Original Article

Design of Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for Molecular Detection of *Yersinia pestis* Bacterium

Mohammad Soleimani, Ph.D.[1], Fatemeh Eini, D.V.M.[2], Mehri Fallah Raufi, D.V.M.[2], Firuzeh Azari, B.Sc.[2], Shahrokh Farzampour, M.D.[2], Ehsan Jamshidian M.D.[2], Alireza Khoshdel, Ph.D.[2], Keivan Majidzadeh, M.D., M.P.H., Ph.D.[2]*

1. Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
2. Tasnim Biotechnology Research Center, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 14185/611, Tasnim Biotechnology Research Center, Tehran, Iran***
Email: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

Received: 26/Jul/2009, Accepted: 1/Jun/2010

Abstract

Objective: *Yersinia pestis*, the causative agent of the zoonotic plague infection, is a major public health concern both as a threat and potential bioweapon. The objective of the present study was to establish a uniplex and multiplex - polymerase chain reaction (PCR) test for the specific detection of *Y. pestis*.

Materials and Methods: PCR reactions performed by three pair primers which targeted the *caf1* and *pla* genes located on the pFra and pPst plasmids and the irp2 chromosomal gene located on the 'pathogenicity island'. After TA cloning of the PCR products, the test's limit of detection (LOD) was determined. For evaluating the specificity, PCR reactions were performed with negative control bacteria.

Results: Assays were performed with the genome of *Y. pestis* which produced three DNA fragments of the expected sizes 300, 400 and 520 bp which corresponded to the *irp2*, *caf1* and *pla* genes, respectively. The lower LoD was 370 copy numbers for the *caf1* gene and 21 for the *pla* gene. In PCR reactions that used negative control bacteria, detectable fragments were not observed.

Conclusion: Our method clearly discriminated *Y. pestis* DNA. The rapidity, specificity and sensitivity of this procedure suggest that it can serve as a useful alternative method for the inoculation of laboratory animals or the use of specific culture media for routine plaque surveillance and outbreak investigations. Another vital result of this study was the establishment of *Y. pestis* molecular detection technique in Iran.

Keywords: *Yersinia pestis*, Diagnosis, PCR

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 363-370

طراحی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مالتیپلکس جهت تشخیص مولکولی باکتری *Yersinia pestis*

محمد سلیمانی .Ph.D[۱]، فاطمه عینی .D.V.M[۲]، مهری فلاح‌رئوفی .D.V.M[۲]، فیروزه آذری .B.Sc[۲]، شاهرخ فرزام پور .M.D[۲]، احسان جمشیدیان .M.D[۲]، علیرضا خوشدل .Ph.D[۲]، کیوان مجیدزاده، .Ph.D، .M.P.H، .M.D[۲*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲. مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۸۵/۶۱۱، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم
پست الکترونیک: **Email: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir**

دریافت مقاله: ۸۸/۵/۵، پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۱۱

چکیده

* **هدف:** طراحی یک روش تشخیص مولکولی سریع جهت تشخیص باکتری *Yersinia pestis* با صرف حداقل زمان و هزینه
* **مواد و روش‌ها:** واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) بر روی ژن‌های ویرولانس *irp2, caf1, pla* به صورت مالتیپلکس و یونیپلکس طراحی و انجام شد. پس از تعیین ویژگی به منظور تعیین حساسیت، ابتدا محصول PCR ژن‌های *pla* و *cfa1* در TA کلونینگ وکتور کلون شده و سپس کمترین غلظتی از پلاسمید حامل ژن که بتواند باند واضحی را روی ژل آگاروز ایجاد کند به عنوان حد تشخیص تعیین شد.
* **یافته‌ها:** نتایج PCR مربوط به سه ژن مذکور در هر دو شکل، به ترتیب قطعاتی با طول ۳۰۰bp، ۴۰۰bp و ۵۲۰bp را ایجاد کرد. کمترین تعداد کپی قابل تشخیص مربوط به ژن *pla*، ۲۱ کپی و برای ژن *caf1* ۳۷۰ کپی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری به دست آمد. هم‌چنین مثبت شدن واکنش هضم آنزیمی وجود محصولات PCR اختصاصی را تایید کرد.
* **نتیجه‌گیری:** با توجه به وجود کانون های طاعون خیز در ایران، این مطالعه می‌تواند در فراهم نمودن ابزار تشخیص مولکولی سریع و مطمئن برای ارزیابی جوندگان به منظور پایش مناطق تحت خطر بسیار موثر باشد. از طرفی روش‌های طراحی شده در این مطالعه ابزاری دقیق، سریع و کم هزینه برای جست‌وجو و تشخیص این باکتری در موارد بیوتروریستی فراهم می‌نماید.

* **کلیدواژگان:** یرسینیا پستیس، تشخیص، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۷۰-۳۶۳

مقدمه

طاعون بیماری مهلک و خطرناکی است که به دنبال آلودگی با باکتری *Yersinia pestis* در اغلب جوندگان و انسان ایجاد می‌شود (۱). این باکتری، کوکوباسیل گرام منفی، فاقد حرکت و اسپور می‌باشد که به طور معمول به شکل انزیوتیک بین جوندگانی مانند موش منتقل می‌شود (۲). عامل بیماری از طریق گزش اکتو پارازیت‌های آلوده، به ویژه کک *Xenopsilla cheopis* از جوندگان به انسان قابل انتقال است (۳، ۴).

