جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۱ ، بهار ۸۵ ۱۳
صفحات: ۴۱ - ۵۰

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

شهرام احمدی* .M.Sc ، میر لطیف موسوی✍ .Ph.D ، رحیم سروری* .Ph.D
جعفر سلیمیان* .M.Sc ، احمد کریمی راهجردی* .M.Sc ، شهرام نظریان* .M.Sc
جعفر امانی* .M.Sc

## چکیــده

**هدف:** ویبریو کلرا سروتایپ o1 عامل وبای اپیدمیک شناخته شده است .همه‌گیری‌های اخیر وبا در نقاط مختلف جهان نیاز به وجود روشی سریع و مطمن برای شناسایی ویبریو کلرا را بیش از پیش لازم می‌سازد. هر چند روش‌های کلاسیک و متداول میکروبیولوژی حساس و اختصاصی‌اند اما هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند. بنابراین در این مقاله، تکنیک جدیدی برای تشخیص عامل ویبریو کلرا O1 تحت عنوان واکنش زنجیره ای پلیمراز – الیزا (PCR-ELISA) معرفی گردیده است.

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

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

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

**واژه‌های کلیدی:** ویبریو کلرا 01، واکنش زنجیره ای پلیمراز – الیزا (PCR-ELISA) ، ژن کد کننده زیر واحد B سم کلرا (ctxB)

دریافت مقاله: ۸۴/۶/۲ ، اصلاح مقاله:۸۴/۱۲/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۲/۲

✍ نویسنده مسئول: گروه علوم زیستی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه امام حسین«ع» ، تهران ـایران
* گروه علوم زیستی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه امام حسین «ع»
آدرس پست الکترونیکی: mmousavi@ihu.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## مقـدمـه

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

فاکتور بیماری‌زای باکتری V.cholera O1 اگزوتوکسینی است که کلرا توکسین نامیده می‌شود. به دلیل آنکه اثر عمده کلرا توکسین اختلال در عبور آب و الکترولیت از جدار مخاط روده است آن را آنتروتوکسین نیز می‌نامند. مولکول آنتروتوکسین از دو قسمت اصلی "A" (Active) به وزن مولکولی ۲۷۰۰۰ دالتون که سابقاً کلراژن نامیده می‌شد و "B" (Binding) یا کلراژنوئید به وزن مولکولی ۵۸۰۰۰ دالتون تشکیل شده است. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه‌ای است که وزن مولکولی هریک ۱۱۶۰۰ دالتون و توالی ژنی هر ۵ قسمت نیز یکسان است. (۴-۵)

از آنجاییکه ویبریوکلرا یکی از مهمترین عوامل عفونی شناخته شده در سطح جهان می‌باشد لذا تشخیص سریع آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. (۶،۲-۹) بنابراین یک روش سریع و حساس جهت تشخیص اولیه و کنترل بیماری مورد نیاز می‌باشد. روش‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی جهت شناسایی عامل بیماری وبا بستگی به ویژگی‌های باکتریولوژیک (مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ....) و بررسی ایمونولوژی سم (مانند روش RPLA) (۱۱) و یا توالی خاصی از DNA کد کنندهٔ سم در کرموزوم باکتری (همانند روش‌های PCR و دو رگه سازی) دارد. (۹، ۱۰،۱۲،۱۳) اما همهٔ این روش‌ها دارای معایب خاص خود از قبیل صرف زمان، هزینه نسبتاً زیاد و محدودیت در تعداد نمونه‌های تشخیصی هستند. اگرچه روش‌های PCR و دو رگه‌سازی در مدت زمان کوتاه با هزینه نسبتاً کم انجام می‌گیرد اما بدلیل استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و استفاده از اتیدیوم بروماید ریسک آلودگی پرسنل آزمایشگاه را بالا برده و امکان تشخیص تعداد نمونه در این تکنیک‌ها کم می‌باشد. (۱۴-۱۷) ما در این تحقیق با هدف از بین بردن معایب بالا، سعی کردیم تا با طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت ژن ctxB و تکثیر آن با DIG-dUTP ، محصول نشاندار شده را توسط کانژوگهٔ Anti DIG شناسایی نموده و با انجام روش PCR-ELISA بر روی ویبریو کلرا O1 استاندارد یک روش سریع و حساس جهت شناسایی این باکتری ارائه نماییم.

