

## تشخیص همزمان سه باکتری سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس با راه اندازی مولتی پلکس پی سی آر

نرگس صفری فروشانی<sup>۱</sup>، دکتر علی کرمی<sup>۲</sup>، فاطمه پورعلی<sup>۳</sup>، دکتر اکرم عیدی<sup>۴</sup>

Karami@bmsu.ac.ir

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا.. (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

دریافت: ۹۱/۷/۱۲ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹

### چکیده

**زمینه و هدف:** سه باکتری سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس از پاتوژن‌های واقعی برای انسان محسوب می‌شوند و تشخیص به‌موقع و زود هنگام آن‌ها حائز اهمیت بسیاری است. سالمونلا تیفی باعث بیماری حصبه، باسیلوس آنتراسیس باعث سیاه زخم و یرسینیا پستیس سبب بیماری طاعون می‌شود. این سه نوع باکتری به‌عنوان عوامل بیولوژیک نظامی نیز استفاده می‌گردد. روش‌های کلاسیک تشخیص این باکتری‌ها طولانی و پیچیده است. مطالعه‌ی حاضر ارایه‌ی یک روش تشخیصی مولکولی جدید و سریع برای تشخیص همزمان این سه باکتری در یک واکنش مولتی پلکس پی سی آر می‌باشد.

**روش بررسی:** واکنش زنجیره ایی پلی مرارز (Polymerase Chain Reaction, PCR) برروی ژن‌های ویروالانس *invA*, *hp* سالمونلا تیفی، *Pa,chr* باسیلوس آنتراسیس و *pla* یرسینیا پستیس به صورت یونی پلکس و مولتی پلکس پی سی آر طراحی و انجام شد. *DNA* ژنومی از سایر باکتری‌ها جهت بررسی ویژگی پرایمر و آزمایش *PCR* استفاده شد. جهت بررسی حساسیت واکنش از دو روش شمارش کلنی و رقت ژنوم استفاده شد.

**یافته‌ها:** بررسی این روش با سویه‌های استاندارد مشخص نمود که پرایمرها اختصاصی است و محصولات با اندازه‌ی مورد نظر تولید گردید. بررسی حساسیت روش نشان داد که این روش قادر است ۱ تا ۱۰ کپی ژنوم و یا ۱ تا ۱۰ واحد کلنی برای هر کدام از این باکتری‌ها به‌طور اختصاصی تشخیص دهد. برای تایید محصولات ایجاد شده در *PCR* تمام قطعات به‌جز محصول *1083bp* باسیل آنتراکس تعیین ترادف شدند و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ برش آنزیمی تایید گردید.

**نتیجه‌گیری:** براساس این مطالعه روش طراحی شده ابزاری دقیق، سریع و کم هزینه برای جستجو و تشخیص این باکتری‌ها از سایر باکتری‌های هم‌خانواده و تشخیص سریع این سه عامل در نمونه‌های مختلف و جستجو و تشخیص این باکتری‌ها را در موارد بیوتروریستی فراهم می‌کند.

**واژگان کلیدی:** تشخیص، باسیلوس آنتراسیس، سالمونلا تیفی، یرسینیا پستیس، مولتی پلکس پی سی آر.

### مقدمه

که پتانسیل بالایی برای بیماری‌زایی انسان دارند و بیماری‌زای واقعی برای انسان هستند. برای مقابله با این عوامل بیماری‌زا

سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس به‌عنوان عوامل گروه A باکتری‌های بیماری‌زا شناخته می‌شوند

۱- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران،

۲- دکترای تخصصی بیولوژی مولکولی، استاد مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج

۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله،

۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد علوم تحقیقات تهران

تشخیص و درمان سریع از اهمیت بسیاری برخوردار است. سالمونلا تیفی عامل حصبه یا تیفوئید است که بیش از ۱۶ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا و سبب حدود ۶۰۰ هزار مورد مرگ می باشد (۱). همه‌ی سالمونلاها به استثنای سالمونلا تیفی که فقط سبب بیماری زایی در انسان و نخستی‌های عالی می باشد برای انسان، پستانداران و پرندگان بیماری‌زا می باشد به همین جهت سرایت آن از طریق آب، مواد غذایی، مدفوع و ادرار انسان، پستانداران و پرندگان بیمار و آلوده می باشد (۲). سیاه زخم یا شاربن بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است که توسط باسیلوس آنتراسیس ایجاد می گردد، این بیماری دامی در تمام نقاط جهان مشاهده می گردد و باکتری به طور غیر مستقیم از محصولات دامی آلوده یا به طور مستقیم توسط اسپور باسیل سیاه زخم به انسان منتقل می شود. سیاه زخم به چهار شکل پوستی، ریوی، گوارشی و مننژیت دیده می شود این باکتری به دلیل خصوصیات ویژه آن که عبارت از داشتن اسپور، حدت بالا، سهولت تولید انبوه و به کارگیری در صدر عوامل خطرناک سلاح‌های بیولوژیک و بیوتروریسم قرار دارد (۳). طاعون بیماری مهلک و خطرناکی است که به دنبال آلودگی با باکتری یرسینیا پستیس در اغلب جوندگان و انسان ایجاد می شود (۴). این باکتری کوکوباسیل گرم منفی، فاقد حرکت و اسپور می باشد که به طور معمول به شکل مرضی همه گیر بین جوندگانی مانند موش منتقل می شود (۵). عامل بیماری از طریق گزش اکتوپارازیت‌های آلوده، به ویژه کک به انسان قابل انتقال است (۶ و ۷). بیماری به سه شکل بالینی خیارکی، سپتیمی، تنفسی ظاهر می شود. فرم تنفسی شدیدترین حالت بالینی بیماری را ایجاد می کند، این حالت از بیماری بیشترین موارد مرگ و میر را به همراه دارد و به راحتی از انسان به انسان قابل انتقال است (۸). برای تشخیص آزمایشگاهی باکتری عامل حصبه در نمونه‌های کلینیکی از کشت خون، مغز استخوان، سوپ رکتال و کشت مدفوع و کشت ادرار و

