مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۵ خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۹۳ تا ۱۰۷

تشخیص همزمان سه باکتری *سالمونلا تیفی*، *باسیلوس آنتراسیس* و *یرسینیا پستیس* با راه اندازی مولتی پلکس پی‌سی‌آر

نرگس صفری فروشانی[۱]، دکتر علی کرمی[۲]، فاطمه پورعلی[۲]، دکتر اکرم عیدی[۱]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی Karami@bmsu.ac.ir

دریافت: ۹۱/۷/۱۲ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: *سه باکتری سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس از پاتوژن‌های واقعی برای انسان محسوب می‌شوند و تشخیص به‌موقع و زود هنگام آن‌ها حائز اهمیت بسیاری است. سالمونلا تیفی باعث بیماری حصبه، باسیلوس آنتراسیس باعث سیاه زخم و یرسینیا پستیس سبب بیماری طاعون می‌شود. این سه نوع باکتری به‌عنوان عوامل بیولوژیک نظامی نیز استفاده می‌گردد. روش‌های کلاسیک تشخیص این باکتری‌ها طولانی و پیچیده است. مطالعه‌ی حاضر ارایه‌ی یک روش تشخیصی مولکولی جدید و سریع برای تشخیص همزمان این سه باکتری در یک واکنش مولتی پلکس پی‌سی‌آر می‌باشد.*

روش بررسی: *واکنش زنجیره ایی پلی مراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) برروی ژن‌های ویرولانس invA,hp سالمونلا تیفی، Pa,chr باسیلوس آنتراسیس و pla یرسینیا پستیس به صورت یونی پلکس و مولتی پلکس پی سی آر طراحی و انجام شد. DNA ژنومی از سایر باکتری‌ها جهت بررسی ویژگی پرایمر و آزمایش PCR استفاده شد. جهت بررسی حساسیت واکنش از دو روش شمارش کلنی و رقت ژنوم استفاده شد.*

یافته‌ها: *بررسی این روش با سویه‌های استاندارد مشخص نمود که پرایمرها اختصاصی است و محصولات با اندازه‌ی مورد نظر تولید گردید. بررسی حساسیت روش نشان داد که این روش قادر است ۱ تا ۱۰ کپی ژنوم و یا ۱ تا ۱۰ واحد کلنی برای هر کدام از این باکتری‌ها به‌طور اختصاصی تشخیص دهد. برای تایید محصولات ایجاد شده در PCR تمام قطعات به‌جز محصول ۱۰۸۲bp باسیل آنتراکس تعیین ترادف شدند و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ برش آنزیمی تایید گردید.*

نتیجه‌گیری: *براساس این مطالعه روش طراحی شده ابزاری دقیق، سریع و کم هزینه برای جستجو و تشخیص این باکتری‌ها از سایر باکتری‌های هم‌خانواده و تشخیص سریع این سه عامل در نمونه‌های مختلف و جستجو و تشخیص این باکتری‌ها را در موارد بیوتروریستی فراهم می‌کند.*

واژگان کلیدی: تشخیص، باسیلوس آنتراسیس، سالمونلا تیفی، یرسینیا پستیس، مولتی پلکس پی‌سی‌آر.

مقدمه

سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس ویرسینیا پستیس به‌عنوان عوامل گروه A باکتری‌های بیماری‌زا شناخته می‌شوند که پتانسیل بالایی برای بیماری‌زایی انسان دارند و بیماری‌زای واقعی برای انسان هستند. برای مقابله با این عوامل بیماریزا

۱- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران،
۲- دکترای تخصصی بیولوژی مولکولی، استاد مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج
۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله،
٤- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد علوم تحقیقات تهران

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص و درمان سریع از اهمیت بسیاری برخوردار است. سالمونلا تیفی عامل حصبه یا تیفوئید است که بیش از ١٦ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا و سبب حدود ٦٠٠ هزار مورد مرگ می‌باشد (۱). همه‌ی سالمونلاها به استثنای سالمونلا تیفی که فقط سبب بیماری‌زایی در انسان و نخستی‌های عالی می‌باشد برای انسان، پستانداران و پرندگان بیماری‌زا می‌باشد به همین جهت سرایت آن از طریق آب، موادغذایی، مدفوع و ادرار انسان ،پستانداران و پرندگان بیمار و آلوده می‌باشد (۲). سیاه زخم یا شاربن بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است که توسط باسیلوس آنتراسیس ایجاد می‌گردد، این بیماری دامی در تمام نقاط جهان مشاهده می‌گردد و باکتری به‌طور غیر مستقیم از محصولات دامی آلوده یا به‌طور مستقیم توسط اسپور باسیل سیاه زخم به انسان منتقل می‌شود. سیاه زخم به چهار شکل پوستی، ریوی، گوارشی و مننژیت دیده می‌شود این باکتری به دلیل خصوصیات ویژه آن که عبارت از داشتن اسپور، حدت بالا، سهولت تولید انبوه و به‌کارگیری درصدر عوامل خطرناک سلاح‌های بیولوژیک و بیوتروریسم قرار دارد (۳). طاعون بیماری مهلک و خطرناکی است که به دنبال آلودگی با باکتری یرسینیا پستیس در اغلب جوندگان و انسان ایجاد می‌شود (٤). این باکتری کوکوباسیل گرم منفی، فاقد حرکت و اسپور می‌باشد که به‌طور معمول به شکل مرضی همه‌گیر بین جوندگانی مانند موش منتقل می‌شود (۵). عامل بیماری از طریق گزش اکتوپارازیت‌های آلوده، به‌ویژه کک به انسان قابل انتقال است (۷و ٦). بیماری به سه شکل بالینی خیارکی، سپتسیمی، تنفسی ظاهر می‌شود. فرم تنفسی شدیدترین حالت بالینی بیماری را ایجاد می‌کند، این حالت از بیماری بیشترین موارد مرگ‌ومیر را به همراه دارد و به راحتی از انسان به انسان قابل انتقال است (۸) .برای تشخیص آزمایشگاهی باکتری عامل حصبه در نمونه‌های کلینیکی از کشت خون، مغز استخوان، سواپ رکتال و کشت مدفوع و کشت ادرار و همچنین آزمایشات دیگری چون الایزا و ایمونوفلورسنت استفاده می‌گردد (۱۰و ۹). تشخیص و شناسایی عامل سیاه زخم به دلیل شباهت بسیار به باسیل‌های غیربیماری‌زای موجود در خاک مشکل و وقت‌گیر است و تنها آزمایشگاه‌های پیشرفته و مرجع قادر به شناسایی دقیق آن می‌باشند و در عین حال در روش‌های متداول تعیین حدت در حیوان آزمایشگاهی ضروری است که علاوه بر وقت‌گیر بودن نیاز به تاسیسات و امکانات ایمنی زیستی خاص کار با عوامل خطرناک را دارد و مشکلات و خطراتی را برای افرادی که با این عامل کار می‌کنند، فراهم می‌سازد (۱۱). در تشخیص عامل طاعون از انجام تست‌های بیوشیمیایی، بررسی حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی، تلقیح به‌حیوانات آزمایشگاهی و کشت در محیط‌های اختصاصی استفاده می‌شود، از طرف دیگر در دسترس نبودن روش‌های مناسب برای انتقال نمونه‌ها از مناطق آلوده به مراکز تشخیصی ممکن است باعث خشک شدن آن‌ها، آلودگی نمونه‌ها یا مرگ باکتری‌ها گردد (۱۲). روش‌های معمول چون کشت باکتری، استاندارد طلایی از روش‌های رایج برای تشخیص باکتری می‌باشد تمام این روش‌های رایج باکتریولوژیک وقت‌گیر و غیرقابل استفاده در جهت تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری است (۱۳). درحالی که در روش‌های مولکولی می‌توان بدون نیاز به این گونه بررسی‌ها به‌طور مستقیم در زمانی بسیار کوتاه اقدام به شناسایی عامل عفونی ویرولان نمود. بنابراین، روش‌های متداول در حملات بیولوژیک و بیوتروریستی فاقد ارزش بوده و نیاز به روش‌های تشخیصی سریع در کمتر از چند ساعت می‌باشد که بتوان اقدامات درمانی و پیشگیری از شیوع بیماری را اعمال نمود، و این روش‌ها کاربرد گسترده‌ایی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیز دارد. فقدان توانایی تشخیص سریع عوامل بیولوژیک سبب گردیده است که این عامل از نظر میزان صدمات و تهدیدات هم سنگ با سلاح‌های هسته‌ایی و خطرناک‌تر به‌دلیل شیوع

