

Rapid Detection of *Vibrio Cholerae* Using Hexaplex PCR Assay

Received: 2 June 2014

Revised: 30 August 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* O₁: 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* O₁ 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 Saeedinia²

Vahid Sadeghi³

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

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

³MSc, 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

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

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

مقدمه: ویبریو کلرا (عامل بیماری وبا) یک پاتوژن مهم در بروز بیماری اسهال در بخش‌های گسترده‌ای از آسیا و آفریقا است. این باکتری یک پاتوژن روده‌ای است که می‌تواند سبب بروز بیماری همه‌گیر گردد. در نتیجه 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 پلیمرز 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 پلیمرز 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 پلیمرز شش‌گانه می‌توان برای طراحی کیت تشخیصی عامل بیماری وبا استفاده نمود.

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

چکیده

مهدی زین‌الدینی^{۱*}
علی‌رضا سعیدی نیا^۲
وحید صادقی^۳

^۱استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
^۲دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، مربی، پژوهشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
^۳کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول:

مهدی زین‌الدینی
تلفن: (+۹۸)۲۱۲۲۹۷۴۶۰۰
پست الکترونیک:
zeinoddini@yahoo.com

مقدمه

به‌وجود آورده است. با اینکه مدیریت بالینی وبا در ۴۰ سال اخیر بهبود یافته ولی با این وجود این بیماری یک تهدید جدی برای کشورهای در حال توسعه 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 ویبریو کلرا بوده است [۶-۱]. در کشور ایران سویه بومی و قطعی ابتلا، ویبریو کلرای التور و سویه O_۱ تأیید شده

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 ویبریو کلرا^۱ است. این بیماری در مناطق آسیا و از جمله 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 زبان‌های جبران‌ناپذیری را

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 ctxA طراحی و انجام گردید [۱۳]. با توجه به اهمیت شناسایی چند فاکتور ژنی باکتری ویبریو کلرا، از روش PCR چندگانه، به منظور شناسایی همزمان فاکتورهای مختلف تأثیرگذار در بیماری‌زایی باکتری و تفکیک آن از نمونه‌های غیر بیماری‌زا استفاده شده است [۱۳].

در مطالعه حاضر به منظور 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 بیماری‌زا و تنظیمی باکتری (شامل ctxA، ctxB، zot، ace، tcp) و ompW مورد شناسایی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و استخراج DNA ویبریو کلرا O₁ سویه اینابا^۱، سالمونلا تیفی^۲، E. coli انتروتوکسیژنیک^۳ و آئروموناس هیدروفیلیا^۴، از آزمایشگاه مرجع ایران (بیمارستان بوعلی) تهیه شدند. همه نمونه‌های باکتری در شرایط هوایی و در محیط کشت تجاری LB، رشد داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از سانتریفیوژ (۹۰۰ rpm، به مدت ۳ دقیقه) رسوب داده شدند. در نهایت نیز با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Bioneer)، ژنوم آن استخراج گردید.

طراحی پرایمر و PCR تکی^۵ شش جفت پرایمر بر مبنای 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

و تاکنون موارد ابتلا به سویه O₁₃₉ گزارش و تأیید نشده است. از نظر سروتایپ نیز هم نوع اینابا^۱ و هم نوع اوگاوا^۲ در کشور ثبت شده است که درصد ابتلا به آن‌ها در سال‌های مختلف، متفاوت است. به‌نحوی که 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].

