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

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال هشتم ● شماره ۳ ● صفحات ۱۵۹ تا ۱۶۵ ● پاییز ۱۳۸۹

طراحی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی

نرگس امینی[۱]، دکتر محمد سلیمانی[۲]، دکتر آرش قلیان‌چی لنگرودی[۳]، *دکتر کیوان مجیدزاده[۴]

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۳/۱۲ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۶/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی، باکتری مولد بیماری تب تیفوئید می‌باشد که سالانه بیش از ۱۶ میلیون نفر در جهان به آن مبتلا می‌شوند و حدود ۶۰۰ هزار نفر نیز در اثر آن می‌میرند. روش‌های کلاسیک تشخیص این بیماری اغلب وقت‌گیر می‌باشند و از حساسیت کافی برخوردار نیستند. هدف این مطالعه، ارائه‌ی نوعی روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR: Polymerase Chain Reaction) برای تشخیص سریع و انجام اقدام‌های درمانی- بهداشتی مناسب و به‌موقع است.

مواد و روش‌ها: در این مقاله تحقیقاتی ژن اختصاصی *viaB* مربوط به باکتری سالمونلا تیفی، هدف‌گذاری و از نرم‌افزار Generunner، برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. واکنش PCR ژن فوق با استفاده از ژنوم باکتری استاندارد (PTCC ۱۶۰۹) انجام و ویژگی روش نیز با استفاده از ژنوم انواعی از نمونه‌های کنترل منفی تعیین گردید. به منظور ساخت کنترل مثبت، تعیین حساسیت و حد تشخیص، کلونینگ محصولات PCR در وکتور پلاسمیدی pTZ۵۷R/T انجام گرفت.

یافته‌ها: الکتروفورز محصولات PCR، باندی به طول ۴۴۱ جفت‌باز را برای ژن *viaB* نشان داد. نمونه‌های کنترل منفی مورد استفاده هیچ باندی ایجاد نکردند. کلونینگ محصولات PCR در وکتور pTZ۵۷R/T با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف تأیید گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: پرایمرهای طراحی شده برای ژن *viaB* در این روش می‌تواند با حساسیتی حدود ۱۹ کپی از ژنوم برای شناسایی این ارگانیسم به‌کار رود و با ردیابی سریع و دقیق باکتری، از ایجاد عوارض پایدار و ناخواسته جلوگیری نماید.

کلمات کلیدی: تب تیفوئید، سالمونلا تیفی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ژن *viaB*

مقدمه

تب تیفوئید (بیماری حصبه) یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. سالانه بالغ بر ۱۶ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند و بیش از ۶۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری می‌میرند (۱). عامل ایجادکننده بیماری، سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی، یک باکتری گرم‌منفی، بی‌هوازی اختیاری و تاژک‌دار است که در جنس سالمونلا و در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد. بر اساس جدیدترین سیستم طبقه‌بندی این جنس به ۲ گونه سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری تقسیم می‌شود. سالمونلا انتریکا به شش زیرگونه (I، II، IIIa، IIIb، IV، V) تقسیم می‌شود. از بین این شش زیرگونه، تنها زیرگونه‌ی I مسوول تقریباً همه عفونت‌های سالمونلا در حیوانات خون‌گرم می‌باشد. در این گونه بالغ بر ۲۳۰۰ سرووار شناخته شده است که در میزان شیوع و بیماری‌هایی که در میزبان‌های مختلف ایجاد می‌کنند متفاوت هستند (۲). زیرگونه‌ی I مسوول بیشترین بیماری‌های انسانی می‌باشد و شامل سالمونلا تیفی نیز می‌باشد که تنها سبب بیماری‌زایی در انسان و نخستی‌های عالی می‌شود (۳). سایر زیرگونه‌ها، شامل سالمونلا آریزونا (زیرگونه‌ی IIIa) و سالمونلا بونگوری، مسوول بیماری‌زایی در حیوانات خونسرد می‌باشند و به

۱- پژوهشگر، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی
۲- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم
۳- پژوهشگر، ایران، تهران، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم
۴- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری تسنیم (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۰۲۱-۸۵۹۵۵۲۴۰ آدرس الکترونیک: k-majidzadeh@armyums.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

ندرت در انسان ایجاد بیماری می‌کنند. اکثر سالمونلاها به غیر از سالمونلا تیفی که تب روده‌ای ایجاد می‌کند یکی از سه عارضه‌ی تب پاراتیفوئید، سپتی‌سمی و مسمومیت غذایی را ایجاد می‌نمایند (۴). تب تیفوئید در صورت عدم درمان و یا درمان دیرهنگام، باعث ایجاد عوارض ناگواری می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها خونریزی روده و پارگی روده می‌باشد (۵).

