

تشخیص سریع ویبریو کلرا O1 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - الیزا (PCR-ELISA)

شهرام احمدی * M.Sc.، میر لطیف موسوی * Ph.D.، رحیم سروری * Ph.D.

جعفر سلیمیان * M.Sc.، احمد کریمی راهجردی * M.Sc.، شهرام نظریان * M.Sc.

جعفر امانی * M.Sc.

چکیده

هدف: ویبریو کلرا سروتایپ O1 عامل وبای اپیدمیک شناخته شده است. همه‌گیری‌های اخیر وبا در نقاط مختلف جهان نیاز به وجود روشی سریع و مطمئن برای شناسایی ویبریو کلرا را بیش از پیش لازم می‌سازد. هر چند روش‌های کلاسیک و متداول میکروبیولوژی حساس و اختصاصی‌اند اما هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند. بنابراین در این مقاله، تکنیک جدیدی برای تشخیص عامل ویبریو کلرا O1 تحت عنوان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - الیزا (PCR-ELISA) معرفی گردیده است.

روش بررسی: توالی ۳۷۵ جفت بازی از ژن کد کننده زیر واحد B سم وبا (ctxB) با DIG-dUTP تکثیر و نشاندار گردید. محصول PCR نشاندار شده، در میکروپلیت‌ها کوت (coat) و با استفاده از آنتی‌بادی ضد دیگوکسی ژنین گائوگه با آنزیم پراکسیداز (antidigoxigenin Fab-peroxydase) شناسایی شد. در ادامه این پژوهش جهت تأیید و شناسایی محصول PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین از پروب بیوتینه SH-1 که مکمل بخش میانی ژن ctxB بود، استفاده شد. اختصاصیت این روش با استفاده از ۶ سویه باکتری ویبریو کلرا O1، سالمونلا پاراتیفی C، شیگلا دیسانتری، پزودوموناس آئروجینوزا، انتروباکتر و کلبسیلا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: حساسیت تشخیص باکتری در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از نمونه باکتری CFU ۵ و با DNA ژنومی به میزان ۰/۵ - ۰/۶ پیکوگرم برای ویبریو کلرا O1 تعیین گردید. محدودیت تشخیص نمونه باکتری با پروب مذکور همانند روش بالا با استفاده از نمونه باکتری CFU ۵ و با DNA ژنومی ۰/۵ - ۰/۶ پیکوگرم تعیین شد.

نتیجه‌گیری: PCR-ELISA در مقایسه با روش‌های متداول PCR که مبتنی بر رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید می‌باشد، حساسیت بیشتری دارد. به نظر می‌رسد روش PCR-ELISA یک روش آزمایشگاهی مناسب و قابل اعتماد برای تشخیص عامل بیماری وبا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویبریو کلرا O1، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - الیزا (PCR-ELISA)، ژن کد کننده زیر واحد B سم کلرا (ctxB)

مقدمه

بیماری وبا چه بصورت پاندمیک و چه به صورت آندمیک طی هزاران سال گذشته زبانهای جبران ناپذیری را بوجود آورده است. اگرچه مدیریت بالینی وبا در ۴۰ سال گذشته بهبود یافته است با این وجود این بیماری یک تهدید جدی برای کشورهای درحال توسعه محسوب می‌شود. (۱-۳) این بیماری همیشه از آسیا به قاره‌های دیگر جهان انتشار یافته و تا سال ۱۹۲۳ شش پاندمی از آن در جهان ثبت شده که براساس شواهد موجود عامل همه آنها V.cholera O1 بوده است. عامل هفتمین پاندمی که از سال ۱۹۶۱ شروع گردیده برخلاف پاندمی‌های قبلی ویبریو التور است. (۲،۴-۶)