بیماری طاعون به سه شکل بالینی خیارکی (Bubonic)، سپتیسمی و تنفسی ظاهر می‌شود. فرم تنفسی بیماری شدیدترین حالت بالینی بیماری را ایجاد می‌کند. این حالت از بیماری بیشترین موارد مرگ و میر را به همراه دارد و به راحتی از انسان به انسان قابل انتقال است (۵). این توان بالقوه باکتری سبب شده است که بتوان از آن به عنوان یک سلاح بیولوژیک استفاده کرد (۶، ۷).

بیماری طاعون قدمت طولانی دارد و از قبل از میلاد مسیح تا جنگ جهانی دوم همواره پاندمی و اپیدمی‌های وسیعی را ایجاد کرده است. طی سالیان اخیر نیز گزارشات متعدد نشان می‌دهد که هنوز طاعون نه تنها در بین جوندگان حتی در بین جمعیت انسانی وجود دارد (۸). سابقه طاعون در ایران به شکل مستند و مکتوب مربوط به دوره ناصرالدین شاه و هم‌چنین سال‌های ۹۹۷ الی ۱۸۷۱ میلادی می‌باشد. در سال ۱۸۷۱ میلادی بیماری طاعون خیارکی به صورت اپیدمی در نواحی شمالی سقز و بانه ظهور کرد و در سال ۱۹۱۳ میلادی بیماری به شکل اپیدمی در کردستان و خراسان ظاهر شد. آخرین واگیری در ایران در فاصله سال‌های ۱۹۵۱ الی ۱۹۶۶ میلادی در کردستان و آذربایجان غربی گزارش شده است (۹).

نقش *Y. pestis* در جهت به کارگیری در سلاح‌های بیولوژیک به قرن ۱۴ برمی‌گردد. در جنگ جهانی دوم ارتش ژاپن از طریق همین عامل توانست اپیدمی وسیعی را در چین ایجاد کند. به همین دلیل طی چندین دهه گذشته یکی از مهم‌ترین وظایف مراکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در اکثر کشورها، پایش مناطق انزیوتیک در معرض خطر و هم‌چنین شناسایی و تشخیص سریع عوامل بیولوژیک به منظور مدیریت حملات بیوتروریستی و جنگ‌های میکروبی می‌باشد (۸).

اگر چه روش‌های معمول باکتریولوژیک هم‌چون کشت معمول ارگانیسم، استاندارد طلایی و جزو روش‌های رایج برای تشخیص باکتری می‌باشند (۱۰)، اما از آنجا که به تقریب رشد ارگانیسم به آهستگی می‌باشد و از طرفی قرار گرفتن عامل در گروه A عوامل بیولوژیک، کشت آن را محدود به آزمایشگاه‌های دارای سطح ایمنی زیستی سه (Biosafety Level 3; BSL3) می‌کند (۱۰، ۱۱).

در تشخیص کلاسیک این باکتری از انجام تست‌های بیوشیمیایی، بررسی حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی و کشت در محیط‌های اختصاصی استفاده می‌گردد. 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).

Yersinia pestis در محیط‌های کشت غنی عمومی رشد می‌کند اما رشد آن نسبت به انواع باکتری‌های دیگر کندتر است. بنابراین ممکن است حضور آن در محیط توسط سایر باکتری‌ها پوشیده شود. رنگ‌آمیزی دو قطبی که در تشخیص آن به کار می‌رود یک تست انحصاری برای آن نیست. سایر یرسینیاها، باکتری‌های روده‌ای و دیگر باکتری‌های گرم منفی به ویژه گونه‌های پاستورلا چنین ویژگی را از خود نشان می‌دهند. ویژگی رشد توده‌ای در محیط کشت مایع نیز که در تشخیص آن به کار می‌رود یک ویژگی انحصاری نمی‌باشد و بعضی از انواع *Yersinia pseudotuberculosis* و *Streptococcus pneumonia* نیز چنین ویژگی را نشان می‌دهند. لیستی از انواع نقاط ضعف روش‌های باکتریولوژیک برای تشخیص این باکتری، در مقالات مختلف ارایه شده است (۱۳، ۱۴).

روش‌های تشخیصی مبتنی بر سرولوژی نیز برای تشخیص این باکتری یا بیماری طاعون توسعه یافته‌اند. بیشتر تست‌های تشخیصی سریع مبتنی بر کشف آنتی ژن کپسولی می‌باشند (۱۵). گرچه روش‌های سرولوژی مبتنی بر تشخیص تیتر آنتی‌بادی ضد این باکتری مانند دیگر عفونت‌ها برای مطالعات اپیدمیولوژیک و تایید گذشته‌نگر عفونت مناسب هستند، اما برای تشخیص عفونت در فاز حاد بیماری ارزش کمی دارند (۱۶). بنابراین در هنگام احتمال استفاده بیوتروریستی از این باکتری، تکیه بر استفاده از تست های سرولوژی برای تشخیص، نگران‌کننده خواهد بود (۱۷). این باکتری یک ارگانیسم دارای تنوع آنتی‌ژنیک است. بنابراین دارای ظرفیت دست ورزی برای تغییر ترادف‌های ژنتیکی نیز می‌باشد که ممکن است موجب بی‌اثر شدن استفاده از سنسورهای رایج در تشخیص گردد.

روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های تشخیصی کلاسیک دارای چندین مزیت می‌باشند. علاوه بر سرعت وحساسیت، این روش‌ها قادر به تشخیص باکتری‌های غیرزنده هم می‌باشند و جداسازی آنها برای تشخیص ضروری نخواهد بود.

مواد و روش ها

انجام طرح تحقیقاتی حاضر پس از بررسی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آجا و تصویب نهایی صورت پذیرفت.

گونه‌های باکتریایی

ژنوم سوش وحشی باکتری *Y. pestis* از انستیتوپاستور ایران تهیه و از آن به عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده شد. لیست و مشخصات باکتری‌های کنترل منفی مورد استفاده نیز در جدول ۱ آورده شده است.

کشت و استخراج ژنوم باکتری ها

از آنجایی که باکتری‌های کنترل منفی، همگی به شکل لیوفیلیزه تهیه شدند، تمامی آنها ابتدا در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (Merk) و سپس در محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (Merk) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ژنوم آنها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن DNP ™ Kit (DNA Purification kit) استخراج گردید.

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

نام میکروارگانیسم	شماره سویه	محل تهیه
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	انستیتو پاستور ایران
Bacillus subtilis	ATCC 6051	
Shigella sonnei	ATCC 9290	
Escherichia coli	ATCC 25922	
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	
Klebsiella pneumoniae	ATCC 7881	
Yersinia enterocolitica	PTCC 1480	سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
Yersinia intermedia	PTCC 1482	
Yersinia pseudotuberculosis	PTCC 1244	
Proteus vulgaris	PTCC 1079	
Citrobacter freundii	PTCC 1600	
Serratia marcesens	PTCC 1111	
Salmonella typhi	PTCC 1609	

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

طراحی پرایمر	محل قرارگیری ژن هدف	اندازه محصول PCR	ژن هدف	ترادف پرایمرها
مطالعه حاضر	پلاسمید pFra	400 bp	*caf1*	**Forward 5'- ccgtagcdaagacgacgtcatc** **Reverse 5'- tcagttccgttatcgccattgc**
مطالعه حاضر	پلاسمید pPst	520 bp	*pla*	**Forward 5'- tggacttgcaggccagtatcgc** **Reverse 5'- ccatgcctgaaagacgtggag**
(۱۲)	کروموزوم	300 bp	*irp2*	**Forward 5'- aaggattcgctgttaccggac** **Reverse 5'- tcgtcgggaagcgtttcttct**

طراحی پرایمرها

ژن‌های هدف‌گذاری شده در این مطالعه شامل *irp2*, *caf1*, *pla* می‌باشند که به ترتیب بر روی پلاسمیدهای pPst, pFra و سکانس Pathogenicity Island باکتری قرار گرفته‌اند. طراحی پرایمرها به کمک نرم‌افزار Gene Runner انجام و ساخت آنها توسط شرکت سیناژن انجام شد. هم‌چنین سکانس پرایمرها، مکان آنها بر روی ژنوم و اندازه قطعه تکثیر شده در جدول ۲ نشان داده شده است. هم‌چنین به منظور بررسی نهایی پرایمرهای طراحی شده و اطمینان از اختصاصی بودن آنها از سرویس Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) سایت (NCBI) National Center for Biotechnology Information استفاده شد.

واکنش PCR

واکنش PCR جهت ارزیابی سه ژن هدف *irp2*, *caf1*, *pla* با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم، ۲ میلی‌مولار یون منیزیم، ۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰۰نانوگرم ژنوم باکتری، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای عقبی و جلویی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۵ سیکل در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه سپس ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. هم‌چنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی انجام شد.

پس از اتمام واکنش آمپلیفیکاسیون، ۷ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱درصد در X۰/۵ بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر، ژل آگاروز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با ترانسلومینیتور مشاهده شد. لازم به ذکر است که واکنش برای هر سه ژن هم به صورت یونیپلکس و هم مالتیپلکس انجام شد.

تعیین ویژگی

به منظور بررسی ویژگی پرایمرهای ژن‌های *irp2*, *caf1*, *pla* جهت تشخیص باکتری مورد نظر، واکنش PCR با شرایط فوق بر روی ژنوم استخراج شده باکتری‌های کنترل منفی انجام شد. هم‌چنین به منظور اطمینان از قابلیت DNA استخراج شده در به‌کارگیری واکنش PCR و عدم وجود مهار کننده در آن، واکنش PCR بر روی ژن کروموزومی 16S rRNA که در تمام باکتری‌ها وجود دارد، بر اساس مطالعه چیانگ انجام شد (۱۸).