همچنین آزمایشات دیگری چون الیزا و ایمونوفلورسنت استفاده می گردد (۹ و ۱۰). تشخیص و شناسایی عامل سیاه زخم به دلیل شباهت بسیار به باسیل‌های غیربیماری‌زای موجود در خاک مشکل و وقت گیر است و تنها آزمایشگاه‌های پیشرفته و مرجع قادر به شناسایی دقیق آن می باشند و در عین حال در روش‌های متداول تعیین حدت در حیوان آزمایشگاهی ضروری است که علاوه بر وقت گیر بودن نیاز به تاسیسات و امکانات ایمنی زیستی خاص کار با عوامل خطرناک را دارد و مشکلات و خطراتی را برای افرادی که با این عامل کار می کنند، فراهم می سازد (۱۱). در تشخیص عامل طاعون از انجام تست‌های بیوشیمیایی، بررسی حساسیت به باکتریوفاز اختصاصی، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی و کشت در محیط‌های اختصاصی استفاده می شود، از طرف دیگر در دسترس نبودن روش‌های مناسب برای انتقال نمونه‌ها از مناطق آلوده به مراکز تشخیصی ممکن است باعث خشک شدن آن‌ها، آلودگی نمونه‌ها یا مرگ باکتری‌ها گردد (۱۲). روش‌های معمول چون کشت باکتری استاندارد طلایی از روش‌های رایج برای تشخیص باکتری می باشد تمام این روش‌های رایج باکتریولوژیک وقت گیر و غیرقابل استفاده در جهت تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری است (۱۳). درحالی که در روش‌های مولکولی می توان بدون نیاز به این گونه بررسی‌ها به طور مستقیم در زمانی بسیار کوتاه اقدام به شناسایی عامل عفونی ویرولان نمود. بنابراین، روش‌های متداول در حملات بیولوژیک و بیوتروریستی فاقد ارزش بوده و نیاز به روش‌های تشخیصی سریع در کمتر از چند ساعت می باشد که بتوان اقدامات درمانی و پیشگیری از شیوع بیماری را اعمال نمود، و این روش‌ها کاربرد گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیز دارد. فقدان توانایی تشخیص سریع عوامل بیولوژیک سبب گردیده است که این عامل از نظر میزان صدمات و تهدیدات هم سنگ با سلاح‌های هسته‌ای و خطرناک‌تر به دلیل شیوع

به مناطق دیگر و حتی همه‌گیری جهانی باشد (۱۴).

### روش بررسی

سویه‌ها به صورت استاندارد از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت و انستیتو پاستور تهران تهیه شد، به دلیل خطرات کاری با سویه‌ی ویرولان از سوش غیر ویرولان باسیلوس آنتراسیس موسوم به اشترن یا سویه‌ی واکسن دامی استفاده گردید که از نظر میکرب شناسی هیچ تفاوتی با سویه‌ی وحشی ندارد. ولی از نظر مولکولی صرفاً فاقد یکی از پلاسمیدهای ویرولان است و به جهت ایمنی به جای سویه‌ی وحشی در آزمایشات تشخیصی از آن استفاده می‌شود. باکتری یرسینیا پستیس سویه‌ی جدا شده از کردستان ایران موسوم به KIM و سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت. نمونه‌هایی که به عنوان کنترل منفی استفاده شد از آزمایشگاه انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. لیست و شماره‌ی سویه آن‌ها در جدول ۱ توضیح داده شده است. مواد شیمیایی از (شرکت مرک)،  $MgCl_2$ ، بافر، نوکلئوتیدها و آنزیم Taq از (شرکت سیناژن) تهیه گردید. در این تحقیق از دستگاه Mastercycler Gradient (ساخت شرکت اپندورف آلمان) جهت چرخه‌های حرارتی استفاده شد. از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک (ساخت شرکت پایا پژوهش) (مشهد) و منبع تغذیه آن با بافر TBEX ۰/۵ جهت الکتروفورز استفاده شد. جهت بررسی ژل از دستگاه UVIdoc (ساخت شرکت UVItac انگلیس) استفاده شد. مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاز شامل باند ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، جفت باز استفاده شد.

**طراحی پرایمر:** برای سالمونلا تیفی بر اساس ردیف دو بخش اساسی از ژنوم باکتری سالمونلا تیفی در حقیقت براساس ژن هدف invA و hp، برای آنتراکس بر اساس دو بخش اساسی تشکیل دهنده‌ی ژنوم باسیل آنتراکس، pA و chr، برای یرسینیا پستیس براساس یک بخش اساسی ژنوم تشکیل

دهنده‌ی باکتری عامل طاعون، pla طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد و با استفاده از نرم‌افزارهای DNAsis (HITACHI, TOKYO, japon)، Blast، ۶/۷۱ Version و OLIGO از نظر ساختار و شباهت با سایر میکروارگانیسم‌های مشابه بررسی و انتخاب گردید (۱۶). همچنین مکان پرایمرها بر روی ژنوم و اندازه قطعه‌ی تکثیر یافته و ژن هدف در جدول ۲ توضیح داده شد. در جدول ۳، سکانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق نوشته شد. پرایمرهای دریافتی براساس غلظت ذکر شده توسط شرکت سازنده پرایمر، در آب مقطر تزریقی با غلظت ۱۰۰ پیکومول تهیه شده و سپس رقت ۲۰ پیکومول از آن غلظت تهیه و جهت استفاده درمنهای ۲۰ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شد.