Archive of SID

www.SID.ir

بـه منـاطق دیگـر و حتـی همـه‌گیـری جهـانی باشـد (۱٤).

روش بررسی

سویه‌ها به‌صـورت استانـدارد از آزمایـشـگاه رفرانـس وزارت بهداشت و انستیتو پاستور تهـران تهیـه شـد، بـه دلیـل خطرات کاری بـا سـویه‌ی ویـرولان از سـوش غیـر ویـرولان باسیلوس آنتراسیس موسوم به اشترن یا سویه‌ی واکسن دامـی استفاده گردید کـه از نظـر میکـرب شناسـی هـیچ تفـاوتی بـا سویه‌ی وحشی ندارد. ولی از نظر مولکولی صرفا فاقد یکی از پلاسیمید های ویـرولان اسـت و بـه جهـت ایمنـی بـه جـای سویه‌ی وحشی در آزمایشات تشخیصی از آن استفاده می‌شود. باکتری یرسینیا پستیس سویه‌ی جـدا شـده از کردسـتان ایـران موسوم به KIM و سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت. نمونه‌هایی که به عنوان کنترل منفی استفاده شد از آزمایشگاه انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. لیست و شماره‌ی سویه آن‌ها در جدول ۱ توضیح داده شده است. مواد شیمیایی از (شـرکت مـرک)، MgCl۲، بـافر، نوکلئوتیدها و آنزیم Taq از (شرکت سیناژن) تهیه گردید. در این تحقیق از دستگاه Mastercycler Gradient (سـاخت شرکت اپندورف آلمان) جهت چرخـه‌هـای حرارتـی اسـتفاده شد. از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک (ساخت شـرکت پایـا پـژوهش) (مـشهد) و منبـع تغذیـه آن بـا بـافر TBEX۰/۵ جهت الکتروفورز استفاده شد. جهـت بررسـی ژل از دسـتگاه UVIdoc (ساخت شرکت UVItec انگلیس) اسـتفاده شـد. مارکر مولکولی ۱۰۰ جفـت بـاز شـرکت فرمنتـاز شـامل بانـد ۱۰۰۰،۵۰۰،٤۰۰،۳۰۰،۲۰۰،۱۰۰، جفت باز استفاده شد.

طراحی پرایمر: برای سالمونلا تیفی بر اساس ردیف دو بخش اساسی از ژنوم باکتری سالمونلا تیفی درحقیقـت براسـاس ژن هدف invA و hp، برای آنتراکس بر اساس دو بخش اساسی تـشکیل دهنـده‌ی ژنـوم باسـیل آنتـراکس، pA و chr، بـرای یرسینیا پستیس براسـاس یـک بخـش اساسـی ژنـوم تـشکیل دهنده‌ی باکتری عامل طاعون، pla طراحی و توسـط شـرکت سیناژن ساخته شد و با اسـتفاده از نـرم‌افزارهـای DNASIS (HITACHI,TOKYO,japon)، Blast ٦/۷۱ Version و OLIGO از نظـر سـاختار و شـباهت بـا سـایر میکروارگانیسم‌هـای مـشابه بررسـی و انتخـاب گردیـد (۱٦). همچنین مکان پرایمرها برروی ژنوم و انـدازه قطعـه‌ی تکثیـر یافته و ژن هدف در جدول ۲توضیح داده شـد. در جـدول ۳، سکانس پرایمرهای استفاده شده در ایـن تحقیـق نوشـته شـد. پرایمرهای دریافتی براساس غلظت ذکر شـده توسـط شـرکت سازنده پرایمر، در آب مقطر تزریقی با غلظـت ۱۰۰ پیکومـول تهیه شده و سـپس رقـت ۲۰ پیکومـول از آن غلظـت تهیـه و جهت استفاده درمنهای ۲۰ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شد.