فاکتور بیماری‌زای باکتری V.cholera O1 اگزوتوکسینی است که کلرا توکسین نامیده می‌شود. به دلیل آنکه اثر عمده کلرا توکسین اختلال در عبور آب و الکترولیت از جدار مخاط روده است آن را آنتروتوکسین نیز می‌نامند. مولکول آنتروتوکسین از دو قسمت اصلی "A" (Active) به وزن مولکولی ۲۷۰۰۰ دالتون که سابقاً کلراژن نامیده می‌شد و "B" (Binding) یا کلراژنوتید به وزن مولکولی ۵۸۰۰۰ دالتون تشکیل شده است. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه‌ای است که وزن مولکولی هریک ۱۱۶۰۰ دالتون و توالی ژنی هر ۵ قسمت نیز یکسان است. (۴-۵) از آنجاییکه ویبریوکلرا یکی از مهمترین عوامل عفونی شناخته شده در سطح جهان می‌باشد لذا تشخیص سریع آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. (۲، ۶-۹) بنابراین یک روش سریع و حساس جهت تشخیص اولیه و کنترل بیماری مورد نیاز می‌باشد. روش‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی جهت شناسایی عامل بیماری وبا بستگی به ویژگی‌های باکتریولوژیک (مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ...) و بررسی ایمونولوژی سم (مانند روش RPLA) (۱۱) و یا توالی خاصی از DNA کد کننده سم در کرموزوم باکتری (همانند روش‌های PCR و دو رگه سازی) دارد. (۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳) اما همه این روش‌ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان، هزینه نسبتاً زیاد و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیصی هستند. اگرچه روش‌های PCR و دو رگه‌سازی در مدت زمان کوتاه با هزینه نسبتاً کم انجام می‌گیرد

اما بدلیل استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و استفاده از اتیدیوم بروماید ریسک آلودگی پرسنل آزمایشگاه را بالا برده و امکان تشخیص تعداد نمونه در این تکنیک‌ها کم می‌باشد. (۱۴-۱۷) ما در این تحقیق با هدف از بین بردن معایب بالا، سعی کردیم تا با طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت ژن ctxB و تکثیر آن با DIG-dUTP، محصول نشاندار شده را توسط کانژوگه Anti DIG شناسایی نموده و با انجام روش PCR-ELISA بر روی ویبریو کلرا O1 استاندارد یک روش سریع و حساس جهت شناسایی این باکتری ارائه نماییم.

روش بررسی

مواد مورد استفاده. DIG-dUTP و کانژوگه مورد استفاده از شرکت Roche خریداری گردید و همچنین پرایمرها و پروب مورد استفاده توسط شرکت TIM MOL.BIOL سنتز شد و سایر مواد که شامل آنزیم Taq DNA پلیمرز، dNTPs، MgCl₂ و آگاروز از شرکت سیناژن خریداری گردید.

تهیه سوشهای باکتری. سویه‌های باکتری ویبریو کلرا O1، سالمونلا پاراتیفی C، شیگلا دیسانتری، پزودوموناس آئروجینوزا، انتروباکتر و کلیسیلا همگی از آزمایشگاه رفرانس تهیه و با استفاده از روشهای کشت، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی تأیید مجدد گردیدند.

تهیه نمونه باکتری جهت PCR. سویه ویبریو کلرا O1 در محیط آب پیتون قلیایی و سایر باکتری‌ها در محیط مایع LB به ترتیب به مدت ۶ و ۱۸ ساعت کشت داده شده و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت فوق با ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (10mM Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH=8.0) حل و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد، مخلوط حاصل به عنوان نمونه مستقیم جهت انجام PCR در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. (۶)

تهیه DNA ژنومی باکتری. جهت تهیه DNA ژنومی باکتری از روش Muary and Thampson (۱۸) با یک سری تغییرات جزئی استفاده شد. ۱/۵ میلی لیتر از سلول‌های باکتریایی

میکرومول از نوکلئوتید dTTP و ۱۰ میکرومول از DIG-11-dUTP (شرکت Roche Diagnostics)، ۱ یونیت از آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سینازن)، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer $\times 10$ ، غلظت ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و غلظت‌های متفاوت (۵۰ تا $10^{-5} \times 5$ نانوگرم) از DNA ژنومی بود. در واکنشی دیگر به جای استفاده از DNA ژنومی، رقت‌هایی از باکتری (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۲۰، ۵ و ۱ سلول) تهیه شده در بند ۲-۲ استفاده شد. شرایط دمایی و تعداد چرخه‌های مورد نیاز مراحل مختلف PCR در جدول ۲ نشان داده شده است.

