Journal of Police Medicine

Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 77-84

Original Article

Rapid Detection of Vibrio Cholerae Using Hexaplex PCR Assay

Received: 2 June 2014 **Revised:** 30 Agust 2014 **Accepted:** 7 September 2014

ABSTRACT

Background: Vibrio cholerae is an important agent of diarrheal diseases in many parts of Asia and Africa. It is an enteric pathogen which produce a global pandemic of the disease. Rapid, sensitive and specific measurement of V. cholerae is an interest for many clinical laboratories. The aim of this study was to design and develop a hexaplex PCR assay for rapid detection of V. cholerae.

Materials and Methods: Six pair of primers were designed for specific amplification of the virulence and regulatory genes for Vibrio cholerae O_1: cholera toxin enzymatic subunit A (ctxA) and B (ctxB), zonula occludens toxin (zot), accessory cholerae enterotoxin (ace), toxin- coregulated pilus (tcp) and outer membrane protein (ompW). Hexaplex PCR carried out using six primers and standard genes. Moreover, sensitivity and specificity of this method were determined.

Results: Hexaplex PCR showed the presence of the virulence and regulatory genes for Vibrio cholerae O_1 in the standard sample. In addition, specificity was qualified and sensitivity determined 100 cfu/ml in this method.

Conclusion: Hexaplex PCR Assay could be used to design a kit for cholerae detection.

Keywords: vibrio cholerae, PCR, detection, specificity, sensitivity

Mehdi Zeinoddini[1*]
Ali Reza Saeedinia[2]
Vahid Sadeghi[3]

[1]Assistant Professor, Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[2]PhD Student, Molecular Genetic, Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[3]MSc, Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Mehdi Zeinoddini
Tel: (+98)2122974600

e-mail: zeinoddini@yahoo.com

تابستان ۱۳۹۳ – دوره ۳ – شماره ۲– صفحات ۷۷-۸۴

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

شناسایی سریع باکتری ویبریو کلرا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شش‌گانه (Hexaplex PCR)

تاریخ دریافت: ۱۲ خرداد ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۸ شهریور ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۶ شهریور ۱۳۹۳

چکیده

مهدی زین‌الدینی[1*]
علی‌رضا سعیدی نیا[2]
وحید صادقی[3]

مقدمه: ویبریو کلرا (عامل بیماری وبا) یک پاتوژن مهم در بروز بیماری اسهال در بخش های گسترده‌ای از آسیا و آفریقا است. این باکتری یک پاتوژن روده‌ای است که می‌تواند سبب بروز بیماری همه‌گیر گردد. درنتیجه تشخیص سریع، حساس و اختصاصی ویبریو کلرا، مورد توجه اکثر آزمایشگاه‌های تشخیصی است. هدف از این پژوهش، طراحی و توسعه یک روش سنجش سریع ژنوم باکتری ویبریو کلرا بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شش‌گانه (Hexaplex PCR) است.

مواد و روش‌ها: پرایمر جهت شناسایی شش ژن بیماری‌زا و تنظیمی از باکتری ویبریو کلرا انجام شد. ژن‌های مذکور شامل ژن‌های کلرا توکسین زیر واحدهای A و B (ctxA, ctxB)، توکسین zot، انتروتوکسین کلرا (ace)، توکسین تنظیمی (tcp) و پروتئین غشاء خارجی (ompW) است. ژنوم نمونه استاندارد، با استفاده از پرایمرهای مذکور در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شش‌گانه، مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین حساسیت و اختصاصیت سنجش مذکور نیز ارزیابی شد.