کشت و استخراج DNA: باکتری‌های تهیـه شـده در محـیط کشت جامـد و محـیط مـایع لوریـا، تلقـیح و در ۳۷ درجـه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ تـا ۲٤ سـاعت کـشت شـد. عـلاوه بـر بررسـی کلـونی‌هـا از نظـر شـکل و سـاختار و بـه‌خـصوص ویژگی‌های کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشـمیایی نیـز انجام گرفت. سپس از ۱/۵ تا ۵ میلی‌لیتر از کشت مایع DNA ژنومی بـه روش‌هـای متـداول (۱۵) اسـتخراج گردیـد. روش استخراج DNA به این صورت انجام شد که ۱/۵ سی‌سـی از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط LB را داخل لوله‌ی اپندورف ریخته و به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقـه در دور rpm ۵۰۰۰ سـانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و به رسوب ۲۰۰ لانـدا از بافر STE اضافه کرده، کاملا مخلوط کرده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌دهیم. ۲۰۰ ماکرولیتر بافر لیز کننـده ۲ درصـد SDS بـه سوسپانـسیون اضـافه کـرده و محلـول را به‌شدت با ورتکس تکان دادیم. ۲۰۰ ماکرولیتر اسـتات سـدیم به لوله اضافه و ۱۰ بار تکان داده و سپس به‌مدت ۵ دقیقـه بـا سانتریفوژ یخچالدار در دور rpm ۱۰۰۰۰ رسـوب را از مـایع شفاف رویی جدا کـردیم. محلـول رویـی کـه حـاوی DNA کروموزومی است به لوله‌ی تازه منتقل شد. هم حجم محلـول

Archive of SID
www.SID.ir

رویی جدا شده ایزوپروپانل اضافه و لوله را به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه کردیم. سپس لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه و در ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰rpm سانتریفوژ کردیم. بعد از سانتریفوژ محلول رویی را دور ریخته و بعد از خشک شدن رسوب به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در فور ٦۰ تا ٦۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۱۰۰ لاندا آب مقطر استریل حل شد. محلول را به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت دادیم. سپس لوله را به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و از محلول شفاف رویی ۵ لاندا جهت PCR استفاده گردید (۱۵).

انجام مولتی پلکس PCR: واکنش PCR جهت ارزیابی ژن‌های هدف و با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقدار ۱ پیکومول از نمونه‌ی ژنومی تهیه شده به لوله‌های حاوی ترکیبات مندرج در جدول ٤ اضافه شده و در دستگاه Master Cycler اپندورف قرار گرفته و با برنامه زیر PCR انجام گردید، که شامل مرحله‌ی اول ۱ چرخه ۷ دقیقه در دمای ۹٤ و سپس ۳۰ چرخه شامل سه مرحله ۹٤ درجه ۱ دقیقه، ۵۵ درجه دمای اتصال پرایمرها ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و مرحله‌ی نهایی در ۷۲ درجه ۷ دقیقه صورت گرفت. قبل از انجام مولتی پلکس پی‌سی‌آر ابتدا تک تک میزان مواد و مراحل پی‌سی‌آر بهینه شدند بعد از به‌دست آوردن مناسب‌ترین میزان مواد و شرایط بهینه برای مولتی پلکس پی‌سی‌آر، میزانی که در جدول ٤ نوشته شده به‌دست آمد. پس از اتمام واکنش آمپلیفیکاسیون، در ۰/۵ X بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و پس از شستشو برروی دستگاه ماورای بنفش بررسی گردید. لازم به ذکر است که واکنش برای هر سه باکتری هم به‌صورت یونیپلکس و هم مالتیپلکس انجام شد.

تعیین اختصاصیت: برای به‌دست آوردن اختصاصیت پرایمرهای ژن‌های invA، hp سالمونلا تیفی، pA و chr آنتراکس و pla یرسینیا، وجهت تشخیص باکتری‌های مورد نظر، واکنش PCR با شرایط فوق برروی ژنوم استخراج شده باکتریهای کنترل منفی انجام شد.

تعیین حساسیت: جهت بررسی میزان حساسیت PCR، از دو روش شمارش کلونی و غلظت DNA استفاده شد.

تایید محصول PCR: به دو روش برش آنزیمی محصول PCR و تعیین ردیف محصول PCR (سکانسینگ) انجام شد. محصول ۱۰۸۳bp باسیل آنتراکس، که واجدسایت برش *HindIII* می‌باشد، از طریق برش انزیمی به روش ذیل تایید شد به این صورت که به لوله‌ی حاوی ۱ میکرولیتر آنزیم *HindIII* و بافر آنزیم، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR اضافه شده و با آب مقطراستریل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید و این مخلوط به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن در ژل آگارز بررسی گردید و بقیه‌ی محصولات تکثیر شده همراه با پرایمرهای جلویی و عقبی آن‌ها برای سکانسینگ به شرکت مربوطه ارسال گردید.

آنالیز سکانس: ردیف‌های دریافتی شامل سکانس حاصل از پرایمرهای F و R هر قطعه از نظر دقت و هم‌پوشانی با هم بررسی گردید. با توجه به کوتاهی اندازه‌ی قطعات انتظار بود که مقدار زیادی هم‌پوشانی وجود داشته باشد. برای شناسایی هم‌پوشانی از برنامه‌ی DNASIS Ver۲/٦ ساخت شرکت هیتاچی استفاده شد. بدین شکل که فایل نوشتاری سکانس پرایمر F با Reverse Complement سکانس پرایمر R مقایسه گردید و با استفاده از برنامه ALIGN به هم متصل و با ویرایش آن سکانس اصلی برای هر قطعه حاصل شد. سکانس‌های حاصل با برنامه‌ی BLAST۲،۲،۹ (۱٦) با بانک ژن مقایسه و شباهت‌ها و تفاوت‌ها شناسایی گردید. از برنامه DNASIS نیز جهت مقایسه‌ی دو سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس مرجع و شناسایی میزان شباهت و

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت نوکلئوتیدهای دوسکانس استفاده شد (۱۶).

یافته‌ها

Uniplex و Multiplex PCR سویه های استاندارد: همچنان که در شکل ۱ دیده می‌شود؛ نتیجه‌ی بررسی نمونه‌ها با ٤ جفت پرایمر نشان داد که پرایمرها به شکل یونی پلکس و مولتی پلکس چهار باند با اندازه‌های ۱٦٤،٤۸۹،۵۲۰ و۱۰۸۳ جفت باز را در سویه‌های آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلاتیفی با پرایمر T، یرسینیا پستیس با پرایمر F وآنتراکس با پرایمر ۱۲۵ ایجاد کرده است. شکل ۲، بررسی نمونه‌ها با ٤ جفت پرایمر را نشان داده که پرایمرها به شکل یونی پلکس و مولتی پلکس چهار باند با اندازه‌های ۱۰۸۳،۵۲۰،۳۷۳،۱٦٤ جفت باز را در سویه‌های آنتراکس باپرایمر ۱۲۹، سالمونلا تیفی با پرایمر S۱۲، یرسینیا پستیس باپرایمرF و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ ایجاد کرده است. Multiplex PCR شکل ۳ مولتی پلکس پی‌سی‌آر هر سه سویه استاندارد باکتری‌های مورد نظر را نشان داد به طوری‌که با پنج جفت پرایمر اختصاصی PCR انجام گرفته است که حضور تمام قطعات مورد انتظار را نشان داده است.

