Nova Biologica Reperta 6(4): 374-381 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.374

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۳۷۴ الی ۳۸۱ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

تشخیص مولکولی عامل طاعون بر اساس ژن *pla*

خاطره کبیری[۱] و کیوان مجیدزاده[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: خاطره کبیری، k.kabiri@iau-tnb.ac.ir

چکیده. یرسینیا پستیس عامل بیماری طاعون، باسیلی گرم منفی متعلق به تیره انتروباکتریاسه است. تشخیص این ارگانیسم بر اساس روش‌های کلاسیک وقت گیر، پر هزینه و خطرناک است. هدف از این مطالعه طراحی روش TaqMan Real-time PCR برای تشخیص سریع این باکتری بر اساس ژن *pla* است. در این مطالعه واکنش Real-time PCR بر اساس ژن هدف *pla* بهینه‌سازی گشت. برای تعیین حساسیت، از ژن *pla* رقت‌های سریال تهیه و آخرین رقتی که سیگنال فلورسنت تولید کرد به عنوان کم‌ترین حد تشخیص در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج آزمایش تعیین حساسیت، منحنی استاندار شامل مقادیر Ct و تعیین کمیت برای آنالیز ژن هدف استفاده گردید. ویژگی آنالیتیکال روش به وسیله انجام آزمایش بر روی ژنوم تعدادی از باکتری‌های کنترل منفی ارزیابی گردید. در این بررسی، در نمودار تکثیر ژن *pla* هیچ گونه تکثیری برای نمونه‌های کنترل منفی مشاهده نشد و ویژگی واکنش تایید گشت. کم‌ترین حد تشخیص روش Real-time PCR برای ژن هدف ۴/۵ fg، همچنین کم‌ترین تعداد کپی از ژن هدف در یک واکنش ۲۰ µl در حدود ۱×۱۰^{۳} تعیین گشت.

واژه‌های کلیدی. ریل تایم پی سی آر، کنترل منفی، منحنی استاندارد، ویژگی، یرسینیا پستیس

The molecular detection of the causative agent of plague on the basis of the *pla* gene

Khatereh Kabiri[1] & Keivan Majidzadeh

[1] Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2]Tasnim Biotechnology Research Center (TBRC), AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Correspondent author: Khatereh Kabiri, k.kabiri@iau-tnb.ac.ir

Abstract. *Yersinia pestis*, a gram-negative rod belonging to the Enterobacteriaceae family, is the causative agent of plague. Classical methods of detecting the organisms are time-consuming, expensive and dangerous. The aim of the study was to design a Real-time PCR assay on the basis of the *pla* gene of *Yersinia pestis.* In this research the Real-time PCR test was optimized by using special primers for targeting *pla* gene. After preparing 10-fold serial dilutions of the *pla* and their analysis by the assay, the last dilution showing a fluorescent signal was confirmed as the limit of detection (LOD). A standard curve based on the Ct values was depicted, so the assay was developed to quantify the target gene. The analytical specificity was determined by subjecting the genome of some control negative bacteria to the assay. In this experiment, negative control genomes did not show detectable signals in the assay. The last dilution of *pla* plasmid which showed a fluorescent signal was 4.5 fg. So, the lower detectable copy numbers of the gene in a 20 µl PCR reaction was calculated as 1×10^{3}.

Keywords. control negative, Real- time PCR, specificity, standard curve, *Yersinia pestis*

Received 11.02.2019/ Revised 16.04.2019/ Accepted 13.05.2019/ Published 10.01.2020

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۲/اصلاح: ۱۳۹۸/۰۱/۲۷/پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۳/انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

مقدمه

یرسینیا پستیس (*Yersinia pestis*)، باسیلی گرم منفی از تیره انتروباکتریاسه است که براساس توانایی تبدیل نیترات به نیتریت و تخمیر گلیسرول به سه بایوتیپ اورینتالیس، آنتیگوآو مدیاوالیس تقسیم می‌گردد (Rollins *et al.*, 2003; Sergueev *et al.*, 2010). این میکروارگانیسم عامل بیماری طاعون خیارکی است و معمولاً از طریق گزش کک گزنوپسیلا کئوپیس منتقل می‌شود. پس از انتشار به ریه‌ها رفته و از طریق آئروسل آلوده از انسان به انسان منتقل می‌شود و منجر به شیوع ناگهانی طاعون ریوی می‌گردد که احتمال خطر ابتلا به طاعون ریوی بین یک تا سه روز است (Perry *et al.*, 1999; Engelthaler *et al.*, 1999; Woron *et al.*, 2006; Tomaso *et al.*, 2006).

