

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

نرگس صفری فروشانی^۱، دکتر علی کرمی^۲، فاطمه پورعلی^۳، دکتر اکرم عیدی^۴

نویسنده مسؤل: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی Karami@bmsu.ac.ir

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) بر روی 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، واحد 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 می‌باشد (۱). همه‌ی سالمونلاها به استثنای سالمونلا تیفی که فقط سبب بیماری‌زایی در انسان و نخستی‌های عالی می‌باشد برای انسان، پستانداران و پرندگان بیماری‌زا می‌باشد به همین جهت سرایت آن از طریق آب، مواد غذایی، مدفوع و ادرار انسان، پستانداران و پرندگان بیمار و آلوده می‌باشد (۲). سیاه زخم یا شاربن بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است که توسط باسیلوس آنتراسیس ایجاد می‌گردد، این بیماری دامی در تمام نقاط جهان مشاهده می‌گردد و باکتری به‌طور غیر مستقیم از محصولات دامی آلوده یا به‌طور مستقیم توسط اسپور باسیل سیاه زخم به انسان منتقل می‌شود. سیاه زخم به چهار شکل پوستی، ریوی، گوارشی و منژیت دیده می‌شود این باکتری به دلیل خصوصیات ویژه آن که عبارت از داشتن اسپور، حدت بالا، سهولت تولید انبوه و به‌کارگیری درصدهای خطرناک سلاح‌های بیولوژیک و بیوتوررسم قرار دارد (۳). طاعون بیماری مهلک و خطرناکی است که به دنبال آلودگی با باکتری یرسینیا پستیس در اغلب جوندگان و انسان ایجاد می‌شود (۴). این باکتری کوکوباسیل گرم منفی، فاقد حرکت و اسپور می‌باشد که به‌طور معمول به شکل مرضی همه‌گیر بین جوندگانی مانند موش منتقل می‌شود (۵). عامل بیماری از طریق گزش اکتوپارازیت‌های آلوده، به‌ویژه کک به انسان قابل انتقال است (۶ و ۷). بیماری به سه شکل بالینی خیارکی، سپتیمی، تنفسی ظاهر می‌شود. فرم تنفسی شدیدترین حالت بالینی بیماری را ایجاد می‌کند، این حالت از بیماری بیشترین موارد مرگ‌ومیر 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 الایزا و ایمونوفلورسنت استفاده می‌گردد (۹ و ۱۰). تشخیص و شناسایی عامل سیاه زخم به دلیل شباهت بسیار به باسیل‌های غیربیماری‌زای موجود در خاک مشکل و وقت‌گیر است و تنها آزمایشگاه‌های پیشرفته و مرجع قادر به شناسایی دقیق آن می‌باشند و در عین حال در روش‌های متداول تعیین حدت در حیوان آزمایشگاهی ضروری است که علاوه بر وقت‌گیر 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 می‌کنند، فراهم می‌سازد (۱۱). در تشخیص عامل طاعون از انجام تست‌های بیوشیمیایی، بررسی حساسیت به باکتریوفاز اختصاصی، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی و کشت در محیط‌های اختصاصی استفاده می‌شود، 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 می‌باشد تمام این روش‌های رایج باکتریولوژیک وقت‌گیر و غیرقابل استفاده در جهت تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری است (۱۳). درحالی که در روش‌های مولکولی می‌توان بدون نیاز به این گونه بررسی‌ها به‌طور مستقیم در زمانی بسیار کوتاه اقدام به شناسایی عامل عفونی ویرولان نمود. بنابراین، روش‌های متداول در حملات بیولوژیک و بیوتوررستی فاقد ارزش بوده و نیاز به روش‌های تشخیصی سریع در کمتر از چند ساعت می‌باشد 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 همه گیری جهانی باشد (۱۴).

