

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۱۷-۱۰

تشخیص سریع اسپور عامل سیاه زخم به روش مولکولی

شهرام پروین، علی احمدی، فاطمه پورعلی، علی کرمی*

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج).
نویسنده رابط: علی کرمی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)،
تلفن: ۸۸۰۴۰۰۶۰ Karami@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۰

چکیده:

زمینه و اهداف: باسیلوس آنتراسیس باکتری اسپور دار، گرم مثبت، هوازی و عامل بیماری سیاه زخم است. در سال‌های اخیر از این باکتری در حملات بیوتروریستی استفاده شده است. اسپور باسیلوس آنتراسیس نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی بسیار مقاوم می‌باشد. برای تشخیص سریع اسپور این باکتری به روش‌های مولکولی، به استخراج ژنوم با شکستن اسپور نیاز می‌باشد. هدف از این مطالعه تشخیص سریع مولکولی DNA باسیلوس آنتراسیس به روش Multiplex PCR با شکستن سریع اسپور به روش فیزیکی در زمان بسیار کوتاه و بدون استخراج ژنوم است.

روش بررسی: اسپورباکتری غیر بیماریزای سیاه زخم یا سویه استرن (سویه واکسن باسیلوس آنتراسیس) توسط سیستم Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, In.) با استفاده از بید های ۰/۱ میلی متری در ۵۰۰۰ دور در دقیقه شکسته و استخراج شد. تشخیص به روش Multiplex PCR با استفاده از ۳ جفت پرایمر صورت گرفت. PCR سه قطعه DNA با اندازه‌های مورد انتظار را تولید نمود که در ژل آگاروز الکتروفورز آنالیز شد. جهت تعیین حد تشخیص و اختصاصیت از رقت‌های مختلف اسپور به روش CFU/ml و باکتری‌های دیگر همین جنس نیز استفاده گردید.

یافته‌ها: اسپورهای باسیلوس آنتراسیس در عرض سه دقیقه شکست شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و Multiplex PCR، محصولات به دست آمده شامل سه قطعه (۱۰۸۳ bp، ۳۸۵ bp، ۱۶۴ bp) در ژل آگارز ۲ درصد آنالیز شد. با استفاده از آنزیم برش دهنده Hind III محصول (1083bp) تأیید گردید. حد تشخیص بر اساس روش CFU/ml، رقت ۱/۵۱۲ از سوسپانسیون با 7680/ml یا ۷ اسپور در میلی لیتر اسپور معین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization از سرعت لازم برخوردار می‌باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراج DNA نیست. با این روش، ما توانستیم به طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور باکتری باسیلوس آنتراسیس را در نمونه‌ها تشخیص دهیم.

کلید واژه‌ها: تشخیص، باسیلوس آنتراسیس، اسپور، Multiplex PCR

مقدمه:

باسیلوس آنتراسیس، باکتری اسپوردار گرم مثبت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و عامل بیماری سیاه زخم است (۱). ژنوم عامل سیاه زخم از DNA حلقوی به اندازه ۵/۴ میلیون جفت باز تشکیل شده است. دو پلاسمید اساسی در این باکتری وجود دارد که واجد ژن‌های ویروالانس و کپسول است: پلاسمید pXoI به اندازه ۱۸۱kbp واجد ژن‌های ef، lef، pa و pXoII به اندازه 96 kbp دارای ژن‌های رمز کننده کپسول (Cap A,B,C) است. مطالعات نشان می‌دهد که به دلیل ویروالانس بسیار بالا و همچنین اسپور بسیار مقاوم به عوامل محیطی و جهش‌ها این باسیل یکی از همگن‌ترین باکتری‌های شناخته شده از نظر تنوع ژنتیکی است (۲-۴). تفاوت خاص بین عامل سیاه زخم و گونه‌های دیگر باسیلوس‌ها، داشتن کپسول و عدم تحرک می‌باشد. از خصوصیات بیوشیمیایی این باکتری تخمیر بعضی از قندها بدون تولید گاز، داشتن اکسیداز، کاتالاز، نیترات، VP مثبت و اوره آز منفی است (۵).