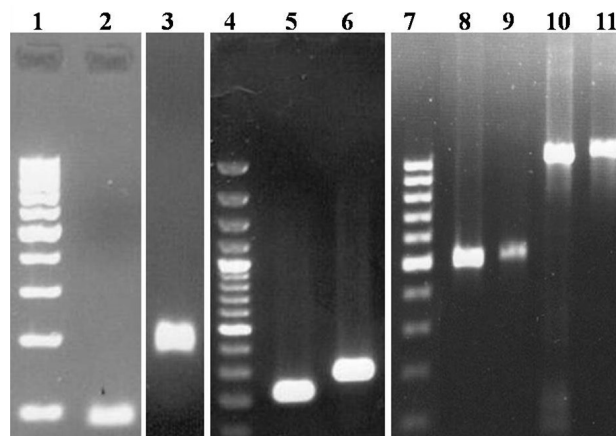
امروزه روش‌های تشخیصی و کیت‌های متعددی برای شناسایی ویبریو کلرا مطرح است. روش‌های کشت سلولی از روش‌های قدیمی هستند که هنوز نیز کاربرد دارد ولی برخی از کیت‌های تشخیصی علیه توکسین کلرا و برخی دیگر بر علیه لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتری طراحی شده است [۸-۱۰]. این روش‌ها اغلب زمان‌بر بوده و نیاز به دوره نگهداری یا کشت طولانی مدت دارد. همچنین باکتری ویبریو می‌تواند وارد یک مرحله زندگی بدون قابلیت کشت سلولی^۳ (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 (مونوپلکس^۴) یا چندگانه (ملتی پلکس^۵)، توانسته‌اند ژنوم باکتری را در کوتاه‌ترین زمان شناسایی نمایند [۱۲-۱۴]. محققین توانسته‌اند با استفاده از روش PCR تکی روی اپرون توکسین کلرا (ctxAB)، آلودگی مواد غذایی به باکتری ویبریو کلرا O₁ را در محدوده ۱ cfu

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده 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'CTATCATTACTTTTAAGAAATGGTGC3' 5'CATACTAATTGCGGCAATCG3'	۱۹۱
M5	ompW	5'CTGTATTTGCTCACCAAGAAGG3' 5'TTGGCATAACCACACAGAAGC3'	۴۹۸
M6	zot	5'CATCATCACGAATGTGCGAG3' 5'CACCACAAAGTGATTGAAATCC3'	۱۰۰۶

با توجه به اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده، 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 ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد و نتایج آن روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). تکثیر قطعات ۹۰، ۱۹۱، ۲۳۷، ۲۹۵، ۴۹۸، ۱۰۰۶ جفت بازی بیانگر حضور ژن‌های *zot*، *ompW*، *tcp*، *aceA*، *ctxB*، *ctxA* 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 و بیبرو کلرا (سویه اینابا)، از ۱۷۰ نانوگرم تا ۱۷ پیکوگرم، رقیق شد و به عنوان الگو در واکنش مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام PCR محصولات به دست آمده روی ژل آگارز بررسی شد. مطابق شکل ۳ و انجام واکنش کدورت سنجی استاندارد مک فارلند^۴، حساسیت روش ۱۰۰ cfu/ml^۵ 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 به صورت فوتومتری، معادل‌گیری آن با تعداد کلنی تشکیل شده از سوسپانسیون باکتری (cfu) محاسبه گردید [



شکل ۱: آنالیز محصول PCR تکی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز رنگ شده 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.

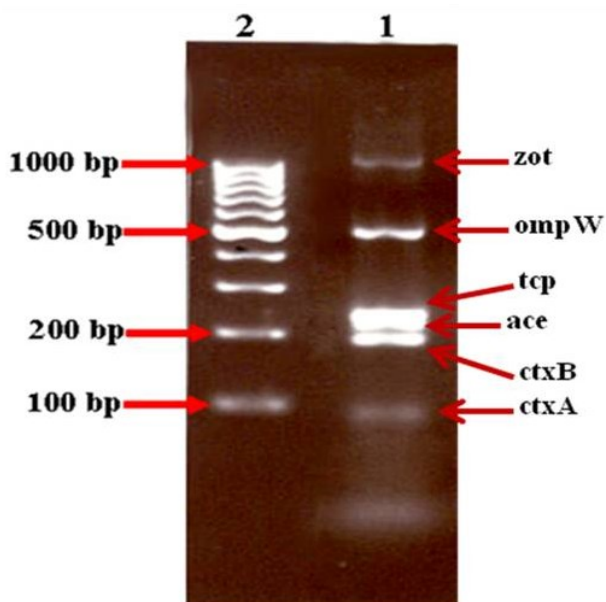
شد. پس از سنتز پرایمرها، PCR تکی با هر جفت پرایمری، در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری و به شکل زیر صورت گرفت: DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر معادل ۸۵ ng/μl بافر PCR (1X)، ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای فوروارد و ریورس، ۱ میکرولیتر معادل ۲ mM dNTP، ۱/۵ mM MgCl₂، ۰/۵ μM آنزیم پلیمرز Taq، معادل ۰/۵ U (مواد لازم برای انجام PCR نیز از شرکت فرمانتاز تهیه گردید). در برنامه سیکل‌های دمایی نیز واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و در ادامه در ۳۵ چرخه واکنش، واسرشتگی^۱ به مدت ۱ دقیقه، اتصال^۲ به مدت ۵/۵ دقیقه و توسعه قطعات^۳ به مدت ۱ دقیقه، استفاده گردید. توسعه نهایی قطعات نیز به مدت ۸ دقیقه به کار برده شد. پس از انجام PCR نیز محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