یافته‌ها: انجام PCR شش‌تایی، حضور ژن‌های بیماری‌زا و تنظیمی باکتری ویبریو کلرا را در نمونه استاندارد نشان داد. همچنین نتایج بیانگر اختصاصیت مناسب روش بوده و حساسیت آن تا حدود cfu ۱۰۰ از باکتری محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شش‌گانه می‌توان برای طراحی کیت تشخیصی عامل بیماری وبا استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: ویبریو کلرا، PCR، شناسایی، حساسیت، اختصاصیت

[1]استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
[2]دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، مربی، پژوهشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
[3]کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
مهدی زین الدینی
تلفن: ۲۱۲۲۹۷۴۶۰۰(۹۸+)
پست الکترونیک:
zeinoddini@yahoo.com

مقدمه

وبا یک بیماری است که با اسهال ملایم تا شدید همراه بوده و در صورت عدم تشخیص به موقع مرگ و میر زیادی را در پی دارد. عامل این بیماری باکتری ویبریوکلرا[1] است. این بیماری در مناطق آسیا و ازجمله کشور ایران بصورت بومی وجود دارد و گاهی بصورت اپیدمی ظاهر می‌شود. بیماری وبا چه بصورت پاندمیک و چه بصورت آندمیک طی هزاران سال گذشته زیان‌های جبران‌ناپذیری را به‌وجود آورده است. بااینکه مدیریت بالینی وبا در ۴۰ سال اخیر بهبود یافته ولی بااین‌وجود این بیماری یک تهدید جدی برای کشورهای درحال‌توسعه محسوب می‌شود. این بیماری همیشه از آسیا به قاره‌های دیگر جهان انتشار یافته و تا سال ۱۹۲۳ شش پاندمی از آن در جهان ثبت شده است که بر اساس شواهد موجود عامل ایجادکننده آن‌ها ویبریوکلرا بوده است [۶-۱]. در کشور ایران سویه بومی و قطعی ابتلا، ویبریو کلرای التور و سویه O_1 تأییدشده

[1]: Vibrio cholera

Journal of Police Medicine
Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 77-84

و تاکنون موارد ابتلا به سویه O_{139} گزارش و تأیید نشده است. ازنظر سروتایپ نیز هم نوع اینابا[1] و هم نوع اوگاوا[2] در کشور ثبت شده است که درصد ابتلا به آن‌ها در سال‌های مختلف، متفاوت است. به‌نحوی‌که در سال ۱۳۸۴ همزمان با اپیدمی بزرگ سال ۱۳۸۴، اولین مورد وبای کشور از دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با سروتایپ اوگاوا و همزمان در شهرستان چابهار، بیماری با سروتایپ اینابا رخ داد و در شهرهای قم و جنوب غرب تهران و کرج نیز در این زمان با سروتایپ اینابا گزارش شده است. لذا هر دو سروتایپ اوگاوا و اینابا در کشور تاکنون مشاهده شده است [۷].

امروزه روش‌های تشخیصی و کیت‌های متعددی برای شناسایی ویبریو کلرا مطرح است. روش‌های کشت سلولی از روش های قدیمی هستند که هنوز نیز کاربرد دارد ولی برخی از کیت های تشخیصی علیه توکسین کلرا و برخی دیگر بر علیه لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتری طراحی شده است [۱۰-۸]. این روش ها اغلب زمان‌بر بوده و نیاز به دوره نگهداری یا کشت طولانی مدت دارد. همچنین باکتری ویبریو می‌تواند وارد یک مرحله زندگی بدون قابلیت کشت سلولی[3] (VBNC) گردد که شناسایی آن را پیچیده‌تر می‌کند. به همین دلیل است که برخی روش‌های کشت سلولی در خصوص نمونه‌های استخراجی از آب یا غذای آلوده، منجر به شکست می‌شوند [۱۱]. بر این اساس محققین استفاده از روش‌های مولکولی را برای شناسایی باکتری ویبریو کلرا توصیه می‌کنند. در این زمینه مقالات متعددی وجود دارد که با استفاده از PCR تکی (منوپلکس[4]) یا چندگانه (ملتی پلکس[5])، توانسته‌اند ژنوم باکتری را در کوتاه‌ترین زمان شناسایی نمایند [۱۴-۱۲]. محققین توانسته‌اند با استفاده از روش PCR تکی روی اپرون توکسین کلرا (ctxAB)، آلودگی مواد غذایی به باکتری ویبریو کلرا O_1را در محدوده ۱ cfu بر ۱۰ گرم وزن ماده غذایی، شناسایی نمایند [۱۲]. همچنین از این روش برای شناسایی اپیدمی کلرا که در ژانویه ۱۹۹۱ در پرو ایجاد و در عرض کمتر از ۸ ماه به کل آمریکای لاتین گسترش یافت نیز استفاده شد. در این روش، PCR تکی بر روی ctx A طراحی و انجام گردید [۱۳]. با توجه به اهمیت شناسایی چند فاکتور ژنی باکتری ویبریو کلرا، از روش PCR چندگانه، به‌منظور شناسایی همزمان فاکتورهای مختلف تأثیرگذار در بیماری‌زایی باکتری و تفکیک آن از نمونه‌های غیر بیماری‌زا استفاده شده است [۱۳].