ویژگی‌های منحصر به فرد این باکتری سبب شده است تا آن را مستعد جنگ‌افزار بیولوژیکی نماید. مهم‌ترین این ویژگی‌ها عبارتند از: تولید اسپور بسیار کوچک، قدرت مقاومت بسیار زیاد، قدرت بیماری‌زایی بالا، قابلیت تولید انبوه و سهولت رهاسازی آن به صورت آئروسول (۶-۷). عامل بیماری سیاه زخم، اسپوری تولید می‌نماید که نسبت به شرایط مختلف فیزیکی مقاوم است. به این ترتیب توانایی بقای آن در محیط بسیار زیاد است. از این‌رو، تقریباً در هر نقطه‌ای از جهان یافت می‌شود (۸). تیمارکردن اسپور با حرارت باعث افزایش هیدروفوبیسیته نسبی آن می‌گردد (۹). روش‌های تشخیصی باسیلوس آنتراسیس به صورت کلاسیک و سنتی شامل کشت، تشخیص ایمونولوژیک شکل کپسول و قابلیت لیز شدن توسط گاما فاژ می‌باشد (۱۰).

روش‌های آزمایشگاهی متداول میکروب‌شناسی برای تشخیص باسیل سیاه زخم بسیار مفید است ولی زمان تشخیص قطعی می‌تواند ۲۴-۴۸ ساعت به طول انجامد (۱۱). در نتیجه از روشی جهت شکست اسپور و استخراج DNA و تشخیص مولکولی در مدت زمان بسیار کمتر (حدود ۳ ساعت) استفاده می‌شود (۱۲، ۱۳). روش‌های معمول لیز و شکستن اسپور، مکانیکی و شیمیایی است. با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از محلول‌های شیمیایی در نمونه‌های واجد اسپور،

روش‌های فیزیکی ارجح هستند. هدف از این مطالعه تعیین روش تشخیص باسیلوس آنتراسیس بر اساس شکستن به روش فیزیکی، استخراج DNA از دیواره‌های سخت اسپور و سپس تشخیص مولکولی ژنوم حاصل به روش Multiplex PCR در زمان کوتاه بود.

مواد و روش‌ها:

تهیه سویه‌های باکتری‌ها: سویه‌های استاندارد گونه‌های باسیلوس سوربتیلیس (PTCC:1365)، باسیلوس سرئوس (PTCC:1247) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و سویه Stern 34F2 و غیر بیماری‌زای باسیلوس آنتراسیس از سازمان دامپزشکی کل کشور تهیه شدند.

کشت باکتری: باکتری‌ها در محیط آگار خوندار، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از کلنی‌های رشد کرده در شرایط کاملاً استریل لام جهت رنگ آمیزی گرم تهیه شد (۱۴).

تهیه اسپور: برای به دست آوردن اسپور، سویه باکتری‌ها از محیط کشت LB broth به روی محیط اختصاصی تولید اسپور (Ammoniom salt sugar) (۱۵) کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۱۰ روز گرمخانه گذاری شد. سپس در زیر هود بیولوژیک کلاس II از کلنی‌های رشد کرده لام تهیه و رنگ آمیزی مالاشیت گرین انجام گردید. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، در زیر هود بیولوژیک کلاس II کشت سطح محیط کشت حاوی اسپور به وسیله ۱۰-۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به طور متوالی شستشو شد. سوسپانسیون حاصل به داخل لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل و سانتریفوژ (مدت ۳۰ دقیقه، ۳۷۹۰ g) شد. سپس مایع روئی به طور کامل به محفظه حاوی فرمالدئید منتقل گردید. به رسوب داخل لوله ۵ ml آب دو بار تقطیر اضافه شد و لوله به مدت ۳ دقیقه داخل دستگاه استیر هموژن شد. سپس بر روی سوسپانسیون، اتانول ۹۸ درجه اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در مرحله بعدی محتویات لوله فالكون سانتریفوژ و مایع روئی دور ریخته شد. رسوب درون لوله با ۵ ml آب مقطر دو بار تقطیر دو بار شستشو گردید. سپس رسوب در حجم ۳ ml آب