شناسایی و تأیید محصولات PCR نشاندار شده.

الکتروفورز ژل آگاروز. ۵ میکرولیتر از محصولات PCR درون چاهک‌های ژل آگاروز ۲٪ حاوی ۰/۵ $\mu g/ml$ اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. به منظور تعیین اندازه محصول از نشانگر 100-bp ladder plus (ساخت شرکت Fermentas) استفاده شد. محصول PCR بعد از الکتروفورز، زیر نور UV مشاهده شده و تصویر ژل با استفاده از دستگاه gel document (BioRad, Hercules) تهیه گردید.

ELISA-DIG. ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR نشاندار

شده با دیگوسکی ژنین با ۹۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS pH=7.2) مخلوط و به هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت اضافه گردید و سپس ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باقی‌گذارده شد تا کاملاً خشک شوند. چاهک‌ها ۵ بار با بافر فسفات سالین حاوی ۰/۵٪ توین ۲۰ (PBST) شستشو داده شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد دیگوسکی ژنین نشاندار شده با پراکسیداز با رقت ۱/۲۵۰۰ در BPST به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید. پس از شستشوی مجدد با PBST، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا [۰/۲ میلی گرم O- فنیل دیامین (OPD) در ۱ میلی لیتر بافر سیترات فسفات با pH=5 به همراه ۲/۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰٪] به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری گردید. جهت توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱/۵ مولار استفاده شد. جذب نوری (O.D) با استفاده از دستگاه ELISA Reader (ساخت شرکت DYNEX Technologies) در ۴۹۰ نانومتر خوانده

کشت داده شده در آب پپتون قلیایی و یا LB را برداشته و بعد از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ rpm، رسوب سلولی حاصل در بافر (Tris-EDTA) TE حل گردید. پس از اضافه نمودن ۶۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K، مخلوط به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید و بعد از افزودن ۸۰ میکرولیتر CTAB/NaCl (۱۰٪) (Cetyle Trimethyl Ammonium bromide in 0.7 M NaCl)، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ با ۲۵۰۰ rpm در ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، هم حجم فاز رویی به آن فنل-کلروفرم اضافه و مخلوط مجدداً سانتریفوژ شد. فاز رویی را به لوله دیگری منتقل و هم حجم آن اتانول ۹۹٪ اضافه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. بعد از سانتریفوژ با ۲۵۰۰ rpm در ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاوی DNA با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. با سانتریفوژ مجدد رسوب حاصل در دمای اتاق خشک و سپس در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. بعد از اضافه نمودن ۵ میکرولیتر RNase A به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. غلظت و خلوص DNA با خواندن جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفوتومتر تعیین گردید.

طراحی و ساخت پرایمرها. در این تحقیق ژن کدکننده

زیر واحد B سم وبا [Cholera Toxin B Subunit (ctxB)] به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد. بعد از به دست آوردن سکانس ژن مورد نظر از بانک ژنی (Accession Number AY475128 & AY804244) اقدام به طراحی پرایمر مورد نیاز تحت نام‌های KFP1 و KFP2 گردید. این پرایمرها توسط برنامه‌های نرم‌افزاری کامپیوتری آنالیز و از نظر تشکیل دایمر، لوپ و پایداری درونی مورد بررسی قرار گرفت، همچنین در این پرایمرها سایتهای آنزیمی جهت استفاده در تحقیقات بعدی پیش‌بینی شد. پرایمرها (جدول ۱) توسط کمپانی TIB Mol. Biol ساخته شد.