## روش بررسی

**مواد مورد استفاده .** DIG-dUTP و گانژوگهٔ مورد استفاده از شرکت Roche خریداری گردید و همچنین پرایمرها و پروب مورد استفاده توسط شرکت TIM MOL.BIOL سنتز شد و سایر مواد که شامل آنزیم Taq DNA پلیمراز ، dNTPs ، $MgCl_2$ و آگاروز از شرکت سیناژن خریداری گردید.

**تهیه سوشهای باکتری .** سویه‌های باکتری ویبریو کلرا O1 ، سالمونلا پاراتیفیC، شیگلا دیسانتری، پزودوموناس آئروجینوزا ، انتروباکتر و کلبسیلا همگی از آزمایشگاه رفرانس تهیه و با استفاده از روشهای کشت، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی تائید مجدد گردیدند.

**تهیه نمونهٔ باکتری جهت PCR .** سویه ویبریو کلرا O1 در محیط آب پپتون قلیایی و سایر باکتری‌ها در محیط مایع LB به ترتیب به مدت ۶ و ۱۸ ساعت کشت داده شده و سپس۱/۵ میلی‌لیتر از کشت فوق با ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (10mM Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH=8.0) حل و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد، مخلوط حاصل به عنوان نمونهٔ مستقیم جهت انجام PCR در دمای ۴ درجهٔ نگهداری گردید. (۶)

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



کشت داده شده در آب پپتون قلیایی و یا LB را برداشته و بعد از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ rpm ، رسوب سلولی حاصل در بافر TE(Tris-EDTA) حل گردید. پس از اضافه نمودن۶۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و۳ میکرولیتر پروتئیناز K ، مخلوط به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید و بعد از افزودن ۸۰ میکرولیتر CTAB/NaCl (۱۰٪) (Cetyle Trimethyl Ammonium bromide in 0.7 M NaCl، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ با ۲۵۰۰rpm در ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، هم حجم فاز رویی به آن فنل- کلروفرم اضافه و مخلوط مجدداً سانتریفوژ شد. فاز رویی را به لولهٔ دیگری منتقل و هم حجم آن اتانول ۹۹٪ اضافه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. بعد از سانتریفوژ با ۲۵۰۰ rpm در ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاوی DNA با ۱میلی لیتر اتانول۷۰٪ شستشو داده شد. با سانتریفوژ مجدد رسوب حاصل در دمای اتاق خشک و سپس در ۵۰ میکرولیتر بافرTE حل گردید. بعد از اضافه نمودن ۵ میکرولیتر RNase A به مدت ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه انکوبه شد. غلظت و خلوص DNA با خواندن جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بوسیلهٔ اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

**طراحی و ساخت پرایمرها .** در این تحقیق ژن کد کنندهٔ زیر واحد B سم وبا [ Cholera Toxin B Subunit (ctxB)] به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد . بعد از به دست آوردن سکانس ژن مورد نظر از بانک ژنی ( Accession Number AY475128 & AY804244) اقدام به طراحی پرایمر مورد نیاز تحت نام‌های KFP1 و KFP2 گردید . این پرایمرها توسط برنامه‌های نرم افزاری کامپیوتری آنالیز و از نظر تشکیل دایمر، لوپ و پایداری درونی مورد بررسی قرار گرفت، همچنین در این پرایمرها سایتهای آنزیمی جهت استفاده در تحقیقات بعدی پیش‌بینی شد. پرایمرها (جدول۱) توسط کمپانی TIB Mol.Biolساخته شد.

**جداسازی و تکثیر ژن ctxB با واکنش PCR .** واکنش PCR جهت تکثیر ژن ctxB در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۳ میکرومول از هر پرایمر ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از نوکلئوتیدهای dATP ، dCTP و dGTP ، ۱۹۰ میکرومول از نوکلئوتید dTTP و ۱۰ میکرومول از DIG-11-dUTP (شرکت Roche Diagnisis) ، ۱ یونیت از آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن)، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer×۱۰، غلظت ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و غلظت‌های متفاوت (۵۰ تا $۵\times۱۰^{-۵}$ نانوگرم) از DNA ژنومی بود. در واکنشی دیگر به جای استفاده از DNA ژنومی، رقت‌هایی از باکتری (۵۰۰، ۲۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰ ، ۵ و ۱سلول) تهیه شده در بند ۲-۲ استفاده شد. شرایط دمایی و تعداد چرخه‌های مورد نیاز مراحل مختلف PCR در جدول ۲ نشان داده شده است.