پرایمرها: پرایمرهای اختصاصی تشخیص عامل مورد نظر از مقالات موجود استخراج گردید (۱۱). جایگاه پرایمر شماره ۱ بر روی پلاسمید PxoI به اندازه ۱۰۸۳ bp که رمزکننده ژن pa می باشد. جایگاه پرایمر شماره ۲ بر روی پلاسمید PxoI به اندازه ۳۸۵ bp که رمزکننده ژن lf می باشد. جایگاه پرایمر شماره ۳ بر روی کروموزوم به اندازه ۱۶۴bp می باشد.

واکنش **Multiplex PCR**: شرایط بهینه واکنش PCR ذکر شده در مقاله مرجع (۱۱) اعمال شد (جدول های شماره ۱ و ۲). محصول واکنش PCR در ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس توسط دستگاه ژل داکيومنتیشن تصویر تهیه گردید.

مقطر دو بار تقطیر حل و سوسپانسیون یکنواخت به دست آمد. جهت از بین بردن باکتری های رویشی باقیمانده، سوسپانسیون به بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه منتقل شد (۱۶). شکست دیواره اسپور و استخراج ژنوم: از دستگاه Mini bead beater-8 جهت شکستن اسپور استفاده شد. ویال های مخصوص دردار حاوی بیدهای شیشه ای به اندازه ۱ mm در اتوکلاو استریل گردید. از سوسپانسیون اسپور در شرایط استریل و با رعایت نکات ایمنی مقدار یک میلی لیتر به ویال حاوی بید اضافه شد. ویال های حاوی سوسپانسیون در محفظه های مخصوص دستگاه اسپور شکن گذاشته شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۸۰ ثانیه توسط بیدهای اختصاصی شکسته شد. برای اطمینان، از محتویات سوسپانسیون حاصل لام تهیه و رنگ آمیزی اختصاصی اسپور (مالاشیت گرین) انجام گردید.

جدول ۱: مقادیر Master mix جهت **Multiplex PCR** از ژنوم استخراج شده اسپور قبل و بعد از بهینه سازی

ردیف	مواد	مقدار اولیه (μl)	غلظت نهائی	مقدار اولیه (μl)	غلظت نهائی
۱	DNA Template	۱	۱ μl	۱	۱ μl
۲	Buffer PCR (10 x)	۲/۵	۱/۲۵X	۲/۵	۱/۰۵X
۳	Mgcl ₂ (50 mM)	۱/۵	۳/۷۵mM	۱/۵	۳/۱۵Mm
۴	dNTPs mM 10	۰/۵	۰/۲۵mM	۰/۵	۰/۲۱mM
۵	Primers forward (۳ جفت)	۱	۵Pmole	۰/۸	۳/۳۶Pmole
۶	Primers reverse (۳ جفت)	۱	۵Pmole	۰/۸	۳/۳۶Pmole
۷	Taq DNA Polymerase (5U/μl)	۰/۵	۲/۵ U/μl	۰/۵	۲/۵ U/μl
۸	D.D.W (آب مقطر دوبار تقطیر)	۸	۸ μl	۱۳	۱۳ μl
۹	حجم نهائی	۲۰		۲۳/۸ μl	

جدول ۲: نحوه اجرای چرخه‌های PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان
Denaturation	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه
Denaturation	۹۵ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
Annealing	۵۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
Extension	۷۲ درجه سانتی گراد	۴۰ ثانیه
Final Extension	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۲۰ ثانیه

برای استخراج ژنوم و واکنش Multiplex PCR استفاده گردید.