**کشت و استخراج DNA:** باکتری‌های تهیه شده در محیط کشت جامد و محیط مایع لوریا، تلقیح و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت شد. علاوه بر بررسی کلونی‌ها از نظر شکل و ساختار و به خصوص ویژگی‌های کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی نیز انجام گرفت. سپس از ۱/۵ تا ۵ میلی‌لیتر از کشت مایع DNA ژنومی به روش‌های متداول (۱۵) استخراج گردید. روش استخراج DNA به این صورت انجام شد که ۱/۵ سی‌سی از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط LB را داخل لوله‌ی اپندورف ریخته و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و به رسوب ۲۰۰ لاندا از بافر STE اضافه کرده، کاملاً مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌دهیم. ۲۰۰ ماکرولیتر بافر لیز کننده ۲ درصد SDS به سوسپانسیون اضافه کرده و محلول را به شدت با ورتکس تکان دادیم. ۲۰۰ ماکرولیتر استات سدیم به لوله اضافه و ۱۰ بار تکان داده و سپس به مدت ۵ دقیقه با سانتریفوژ یخچالدار در دور ۱۰۰۰۰ rpm رسوب را از مایع شفاف رویی جدا کردیم. محلول رویی که حاوی DNA کروموزومی است به لوله‌ی تازه منتقل شد. هم حجم محلول

پرایمرهای ژن‌های *hp*، *invA*، *salmonella* تیفی، *pa* و *chr* آنتراکس و *pla* یرسینیا، جهت تشخیص باکتری‌های مورد نظر، واکنش PCR با شرایط فوق بر روی ژنوم استخراج شده باکتریهای کنترل منفی انجام شد.

**تعیین حساسیت:** جهت بررسی میزان حساسیت PCR، از دو روش شمارش کلونی و غلظت DNA استفاده شد.

**تایید محصول PCR:** به دو روش برش آنزیمی محصول PCR و تعیین ردیف محصول PCR (سکانسینگ) انجام شد. محصول  $1083\text{bp}$  با سایل آنتراکس، که واجد سایت برش *HindIII* می‌باشد، از طریق برش آنزیمی به روش ذیل تایید شد به این صورت که به لوله‌ی حاوی ۱ میکرولیتر آنزیم *HindIII* و بافر آنزیم، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR اضافه شده و با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید و این مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن در ژل آگارز بررسی گردید و بقیه‌ی محصولات تکثیر شده همراه با پرایمرهای جلویی و عقبی آن‌ها برای سکانسینگ به شرکت مربوطه ارسال گردید.

**آنالیز سکانس:** ردیف‌های دریافتی شامل سکانس حاصل از پرایمرهای F و R هر قطعه از نظر دقت و هم‌پوشانی با هم بررسی گردید. با توجه به کوتاهی اندازه‌ی قطعات انتظار بود که مقدار زیادی هم‌پوشانی وجود داشته باشد. برای شناسایی هم‌پوشانی از برنامه‌ی DNASIS Ver2/6 ساخت شرکت هیتاچی استفاده شد. بدین شکل که فایل نوشتاری سکانس پرایمر F با Reverse Complement سکانس پرایمر R مقایسه گردید و با استفاده از برنامه ALIGN به هم متصل و با ویرایش آن سکانس اصلی برای هر قطعه حاصل شد. سکانس‌های حاصل با برنامه‌ی BLAST2،2.9 (۱۶) با بانک ژن مقایسه و شباهت‌ها و تفاوت‌ها شناسایی گردید. از برنامه DNASIS نیز جهت مقایسه‌ی دو سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس مرجع و شناسایی میزان شباهت و

رویی جدا شده ایزوپروپانل اضافه و لوله را به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه کردیم. سپس لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و در ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ کردیم. بعد از سانتریفوژ محلول رویی را دور ریخته و بعد از خشک شدن رسوب به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در فور ۶۰ تا ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۱۰۰ لاندا آب مقطر استریل حل شد. محلول را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت دادیم. سپس لوله را به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و از محلول شفاف رویی ۵ لاندا جهت PCR استفاده گردید (۱۵).

**انجام مولتی پلکس PCR:** واکنش PCR جهت ارزیابی ژن‌های هدف و با شرایط برقراری واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقدار ۱ پیکومول از نمونه‌ی ژنومی تهیه شده به لوله‌های حاوی ترکیبات مندرج در جدول ۴ اضافه شده و در دستگاه Master Cycler اپندورف قرار گرفته و با برنامه زیر PCR انجام گردید، که شامل مرحله‌ی اول ۱ چرخه ۷ دقیقه در دمای ۹۴ و سپس ۳۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۵ درجه دمای اتصال پرایمرها ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و مرحله‌ی نهایی در ۷۲ درجه ۷ دقیقه صورت گرفت. قبل از انجام مولتی پلکس پی سی آر ابتدا تک تک میزان مواد و مراحل پی سی آر بهینه شدند بعد از به دست آوردن مناسب‌ترین میزان مواد و شرایط بهینه برای مولتی پلکس پی سی آر، میزانی که در جدول ۴ نوشته شده به دست آمد. پس از اتمام واکنش آمپلیفیکاسیون، در ۰/۵ X TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید و پس از شستشو بر روی دستگاه ماورای بنفش بررسی گردید. لازم به ذکر است که واکنش برای هر سه باکتری هم به صورت یونیپلکس و هم مالتیپلکس انجام شد.

**تعیین اختصاصیت:** برای به دست آوردن اختصاصیت

نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که پرایمرهای اختصاصی سه باکتری یرسینیا پستیس، آنتراکس، و سالمونلا تیفی موریوم با باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا سونئی، اشرشیاکلی، انتروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروچینوزا، سیتروباکترفروندی، سراشیا مارسسنز، کلبسیلا پنومونیا که به عنوان کنترل منفی استفاده شدند، مورد PCR قرار گرفتند که هیچ باندی ایجاد نکردند و این نشان دهنده‌ی اختصاصی بودن این پرایمرهاست.

**تعیین حساسیت:** محاسبه‌ی غلظت ژنوم با دستگاه نانو دراپ مشخص نمود که غلظت DNA ژنومی معادل ۷۵ نانوگرم در میکرولیتر می‌باشد همچنان که در شکل ۴ دیده می‌شود، بررسی با رقت‌های مختلف تا رقت  $10^{-4}$  ژنوم با ۵ جفت پرایمر اختصاصی باند مناسب را نشان می‌دهد که حساسیت روش بسیار مناسب است و با توجه به اینکه تعداد کپی ژنوم برابر  $10^7 \times 1/5$  در ۷۵ نانوگرم است، در واقع هر نانوگرم ژنوم واجد  $2 \times 10^6$  کپی می‌باشد. در نتیجه حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ کپی است و چون هر باکتری یک کپی از ژنوم را دارد، بنابراین حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ باکتری می‌باشد. بررسی حساسیت به روش شمارش کلنی نیز این نتیجه را تایید نمود.