جداسازی و تکثیر ژن ctxB با واکنش PCR. واکنش

PCR جهت تکثیر ژن ctxB در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۳ میکرومول از هر پرایمر ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از نوکلئوتیدهای dATP، dCTP و dGTP، ۱۹۰

شد. (۱۹، ۱۵، ۱۴)

طراحی و ساخت پروب . به منظور تأیید نهایی ژن تکثیر یافته در این تحقیق از پروب SH1 استفاده شد. همانند طراحی پرایمر بعد از به دست آوردن سکانس ژن ctxB از بانک ژنی اقدام به طراحی پروب نمودیم. پروب مورد نظر مکمل قسمت میانی ژن ctxB بوده و در انتهای ۵' بیوتینیله گردیده بود. پروب توسط کمپانی TIB Mol.Biol ساخته شد (جدول ۱).

دورگه سازی (Hybridization) . پس از اضافه نمودن آویدین با غلظت ۲/۵ μg/ml در بافر کربنات بی کربنات با pH=9.6 (Coating Buffer) ، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر کدام از چاهک‌های پلیت میکروتیتر اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از ۴ بار شستشو با PBST ، ۱۰۰ میکرولیتر از پروب بیوتینیله با غلظت ۸ pmol/ml در بافر پوشاننده را اضافه، و پلیت به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. جهت واکنش دو رگه‌سازی، ۱۵ میکرولیتر از محصولات PCR بعد از دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و بلافاصله قرار دادن در یخ به مدت ۵ دقیقه، به همراه ۸۵ میکرولیتر از محلول دو رگه‌سازی به هر کدام از چاهک‌های پلیت میکروتیتر حاوی پروب اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ادامهٔ پروسه از شستشو تا ثبت جذب نوری (OD) همانند مراحل قبلی بود. (۱۶، ۱۵)

یافته‌ها

بررسی نتایج ژل مربوط به واکنش PCR ژن ctxB با DNA ژنومی . نتیجهٔ بدست آمده از واکنش PCR ژن ctxB با مقادیر مختلف DNA ژنومی ویبریولکرا O1 با ۵، ۸ و ۳۰ سیکل و سایر سویه‌های باکتریایی با ۳۰ سیکل در شکل ۱ نشان داده شده است. کمترین مقدار DNA ژنومی که یک باند قابل رویت را روی ژل آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بوجود آورده، ۵۰ pg از DNA ژنومی باکتری ویبریولکرا O1 با ۳۰ سیکل بوده است. چنانکه از شکل ۱ پیدا است هیچگونه باندهایی برای PCR سایر رقت‌ها و سایر سویه‌های باکتریایی مشاهده نشده است. نتایج

بدست آمده از ژل محصولات PCR با ۵ سیکل مشابه آنچه برای ۸ سیکل بدست آمده، می‌باشد (تصویر نشان داده نشده است).
بررسی نتایج ژل مربوط به واکنش PCR ژن ctxB با استفاده از باکتری های لیزشدهٔ ویبریولکرا O1 . نتیجهٔ بدست آمده از PCR ژن ctxB از رقت‌های نمونهٔ باکتری ویبریولکرا O1 با ۸ و ۳۰ سیکل در شکل ۲ نشان داده شده است. کمترین مقدار نمونه باکتری که یک باند قابل رویت را روی ژل آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بوجود آورده، ۵۰۰ عدد باکتری با ۳۰ سیکل بوده است. چنانکه از ژل شکل ۲ پیدا است هیچگونه باندهایی برای سایر رقت‌ها مشاهده نشده است. نتایج بدست آمده از ژل محصولات PCR با ۵ سیکل مشابه آنچه برای ۸ سیکل بدست آمده، می‌باشد.