یافته‌ها:

نتایج کشت باکتری (رویشی و اسپور): پس از گرمخانه گذاری و رنگ آمیزی گرم از کلنی‌های جنس باسیلوس (باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس) و سویه stern 34f2، باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شد. اسپور حاصل از بهینه‌سازی مرحله اسپورولاسیون و خلوص بالای آن از طریق رنگ آمیزی مالاشیت گرین و بررسی میکروسکوپی نمونه کشت محیط اختصاصی اسپور مورد تأیید قرار گرفت.

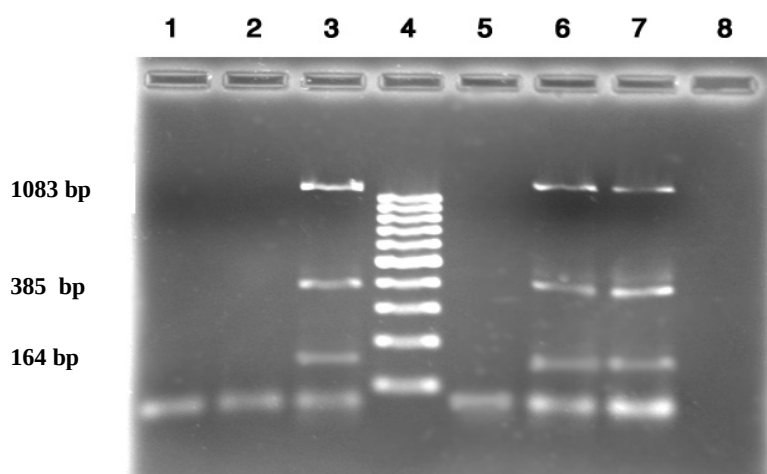
نتایج الکتروفورز واکنش Multiplex PCR: محصول واکنش PCR سوسپانسیون اسپور شکسته شده با رقت ۱/۳۲ سبب ایجاد ۳ باند مجزای مورد انتظار شامل قطعات ۱۰۸۳ bp، ۳۸۵ bp، ۱۶۴bp گردید (شکل ۱).

تأیید محصول واکنش Multiplex PCR: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول ۱۰۸۳ bp توسط آنزیم محدودالثر برش دهنده Hind III، دو قطعه با اندازه‌های ۶۹۶bp و ۳۸۶bp حاصل می‌شود که تأییدکننده درستی محصول ایجاد شده توسط پرایمرها است (شکل ۲).

تأیید محصول: پس از استخراج توالی ژن و یافتن جایگاه پرایمرها در روی آن و بدست آوردن اندازه دقیق قطعه تکثیر شده (1083bp) با استفاده از برنامه نرم‌افزار DNASIS، جایگاه برش آنزیمی مناسب در روی قطعه، بررسی شد. جهت هضم آنزیمی محصول PCR، طبق دستورالعمل هضم آنزیمی عمل شد (محصول PCR به مقدار ۵μl، آنزیم Hind III به مقدار ۱μl، 10Xr buffer به مقدار ۲μl، آب دو بار تقطیر شده به مقدار ۱۲μl): ابتدا مخلوط فوق به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به جهت اثر آنزیم مورد نظر انکوبه شد. پس از این زمان، محصولات حاصل از هضم آنزیمی به مدت ۶۵ دقیقه الکتروفورز شدند. جهت مشاهده باندهای برش خورده DNA از ژل آگاروز ۲٪ استفاده گردید.