تفاوت نوکلئوتیدهای دوسکانس استفاده شد (۱۶).

## یافته‌ها

### Multiplex PCR و Uniplex سویه های استاندارد:

همچنان که در شکل ۱ دیده می‌شود؛ نتیجه‌ی بررسی نمونه‌ها با ۴ جفت پرایمر نشان داد که پرایمرها به شکل یونی پلکس و مولتی پلکس چهار باند با اندازه‌های ۱۶۴، ۸۹، ۵۲۰ و ۱۰۸۳ جفت باز را در سویه‌های آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلاتیفی با پرایمر T، یرسینیا پستیس با پرایمر F و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ ایجاد کرده است. شکل ۲، بررسی نمونه‌ها با ۴ جفت پرایمر را نشان داده که پرایمرها به شکل یونی پلکس و مولتی پلکس چهار باند با اندازه‌های ۱۶۴، ۳۷۳، ۵۲۰، ۱۰۸۳ جفت باز را در سویه‌های آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا تیفی با پرایمر S۱۲، یرسینیا پستیس با پرایمر F و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ ایجاد کرده است. Multiplex PCR شکل ۳ مولتی پلکس پی‌سی‌آر هر سه سویه استاندارد باکتری‌های مورد نظر را نشان داد به‌طوری‌که با پنج جفت پرایمر اختصاصی PCR انجام گرفته است که حضور تمام قطعات مورد انتظار را نشان داده است. بررسی اختصاصی بودن PCR. باتوجه به شکل ۱، ۲، ۳ که نتایج اختصاصی بودن مولتی پلکس پی‌سی‌آر و پرایمرها را نیز

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

| نام میکروارگانیسم             | شماره سویه | محل تهیه     |
|-------------------------------|------------|--------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 25923 | pasture Iran |
| <i>Shigella sonnei</i>        | ATCC 9290  |              |
| <i>Esherichia coli</i>        | ATCC 25922 |              |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | ATCC 29212 |              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |              |
| <i>Citrebacter freundii</i>   | PTCC 1600  |              |
| <i>Serratia marcesens</i>     | PTCC 1111  |              |
| <i>Klebsiella pneumonia</i>   | ATCC 7881  |              |

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

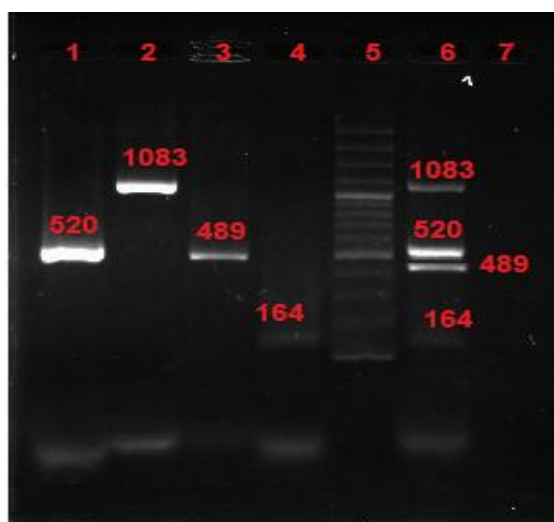
| شماره پرایمر            | جایگاه ژن، پلاسمید/کروموزوم | اندازه محصول     | پروتئین |
|-------------------------|-----------------------------|------------------|---------|
| S۱۲-S۱۳ سالمونلا        | کروموزوم                    | ۳۷۳bp            | invA    |
| T سالمونلا              | کروموزوم                    | ۴۸۹bp            | hp      |
| HindIII آنتراکس ۱۲۵/۱۲۶ | PXO۱                        | ۱۰۸۳ bp واجدسایت | pA      |
| ۱۲۹-۱۳۰ آنتراکس         | کروموزوم                    | ۱۶۴ bp           | chr     |
| Yer یرسینیا             | pPst۱                       | ۵۲۰ bp           | pla     |

جدول ۳: سکانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

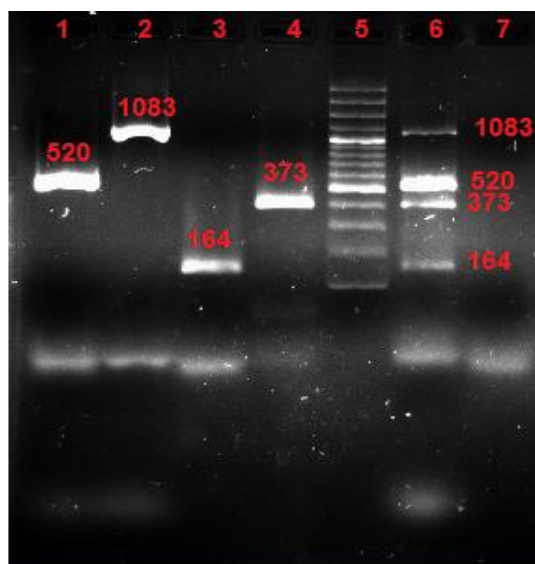
|                |                                 |
|----------------|---------------------------------|
| S۱۲F:          | gta ttg ttg att aat gag atc cg  |
| S۱۳R:          | ata tta cgc acg gaa aca cgt t   |
| Salmonella TF: | tgt ccg ctg tct gaa gtc atc     |
| Salmonella TR: | atc tca ggc aaa ctc aca agg g   |
| Antherax ۱۲۵:  | tta atg cga ttg tct acg at      |
| Antherax ۱۲۶:  | gat caa ttg cga ccg tac ttg aa  |
| Antherax ۱۲۹:  | ccc agg ggg aca aac gat agc tcc |
| Antherax ۱۳۰:  | aac gat agc tcc tac att tgg ag  |
| Yersinea YerF: | tgg act tgc agg cca gta tcg c   |