بیماری طاعون در بسیاری از مناطق آسیا، آفریقا و آمریکا به صورت اندمیک مشاهده می‌شود و در ایران نیز کردستان به عنوان ناحیه طاعون خیز مطرح است. بر اساس گزارشات کریمی در سال ۱۹۶۶، آخرین واگیری طاعون در ایران در فاصله سال‌های ۱۹۶۶-۱۹۴۷ میلادی در کردستان و آذربایجان غربی مشاهده شده است (Tomaso *et al.*, 2006; Azizi & Azizi, 2010; Riehm *et al.*, 2011). بر اساس مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها، این باکتری در دسته A عوامل بیوتروریسمی قرار دارد که از خصوصیات مهم این گروه می‌توان به انتقال آسان انسان به انسان از طریق ذرات موجود در هوا (آئروسل)، نرخ بالای مرگ و میر، سهولت تولید و انتشار آسان، مقاومت به آنتی بیوتیک‌های استاندارد و عدم پیشگیری با واکسن اشاره کرد. خطرناک بودن این باکتری سبب شده که جداسازی و کشت آن تنها در آزمایشگاه‌های دارای سطح ایمنی زیستی ۳ صورت گیرد (Woron *et al.*, 2006; Kenny *et al.*, 2008; Sergueev *et al.*, 2010; Riehm *et al.*, 2011).

روش‌های تشخیص کلاسیک این باکتری مانند: تست‌های بیوشیمیایی، سرولوژی، حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی، رنگ آمیزی و غیره است که اغلب جزو روش‌های مبتنی بر کشت محسوب می‌گردد و به سبب رشد کند باکتری بسیار وقت گیر و غیر قابل تکرار است. هنگامی که یرسینیا پستیس را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ٪۵ دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌دهند، شرایط مذکور برای بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و مورد توجه در پزشکی مناسب است، بنابراین ممکن است رشد سایر باکتری‌ها نیز در محیط مشاهده شود (Suzuki *et al.*, 1997; Leal & Almeida, 1999; Tomaso *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 1999; Schofield *et al.*, 2009; Filippov *et al.*, 2011).

علاوه براین، درمان با آنتی بیوتیک یا آلودگی متقاطع با سایر باکتری‌های موجود در محیط و یا نمونه‌های بالینی ممکن است مانع رشد میکروارگانیسم هدف در محیط کشت شود. مشکلات کشت یرسنیا پستیس همراه با میزان بالای مرگ میر طاعون ریوی سبب شده نیاز به روش‌های تشخیص سریع اهمیت بسزایی پیدا کند. روش‌های مولکولی مدت زمان کمی نیاز دارند و غالبا از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردارند. با استفاده از روش‌های مذکور، در هنگام شیوع ناگهانی طاعون با این روش‌ها می‌توان تعداد زیادی نمونه را به طور همزمان بررسی نمود؛ در نتیجه سرعت تشخیص و کنترل پیشرفت بیماری در یک جمعیت بالا می‌رود، بنابراین طراحی روش‌های تشخیص سریع جهت شناسایی این میکروارگانیسم از اهمیت بالایی برخوردار است (Wilmoth *et al.*, 1996; Lindler *et al.*, 2001; O'Hara, 2005; Riehm *et al.*, 2011).

میکروارگانیسم مزبور، دارای پلاسمید انحصاری pPCP1 به طول ۹/۶ kb است که ژن بیماری‌زا *pla* بر روی آن قرار گرفته است. ژن *pla* فعال کننده پلاسمینوژن است و در اتصال و تهاجم به سلول‌های میزبان نقش موثری دارا است و منحصرا در تمام سویه‌های یرسینیا پستیس وجود دارد. در سال‌های اخیر روش‌هایی جهت تشخیص مولکولی یرسینیا پستیس بر اساس ژن‌های متعددی از جمله *ypo2088*، *enf3*، *Lcrv*، *yihn* و *yopT* معرفی و تکامل یافته است، اما تمامی ژن‌های مذکور از اختصاصیت پایین برخوردار و یا به دلیل قرار گرفتن بر روی پلاسمیدهای مشترک بین یرسینیا پستیس با یرسینیا انتروکولیتیکا و یرسینیای سودو توبرکلوزیس جهت هدف گذاری برای تشخیص مناسب ارزیابی نشده‌اند اما ژن *pla* از اختصاصیت ٪۱۰۰ بر خوردار بوده و نتایج کاذب در زمینه تشخیص آن گزارش نشده است (Perry *et al.*, 1999; Tomaso *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2008). از این رو هدف از این پژوهش، طراحی روش Real-Time PCR جهت تشخیص سریع و دقیق ژن *pla* در باکتری یرسینیا پستیس تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

ژنوم سویه‌ها

در این مطالعه، ژنوم باکتری یرسینیا پستیس از انستیتو پاستور ایران تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تعدادی باکتری منسوب و غیر منسوب به عنوان کنترل منفی انتخاب گردید که در جدول ۱ ذکر شده است. باکتری‌های کنترل منفی همگی به شکل لیوفیلیزه بودند بنابراین ابتدا آن‌ها در محیط BHI (Merck) Broth سپس در BHI Agar (Merck) کشت داده شدند و در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. جهت استخراج ژنوم باکتری‌های کنترل منفی از کیت Mini Extraction (k-31111, K-3112) kit بیونیر استفاده شد.