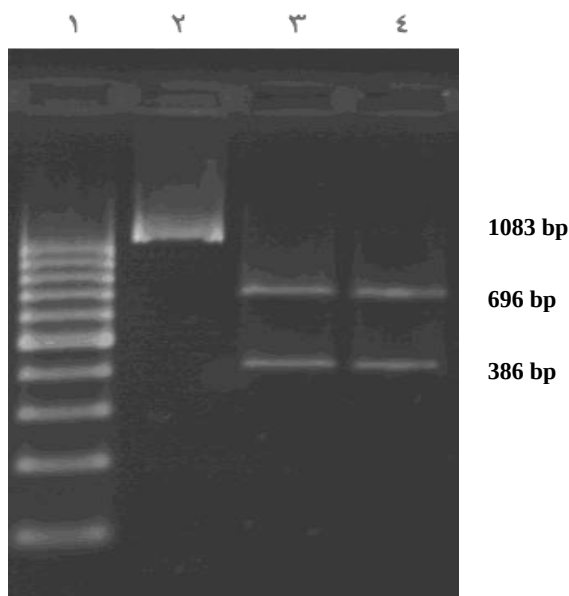
تعیین حساسیت و اختصاصیت: از نمونه‌های اسپور شکسته شده توسط دستگاه اسپور شکن رقت‌های صفر تا ۱/۱۰۲۴ تهیه گردید، سپس رقت‌های تهیه شده بر روی محیط آگار خوندار جهت شمارش تعداد اسپورها کشت داده شد. همچنین برای ژنوم رقت‌های مذکور واکنش PCR و الکتروفورز محصولات PCR انجام گردید.

جهت تعیین اختصاصیت آزمایش از باکتری‌های هم جنس باسیلوس آنتراسیس (مانند باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و همچنین E.coli O157:H7 و شیگلادیسانتری



شکل ۱: ژل الکتروفورز ۲٪ محصول Multiplex PCR ژنوم اسپور قبل و بعد از شکست

- ۱- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن
- ۲- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور قبل از شکست توسط دستگاه اسپور شکن
- ۳- کنترل مثبت (ژنوم استخراج شده سویه Stern 34f2)
- ۴- 100 bp Ladder
- ۵- کنترل منفی (آب دو بار تقطیر شده)
- ۶- رقت ۱ به ۳۲ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن
- ۷- رقت ۱ به ۶۴ از نمونه سوسپانسیون اسپور بعد از شکست توسط دستگاه اسپور شکن



شکل ۲: برش محصول ۱۰۸۳ bp واکنش PCR توسط آنزیم Hind III

- ۱- Ladder 100 bp (فرمتاز)
- ۲- محصول ۱۰۸۳ bp واکنش PCR
- ۳- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III
- ۴- محصول هضم شده توسط آنزیم Hind III

محلول سوسپانسیون در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه، تمام فرم‌های رویشی را از بین برد. جهت اطمینان از زنده بودن اسپورهای حاصله در سوسپانسیون، با کشت مجدد در محیط آگار خوندار به مدت ۲۴-۱۸ ساعت اسپورها به فرم رویشی تبدیل شدند. این آزمایش، نشان دهنده زنده ماندن اسپورها بعد از تمام مراحل خالص سازی بود.

