Archive of SID

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۱۷-۱۰

تشخیص سریع اسپور عامل سیاه زخم به روش مولکولی

شهرام پروین، علی احمدی، فاطمه پورعلی، علی کرمی*

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج).
نویسنده رابط: علی کرمی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) ،
تلفن: ۸۸۰۴۰۰۶۰ Karami@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله :۸۸/۱۰/۱۰

چکیده:

زمینه و اهداف: *باسیلوس آنتراسیس* باکتری اسپور دار، گرم مثبت، هوازی و عامل بیماری سیاه زخم است. در سال‌های اخیر از این باکتری در حملات بیوتروریستی استفاده شده است. اسپور *باسیلوس آنتراسیس* نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی بسیار مقاوم می‌باشد. برای تشخیص سریع اسپور این باکتری به روش‌های مولکولی، به استخراج ژنوم با شکستن اسپور نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه تشخیص سریع مولکولیDNA *باسیلوس آنتراسیس* به روشMultiplex PCR با شکستن سریع اسپور به روش فیزیکی در زمان بسیار کوتاه و بدون استخراج ژنوم است.

روش بررسی: اسپورباکتری غیر بیماریزای سیاه زخم یا سویه استرن (سویه واکسن *باسیلوس آنتراسیس*) توسط سیستم Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, In.) با استفاده از بید های ۰/۱ میلی متری در ۵۰۰۰ دور در دقیقه شکسته و استخراج شد. تشخیص به روش Multiplex PCR با استفاده از ۳ جفت پرایمر صورت گرفت. PCR سه قطعه DNA با اندازه‌های مورد انتظار را تولید نمود که در ژل آگاروز الکتروفورز آنالیز شد. جهت تعیین حد تشخیص و اختصاصیت از رقت‌های مختلف اسپور به روش CFU/ml و باکتری‌های دیگر همین جنس نیز استفاده گردید.

یافته‌ها: اسپورهای *باسیلوس آنتراسیس* در عرض سه دقیقه شکست شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و Multiplex PCR، محصولات به دست آمده شامل سه قطعه (۱۰۸۳ bp، ۳۸۵ bp ، ۱۶۴ bp) در ژل آگارز ۲ درصد آنالیز شد. با استفاده از آنزیم برش دهنده Hind III محصول (1083bp) تائید گردید. حد تشخیص بر اساس روشCFU/ml، رقت ۱/۵۱۲ از سوسپانسیون با 7680/ml یا ۷ اسپور در میلی لیتر اسپور معین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization از سرعت لازم برخوردار می‌باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراجDNA نیست. با این روش، ما توانستیم به طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور باکتری باسیلوس آنتراسیس را در نمونه‌ها تشخیص دهیم.

کلید واژه ها: تشخیص، *باسیلوس آنتراسیس*، اسپور، Multiplex PCR

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

باسیلوس آنتراسیس، باکتری اسپوردار گرم مثبت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و عامل بیماری سیاه زخم است (۱). ژنوم عامل سیاه زخم از DNA حلقوی به اندازه ۵/۴ میلیون جفت باز تشکیل شده است. دو پلاسمید اساسی در این باکتری وجود دارد که واجد ژن‌های ویرولانس و کپسول است : پلاسمید pXoI به اندازه ۱۸۱kbp واجد ژن‌های pa ، lef ، ef و پلاسمید pXoII به اندازه 96 kbp دارای ژن‌های رمز کننده کپسول (Cap A,B,C) است. مطالعات نشان می‌دهد که به دلیل ویرولانس بسیار بالا و همچنین اسپور بسیار مقاوم به عوامل محیطی و جهش زا این باسیل یکی از همگن‌ترین باکتری‌های شناخته شده از نظر تنوع ژنتیکی است (۴-۲). تفاوت خاص بین عامل سیاه زخم و گونه‌های دیگر باسیلوس‌ها، داشتن کپسول و عدم تحرک می‌باشد. از خصوصیات بیوشیمیایی این باکتری تخمیر بعضی از قندها بدون تولید گاز، داشتن اکثرا اکسیداز، کاتالاز، نیترات، VP مثبت و اوره آز منفی است (۵).