طراحی پرایمر و پروب

ژن *pla* که بر روی پلاسمید pPCP1 قرار گرفته است به عنوان هدف انتخاب گردید. ترادف‌های ژن مذکور از سایت NCBI تهیه و پرایمرها و پروب با استفاده از نرم افزار Allele ID7 طراحی و توسط شرکت بیونیر کره جنوبی ساخته شد. پروب توسط رنگ گزارشگر (FAM) 6-carboxyfluorescein در انتهای '5 و رنگ خاموش‌کننده Black Hole Quencher (BHQk) در انتهای '5 نشانه‌گذاری گردید (جدول ۱).

واکنش Real-Time PCR

جهت ارزیابی ژن‌های هدف و تشخیص یرسینیا پستیس، بهینه سازی غلظت اجزای واکنش و برنامه حرارتی، واکنش Real-Time PCR در میکروتیوب‌های ۸ تایی Applied Biosystems™ در حجم µl ۲۰ انجام گردید و به طور همزمان تکثیر و آنالیز نتایج توسط دستگاه 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABI) انجام گشت. واکنش µl ۲۰ بر اساس Premix Ex Taq (2X) (شامل: آنزیم Taq، بافر و dNTPs)، ROX (25X)، پرایمر جلویی و عقبی و پروب (۱۰pmol/µl)، DNA باکتری‌های کنترل منفی و کنترل مثبت (۸۰ ng/µl) تهیه گردید. همچنین یک واکنش µl ۲۰ به عنوان کنترل منفی با استفاده از آب دیونیزه شده به جای DNA هدف تهیه شد. الگوی دمایی واکنش Real-Time PCR برای ۴۰ چرخه بر اساس دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل شدن ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم گردید.

تعیین ویژگی

به منظور ارزیابی ویژگی و اختصاصیت پرایمرها، واکنش Real-Time PCR بر روی DNA باکتری‌های کنترل منفی و کنترل مثبت (۸۰ ng/µl) انجام شد (جدول ۲). برنامه دمایی و اجزای واکنش مطابق با شرایط فوق تهیه گردید.

تعیین حساسیت

جهت انجام واکنش حساسیت برای تعیین کم‌ترین حد تشخیص یعنی آخرین رقتی که تکثیر مشاهده می‌شود و فلورسنس تولید می‌گردد، رقت‌های سریال 10^{-1} الی 10^{-10} تهیه، سپس با استفاده از پیکودراپ غلظت‌ها تعیین گردید. واکنش‌های سنجش حساسیت به شکل سه تایی برای هر رقت مطابق با اجزای واکنش و برنامه دمایی فوق تهیه شد. در واکنش Real-time PCR برای رسم منحنی استاندارد و تعیین حد تشخیص تعداد کپی ژن در اولین رقت باید محاسبه و در برنامه تنظیمات مربوط به منحنی استاندارد وارد گردد. پس از اتمام واکنش، با استفاده از منحنی استاندارد، تعداد نسخه‌های هر یک از رقت‌های تعیین گشت. جهت ارزیابی تکرار پذیر بودن نتایج حاصل از واکنش حساسیت راه‌اندازی شد. پس از دو هفته، مجدداً رقت‌های سریال تهیه و تکرارپذیر بودن واکنش‌ها مطابق شرایط ذکر شده بررسی گردید.

نتایج

نتایج واکنش Real-time PCR

در این مطالعه ژن *pla* یرسینیا پستیس جهت تشخیص و تعیین کمی انتخاب گردید. پرایمرها و پروب برای ژن مذکور طراحی شد. نتایج تکثیر به صورت منحنی‌های تکثیر شامل محور عمودی ΔRn و محور افقی Cycle مشاهده گشت. ΔRn نشان دهنده شدت سیگنال تولیدی در هر لحظه از واکنش است و Cycle تعداد چرخه‌های تکثیر را نشان می‌دهد. در نمودارهای تکثیر CT یا چرخه آستانه، این چرخه اولین چرخه‌ای است که میزان فلورسنس آن چرخه از حد پایه بیش‌تر است. در این زمان تعداد آمپلیکون‌های واکنش به حد کافی افزایش یافته‌اند و میزان فلورسنس زیاد می‌شود. منحنی تکثیر ژن *pla* با چرخه آستانه ۸ تشکیل گشت. بمنظور ارزیابی میزان اختصاصیت پرایمرها، واکنش Real-Time PCR بر روی ۸ باکتری منسوب و غیر منسوب به عنوان کنترل منفی انجام شد.