بررسی حساسیت PCR-ELISA:

بررسی حساسیت PCR-ELISA با استفاده از DNA ژنومی باکتری ویبریولکرا O1 . به منظور تعیین حداقل روش شناسایی گردد سریال رقت از DNA ژنومی تهیه و جهت تعیین حساسیت با استفاده از روش PCR-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده (جدول ۳) نشان می‌دهد که حداقل میزان نمونهٔ DNA ژنومی که می‌تواند با این روش شناسایی گردد، ۰/۶ - ۰/۵ پیکوگرم می‌باشد (جدول ۳).

بررسی حساسیت PCR-ELISA با استفاده از نمونهٔ مستقیم باکتری ویبریولکرا O1 . جهت تعیین حداقل تعداد باکتری ویبریولکرا O1 که می‌توانست توسط این روش شناسایی گردد رقت‌های متفاوتی از نمونهٔ باکتری تهیه و با استفاده از روش PCR-ELISA ، حساسیت آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده (جدول ۴) نشان می‌دهد که حداقل تعداد نمونهٔ از باکتری که با این روش شناسایی می‌گردد ۵ سلول است.

حساسیت تشخیص واکنش دورگه سازی . جهت تأیید محصول PCR ژن ctxB باکتری ویبریولکرا O1 و همچنین سایر سویه‌های باکتریایی به کار برده شده در این تحقیق و نیز جهت تعیین حداقل میزان DNA ژنومی که می‌توانست شناسایی گردد روش دو رگه‌سازی به کار برده شد . جدول شمارهٔ ۵ مربوط به

جدول ۱: پرایمرها و پروب طراحی شده از ژن *ctxB*

توالی نوکلئوتید	تعداد نوکلئوتید
KFP1 5'- GGAGGATCCATGGTAAAGATAAATATTTG -3'	۲۹ باز
KFP2 5'- GGCTTTTTGGAATTCTAATTTGCCATACT -3'	۲۹ باز
SH1 5'-Biotin -AGCTGG AAA AAG AGAGATGGC -3'	۲۱ باز

جدول ۲. شرایط دمایی و تعداد چرخه های مورد نیاز مراحل مختلف PCR

مرحله	درجه حرارت(سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سکیل
واسرشت اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشت	۹۴	۱	
اتصال	۶۲	۱	۸و۵
تکثیر	۷۲	۱	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱

01 PCR-ELISA DNA

سریال رقت DNA	جذب نوری (۸ سیکل)	جذب نوری (۵ سیکل)	غلظت DNA
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰	۲/۷۰۱	۲/۱۵۳	۵۰ نانوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰۰	۲/۵۵۳	۲/۰۸۶	۵ نانوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰۰۰	۲/۲۹۴	۱/۹۷۹	۰/۵ نانوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰۰۰۰	۱/۶۴۵	۱/۱۵۳	۵۰ پیکوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰۰۰۰۰	۰/۸۵۷	۰/۵۹۳	۵ پیکوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۲۰۰۰۰۰	۰/۴۱۲	۰/۳۲۸	۲/۵ پیکوگرم
(ویبریو کلرا) ۱/۱۰۰۰۰۰۰	۰/۲۱۸	۰/۱۷۸	۵۰ نانوگرم
سالمونلا پاراتیفی	۰/۰۶۰	۰/۰۵۸	۵۰ نانوگرم
شیگلا دیسانتری	۰/۰۵۷	۰/۰۵۳	۵۰ نانوگرم
اشریشیاکلی	۰/۰۶۰	۰/۰۶۱	۵۰ نانوگرم
یزودوموناس آئروجینوزا	۰/۰۵۸	۰/۰۵۹	۵۰ نانوگرم
کلپسیلا	۰/۰۶۳	۰/۰۶۲	۵۰ نانوگرم
کنترل منفی	۰/۰۵۴	۰/۰۵۱	---

