by the Ethics Review Committee of the MNUMS and the survey was conducted in accordance with the rules and regulations.

#### Result

Sensitivity of Stx1 and stx2 genes in PCR results are positive in 10 pg/μL DNA solution and negative in 1pg/μL DNA. In LAMP test results showed that positive for all concentration. It shows that LAMP method sensitivity is 10 times more than PCR.

#### Conclusion:

It shows that LAMP method sensitivity is 10 times more than PCR. All in all LAMP test is cost effective test with sensitive for detection STEC.

Keywords: gel electrophoresis, LAMP, PCR, STEC, stx1, stx2

Pp. 3-7, Pictures 3, References 16

## Үндэслэл

Дэлхий дахинд хоол хүнсээр дамжих бактерийн халдвар эрчимтэй нэмэгдсээр байна. Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллага (ДЭМБ)-ын мэдээгээр хоол хүнсээр дамжих өвчинд 10 хүн тутмын 1 нь өртөж, эмгэгтөрөгч бактериар бохирлогдсон хоол хүнс хэрэглэсний улмаас жил бүр 420 сая хүн (230 сая нь 5 хүртэлх насны хүүхэд) суулгалтаар өвчилж байна [1]. АНУ-д жил бүр 76 сая хүн хоол хүнсээр дамжих халдвараар өвчилдөг бөгөөд тэдгээрийн 270000 орчим тохиолдол нь суулгалт үүсгэгч *Escherichia coli* (DEC)-ийн шалтгаантай байдаг [2]. *E.coli*-ийн шалтгаант хоолны хордлогын үед нарийн, бүдүүн гэдэсний үрэвсэл, цөсний замын халдвар, мухар олгойн үрэвсэл, элэгний буглаа зэрэг ходоод гэдэсний замын олон төрлийн эмгэг үүсдэг [3, 4]. STEC-ийн хоруу чанарын генийг олшруулан илрүүлэх ПГУ-ын арга нь өвөрмөц, мэдрэг чанар сайтай боловч оношлогоонд 5-6 цаг зарцуулахаас гадна заавал тусгай термоциклер, тоног төхөөрөмж шаарддаг [5]. LAMP олшруулалт нь *bst* полимеразыг ашиглан ПГУ-аас ялгаатай нь 4 юмуу 6 праймер ашиглан байгенийг олшруулдаг, тогтмол температурт явагддаг, нэг шаттай, их хэмжээний бүтээгдэхүүн үүсгэдэг илүү өвөрмөц, хурдан бөгөөд энгийн арга юм [6]. Дотор праймер (FIP, VIP) тус бүр нь байгенийн 2 өвөрмөц дараалалд хамжаа, үндсэн гогцоо үүсэхэд туслах дарааллыг агуулдаг. Гадна праймер нь зөвхөн циклийн бус үе шатанд гинжийг нийлэгжүүлэх үүрэг гүйцэтгэдэг бол байгенийн бүсүүдтэй хамжаа дараалал бүхий гогцоо праймер нэмэлтээр ашигласнаар олшруулах урвалыг илүү хурдасгадаг [7, 8]. Гельд гүйлгэсэний дараа гарсан үр дүнг этидиум бромид, SYBR green гэх мэт флюоресценц будагч бодис ашиглан хэт ягаан туяаны үүсгүүрт харах эсвэл өнгөний өөрчлөлтөөр нүдээр харж дүгнэх боломжтой. LAMP олшруулалтын арга нь генетикийн шинжилгээ, халдварт өвчний оношлогоо, хоол хүнсний эрүүл ахуй, орчны шинжилгээ зэрэгт өргөн хүрээнд ашиглах бүрэн боломжтой [9].