**شناسایی و تائید محصولات PCR نشاندار شده.**

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

**ELISA–DIG .** ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR نشاندار شده با دیگوکسی ژنین با ۹۰ میکرولیتربافر فسفات سالین (PBS pH=7.2) مخلوط و به هرکدام از چاهک‌های میکرو پلیت اضافه گردید و سپس ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باقی گذارده شد تا کاملاً خشک شوند. چاهک‌ها ۵ بار با بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ ٪ توین ۲۰ (PBST ) شستشو داده شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ضد دیگوکسی ژنین نشاندار شده با پراکسیداز با رقت ۱/۲۵۰۰ در BPST به هر کدام از چاهک ها اضافه گردید. پس از شستشوی مجدد باPBST ، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا [۰/۲ میلی گرم O- فنیل دیامین (OPD) در ۱میلی لیتر بافر سیترات فسفات با pH=5 به همراه ۲/۵ میکرولیتر از آب اکسیژنه ۳۰٪] به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در اتاقک تاریک نگهداری گردید. جهت توقف واکنش از ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱/۵ مولار استفاده شد. جذب نوری (O.D) با استفاده از دستگاه ELISA Reader (ساخت شرکت DYNEX Technologis) در ۴۹۰ نانومتر خوانده

شد. (۱۴، ۱۵، ۱۹)

**طراحی و ساخت پروب .** به منظور تأیید نهایی ژن تکثیر یافته در این تحقیق از پروب SH1 استفاده شد. همانند طراحی پرایمر بعد از به دست آوردن سکانس ژن ctxB از بانک ژنی اقدام به طراحی پروب نمودیم. پروب مورد نظر مکمل قسمت میانی ژن ctxB بوده و در انتهای ´۵ بیوتینیله گردیده بود. پروب توسط کمپانی TIB Mol.Biolساخته شد (جدول۱).

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

## یافته‌ها

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

**بررسی نتایج ژل مربوط به واکنش PCR ژن ctxB با استفاده از باکتری های لیزشدهٔ ویبریو کلراO1 .** نتیجهٔ بدست آمده از PCR ژن ctxB از رقت‌های نمونهٔ باکتری ویبریو کلرا O1 با ۸ و۳۰ سیکل در شکل ۲ نشان داده شده است. کمترین مقدار نمونه باکتری که یک باند قابل روئیت را روی ژل آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید بوجود آورده ، ۵۰۰ عدد باکتری با ۳۰ سیکل بوده است. چنانکه از ژل شکل ۲ پیدا است هیچگونه باندی برای سایر رقت‌ها مشاهده نشده است. نتایج بدست آمده از ژل محصولات PCR با ۵ سیکل مشابه آنچه برای ۸ سیکل بدست آمده، می‌باشد.

**بررسی حساسیت PCR-ELISA:**

**بررسی حساسیت PCR-ELISA با استفاده از DNA ژنومی باکتری ویبریو کلرا O1 .** به منظور تعیین حداقل غلظت DNA ژنومی ویبریو کلرا O1 که می‌توانست توسط این روش شناسایی گردد سریال رقت از DNA ژنومی تهیه و جهت تعیین حساسیت با استفاده از روش PCR-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده (جدول ۳) نشان می‌دهد که حداقل میزان نمونهٔ DNA ژنومی که می‌تواند با این روش شناسایی گردد، ۰/۶– ۰/۵پیکوگرم می‌باشد (جدول۳).

**بررسی حساسیت PCR-ELISA با استفاده از نمونهٔ مستقیم باکتری ویبریو کلراO1 .** جهت تعیین حداقل تعداد باکتری ویبریو کلراO1 که می توانست توسط این روش شناسایی گردد رقت های متفاوتی از نمونهٔ باکتری تهیه و با استفاده از روش PCR-ELISA ، حساسیت آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده (جدول ۴) نشان می‌دهد که حداقل تعداد نمونهٔ از باکتری که با این روش شناسایی می‌گردد ۵ سلول است.