سالمونلا انتریکا سرووار تیفی دارای دو سویه‌ی مهم Ty۲ و CT۱۸ می‌باشد. ژنوم کامل باکتری سالمونلا تیفی سروتایپ CT۱۸ در سال ۲۰۰۱ به‌طور کامل تعیین ردیف گردید. این باکتری دارای یک ژنوم حلقوی به اندازه ۴۸۰۹۰۳۷ جفت‌باز است. همچنین پلاسمیدهای مهم آن شامل پلاسمید مقاومت دارویی چندگانه (pHCM۱: Multiple drug-resistance incH۱ plasmid) با اندازه‌ی ۲۱۸۱۵۰ جفت‌باز و پلاسمید (pHCM۲) با اندازه‌ی ۱۰۵۱۶ جفت‌باز (که شباهت زیادی به پلاسمید بیماری‌زایی باکتری عامل طاعون دارد) نیز به‌طور کامل تعیین ردیف شده‌اند. این پلاسمیدها تعداد ۲۰۴ ژن را در خود جای داده‌اند (۶). ژنوم سروتایپ Ty۲ نیز در سال ۲۰۰۳ به‌طور کامل تعیین ردیف گردید و مشخص شد که اندازه آن ۴۷۹۱۹۶۱ جفت‌باز می‌باشد. با مقایسه‌ی ژنوم کامل دو سویه مختلف سالمونلا تیفی Ty۲ و CT۱۸ مشخص شد که اندازه‌ی ژنوم آن‌ها تفاوت بسیار اندکی دارد. این بررسی همچنین نشان داد که فقط ۲۹ ژن به‌طور اختصاصی متعلق به سویه‌ی Ty۲ است درحالی‌که ۸۴ ژن به‌طور اختصاصی متعلق به سویه‌ی CT۱۸ است و در عین حال نکته جالب این است که سویه‌ی TY۲ فاقد دو پلاسمید مقاومت دارویی شناخته شده در CT۱۸ است (۷، ۸).

این باکتری به دلیل سهولت تهیه و تولید و همچنین آسانی به‌کارگیری جهت آلوده‌نمودن افراد، سابقه استفاده بسیاری در عملیات بیولوژیک و بیوتروریستی دارد (۱). بررسی کارآیی عوامل مختلف بیولوژیک از نظر آلوده‌کردن افراد نشان داده است که ۱ گرم کشت باکتری سالمونلا تیفی معادل ۱۰۰ گرم عامل شیمیایی اعصاب "V" و معادل ۰/۰۲ گرم سم سیانیدپتاسیم اثر دارد (۱). در بررسی دیگری ذکر شده است که مصرف ۱۰۰ میلی‌لیتر آب (نصف لیوان) از یک منبع ۵ میلیون لیتری که با ۱۲۰۰ گرم باکتری سالمونلا تیفی و یا ۵ کیلوگرم سم بوتولینوم و یا ۷ کیلوگرم سم استافیلوکوک آلوده شده باشد سبب بیماری شدید می‌شود. درحالی‌که برای مسموم نمودن این حجم از منبع آب با سموم شیمیایی به ۱ تن سیانیدپتاسیم نیاز است (۴). با توجه به اینکه تشخیص سریع و درمان به‌موقع مانع از گسترش بیماری و ایجاد عوارض دائمی و یا مرگ بیماران می‌شود و روش‌های کلاسیک اغلب وقت‌گیر بوده و حساسیت بالایی ندارند، توجه به روش‌های مولکولی جهت شناسایی عوامل بیماری‌زای میکروبی گسترش یافته است. تشخیص سریع برای شناسایی سالمونلا تیفی علاوه‌بر جلوگیری از مرگ‌ومیر، به سبب قرار گرفتن این باکتری در فهرست عوامل بیولوژیک گروه ۲ نیز مورد توجه است (۹).

مواد و روش‌ها

این مقاله از نوع تحقیقاتی است.

کشت و استخراج ژنوم باکتری‌ها: از آنجایی که باکتری‌های کنترل منفی و مثبت، 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 گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، ژنوم آن‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن DNP™ Kit (DNA Purification kit) استخراج گردید. لیست باکتری‌های کنترل منفی مورد استفاده در جدول شماره‌ی ۱ آمده است.