01 PCR-ELISA

تعداد باکتری	جذب نوری (۸ سیکل)	جذب نوری (۵ سیکل)
۵۰۰	۲/۷۴۳	۲/۳۴۰
۲۵۰	۱/۹۷۶	۱/۶۱۸
۱۰۰	۱/۰۲۵	۰/۸۵۹
۲۰	۰/۶۳۸	۰/۴۳۱
۵	۰/۲۶۱	۰/۱۸۹
۱	۰/۱۱۲	۰/۰۹۴
کنترل منفی	۰/۰۵۶	۰/۰۵۴

PCR با استفاده از سلول‌های باکتریایی O1 کلرا به عنوان الگو

۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱



۱۰۰

ستون ۱: 100 bp DNA ladder plus

ستون ۲: محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰۰ سلول از باکتری های لیز شده و بیبرئو کلرا O1 به عنوان الگو

ستون های ۳-۸: محصول واکنش های PCR ۸ سیکلی با استفاده از غلظت های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۲۰، ۵ و ۱ سلول از باکتری های لیز شده و بیبرئو کلرا O1 به عنوان الگو

بحث

شناسایی عامل بیماری وبا اولین مرحله در تشخیص این بیماری می باشد، زیرا تنها، گونه های تولید کننده سم قادر به ایجاد بیماری اسهال آبکی و اپیدمی های مربوط به آن می باشند. (۱، ۱۳، ۲۰) روش های متداول میکروبیولوژی که جهت شناسایی و بیبرئو کلرا به کار برده می شوند شامل روش های کشت باکتری، بیوشیمیایی و ایمونولوژیک می باشند که این روش ها غالباً چندین روز وقت جهت کامل شدن نیاز دارند. روش های مبتنی بر اسید نوکلئیک از قبیل واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، PCR-ELISA و روش دو رگه سازی (Hybridization) غالباً زمان شناسایی را به طور قابل ملاحظه ای کاهش داده اند. (۱، ۳، ۸، ۱۲، ۱۵، ۱۹، ۲۱) ولی از آنجاییکه بیماری وبا همیشه به صورت پاندمی یا آندمی مطرح می شود لذا وجود یک روش که بتواند در زمان کوتاه نمونه های

آزمایش دورگه سازی محصول PCR با پروب نشاندار می باشد. نتایج نشان می دهد که DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن ctxB باکتری و بیبرئو کلرا O1 بوده است. همچنین نتایج حاصله بیانگر میزان DNA ژنومی قابل تشخیص در واکنش را ۰/۶-۰/۵ پیکوگرم برای و بیبرئو کلرا O1 می باشد.

بررسی های درون سنجش و بین سنجش. برای ارزیابی درون سنجش از غلظت های مشخص DNA ژنومی چهار PCR گذاشته و سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ELISA آشکارسازی شد. بررسی های بین سنجش چهار بار بطور جداگانه انجام گرفت. در ضمن در بررسی های درون سنجش و بین سنجش نمونه های کنترل منفی گذاشته شد. نتایج حاصله با نرم افزار SPSS بررسی و تأیید گردید.

شیگلا انجام گرفته است. (۱۷، ۱۹) هونگ و همکاران (۱۷) در شناسایی سالمونلا انتریکا به روش PCR-ELISA، حداقل تعداد باکتری که در یک واکنش قابل شناسایی بود را ۱۰ سلول تعیین کردند. حساسیت روش هونگ و همکاران نیز مانند این پژوهش ۱۰۰ برابر روش شناسایی PCR مبتنی بر الکتروفورز مشخص گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد PCR-ELISA، روش حساس، اختصاصی، آسان و سریع برای تشخیص ویبریو کلرا O1 می‌باشد. با توجه به استفاده از سوشهای آزمایشگاهی تأیید شده در این تحقیق، جهت کاربردی نمودن روش تشخیص در مراکز کلینیکی، لازم است در ادامه مطالعات میدانی و کلینیکی نیز انجام و نتایج آن با یافته‌های طرح مقایسه گردد.