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

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

| تعداد نوکلئوتید | توالی نوکلئوتید |
|---|---|
| ۲۹ باز | KFP1 5´- GGAGGATCCATGGTAAAGATAATATTTG -3´ |
| ۲۹ باز | KFP2 5´- GGCTTTTTGGAATTCTAATTTGCCATACT -3´ |
| ۲۱ باز | SH1 5´-Biotin -AGCTGG AAA AAG AGAGATGGC -3´ |

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

| تعداد سکیل | زمان (دقیقه) | درجه حرارت(سانتی گراد) | مرحله |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۵ | ۹۴ | واسرشت اولیه |
| ۵و۸ | ۱ | ۹۴ | واسرشت |
| | ۱ | ۶۲ | اتصال |
| | ۱ | ۷۲ | تکثیر |
| ۱ | ۱۰ | ۷۲ | تکثیر نهایی |

**01 PCR-ELISA DNA**

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

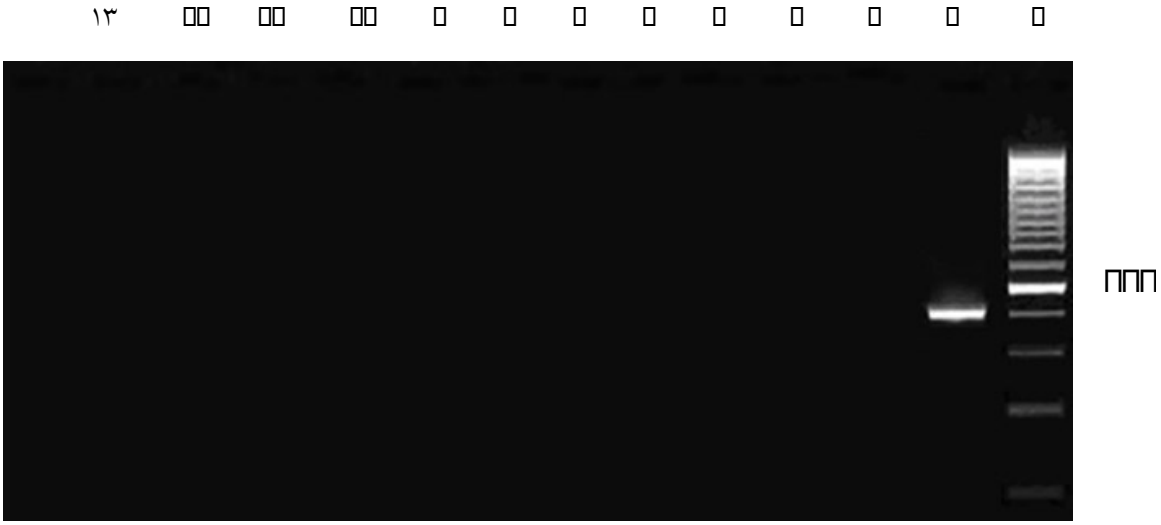
**o1 PCR-ELISA**

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

[illegible]

| غلظت DNA | جدب نوری(۸ سیکل) | سریال رقت DNA |
|---|---|---|
| ۵۰ نانوگرم | ۲/۸۵۱ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰ |
| ۵ نانوگرم | ۲/۳۰۱ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰۰ |
| ۰/۵ نانوگرم | ۲/۱۸۱ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰۰۰ |
| ۵۰ پیکوگرم | ۱/۶۴۵ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰۰۰۰ |
| ۵ پیکوگرم | ۰/۸۵۷ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰۰۰۰۰ |
| ۲/۵ پیکوگرم | ۰/۴۰۲ | (ویبریوکلرا)۱/۲۰۰۰۰۰ |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۱۹۷ | (ویبریوکلرا)۱/۱۰۰۰۰۰۰ |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۰۵۷ | سالمونلا پاراتیفی |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۰۵۱ | شیگلا دیسانتری |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۰۶۲ | اشریشیاکلی |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۰۵۹ | پزودوموناس آئروجینوزا |
| ۵۰ نانوگرم | ۰/۰٦۰ | کلبسیلا |
| --- | ۰/۰٦۲ | کنترل منفی |