واکنش *pla*-Real- time PCR

با استفاده از پرایمرهای Forward -*pla*-real و Reverse-pla-real و پروب P- *pla*-real واکنش Real- time PCR بر روی DNA ژنومیک باکتری‌های کنترل منفی انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است فقط ژن *pla* -pTZ57R/T با پرایمرهای مذکور قابل تکثیر بودند.

نتایج تعیین حساسیت

جهت تعیین حساسیت و کم‌ترین حد تشخیص رقت‌های سریال (ده گانه) از ژن *pla* -pTZ57R/T با غلظت ng/µl ۱۰۰ تهیه شد. نمودار تعیین حساسیت به دو صورت نمودار تکثیر و استاندارد قابل مشاهده است که در شکل‌های۳ و۴ نشان داده شده است. در نمودار تکثیر، منحنی‌های تکثیر ژن *pla*-Real- time PCR در غلظت‌های مختلف نمایش داده شده است. نمودار استاندارد از محور عمودی CT و محور افقی کمیت تشکیل شده است که تعداد کپی‌های ژن را در هر رقت نشان می‌دهد. در منحنی استاندارد فاکتورهای بررسی CT نشان می‌دهد که CT با غلظت رابطه عکس دارد و با کاهش غلظت مقدار CT افزایش یافته است. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است در بررسی Quantity

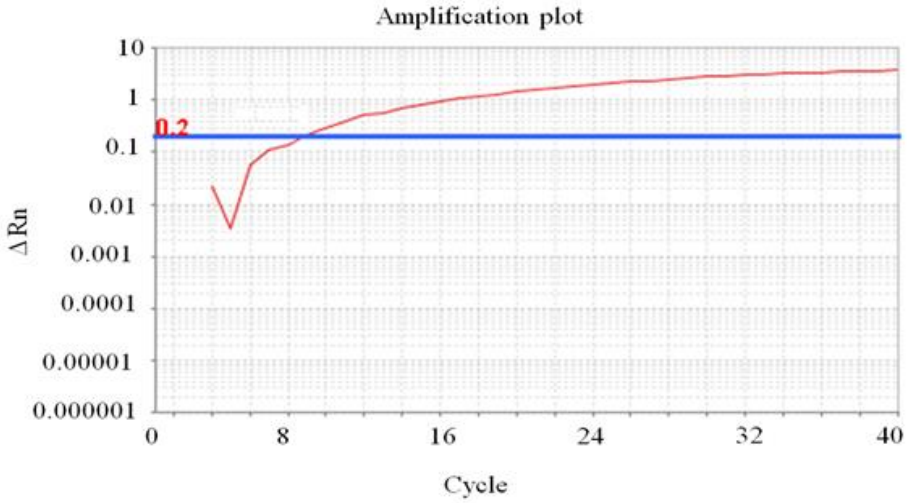
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

جدول ۱- فهرست پرایمر و پروب استفاده شده.
Table 1. The list of primers and probes used.

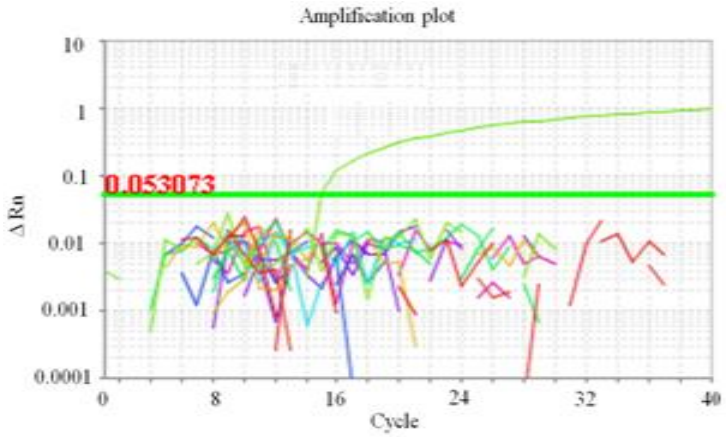
نام پرایمر و پروب	ترادف ('5 -> 3')
F-*pla*-real	GCTCACGTTATTATGGTAC
R-*pla* -real	TCTCCACTATTCTTATCAATG
P-*pla* -real	ATTAACGCTGGATATTATGTCACACCT

جدول۲- لیست باکتری‌های استفاده شده جهت سنجش اختصاصیت.
Table 2. The list of bacteria used for specificity assay.

