مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵: ۲۴۱-۲۴۸

● مقاله تحقیقی کد مقاله: ۲۱

طراحی و ساخت کنترل داخلی جهت تشخیص یرسینیا پستیس بوسیله PCR

کبیری خاطره ۱*
دکتر مجیدزاده کیوان ۲

۱- دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲- استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا تهران

* **نشانی نویسنده مسؤول:** پاسداران، گلستان پنجم، بوستان دهم، دانشگاه آزاد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی

تلفن: ۰۹۳۳۶۴۸۵۸۱۱

نشانی الکترونیکی:
Kabiri.kh93@gmail.com

چکیده

زمینه: یرسینیا پستیس، عامل طاعون، باکتری گرم منفی، غیر متحرک و کند رشد متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. بر اساس طبقه‌بندی CDC این باکتری به دلیل نرخ بالای مرگ و میر و انتقال آسان انسان به انسان در دسته A عوامل بیوتروریسمی قرار گرفته است. علی‌الرغم حساسیت و دقت بالای PCR، ممکن است نتایج منفی کاذب به علت وجود مهارکننده موجود در نمونه‌های بالینی مشاهده شود. هدف از این مطالعه ساخت کنترل داخلی جهت تشخیص اختصاصی یرسنیا پستیس می‌باشد.

روش کار: در این پژوهش، پرایمرهای تشخیصی بر اساس ناحیه حفاظت شده‌ای از ژن‌های caf1 و pla توسط نرم افزار Allele ID 7.6 طراحی گشت. پرایمرهای هیبرید برای کنترل داخلی با استفاده از توالی ژن AOX1 مخمر پیکیا پاستوریس و ژن هدف طراحی شد. واکنش PCR بر روی DNA ژنومیک یرسینیا پستیس انجام گشت. محصول آن جهت ساخت کنترل داخلی در وکتور pTZ57R/T قرار گرفت. سپس، عملکرد کنترل داخلی توسط پرایمرهای تشخیصی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در الکتروفورز محصول PCR ژن‌های caf1 و pla به ترتیب باندهایی به طول ۱۱۷ و ۱۳۶ جفت باز و نتیجه تکثیر کنترل داخلی caf1-IC و pla-IC به ترتیب قطعاتی با طول ۲۲۷ و ۲۵۰ جفت باز رویت گردید، بنابراین محصول کنترل داخلی از نظر اندزه اختلاف مناسبی با محصول ژن‌های هدف دارا می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد کنترل مثبت داخلی ابزاری مؤثر برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب و تأیید صحت نتایج می‌باشد.

واژگان کلیدی: یرسینیا پستیس، طاعون، PCR، کنترل داخلی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۴/۲۰ تاریخ اصلاح نهایی: ۹۵/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۱۲

مقدمه

یرسینیا پستیس عامل بیماری طاعون، باسیل گرم منفی، بدون حرکت واسپور از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد [۱]. جنس یرسینیا شامل یازده گونه است اما تنها سه گونه یرسینیا پستیس، یرسینیا انتروکولیتیکا و یرسینیا سودوتوبرکلوزیس در بیمار زایی انسان نقش دارند. هر سه گونه دارای پلاسمید pCD1 که سیتم ترشحی تیپ سه توسط آن کد می‌گردد [۲و۳]. این ارگانیسم معمولاً از طریق نیش کک گزنوپسیلا کئوپیس[۱] به انسان و جوندگان منتقل می‌گردد. بر اساس طبقه‌بندی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در آمریکا باکتری مذکور در دسته A عوامل بیولوژیک قرار گرفته است که به راحتی از طریق آئروسل‌های تنفسی از انسان به انسان منتقل می‌شود و از این ویژگی جهت ساخت سلاح‌ها بیولوژیک استفاده گردید است. همچنین علاوه بر این مناطق طبیعی آلوده به طاعون تقریباً در همه کشورها به جز استرلیا، مدار استوا و اطراف آن و مناطق گرمسیری دارای دمای c° ۵۵-۴۰ می‌باشد [۸-۴].