کلونینگ محصولات PCR و تهیه کنترل مثبت

به منظور دست‌یابی به یک روش تشخیص مولکولی مناسب و مطمئن، وجود کنترل مثبت امر مهمی محسوب می‌گردد که برای تهیه آن از روش کلونینگ محصولات PCR در وکتور مناسب استفاده شد. به این منظور پس از تکثیر ژن‌های مورد نظر و خالص‌سازی با استفاده از کیت ACCU Prep PCR Purification Kit (BIONEER)، واکنش اتصال آنها به تی- وکتور pTZ57R/T مطابق با روش سازنده کیت InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas) انجام گرفت. پس از آماده‌سازی باکتری پذیرای *E. coli top 10 F'* ترانسفورماسیون انجام و در نهایت باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط Luria-Bertani agar (Merk) حاوی ۵- برومو ۴-کلرو ۳-ایندولیل بتا دی‌گالاکتو پیرانوزید (X-gal) با غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ایزوپروپیل بتادی‌تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl-[beta]-D-; IPTG Thiogalactopyranoside) با غلظت ۳۸/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر، آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و تتراسیکلین باغلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کشت داده شدند.

ارزیابی اولیه کلونینگ بر اساس انتخاب پرگنه‌های سفید به عنوان موارد مثبت و پرگنه‌های آبی به عنوان موارد کنترل منفی انجام گرفت. جهت تایید موارد مثبت و منفی، پس از تهیه ماتریکس از کشت‌های اولیه، واکنش Colony-PCR با شرایط ذکر شده در بالا برای هر یک از ژن‌ها انجام شد. هم‌چنین به منظور تایید نهایی کلون‌های دریافت کننده اینسرت، پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت ACCU Prep Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER)، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم (Fermentase) *XbaI* بر روی قطعه *caf1* و واکنش هضم آنزیمی با استفاده از ۲ آنزیم (Fermentase) BglII ,(Fermentase) *HindIII* بر روی قطعه *pla* انجام شد. واکنش هضم آنزیمی مربوط به اینسرت *caf1* به صورت تک آنزیمی با ایجاد برش در Multiple cloning site وکتور و هم‌چنین ابتدای اینسرت و پیش‌بینی ایجاد قطعه‌ای با طول ۷۰bp یا ۳۳۰bp، درحجم ۲۰ میکرولیتر با به کارگیری ۱ واحد آنزیم برای ۱میکروگرم پلاسمید انجام گردید. هم‌چنین واکنش هضم دو آنزیمی برای ایجاد برش توسط آنزیم *HindIII* در Multiple Cloning Site وکتور و برش توسط آنزیم BglII در اینسرت *pla* و پیش‌بینی حصول قطعه‌ای با طول ۱۵۰bp یا ۵۰۰bp درحجم ۲۰ میکرولیتر با به کارگیری ۱ واحد از هر یک از آنزیم‌های مذکور بر روی ۱میکروگرم پلاسمید انجام شد.

تعیین حساسیت و حد تشخیص (Limit Of Detection; LOD)

پس از انجام واکنش TA کلونینگ در مورد قطعات *pla* و *caf1*، ابتدا غلظت پلاسمید حاوی اینسرت با اسپکتروفتومتر مشخص شد و سپس جهت تعیین حساسیت واکنش، حداقل تعداد کپی از قطعه مورد نظر که بتواند در واکنش PCR باند واضحی ایجاد کند، محاسبه گردید. بدین منظور رقت های متوالی (10^{-8} الی 10^{-1}) از پلاسمید مورد نظر با غلظت مشخص تهیه شد. پس از انجام واکنش PCR روی رقت‌های متوالی پلاسمید، کمترین رقتی از آن که باند مشخص و واضحی را نشان داد، به عنوان حد تشخیص تعیین شد.

یافته ها

واکنش PCR مربوط به سه ژن *irp2, caf1, pla*

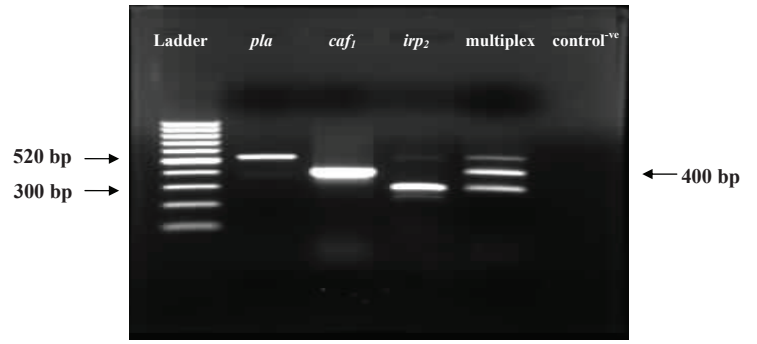
نتایج واکنش PCR مربوط به ۲ ژن پلاسمیدی *caf1, pla* و ژن کروموزومی *irp2* در دو شرایط Uniplex و Multiplex مثبت بود. قطعات تکثیر یافته *irp2, caf1, pla* به ترتیب با طول ۵۲۰bp، ۴۰۰bp، ۳۰۰bp بر روی ژل مشخص گردید (شکل ۱).