نام میکرو ارگانیسم	شماره سویه
Shigella sonnei	ATCC 9290
Klebsiella pneumoniae	ATCC 7881
Escherichia coli	ATCC 25922
Bacillus subtilis	ATCC 6051
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Yersinia enterocolitica	PTCC 1480
Yersinia pseudotuberculosis	ATCC 29833

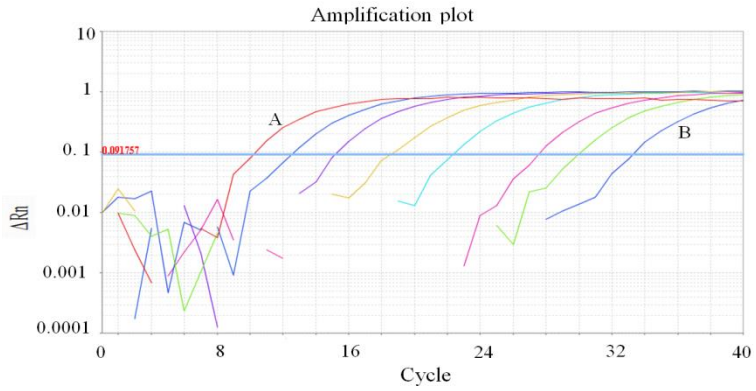


شکل ۱- منحنی تکثیر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.
Fig. 1. Amplification curve at 45°C



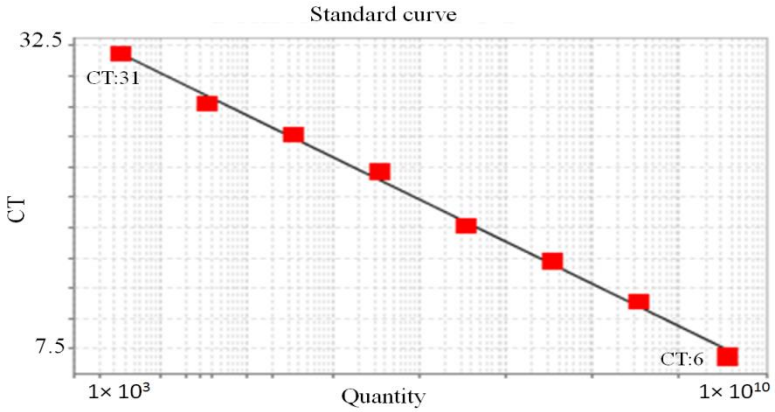
شکل ۲- منحنی ویژگی *pla*-Real- time PCR
Fig. 2. Specificity curve of *pla*-Real- time PCR

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]



شکل ۳- نمودار تکثیر جهت تعیین کم‌ترین حد تشخیص *pla*-Real- time PCR، A: 45ng/µl, B: 4.5 fg/µl

Fig. 3. Amplification curve to determine the limit of detection for *pla*-Real- time PCR, A: 45ng/µl, B: 4.5 fg/µl



شکل ۴- منحنی استاندارد *pla*-Real- time PCR

Fig. 4. Standard curve for *pla*-Real- time PCR

مشاهده شد حد تشخیص بین ۱۰۳× ۱ تا ۱۰۱۰×۱ و کم‌ترین حد تشخیص ۱۰۳× ۱ کپی از ژن *pla* -pTZ57R/T است. غلظت‌ها بین ۴/۵ fg/µl تا ۴۵ ng/µl است که کم‌ترین غلظت در این تست ۴/۵ fg/µl است. همان‌طور که در شکل۴ نشان داده شده است با کاهش غلظت، تکثیر دیرتر صورت گرفته و CT افزایش یافته است.