در مطالعه حاضر به‌منظور طراحی و توسعه یک روش تشخیصی سریع و ساده، ما یک سنجش زنجیره‌ای پلیمراز شش تایی (Hexaplex PCR) را راه‌اندازی کردیم تا در آن ژن‌های بیماری زا و تنظیمی باکتری (شامل ctxA، ctxB، zot، ace، tcp، ompW) مورد شناسایی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و استخراج DNA

ویبریو کلرا O_1 سویه اینابا[6]، سالمونلا تیفی[7]، E. coli انتروتوکسیژنیک[8] و آئروموناس هیدروفیلیا[9]، از آزمایشگاه مرجع ایران (بیمارستان بوعلی) تهیه شدند. همه نمونه‌های باکتری در شرایط هوازی و در محیط کشت تجاری LB، رشد داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از سانتریفیوژ (۹۰۰۰ rpm، به مدت ۳ دقیقه) رسوب داده شدند. درنهایت نیز با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Bioneer)، ژنوم آن استخراج گردید.

طراحی پرایمر و PCR تکی[10]

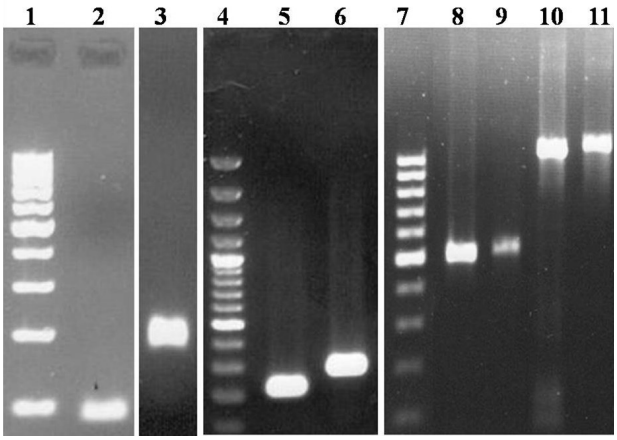
شش جفت پرایمر برمبنای مناطق مشخص و غیر همسان بین ژنی، با استفاده از بانک‌های ژنی و نرم‌افزار Gene Runner، طراحی گردید (جدول ۱) و برای سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در این تحقیق.

نام پرایمر	ژن هدف	ترادف	اندازه قطعه تکثیر یافته (bp)
M1	aceA	5'CTTTATGACTGGCTAATTGATGG3' 5'CAAAGCCTGAAGCACGATAG3'	۲۳۷
M2	tcp	5'ATTCTTGGTGATCTCATGATAAGG3' 5'TTAATTCACCACAAATATCTGCC3'	۲۹۵
M3	ctxA	5'GGTCTTATGCCAAGAGGACAG3' 5'CGTCTGAGTTCCTCTTGCATG3'	۹۰
M4	ctxB	5'CTATCATTACTTTTAAGAATGGTGC3' 5'CATACTAATTGCGGCAATCG3'	۱۹۱
M5	ompW	5'CTGTATTTGCTCACCAAGAAGG3' 5'TTGGCATACCACACAGAAGC3'	۴۹۸
M6	zot	5'CATCATCACGAATGTGCGAG3' 5'CACCACAAAGTGATTGAAATCC3'	۱۰۰۶