References

1. Hoge CW, Bodhidatta L, Echeverria P, Deesuwan M, Kitporka P. Epidemiologic study of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Thailand: at the advancing edge of the eighth pandemic. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 263–268.
2. Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam PD. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol* 1999; 37:734–741.
3. Vergara M, Maestre J, Suarez O, Monte R. Toxigenic *vibrio cholerae*: identification of the *ctxB* gene. *Microbiol Clin* 1997; 15(4): 181-5.
4. Rivera ING, Chun J, Huq A, Sack B, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl*

زیادی را آزمایش نماید و از حساسیت بسیار بالایی برخوردار باشد، لازم و ضروری است. مضافاً، در روش PCR بدلیل استفاده از ژل آگاروز جهت مشاهده نتیجه واکنش و استفاده از اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی ژل خطر آلودگی پرسنل و محیط را بالامی‌برد. ما در این پژوهش جهت بر طرف نمودن معایب روش‌های بالا، روش PCR-ELISA را جهت شناسایی سریع و اختصاصی ویبریو کلرا به عنوان یک روش شناسایی روتین و برتر از PCR به کار بردیم. محققین زیادی روش PCR را جهت شناسایی ویبریو کلرا به کار برده‌اند. (۹، ۲۲–۲۵)

کخ از روش PCR جهت تشخیص ویبریو کلرا در نمونه‌های غذایی استفاده کرده است. حد تشخیصی وی در این روش ۱ تا ۱۰۰ باکتری در ۱۰ گرم از نمونه‌های غذایی آلوده شده در مدت زمان ۸ تا ۱۰ ساعت بود. (۲۳) چو و همکارانش از ژن توکسین RTX ویبریو کلرا به منظور شناسایی ۱۶۶ نمونه کلینیکی ویبریو کلرا استفاده نمودند البته در این روش زمان فاکتور مهمی نبود. (۲۴) اسلام و همکارانش از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (MAbs) علیه ویبریو کلرا O1 و O139 به همراه روش PCR استفاده نمودند. حد تشخیص در این روش برای ویبریو کلرا O139، ۱۰ باکتری در حالی که برای بیوتایپ اوگاوا ویبریو کلرا O1 حد تشخیص ۱۰۰ باکتری و برای بیوتایپ اینابا ویبریو کلرا حد تشخیص ۱۰۰۰ باکتری در مدت زمان ۲۴ ساعت بود. (۲۶)

بانوماتی و همکارانش با انتخاب مجموعه‌ای از ژن‌های ویبریو کلرا O139 و بررسی آن با سایر گونه‌های باکتریایی روش ساترن بلات را جهت تشخیص ویبریو کلرا ارائه دادند که در این روش نیز زمان و میزان نمونه معیارهای مهمی نبود. (۲۷) در مقایسه با روش‌های بالا، با روش PCR-ELISA ارائه شده در این پژوهش حداقل تعداد باکتری که در یک واکنش قابل شناسایی بود ۵ سلول تعیین شد. همچنین نتایج مشخص کرد که حساسیت روش تشخیص PCR-ELISA برای شناسایی ویبریوکلرا O1 در مقایسه با نتایج ارائه شده توسط دیگر محققان که از روش PCR استفاده کرده‌اند ۱۰۰ برابر بیشتر است. تا کنون گزارشی از شناسایی ویبریوکلرا O1 به روش PCR-ELISA ارائه نشده است. اما تحقیقاتی در مورد خانواده انتروباکتریاسه از جمله سالمونلا و