آخرین گزارش رسمی مبنی بر مشاهده طاعون در بین جوندگان در سال ۲۰۱۱ توسط تیم تحقیقاتی انیستیتو پاستور ایران به منظور مطالعه بر روی حیوانات مخزن طاعون در ناحیه غرب ایران (محدوده مرز بین استان‌های کردستان و همدان منطقه‌ای به مساحت ۲۰۰۰ متر مربع) را ثبت گردیده است که در طی این بررسی یک قلاده سگ آلوده به طاعون شناسایی گشته است. در ادامه تحقیقات در سال ۲۰۱۲ منطقه‌ای در حدود ۱۲۰۰ متر مربع (منطقه‌ای که سگ آلوده مشاهده شده بود) بررسی و سه قلاده سگ و یک جونده مبتلا به طاعون مشاهده شد. نتایج آنها نشان داد، اگر چه گزارش رسمی از طاعون انسانی از سال ۱۹۶۶ این منطقه گزارش نشده است اما این منطقه همچنان به عنوان یک کانون طاعون خیز فعال مطرح می‌باشد [۹]. جهت تشخیص میکروارگانسیم مذکور روش‌های تشخیصی کلاسیک، سرولوژی و مولکولی متعددی وجود دارد. امروزه جهت تشخیص سریع آن تست‌های تشخیص مولکولی بر اساس انواع PCR و Real-time PCR طراحی و ساخته گشته است [۱۴-۱۰].

علیرغم حساسیت و ویژگی بالا روش‌های تشخیص مولکولی، مشاهده نتایج منفی کاذب بسیار نگران‌کننده است. برای غلبه بر این مشکل در طی یک آزمایش PCR از کنترل‌های متفاوتی همچون کنترل واکنش‌گرها، کنترل مثبت و ... استفاده می‌گردد [۱۷-۱۵]. اما تمامی این کنترل‌های در یک تیوب جداگانه بررسی می‌شود در نتیجه نتایج آن نمی‌تواند نتایج منفی کاذب را تأیید کند. در طی بررسی‌های متعدد محققین دریافتند کنترل‌های مذکور تنها برای اطمینان از عملکرد دستگاه، اجزای واکنش و ... قابل استفاده می‌باشند. در یک آزمایش PCR عواملی از جمله خطای انسانی، وجود چرخه‌های حرارتی متعدد، عملکرد نادرست ترموسایکلر، فعالیت ضعیف DNA پلیمراز و ... سبب می‌شود نتایج PCR چندان قابل اعتماد نباشد و از سوی بسیاری از محققین با وجود تمام مزایایی که PCR دارد به عنوان یک استاندارد طلایی معرفی نشود. در چنین شرایط وجود یک کنترل داخلی[۲] (IC) در تیوب واکنش نمونه می‌تواند سبب قطعیت نتایج مثبت و منفی شود. کنترل داخلی یک سکانس DNA است که در همان تیوبی که نمونه اصلی قرار دارد به طور همزمان با سکانس هدف تکثیر می‌شود. در یک واکنش PCR بدون IC عدم وجود سیگنال و باند در پایان واکنش نشان‌دهنده عدم حضور سکانس DNA هدف در واکنش است. این نتیجه منفی می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد اما در یک واکنش PCR که در آن IC وجود دارد، در صورت عدم وجود سکانس DNA هدف همیشه یک باند یا سیگنال IC تولید می‌شود که می‌تواند تأییدی برای صحت نتایج منفی و عدم و جود مهارکننده‌ها در واکنش باشد [۲۲-۱۸] هدف از این مطالعه طراحی و ساخت کنترل داخلی جهت تأیید صحت حساسیت و اختصاصیت تشخیص مولکولی یرسنیا پستیس و جلوگیری از نتایج منفی کاذب می‌باشد.

روش کار

طراحی پرایمر: در این مطالعه ژن‌های Caf1 (بر روی پلاسمید pMT1) و pla (بر روی پلاسمید pPCP1) جهت طراحی کنترل داخلی انتخاب گشت. این دو ژن از عوامل ضروری برای بیمارزایی باکتری در بدن محسوب می‌شوند. ژن pla برای عفونت زیر جلدی لازم است و ژن caf1 در جلوگیری از فاگوسیتوز باکتری نقش دارد. از طرفی در مطالعات مختلف گونه‌هایی از این باکتری مشاهده شده است که یکی از پلاسمیدهای pMT1 یا pPCP1 را از دست داده‌اند اما جزء گونه‌های بیمارزا محسوب می‌شوند در نتیجه انتخاب تنها یک ژن برای تشخیص و یا طراحی کنترل منجر به نتیجه منفی کاذب می‌گردد اما با هدف‌گذاری هر دو ژن می‌توان بر این مشکل غلبه کرد [۲۴و ۲۳، ۱]. پس از