جهت شکستن دیواره اسپور باسیلوس آنتراسیس از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و فیزیکی-شیمیایی استفاده می‌شود. روش فیزیکی، روش بسیار خوبی برای شکستن اسپورها است. در مطالعات و پژوهش‌های انجام شده در زمینه کاربرد روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم، روش‌های Freeze/thaw - Bead mill - Hot-detergent Treatment homogenization استفاده شده‌اند. ولی نتیجه این مطالعات ارجحیت روش Bead mill homogenization را نسبت به سایرین نشان می‌دهد (۱۳). یکی از شاخصه‌های مهم در تشخیص عوامل باکتریایی تشخیص در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌باشد که روش فیزیکی مورد استفاده در این مطالعه (Bead mill homogenization) در کوتاه‌ترین زمان (۶۰ ثانیه) حاصل گردید. ولی جهت شکست تمام اسپورهای درون سوسپانسیون زمان بیشتری (۱۸۰ ثانیه) جهت استخراج کل ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. در صورتیکه در سایر روش‌های فیزیکی این ویژگی وجود ندارد (۱۳). در روش‌های معمول مورد استفاده جهت استخراج ژنوم به مواد شیمیایی (مانند فنل کلروفرم، جوشاندن، آنزیم ها، بافرها، کیت های تجاری) نیاز است. آنزیم ها و یا دترجنت‌ها می‌توانند به طور بالقوه به آنزیم ها، ارگانل‌های سلولی، ژنوم باکتری آسیب احتمالی برسانند. ولی در روش فیزیکی جهت استخراج ژنوم که در این مطالعه استفاده شد (Bead mill homogenization) مواد شیمیایی فوق مصرف نشدند (۱۶). همچنین در مطالعات انجام شده به روش فیزیکی، در روش‌های Hot - Freeze/thaw - Bead mill homogenization - detergent Treatment در مراحل استخراج از بافر

TENS 2X (Tens 1X is 50 mM Tris HCL[pH 8.0], 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% [wt/vol] SDS) استفاده گردید. ولی در روش فیزیکی مطالعه حاضر (Bead mill homogenization) فقط از آب دو بار تقطیر استفاده شد. این مورد می‌تواند به ساده بودن روش، کاهش هزینه و زمان کمک کند (۱۳و۱۶).

حساسیت و اختصاصیت: واکنش PCR از رقت‌های ۱/۳۲ تا ۱/۵۱۲ از نمونه‌های اسپور شکست یافته با دستگاه اسپور شکن نشان داد که حساسیت تشخیص نمونه سوسپانسیون اسپور تا رقت ۱/۵۱۲ که دارای ۷۶۸۰ عدد اسپور در هر میلی‌لیتر است، مورد تأیید است. برای بررسی اختصاصیت پرایمرهای انتخابی از ژنوم استخراج شده نمونه‌های باکتری باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، E.coli O 157 و شیگلا دیسانتری استفاده شد. محصولات حاصله بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. پرایمرهای طراحی شده فقط با باسیلوس آنتراسیس محصول تولید کردند.

بحث:

باتوجه به تولید راحت و سریع اسپور باسیل عامل سیاه زخم و مقاومت بالای آن نسبت به عوامل محیطی، شناسایی باکتری (شکل فعال واسپور) لازم است. همچنین استخراج ژنوم و شکست دیواره باکتری و اسپور ضروری‌تر است. جهت تولید اسپور، از محیط اختصاصی تولید اسپور (Ammoniom salt sugar) (۱۵) استفاده شد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه مقدار یون منگنز و کلسیم در ساختار اسپور نسبت به فرم رویشی زیادتر می‌باشد، پس در نتیجه از این محیط انتخابی جهت تولید تعداد فراوان اسپور استفاده گردید. از طرف دیگر اگر شرایط محیط برای میکروارگانیسم نامساعد گردد، پروتئین‌هایی که در شرایط مساعد غذایی بر روی ژن‌های تولید کننده اسپور در کروموزوم قرار دارند، از کروموزوم برداشته شده و ژن‌های اسپورزایی بارز می‌گردند و باکتری تبدیل به اسپور می‌شود (۵). لذا، طی مدت ۵ الی ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، هر چه به تعداد روزهای انکوباسیون افزوده گردد، شرایط محیطی سخت‌تر می‌شود و فرم رویشی بیشتری به اسپور تبدیل می‌گردد. به این ترتیب، به خلوص بالاتری از اسپوردست می‌یابیم. به دلیل سبک‌تر بودن فرم رویشی نسبت به اسپور، با سانتریفوژ نمودن سوسپانسیون‌های اسپور نسبتی از خلوص و جداسازی اسپورها حاصل شد. در مرحله بعدی افزودن اتانول و آب مقطر دو بار تقطیر شده بر روی سوسپانسیون مخلوط باعث از بین رفتن غشاء فرم‌های رویشی شد. این پدیده باعث نفوذ آب به داخل سیتوپلاسم آنها می‌گردد و با تورم سلولی منجر از بین رفتن نسبی فرم‌های رویشی باکتری می‌شود. در مرحله پایانی و تکمیلی قرار دادن