**شکل ۱ . ژل آگاروز مربوط به محصولات PCR با استفاده از DNA ژنومی به عنوان الگو**




ستون ۱ : 100 bp DNA ladder plus
ستون ۲ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی ویبریو کلرا o1 به عنوان الگو
ستون۳ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی سالمونلا پاراتیفی به عنوان الگو
ستون ۴ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی شیگلا دیسانتری به عنوان الگو
ستون ۵ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی پزودوموناس آئروجینوزا به عنوان الگو
ستون ۶ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی انتروباکتر به عنوان الگو
ستون ۷ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰ ng از DNA ژنومی کلبسیلا به عنوان الگو
ستون های ۱۳-۸ : محصول واکنش های PCR ۸ سیکلی با استفاده از غلظت های ۵۰ ng ، ۵ ng ، ۰/۵ ng ، ۰/۰۵ ng ، ۰/۰۰۵ ng و ۰/۰۰۰۵ ng از DNA ژنومی ویبریو کلرا o1 به عنوان الگو

[illegible] ۳ [illegible] PCR [illegible] O1 [illegible]

[illegible]

ستون ۱ : 100 bp DNA ladder plus
ستون ۲ : محصول واکنش PCR ۳۰ سیکلی با استفاده از ۵۰۰ سلول از باکتری های لیز شدهٔ ویبریو کلرا o1 به عنوان الگو
ستون های ۸-۳ : محصول واکنش های PCR ۸ سیکلی با استفاده از غلظت های ۵۰۰ ، ۲۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰ ، ۵ و ۱ سلول از باکتری های لیز شدهٔ ویبریو کلرا o1 به عنوان الگو

آزمایش دورگه سازی محصول PCR با پروب نشاندار می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که DNA ژنومی تکثیر یافته مربوط به ژن ctxB باکتری ویبریو کلراO1 بوده است. همچنین نتایج حاصله بیانگر میزان DNA ژنومی قابل تشخیص در واکنش را ۰/۶– ۰/۵ پیکوگرم برای ویبریو کلرا O1 می‌باشد.

**بررسی‌های درون سنجش و بین سنجش.** برای ارزیابی درون سنجش از غلظت‌های مشخص DNA ژنومی چهار PCR گذاشته و سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ELISAآشکارسازی شد. بررسی‌های بین سنجش چهار بار بطور جداگانه انجام گرفت. در ضمن در بررسی‌های درون سنجش و بین سنجش نمونه‌های کنترل منفی گذاشته شد. نتایج حاصله با نرم افزار SPSS بررسی و تائید گردید.

## بحث

شناسایی عامل بیماری وبا اولین مرحله در تشخیص این بیماری می‌باشد، زیرا تنها، گونه‌های تولید کنندهٔ سم قادر به ایجاد بیماری اسهال آبکی و اپیدمی‌های مربوط به آن می‌باشند. (۱،۱۳،۲۰) روش‌های متداول میکروبیولوژی که جهت شناسایی ویبریو کلرا به کار برده می‌شوند شامل روش‌های کشت باکتری، بیوشیمیایی و ایمونولوژیک می‌باشند که این روش‌ها غالباً چندین روز وقت جهت کامل شدن نیاز دارند. روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک از قبیل واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، PCR-ELISA و روش دو رگه‌سازی (Hybridization) غالباً زمان شناسایی را به طور قابل ملاحضه‌ای کاهش داده‌اند. (۱، ۳، ۸، ۱۲، ۱۵، ۱۹، ۲۱) ولی از آنجایی‌که بیماری وبا همیشه به صورت پاندمی یا آندمی مطرح می‌شود لذا وجود یک روش که بتواند در زمان کوتاه نمونه‌های

زیـادی را آزمایش نماید و از حساسیت بسیار بالایی برخوردار باشد، لازم و ضروری است. مضافاً ، در روش PCR بدلیل استفاده از ژل آگـاروز جهـت مشاهدهٔ نتیجهٔ واکنش و استفاده از اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی ژل خطر آلودگی پرسنل و محیط را بالامی‌برد. مـا در ایـن پـژوهش جهت بر طرف نمودن معایب روش‌های بالا، روش PCR-ELISA را جهت شناسایی سریع و اختصاصی ویبریو کلـرا بـه عـنوان یک روش شناسایی روتین و برتر از PCR به کار بـردیم. محققین زیادی روش PCR را جهت شناسایی ویبریو کلرا به کار برده اند. (۹، ۲۲–۲۵)