1: Inaba, 2: Ogawa, 3: Viable but no culturable, 4: Monoplex, 5: Multiplex, 6: Inaba, 7: Salmonella thyphi, 8: E. coli of enterotoxigenic, 9: Aeuromonas hydrophilia, 10: Monoplex PCR

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۳ – دوره۳ – شماره ۲– صفحات ۷۷-۸۴



شکل ۱: آنالیز محصول PCR تکی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز رنگ‌شده با اتیدیوم بروماید. (۱ و ۴ و ۷) مارکر وزنی DNA، ۱۰۰ bp، (۲) محصول PCR تکی با پرایمرهای M3، (۳) محصول PCR تکی با پرایمرهای M4، (۵) محصول PCR تکی با پرایمرهای M1، (۶) محصول PCR تکی با پرایمرهای M2، (۸ و ۹) محصول PCR تکی با پرایمرهای M5، (۱۰ و ۱۱) محصول PCR تکی با پرایمرهای M6.

شد. پس از سنتز پرایمرها، PCR تکی با هر جفت پرایمری، در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری و به شکل زیر صورت گرفت: DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر معادل ۸۵ ng/µl، بافر PCR (1X)، ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای فوروارد و ریورس، ۱ میکرولیتر معادل ۰/۵ µM، $MgCl_2$ معادل ۱/۵ mM، dNTP معادل ۲ mM و آنزیم پلیمراز Taq، معادل ۰/۵ U (مواد لازم برای انجام PCR نیز از شرکت فرمانتاز تهیه گردید). در برنامه سیکل‌های دمایی نیز واسرشتگی اولیه ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و در ادامه در ۳۵ چرخه واکنش، واسرشتگی[1] ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال[2] ۵۷/۵ °C به مدت ۱ دقیقه و توسعه قطعات[3] ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه، استفاده گردید. توسعه نهایی قطعات نیز ۷۲ °C به مدت ۸ دقیقه به‌کار برده شد. پس از انجام PCR نیز محصولات به‌دست‌آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد موردبررسی قرار گرفت.

PCR شش‌تایی

جهت PCR شش‌تایی نیز مشابه شرایط واکنش و برنامه ارائه‌شده در خصوص PCR تکی مراحل انجام شد با این تفاوت که هر شش جفت پرایمر در یک واکنش و میکروتیوپ استفاده شدند. در این فاز، مقادیر $MgCl_2$ و dNTP ۶ برابر و مقدار آنزیم پلیمراز ۳ برابر بودند.

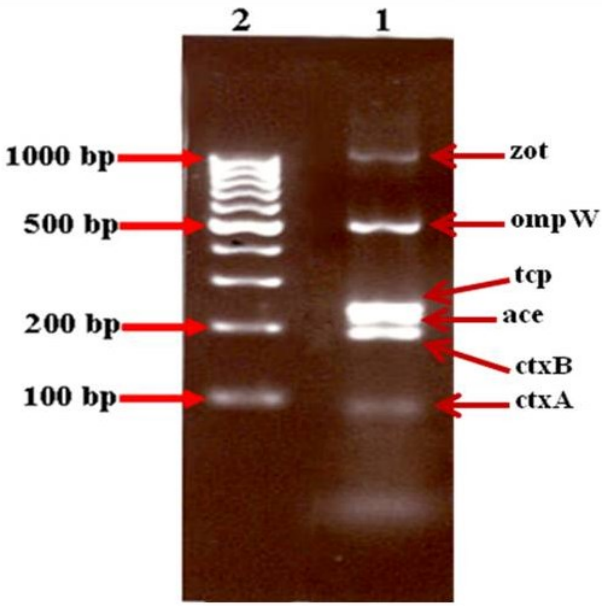
یافته‌ها

ویژگی PCR

با توجه به اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی‌شده، عملکرد PCR تکی برای تک‌تک ژن‌های مورد آزمایش مطلوب بود (شکل ۱). پس از اطمینان از صحت هر جفت از پرایمرها، PCR شش‌تایی بر اساس روش ارائه‌شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد و نتایج آن روی ژل آگارز ۱ درصد موردبررسی قرار گرفت (شکل ۲). تکثیر قطعات ۹۰، ۱۹۱، ۲۳۷، ۲۹۵، ۴۹۸، ۱۰۰۶ جفت بازی بیانگر حضور ژن‌های ctxA، ctxB، aceA، tcp، ompW و zot به ترتیب، در نمونه‌های مورد آزمایش است.