طراحی پرایمرها: پس از اخذ ترادف ژن هدف‌گذاری شده در این مطالعه (*viaB*)، طراحی پرایمرها به کمک نرم‌افزار Generunner (ویرایش ۲) انجام و ساخت آن‌ها توسط شرکت سیناژن صورت گرفت (جدول ۲). همچنین به منظور بررسی نهایی پرایمرهای طراحی‌شده و اطمینان از اختصاصی بودن آن‌ها از سرویس BLAST سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI: National Center for Biotechnology Information) استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: واکنش PCR جهت ارزیابی ژن هدف *viaB* با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم، ۲ میلی‌مول یون منیزیم، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۱۰۰ نانوگرم ژنوم باکتری، ۰/۵ میکرومول از پرایمرهای عقبی و جلویی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از برنامه‌ی مشخص برای ۳۵ سیکل در دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال ۵۲/۵°C به مدت ۴۵

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

جدول ۱- لیست باکتری‌های کنترل منفی جهت بررسی تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی

محل تهیه	شماره‌ی سویه	نام میکروارگانیسم
	ATCC ۲۵۹۲۳	*Staphylococcus aureus*
	ATCC ۶۰۵۱	*Bacillus subtilis*
	ATCC ۹۲۹۰	*Shigella sonnei*
انستیتو پاستور ایران	ATCC ۲۵۹۲۲	*Escherichia coli*
	ATCC ۲۹۲۱۲	*Enterococcus faecalis*
	ATCC ۲۷۸۵۳	*Pseudomonas aeruginosa*
	ATCC ۷۸۸۱	*Klebsiella pneumoniae*
	PTCC ۱۴۸۰	*Yersinia enterocolitica*
	PTCC ۱۴۸۲	*Yersinia intermedia*
سازمان پژوهش‌های	PTCC ۱۲۴۴	*Yersinia pseudotuberculosis*
علمی و صنعتی	PTCC ۱۰۷۹	*Proteus vulgaris*
	PTCC ۱۶۰۰	*Citrobacter freundii*
	PTCC ۱۱۱۱	*Serratia marcesens*

ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. بعد از این ۳۵ چرخه، تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۵دقیقه انجام یافت. همچنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و با استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی انجام شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR با ۱ میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری (Fermentase) (۶X Loading dye Buffer) مخلوط و در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. همچنین یک میکرولیتر از ژنوم استخراجی از سوش‌های کلینیکال سالمونلا تیفی در شرایط و برنامه‌ی مشابه PCR گردید.

تعیین ویژگی: به‌منظور بررسی ویژگی پرایمرها و تعیین ویژگی آنالیتیک روش، واکنش PCR با شرایط فوق بر روی ژنوم باکتری‌های کنترل منفی انجام شد (جدول ۱). همچنین به منظور اطمینان از قابلیت DNA استخراج‌شده جهت به‌کارگیری در واکنش PCR و عدم وجود مهارکننده در آن، واکنش PCR بر روی ژن یونیورسال و کروموزومی ۱۶S rRNA انجام شد.

کلونینگ محصول PCR و تهیه‌ی کنترل مثبت: وجود کنترل مثبت برای استفاده در یک کیت تشخیصی به عنوان یک روش مولکولی دقیق و سریع بسیار حائز اهمیت می‌باشد. برای انجام این کار، پس از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت ACCU Prep BIONEER (PCR Purification kit) در پلاسمید pTZ۵VR/T و مطابق دستورالعمل کیت InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentase) کلونینگ صورت گرفت. کلون‌های دریافت‌کننده‌ی محصول تکثیر ژن *viaB* با استفاده از غربالگری سفید و آبی انتخاب شدند. استخراج پلاسمید در مورد کلنی‌های سفید با استفاده از کیت ACCU Prep BIONEER (Plasmid Mini extraction kit) انجام گرفت. برای تأیید کلون‌ها از واکنش PCR و واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم XbaI (Fermentase) استفاده شد. پیش‌بینی ما ایجاد یک قطعه‌ی خطی

جدول ۲- سکانس پرایمرهای viaB مورد استفاده در مطالعه

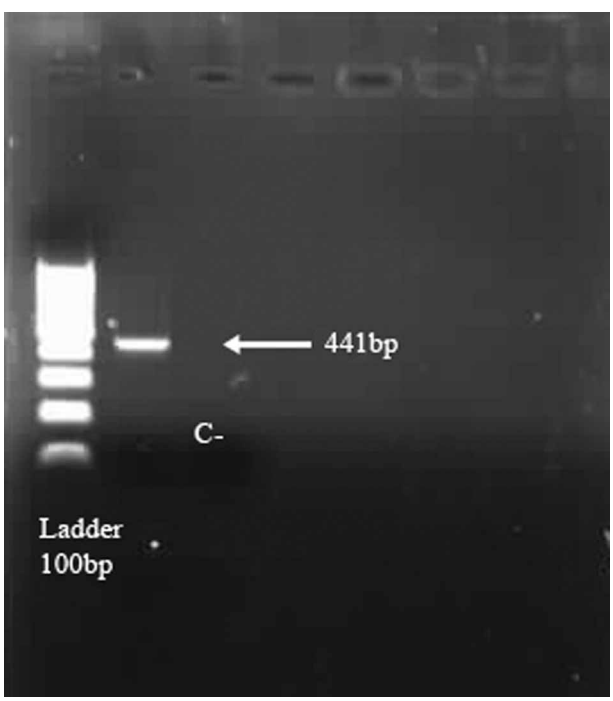
طول محصول	نقطه‌ی ذوب	توالی پرایمر	نام پرایمر
۴۰۰ bp	۵۹/۷	۵′-CATAAGGAGACTTCATGAGG-۳′	*via*F
	۶۲/۲	۵′-CTATCCTGAAGCTCTTCC-۳′	*via*R