۱- Xenopsylla Cheopis

۲- Internal Control

تهیه ترادف‌های کامل ژن‌های pla و caf1 از سایت NCBI[۳]، پرایمرهای ژن‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار Allele ID 7.6 طراحی گردید. پرایمرهای طراحی گشته در این مطالعه در جدول یک آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی گشته برای ژن‌های Caf1 و pla

caf1- PCR	
F - caf1	CCGCATCACTCTTACATA
R- caf1	GTGGTTCCTGTTTTATAGC
pla- PCR	
F-pla	GCTCACGTTATTATGGTAC
R-pla	TCTCCACTATTCTTATCAATG

تهیه پلاسمیدهای کنترل مثبت دارای ژن caf1 و pla: کنترل مثبت خارجی در آزمایشات PCR جهت تأیید کیت تشخیصی از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعات قبلی DNA ژنومیک این باکتری را تهیه و ژن‌های caf1 و pla را تکثیر و در وکتور pTZ57R/T کلون کردند. در مطالعه پیش روی نیز از DNA به صورت پلاسمیدهای pTZ57R/T - caf1 و pTZ57R/T - pla به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش PCR: جهت ارزیابی ژن‌های هدف و تشخیص یرسینیا پستیس، بهینه‌سازی غلظت اجزای واکنش و برنامه حرارتی، واکنش PCR در حجم ۲۵ µl انجام گشت. واکنش ۲۵ µl بر اساس کلرید منیزیوم (dNTPs)، (۱۰mM)، (۲۵mM)، بافر ۱۰X، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، پرایمر جلویی و عقبی (DNA 10)، (pmol/ µl) پلاسمیدی pTZ۵۷R/T - caf1 و pTZ57R/T - pla (ng/µl 100) (ng/µl 100) تهیه گشت. یک واکنش واکنش ۲۵ µl به عنوان کنترل منفی با استفاده از آب دیونیزه شده به جای DNA هدف تهیه شد. برنامه دمایی ترموسایکلر برای ۴۰ چرخه برای ژن‌های caf1 و pla به ترتیب دمای واسرشت اولیه ۹۴ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰ دقیقه سپس در دمای ۹۴ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۴۵ ثانیه دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۵۰ ثانیه و دمای طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژن به مدت ۳۰ دقیقه تنظیم گشت. پس از پایان واکنش ۷ µl از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ همراه با بافر TBE X ۰/۵ و رنگ اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۱۰۰ توسط دستگاه عکسبرداری از ژل الکتروفورز (Syngene documentation system Gel) مشاهده گردید.

طراحی کنترل داخلی: جهت ساخت کنترل داخلی رقابتی نیاز به پرایمرهای هیبرید است که بتواند سکانس هدف و کنترل داخلی را تکثیر کند. برای ساخت سکانس کنترل داخلی از توالی ژن AOX1 مخمر پیکیا پاستوریس[۴] استفاده گشت. به دو انتهای سکانس AOX1 توالی پرایمرهای ژن‌های هدف افزوده گردید (جدول۲). به منظور تهیه سکانس caf1-IC و pla-IC از وکتور pPiczα A که دارای ژن Aox1 است و پرایمرهای هیبرید استفاده گشت. در طی واکنش PCR پرایمرهای هیبرید طراحی شده با تکثیر سکانس Aox1 به دو انتهای آن می‌چسبند.

۳- National center for biotechnology information

۴- Pichia pastoris

جدول دو: پرایمرهای طراحی گشته برای ژن های caf1 – IC و pla- IC

PCR – caf1- IC	
F- caf1- IC	CCGCATCACTCTTACATAAGATCTAACATCCAAAG
R- caf1- IC	CCAGCCCAGTTAGCTATAAAACAGGAACCAC
PCR – pla- IC	
F-pla- IC	GCTCACGTTATTATGGTACAGCAGACCGTTGC
R-pla – IC	CAAGCTCCGCATCATTGATAAGAATAGTGGAGA

واکنش PCR بر اساس کلرید منیزیوم (dNTPs)، (۱۰mM)، (۲۵mM)، بافر ۱۰X، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، پرایمر جلویی و عقبی هیبرید (10 pmol/µl)، DNA پلاسمیدی pPiczα A

(ng/µl 20) برای هر یک از ژن‌ها به طور جداگانه تهیه گشت. برنامه دمایی ترموسایکلر برای ۳۵چرخه برای ژن‌های caf1 و pla به ترتیب دمای واسرشت اولیه ۹۴ و ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۵ دقیقه سپس در دمای ۹۴ و ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۴۵ ثانیه دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۴۵ ثانیه و دمای طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژن به مدت ۳۰ دقیقه تنظیم گشت.