ارزیابی حساسیت و اختصاصیت PCR شش‌تایی

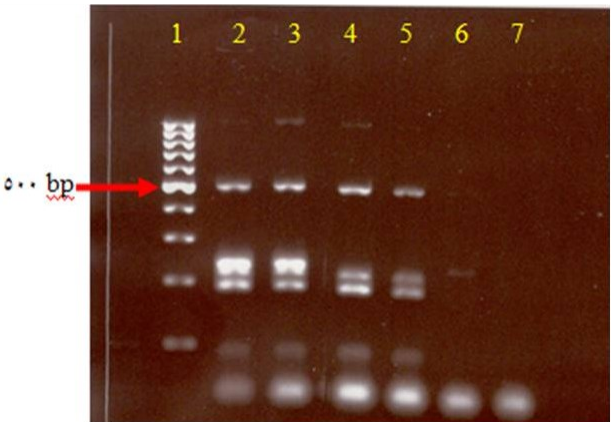
واکنش PCR شش‌تایی جداگانه برای بررسی حساسیت و اختصاصیت روش انجام شد. برای ارزیابی حساسیت روش DNA ژنومیک باکتری ویبریو کلرا (سویه اینابا)، از ۱۷۰ نانوگرم تا ۱۷ پیکوگرم، رقیق شد و به‌عنوان الگو در واکنش مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام PCR محصولات به‌دست‌آمده روی ژل آگارز بررسی شد. مطابق شکل ۳ و انجام واکنش کدورت سنجی استاندارد مک فارلند[4]، حساسیت روش ۱۰۰ cfu/ml[5] تخمین زده شد. لازم به توضیح است که در این آزمایش از استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد و پس از کشت باکتری، کدورت سنجی، استخراج ژنومی و تعیین غلظت ژنومی به‌صورت فوتومتری، معادل‌گیری آن با تعداد کلنی تشکیل‌شده از سوسپانسیون باکتری (cfu) محاسبه گردید [



شکل ۲: آنالیز محصول PCR شش‌تایی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز رنگ‌شده با اتیدیوم بروماید. (۱) محصول PCR شش‌تایی (قطعات تکثیرشده به ترتیب عبارت‌اند از: ctxA:۹۰ بازی، ctxB:۱۹۱ بازی، aceA:۲۳۷ بازی، tcp:۲۹۵ بازی، ompW:۴۹۸ بازی، zot:۱۰۰۶ بازی) ، (۲) مارکر وزنی DNA، ۱۰۰ bp.

[1:] Denaturation, [2:] Annealing, [3:] Extension, [4:] McFarland reaction, [5:] Colony Formation Unit

Journal of Police Medicine
Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 77-84



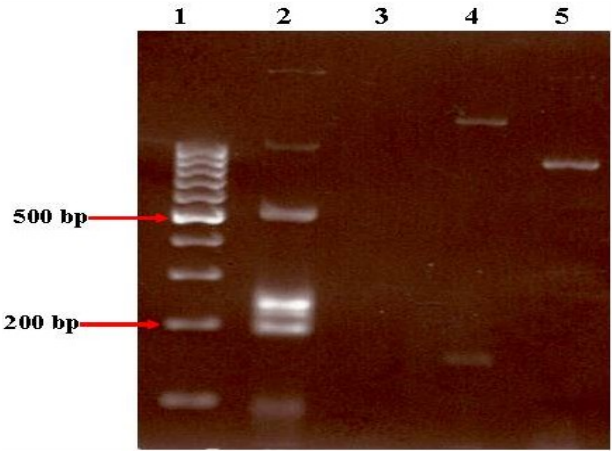
شکل ۳: آنالیز حساسیت PCR شش‌تایی. (۱) مارکر وزنی DNA، bp ۱۰۰، PCR با استفاده از ژنوم DNA باکتری اینابا در غلظت‌های ۱۷۰ نانوگرم (۲)، ۱۷ نانوگرم (۳)، ۱۷۰ پیکوگرم (۴)، ۸۵ پیکوگرم (۵)، ۳۴ پیکوگرم (۶) و ۱۷ پیکوگرم (۷).