با طول حدود ۳۰۰۰ جفت‌باز در روی ژل آگارز بود. تأیید نهایی کلون‌ها با استفاده از تعیین توالی به روش ترادف چرخشی (Cycle sequencing) انجام گرفت و پلاسمید تأیید شده، pTZ۵۷R/T-*viaB* نام‌گذاری شد.

تعیین حساسیت و حد تشخیص (LOD): پس از کلونینگ قطعه *viaB*، ابتدا غلظت پلاسمید pTZ۵۷R/T-*viaB* با قرائت جذب نوری OD در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مشخص شد و سپس جهت تعیین حساسیت آنالیتیک روش، حداقل تعداد کپی از قطعه‌ی مورد نظر که بتواند در واکنش PCR باند واضحی ایجاد کند محاسبه گردید. بدین منظور رقت‌های متوالی ده‌برابر (10^{-1} الی 10^{-10}) از پلاسمید pTZ۵۷R/T-*viaB* 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 تعیین و پس از انجام محاسبات مربوطه مطابق روش Chiang، به عنوان حد نهایی تشخیص تعیین شد (۱۰).

یافته‌ها

PCR: واکنش PCR مربوط به ژن *viaB* تنظیم و قطعه‌ای به طول ۴۴۱bp برای این ژن در روی ژل مشخص گردید (شکل ۱). همچنین

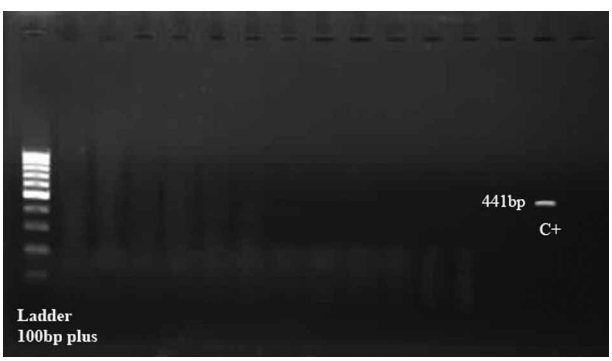


شکل ۱- محصول PCR ژن viaB جهت تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی

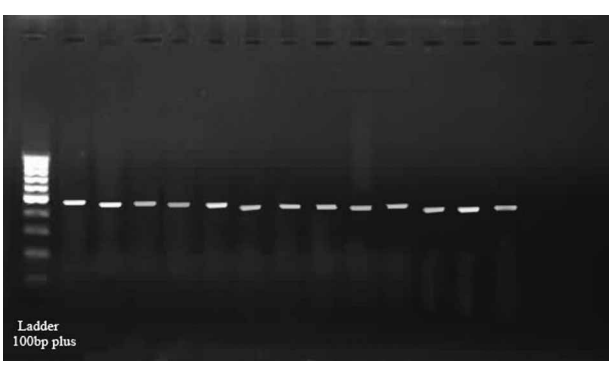
واکنش PCR بر روی کلون‌های دریافت‌کننده‌ی این ژن (کنترل مثبت) که pTZ۵۷R/T-*viaB* نام‌گذاری شد. مطابق انتظار، باندی به اندازه ۴۴۱bp در ژل آگاروز ایجاد شد.

تعیین ویژگی: واکنش PCR مربوط به ژن *viaB*، در تمام باکتری‌های کنترل منفی، باندی را ایجاد نکرد که نشان‌دهنده‌ی ویژگی بالای واکنش PCR در این مطالعه می‌باشد (شکل ۲). همچنین مثبت شدن واکنش PCR مربوط به ژن یونیورسال ۱۶S rRNA با طول ۴۷۵bp، حضور ژنوم استخراج شده قابل PCR در نمونه‌های کنترل منفی را تأیید نمود (شکل ۳).

تعیین حد نهایی تشخیص: آخرین رقت از پلاسمید pTZ۵۷R/T-*viaB* با غلظت اولیه ۷۰۰ng/µl که باند قابل مشخصی را در روی



شکل ۲- باکتری‌های کنترل منفی به‌ترتیب از چپ به راست *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Shigella sonnei*، *Escherichia coli*، *Enterococcus faecalis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Yersinia enterocolitica*، *Yersinia intermedia*، *Yersinia pseudotuberculosis*، *Proteus vulgaris*، *Citrobacter freundii* و *Serratia marcesens*.