- Environ Microbiol 2001; 67: 2421–29.
5. Shah, M, Faruque M, Albert JJ, Mekalanos J. Epidemiology Genetics and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1301-14.
 6. Theron J, Cilliers J, Du Preez M, Brozel VS, Venter SN detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. J Appl Microbiol 2000; 89(3): 539-46.
 7. Nandi S, Maiti D, Saha A, Bhadra RK. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTX phi array and its position in the genome. Microbiology 2003; 149: 89-97.
 8. Keasler SP, Hall RH. Detection and biotyping *vibrio cholerae* o1 with multiplex polymerase chain reaction. lancet 1993; 341: 1661 .
 9. Verala P, Rivas M, Binsztein N. Identification of toxigenic *vibrio cholerae* from the argentine outbreak by PCR for *ctxA1* and *ctxA2-B*. FEBS lett 1993; 315: 74-76 .
 10. Radu S, Ho YK, Lihan S, Yuherman Rusul G, Yasin RM, Khair J, Elhadi N. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 from human and environmental sources in Malaysia. Epidemiol Infect 1999; 123: 225–232.
 11. Minami A, Hashimoto S, Abe H, Arita M, Taniguchi T, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Cholera enterotoxin production in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from the environment and from humans in Japan. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 2152–57.
 12. Farmer III JJ, Hickman-Brenner, FW The genera *Vibrio* and *Photobacterium* in the Prokaryotes, edited by. Balows A, TruÈper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. New York, Springer-Verlag 1992; 2952-3011.
 13. Hoshino K ,Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya SK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20 (3): 201-7.
 14. Daly P, Collier T, Doyle S PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. Lett Appl Microbiol 2002; 34: 222–226.
 15. Fach P, Perelle S, Grout J, Dilasser F Comparison of different PCR tests for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria. J Microbiol Methods 2003; 55: 383– 392.
 16. Sails AD, Bolton FJ, Fox AJ, Wareing DRA, Greenway DLA Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microbiol 2002; 3: 1319-24.
 17. Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, Maurerl JJ Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on Poultry Carcasses by using PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microbiol 2003; 6: 3492 –99.
 18. Muarry MG, Thampson WF Rapid isolation of high molecular weight plant DNA . Nucleic Acid Res 1983; 8: 4321-4325.

19. Ge B, Zhao S, Hall R, Meng J A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Microbes Infect* 2002; 4: 285-290.
20. Folgosa E. Molecular identification of pathogenicity genes and ERIC types in Vibrio cholerae O1 epidemic strains from Mozambique. *Epidemiol infect* 2001; 127: 17-25.
21. Korbayashi K, Set K, Akasaka S, Makino M Detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 using polymerase chain reaction for amplifying the cholera enterotoxin gene. *Journal of Japanese Association of Infectious Diseases* 1990; 64: 1323- 29.
22. Koch WH, Payne WL, Wentz BA , Cebula TA Rapid polymerase chain reaction method for detection of Vibrio cholerae in foods. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 556-560.
23. Shangkuan YH, Show YS, Wang TM Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic Vibrio cholerae and to biotype Vibrio cholerae O1. *J Appl Bacteriol* 1995; 79(3): 264-273.
24. Chow KH, Uyen ky, Yam WC Detection of RTX Toxin gene in Vibrio cholerae by PCR . *J clinl microbiol* 2001; 2594-97
25. Lee HF, Yeh HL , Hsiao HL , Wang TK , Liu CH Detection and identification of toxigenic Vibrio cholerae O1 strains by a simplified polymerase chain reaction method. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1993; 26(1): 6-14.
26. Islam MM, Golam Kabir Md, Moly PK , Islam AFMT, Rakib A Detection of Vibrio cholrae o1 and o139 serogroups Directly from stool specimens by combined immunomagnetic separation and polymerase Chain reaction .*pakistan Journal of biological sciences* 2004;7: 1654-59.
27. Bhanumathi R , Sabeena F, Isac SR, Shukla BN, Singh DV Molecular Characterization of Vibrio cholerae o139 Bengal Isolated from water and the Aquatic Plant Eichhorinia Crasipes in the River Ganga, Varanasi,India *Appl Environ Microbiol* 2003; 2389-94.