واکنش PCR مربوط به تعیین ویژگی

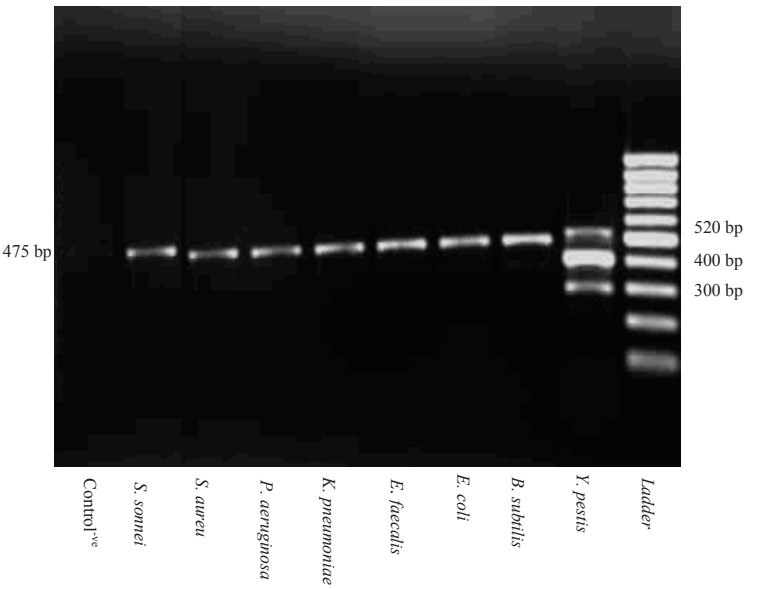
واکنش PCR مربوط به سه ژن *irp2, caf1, pla* در تمام باکتری‌های کنترل منفی، باندی را ایجاد نکرد تا نشان دهنده ویژگی واکنش PCR در این مطالعه باشد. هم‌چنین مثبت شدن واکنش PCR مربوط به ژن یونیورسال 16S rRNA با طول ۴۷۵bp، حضور ژنوم استخراج شده قابل PCR را تایید نمود (شکل ۲).

جدول ۳: فرمول تعیین تعداد کپی‌های قابل تشخیص

$\frac{M \times N}{L \times D}$ = **تعداد کپی‌های قابل تشخیص**	
M	کمترین غلظت سکانس هدف که در واکنش PCR قابل تشخیص است
N	عدد آووگادرو = مول / مولکول $۱۰^{۲۳} \times ۶/۰۲۳$
L	اندازه سازه ژنی = (طول وکتور + ژن هدف)
D	تبدیل bp به کیلودالتون = $۱۰^{۵} \times ۶/۶$



شکل ۱: نتایج واکنش PCR مربوط به ۲ ژن پلاسمیدی *caf1, pla* و ژن کروموزومی *irp2* در دو شرایط Uniplex و Multiplex



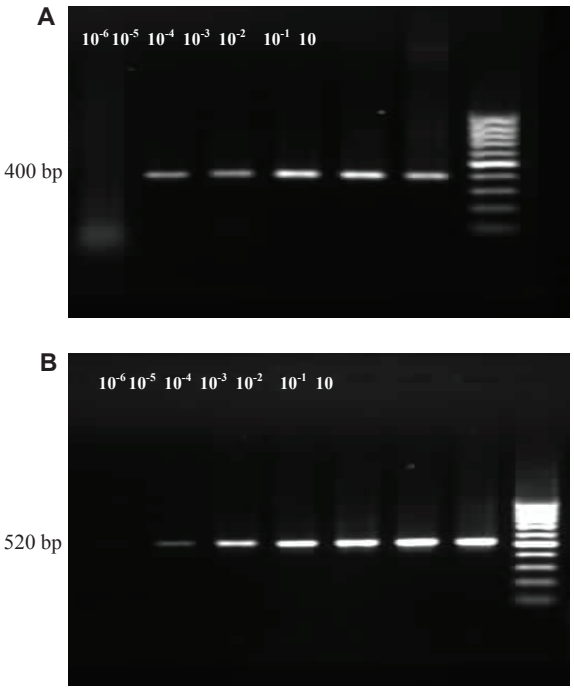
شکل ۲: واکنش PCR مربوط به سه ژن *irp2, caf1, pla* در باکتری *Y.pestis* و ژن کروموزومی 16S rRNA در باکتری‌های کنترل منفی. در هیچ یک از باکتری‌های کنترل منفی در واکنش PCR مربوط به سه ژن *irp2, caf1, pla* باندی دیده نشد. مثبت شدن واکنش PCR مربوط به ژن کروموزومی 16S rRNA با طول ۴۷۵bp حضور ژنوم استخراج شده با قابلیت انجام PCR را تایید می‌کند.