جدول ۴: مقادیر و ترکیبات استفاده شده در فرایند مولتی پلکس PCR

| ردیف | مواد                 | مقدار        |
|------|----------------------|--------------|
| ۱    | آب مقطر تزریقی       | ۱۷/۶ پیکومول |
| ۲    | بافر ۱۰ x            | ۲/۵ پیکومول  |
| ۳    | Mgcl۲mM              | ۱ پیکومول    |
| ۴    | dNTPmix (۱۰۰mM each) | ۰/۵ پیکومول  |
| ۵    | پرایمر F             | ۱ پیکومول    |
| ۶    | پرایمر R             | ۱ پیکومول    |
| ۷    | DNA                  | ۱ پیکومول    |
| ۸    | انزیم Taq            | ۲۰۵ یونیت    |
| ۹    | جمع                  | ۲۵ پیکومول   |



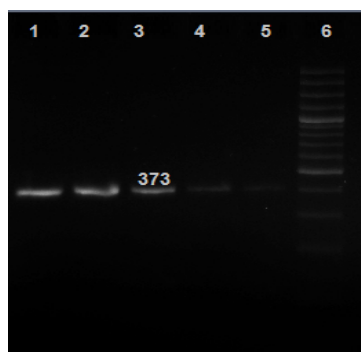
شکل ۱: نتایج Multiplex PCR و Uniplex، خانه‌ی شماره‌ی ۱: یرسینیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه باند ۵۲۰). خانه‌ی شماره‌ی ۲: آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی شماره‌ی ۳: سالمونلا با پرایمر T (اندازه باند ۴۸۹). خانه‌ی شماره‌ی ۴: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴). خانه‌ی شماره‌ی ۵: وزن مولکولی. خانه‌ی شماره ۶: مولتی پلکس پی‌سی‌آر با چهار جفت پرایمر اختصاصی یرسینیا پستیس Yer، آنتراکس ۱۲۵، سالمونلا T، آنتراکس ۱۲۹ خانه‌ی شماره ۷: کنترل منفی.



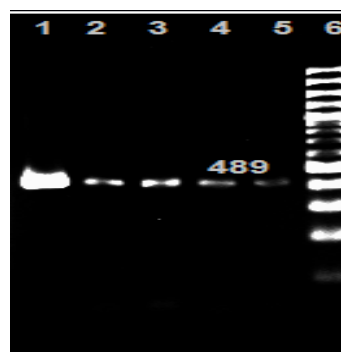
شکل ۲: نتیجه‌ی Multiplex PCR و Uniplex را با ۴ جفت پرایمر نشان داده است. خانه‌ی ۱: یرسینیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه باند ۵۲۰). خانه‌ی ۲: آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی ۳: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴). خانه‌ی ۴: سالمونلا با پرایمر S۱۲ (اندازه باند ۳۷۳). خانه‌ی ۵: وزن مولکولی خانه‌ی ۶: مولتی پلکس پی‌سی‌آر با چهار جفت پرایمر اختصاصی که عبارت است از: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا با پرایمر S۱۲، یرسینیا پستیس با پرایمر Yer، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵. خانه‌ی ۷: کنترل منفی.



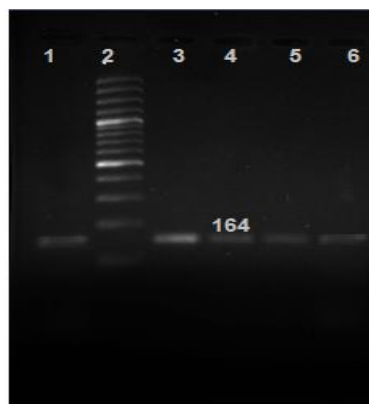
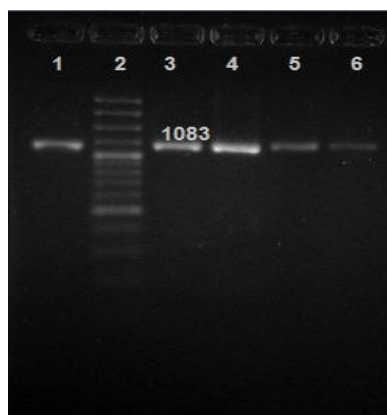
شکل ۳: نتایج Multiplex PCR با پنج جفت پرایمر اختصاصی را نشان داده است. خانه ۱: مولتی پلکس پی سی آر، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه‌ی باند ۱۶۴)، سالمونلا با پرایمر S ۱۲ (اندازه‌ی باند ۳۷۳)، سالمونلا با پرایمر T (اندازه‌ی باند ۴۸۹)، پرسیپتیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه‌ی باند ۵۲۰)، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه‌ی باند ۱۰۸۳). خانه ۲: وزن مولکولی خانه ۳: کنترل منفی