PCR شش‌تایی

جهت PCR شش‌تایی نیز مشابه شرایط واکنش و برنامه ارائه شده 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 MgCl₂ و dNTP ۶ برابر و مقدار آنزیم پلیمرز ۳ برابر بودند.

یافته‌ها

ویژگی PCR



شکل ۲: آنالیز محصول PCR شش‌تایی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز رنگ شده با اتیدیوم بروماید. (۱) محصول PCR شش‌تایی (قطعات تکثیر شده 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،

سایر روش‌های مرسوم برخوردار است و محققین زیادی روش PCR را جهت تشخیص و شناسایی ویبریو کلرا به کار برده اند [۱۴-۱۲]. شیرای^۲ 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^۳ 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 به منظور 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_۱ و O_{۱۳۹} استفاده نمودند. حد تشخیص در این روش برای ویبریو کلرا O_{۱۳۹}، ۱۰ باکتری ارزیابی شد در حالی که 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^۴ یک سیستم تشخیص آنی و سریع برای ویبریو کلرا ارائه دادند که بر اساس اطلاعات ارائه شده حد تشخیصی آن ۱/۴ cfu گزارش شد [۱۹]. از سوی دیگر روش‌های PCR چندگانه^۵، برای شناسایی همزمان چند فاکتور ژنی باکتری در یک زمان، نیز مورد توجه محققین قرار دارد. تحقیقات زیادی با این روش برای شناسایی ویبریو کلرا تاکنون انجام شده است [۲۴-۲۰] و [۱۴]. در سال ۲۰۰۲، سینف^۶ و همکارانش یک روش PCR شش تایی را برای شناسایی ویبریو کلرا ارائه دادند که ژن‌های مورد شناسایی در آن، *ompU*، *atcpA*، *ace*، *zot*، *ctxA* و *toxR*،



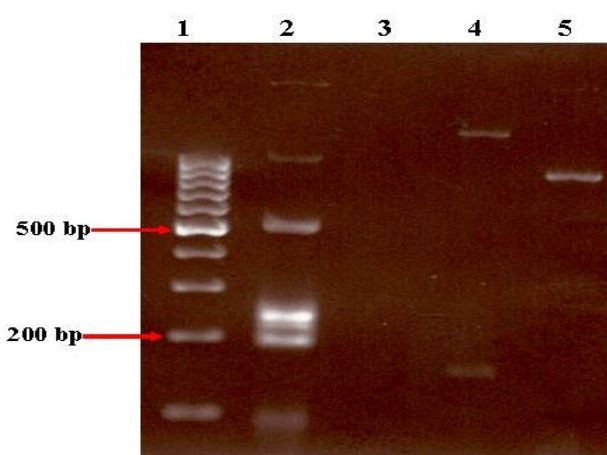
شکل ۳: آنالیز حساسیت PCR شش تایی. (۱) مارکر وزنی DNA، ۵۰۰ bp، ۱۰۰ PCR با استفاده از ژنوم DNA باکتری اینابا در غلظت‌های ۱۷۰ نانوگرم (۲)، ۱۷ نانوگرم (۳)، ۱۷۰ پیکوگرم (۴)، ۸۵ پیکوگرم (۵)، ۳۴ پیکوگرم (۶) و ۱۷ پیکوگرم (۷).

[۱۵]. به منظور ارزیابی اختصاصیت روش، ۱۷۰ نانوگرم از DNA ژنومی سه باکتری سالمونلا تیفی، E.coli اینتروتوکسیژنیک و آئروموناس هیدروفیلیا با ویبریو کلرا (اینابا)، مورد مقایسه قرار گرفتند. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، واکنش PCR شش تایی با ژنوم باکتری ویبریو کلرا مثبت است. حال آنکه در خصوص دیگر باکتری‌ها، این واکنش جواب منفی نشان می‌دهد که بیانگر اختصاصیت مطلوب روش است.