ویژگی‌های منحصر به فرد این باکتری سبب شده است تا آن را مستعد جنگ‌افزار بیولوژیکی نماید. مهم‌ترین این ویژگی‌ها عبارتند از: تولید اسپور بسیارکوچک، قدرت مقاومت بسیار زیاد، قدرت بیماریزائی بالا، قابلیت تولید انبوه و سهولت رهاسازی آن به صورت آئروسل (۷-۶). عامل بیماری سیاه زخم، اسپوری تولید می‌نماید که نسبت به شرایط مختلف فیزیکی مقاوم است. به این ترتیب توانائی بقای آن در محیط بسیار زیاد است. از این-رو، تقریبا در هر نقطه‌ای از جهان یافت می‌شود(۸). تیمارکردن اسپور با حرارت باعث افزایش هیدروفوبیسیتی نسبی آن می‌گردد(۹). روش‌های تشخیصی *باسیلوس آنتراسیس* به صورت کلاسیک و سنتی شامل کشت، تشخیص ایمونولوژیک شکل کپسول و قابلیت لیز شدن توسط گاما فاژ می‌باشد(۱۰).

روش‌های آزمایشگاهی متداول میکروب‌شناسی برای تشخیص باسیل سیاه زخم بسیار مفید است ولی زمان تشخیص قطعی می‌تواند ۴۸-۲۴ ساعت به طول انجامد(۱۱). در نتیجه از روشی جهت شکست اسپور و استخراج DNA و تشخیص مولکولی در مدت زمان بسیار کمتر(حدود ۳ ساعت) استفاده می‌شود(۱۳،۱۲). روش‌های معمول لیز و شکستن اسپور، مکانیکی و شیمیائی است. با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از محلول‌های شیمیائی در نمونه‌های واجد اسپور، روش‌های فیزیکی ارجح هستند. هدف از این مطالعه تعیین روش تشخیص *باسیلوس آنتراسیس* بر اساس شکستن به روش فیزیکی، استخراج DNA از دیواره‌های سخت اسپور و سپس تشخیص مولکولی ژنوم حاصل به روش Multiplex PCR در زمان کوتاه بود.

مواد و روش‌ها:

تهیه سویه‌های باکتری‌ها: سویه‌های استاندارد گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC:1365)، *باسیلوس سرئوس*(PTCC:1247) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران وسویه Stern 34F2 و غیر بیماریزای *باسیلوس آنتراسیس* از سازمان دامپزشکی کل کشور تهیه شدند.

کشت باکتری: باکتری‌ها در محیط آگار خوندار، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از کلنی‌های رشد کرده در شرایط کاملاً استریل لام جهت رنگ آمیزی گرم تهیه شد(۱۴).

تهیه اسپور: برای به دست آوردن اسپور، سویه باکتری‌ها از محیط کشت LB broth به روی محیط اختصاصی تولید اسپور(Ammoniom salt sugar)(۱۵) کشت و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۱۰ روز گرمخانه گذاری شد. سپس در زیر هود بیولوژیک کلاسII از کلنی‌های رشد کرده لام تهیه و رنگ آمیزی مالاشیت گرین انجام گردید. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت سطح محیط کشت حاوی اسپور به وسیله ۱۰- ۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به‌طور متوالی شستشو شد. سوسپانسیون حاصل به داخل لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری منتقل و سانتریفوژ(مدت۳۰ دقیقه، ۳۷۹۰ g) شد. سپس مایع روئی به طور کامل به محفظه حاوی فرمالدئید منتقل گردید. به رسوب داخل لوله ۵ ml آب دو بار تقطیر اضافه شد و لوله به مدت ۳ دقیقه داخل دستگاه استیرر هموژن شد. سپس برروی سوسپانسیون، اتانول ۹۸ درجه اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در مرحله بعدی محتویات لوله فالکون سانتریفوژ و مایع روئی دور ریخته شد. رسوب درون لوله با ۵ ml آب مقطر دو بار تقطیر دو بارشستشوگردید.سپس رسوب در حجم۳ ml آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر دو بار تقطیر حل و سوسپانسیون یکنواخت به دست آمد. جهت از بین بردن باکتری‌های رویشی باقیمانده، سوسپانسیون به بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه منتقل شد(۱۶). شکست دیواره اسپور و استخراج ژنوم: از دستگاه Mini bead beater-8 جهت شکستن اسپور استفاده شد.