بررسی اختصاصی بودن PCR: باتوجه به شکل ۱،۲،۳ که نتایج اختصاصی بودن مولتی پلکس پی‌سی‌آر و پرایمرها را نیز نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که پرایمرهای اختصاصی سه باکتری یرسینیا پستیس، آنتراکس، و سالمونلا تیفی موریوم با باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا سونئی، اشرشیاکلی، انتروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروجینوزا، سیتروباکترفروندی، سراشیا مارسسنز، کلبسیلا پنومونیا که به عنوان کنترل منفی استفاده شدند، مورد PCR قرارگرفتند که هیچ باندی ایجاد نکردند و این نشان دهنده‌ی اختصاصی بودن این پرایمرهاست.

تعیین حساسیت: محاسبه‌ی غلظت ژنوم با دستگاه نانو دراپ مشخص نمود که غلظت DNA ژنومی معادل ۷۵ نانوگرم در میکرولیتر می‌باشد همچنان که در شکل ٤ دیده می‌شود، بررسی با رقت‌های مختلف تا رقت $۱۰^{-٤}$ ژنوم با ۵ جفت پرایمر اختصاصی باند مناسب را نشان می‌دهد که حساسیت روش بسیار مناسب است و با توجه به اینکه تعداد کپی ژنوم برابر $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ در ۷۵ نانوگرم است، در واقع هر نانوگرم ژنوم واجد ۲×۱۰^{٦} کپی می‌باشد. در نتیجه حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ کپی است و چون هر باکتری یک کپی از ژنوم را دارد، بنابراین حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ باکتری می‌باشد. بررسی حساسیت به روش شمارش کلنی نیز این نتیجه را تایید نمود.

جدول ۱: لیست باکتری‌های کنترل منفی مورد استفاده در این تحقیق

نام میکروارگانیسم	شماره سویه	محل تهیه
Staphylococcus areus	ATCC 25923	pasture Iran
Shigella sonnei	ATCC 9290	
Esherichia coli	ATCC 25922	
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	
Citrebacter freundi	PTCC 1600	
Serratia marcesens	PTCC 1111	
Klebsiella pneumonia	ATCC 7881	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

شماره پرایمر	جایگاه ژن، پلاسمید/کروموزوم	اندازه محصول	پروتئین
S۱۲-s۱۳ سالمونلا	کروموزوم	۳۷۳bp	invA
T سالمونلا	کروموزوم	٤٨٩bp	hp
۱۲۵/۱۲٦ آنتراکس HindIII	PXO۱	۱۰۸۳ bp واجدسایت	pA
۱۳۰-۱۲۹ آنتراکس	کروموزوم	١٦٤ bp	chr
Yer یرسینیا	pPst۱	٥٢٠ bp	pla

جدول ۳: سکانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

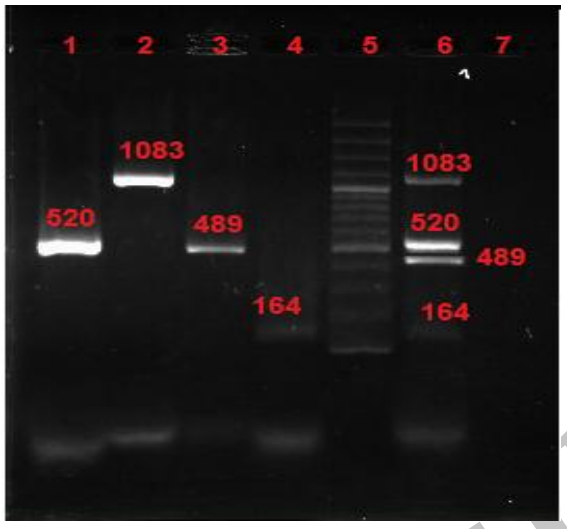
S۱۲F:	gta ttg ttg att aat gag atc cg
S۱۳R:	ata tta cgc acg gaa aca cgt t
Salmonella TF:	tgt ccg ctg tct gaa gtc atc
Salmonella TR:	atc tca ggc aaa ctc aca agg g
Antherax ۱۲٥:	tta atg cga ttg tct acg at
Antherax ۱۲٦:	gat caa ttg cga ccg tac ttg aa
Antherax ۱۲۹:	ccc agg ggg aca aac gat agc tcc
Antherax ۱۳۰:	*aac gat agc tcc tac att tgg ag*
Yersinea YerF:	*tgg act tgc agg cca gta tcg c*

جدول ٤: مقادیر و ترکیبات استفاده شده در فرایند مولتی پلکس PCR

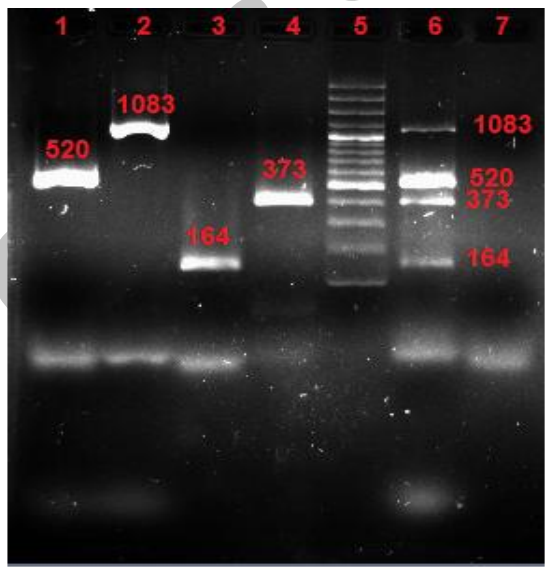
ردیف	مواد	مقدار
۱	آب مقطر تزریقی	۱۷/٦ پیکومول
۲	بافر x ۱۰	۲/٥ پیکومول
۳	Mgcl۲mM	۱ پیکومول
٤	dNTPmix (۱۰۰mM each)	۰/٥ پیکومول
٥	پرایمر F	۱ پیکومول
٦	پرایمر R	۱ پیکومول
۷	DNA	۱ پیکومول
۸	انزیم Taq	۲،٥ یونیت
۹	جمع	۲٥ پیکومول