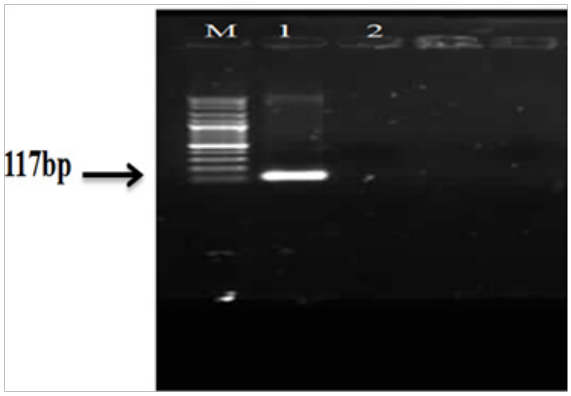
برای واکنش اتصال نیاز به وکتوری برای انتقال قطعه اینسرت به سلول میزبان است. در این پژوهش از روش کلون‌سازی TA و وکتور pTZ57R/T کیت InsTAclone™ PCR Cloning از شرکت Fermentase استفاده شده است. در این حامل‌ها از فعالیت ترمینال ترانسفرازی DNA پلیمر از Taq به منظور کلون‌سازی استفاده شده است و پلاسمیدهای کلون‌سازی PCR به گونه‌ای طراحی شده هستند که حاوی یک T در انتهای ’۳ دنباله‌های خود باشند تا کلون‌سازی مستقیم محصولات حاصله از DNA پلیمر از Taq حاوی آدنین اضافی در انتهای ’۳ را ممکن سازند [۱۷]. بنابراین قطعه حاصل از PCR که توسط پرایمرهای هیبرید تکثیر گشته در وکتور pTZ57R/T به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته سپس در باکتری اشرشیا کلی سویه E.coli سویه JM107 برای ترانسفورم گردید. جهت انتخاب کلنی حاوی کنترل داخلی محصول حاصل از کلونیگ توسط غربالگری سفید آبی در محیط LB-Agar شرکت Merck حاوی IPTG، X-Gal و آمپی‌سیلین بررسی شد. کلون‌های حاوی کنترل داخلی انتخاب گشته بر روی محیط کشت LB Broth شرکت Merck کشت داده شد سپس استخراج پلاسمیدهای حاوی کنترل داخلی بر روی کلنی‌های رشد کرده به وسیله کیت Mini Extraction kit (K-31111, K-3112) بیونیر انجام گشت.

بررسی عملکرد کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای

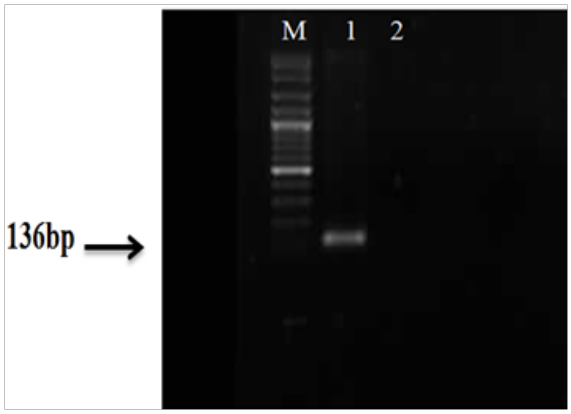
هدف: جهت بررسی تکثیر کنترل داخلی واکنش PCR توسط پرایمر های هدف راه‌اندازی گشت. سه واکنش جداگانه کنترل داخلی (pla-IC, caf1-IC)، کنترل مثبت (pTZ57R/T-caf1) و (pTZ57R/T-pla)، کنترل منفی (آب دیونیزه شده) برای هر یک از ژن‌ها به طور جداگانه تهیه گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ژن‌های caf1 و pla یرسینیا پستیس جهت طراحی ساخت کنترل داخلی انتخاب گردید. الکتروفورز محصول PCR بهینه شده ژن‌های caf1 و pla توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده به ترتیب باندهایی به طول ۱۱۷ و ۱۳۶ جفت باز بر روی ژل مشخص گردیده که در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