ویال‌های مخصوص دردار حاوی بیدهای شیشه‌ای به اندازه ۱/. m m دراتوکلاو استریل گردید. از سوسپانسیون اسپور در شرایط استریل و با رعایت نکات ایمنی مقدار یک میلی لیتر به ویال حاوی بید اضافه شد. ویال‌های حاوی سوسپانسیون در محفظه‌های مخصوص دستگاه اسپورشکن گذاشته شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۸۰ ثانیه توسط بیدهای اختصاصی شکسته شد. برای اطمینان، از محتویات سوسپانسیون حاصل لام تهیه و رنگ آمیزی اختصاصی اسپور(مالاشیت گرین)انجام گردید.

پرایمرها: پرایمرهای اختصاصی تشخیص عامل مورد نظر ازمقالات موجود استخراج گردید(۱۱). جایگاه پرایمر شماره ۱ برروی پلاسمید PxoI به اندازه bp ۱۰۸۳ که رمزکننده ژن pa می‌باشد. جایگاه پرایمر شماره۲ برروی پلاسمید PxoI به اندازه bp ۳۸۵ که رمزکننده ژن lf می‌باشد. جایگاه پرایمر شماره ۳ برروی کروموزوم به اندازه ۱۶۴bp می باشد.

واکنش **Multiplex PCR**: شرایط بهینه واکنش PCR ذکر شده در مقاله مرجع(۱۱) اعمال شد(جدول‌های شماره ۱و۲). محصول واکنش PCR درژل آگاروز ۲ ٪ الکتروفورز و ژل با اتیدیوم برومایدرنگ آمیزی و سپس توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن تصویر تهیه گردید.

جدول ۱: مقادیر Master mix جهت **Multiplex PCR** از ژنوم استخراج شده اسپور قبل و بعد از بهینه سازی

ردیف	مواد	مقداراولیه(µl)	غلظت نهائی	مقداراولیه(µl)	غلظت نهائی
۱	DNA Templete	۱	۱ µl	۱	۱ µl
۲	Buffer PCR (10 x)	۲/۵	۱/۲۵X	۲/۵	۱/۰۵X
۳	$Mgcl_2$ (50 mM)	۱/۵	۳/۷۵mM	۱/۵	۳/۱۵Mm
۴	dNTPs mM 10	۰/۵	۰/۲۵mM	۰/۵	۰/۲۱mM
۵	Primers forward (۳ جفت)	۱	۵Pmole	۰۸	۳/۳۶Pmole
۶	Primers reverse (۳ جفت)	۱	۵Pmole	۰۸	۳/۳۶Pmole
۷	Taq DNA Polymerase (5U/µl)	۰./۵	۲/۵ U/µl	۰./۵	۲/۵ U/µl
۸	D.D.W (آب مقطر دوبار تقطیر)	۸	۸ µl	۱۳	۱۳ µl
۹	حجم نهائی	۲۰		۲۳/۸ µl	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: نحوه اجرای چرخه‌های PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان
Denaturation	۹۵درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه
Denaturation	۹۵ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
Annealing	۵۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
Extension	۷۲ درجه سانتی گراد	۴۰ ثانیه
Final Extention	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۲۰ثانیه

تائید محصول: پس از استخراج توالی ژن و یافتن جایگاه پرایمرها در روی آن و بدست آوردن اندازه دقیق قطعه تکثیر شده (1083bp) با استفاده از برنامه نرم‌افزار DNASIS ، جایگاه برش آنزیمی مناسب در روی قطعه، بررسی شد. جهت هضم آنزیمی محصول PCR، طبق دستورالعمل هضم آنزیمی عمل شد(محصول PCR به مقدار۵µl، آنزیم Hind III به مقدار ۱µl، buffer 10Xr به مقدار۲µl، آب دو بارتقطیر شده به مقدار ۱۲µl): ابتدا مخلوط فوق به مدت ۳ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به جهت اثر آنزیم مورد نظر انکوبه شد. پس از این زمان، محصولات حاصل از هضم آنزیمی به مدت ۶۵ دقیقه الکتروفورز شدند. جهت مشاهده باندهای برش خورده DNA از ژل آگاروز۲ ٪ استفاده گردید.

تعیین حساسیت و اختصاصیت: از نمونه‌های اسپور شکسته شده توسط دستگاه اسپور شکن رقت‌های صفر تا ۱/۱۰۲٤ تهیه گردید، سپس رقت‌های تهیه شده برروی محیط آگار خوندار جهت شمارش تعداد اسپورها کشت داده‌شد. همچنین برای ژنوم رقت‌های مذکور واکنشPCR و الکتروفورز محصولات PCR انجام گردید.