۱۵]. به‌منظور ارزیابی اختصاصیت روش، ۱۷۰ نانوگرم از DNA ژنومی سه باکتری سالمونلا تیفی، E.coli اینتروتوکسیژنیک و آئروموناس هیدروفیلیا با ویبریوکلرا (اینابا)، مورد مقایسه قرار گرفتند. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، واکنش PCR شش‌تایی با ژنوم باکتری ویبریو کلرا مثبت است. حال‌آنکه در خصوص دیگر باکتری‌ها، این واکنش جواب منفی نشان می‌دهد که بیانگر اختصاصیت مطلوب روش است.

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های روده‌ای که باعث بیماری‌های اسهالی می‌شوند هنوز به‌عنوان یک مشکل بزرگ بهداشتی در جهان مطرح هستند. سالیانه بین ۲ تا ۴ میلیارد عفونت اسهالی در کشورهای درحال‌توسعه رخ می‌دهد که از این تعداد بین ۳ تا ۵ میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند. اکثر قربانیان را بچه‌های زیر ۵ سال تشکیل می دهند. هم‌چنین بیماری‌های اسهالی به‌عنوان رایج‌ترین مشکل بهداشتی مسافرین به کشورهای درحال‌توسعه است. بیش از نیمی از موارد بیماری‌های اسهالی توسط باکتری‌هایی ایجاد می‌شود که یک یا چند انتروتوکسین تولید می‌کنند. در این میان، ویبریوکلرا شدیدترین بیماری را ایجاد می‌کند [۶-۱].

روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، PCR-ELISA و روش دورگه‌سازی[1] قادر است ژنوم باکتری را در کوتاه‌ترین زمان و بهترین کارایی، شناسایی نماید. در این میان تکنیک PCR به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به کار برده شده است. در اغلب موارد این آزمون از سرعت، اختصاصیت و حساسیت بالاتری نسبت به سایر روش‌های مرسوم برخوردار است و محققین زیادی روش PCR را جهت تشخیص و شناسایی ویبریو کلرا به‌کاربرده اند [۱۴-۱۲]. شیرای[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۱ از روش PCR برای شناسایی اپرون انتروتوکسین کلرا استفاده نمودند که محدوده تشخیصی روش ۱ پیکوگرم DNA یا ۳ سلول زنده بود [۱۶]. بلتنی[3] و همکارانش در سال ۲۰۱۲ از روش PCR آنی و NASBA برای شناسایی آلودگی آب به باکتری استفاده کردند که حد تشخیصی آن را ۱ cfu ارزیابی کردند [۱۷]. Chow و همکارانش در سال ۲۰۰۱ از ژن توکسین RTX ویبریو کلرا به‌منظور شناسایی ۱۶۶ نمونه کلینیکی ویبریو کلرا استفاده نمودند. البته در این روش در مورد حد تشخیصی، مطلبی ارائه نشده است [۹]. Islam و همکارانش در سال ۲۰۰۴ از روش PCR همراه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (MAbs) علیه ویبریو کلرا O_1 و O_{139} استفاده نمودند. حد تشخیص در این روش برای ویبریو کلرا O_{139}، ۱۰ باکتری ارزیابی شد درحالی‌که برای سویه اوگاوا ۱۰۰ باکتری و برای سویه اینابا ۱۰۰۰ باکتری در مدت زمان ۲۴ ساعت بود [۱۸]. Yamazaki و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش ایزوترمال LAMP[4] یک سیستم تشخیص آنی و سریع برای ویبریوکلرا ارائه دادند که بر اساس اطلاعات ارائه‌شده حد تشخیصی آن ۱/۴ cfu گزارش شد [۱۹]. از سوی دیگر روش های PCR چندگانه[5]، برای شناسایی همزمان چند فاکتور ژنی باکتری در یک‌زمان، نیز موردتوجه محققین قرار دارد. تحقیقات زیادی با این روش برای شناسایی ویبریوکلرا تاکنون انجام شده است [۲۴-۲۰ و ۱۴]. در سال ۲۰۰۲، سینف[6] و همکارانش یک روش PCR شش‌تایی را برای شناسایی ویبریو کلرا ارائه دادند که ژن‌های مورد شناسایی در آن، ctxA، zot، ace، tcpA، ompU و toxR،