شکل ۳- باند ۴۷۵bp مربوط به ژن یونیورسال ۱۶S rRNA در باکتری‌های کنترل منفی به‌ترتیب از چپ به راست *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Shigella sonnei*، *Escherichia coli*، *Enterococcus faecalis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Yersinia enterocolitica*، *Yersinia intermedia*، *Yersinia pseudotuberculosis*، *Proteus vulgaris*، *Citrobacter freundii* و *Serratia marcesens*.

شکل ۴- نتایج حد تشخیص جهت تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی

ژل ایجاد نمود، $۱۰^{-۷}$ و کمترین تعداد کپی قابل تشخیص ژن *viaB* در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR برابر ۱۹ کپی محاسبه گردید (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم کاهش شیوع بیماری تب تیفوئید در کشورهای توسعه‌یافته، هنوز این بیماری یکی از معضلات اساسی بهداشتی در کشورهای در حال توسعه و از جمله کشور ما می‌باشد. همچنین با توجه به هم‌جواری با کشورهایی که از لحاظ بهداشتی در وضعیت مطلوبی نیستند مانند افغانستان و عراق، توجه به تشخیص سریع و درمان به‌موقع این بیماری به خصوص در استان‌های مرزی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

جهت تشخیص آزمایشگاهی باکتری عامل حصبه در نمونه‌های کلینیکی از کشت خون و مغز استخوان، کشت مدفوع، سواپ رکتال، کشت ادرار و همچنین آزمایش های دیگری چون تست ویدال، الایزا و ایمونوفلورسنت استفاده می‌شود که تمام این روش‌ها وقت‌گیر و غیرقابل استفاده جهت تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری است (۱۱، ۱۲). از جمله معایب این روش‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: جداسازی باکتری حداقل به ۲ تا ۵ روز زمان نیاز دارد، ضمن این‌که کشت خون در ۶۵-۳۰ درصد از موارد تب تیفوئید منفی است و در صورت استفاده‌ی قبلی از آنتی‌بیوتیک، رشد باکتری در محیط کشت مهار می‌شود. تفسیر تست ویدال در مناطق اندمیک، غیراختصاصی و دشوار است و برای استفاده‌ی مؤثر از تست ویدال در هر منطقه باید تیتر مناسب آن منطقه تعیین شود؛ لازمه‌ی این کار تعیین تیتر پایه در گروه سالم می‌باشد. از طرفی برخی از بیماری‌های دیگر به‌ویژه عفونت ناشی از سایر میکروارگانیسم‌های گرم منفی به‌خاطر دارابودن آنتی‌ژن‌های متقاطع باعث افزایش غیراختصاصی در عیار آنتی‌بادی‌های موجود در فرد می‌شوند، آنتی‌بادی به‌وسیله‌ی آنتی‌ژن‌های ناشی از ارگانیسم‌های همراه نیز افزایش می‌یابد و مثلاً در اثر تزریق واکسن نیز آنتی‌بادی‌های ضدسالمونلایی تولید می‌شوند. از این گذشته آنتی‌بادی‌های مورد بحث برای مدت بسیار طولانی در سرم باقی می‌مانند و لذا واکنش آگلوتیناسیون مثبت صرفاً به مفهوم تماس با میکروارگانیسم در روزهای اخیر یا گذشته‌ای دور می‌باشد. این موارد به‌طور کلی تفسیر نتایج را پیچیده می‌نماید (۱۳-۱۵). کشت ادرار نیز روش مناسبی برای تشخیص نیست زیرا سالمونلا به‌طور مداوم و مرتب از ادرار دفع نمی‌شود. در مورد کشت مدفوع نیز باید ذکر شود که در مناطق اندمیک، یافتن ارگانیسم‌ها در مدفوع بیماران تشخیص بیماری را تأیید نمی‌کند. در ضمن کشت مدفوع و ادرار اغلب بعد از هفته‌ی اول بیماری مثبت می‌شوند (۱۶، ۱۷).