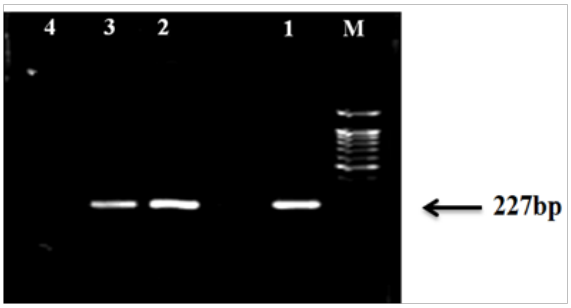


شکل ۱- نتایج تکثیر ژن caf1
M: مارکر ۱۰۰bp، ۱: pTZ57R/T- caf1، ۲: کنترل منفی

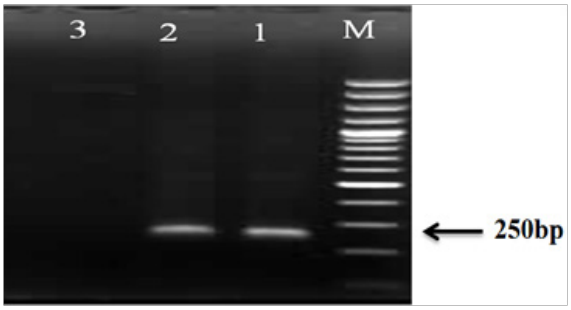


شکل ۲- نتایج تکثیر ژن pla
M: مارکر ۱۰۰bp، ۱: pTZ57R/T- pla، ۲: کنترل منفی

نتایج تکثیر ژن Aox1 با استفاده از پرایمرهای هیبرید caf1-IC و pla-IC: برای ساخت سکانس IC با استفاده از پرایمرهای هیبرید و وکتور pPiczα A یک واکنش caf1-IC-PCR و pla-IC-PCR انجام شد. نتیجه واکنش caf1-IC و pla-IC به ترتیب قطعاتی با طول ۲۲۷ جفت باز و ۲۵۰ جفت باز است که در شکل‌های ۳و ۴ نشان داده شده است.

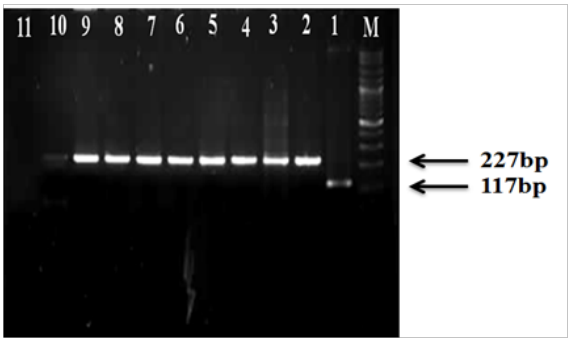


شکل ۳- نتایج سکانس caf1-IC
M: مارکر ۱۰۰bp، ۳ -۱ سکانس caf1-IC، ۴ – کنترل منفی

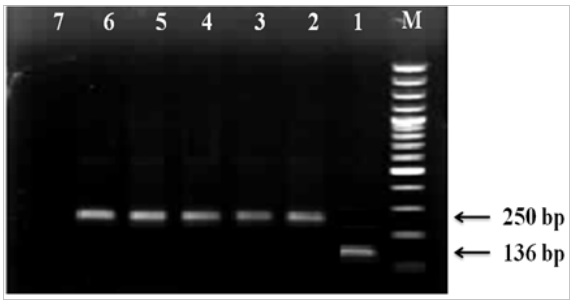


شکل ۴- نتایج سکانس pla-IC
M: مارکر ۱۰۰bp، ۱و۲سکانس pla-IC، ۳ – کنترل منفی

جهت بررسی تکثیر کنترل داخلی توسط پرایمر های هدف واکنش PCR بر روی caf1 - C و pla - IC انجام گردید. نتیجه PCR بر روی caf1 - C و pla - IC به ترتیب قطعاتی با طول ۲۲۷ جفت باز و ۲۵۰ جفت باز است که در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل ۵- نتایج تکثیر سکانس caf1-IPC به وسیله Colony PCR
M: مارکر ۱۰۰bp، pTZ57R/T- caf1:۱ ، caf1-IPC:۲-۱۰، ۱۱: کنترل منفی