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های روده‌ای که باعث بیماری‌های اسهالی می‌شوند هنوز به عنوان یک مشکل بزرگ بهداشتی در جهان مطرح هستند. سالیانه بین ۲ تا ۴ میلیارد عفونت اسهالی در کشورهای در حال توسعه 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 می‌دهند. همچنین بیماری‌های اسهالی به عنوان رایج‌ترین مشکل بهداشتی مسافین به کشورهای در حال توسعه است. بیش از نیمی از موارد بیماری‌های اسهالی توسط باکتری‌هایی ایجاد می‌شود که یک یا چند انتروتوکسین تولید می‌کنند. در این میان، ویبریو کلرا شدیدترین بیماری را ایجاد می‌کند [۶-۱].

روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، PCR-ELISA و روش دورگه‌سازی^۱ قادر است ژنوم باکتری را در کوتاه‌ترین زمان و بهترین کارایی، شناسایی نماید. در این میان تکنیک PCR به طور موفقیت آمیزی برای شناسایی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به کار برده شده است. در اغلب موارد این آزمون از سرعت، اختصاصیت و حساسیت بالاتری نسبت به



شکل ۴: آنالیز اختصاصیت PCR شش تایی. (۱) مارکر وزنی DNA، ۱۰۰ 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).

- Singleton P. Bacteria: in biology, biotechnology and medicine. 5th ed. John Wiley & Sons 1999.
- 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.
- Heyman D. Control of Communicable Diseases Manual. American Public Health Association. Washington, DC 2004: 100-8.
- Lima AAM. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. *Curr Opin Infect Dis* 1994; 7: 592-601.
- Zahraei SM, Afshani Naghade MT, Soroush M, Masoumiasl H, Javanmard A, Safarey MH. Survey on cholera epidemic in Iran - 2004. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2004; 12: 1-4. (Persian)
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

بودند حال آنکه ما در این تحقیق از ژن های *ctxB* و *ompW* به جای *ompU* و *toxR* استفاده نمودیم [۱۴]. در سال ۱۳۹۲ فولادی و همکاران، واکنش تریپلکس را برای شناسایی همزمان سه ژن *ctxB*، *ctxA* و *zot* مورد استفاده قرار دادند. در این تحقیق حساسیت روش ۱۰ کپی ژنی محاسبه گردید [۲۴]. ما در این تحقیق تلاش کردیم با افزایش همزمان ژن های قابل شناسایی به ۶ ژن (*ctxA*، *ctxB*، *zot*، *ace*، *tcpA* و *ompW*) و (ضمن افزایش اختصاصیت روش شناسایی، بتوانیم حساسیت مطلوبی را نیز ایجاد نماییم. با توجه به اینکه انترتوکسین *ace*، فاکتور کلونیزاسیون *tcpA* و پروتئین غشایی *ompW* (که دارای خاصیت ایمونوژنیک بالایی است)، از ژن های کلیدی در باکتری ویبریوکلرا هستند، لذا شناسایی همزمان آن ها به همراه سه ژن اول، سبب افزایش اختصاصیت روش شناسایی خواهد شد.

لازم به توضیح است که راه اندازی روش PCR شش تایی هر چند در تفکیک سویه های بیماری زا از غیر بیماری زا کمک زیادی می کند و سبب افزایش اختصاصیت روش می گردد، ولی با توجه با تکثیر همزمان شش قطعه ژنی، حساسیت روش را نسبت به PCR سه تایی، کاهش می دهد. بر این اساس محققین تلاش کرده اند معایب روش های پیشین را برطرف نمایند ولی تلاش برای ابداع روش های جدیدی که در آن برخی از معایب روش های قبلی برطرف شده باشد و یا نسبت به روش های قبلی از اختصاصیت، حساسیت و سرعت عمل بهتری برخوردار باشد، پیوسته مدنظر محققین قرار دارد. ما در این تحقیق از روش PCR شش تایی که همزمان بتواند ۶ ژن بیماری زا و تنظیمی باکتری را شناسایی کند، استفاده کردیم که علاوه بر راه اندازی روش، توانسته است حساسیت (تا ۱۰۰ cfu) و اختصاصیت مطلوبی را نیز نشان دهد. به نظر می رسد می توان از این روش در مطالعات آتی جهت طراحی کیت های تشخیصی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

- Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 48-86.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Text book of diagnostic microbiology. 4th ed. New York: Saunders 2010.

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)