Archive of SID

www.SID.ir



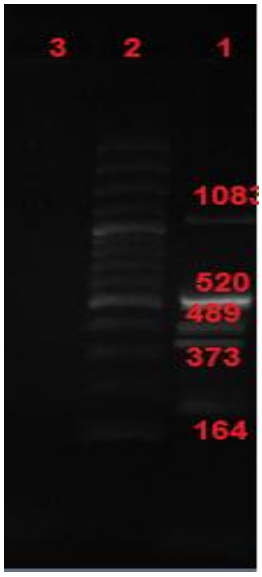
*شکل ۱: نتایج **Uniplex** و **Multiplex PCR**، خانه‌ی شماره‌ی ۱: یرسینیا پستیس با پرایمر **Yer** (اندازه باند۵۲۰). خانه‌ی شماره‌ی ۲: آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی شماره‌ی ۳: سالمونلا با پرایمر **T** (اندازه باند۴۸۹). خانه‌ی شماره‌ی ٤: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ١٦٤). خانه‌ی شماره‌ی ٥ وزن مولکولی. خانه‌ی شماره ٦ مولتی پلکس پی‌سی‌آر با چهارجفت پرایمر اختصاصی یرسینیا پستیس **Yer**، آنتراکس ۱۲۵، سالمونلا **T**، آنتراکس ۱۲۹ خانه‌ی شماره ۷: کنترل منفی.*



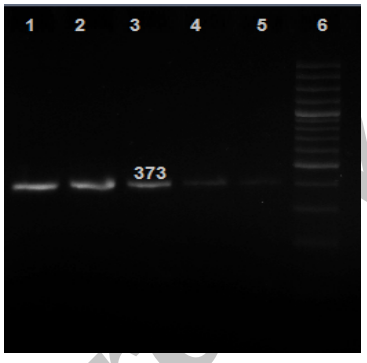
*شکل ۲: نتیجه‌ی **Uniplex** و **Multiplex PCR** را با ٤ جفت پرایمر نشان داده است. خانه‌ی ۱: یرسینیا پستیس با پرایمر **Yer** (اندازه باند ۵۲۰). خانه‌ی ۲:آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی ۳: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ١٦٤). خانه‌ی ٤: سالمونلا با پرایمر **S۱۲** (اندازه باند ۳۷۳). خانه‌ی ٥: وزن مولکولی خانه‌ی ٦: مولتی پلکس پی‌سی‌آر با چهار جفت پرایمر اختصاصی که عبارت است از: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا با پرایمر **S۱۲**، یرسینیا پستیس با پرایمر **Yer**، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵. خانه‌ی ۷: کنترل منفی.*

Archive of SID

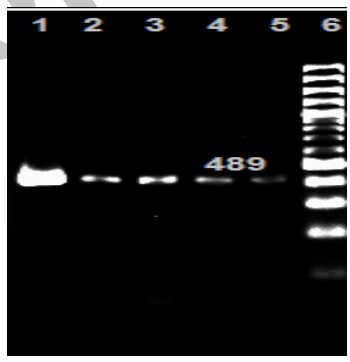
www.SID.ir



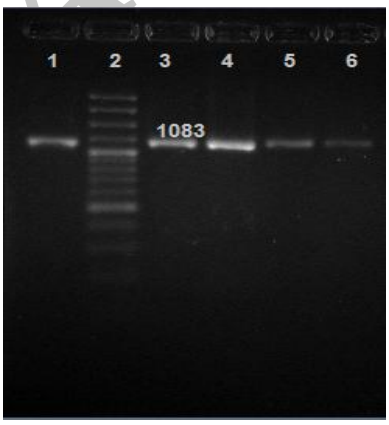
شکل ۳: نتایج MultiplexPCR با پنج جفت پرایمر اختصاصی را نشان داده است. خانه‌ی ۱: مولتی پلکس پی‌سی‌آر، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه‌ی باند ۱٦٤)، سالمونلا با پرایمر S۱۲ (اندازه‌ی باند ۳۷۳)، سالمونلا با پرایمر T (اندازه‌ی باند ٤۸۹)، یرسینیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه‌ی باند ۵۲۰)، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه‌ی باند ۱۰۸۳). خانه‌ی ۲: وزن مولکولی خانه‌ی ۳: کنترل منفی