شکل ۶- نتایج تکثیر سکانس pla-IC بوسیله Colony PCR
M: مارکر ۱۰۰bp، pTZ57R/T- pla:۱ ، pla-:۲-۶ ، IC ، ۷: کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

در واکنش‌های PCR معمولاً انواع مختلفی از کنترل از جمله: کنترل مثبت خارجی، کنترل منفی خارجی، کنترل واکنش‌گرها و کنترل غلظت‌های استاندارد استفاده می‌گردد [۲۵و۱۷]. اما تمامی این کنترل‌ها خارجی می‌باشد و به یک کنترل داخلی جهت تأیید واکنش‌های تیوب حاوی ژن هدف نیاز می‌باشد. کنترل‌های داخلی شامل کنترل داخلی رقابتی و غیر رقابتی می‌باشد. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت یک کنترل داخلی رقابتی جهت تشخیص یرسینیا پستیس می‌باشد. در این روش از پرایمرهای مرکب استفاده می‌شود. بر روی سکانس هدف و IC با یک جفت پرایمر مشترک تحت شرایط یکسان در یک تیوب واکنش PCR انجام می‌شود. در این نوع از IC بین سکانس هدف و قطعه IC برای تکثیر رقابت وجود دارد و میزان IC به لحاظ محدودیت تشخیص حائز اهمیت است. در شرایطی که دو قطعه متفاوت و نزدیک به هم با یک جفت پرایمر یکسان تکثیر پیدا می‌کنند، مهارکننده‌ها و تقویت‌کننده‌ها می‌توانند بر روی محصول یک یا هر دو آن‌ها تأثیر گذارند که این امر وابسته به مولاریته، طول قطعات، توالی و تشکیل ساختارهای ثانویه قطعات DNA است [۳۱-۲۶]. استفاده از IC رقابتی سبب پایین آمدن راندمان تکثیر سکانس هدف و در نتیجه کاهش حد تشخیص می‌شود. در چنین شرایطی تعیین غلظت مناسب IC بسیار حائز اهمیت است و باید برای انتخاب آن بسیار دقت کرد. کمترین غلظتی از IC که بتواند در طی واکنش PCR تکثیر شود بسیار مناسب است در غیر این صورت با سکانس DNA هدف در استفاده از پرایمرها و تکثیر رقابت می‌کند و سبب می‌شود هیچ سیگنال یا باندی از سکانس هدف تشکیل نشود و سبب نتیجه

منفی کاذب می‌شود. در شرایطی که غلظت IC بالا است و غلظت DNA هدف در تیوب نمونه پایین است، مهارکننده‌ها مانع تکثیر DNA هدف می‌شوند اما نمی‌توانند بر روی تکثیر IC اثری داشته باشند در نتیجه سکانس IC تکثیر می‌شود و سکانس هدف تکثیر نمی‌شود و نتیجه منفی کاذب به دنبال خواهد داشت [۳۳ و ۳۲،۲۶].

نکته دیگری که در طی طراحی IC باید در نظر گرفت طول قطعه IC است. بر اساس کینتیک واکنش PCR در طی یک واکنش، هر چه قطعه تکثیری کوچکتر باشد تکثیر بهتری دارد. اگر طول سکانس هدف بزرگتر از IC باشد واکنش به نفع قطعه کوچک‌تر یعنی IC انجام می‌شود. بهترین اندازه برای قطعه IC کمتر از ۵۰۰bp پیشنهاد شده است تا بر روی حساسیت ذاتی PCR تأثیری نداشته باشد. به هر حال طول قطعه IC طوری باید در نظر گرفته شود که از سکانس هدف بزرگ‌تر باشد و از رقابتی بودن واکنش اطمینان داشته باشیم. اگر سکانس هدف تکثیر پیدا کند اما اثری از تکثیر IC مشاهده نشود، نتیجه مثبت آن قابل قبول است زیرا مقدار DNA سکانس هدف در تیوب واکنش بیشتر از IC بوده به علاوه استفاده از IC برای کنترل واکنش است و تکثیر آن ضروریت ندارد. در طی آزمایشات، تکثیر سکانس هدف مهم است. اگر هم IC و هم سکانس هدف تکثیر پیدا نکنند نتیجه منفی فاقد هر گونه ارزشی است و مطمئناً در واکنش PCR مهارکننده وجود دارد. به هر حال، نقطه ضعف این استراتژی پایین آمدن حد تشخیص است زیرا IC و سکانس هدف برای استفاده از پرایمرها و تکثیر با هم در رقابت هستند [۳۶ و ۳۵،۲۶].