## Зорилго

STEC-ийг ПГУ болон LAMP-аргаар илрүүлэн, харьцуулан үнэлэх

## Судалгааны материал, арга зүй

Бид судалгаандаа Кагошимагийн Их Сургуулийн судалгааны лабораторид ялган дүйсэн Stx1, Stx2 эерэг STEC-ийн лавлагаа омгийг ашиглалаа. Лавлагаа омгийг LB агарт өсгөвөрлөн, [10] өсгөврөөс ДНХ ялгалаа [5]. ДНХ-ийн гарцыг нанодропоор хэмжин 1пг/мкл ДНХ, 10пг/мкл ДНХ, 100пг/мкл, ДНХ, 1нг/мкл, ДНХ, 10нг/мкл ДНХ, 100нг/мкл концентрацитай ДНХ уусмал бэлтгэлээ. Эдгээр ялгаатай концентрацитай ДНХ уусмалд ПГУ болон LAMP аргаар STEC-ийг илрүүлэн илрүүлэх чадамжийг харьцуулан үнэлэв.

**STEC-ийг ПГУ-аар илрүүлэх:** STEC-ийн шига токсин кодлогч *stx1* (348 х.н), *stx2* (584 х.н) генүүдийг өвөрмөц праймер (*stx1* F:CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG, R:CACCAGACAATGTAACCGCTG, *stx2* F:ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG, R:GCGTCATCGTATACACAGGAGC) ашиглан ПГУ-аар олшруулж, илрүүлээ. [11] ПГУ-ыг эхлэлийн денатураци 94 хэмд 3 минут, Денатураци 94 хэмд 30 сек, Праймер холбогдох 62 хэмд 40 сек, Уртсах 72 хэмд 1 минутаар 31 цикл явагдсаны дараа 72 хэмд 7 минут байх нөхцлөөр явууллаа [12, 13]. Олширсон бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн агарозын гелээр 100 вольтод 35 минут гүйлгэж этидиум бромидоор 20 минут будаж илрүүлэв [11].

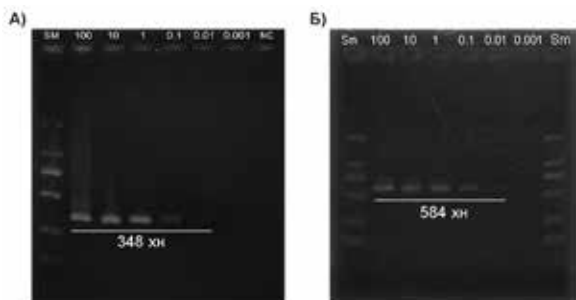
**Шига токсин ялгаруулагч *E.coli* (STEC)-ийг LAMP аргаар илрүүлэх:** LAMP урвалжийн холимгийг 5 M бетайн, 14ThermoPol буфер уусмал, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM де олигонуклеозид трифосфат, 10 U/μL Bst DNA полимераз, F3/B3 праймер 0.1 μM, FIP/VIP праймер 1.8 μM, LF/LB праймер 1 μM, 2мкл ДНХ байхаар тооцож нийт 25 мкл холимог бэлтгэв. [5] Бэлтгэсэн холимгийг 65°C хэмд 1 цаг инкубацлан олшруулсаны дараа 80°C хэмд 5 минут байлгаж урвалыг зогсоон, олширсон бүтээгдэхүүнд Sybr green будаг нэмж нүдээр болон хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт харж мөн гел электрофорезийн аргаар илрүүлээ [14].

### Судалгааны ёс зүй

Судалгаа явуулах зөвшөөрлийг АШУУИС-ийн Ёс зүйн хяналтын хорооноос олгон судалгааг ёс зүйн дүрэм, журамын дагуу хийж гүйцэтгэсэн.