با توجه به دلایل ذکرشده در مورد ناکارایی روش‌های تشخیص معمول، روش‌های نوین مولکولی به‌خصوص تکنیک PCR مناسب‌ترین، سریع‌ترین و دقیق‌ترین روش می‌باشد که معایب بیان شده در سطور پیشین در مورد سایر روش‌ها را ندارد و از اختصاصیت و حساسیت بسیار بالایی نیز برخوردار است؛ ضمن اینکه زمان لازم برای انجام آن یک ساعت تا یک روز می‌باشد (۱۸). در تحقیق حاضر ژن اختصاصی *viaB* باکتری سالمونلا تیفی انتخاب گردید. این ژن بر روی پلاسمید قرار دارد و کدکننده‌ی آنتی‌ژن vi که یک پلی‌ساکارید کپسولی است می‌باشد و اولین بار توسط Felix و Pitt کشف گردید. این پلی‌ساکارید که یک هموپلی‌مر خطی مرکب از α۱,۴ ۲-deoxy-۲-n-acetylgalactosamine uronic acid می‌باشد، در فعالیت باکتریسیدال سرم و فاگوسیتوز مداخله می‌نماید و لذا در ویرولانس میکروب نقش دارد. آنتی‌ژن vi در باکتری‌های سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا دوبلین و سیتروباکتر فروندی نیز وجود دارد ولی در تحقیق حاضر طراحی پرایمرها به‌گونه‌ای بود که به‌طور اختصاصی فقط ژن مورد نظر در باکتری سالمونلا تیفی را تکثیر می‌نماید و قادر به شناسایی و تکثیر این ژن در باکتری‌های نامبرده نمی‌باشد. برای اطمینان از این امر از سرویس BLAST سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) استفاده شد.

حد تشخیص پرایمرهای طراحی‌شده در این تحقیق ۱۹ کپی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR می‌باشد. تعیین حد تشخیص یکی از مهم‌ترین شاخص‌های اعتباربخشی کیت‌های تشخیص مولکولی می‌باشد و محققین از روش‌های مختلف برای محاسبه‌ی آن استفاده نموده‌اند. یکی از این روش‌ها، تهیه‌ی رقت‌های سریال از باکتری زنده و سپس شمارش آن‌ها و تعیین CFU می‌باشد (۱۹). در این روش استخراج ژنوم از رقت‌های مختلف باکتری انجام می‌شود و با انجام PCR حد تشخیص محاسبه می‌گردد. علی‌رغم اینکه این روش دقت بالایی دارد، اما مهم‌ترین نقطه‌ی ضعف آن نیاز به باکتری زنده است. به‌دلیل خطرناک بودن کار با باکتری، در این تحقیق از باکتری‌ها 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 درنهایت تخمین حد تشخیص می‌باشد. دقت پایین تخمین میزان غلظت قطعات بزرگ DNA (ژنوم باکتری) مهم‌ترین نقطه‌ی ضعف این روش می‌باشد. براساس مطالعات محققین مختلف، کلونینگ ژن هدف در پلاسمید و سپس تهیه‌ی رقت‌های سریال از آن و انجام PCR یکی از بهترین روش‌های تعیین LOD می‌باشد، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر نیز از این روش استفاده گردید.

در سال ۱۹۹۴ Song و همکاران به شناسایی سالمونلاتیفی با استفاده از روش Nested PCR مبتنی بر ژن Flagellin پرداختند (۸). همچنین در سال ۱۹۹۵ شارما به شناسایی سالمونلا تیفی به‌وسیله روش Nested PCR مبتنی بر توالی ژن *viaB* پرداخت و اعلام کرد که با استفاده از این روش این امکان وجود دارد که سالمونلا تیفی در حد یک سلول شناسایی شود (۲۰). یاشیموتو و همکارانش در سال ۱۹۹۵با استفاده از روش PCR و استفاده از ترادف ژن *viaB* نسبت به شناسایی باکتری سالمونلا تیفی اقدام نمودند. در سال ۱۹۹۷ چاودری و همکاران تحقیقی تحت عنوان استانداردسازی PCR برای شناسایی سالمونلا تیفی در تب تیفوئید، با استفاده از ژن Flagellin انجام دادند (۱۲). در سال ۲۰۰۱ هیروس و همکاران آزمایشی تحت عنوان تکثیر انتخابی ژنهای *viaB*، *prt*، *tyv* و fliC توسط Multiplex PCR برای شناسایی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی انجام دادند. در این تحقیق برای هر یک از ژن‌ها پرایمری طراحی و PCR انجام شد. در نهایت نتایج نشان داد که همه‌ی نمونه‌های استخراجی آزمایش‌شده‌ی سالمونلا انتریکا سرووار تیفی، به‌دقت توسط این آزمایش شناسایی می‌شوند (۲۱).