در مطالعه حاضر جهت جلوگیری از نتایج کاذب یک کنترل داخلی رقابتی طراحی شد. در ساخت این کنترل از سکانس ژن Aox1 مخمر پیکیا پاستوریس استفاده شد. پروب کنترل داخلی با لیبلی متفاوت از پروب ژن هدف نشانه‌گذاری شد.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ یک کنترل مثبت داخلی رقابتی برای تشخیص یرسینیا پستیس در مناطق طاعون خیز طراحی کردند. آن‌های یک واکنش Multiplex PCR راه‌اندازی کردند. در مقایسه این روش با کشت، Multiplex PCR دارای سرعت و دقت بالاتری است علاوه بر این و جود یک کنترل داخلی از نتایج منفی کاذب جلوگیری می‌کند. این محققین تشخیص یرسینیا پستیس با استفاده از کنترل داخلی را روشی بسیار مفید و مناسب ارزیابی کرند [۳۷].

Janse و همکاران در سال ۲۰۱۰ جهت تشخیص باسیلوس آنتراسیس، فرانسیسلا تولرانسیس و یرسینیا پستیس یک Multiplex qPCR و کنترل داخلی طراحی کردند. نتایج نشان داد این روش بسیار سریع و دقیق است، همچنین وجود کنترل داخلی سبب کاهش نتایج منفی کاذب و اطمینان بخشیدن به قطعیت نتایج مثبت می‌شود [۳۸].

در مطالعه حاضر جهت جلوگیری از نتایج کاذب یک کنترل داخلی رقابتی طراحی شد. در ساخت این کنترل از پرایمرهای هیبرید جهت تکثیر سکانس ژن Aox1 مخمر پیکیا پاستوریس استفاده گشت. پس از تکثیر سکانس مذکور عملکرد کنترل داخلی رقابتی طراحی گشته توسط پرایمرهای ژن‌های هدف مورد بررسی قرار گرفت. در این نوع کنترل بر خلاف کنترل داخلی غیر رقابتی عملکرد پرایمرهای هدف نیز در تیوب واکنش حاوی ژن هدف نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. در تشخیص مولکولی میکرو ارگانیسم مذکور نتایج منفی می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد اما در یک واکنش PCR که در آن کنترل داخلی وجود دارد، در صورت عدم وجود سکانس DNA هدف همیشه یک باند کنترل داخلی تولید می‌شود که می‌تواند تأییدی برای صحت نتایج منفی و عدم و جود مهارکننده‌ها در واکنش باشد.

مراجع

1- Riehm J.M, Rahalison L, Scholz H.C, Thoma B, Pfeffer M, Razanakoto L.M, et al. Detection of Yersinia pestis using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. Molecular and cellular probes. 2011; 25(1):8-12.

2- Schubert.S, The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects, International Journal of Medical Microbiology. 2004; 294, 83–94

3- Zhou D, Han Y, Yang R. Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. Microbes and infection. 2006; 8(1):273-84.

4- The Pla surface protease/adhesin of Yersinia pestis mediates bacterial invasion into human endothelial cells AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of Yersinia pestis, Clinical icrobiology reviews. 2004;17(2):434-64.

5- Butler T. Plague into the 21st century. Clinical infectious diseases. 2009; 49(5):736-42.

6- Anisimov AP, Amoako K.K. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. Journal of medical microbiology. 2006;55(11):1461-75.

7- Anker M, Schaaf D. WHO report on global surveillance of epidemic- prone infectious diseases.World-Health Organization. 2000;11-23.

8- Stewart A, Satterfield B, Cohen M, O'Neill K, Robison R. A quadruplex real-time PCR assay for the detection of Yersinia pestis and its plasmids. Journal of medical microbiology. 2008;57(3):324-331.

9- .Esamaeili S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E.Serologic Survey of Plague in Animals, Western Iran,Emerg Infect Dis. 2013; 19(9): 1549[Persian].

10- Bubonic Plague Kills at least 20 People in Madagascar, Available from: URL: http://entomologytoday.org,(Accessed:11 December 2013).