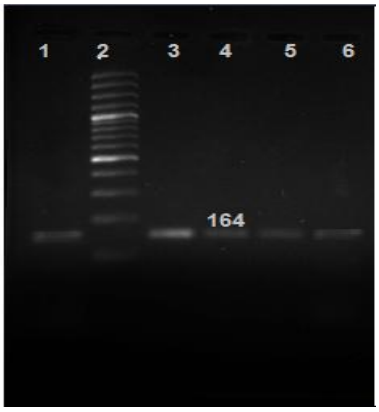


شکل ٤- ب



شکل ٤-الف

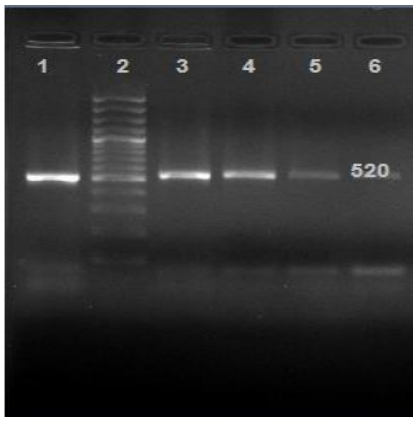




Archive of SID

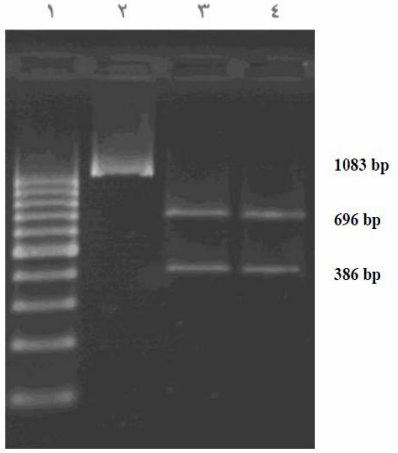
www.SID.ir

شکل ٤–ج شکل ٤– د



شکل ٤– ه

شکل ٤: نتایج مربوط به رقت سریال DNA باجفت پرایمر T سالمونلا تیفی (اندازه‌ی باند ٤٨٩)(شکل ٤–الف)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر S ۱۲/۱۳ (اندازه‌ی باند ۳۷۳)(شکل ٤–ب)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر ۱۲۹ آنتراکس (اندازه‌ی باند ١٦٤) (شکل ٤–ج)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر ۱۲۵ آنتراکس(اندازه‌ی باند ۱۰۸۳)(شکل ٤–د) و رقت سریال DNA با جفت پرایمر Yer یرسینیا پستیس (اندازه‌ی باند ۵۲۰)(شکل ٤– ه). سالمونلا با پرایمر T و۱۲ s (شکل ٤–الف وب): خانه‌ی ۱. نمونه ژنوم خالص. خانه‌ی ۲. DNA با رقت 10^{-1}، خانه‌ی ۳. DNA با رقت 10^{-2}، خانه ٤. DNA با رقت 10^{-3} خانه‌ی ۵.DNA با رقت 10^{-4} خانه‌ی ٦. وزن مولکولی. آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳)(شکل ٤–د) ،۱۲۹ (اندازه باند ١٦٤)(شکل ٤–ج) و یرسینیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه باند۵۲۰)(شکل ٤–ه): خانه‌ی ۱. DNA خالص. خانه‌ی ۲. وزن مولکولی. خانه‌ی ۳.DNA با رقت 10^{-1}، خانه‌ی ٤. DNA با رقت 10^{-2} ، خانه‌ی ۵.DNA با رقت 10^{-3}، خانه‌ی ٦. DNA با رقت 10^{-4}



شکل ۵: برش محصول ۱۰۸۳bp واکنش PCR توسط آنزیم HindIII

تایید محصول واکنش Multiplex PCR آنتراکس با پرایمر ۱۲۵: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول bp ۱۰۸۳ توسط آنزیم محدودالاثر برش دهنده *HindIII*، دوقطعه با اندازه‌های ٦٩٦bp و ٣٨٦bp حاصل می‌شود که تایید کننده‌ی درستی

Archive of SID
www.SID.ir

محصول ایجاد شده توسط پرایمرهاست (شکل ۵). مقایسه‌ی ترادف محصول PCR پرایمرهای ۱۲ و ژن invA از بانک ژنرشته فوقانی سکانس حاصل از محصول PCR و رشته‌ی تحتانی سکانس ژن مرجع می‌باشد. نوکلئوتیدهای متفاوت با حروف درشتتر در جایگاه ۱۲٤، ۲۳۲ و ۲۳۳ مشخص گردیده است. خانه‌ی ۱. وزن مولکولی، خانه‌ی ۲. محصول واکنش PCR، ۱۰۸۳bp. خانه‌ی ۳. محصول هضم شده توسط آنزیم *HindIII*. خانه‌ی ٤. محصول هضم شده توسط آنزیم *HindIII*

بحث

در این بررسی از نمونه‌های استاندارد استفاده شد که پرایمرهای انتخاب شده به‌طور اختصاصی قادر به تشخیص ژنوم عامل ویرولان این سه باکتری و همچنین نمونه‌ی مستقیم بوده و هیچ‌گونه پاسخی با سایر باکتری‌های هم خانواده و یا باکتری‌های دیگری که ممکن است در نمونه‌ی کلینیکی وجود داشته باشد، ایجاد نکرده‌اند و اندازه‌ی قطعات پرایمرهای انتخاب شده به نحوی است که امکان تفکیک چهار قطعه با اندازه‌های ١٦٤، ۳۷۳، ٤٨٩،٥۲۰، ۱۰۸۳ جفت باز به سهولت با سیستم عادی آگارز ژل الکترفورز با غلظت ۱ تا ۱/۵ درصد وجود دارد. با استفاده از این روش امکان تشخیص سریع ژنوم، تهیه‌ی مخلوط واکنش، انجام چرخه‌های PCR سریع الکتروفورز (حاوی ماده اتیدیوم بروماید) و بررسی نتیجه در دستگاه UV در کمتر از ۹۰ دقیقه وجود دارد. در روش‌های متداول، تشخیص سالمونلاها نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد اما در این روش تشخیص بسیار سریع انجام می‌شود (۹). در یک تحقیق مشابه از روش PCR جهت تشخیص عامل حصبه و تفکیک آن از سایر انتروباکتریاسه ها و همچنین سایر سالمونلاها استفاده شده است که تنها یک نوع باکتری که همان عامل حصبه است، مورد شناسایی قرار گرفت. اما در روش تحقیق اخیر سه گونه مختلف از خانواده‌های متفاوت باکتری‌ها با تفاوت‌های ظاهری و بالینی متفاوت به‌طور همزمان در یک لوله آزمایش مورد شناسایی قرار گرفت (۱۷). محققین جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی بر اساس ردیف ژن‌های شناخته شده، tyv,flic-d,flic-a,viaB,prt,spvC را طراحی و بررسی نمودند (۱۸). تفاوت این تحقیق با تحقیق حاضر این است که پرایمرهای مختلفی مورد طراحی قرار گرفت که زمان بر هستند و کار دشوارتر است و ژن‌های مورد استفاده تنها ژن‌های ویرولانس بودند که حتما باید از نمونه‌های بالینی آلوده تهیه شوند، اما در نتایج آزمایش حاضر هم می‌توان از ژن‌های ویرولانس و هم غیر ویرولانس برای تشخیص بیماری استفاده کرد . دریک بررسی با پنج جفت پرایمر مبتنی بر ژن‌های viaB,fliC,tyv(rfbE), prt(rfbS) و با روش مولتی پلکس به خوبی قادر به تشخیص عامل سالمونلا بوده است (۱۹). تعداد پرایمرهای این روش زیاد بوده و در عین حال روش به‌کار گرفته شده PCR عادی با سرعت متداول است. روش‌های بسیار مختلفی نیز جهت تشخیص عامل آنتراکس در نمونه‌های کلینیکی دامی و محیطی استفاده شده است. روش‌های استاندارد موجود جهت تشخیص نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد (۲۲-۲۰). از روش‌های مختلف مولکولی برای تشخیص باکتری عامل آنتراکس و تفکیک آن از سایر باسیلوس‌ها استفاده شده است. اما بهترین روش برای تشخیص عامل آنتراکس همان روش مولکولی استفاده از تکنیک پی‌سی‌آر است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به علت استفاده از فاکتور زمان که بسیار حیاتی است برای تشخیص به‌موقع و زود هنگام این بیماری برای جلوگیری از اپیدمی شدن بیماری به خصوص پخش اسپور آنتراکس در هوا که در بمبهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸-۲۳). هینباج و شوام در سال ۱۹۹۳ در مطالعات