### Үр дүн

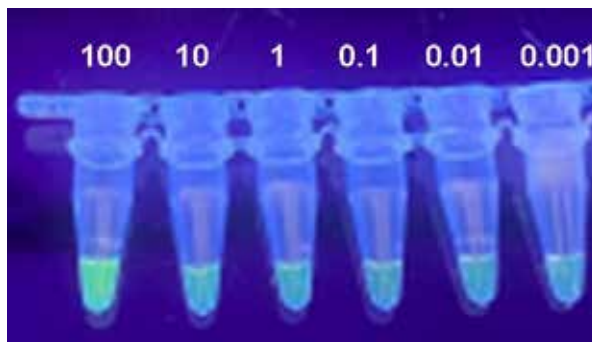
100 – 0.001 нг/мкл хүртэл 6 төрлийн ялгаатай концентраци бүхий ДНХ уусмалд Stx1, Stx2-ийг ПГУ-ын аргаар илрүүлсэн дүнг 1-р зурагт үзүүллээ.



**Picture 1. Mapping of PCR results of STEC toxin encoders stx1 (A), stx2 (B), genes detected in DNA solutions at different concentrations. Sm determinant, DNA in columns 2 - 7 at a concentration of 100 - 0.001 ng/μl**

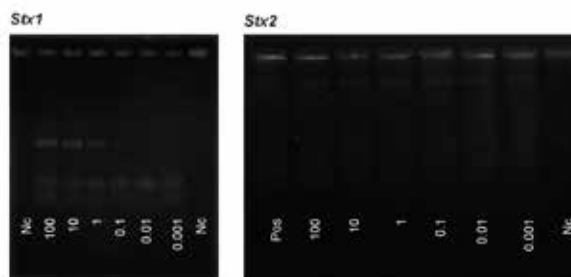
ПГУ-аар stx1 генийн 348 х.н урттай бүтээгдэхүүн болон stx2 генийн 584 х.н урттай бүтээгдэхүүн аль аль нь 100нг/мкл концентрацитайгаас 10пг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ уусмалд олширч илэрлээ. Харин 1 пг/мкл концентрацитай ДНХ уусмалд stx1, stx2 генийн бүтээгдэхүүн илэрсэнгүй.

Ялгаатай концентрацитай ДНХ уусмалд stx2 генийг LAMP аргаар олшруулан хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт байршуулан, өнгөний ялгарлаар дүгнэхэд 100нг/мкл концентрацитайгаас 1пг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ уусмалд эерэг тодорхойлогдлоо (Зураг 2).



**Picture 2. UV detection of the STEC stx2 gene amplified by LAMP**

LAMP аргаар олшруулсан үр дүнг баталгаажуулан агарозын гельд гүйлгэн, этидиум бромидоор будаж илрүүлсэн дүнг 3-р зурагт нэгтгэлээ.



**Picture 3. STEC-shiga toxin encoder stx1 and stx2 genes detected by LAMP DNA solution at different concentrations**

Nc - negative control, pos - positive control, DNA in columns 2 - 7 with a concentration of 100 - 0.001 ng/μl

LAMP аргаар 100нг/мкл концентрацитайгаас 1пг/мкл болтол шингэрүүлсэн бүх шингэрүүлэлтийн хувд эерэг үр дүн өгч ПГУ-тай харьцуулахад 10 дахин мэдрэг байна.

### Хэлцэмж

1998 онд Японы Eiken Chemical Co., Ltd хэмээх компани ПГУ-аас үүдэлтэй тодорхой бэрхшээлүүдийг арилгасан тогтмол хэмт гогцоо олшруулалт (LAMP) аргыг зохион бүтээжээ [16]. LAMP аргыг 2000 онд Японы судлаач Tsugunori Notomi нуклейн хүчлийг Bst ДНХ полимераза ферментийг ашиглан тогтмол температурт явагддаг ДНХ-ийн гинжийг автоматаар солих урвалд суурилсан LAMP аргыг туршиж, нуклейн хүчлийг олшруулах аргачлалд суурилсан бүх шинжлэх ухааны салбар, ялангуяа