درسال ۲۰۰۴ سلطانی و همکاران به شناسایی سریع سالمونلا تیفی با استفاده از روش Multiplex PCR در ژن‌های *tyv*، *prt* و *invA* پرداختند. در نهایت مشخص شد که حساسیت این روش حدود $۲/۵ \times ۱۰^{۲}$ CFU/ml می‌باشد که می‌تواند به عنوان روش مناسب برای شناسایی سریع سالمونلا تیفی مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). در سال ۲۰۰۵ کرمی و همکاران به بررسی و تشخیص سریع باکتری عامل حصبه به روش Multiplex PCR بر اساس ژن‌های *tyv*، *prt* و *invA* و تعیین ردیف و مقایسه سکانس سویه‌ی جدا شده از ایران با بانک ژن پرداختند.پارکاش و همکاران در سال ۲۰۰۵ طی تحقیقی به ارزیابی Nested PCR در تشخیص تب تیفوئید پرداختند. در این تحقیق Nested PCR با استفاده از پرایمرهای h1-d که مخصوص سالمونلا انتریکا سرووار تیفی است با کشت خون و تست ویدال مقایسه شد. نتایج نشان داد که Nested PCR می‌تواند به عنوان یک روش استاندارد سریع در شناسایی تب تیفوئید مورد استفاده قرار گیرد (۲۳). اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۷ به شناسایی سالمونلا تیفی به‌وسیله‌ی Nested PCR در نمونه‌های خون، ادرار و مدفوع پرداختند. در این بررسی ۱۳۱ بیمار که دارای علائم کلینیکی تب تیفوئید بودند مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که PCR روی خون روش حساسی برای تشخیص تب تیفوئید است و PCR روی ادرار و مدفوع می‌تواند تست مکمل مفیدی باشد (۲۴).

با توجه به اهمیت و ضرورت تشخیص به‌موقع سالمونلا تیفی در کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری و به‌خصوص اهمیت این امر در بحران‌ها و جنگ‌های بیوتروریستی و ناکارآمد بودن روش‌های معمول شناسایی آن، روش تشخیص مولکولی می‌تواند عامل بیماری‌زا را در حداقل زمان و با دقت و حساسیت بالا تشخیص دهد و امکان مقابله با عملیات بیوتروریستی را در زمان مناسب فراهم آورد. همچنین در صورت شیوع بیماری، با تشخیص سریع می‌توان از بروز عوارض پایدار و مرگ‌آور جلوگیری کرد. پیشنهاد می‌شود در کیت‌های تشخیص بیماری به‌منظور جلوگیری از آلودگی نمونه‌های بیمار، کنترل مثبت مورد استفاده به گونه‌ای طراحی و کلون گردد که طول باند ایجاد شده در نتیجه‌ی انجام PCR و سپس الکتروفورز، متفاوت از طول باند بیماری باشد تا علاوه‌بر جلوگیری

از آلودگی، امکان انجام PCR در یک تیوب فراهم شود. برای این منظور باید بدون تغییر محل اتصال پرایمرهای جلویی و عقبی، طول باند افزایش و یا کاهش یابد، که این تحقیق توسط نویسندگان مقاله در حال انجام است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری‌های بی‌دریغ مسوولین دانشگاه، فرمانده‌هان مربوطه و پرسنل مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی آجا در اجرای این طرح پژوهشی، قدردانی و سپاسگزاری نمایند.