کـخ از روش PCR جهـت تشـخیص ویـبریو کلـرا در نمونـه‌های غذایـی اسـتفاده کـرده است. حد تشخیصی وی در این روش ۱ تا ۱۰۰ باکـتری در ۱۰ گـرم از نمونـه‌های غذایی آلوده شده در مدت زمـان ۸ تـا ۱۰ سـاعت بود. (۲۳) چو و همکارانش از ژن توکسین RTX ویـبریو کلـرا به منظور شناسایی ۱۶۶ نمونه کلینیکی ویبریو کلـرا اسـتفاده نمودنـد البـته در این روش زمان فاکتور مهمی نبود. (۲۴) اسـلام و همکـارانش از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (MAbs) علـیه ویـبریو کلـرا O1 و O139 بـه همـراه روش PCR استفاده نمودنـد. حـد تشـخیص در این روش برای ویبریو کلرا O139، ۱۰ باکـتری در حالـی کـه بـرای بیوتایـپ اوگـاوا ویبریو کلرا O1 حد تشـخیص ۱۰۰ باکـتری و بـرای بیوتایـپ ایـنابا ویـبریو کلـرا حد تشخیص ۱۰۰۰ باکتری در مدت زمان ۲۴ ساعت بود. (۲۶)

بانوماتی و همکارانش با انتخاب مجموعه‌ای از ژن‌های ویبریو کلرا O139 و بررسـی آن بـا سـایر گونـه‌هـای باکتریایی روش ساترن بلات را جهت تشخیص ویبریو کلرا ارائه دادند که در این روش نیز زمـان و مـیزان نمونـه معـیارهای مهمـی نبود. (۲۷) در مقایسه با روشـهای بـالا، با روش PCR-ELISA ارائه شده در این پژوهش حداقل تعداد باکتری که در یک واکنش قابل شناسایی بود ۵ سلول تعییـن شـد. همچنیـن نـتایج مشـخص کـرد کـه حساسیت روش تشـخیص PCR-ELISA بـرای شناسـایی ویـبریوکلرا O1 در مقایسـه با نتایج ارائه شده توسط دیگر محققان که از روش PCR اسـتفاده کـرده‌انـد ۱۰۰ برابـر بیشـتر اسـت. تـا کـنون گزارشی از شناسایی ویبریوکلرا O1 به روش PCR-ELISA ارائه نشده است. امـا تحقیقاتـی در مورد خانواده انتروباکتریاسه از جمله سالمونلا و شـیگلا انجـام گرفـته اسـت. (۱۷، ۱۹) هونـگ و همکـاران (۱۷) در شناسـایی سـالمونلا انـتریکا بـه روش PCR-ELISA ، حداقـل تعـداد باکتری که در یک واکنش قابل شناسایی بود را ۱۰ سـلول تعییـن کـردند. حساسیت روش هونگ و همکاران نیز مانند ایـن پژوهش ۱۰۰ برابر روش شناسایی PCR مبتنی بر الکتروفورز مشخص گردید.

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

## References

**1.** Hoge CW, Bodhidatta L, Echeverria P, Deesuwan M, Kitporka P. Epidemiologic study of Vibrio cholerae O1 and O139 in Thailand: at the advancing edge of the eighth pandemic. Am J Epidemiol 1996; 143: 263–268.

**2.** Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam PD. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in Vibrio cholerae O1 strains isolated from 1979 to 1996. J Clin Microbiol 1999; 37:734–741.

**3.** Vergara M, Maestre J, Suarez O, Monte R Toxigenic vibrio cholerae: identification of the ctxB gene . Microbiol Clin 1997; 15(4): 181-5.

**4.** Rivera ING, Chun J, Huq A, Sack B, Colwell RR Genotypes associated with virulence in environmental isolates of Vibrio cholerae. Appl

Environ Microbiol 2001; 67: 2421–29.

**5.** Shah, M, Faruque M, Albert JJ, Mekalanos J. Epidemiology Genetics and Ecology of Toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1301-14.

**6.** Theron J, Cilliers J, Du Preez M, Brozel VS, Venter SN detection of toxigenic Vibrio cholerae from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. J Appl Microbiol 2000; 89(3): 539-46.