جهت تعیین اختصاصیت آزمایش از باکتری‌های هم جنس *باسیلوس آنتراسیس*(مانند باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و همچنین *E.coli* O157 :H7 و *شیگلادیسانتری* برای استخراج ژنوم و واکنش Multiplex PCR استفاده گردید.

یافته ها:

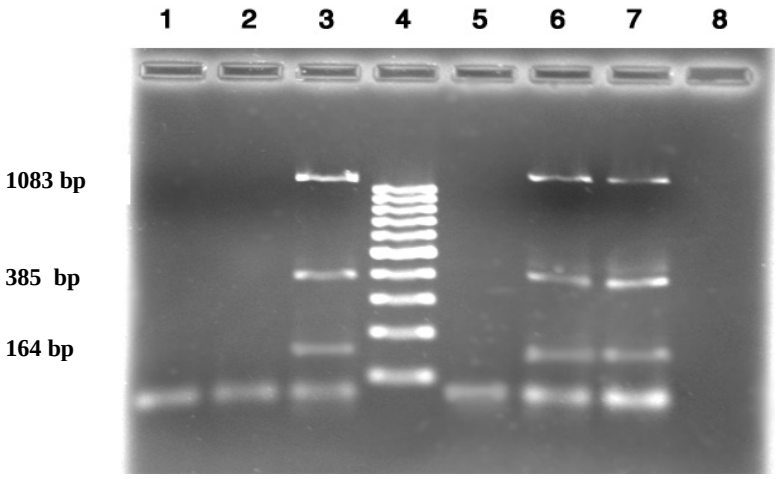
نتایج کشت باکتری(رویشی و اسپور): پس از گرمخانه گذاری و رنگ آمیزی گرم از کلنی‌های جنس باسیلوس (باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس)و سویه stern 34f2، باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شد. اسپور حاصل از بهینه‌سازی مرحله اسپورولاسیون و خلوص بالای آن از طریق رنگ آمیزی مالاشیت گرین و بررسی میکروسکوپی نمونه کشت محیط اختصاصی اسپور مورد تائید قرار گرفت.

نتایج الکتروفورز واکنش **Multiplex PCR**: محصول واکنش PCR سوسپانسیون اسپور شکسته شده با رقت ۱/۳۲ سبب ایجاد ۳ باند مجزای مورد انتظار شامل قطعات bp ۱۰۸۳ ، bp ۳۸۵ ، ۱۶۴bp گردید(شکل ۱).

تائید محصول واکنش **Multiplex PCR**: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول bp ۱۰۸۳ توسط آنزیم محدودالاثر برش دهنده Hind III ، دو قطعه با اندازه‌های ۶۹۶bp و ۳۸۶bp حاصل می‌شود که تائیدکننده درستی محصول ایجاد شده توسط پرایمرها است(شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : ژل الکتروفورز ۲٪ محصول Multiplex PCR ژنوم اسپور قبل و بعد از شکست

۱- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

۲- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

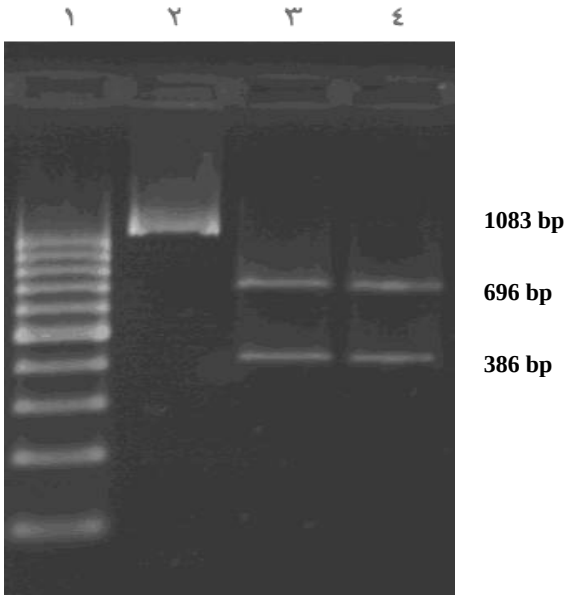
۳-کنترل مثبت(ژنوم استخراج شده سویهStern 34f2)

۴- 100 bp Ladder

۵-کنترل منفی(آب دو بار تقطیر شده)