генетикийн шинжилгээнд мутаци, нэг нуклеотидын полиморфизм илрүүлэх мөн халдварт өвчний оношлогоо, хоол хүнсний эрүүл ахуй, орчны шинжилгээ зэрэгт өвчин үүсгэгч вирус, бактери, шимэгчийг илрүүлэх өндөр ач холбогдолтой шинэлэг аргачлал болохыг судалгаагаараа нотолжээ [8]. 2020 онд Laura E. Lamb нар бхПГУ болон LAMP аргыг харьцуулан үнэлжээ. Судалгааны дүнгээр шинжилгээгээр эерэг сорьц 100%-д N = 6/6 LAMP эерэг, ПГУ-ын сорьцны 83%-д N = 5/6 бхПГУ эерэг байв. Судлаачид бохирдол, техник алдаа зэрэг хуурамч эерэг хариу гарсан байх боломжуудыг дахин шалгаж, хэд дахин туршиж үр дүнг баталгаажуулахад эерэг үр дүн хэвээр байжээ. Мөн ПГУ-аар сөрөг гарсан дээжүүдийн нэг нь LAMP аргаар эерэг байлаа. Уг судалгаагаар LAMP аргыг ПГУ-аас илүү мэдрэг чанар өндөртэй байж магадгүй юм гэж дүгнэжээ [15].

**Дүгнэлт:** LAMP шинжилгээг STEC-ийг илрүүлэхэд ашиглах бүрэн боломжтой, илрүүлэх чадамж ПГУ-ын шинжилгээнээс 10 дахин өндөр байна.

#### Ном зүй

1. Zhao C, Ge B, De Villena J, et al. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Applied and environmental microbiology*. Dec 2001;67(12):5431-5436.
2. Taylor EV, Nguyen TA, Machesky KD, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *Journal of food protection*. Jun 2013;76(6):939-944.
3. Дзшиймаа Л, Батхүү П, Гэлэгжамц Х. *Escherichia coli* (EcoH) -ийн халдвар 2006;
4. МУҮСХ. Хүнсний аюулгүй байдлын статистикийн үзүүлэлтүүд 2018. 2019.
5. Wang F, Jiang L, Ge B. Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools. *Journal of clinical microbiology*. Jan 2012;50(1):91-7. doi:10.1128/jcm.05612-11
6. Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of microbiological methods*. Feb 2007;68(2):414-20. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.024
7. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. Jun 2002;16(3):223-9. doi:10.1006/mcpr.2002.0415
8. Я.Мөнхдэлгэр ВХ. Тогтмол хэмт гогцоо олшруулалтын арга (LAMP) ба SARS-CoV-2 вирусийн оношлогоо. АШУҮИС; 2021.
9. Gould LH, Bopp C, Strockbine N, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. Oct 16 2009;58(Rr-12):1-14.
10. Shakerian A, Rahimi E, Emad P. Vegetables and Restaurant Salads as a Reservoir for Shiga Toxigenic *Escherichia coli*: Distribution of Virulence Factors, O-Serogroups, and Antibiotic Resistance Properties. *Journal of food protection*. Jul 2016;79(7):1154-60. doi:10.4315/0362-028x.jfp-15-517
11. George DF, Gbedema SY, Agyare C, et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Kumasi, Ghana. *ISRN microbiology*. 2012;2012:658470. doi:10.5402/2012/658470
12. Vidal M, Kruger E, Duran C, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of clinical microbiology*. Oct 2005;43(10):5362-5. doi:10.1128/jcm.43.10.5362-5365.2005
13. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among E.

- coli strains causing diarrhea in Mongolian children. Journal of clinical microbiology. Jan 2004;42(1):133-9.
14. Yan M, Xu L, Jiang H, Zhou Z, Zhou S, Zhang L. PMA-LAMP for rapid detection of Escherichia coli and shiga toxins from viable but non-culturable state. Microbial pathogenesis. Apr 2017;105:245-250. doi:10.1016/j.micpath.2017.02.001
15. Lamb LE, Bartolone SN. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. 2020;15(6):e0234682. doi:10.1371/journal.pone.0234682.
16. Soroka M, Wasowicz B. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Jul 29 2021;10(8).

*Танилцаж, нийтлэх санал өсгөн:  
Анагаах ухааны доктор Д.Алтанцэцэг*