References

1- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull Word Health org. 2004;82 (5): 346-53.
2- Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, et al. Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays. J Bacteriol. 2004;186 (17): 5883-98.
3- Crum NF. Current trends in typhoid Fever. Current Gastroenterol Rep. 2003;5 (4): 279-86.
4- Purver R. Chemical and biological terrorism. The threat according to the open literature 1995; available at: www.csis-scrs.gc.ca/eng/miscdics/purv-e.html.
5- Connor BA, Schwartz E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. Lancet Infect Dis. 2005;5 (10): 623-8.
6- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. Nature. 2001;413 (6858): 848-52.
7- Deng W, Liou SR, Plunkett G 3rd, Mayhew GF, Rose DJ, Burland V, et al. Comparative genomics of Salmonella entericaserovarTyphi strains Ty2 and CT18. J Bacteriol. 2003;185 (7): 2330-7.
8- Chan K, Baker S, Kim CC, Detwiler C S, Dougan G, Falkow S. Genomic Comparison of salmonella enteric Serovars and salmonella bongori by use of an S. enteric serovar typhi murium DNA microarray. J Bacteriol. 2003;185: 553-3.
9- Bhutta, ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. BMJ. 2006; 333 (7558): 78-82.
10- Chiang YCH, Yang CH, Ho YCH, Lin CHK, Tsen HY. Identification of Bacillus spp., Escherichia coli, Salmonella spp. Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. Int J Food Microbiol. 2006;107 (2): 131-7.
11- Mochammad H, Smits H L. Detection Of Salmonella Typhi By Nested Polymerase Chain Reaction In Blood, Urine, And Stool Samples. Am J Trop Med Hyg. 2007;76 (1): 139–3.
12- Chaudhry R, Laxmi BV, Nisar N, Ray K, Kumar D. Standardisation ofpolymerase chain reaction for the detection of Salmonella typhi in typhoid fever. J Clin Pathol.. 1997;50 (5): 437-9.
13- Frankel G.Detection of Salmonella typhi by PCR..J Clin Microbiol. 1994;32 (5): 1415.
14- Ismail TF. Rapid diagnosis of typhoid fever. Indian J Med Res. 2006;123 (4): 489-92.
15- Olopoenia L, King A. Widal agglutination test - 100 years later: still plagued by controversy. Postgrad Med J. 2000;76 (892): 80-4.
16- Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever.BMJ. 2006; 333 (7558): 78-82.
17- Cunha BA., Typhoid fever: the temporal relations of key clinical diagnostic points. Lancet Infect Dis. 2006;6 (6): 318-20.
18- Nizami SQ, Bhutta ZA, Siddiqui AA, Lubbad L. Enhanced detection rate of typhoid fever in children in a periurban slum in Karachi, Pakistan using polymerase chain reaction technology. Scand J Clin Lab Invest. 2006;66 (5): 429-36.
19- Walia M, Gaind R, Mehta R, Paul P, Aggarwal P, Kalaivani M. Current perspectives of enteric fever: a hospital-based study from India. Ann Trop Paediatr. 2005;25 (3): 161-74.
20- Sharma KB. Detection of Salmonella typhiby Nested PCR Based on the ViaB Sequence. J Clin Microbiol.1995;33 (12): 3361.
21- Hirose K, Itoh K, Nakajima K, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya M, et al. Selective Amplification of tyv (rfbE), prt (rfbS), viaB, and fliC Genes by Multiplex PCR for Identification of Salmonella enterica Serovars Typhi and Paratyphi A. J Clin Microbiol. 2002;40 (2) 633–6.
22- Banavandi MJ, Shahhossein Y, Shahbazzadeh D, KarimI V, MirzahoseinI H, MahboudI F, Abachi M, Javadi G. Selective Amplification of prt, tyv and invA Genes by Multiplex PCR for Rapid Detection of Salmonella typhi. Iran Biomed J. 2005;9 (3): 135-8.
23- Prakash P, Mishra OP, Singh AK, Gulati AK, Nath G. Evaluation of nested PCR in diagnosis of typhoid fever. J Clin Microbiol. 2005;43 (1): 431–2.
24- Smits H, Hatta M, . Detection Of Salmonella Typhi By Nested Polymeras Chain Reaction In Blood, Urine, And Stool Sampls. Am J Trop Med Hyg. 2007;76 (1), 139-43.

A Polymerase Chain Reaction Method for Rapid Detection of Salmonella typhi

Amini. N[1], Soleimani. MS; PhD[2], Ghalyanchi Langeroudi. A; DVM, PhD[3], *Majidzadeh. K; MD, MPH, PhD[4]

Received: 2 Jun 2010 Accepted: 6 Sep 2010

Abstract

Background: Salmonella enterica serotype Typhi is the causative pathogen of typhoid fever. Morbidity and mortality rates of the disease are 16×106 and 6×105 cases per year, respectively. Proper diagnosis of the disease and its suitable treatment have critical roles in morbidity and mortality reduction, especially in the developing countries. The traditional methods for detection of the organism are time consuming with low sensitivity. The aim of the present study is to design a new polymerase chain reaction (PCR) method for rapid detection of the organism.

Materials and methods: Target specific viaB genes were used for primer designing using Generunner software. PCR tests were sat up using the standard Salmonella typhi genome. Besides, specificity of the method was determined using negative control bacterial genomes. For construction of positive control, determination of sensitivity of the method and limit of the detection, PCR products were cloned in a pTZ57RT plasmid vector.

Results: The agarose gel electrophoresis of PCR products showed 441 bands for the viaB genes. PCR tests for control negative genomes did not create any band on the agarose gel. Results of PCR, enzymatic digestion and sequencing confirmed the cloning process and the positive control construct.

Conclusion: Considering the disadvantages of the classic methods for detection of the organism and the advantages of the molecular methods, the diagnostic kit proposes a suitable tool for rapid detection of the Salmonella typhi.

Keywords: Salmonella Typhi,Typhoid fever, Polymerase chain reaction, viaB gene

1- Researcher, Islamic Azad University, Ghom, Iran.
2- Assistant Professor, Aja University of Medical Sciences, Dept. of Tasnim Biotechnology Center, Tehran, Iran.
3- Researcher, Aja University of Medical Sciences, Tasnim Center, Tehran, Iran.
4- (*Corresponding Author) Assistant Professor, Aja University of Medical Sciences, Medical Faculty, Tehran, Iran
Tel: 021-85955240 E-mail: k-majidzadeh@armyums.ac.ir