بحث

در دهه‌های اخیر با معرفی تکنیک Real- time PCR، این روش جهت شناسایی بسیاری از باکتری‌ها از جمله گونه‌های مختلف یرسینیا شامل: یرسینیا پستیس، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکولیتیکا توسعه یافته است (Matero *et al*., 2009; Wang *et al*., 2014). با توجه به این‌که یرسینیا پستیس در دسته A عوامل بیوتروریسمی قرار گرفته است و از آن در ساخت سلاح‌های زیستی می‌توان استفاده نمود به عنوان تهدیدی برای تمام جهانیان محسوب می‌گردد. در حال حاضر در بسیاری از نقاط جهان مناطق طاعون خیز وجود دارد، در ایران هم اگرچه آخرین گزارش‌ها رسمی طاعون انسانی مربوط به چندین دهه قبل است اما بر اساس گزارشات اخیر انستیتو پاستور ایران هنوز هم کردستان به عنوان ناحیه طاعون خیز مطرح است (Filippov *et al*., 2011; Esamaeili *et al*., 2013). روش‌های تشخیص مولکولی مختلفی برای این باکتری ارائه شده است که از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار و قابل اعتماد هستند (Loiez *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2013). بین روش‌های مولکولی تشخیص به وسیلهReal-time PCR نیاز به مراحل پس از PCR مانند: ژل الکتروفورز، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و تفسیر ژل با نور ماورای بنفش ندارد و احتمال آلودگی‌های مقاطع کاهش می‌یابد. همچنین در این روش تکثیر و تشخیص اسید نوکلئیک در یک محیط سربسته صورت گرفته و می‌توان مقدار کمی توالی هدف را تعیین نمود (Drancourt & Raoult, 2002; Arya *et al*., 2005; Mackay *et al*., 2004; Chase *et al*., 2005; Espy *et al*., 2006; Ayyadurai *et al*., 2010; Qu *et al*., 2010). تاکنون محققین از Real-time PCR جهت تشخیص باکتری مزبور در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

نمونه‌های مختلف بالینی، باستانی، کک و غیره استفاده کرده‌اند (Leal & Almeida, 1999; Sergueev *et al*., 2010).

نتایج مطالعه‌ای نشان داد: Real-time PCR ابزاری قدرتمند جهت تشخیص یرسینیا پستیس و یرسینیا سودوتوبرکلوزیس است. آنها در پژوهش خود، دوجفت پرایمر اختصاصی برای هر کدام از باکتری‌های نامبرده، یک جفت پرایمر مشترک برای هر دو باکتری، و همچنین یک جفت پرایمر دیگر جهت تکثیر باکتریوفاژ λ (کنترل داخلی) طراحی نمودند. در طی این مطالعه ژن کروموزومی *ypo2088* کدکننده متیل ترانسفراز و ژن پلاسمیدی *pla* که فعال‌کننده پلاسمینوژن است، به ترتیب برای یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا پستیس، و همچنین ژن مشترک *wzz* جهت تشخیص انتخاب گردید. نتایج آزمون نشان داد ژن *pla* جهت تشخیص مناسب است و تقریبا در هر سلول باکتری بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ کپی از این ژن وجود دارد (Matero *et al*., 2009).

در طی مطالعه‌ای بر روی ۱۴۹ نمونه به دست آمده از آسپیراسیون غدد لنفاوی بیماران مشکوک به طاعون خیارکی روش Real-time PCR (´۵ نوکلئاز و پروب هیبریداسیون) با ایمونوکروماتوگرافی و کشت جهت تشخیص یرسینیا پستیس مقایسه شده است. نمونه‌های تحت بررسی، تعداد ۴۰ مورد توسط کشت، ۸۸ مورد توسط ایمونوکروماتوگرافی، ۱۲۰مورد توسط ژن *caf1* و ۱۱۹مورد توسط ژن *pla* مثبت گردید. تعداد کم‌تر ژن *pla* نسبت به *caf1* به دلیل از دست دادن پلاسمید حاوی ژن مذکور عنوان شد. آن‌ها Real-time PCR را به عنوان روشی مناسب جهت تشخیص بیماران مشکوک به طاعون خیارکی پیشنهاد کردند (Riehm *et al*., 2011). بر روی نمونه‌های تنفسی شبیه سازی شده با آلودگی یرسینیا پستیس با استفاده از روش Real-time PCR nuclease ´5 ژن *pla* را هدف گذاری شده است. نتایج نشان داد در صورت عدم وجود مهارکننده در واکنش، اختصاصیت و حساسیت روش Real-time PCR ´5 nuclease به ترتیب برابر با ۱۰۰ درصد و 10^2 CFU/ml است و با توجه به مدت زمان کوتاه آن، ابزاری قدرتمند در جهت تشخیص یرسینیا پستیس در حملات بیوتروریسمی است (Loiez *et al*., 2003). جهت شناسایی تعدادی از ارگانیسم‌های مورد استفاده در ساخت سلاح‌های زیستی از Real-time PCR استفاده شده است. در بین میکروارگانیسم‌های هدف بالاترین اختصاصیت (۱۰۰ درصد) در ارتباط با یرسینیا پستیس مشاهده شد. جهت تشخیص یرسینیا پستیس، بورخولدریا مالئی، بورخولدریا سودومالئی، فرانسیسلا تولارنسیس و باسیلوس آنتراسیس که از میکروارگانیسم‌های با پتانسیل ساخت سلاح‌های زیستی هستند؛ استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد بالاترین اختصاصیت مربوط به یرسینیا پستیس (۱۰۰ درصد) است (Rachwal *et al*., 2012).