در قسمت استخراج DNA از اسپورهای باکتری، به خالص سازی DNA حاصل از شکست اسپور باکتری اشاره شده است. ولی ما در مطالعه حاضر از دستگاه اسپور شکن استفاده کردیم و نمونه DNA حاصل از شکست اسپور را خالص ننموده و سوسپانسیون حاصل از شکست را جهت تشخیص مولکولی DNA به روش Multiplex PCR بکار بردیم.

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه کنوانسیون منع سلاح های میکروبی از باکتری *باسیلوس آنتراسیس* پاتوژن به عنوان یک سلاح میکروبی و خطرناک نام می برد، و نیز عدم دسترسی به این باکتری پاتوژن و منع قانونی و اخلاقی استفاده از آن و همچنین عدم وجود پلاسמיד PxoII و دارا بودن PxoI، از سویه غیر بیماریزای این باکتری (سویه Stern) به عنوان تولیدکننده اسپور خالص استفاده شد. این سویه رفتاری مشابه با سویه بیماریزای *باسیلوس آنتراسیس* دارد (۲۰-۱۹). نتایج بهینه سازی نشان داد شکستن به روش فیزیکی، با استفاده از ذرات شیشه و دستگاه Bead Mill Homogenization، از سرعت لازم برخوردار می باشد. بعد از شکست در مدت ۳ دقیقه، نیازی به استخراج DNA نیست. با این روش، توانستیم به طور سریع، اختصاصی و با حساسیت بالا اسپور *باسیلوس آنتراسیس* را در نمونه ها تشخیص دهیم. به این ترتیب، این مطالعه توانست در ایران موفق به تشخیص سریع اسپور باکتری شود.

قبل از شکست فیزیکی اسپور توسط glass bead، در سوسپانسیون مورد نظر DNA خارج سلولی وجود دارد. برای برطرف کردن این عیب و بدست آوردن سوسپانسیون اسپور عاری از آلودگی با DNA، از سوسپانسیون رقت تهیه شد. از این رقت، که با الکتروفورز محصول Multiplex PCR باند ایجاد نمی کند، جهت شکست اسپور استفاده شد.

تشخیص و شناسایی عوامل باکتریائی اسپوردار در زمان بسیار کوتاه تر از روش های سنتی انجام پذیرفت. برای تبدیل شدن اسپور *باسیلوس آنتراسیس* به سلول های رویشی، آن را باید به مدت حداقل ۶ ساعت در محیط آگار خوندار و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری کرد. این مرحله هم زمان بر می باشد. ولی با شکستن اسپور به صورت مستقیم، جهت بدست آوردن ژنوم باکتری، به زمان خیلی کمتری نیاز است (۱۷). به منظور عدم استفاده از مواد شیمیائی در راستای حفظ محیط زیست، و حفظ سلامت کاربران، و جهت اجتناب از هرگونه مواد شیمیائی سمی و مضر، باید به بسط روش های سریع و مکانیکی شکست اسپور و روش های خالص سازی آن از سوسپانسیون پرداخت. در این روش نسبت به روش های سنتی در مجموع هزینه کمتری صرف شد. روش مولکولی Multiplex PCR نسبت به روش های سنتی از دقت و حساسیت بالائی برخوردار می باشد. دسترسی سریع و آسان به ژنوم اسپور و تشخیص مولکولی مستقیم آن بدون طی کردن فرآیند طولانی استخراج ژنوم از مزایای روش ما است. در یکی از پژوهش های انجام شده (۱۸)

فهرست مراجع:

۱. بروکس اف، بوتل اس، موریس آ. میکروب شناسی پزشکی جاوئر ملنیک و آدلبرگز. ترجمه ستوده نیاع. چاپ سوم، تهران، انتشارات کبیر، ۱۳۸۲، صص، ۲۵۳ تا ۲۵۲.
۲. حاتمی ح. اپیدمیولوژی بیوتروریسم، اولین کنگره ملی بهداشت عمومی و طب پیشگیری، کرمانشاه، ۱۳۷۹، کتاب رایانه ای کنگره ها، معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، ویرایش ششم، سال ۱۳۸۰، صص، ۶۲۶ تا ۶۲۴.
3. Keim P, Kalif A, Schupp j, Hill K.. Molecular evaluation and diversity in *Bacillus anthracis* by AFLP markers. *J Bacteriol*. 1997; **92**: 784- 6.
4. Knisely RF. Selective Medium for *Bacillus Anthracis*. *j Bacterio*1996; **93**: 684-6.
۵. ادیب فر پ. میکروب شناسی پزشکی. چاپ چهارم. قم، انتشارات الهادی، ۱۳۷۵، صص، ۲۸۱ تا ۲۷۷.
6. Pile C James, Malone D jhon, Eitzen M. Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch internal Med*1998; **158**: 429-434.
7. Okinaka R, Cloud K, Hampton O. Sequence, assembly and analysis of pXoI and pXoII. *J Applied Microbiol*1999; **87**:261-62.
8. Hugh Jones M. global anthrax report. *J Appl Microbiol*1999; **87**(2): 189-191.
9. Furukawa S, Naraisawa N, Watanabe T, kawarai T, Myozen K. Formation of spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *J.Food Microbiol*2005; **102**: 107-111.

10. Popovic T, Hoffmaster AR, Ezzell JW, Absire TG. Validation of methods for confirmatory identification of presumptive isolates of *Bacillus anthracis*, *J. AOAC internat* 2001; **88**: 175-177.
۱۱. کرمی ع، رنجبر ر، پورعلی ف، مهرانی ح. تشخیص سریع باسیلوس آنتراسیس به روش PCR، مجله پزشکی کوثر، تهران، پائیز ۱۳۸۲، شماره ۸ (۳) صص ۱۹۷ تا ۲۰۴.
12. Philip B, Margaret O, Farzad P, David A . A microfluidic cartridge to prepare spores for PCR analysis . *Biosensors&Bioelectronics* 1999; **14**: 849-852.
13. Cheryl R. K, Kaysie L.B, Dante L.A, Peter C.S, Karen K.H, Paul J.J. Small – Scale DNA Sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environm Microbiol* 1998; **64**: 2463-2472.
۱۴. رجائی م، عطائی ر، قربانی غ، کرمی ع، مهرابی توانع. سیاه زخم- چاپ دوم، تهران، انتشارات اندیشمند، ۱۳۸۲، صص ۸۶ تا ۶۶.
15. Buchanan R. E., Gibbons N. E., manual of determinative bacteriology. Ed. 8, Baltimore, Williams & wilkins. 1974; pp: 1689-1690.
16. Warriner k , Waites W.M. Enhanced sporulation *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose *Let Appl Microbiol* 1999; **29**: 97-102.
17. Ellerbrok H, Natterman H, Ozel M, Beutin L, Appel B. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR, *FEMES Microbiol* 2002; **214**: 51-59.
18. Tamas T, Jennie C. Hunter C and Terrance L. Development of methods for extracting DNA from bacterial spores. *Environmental remediation technology program* 1998; **510**: 1999-2000
19. Sterne M, The use of anthrax vaccines prepared from avirulant (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Veternary Sci. Animal Industry*. 1939; **13**: 307-312.
20. Sterne M, Avirulant anthrax vaccine onderstepoort. *Veternary Sci. Animal Industry* 1946; **21**: 41-43.