Archive of SID
www.SID.ir

خود برای بررسی ژنوم باکتری یرسینیا پستیس در تحت گونه‌های مختلف آسیا، آفریقا و آمریکا از پرایمرهای ژن pla جهت شناسایی قطعی باکتری استفاده کردند و نتایج تحقیقات آن‌ها نشان دادکه انجام واکنش PCR در جهت نیل به اهداف تشخیصی و کنترلی بیماری و بررسی‌های اپیدمیولوژی قابل استناد است. تفاوت با آزمایش حاضر در این است که روش مورد استفاده تنها یونی پلکس پی‌سی‌آر است؛ اما تحقیق ما روش مولتی پلکس پی‌سی‌آر استفاده شده که باعث صرفه‌جویی در زمان و مواد مورد استفاده و تشخیص گونه‌های مختلف باکتری‌ها همزمان با هم شده است (۲۹). انگلتالر و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی باکتری عامل طاعون، روش PCR را با روش تلقیح به حیوان آزمایشگاهی مقایسه کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان دادکه شناسایی باکتری عامل طاعون با روش PCR نه تنها مشکلات منفی کاذب را به دلیل مقاومت برخی از حیوانات آزمایشگاهی به یرسینیا پستیس ایجاد نمی‌کند بلکه روشی مقرون به صرفه از نظر هزینه‌ی امکانات و زمان می‌باشد. بنابراین نتیجه گرفتند که این روش نسبت به روش‌های معمول تشخیصی همچون کشت باکتریولوژی و تلقیح به حیوان آزمایشگاهی بسیار حساس‌تر و دقیق‌تر است و می‌تواند یک روش مناسب در جهت تشخیص، کنترل و مراقبت بیماری طاعون به‌شمار آید (۳۰). روش مولتی‌پلکس نسبت به روش یونی پلکس نه تنها کم هزینه‌تر و سریع‌تر می‌باشد؛ بلکه موارد منفی کاذب را نیز به‌طور کامل حذف خواهد کرد. در این تحقیق که بر اساس ژن‌های invA و hp سالمونلا تیفی، pA وchr آنتراکس و pla یرسینیا پستیس انجام شد، تمامی این ژن‌ها با توجه به پرایمر اختصاصی خود مورد شناسایی قرار گرفت. با توجه به پیشرفت‌های عظیم در عرصه‌های مولکولی از این روش‌ها مثل مولتی پلکس پی‌سی‌آر می‌توان جهت تشخیص عوامل مختلف عفونی از جمله تشخیص این سه عامل آنتراکس، سالمونلا تیفی موریوم، یرسینیا پستیس استفاده کرد. عامل اساسی در به‌کارگیری عملی از روش PCR شناسایی پرایمرهای اختصاصی است. طراحی پرایمر نیازمند بررسی جایگاه‌های بسیاری است که محققین جهت طراحی پرایمر و پروب‌های مناسب از بخش‌های مختلفی از توالی‌های موجود استفاده کردند.

نتیجه گیری

براساس نتایج این تحقیق روش مولتی پلکس پی‌سی‌آر می‌تواند جهت تشخیص سریع و همزمان سه باکتری سالمونلا تیفی موریوم، باسیلوس آنتراسیس ویرسینیا پستیس از سایر باکتری‌های مشابه یا هم خانواده آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند، و با توجه به اینکه از این سه عامل به عنوان سلاح‌های میکروبی و خطرناک می‌توان نام برد، این مطالعه می‌تواند ابزاری برای تشخیص سریع، دقیق و کم هزینه برای ردیابی این باکتری‌ها در مواردی مانند عملیات بیوتروریستی و یا جنگ‌های میکروبی فراهم نماید. اختصاصیت روش بسیار بالا است، به‌طوری‌که قادر است یک نوع باکتری را در بین هزاران نوع باکتری متفاوت تشخیص دهد. انجام این روش بسیار ساده است و با توجه به اینکه به‌طور همزمان صورت می‌گیرد نیاز به انجام PCR های متعدد جهت تشخیص هر عامل به‌طور جداگانه نمی‌باشد. با توجه به تجارب ده سال گذشته کسب شده در این مرکز و بهینه سازی‌های انجام شده در مورد تک تک عوامل، انجام PCR ترکیبی جهت تشخیص سریع و همزمان چند عامل در نمونه های مجهول از مزایایی ارزشمند این روش است. از این روش می‌توان در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی عوامل عفونی و یا آزمایشگاه‌های سیار تهیه شده جهت بحران‌ها و شرایط خاص استفاده نمود و همچنین در آزمایشگاه های مرجع تشخیص عوامل می‌تواند کمک بزرگی به تشخیص همزمان عوامل در یک واکنش نماید. با توجه به اینکه در جهان تا کنون چنین روشی برای تشخیص همزمان و سریع سه عامل ذکر شده

Archive of SID

www.SID.ir

توسعه نیافته است، این تحقیق را می‌توان منحصر به‌فرد و با ارزش دانست و قطعا قابل توسعه جهت ساخت کیت‌های تشخیص مولکولی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

با تشکراز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و اساتید و همکاران محترم از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و پژوهشکده‌ی طب رزمی که بدون همکاری و مساعدت‌های بی‌شایبه آن‌ها انجام این تحقیق امکان پذیر نبود. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد می‌باشد.

References

1- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of thyphoid fever. *Bull World Health Org*. 2004; 82: 346-53.

2- Purver R. Chemical and biological terrorism. The threat according to the open literature. 1995. *www.csis-scrs.gc.ca/eng/misc docs/pur V_e.html.*

3- Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A. Sequence, Assembly and analysis of Pxo1 and Pxo2. *J Applied Microbiol*. 1999; 87: 261-62.