شکل ۴-ب

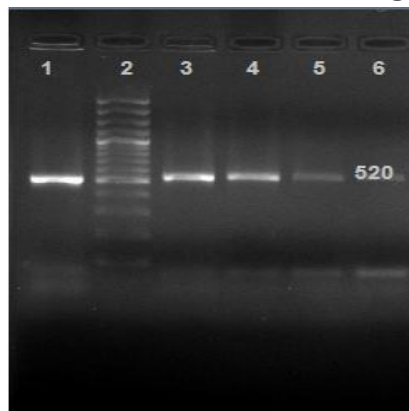


شکل ۴-الف



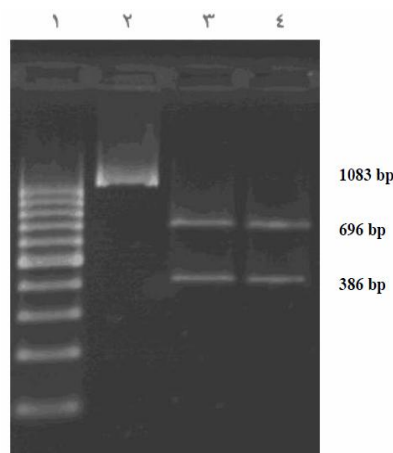


شکل ۴-ج شکل ۴-د



شکل ۴-ه

شکل ۴: نتایج مربوط به رقت سریال DNA با جفت پرایمر T سالمونلا تیفی (اندازه‌ی باند ۴۸۹) (شکل ۴-الف)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر S12/13 (اندازه‌ی باند ۳۷۳) (شکل ۴-ب)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر ۱۲۹ آنتراکس (اندازه‌ی باند ۱۶۴) (شکل ۴-ج)، رقت سریال DNA با جفت پرایمر ۱۲۵ آنتراکس (اندازه‌ی باند ۱۰۸۳) (شکل ۴-د) و رقت سریال DNA با جفت پرایمر Yersinia pestis (اندازه‌ی باند ۵۲۰) (شکل ۴-ه). سالمونلا با پرایمر T و S12 (شکل ۴-الف و ب): خانه‌ی ۱. نمونه ژنوم خالص. خانه‌ی ۲. DNA با رقت  $10^{-1}$ ؛ خانه‌ی ۳. DNA با رقت  $10^{-2}$ ، خانه ۴. DNA با رقت  $10^{-3}$  خانه‌ی ۵. DNA با رقت  $10^{-4}$  خانه‌ی ۶. وزن مولکولی. آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳) (شکل ۴-د)، ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴) (شکل ۴-ج) و Yersinia pestis با پرایمر Yers (اندازه باند ۵۲۰) (شکل ۴-ه): خانه‌ی ۱. DNA خالص. خانه‌ی ۲. وزن مولکولی. خانه‌ی ۳. DNA با رقت  $10^{-1}$ ، خانه‌ی ۴. DNA با رقت  $10^{-2}$ ، خانه‌ی ۵. DNA با رقت  $10^{-3}$ ، خانه‌ی ۶. DNA با رقت  $10^{-4}$



شکل ۵: برش محصول ۱۰۸۳bp واکنش PCR توسط آنزیم HindIII

آنزیم محدودالثر برش دهنده HindIII، دوقطعه با اندازه‌های ۶۹۶bp و ۳۸۶bp حاصل می‌شود که تایید کننده‌ی درستی

تایید محصول واکنش Multiplex PCR آنتراکس با پرایمر ۱۲۵: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول ۱۰۸۳ bp توسط

محصول ایجاد شده توسط پرایمرهاست (شکل ۵). مقایسه‌ی ترادف محصول PCR پرایمرهای ۱۲ و ژن *invA* از بانک ژنرشته فوقانی سکانس حاصل از محصول PCR و رشته‌ی تحتانی سکانس ژن مرجع می‌باشد. نوکلئوتیدهای متفاوت با حروف درشتتر در جایگاه ۱۲۴، ۲۳۲ و ۲۳۳ مشخص گردیده است. خانه‌ی ۱. وزن مولکولی، خانه‌ی ۲. محصول واکنش PCR، ۱۰۸۳bp. خانه‌ی ۳. محصول هضم شده توسط آنزیم *HindIII*. خانه‌ی ۴. محصول هضم شده توسط آنزیم *HindIII*

### بحث

در این بررسی از نمونه‌های استاندارد استفاده شد که پرایمرهای انتخاب شده به‌طور اختصاصی قادر به تشخیص ژنوم عامل ویرولان این سه باکتری و همچنین نمونه‌ی مستقیم بوده و هیچ‌گونه پاسخی با سایر باکتری‌های هم خانواده و یا باکتری‌های دیگری که ممکن است در نمونه‌ی کلینیکی وجود داشته باشد، ایجاد نکرده‌اند و اندازه‌ی قطعات پرایمرهای انتخاب شده به نحوی است که امکان تفکیک چهار قطعه با اندازه‌های ۱۶۴، ۳۷۳، ۴۸۹، ۵۲۰، ۱۰۸۳ جفت باز به سه سهولت با سیستم عادی آگارز ژل الکتروفورز با غلظت ۱ تا ۱/۵ درصد وجود دارد. با استفاده از این روش امکان تشخیص سریع ژنوم، تهیه‌ی مخلوط واکنش، انجام چرخه‌های PCR سریع الکتروفورز (حاوی ماده اتیدیوم بروماید) و بررسی نتیجه در دستگاه UV در کمتر از ۹۰ دقیقه وجود دارد. در روش‌های متداول، تشخیص سالمونلاها نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد اما در این روش تشخیص بسیار سریع انجام می‌شود (۹). در یک تحقیق مشابه از روش PCR جهت تشخیص عامل حصبه و تفکیک آن از سایر انتروباکتریاسه‌ها و همچنین سایر سالمونلاها استفاده شده است که تنها یک نوع باکتری که همان عامل حصبه است، مورد شناسایی قرار گرفت. اما در

روش تحقیق اخیر سه گونه مختلف از خانواده‌های متفاوت باکتری‌ها با تفاوت‌های ظاهری و بالینی متفاوت به‌طور همزمان در یک لوله آزمایش مورد شناسایی قرار گرفت (۱۷). محققین جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی بر اساس ردیف ژن‌های شناخته شده، *tyv, fliC- d, fliC-a, viaB, prt, spvC* را طراحی و بررسی نمودند (۱۸). تفاوت این تحقیق با تحقیق حاضر این است که پرایمرهای مختلفی مورد طراحی قرار گرفت که زمان بر هستند و کار دشوارتر است و ژن‌های مورد استفاده تنها ژن‌های ویرولان بودند که حتما باید از نمونه‌های بالینی آلوده تهیه شوند، اما در نتایج آزمایش حاضر هم می‌توان از ژن‌های ویرولان و هم غیر ویرولان برای تشخیص بیماری استفاده کرد. در یک بررسی با پنج جفت پرایمر مبتنی بر ژن‌های *prt(rfbS), viaB, fliC, tyv(rfbE)* و با روش مولتی پلکس به خوبی قادر به تشخیص عامل سالمونلا بوده است (۱۹). تعداد پرایمرهای این روش زیاد بوده و در عین حال روش به‌کار گرفته شده PCR عادی با سرعت متداول است. روش‌های بسیار مختلفی نیز جهت تشخیص عامل آنتراکس در نمونه‌های کلینیکی دامی و محیطی استفاده شده است. روش‌های استاندارد موجود جهت تشخیص نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد (۲۰-۲۲). از روش‌های مختلف مولکولی برای تشخیص باکتری عامل آنتراکس و تفکیک آن از سایر باسیلوس‌ها استفاده شده است. اما بهترین روش برای تشخیص عامل آنتراکس همان روش مولکولی استفاده از تکنیک پی سی آر است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به علت استفاده از فاکتور زمان که بسیار حیاتی است برای تشخیص به‌موقع و زود هنگام این بیماری برای جلوگیری از اپیدمی شدن بیماری به خصوص پخش اسپور آنتراکس در هوا که در بمبهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳-۲۸). هینباج و شوام در سال ۱۹۹۳ در مطالعات