شکل ۴: آنالیز اختصاصیت PCR شش‌تایی. (۱) مارکر وزنی DNA، bp ۱۰۰، PCR با استفاده از ژنوم DNA باکتری ویبریو کلرا سویه اینابا (۲)، باکتری سالمونلا تیفی (۳)، E.coli اینتروتوکسیژنیک (۴) و آئروموناس هیدروفیلیا (۵).

[1]: Hybridization, [2]: Shirai, [3]: Blatny, [4]: Loop mediated isothermal amplification, [5]: Multiplex PCR, [6]: Singh

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۳ - دوره۳ - شماره ۲- صفحات ۷۷-۸۴

بودند حال‌آنکه ما در این تحقیق از ژن هـای ctxB و ompW به‌جای ompU و toxR استفاده نمودیم [۱۴]. در سـال ۱۳۹۲ فولادی و همکاران، واکنش تریپلکس را برای شناسایی همزمان سه ژن ctxA، ctxB و zot مورد استفاده قراردادند. در این تحـقـیـق حساسیت روش ۱۰ کپی ژنی محاسبه گردید [۲۴]. ما در این تحقیق تلاش کردیم با افزایش همزمان ژن‌های قابل‌شناسایی به ۶ ژن (ctxA، ctxB، zot، ace، tcpA و ompW) و (ضمن افـزایـش اختصاصیت روش شناسایی، بتوانیم حساسیت مطلوبی را نیز ایـجـاد نماییم. با توجه به اینکه انتروتوکسین ace، فاکتور کلونـیـزاسـیـون tcpA و پروتئین غشایی ompW (که دارای خاصیت ایمونوژنیـک بالایی است)، از ژن‌های کلیدی در باکتری ویبریوکلرا هستنـد، لـذا شناسایی همزمان آن‌ها به همراه سه ژن اول، سـبـب افـزایـش اختصاصیت روش شناسایی خواهد شد.

لازم به توضیح است که راه‌اندازی روش PCR شش‌تایی هرچند در تفکیک سویه‌های بیماری‌زا از غیر بیماری‌زا کمک زیادی می‌کند و سبب افزایش اختصاصیت روش می‌گردد، ولی با توجه با تـکـثـیـر همزمان شش قطعه ژنی، حساسیت روش را نسـبـت بـه PCR سه‌تایی، کاهش می‌دهد. بر این اساس محققین تـلاش کـرده انـد معایب روش‌های پیشین را برطرف نمایند ولی تلاش بـرای ابـداع روش‌های جدیدی که در آن برخی از معایب روش هـای قـبـلـی برطرف شده باشد و یا نسبت به روش‌های قبلی از اختـصـاصـیـت، حساسیت و سرعت عمل بهتری برخوردار باشد، پیوسـتـه مـدنـظـر محققین قرار دارد. ما در این تحقیق از روش PCR شش‌تایی کـه همزمان بتواند ۶ ژن بیماری‌زا و تنظیمی باکتری را شناسایی کـنـد، استفاده کردیم که علاوه بر راه‌اندازی روش، توانسته است حساسیت (تا ۱۰۰ cfu) و اختصاصیت مطلوبی را نیز نشان دهـد. بـه نـظـر می‌رسد می‌توان از این روش در مطالعات آتـی جـهـت طـراحـی کیت‌های تشخیصی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

پژوهش فوق در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتـی مالک اشتر انجام گرفته است و بودجه آزمایش‌های فوق از سـوی این دانشگاه تأمین شده است؛ بنابراین جا دارد تا از زحمات مسئولین این دانشگاه سپاسگزاری گردد.