11- Cao LK, Anderson GP, Ligler FS, Ezzell J. Detection of Yersinia pestis fraction 1 antigen with a fiber opticbiosensor. J Clin Microbiol. 1995; 33(2): 336-41

12- Rajerison M, Dartevelle S, Ralafiarisoa LA, Bitam I, Tuyet DTN, Andrianaivoarimanana V," etal", Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of Yersinia pestis antibodies in humans and reservoirs, PLoS One. 2009; 3(4): 421.

13- Rachwal PA, Rose HL, Cox V, Lukaszewski RA, Murch AL, Weller SA. The potential of TaqMan Array Cards for detection of multiple biological agents by real-time PCR. PLoS One. 2012; 7(4):e35971.

14- Mahesh.S. Molecular detection of Yersinia pestis isolates of Indian origin by using Pla specific monoclonal antibodies. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 28 (2005) 1998; 131–144

15- Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadoro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):191-7.

16- Murphy N, McLauchlin J, Ohai C, Grant K Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for Listeria monocytogenes and Salmonella enterica. International journal of food microbiology. 2007;120(1):110-9.

17- McPherson M, Møller S. PCR: Taylor & Francis. 2007.

18- Laurie .J. Development of a novel internal positive control for Taqman based assays. Molecular and Cellular Probes. 2005; 19 (2005) 51–59

19- Barkham T. Medical Environment Should Not Be Mandatory in the ClinicalInternal Amplification Control for PCR. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(7):3379.

20- Betsou.F. Samples Chlamydia trachomatis DNA from Urine Control DNA for PCR Amplification of Construction and Evaluation of Internal. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2003; p. 1274–1276

21- Konet DS, Mezencio JM, Babcock G, Brown F. Inhibitors of RT-PCR in serum. JVirol Methods. 2000;84(1):95-98.

22- Markus . S. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. Journal of Virological Methods . 2003; 108 (2003) 1-8.

23- Mahesh.S. Molecular detection of Yersinia pestis isolates of Indian origin by using Pla specific monoclonal antibodies. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 2005; 28 : 131–144.

24- Leal N.C, Almeida A.M.P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in Yersinia pestis by multiplex-PCR.Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1999;41(6):339-42.

25- Zhou D, Han Y, Yang R. Molecular and physiological insights into plague transmission.virulence and etiology. Microbes and infection. 2006;8(1):273-84.

26- Murphy N, McLauchlin J, Ohai C, Grant K. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for Listeria monocytogenes and Salmonella enterica, International journal of food microbiology. 2007; 120(1):110-9.

27- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. Journal of clinical microbiologyc. 2004; 42(5):1863-8.

28- Hoorfar J, Wolffs P, RÅDSTRÖM P Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. Apmis b. 2 004;112(11-12):808-14.

29- Murphy N, McLauchlin J, Ohai C, Grant K. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for Listeria monocytogenes and Salmonella enterica, International journal of food microbiology. 2007; 120(1):110-9.

30- Hoorfar, J, Cook, N, Malorny, B,Wagner, M, De Medici, D, Abdulmawjood A, Fach. P. Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 96 (4) 221–222

31- Hoorfar, J., and N. Cook. Critical aspects of standardization of PCR. Methods Mol. Biol. 2003; 216:51–64.

32- Malorny, B., P. T. Tassios, P. Ra°dstro¨m, N. Cook, M. Wagner, and J. Hoorfar. Standardization of diagnostic PCR for the detection of food- borne pathogens. Int. J. Food Microbiol. 2003; 83:39–48.

33- Malorny, B., C. Bunge, J. Hoorfar, R. Helmuth. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69:290–296.

34- Sachadyn, P., and J. Kur. The construction and use of a PCR internal control. Mol. Cell. Probes 1998; 12:259–262.

35- Becky J. Brey, Roy P. Radcliff . Design and development of an internal control plasmid for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using real-time PCR. Molecular and Cellular Probes. 2006; 20 (2006) 51–59.

36- Y. Tang, Q. Wang, . Development of a ssRNA internal control template reagent for a multiplex RT-PCR to detect turkey astroviruses. Journal of Virological Methods. 2005; 126 (2005) 81–86.

37- Zhang Z, Liang Y, Yu D, Xia L, Hai R. Development of a multiplex polymerase chain reaction (PCR) with an internal control method to detect Yersinia pestis in the plague foci surveillance. African Journal of Microbiology Research. 2013;7(8):698-700.

38- Janse I, Hamidjaja R.A, Bok J.M, van Rotterdam B.J. Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis by using multiplex qPCR including internal controls for using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC microbiology. 2010; 10(1):314.