۶- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن

۷- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن



شکل۲: برش محصول bp ۱۰۸۳ واکنش PCR توسط آنزیم Hind III

۱- Ladder100 bp(فرمنتاز)

۲- محصول bp ۱۰۸۳ واکنش PCR

۳- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III

۴- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III

www.SID.ir

Archive of SID

حساسیت و اختصاصیت: واکنش PCR از رقت‌های ۱/۳۲ تا ۱/۵۱۲ از نمونه‌های اسپور شکست یافته با دستگاه اسپور شکن نشان داد که حساسیت تشخیص نمونه سوسپانسیون اسپور تا رقت ۱/۵۱۲ که دارای ۷۶۸۰ عدد اسپور در هر میلی‌لیتر است، مورد تائید است. برای بررسی اختصاصیت پرایمرهای انتخابی از ژنوم استخراج شده نمونه‌های باکتری *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *E.coli* O 157 و *شیگلا دیسانتری* استفاده شد. محصولات حاصله بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورزشد. پرایمرهای طراحی شده فقط با *باسیلوس آنتراسیس* محصول تولید کردند.

بحث:

باتوجه به تولید راحت و سریع اسپور باسیل عامل سیاه زخم و مقاومت بالای آن نسبت به عوامل محیطی، شناسایی باکتری(شکل فعال واسپور) لازم است. همچنین استخراج ژنوم و شکست دیواره باکتری و اسپور ضروری‌تراست. جهت تولید اسپور، از محیط اختصاصی تولید اسپور(Ammoniom salt sugar)(۱۵) استفاده شد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه مقدار یون منگنز و کلسیم در ساختار اسپور نسبت به فرم رویشی زیادتر می‌باشد، پس در نتیجه از این محیط انتخابی جهت تولید تعداد فراوان اسپور استفاده گردید. از طرف دیگر اگر شرایط محیط برای میکروارگانیسم نامساعد گردد، پروتئین‌هائی که در شرایط مساعد غذائی بر روی ژن‌های تولید کننده اسپور در کروموزوم قرار دارند، از کروموزوم برداشته شده و ژن‌های اسپورزائی بارز می‌گردند و باکتری تبدیل به اسپور می‌شود(۵). لذا، طی مدت ۵ الی ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، هر چه به تعداد روزهای انکوباسیون افزوده گردد، شرایط محیطی سخت‌تر می‌شود و فرم رویشی بیشتری به اسپور تبدیل می‌گردد. به این ترتیب، به خلوص بالاتری از اسپوردست می‌یابیم. به دلیل سبک‌تر بودن فرم رویشی نسبت به اسپور،با سانتریفوژ نمودن سوسپانسیون‌های اسپور نسبتی از خلوص و جداسازی اسپورها حاصل شد. در مرحله بعدی افزودن اتانول و آب مقطر دو بار تقطیر شده بر روی سوسپانسیون مخلوط باعث از بین رفتن غشاء فرم‌های رویشی شد. این پدیده باعث نفوذ آب به داخل سیتوپلاسم آنها می‌گردد و با تورم سلولی منجر از بین رفتن نسبی فرم‌های رویشی باکتری می‌شود. در مرحله پایانی و تکمیلی قرار دادن محلول سوسپانسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه، تمام فرم‌های رویشی را از بین برد. جهت اطمینان از زنده بودن اسپورهای حاصله در سوسپانسیون، با کشت مجدد در محیط آگار خوندار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت اسپورها به فرم رویشی تبدیل شدند. این آزمایش، نشان دهنده زنده ماندن اسپورها بعد از تمام مراحل خالص سازی بود.