منابع

1. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 48-86.
2. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Text book of diagnostic microbiology. 4th ed. New York: Saunders 2010.
3. Singleton P. Bacteria: in biology, biotechnology and medicine. 5th ed. John Wiley & Sons 1999.
4. Mandell G, Dolin R, Bennett J, Mandell GL, Bennett J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed, Elsevier; Churchill Livingstone, New York 2004: 2536-44.
5. Heyman D. Control of Communicable Diseases Manual. American Public Health Association. Washington, DC 2004: 100-8.
6. Lima AAM. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. Curr Opin Infect Dis 1994; 7: 592-601.
7. Zahraei SM, Afshani Naghade MT, Soroush M, Masoumiasl H, Javanmard A, Safarei MH. Survey on cholera epidemic in Iran - 2004. Iran J Infect Dis Trop Med 2004; 12: 1-4. (Persian)
8. Almeida R, Hickman-Brenner F, Sowers E, Puhr N, Farmer J, Wachsmuth I. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. J Clin Microbiol 1990; 28: 128-30.
9. Chow K, Ng T, Yuen K, Yam W. Detection of RTX toxin gene in Vibrio cholerae by PCR. J Clin Microbiol 2001; 39: 2594-7.
10. Carillo L, Gilman R, Mantle R, Nunez N, Watanabe J, Moron J, et al. Rapid detection of Vibrio cholerae O1 in stools of Peruvian cholera patients by using monoclonal immunodiagnostic kits. Loyaza Cholera Working Group in Peru. J Clin Microbiol 1994; 32: 856-7.
11. Colwell RR, Brayton P, Herrington D, Tall B, Huq A, Levine MM. Viable but non-culturable Vibrio cholerae O1 revert to a cultivable state in the human intestine. World J Microbiol Biotechnol 1996; 12: 28-31.
12. 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: 556-60.
13. Fields P, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol 1992; 30: 2118-21.
14. Singh D, Isac SR, Colwell R. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. J Clin Microbiol 2002; 40: 4321-4.

Journal of Police Medicine
Summer 2014; Vol. 3, No. 2: 77-84
15.McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA-J Am Med Assoc 1907; 49: 1176-8.
16.Shirai H, Nishibuchi M, Ramamurthy T, Bhattacharya S, Pal S, Takeda Y. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of Vibrio cholerae. J Clin Microbiol 1991; 29: 2517-21.
17.Fykse EM, Nilsen T, Nielsen AD, Tryland I, Delacroix S, Blatny JM. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of Vibrio cholerae in ballast water. Mar Pollut Bull 2012; 64: 200-6.
18.Islam MM, Kabir MG, Moly PK, Islam A, Rakib MA. Detection of Vibrio cholerae O1 and O139 serogroups directly from stool specimens by combined immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. Pakistan J Biol Sci 2004; 7: 1654-9.
19.Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing Vibrio cholerae using loop-mediated isothermal amplification. Methods Mol Biol 2011; 739: 13-22.
20.Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamamoto S, et al. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic Vibrio spp., Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and Vibrio vulnificus. Mol Cell Probes 2011; 25: 174-6.
21.Kumar P, Peter WA, Thomas S. Rapid detection of virulence-associated genes in environmental strains of Vibrio cholerae by multiplex PCR. Curr Microbiol 2010; 60: 199-202.
22.Bauer A, Rorvik LM. A novel multiplex PCR for the identification of Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus. Lett Appl Microbiol 2007; 45: 371-5.
23.Mehrabadi JF, Morsali P, Nejad HR, Imani Fooladi AA. Detection of toxigenic Vibrio cholerae with new multiplex PCR. J Infect Public Health 2012; 5: 263-7.
24.Mirnejad R, Shoja Sh, Imani Fooladi AA. Use of a Multiplex PCR assay for simultaneous detection of the ctxA, ctxB and zot genes of Vibrio cholerae isolated from patients.Iran J Med Microbiol. 2013; 7: 22-7. (Persian)

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۳ - دوره۳ - شماره ۲- صفحات ۷۷-۸۴