4- Franz DR, Jahrling PB, Fried lander AM, Mc Clain DJ, Hoover DL, Bryne WR, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfar agents. *JAMA*. 1997; 278: 399-41.

5- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Plague as a biological weapon medical and public health management. *JAMA*. 2000; 283: 2281-2290.

6- Butler T. Plague and other Yersinia infections. NewYork Plenum Medical Book Company. 1991; 112.

7- Hinnebusch J,Cherepanov P, Rudoplh A, et al. Murine toxin of yersinia pestis shows phospholipase D activity required for virulence in mice. *Int J Med Microbiol*. 2000; 290: 483-487.

8- Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic disease caused by yersinia. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4: 309-324.

9- Ivanhoff B. Typhoid fever global situation and WHO recommendations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1995; 26: 1-6.

10- Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Former JJ. Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonella as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori Comb nov. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 313-330.

11- Turnbull PC B, Boehm R, and Cosivio.Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. WHO Publication. 1998.

12- Leal NC, Almeida AM. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in yersinia pestis by multiplex PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999; 41: 339-342.

13- Hu Wung, Yujun Cui, Zuyu Wung. Xiaoyi Wang, Zhaobiao Guo, Yanfeng Yan, et al. A Dog – Associated primary pneumonic plague in Qinghai

Archive of SID

www.SID.ir

province, China. *Clin Infect Dis*. 2011; 52: 185-190.

14- Turnbull PC. Bacillus antheracis but not always antherax. *J Appl Bacteriol*. 1992; 72: 21-8.

15- Joseph Sambrook and David W. Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000.

16- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI- BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3389-3402.

17- Aabo S, Ramussen DF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. Salmonella identification by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 1993; 7: 171-178.

18- Hirose K, Itoh KI, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, et al. Selective amplification of tyv(rfbE), prt(rfbS),via B, and fliC genes by Multiplex PCR for identifications of Salmonella enterica Serovars typhi and para typhi A. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 633-636.

19- Herrera Leon S, Mc Quiston JR,Usera MA, Fields PI, Garaizar I, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of salmonella. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2581-86.

20- Harrison LH, Ezzel JW, Abshire TG. Evaluation of serologic tests for diagnosis antherax after an outbreak of cutaneous antherax in Paraguay. *J Infect Dis*.1989; 160: 706-10.

21- Conrad P. Quim, Peter M. Dull, Vera Semenova, Han Le, Shan Crotty, Thomas H, et al. Immne Responses to bacillus anthracis protective antigen in patients with bioterrorism related cutaneous or inhalation anthrax. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1228-1236.

22- Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, Page EH, Snawder JE, Striley CAF, Mackenzie BA. Determination of Serum IgG antibodies to bacillus anthracis protective antigen in environmental sampling workers using a fluorescent covalent microsphere immuno assay. *Occup Environ Med*. 2004; 61: 703-708.

23- Welkos SL, Lowe JR, Eden MC Cutchan F. Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of Bacillus anthracis .*Gene* 1988; 69: 87-300.

24- Ramisse V, Patra G, Garrigue H. Identification and characterization of Bacillus antheracis by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids Pxo1 and Pxo2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Let*. 1996; 9-16.

25- Beyer W, Glockner P, Otto J, Bohm H. A nested PCR method for the detection of Bacillus anthracis in environmental samples collected from former tannery sites. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 128: 113-8.

26- Handerson I, Duggleby CJ, Tunder bull PC. Differntation of Bacillus anthracis from other Bacillus cereus group bacteria with the PCR. *Int J Bacteriol*. 1994; 44: 99-105.

27- Beyer W, Pocivalsek S, Bohm R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect Bacillus anthracis from soil samples limitation of present published primers. *J Appl Microbiol*. 1999; 87: 229-360.

28- Jackson PJ, Hugh Jones ME, Adair DM. PCR

Archive of SID

www.SID.ir

analysis of tissue samples from the 1979 Sverd lovsk anthrax victims: The presence of multiple Bacillus antheracis strains in different victims. *Proc NatI Acad Sci USA*. 1998; 95: 1224-9.

29- Hinne busch J, Schwan TG. New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect yersinia pestis in fleas. *J Clin Microbio*l. 1993; 31: 1511-1514.

30- Engelthaler DM, Gage KL, Montenieri JA, Chu M, Carter LG.PCR detection of yersinia pestis in fleas comparison with mouse inculation. *J Clin Microbiol*. 1999: 1980-1984.

Archive of SID

www.SID.ir

Simultaneous Detection of *Salmonella typhi*, *Bacillus antheracis*, and *Yersinea pestis* by Multiplex PCR

Safari Foroshani N[1], Karami A[2], Pourali F[2], Aeidi A[1], Fatemeh tavana BS[2]

[1]Islamic Azad University, Science and Research, Tehran, Iran.

[2]Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences,Tehran, Iran

Corresponding Author: Karami A, Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: Karami@bmsu.ac.ir.

Received: 3 Oct 2012 **Accepted:** 17 Feb 2013

Background and Objectives: *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis* are potent human pathogenic bacteria that cause typhoid fever, anthrax, and plague,respectively. The classic microbiological methods for detection and identification of these agents are laborious and time consuming.Therefore, developing an accurate method for rapid detection of these potent human pathogens is important, especially due to their potential use as Bioterrorism agents. We have designed a new rapid molecular detection method by using multiplex PCR in a single reaction.

Materials and Methods: PCR was carried out using specific primers for the virulence factor of *S. typhi*, hp and invA, *B. anthracis* virulence factors, chr and pa, and *Y. pestis* toxin, pla. The primer sets were tested for cross reactivity with individual DNA strains and mixtures in a multiplex PCR format. For determination of sensitivity of the method, we used colony counting and genomic DNA dilution.

Results: Theresult with standard strains revealed that primers are specific for each strain as they have successfully amplified the desire products. The sensitivity analysis showed a 1-10 CFU and 1-10 copies of the genomes. In this respect, the accuracy of the result was checked by sequencing of the 1083-bp PCR products, except for anthrax, which was determined by enzymatic digestion.

Conclusion: We have found a rapid, specific, sensitive, and a non-expensive molecular method for detection of three potent human pathogens. This finding provide an efficient diagnostic tool to determine these bacteria in bioterrorism samples.

Keywords: Detection, Salmonella typhi, Bacillus antheracis, Yersinia pestis, Multiplex PCR

Archive of SID

www.SID.ir