جهت شکستن دیواره اسپور *باسیلوس آنتراسیس* از روش‌های فیزیکی، شیمیائی و فیزیکی-شیمیائی استفاده می‌شود. روش فیزیکی، روش بسیار خوبی برای شکستن اسپورها است. در مطالعات و پژوهش‌های انجام شده در زمینه کاربرد روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم، روش‌های Freeze/thaw – Bead mill – Hot-detergent Treatment homogenization استفاده شده‌اند. ولی نتیجه این مطالعات ارجحیت روش Bead mill homogenization را نسبت به سایرین نشان می‌دهد(۱۳). یکی از شاخصه‌های مهم در تشخیص عوامل باکتریائی تشخیص در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌باشد که روش فیزیکی مورد استفاده در این مطالعه (Bead mill homogenization) در کوتاه‌ترین زمان (۶۰ ثانیه) حاصل گردید. ولی جهت شکست تمام اسپورهای درون سوسپانسیون زمان بیشتری (۱۸۰ ثانیه) جهت استخراج کل ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. در صورتیکه در سایر روش‌های فیزیکی این ویژگی وجود ندارد(۱۳). در روش‌های معمول مورد استفاده جهت استخراج ژنوم به مواد شیمیائی (مانند فنل کلروفرم، جوشاندن، آنزیم ها، بافرها، کیت های تجاری) نیاز است. آنزیم ها و یا دترجنت‌ها می‌توانند به طور بالقوه به آنزیم ها، ارگانل‌های سلولی، ژنوم باکتری آسیب احتمالی برسانند. ولی در روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم که در این مطالعه استفاده شد (Bead mill homogenization) مواد شیمیائی فوق مصرف نشدند(۱۶). همچنین در مطالعات انجام شده به روش فیزیکی ، در روش‌های Freeze/thaw – Hot-detergent Treatment – Bead mill homogenization در مراحل استخراج از بافر

TENS 2X (Tens 1X is 50 mM Tris HCL[pH 8.0], 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1%[wt/vol] SDS)

استفاده‌گردید. ولی در روش فیزیکی مطالعه حاضر (Bead mill homogenization) فقط ازآب دو بار تقطیر استفاده شد.این مورد می‌تواند به ساده بودن روش، کاهش هزینه و زمان کمک کند (۱۳و۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

قبل از شکست فیزیکی اسپور توسط glass bead، در سوسپانسیون مورد نظر DNA خارج سلولی وجود دارد. برای برطرف کردن این عیب و بدست آوردن سوسپانسیون اسپور عاری از آلودگی با DNA، از سوسپانسیون رقت تهیه شد. از این رقت ، که با الکتروفورز محصول Multiplex PCR باند ایجاد نمی‌کند، جهت شکست اسپور استفاده شد.

تشخیص و شناسائی عوامل باکتریائی اسپوردار در زمان بسیار کوتاه‌تر از روش‌های سنتی انجام پذیرفت. برای تبدیل شدن اسپور *باسیلوس آنتراسیس* به سلول‌های رویشی، آن را باید به مدت حداقل۶ ساعت درمحیط آگار خوندار و در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری کرد. این مرحله هم زمان بر می‌باشد. ولی با شکستن اسپور به صورت مستقیم، جهت بدست آوردن ژنوم باکتری، به زمان خیلی کمتری نیاز است(۱۷). به منظور عدم استفاده از مواد شیمیائی در راستای حفظ محیط زیست، و حفظ سلامت کاربران، و جهت اجتناب از هرگونه مواد شیمیائی سمی و مضر، باید به بسط روش‌های سریع و مکانیکی شکست اسپور و روش‌های خالص سازی آن از سوسپانسیون پرداخت. در این روش نسبت به روش‌های سنتی در مجموع هزینه کمتری صرف شد. روش مولکولی Multiplex PCR نسبت به روش‌های سنتی از دقت و حساسیت بالائی برخوردار می‌باشد. دسترسی سریع و آسان به ژنوم اسپور و تشخیص مولکولی مستقیم آن بدون طی‌کردن فرآیند طولانی استخراج ژنوم از مزایای روش ما است. در یکی از پژوهش‌های انجام شده(۱۸) در قسمت استخراج DNA از اسپورهای باکتری، به خالص سازی DNA حاصل از شکست اسپور باکتری اشاره شده است. ولی ما در مطالعه حاضر از دستگاه اسپورشکن استفاده کردیم و نمونه DNA حاصل از شکست اسپور را خالص ننموده و سوسپانسیون حاصل از شکست را جهت تشخیص مولکولی DNA به روش Multiplex PCR بکار بردیم.

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه کنوانسیون منع سلاح‌های میکروبی از باکتری *باسیلوس آنتراسیس* پاتوژن به عنوان یک سلاح میکروبی و خطرناک نام می‌برد، و نیز عدم دسترسی به این باکتری پاتوژن و منع قانونی و اخلاقی استفاده از آن و همچنین عدم وجود پلاسمید PxoII و دارا بودن PxoI، از سویه غیر بیماریزای این باکتری(سویه Stern) به عنوان تولیدکننده اسپور خالص استفاده شد. این سویه رفتاری مشابه با سویه بیماریزای *باسیلوس آنتراسیس* دارد(۲۰-۱۹). نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی، با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization، از سرعت لازم برخوردار می‌باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراج DNA نیست. با این روش، توانستیم به‌طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور باسیلوس آنتراسیس را در نمونه‌ها تشخیص دهیم. به این ترتیب، این مطالعه توانست در ایران موفق به تشخیص سریع اسپور باکتری شود.