تهیه کنترل مثبت

واکنش PCR بر روی کلون‌های دریافت کننده اینسرت (کنترل مثبت) در مورد ژن‌های *pla* و *caf1* که به ترتیب pTVpla و pTVcaf1 نام‌گذاری شدند، مطابق انتظار به ترتیب باندهایی به اندازه ۱۵۲۰ و ۴۰۰bp در ژل آگاروز ایجاد نمود. هم‌چنین به منظور تایید نهایی، قطعات مورد نظر با آنزیم‌های ذکر شده مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پس از هضم آنزیمی طبق انتظار در مورد ژن *Pla* قطعه ۵۰۰bp و ژن *caf1* قطعه ۳۳۰bp مشاهده شد.

تعیین حد تشخیص

آخرین رقتی از پلاسمید pTVcaf1 با غلظت اولیه ۱۲۰ میکرولیتر بر نانوگرم که باند قابل مشخصی ایجاد نمود، $۱۰^{-۵}$ و در مورد پلاسمید pTVpla با غلظت اولیه ۸۰ میکرولیتر بر نانوگرم ، $۱۰^{-۶}$ به دست آمد (شکل A-B ۳). با توجه به نتایج حاصل و با استفاده از فرمول ذکر شده در جدول ۳ کمترین تعداد کپی قابل تشخیص مربوط به هر دو ژن تعیین گردید (۱۹). این میزان برای ژن *caf1*، ۳۷۰ کپی و برای ژن *pla* ۲۱ کپی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR به دست آمد.



شکل شماره ۳: A: رقت 10^{-5} کمترین رقتی از پلاسمید pTVcaf1 با غلظت اولیه ۱۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر می‌باشد، که در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR قابل تشخیص است. B: رقت 10^{-6} کمترین رقتی از پلاسمید pTVpla با غلظت اولیه ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، که در واکنش۲۵ میکرولیتری PCR قابل تشخیص است.

بحث

در این مطالعه از روش Uniplex PCR و Multiplex PCR برای تشخیص مولکولی سریع باکتری *Yersinia pestis* استفاده شد. ژن های مورد مطالعه *irp2, caf1, pla* بودند که به ترتیب بر روی پلاسمیدهای pFr، pPst و ترادف Pathogenicity Island قرار گرفته‌اند. این پلاسمیدها در گونه باکتری *Y.pestis* منحصر به فرد بوده و از طرفی بیشتر تحت گونه‌های وحشی موجود در طبیعت این پلاسمیدها را در خود حفظ نموده‌اند (۲۰، ۲۱).

هینباچ و شوام درسال ۱۹۹۳ در مطالعات خود برای بررسی ژنوم باکتری *Y.pestis* در تحت گونه‌های مختلف آسیا، آفریقا و آمریکا از پرایمرهای ژن *pla* جهت شناسایی قطعی باکتری استفاده کردند و نتایج تحقیقات آنها نشان داد که انجام واکنش PCR در جهت نیل به اهداف تشخیصی و کنترل بیماری و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی قابل استناد است (۲۲). از سویی طبق بررسی‌های انجام شده، مشخص شده است که استفاده از این ژن‌ها جهت شناسایی باکتری *Y.pestis*، نتایج مثبت کاذب با سایر گونه‌های مشابه نظیر *Y.entercolitica, Y.pseudotubesculosis* و *Rickettsia typhi* ایجاد نمی‌کند (۲۲). انگلتالر و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی باکتری *Y.pestis* روش PCR را با روش تلقیح به حیوان آزمایشگاهی مقایسه کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که شناسایی باکتری *Y.pestis* با روش PCR نه تنها مشکلات منفی کاذب را به دلیل مقاومت برخی از حیوانات آزمایشگاهی به *Y.pestis* ایجاد نمی‌کند بلکه روشی مقرون به صرفه از نظر هزینه، 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 به شمار آید (۲۳). تحقیق حاضر نیز حساسیت بالای پرایمرهای طراحی شده را نشان داده است، به طوری که LOD برابر ۳۷۰ کپی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR برای ژن *caf1* و۲۱ کپی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR برای ژن *pla* در این راستا قرار می‌گیرد. تعیین حد تشخیص یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیت‌های تشخیص مولکولی می‌باشد و محققین از روش‌های مختلف برای محاسبه آن استفاده نموده‌اند. یکی از این روش‌ها، تهیه رقت‌های سریال از باکتری زنده و سپس شمارش آنها و تعیین

واحدهای کلونی‌ساز (Colony Forming Unit; CFU) می‌باشد. در این روش از رقت‌های مختلف باکتری استخراج ژنوم انجام و با PCR کردن آنها حد تشخیص محاسبه می‌گردد. بر خلاف داشتن دقت بالای این روش، مهم‌ترین نقطه ضعف آن نیاز به باکتری زنده می‌باشد و به دلیل خطرناک بودن کار با باکتری *Y.pestis* و نیاز به BSL3، در این تحقیق از آن استفاده نشد. روش دیگر تعیین LOD، اندازه‌گیری غلظت ژنوم، تهیه رقت‌های سریال از آن، تخمین تعداد کپی ژنوم در هر رقت، انجام PCR در مورد هر رقت و در نهایت تخمین حد تشخیص می‌باشد. دقت پایین مهم‌ترین نقطه ضعف این روش می‌باشد. بر اساس مطالعات محققین مختلف، کلونینگ ژن هدف در پلاسمید و سپس تهیه رقت‌های سریال از آن و انجام PCR یکی از بهترین روش‌های تعیین LOD می‌باشد، بنابراین در مطالعه حاضر نیز از این روش استفاده گردید.