استفاده کرد. عامل اساسی در به کارگیری عملی از روش PCR شناسایی پرایمرهای اختصاصی است. طراحی پرایمر نیازمند بررسی جایگاه‌های بسیاری است که محققین جهت طراحی پرایمر و پروب‌های مناسب از بخش‌های مختلفی از توالی‌های موجود استفاده کردند.

### نتیجه گیری

براساس نتایج این تحقیق روش مولتی پلکس پی‌سی‌آر می‌تواند جهت تشخیص سریع و همزمان سه باکتری سالمونلا تیفی موریوم، باسیلوس آنتراسیس ویرسینیا پستیس از سایر باکتری‌های مشابه یا هم خانواده آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند، و با توجه به اینکه از این سه عامل به عنوان سلاح‌های میکروبی و خطرناک می‌توان نام برد، این مطالعه می‌تواند ابزاری برای تشخیص سریع، دقیق و کم هزینه برای ردیابی این باکتری‌ها در مواردی مانند عملیات بیوتروریستی و یا جنگ‌های میکروبی فراهم نماید. اختصاصیت روش بسیار بالا است، به طوری که قادر است یک نوع باکتری را در بین هزاران نوع باکتری متفاوت تشخیص دهد. انجام این روش بسیار ساده است و با توجه به اینکه به طور همزمان صورت می‌گیرد نیاز به انجام PCR های متعدد جهت تشخیص هر عامل به طور جداگانه نمی‌باشد. با توجه به تجارب ده سال گذشته کسب شده در این مرکز و بهینه سازی‌های انجام شده در مورد تک تک عوامل، انجام PCR ترکیبی جهت تشخیص سریع و همزمان چند عامل در نمونه‌های مجهول از مزایایی ارزشمند این روش است. از این روش می‌توان در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی عوامل عفونی و یا آزمایشگاه‌های سیار تهیه شده جهت بحران‌ها و شرایط خاص استفاده نمود و همچنین در آزمایشگاه‌های مرجع تشخیص عوامل می‌تواند کمک بزرگی به تشخیص همزمان عوامل در یک واکنش نماید. با توجه به اینکه در جهان تا کنون چنین روشی برای تشخیص همزمان و سریع سه عامل ذکر شده

خود برای بررسی ژنوم باکتری یرسینیا پستیس در تحت گونه‌های مختلف آسیا، آفریقا و آمریکا از پرایمرهای ژن *pla* جهت شناسایی قطعی باکتری استفاده کردند و نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که انجام واکنش PCR در جهت نیل به اهداف تشخیصی و کنترل بیماری و بررسی‌های اپیدمیولوژی قابل استناد است. تفاوت با آزمایش حاضر در این است که روش مورد استفاده تنها یونی پلکس پی‌سی‌آر است؛ اما تحقیق ما روش مولتی پلکس پی‌سی‌آر استفاده شده که باعث صرفه‌جویی در زمان و مواد مورد استفاده و تشخیص گونه‌های مختلف باکتری‌ها همزمان با هم شده است (۲۹). انگلتال و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی باکتری عامل طاعون، روش PCR را با روش تلقیح به حیوان آزمایشگاهی مقایسه کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که شناسایی باکتری عامل طاعون با روش PCR نه تنها مشکلات منفی کاذب را به دلیل مقاومت برخی از حیوانات آزمایشگاهی به یرسینیا پستیس ایجاد نمی‌کند بلکه روشی مقرون به صرفه از نظر هزینه‌ای امکانات و زمان می‌باشد. بنابراین نتیجه گرفتند که این روش نسبت به روش‌های معمول تشخیصی همچون کشت باکتریولوژی و تلقیح به حیوان آزمایشگاهی بسیار حساس‌تر و دقیق‌تر است و می‌تواند یک روش مناسب در جهت تشخیص، کنترل و مراقبت بیماری طاعون به شمار آید (۳۰). روش مولتی پلکس نسبت به روش یونی پلکس نه تنها کم هزینه‌تر و سریع‌تر می‌باشد؛ بلکه موارد منفی کاذب را نیز به طور کامل حذف خواهد کرد. در این تحقیق که بر اساس ژن‌های *invA* و *hp* سالمونلا تیفی، *pA* و *chr* آنتراکس و *pla* یرسینیا پستیس انجام شد، تمامی این ژن‌ها با توجه به پرایمر اختصاصی خود مورد شناسایی قرار گرفت. با توجه به پیشرفت‌های عظیم در عرصه‌های مولکولی از این روش‌ها مثل مولتی پلکس پی‌سی‌آر می‌توان جهت تشخیص عوامل مختلف عفونی از جمله تشخیص این سه عامل آنتراکس، سالمونلا تیفی موریوم، یرسینیا پستیس

بقیه الله (عج) و اساتید و همکاران محترم از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و پژوهشکده‌ی طب رزمی که بدون همکاری و مساعدت‌های بی‌شایبه آن‌ها انجام این تحقیق امکان پذیر نبود. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد می‌باشد.