تشخیص یرسینیا پستیس بر اساس چهار ژن پلاسمیدی *pla*، *caf1*، *Ymt* و *YopT* صورت گرفت که اختصاصیت و حساسیت به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۵ cfu گزارش شد (Tomaso *et al*., 2003).

از روش Real-time PCR با استفاده از پروب TaqMan برای تشخیص یک ژن کروموزومی و سه ژن پلاسمیدی استفاده شده است. اختصاصیت ژن‌های *yihn*، *pla* ، *caf1* و *lcrv* نشان داد از دست رفتن پلاسمیدهای حاوی ژن هدف منجر به نتایج منفی کاذب می‌گردد و آزمون چندگانه بر روی ژن‌های مختلف به طور همزمان منجر به کاهش حساسیت می گردد (Stewart *et al*., 2008).

در مطالعه پیش رو، واکنش Real-time PCR با استفاده از پروب TaqMan جهت تشخیص ژن *pla* یرسنیا پستیس راه اندازی شد. در نمودار تکثیر ژن *pla* هیچ گونه تکثیری برای نمونه‌های کنترل منفی مشاهده نشد و ویژگی واکنش تایید گشت. کم‌ترین حد تشخیص در این آزمایش برای ژن برابر با *pla* ۴/۵ fg/µl (10^3 ×۱ کپی از ژن) تعیین شد. محدوده خطی روش کمی مذکور برای تشخیص *pla* بین ۴/۵fg -۴۵ng/µl (10^{10} ×۱ - 10^3 ×۱ کپی از ژن) مشاهده شد. در این پژوهش محدوده تمامی معیارهای Slope، y-intercept و R2 به ترتیب برابر با ۳/۳۴-، ۴۳/۰۴۹ و ۰/۹۹۹ به دست آمده که مطابق با دامنه تایید شده Real-time PCR است. ضریب R2 نشان دهنده دقت و صحت در تهیه رقت‌های سریال و درستی پیپتینگ رقت‌های سریال به درون چاهک‌ها است و y-intercept که نشان دهنده بازدهی خوب، حساسیت سنجش، صحت و دقت کمیت سنجی الگو است، نتایج پژوهش فوق را تایید می‌نماید. بر اساس نتایج به دست آمده روش Real-time PCR از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است و می‌توان از این روش برای تشخیص باکتری یرسینیا پستیس در نمونه‌های محیطی و بالینی استفاده نمود. این روش تشخیصی از سرعت بالایی برخوردار است و می‌توان از آن در حملات بیوتروریسمی و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی استفاده نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از کلیه مسئولینی که در دانشگاه علوم پزشکی آجا در انجام این مطالعه همکاری نموده‌اند، ابراز می‌دارند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]

REFERENCES

Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. – Expert Rev. Mol. Diagn. 5: 209-219.

Ayyadurai, S., Flaudrops, C., Raoult, D. and Drancourt, M. 2010. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. – BMC Microbiol. 10: 1-7.

Azizi, M.H. and Azizi, F. 2010. A history of the human plague in Iran. – Arch. Iran Med. 13: 563-569.

Chase, C.J., Ulrich, M.P., Wasieloski, L.P., Kondig, J.P., Garrison, J. and Lindler, L.E. 2005. Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. – Adv. Clin. Chem. 51: 1778-1785.

Drancourt, M. and Raoult, D. 2002. Molecular insights into the history of plague . – Microbes Infect. 4: 105-109.

Engelthaler, D.M., Gage, K.L., Montenieri, J.A., Chu, M. and Carter, L.G. 1999. PCR detection of *Yersinia pestis* in fleas: comparison with mouse inoculation. – J. Clin. Microbiol. 37: 1980-1984.

Esamaeili, S., Azadmanesh, K., Naddaf, S.R. Rajerison, M., Carniel, E. and Mostafavi, E. 2013. Serologic survey of plague in animals, western Iran. – J. Emerg. Infect. Dis. 19: 1549-1551..

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. and Smith, T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. – Clin. Microbiol. Rev. 19: 165-256.

Filippov .A.A., Sergueev, K.V., He, Y., Huang, X.Z., Gnade, B.T. and Mueller, A.J. 2011. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. – PLOS ONE 6: 1-11.

Kenny, J.H., Zhou, Y., Schriefer, M.E. and Bearden, S.W. 2008. Detection of viable *Yersinia pestis* by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. – J. Microbiol. Methods. 75: 293-301.