روش‌های تشخیصی *Y.pestis* بر اساس روش PCR بر روی کک ناقل بیماری (۲۳)، موش آلوده و کشت‌های باکتریایی (۲۴، ۲۵) نیز انجام شده است. بیشتر این روش‌ها بر اساس موقعیت و محل قرارگیری ژن‌های مهم پلاسمیدهای pFra و pPst می‌باشد. اما برخی از گونه‌های *Y.pestis* که در طبیعت وجود دارند، پلاسمید pFra را از دست داده‌اند ولی کماکان جزو گونه‌های وحشی و بیماری‌زا مطرح می‌باشند و می‌توانند در تشخیص بیماری موارد منفی کاذب را ایجاد کنند (۱۲). لذا در مطالعه حاضر، روش مالتیپلکس که بر اساس دو ژن پلاسمیدی *caf1, pla* و ژن کروموزومی *irp2* پایه‌گذاری شد می‌تواند تا حد زیادی بر این مشکل غلبه نموده و موارد منفی کاذب را به حداقل برساند. تسوکانو و همکاران نیز در سال ۱۹۹۶ از روش Multiplex-primers جهت شناسایی *Y.pestis* از سایر گونه‌های پاتوژن Yers-inia و سایر انتروباکتریاسه‌ها استفاده و آن را مفید ارزیابی کردند (۲۶). در سال ۱۹۹۹، المدیا و لیل بر مبنای روش Multiplex-PCR باکتری *Y.pestis* را مورد شناسایی قرار دادند. این محققین طی این مطالعه ۴ ژن بیماری زایی *irp2, caf1, pla* و lcrV را در نمونه‌های بالینی و انواع سویه‌های وحشی و غیروحشی باکتری مطالعه کردند و نشان دادند که با به‌کارگیری روش Multiplex، تمام موارد منفی کاذب از مطالعه حذف خواهد شد (۱۲). بنابراین روش Multiplex نسبت به روش Uniplex نه تنها کم هزینه‌تر و سریع‌تر می‌باشد بلکه موارد منفی کاذب را نیز به طور کامل حذف خواهد کرد.

بر خلاف کنترل نسبی بیماری طاعون، هم اکنون در بسیاری از مناطق دنیا کانون‌های طاعون خیز به طور طبیعی وجود دارد. در کشور ما نیز در حال حاضر کانونی تحت عنوان کانون طاعون خیز کردستان وجود دارد. به طور کلی در چنین کانون‌هایی، باکتری توسط کک‌های ناقل بین جوندگان دارای مقاومت نسبی به بیماری

طاعون در حال انتقال است و یک انزیوسی به وجود می‌آورد. هرگاه انتقال باکتری به جوندگان حساس به این بیماری رخ دهد باعث بروز یک اپیزیوسی می‌گردد که با مرگ و میر فراوان جوندگان همراه است. وقوع اپی‌زیوسی از لحاظ ایجاد شرایط مناسب برای رخداد یک اپیدمی در بین جمعیت انسانی اهمیت دارد. از سویی قابلیت این باکتری در انتقال عفونت از طریق آیروسل‌های آلوده، در به کارگیری در سلاح‌های بیولوژیک مدت‌هاست مورد توجه قرار گرفته است و طبق طبقه‌بندی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در آمریکا (Center for Disease Control and Pervention; CDC)، در دسته A عوامل بیولوژیک مهم از نظر بیوتروریسم قرار می‌گیرد. از خصوصیات این دسته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: آسانی انتقال از انسان به انسان، نرخ مرگ و میر بالا، فشار بالا بر سیستم‌های بهداشتی- پزشکی، ایجاد فشار روحی - روانی شدید بر افکار عمومی و نیاز به آمادگی بالا برای مقابله با آنها. با توجه به نکاتی نظیر توان بالقوه باکتری در استفاده جهت اهداف بیوتروریستی و احتمال وقوع اپیزیوسی و اپیدمی در کانون‌های طاعون خیز، لزوم آشنایی با روش‌های تشخیص سریع و حساس باکتری به طور کامل محسوس است. اگر چه روش‌های معمول باکتریولوژیک همچون کشت معمول ارگانیسم، استاندارد طلایی و جزو روش‌های رایج برای تشخیص باکتری می‌باشند (۱۰)، اما از آنجا که به تقریب رشد ارگانیسم به آهستگی می‌باشد و از طرفی قرار گرفتن عامل در کاتگوری A عوامل بیولوژیک، شرایط کشت آن را محدود به آزمایشگاه‌های دارای ایمنی زیستی سطح ۳ می‌کند (۱۰، ۱۱). وقت‌گیر و پرخطر و پرهزینه بودن روش‌های معمول تشخیصی سبب شده است که بررسی روش‌های تشخیص مولکولی سریع جهت شناسایی عامل مورد هدف این مطالعه قرار گیرد. اهمیت این موضوع به خصوص پس از وقایع یازده سپتامبر، موجب علاقه‌مندی زیاد متخصصین در زمینه طراحی روش‌های تشخیص سریع باکتری گردیده است که این واقعیت با مشاهده افزایش مقالات منتشر شده در این زمینه در چند سال اخیر روشن می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که در حال حاضر در ایران هیچ ارگان و سیتم بهداشتی و یا نظامی اقدام به پایش مناطق آلوده و تحت خطر با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی ننموده است و هیچ روش تنظیم شده‌ای در این زمینه ارایه نشده است، این مطالعه می‌تواند در فراهم نمودن ابزار تشخیص مولکولی مناسب برای ارزیابی جوندگان و ککک‌های آلوده به منظور پایش مناطق تحت خطر بسیار موثر باشد و مناطق تحت خطر را حتی برای ردیابی از نظر ایجاد یک اپیزیوسی کنترل و مراقبت کند. از طرفی روش‌های طراحی شده در این مطالعه، ابزاری دقیق، سریع و کم هزینه برای جست‌وجو، تشخیص و ردیابی این باکتری در موارد استفاده عمدی از آن مانند عملیات بیوتروریسمی یا جنگ‌های میکروبی فراهم می‌نماید.