توسعه نیافته است، این تحقیق را می‌توان منحصر به فرد و با ارزش دانست و قطعاً قابل توسعه جهت ساخت کیت‌های تشخیص مولکولی می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

با تشکراز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی

### References

- 1- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Org.* 2004; 82: 346-53.
- 2- Purver R. Chemical and biological terrorism. The threat according to the open literature. 1995. [www.csis-scrs.gc.ca/eng/misc\\_docs/pur\\_V\\_e.html](http://www.csis-scrs.gc.ca/eng/misc_docs/pur_V_e.html).
- 3- Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A. Sequence, Assembly and analysis of Pxo1 and Pxo2. *J Applied Microbiol.* 1999; 87: 261-62.
- 4- Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, McClain DJ, Hoover DL, Bryne WR, et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA.* 1997; 278: 399-41.
- 5- Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Plague as a biological weapon medical and public health management. *JAMA.* 2000; 283: 2281-2290.
- 6- Butler T. Plague and other Yersinia infections. New York Plenum Medical Book Company. 1991; 112.
- 7- Hinnebusch J, Cherepanov P, Rudolph A, et al. Murine toxin of yersinia pestis shows

- phospholipase D activity required for virulence in mice. *Int J Med Microbiol.* 2000; 290: 483-487.
- 8- Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic disease caused by yersinia. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 309-324.
  - 9- Ivanhoff B. Typhoid fever global situation and WHO recommendations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1995; 26: 1-6.
  - 10- Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ. Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonella as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori Comb nov. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 313-330.
  - 11- Turnbull PC B, Boehm R, and Cosivio. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. WHO Publication. 1998.
  - 12- Leal NC, Almeida AM. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in yersinia pestis by multiplex PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999; 41: 339-342.
  - 13- Hu Wung, Yujun Cui, Zuyu Wung. Xiaoyi Wang, Zhaobiao Guo, Yanfeng Yan, et al. A Dog – Associated primary pneumonic plague in Qinghai

- province, China. *Clin Infect Dis*. 2011; 52: 185-190.
- 14- Turnbull PC. Bacillus anthracis but not always anthrax. *J Appl Bacteriol*. 1992; 72: 21-8.
- 15- Joseph Sambrook and David W. Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000.
- 16- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI- BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3389-3402.
- 17- Aabo S, Ramussen DF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. Salmonella identification by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 1993; 7: 171-178.
- 18- Hirose K, Itoh KI, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, et al. Selective amplification of tyv(rfbE), prt(rfbS), via B, and fliC genes by Multiplex PCR for identifications of Salmonella enterica Serovars typhi and para typhi A. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 633-636.
- 19- Herrera Leon S, Mc Quiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar I, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of salmonella. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2581-86.
- 20- Harrison LH, Ezzel JW, Abshire TG. Evaluation of serologic tests for diagnosis anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay. *J Infect Dis*. 1989; 160: 706-10.
- 21- Conrad P. Quim, Peter M. Dull, Vera Semenova, Han Le, Shan Crotty, Thomas H, et al. Immune Responses to bacillus anthracis protective antigen in patients with bioterrorism related cutaneous or inhalation anthrax. *J Infect Dis*. 2004; 190: 1228-1236.
- 22- Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, Page EH, Snawder JE, Striley CAF, Mackenzie BA. Determination of Serum IgG antibodies to bacillus anthracis protective antigen in environmental sampling workers using a fluorescent covalent microsphere immuno assay. *Occup Environ Med*. 2004; 61: 703-708.
- 23- Welkos SL, Lowe JR, Eden MC, Cutchan F. Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of Bacillus anthracis. *Gene*. 1988; 69: 87-300.
- 24- Ramisse V, Patra G, Garrigue H. Identification and characterization of Bacillus anthracis by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids Pxo1 and Pxo2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 1996; 9-16.
- 25- Beyer W, Glockner P, Otto J, Bohm H. A nested PCR method for the detection of Bacillus anthracis in environmental samples collected from former tannery sites. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 128: 113-8.
- 26- Handerson I, Duggleby CJ, Tunder bull PC. Differentiation of Bacillus anthracis from other Bacillus cereus group bacteria with the PCR. *Int J Bacteriol*. 1994; 44: 99-105.
- 27- Beyer W, Pocivalsek S, Bohm R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect Bacillus anthracis from soil samples limitation of present published primers. *J Appl Microbiol*. 1999; 87: 229-360.
- 28- Jackson PJ, Hugh Jones ME, Adair DM. PCR

analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: The presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 1224-9.

29- Hinnebusch J, Schwan TG. New method for plague surveillance using polymerase chain

reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 1511-1514.

30- Engelthaler DM, Gage KL, Monteneri JA, Chu M, Carter LG. PCR detection of *Yersinia pestis* in fleas comparison with mouse inoculation. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1980-1984.

## Simultaneous Detection of *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis* by Multiplex PCR

Safari Foroshani N<sup>1</sup>, Karami A<sup>2</sup>, Pourali F<sup>2</sup>, Aeidi A<sup>1</sup>, Fatemeh tavana BS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Islamic Azad University, Science and Research, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Karami A, Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Email:** Karami@bmsu.ac.ir.

**Received:** 3 Oct 2012      **Accepted:** 17 Feb 2013

**Background and Objectives:** *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis* are potent human pathogenic bacteria that cause typhoid fever, anthrax, and plague, respectively. The classic microbiological methods for detection and identification of these agents are laborious and time consuming. Therefore, developing an accurate method for rapid detection of these potent human pathogens is important, especially due to their potential use as Bioterrorism agents. We have designed a new rapid molecular detection method by using multiplex PCR in a single reaction.

**Materials and Methods:** PCR was carried out using specific primers for the virulence factor of *S. typhi*, *hp* and *invA*, *B. anthracis* virulence factors, *chr* and *pa*, and *Y. pestis* toxin, *pla*. The primer sets were tested for cross reactivity with individual DNA strains and mixtures in a multiplex PCR format. For determination of sensitivity of the method, we used colony counting and genomic DNA dilution.

**Results:** The result with standard strains revealed that primers are specific for each strain as they have successfully amplified the desired products. The sensitivity analysis showed a 1-10 CFU and 1-10 copies of the genomes. In this respect, the accuracy of the result was checked by sequencing of the 1083-bp PCR products, except for anthrax, which was determined by enzymatic digestion.

**Conclusion:** We have found a rapid, specific, sensitive, and a non-expensive molecular method for detection of three potent human pathogens. This finding provides an efficient diagnostic tool to determine these bacteria in bioterrorism samples.

**Keywords:** Detection, *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, Multiplex PCR