Leal, N.C and Almeida, A.M. 1999. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex PCR. – Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 41: 339-342.

Lindler, L.E., Fan, W. and Jahan, N. 2001. Detection of ciprofloxacin-resistant*Yersinia pestis* by fluorogenic PCR using the light Cycler. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 39: 3649-3655.

Loiez, C., Herwegh, S., Wallet, F., Armand, S., Guinet, F. and Courcol, R.J. 2003. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. – Eur. J. Clin. Microbiol. 10: 190-212.

Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. – Clin. Microbiol. Infect. 10: 190-212.

Matero, P., Pasanen, T., Laukkanen, R., Tissari, P., Tarkka, E. and Vaara M. 2009. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and Yersinia pseudotuberculosis. – Apmis. 117:34-44.

O'Hara, C.M. 2005. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceas and other aerobic gram-negative bacilli. – Clin. Microbiol. Rev. 18: 147-162.

Perry, R.D. and Fetherston, J.D. 1999. *Yersinia pestis* etiologic agent of plague. – Clin. Microbiol. Rev. 10: 35-66.

Qu, S., Shi, Q,. Zhou, L., Guo, Z., Zhou, D. and Zhai, J. 2010. Ambient stable quantitative PCR reagents for the detection of *Yersinia pestis*. – PLOS ONE 4: 1-7.

Rachwal, P.A., Rose, H.L., Cox ,V., Lukaszewski, R.A., Murch, A.L. and Weller, S.A. 2012. The potential of TaqMan Array Cards for detection of multiple biological agents by real-time PCR. – PLOS ONE 7: 1-7.

Riehm, J.M., Rahalison, L., Scholz, H.C., Thoma, B., Pfeffer, M. and Razanakoto, L.M. 2011. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. – Mol. Cell Probes. 25: 8-12.

Rollins, S.E., Rollins, S.M. and Ryan, E.T. 2003. *Yersinia pestis* and the plague. – Am. J. Clin. Pathol. 119: 78-85.

Schofield, D.A., Molineux, I.J. and Westwate, C. 2009. Diagnostic bioluminescent phage for detection of *Yersinia pestis*. – J. Clin. Microbiol. 47: 3887-3894.

Sergueev, K.V., Borschel, R.H., Nikolich, M.P. and Filippov, A.A. 2010. Rapid and sensitive detection of *Yersinia pestis* using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by real-time PCR. – PLOS ONE 5: 1-10.

Stewart, A., Satterfield. B., Cohen, M., O'Neill, K. and Robison, R. 2008. A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmids. – J. Med. Microbiol. 57: 324-331.

Suzuki, S., Sakakibara, H. and Hotta, S. 1997. Latex agglutination tests for measurement of antiplague antibodies. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 6: 332-336.

Tomaso, H., Reisinger, E.C., Dahouk, S., Frangoulidis, D., Rakin., A. and Landt, O. 2006. Rapid detection of Yersinia pestis with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. – FEMS Immunol. Med. Microbiol. 38: 117-26.

Tomaso, H., Thullier, P., Seibold, E., Guglielmo, V., Buckendahl, A. and Rahalison, L. 2007. Comparison of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of *Yersinia pestis*. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 45: 3404-3407.

Tomaso, H., Reisinger, E.C., Dahouk, S., Frangoulidis, D., Rakin, A. and Landt, O. 2003. Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. – FEMS Microbiol. Immunol. 38: 117-126.

Wang, J.Z., Duan, R., Liang, J.R., Huang, Y., Xiao, Y.C, Qiu, H. and Wang, X. 2014. Real-time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the ail and fox A Genes – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 52: 4443-4444.

Wilmoth, B.A., Chu, M.C. and Quan, T.J. 1996. Identification of *Yersinia pestis* by BBL crystal enteric / nonfermentor identification system. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34: 2829-2830.

Woron, A.M., Nazarian, E.J., Egan, C., McDonough, K.A., Cirino, N.M. and Limberger, R.J. 2006. Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis*. – Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56: 261-268

Zhang. Z., Liang. Y., Yu. D., Xia. L. and Hai. R. 2013. Development of a multiplex polymerase chain reaction (PCR) with an internal control method to detect *Yersinia pestis* in the plague foci surveillance. – Afr. J. Microbiol. Res.7: 698-700.

*****

How to cite this article:

Kabiri, Kh. and Majidzadeh, K. 2020. Molecular detection of causative agent of plague based on *pla* gene. – Nova Biol. Reperta 6: 374-381. (In Persian)

کبیری، خ. و مجیدزاده، ک. ۱۳۹۸. تشخیص مولکولی عامل طاعون بر اساس ژن *pla*. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۳۸۱-۳۷۴.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.10.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.374]