تقدیر و تشکر

انجام این طرح با حمایت مالی ارتش جمهوری اسلامی ایران صورت گرفته است و نویسندگان مقاله از کلیه فرماندهان مربوطه سپاسگزاری و تشکر می کنند. همچنین، نویسندگان از آقایان دکتر نورایر پیازک از بخش انگل شناسی انستیتو پاستور ایران و دکتر کیهان آزادمنش از بخش هپاتیت انستیتو پاستور ایران که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می کنند.

References

1. Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, McClain DJ, Hoover DL, Bryne WR, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. JAMA. 1997; 278: 399-411.
2. Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. JAMA. 2000; 283: 2281-2290.
3. Butler T, Plague and Other Yersinia Infections. New York: Plenum Medical Book Company; 1991;112.
4. Hinnebusch J, Cherepanov P, Du Y, Rudoplh A, Dixon JD, Schwan T, Forsberg A. Murine toxin of Yersinia pestis shows phospholipase D activity required for virulence in mice. Int J Med Microbiol. 2000; 290: 483-487.
5. Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic diseases caused by Yersinia. Clin Microbiol Rev.1991; 4: 309-324.
6. Henderson DA. The looming threat of bioterrorism. Science. 1999; 283: 1279-1282.
7. Kortepeter MG, Parker GW. Potential biological weapons threats. Emerg Infect Dis 1999; 5: 523-527.
8. Perry RD, Fetherston JD. Yersinia pestis-etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 35-66.
9. Saebi E. Infectious diseases. Iran: Rouzbahan press; 1994; 78-94.
10. Cavanaugh DC. Plague manual. Geneva: World Health Organization; 1976; 50-55.
11. Fong IW, Alibek K. Bioterrorism and infectious Agents: A new dilemma for the 21st century. New York: Springer; 2005; 52.
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(6): 339-342.
13. Wilmoth BA, Chu MC, Quan TJ. Identification of Yersinia pestis by BBL Crystal Enteric / Nonfermentor Identification System. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2829-2830.
14. O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceas and other aerobic gram-negative bacilli. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 147-162.
15. Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M, Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. J Clin Microbiol. 2000; 38: 260-263.
16. Butler T. Yersinia infections: Centennial of the discovery of the plague bacillus. Clin Infect Dis. 1994; 19: 655-661.
17. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of Yersinia pestis. Clin Microbiol Rev. 2004; 17: 434-464.
18. Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of Bacillus spp., Escherichia coli, Salmonella spp. Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridiza-

tion. Int J Food Microbiol. 2006; 107(2): 131-137.
19. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manul. New York: Cold spring harbour Lab. press, plainview; 2001; 1-3.
20. Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM, Protsenko OA. Plasmid content in Yersinia pestis strains of different origin. FEMS Microbiol Lett. 1990; 67: 45-48.
21. Neubauer H, Meyer H, Prior J, Aleksic S, Hensel A, Splettstosser W. A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of Yersinia pestis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2000; 47: 573-580.
22. Hinnebusch J, Schwan TG. New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect Yersinia pestis in fleas. J clin Microbiol. 1993; 31: 1511-1514.
23. Engelthaler DM, Gage KL, Montenieri JA, Chu M, Carter LG. PCR detection of Yersinia pestis in fleas: comparison with mouse inoculation. J clin Microbiol; 1999: 1980-1984.
24. Campbell J, Lowe J, Walz S, Ezzel J. Rapid and specific identification of Yersinia pestis by using a nested polymerase chain reaction procedure. J clin Microbiol. 1993; 31: 758-759.
25. Norkina OV, Kulichenko AN, Ginisburg AL, Tuchkov IV, Popov YuA, Aksenov MU, et al. Development of a diagnostic test for Yersinia pestis by the polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol. 1994; 76: 240-245.
26. Tsukano H, Itoh K, Suzuki S, Watanabe H. Detection and identification of Yersinia pestis by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers. Microbiol. Immunol. 1996; 40: 773-775.