**7.** Nandi S, Maiti D, Saha A, Bhadra RK. Genesis of variants of Vibrio cholerae O1 biotype El Tor: role of the CTX phi array and its position in the genome. Microbiology 2003; 149: 89-97.

**8.** Keasler SP, Hall RH. Detection and biotyping vibrio cholerae o1 with multiplex polymerase chain reaction. lancet 1993; 341: 1661 .

**9.** Verala P, Rivas M, Binsztein N. Identification of toxigenic vibrio cholerae from the argentine outbreak by PCR for ctxA1 and ctxA2-B. FEBS lett1 993; 315: 74-76 .

**10.** Radu S, Ho YK, Lihan S, Yuherman Rusul G, Yasin RM, Khair J, Elhadi N. Molecular characterization of Vibrio cholerae O1 and non-O1 from human and environmental sources in Malaysia. Epidemiol Infect 1999; 123: 225–232.

**11.** Minami A, Hashimoto S, Abe H, Arita M, Taniguchi T, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Cholera enterotoxin production in Vibrio cholerae O1 strains isolated from the environment and from humans in Japan. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 2152–57.

12. Farmer III JJ, Hickman-Brenner, FW The genera Vibrio and Photobacterium in the Prokaryotes, edited by. Balows A, TruÈper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. New York, Springer-Verlag 1992; 2952-3011.

**13.** Hoshino K ,Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya SK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 and O139.FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20 (3): 201-7.

**14.** Daly P, Collier T, Doyle S PCR-ELISA detection of Escherichia coli in milk. Lett Appl Microbiol 2002; 34: 222–226.

**15.** Fach P, Perelle S, Grout J, Dilasser F Comparison of different PCR tests for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria. J Microbiol Methods 2003; 55: 383– 392.

**16.** Sails AD, Bolton FJ, Fox AJ, Wareing DRA, Greenway DLA Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in environmental waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microbiol 2002; 3: 1319-24.

**17.** Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, Maurer1 JJ Rapid Detection of Campylobacter coli, C. jejuni, and Salmonella enterica on Poultry Carcasses by using PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.Appl Environ Microbiol 2003; 6: 3492 –99.

**18.** Muarry MG, Thampson WF Rapid isolation of high molecular weight plant DNA . Nucleic Acid Res 1983; 8: 4321-4325.

**19.** Ge B, Zhao S, Hall R, Meng J A PCR–ELISA for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli. Microbes Infect 2002; 4: 285–290.

**20.** Folgosa E. Molecular identification of pathogenicity genes and ERIC types in Vibrio cholerae O1 epidemic strains from Mozambique. Epidemiol infect 2001; 127: 17-25.

**21.** Korbayashi K, Set K, Akasaka S, Makino M Detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 using polymerase chain reaction for amplifying the cholera enterotoxin gene. Journal of Japanese Association of Infectious Diseases 1990; 64: 1323- 29.

**22.** Koch WH, Payne WL, Wentz BA , Cebula TA Rapid polymerase chain reaction method for detection of Vibrio cholerae in foods. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 556-560.

**23.** Shangkuan YH, Show YS, Wang TM Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic Vibrio cholerae and to biotype Vibrio cholerae O1. J Appl Bacteriol 1995; 79(3): 264-273.

**24.** Chow KH, Uyen ky, Yam WC Detection of RTX Toxin gene in Vibrio cholerae by PCR . J clinl microbiol 2001; 2594-97

**25.** Lee HF, Yeh HL , Hsiao HL , Wang TK , Liu CH Detection and identification of toxigenic Vibrio cholerae O1 strains by a simplified polymerase chain reaction method.Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi 1993; 26(1): 6-14.

**26.** Islam MM, Golam Kabir Md, Moly PK , Islam AFMT, Rakib A Detection of Vibrio cholrae o1 and o139 serogroups Directly from stool specimens by combined immunomagnetic separation and polymerase Chain reaction .pakistan Journal of biological sciences 2004;7: 1654-59.

**27.** Bhanumathi R , Sabeena F, Isac SR, Shukla BN, Singh DV Molecular Characterization of Vibrio cholerae o139 Bengal Isolated from water and the Aquatic Plant Eichhorinia Crasipes in the River Ganga, Varanasi,India Appl Environ Microbiol 2003; 2389-94.