فهرست مراجع:

۱. بروکس اف، بوتل اس، مورس آ. *میکروب شناسی پزشکی جاوتز* ملنیک و آدلبرگز. ترجمه ستوده نیا ع. چاپ سوم، تهران، انتشارات کبیر، ۱۳۸۲، صص، ۲۵۳ تا ۲۵۲.

۲. حاتمی ح. اپیدمیولوژی بیوتروریسم، اولین کنگره ملی بهداشت عمومی و طب پیشگیری، کرمانشاه، ۱۳۷۹، کتاب رایانه‌ای کنگره‌ها، معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، ویرایش ششم، سال ۱۳۸۰، صص، ۶۲۶ تا ۶۲۴.

3. Keim P, Kalif A, Schupp j , Hill K.. Molecular evalution and diversity in *Bacillus anthracis* by AFLP markers. *J Bacteriol .* 1997; **92**: 784- 6.

4. Knisely RF. Selective Medium for *Bacillus Anthracis*. *j Bacterio*1996; **93**: 684-6.

۵. ادیب فر پ. میکروب شناسی پزشکی. چاپ چهارم. قم،انتشارات الهادی، ۱۳۷۵، صص، ۲۸۱ تا ۲۷۷.

6. Pile C James, Malone D jhon, Eitzen M . Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch internal Med*1998; **158**: 429-434.

7. Okinaka R, Cloud K, Hampton O. Sequence, assembly and analysis of pXoI and pXoII. *J Applied Microbiol*1999; **87**:261-62.

8. Hugh Jones M. global anthrax report. *J Appl Microbiol*1999; **87**(2): 189-191.

9. Furukawa S, Naraisawa N, Watanabe T, kawarai T, Myozen K. Formation of spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *J.Food Microbiol*2005; **102**: 107-111.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Popovic T, Hoffimaster AR, Ezzell JW, Absire TG. Validation of methods for confirmatory identification of presumptive isolates of *Bacillus anthracis*, *J. AOAC internat l*2001; **88**: 175-177.

۱۱. کرمی ع، رنجبر ر، پورعلی ف، مهرانی ح. تشخیص سریع باسیلوس آنتراسیس به روش PCR، مجله پزشکی کوثر، تهران، پائیز۱۳۸۲، شماره۸(۳) صص ۱۹۷تا ۲۰۴.

12.Philip B, Margaret O, Farzad P, David A . A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis . *Biosensors&Bioelectronics*1999; **14**: 849-852.

13. Cheryl R. K, Kaysie L.B, Dante L.A, Peter C.S, Karen K.H, Paul J.J. Small – Scale DNA Sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environm Microbiol* 1998; **64**: 2463-2472.

۱۴. رجائی م، عطائی ر، قربانی غ، کرمی ع، مهرابی توانا ع. *سیاه زخم*- چاپ دوم، تهران، انتشارات اندیشمند، ۱۳۸۲، صص ۸۶ تا۶۶.

15. Buchanan R. E., Gibbons N. E., manual of determinative bacteriology. Ed. 8, *Baltimore*, Williams & wilkins. 1974; pp: 1689-1690.

16. Warriner k , Waites W.M. Enhanced sporulation *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose *Let Appl Microbiol* 1999; **29**: 97-102.

17. Ellerbrok H, Natterman H, Ozel M, Beutin L, Appel B. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR, *FEMES Microbiol*2002; **214**: 51-59.

18.Tamas T, Jennie C. Hunter C and Terrance L. Development of methods for extracting DNA from bacterial spores. *Environmental remediation technology program*1998; **510**: 1999-2000

19. Sterne M, The use of anthrax vaccines prepared from avirulant (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Veternary Sci. Animal Industry*. 1939: **13**: 307-312.

20. Sterne M, Avirulant anthrax vaccine onderstepoort. *Veternary Sci. Animal Industry* 1946; **21**: 41-43.

www.SID.ir