روش بررسی

سویها به صورت استاندارد از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت و انستیتو پاستور تهران تهیه شد، به دلیل خطرات کاری با سویه ی ویرولان از سوش غیر ویرولان باسیلوس آنتراسیس موسوم به اشترن یا سویه ی واکسن دامی استفاده گردید که از نظر میکرب شناسی هیچ تفاوتی با سویه ی وحشی ندارد. ولی از نظر مولکولی صرفا فاقد یکی از پلاسمید های ویرولان است و به جهت ایمنی به جای سویه ی وحشی در آزمایشات تشخیصی از آن استفاده می شود. باکتری یرسینیا پستیس سویه ی جدا شده از کردستان ایران موسوم به KIM و سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت. نمونه هایی که به عنوان کنترل منفی استفاده شد از آزمایشگاه انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. لیست و شماره ی سویه آن ها 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 چرخه های حرارتی استفاده شد. از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک (ساخت شرکت پایا پژوهش) (مشهد) و منبع تغذیه آن با بافر TBEX0/5 جهت الکتروفورز استفاده شد. جهت بررسی ژل از دستگاه UVIdoc (ساخت شرکت UVIttec انگلیس) استفاده شد. مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمتاز شامل باند ۱۰۰، 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 درحقیقت براساس ژن هدف invA و hp، برای آتراکس بر اساس دو بخش اساسی تشکیل دهنده ی ژنوم باسیل آتراکس، pa و chr، برای یرسینیا پستیس براساس یک بخش اساسی ژنوم تشکیل

دهنده ی باکتری عامل طاعون، pla طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد و با استفاده از نرم افزارهای DNASIS (HITACHI, TOKYO, japon)، Blast، ۶/۷۱ Version و OLIGO از نظر ساختار و شباهت با سایر میکروارگانیسم های مشابه بررسی و انتخاب گردید (۱۶). همچنین مکان پرایمرها برروی ژنوم و اندازه قطعه ی 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 درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. **کشت و استخراج DNA:** باکتری های تهیه شده در محیط کشت جامد و محیط مایع لوریا، تلقیح و در ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت شد. علاوه بر بررسی کلونی ها از نظر شکل و ساختار و به خصوص ویژگی های کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی نیز انجام گرفت. سپس از ۱/۵ تا ۵ میلی لیتر از کشت مایع DNA ژنومی به روش های متداول (۱۵) استخراج گردید. روش استخراج DNA به این صورت انجام شد که ۱/۵ سی سی از کشت شبانه باکتری ها در محیط LB را داخل لوله ی اپندورف ریخته و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دور rpm ۵۰۰۰ 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 می دهیم. ۲۰۰ ماکرولیتر بافر لیز کننده 2 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 rpm ۱۰۰۰۰ رسوب را از مایع شفاف رویی جدا کردیم. محلول رویی که حاوی DNA کروموزومی است به لوله ی تازه منتقل شد. هم حجم محلول

پرایمرهای ژن‌های *hp*، *invA*، *salmonella* تیفی، *chr* و *pA*، 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 1083bp با سبیل آنتراکس، که واجدسایت 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 پی‌سی‌آر ابتدا تک تک میزان مواد و مراحل پی‌سی‌آر بهینه شدند بعد از به‌دست آوردن مناسب‌ترین میزان مواد و شرایط بهینه برای مولتی پلکس پی‌سی‌آر، میزانی که در جدول ۴ نوشته شده به‌دست آمد. پس از اتمام واکنش آمپلیفیکاسیون، در ۰/۵ X بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و پس از شستشو بر روی دستگاه ماورای بنفش بررسی گردید. لازم به ذکر است که واکنش برای هر سه باکتری هم به‌صورت یونیپلکس و هم مالتیپلکس انجام شد.

تعیین اختصاصیت: برای به‌دست آوردن اختصاصیت

تفاوت نوکلئوتیدهای دوسکانس استفاده شد (۱۶).

یافته‌ها

Uniplex و Multiplex PCR 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 520,489,164 و 1083 جفت باز را در سویه‌های آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا تیفی 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 ۱۰۸۳، ۱۶۴، ۳۷۳، ۵۲۰ جفت باز را در سویه‌های آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا تیفی با پرایمر S12، یرسینیا پستیس با پرایمر F و آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ ایجاد کرده است. Multiplex PCR شکل ۳ مولتی پلکس پی سی آر هر سه سویه استاندارد باکتری‌های مورد نظر را نشان داد به طوری که با پنج جفت پرایمر اختصاصی PCR انجام گرفته است که حضور تمام قطعات مورد انتظار را نشان داده است. بررسی اختصاصی بودن PCR؛ با توجه به شکل 1,2,3 که نتایج اختصاصی بودن مولتی پلکس پی سی آر و پرایمرها را نیز

نشان می‌دهد؛ به طوری که پرایمرهای اختصاصی سه باکتری یرسینیا پستیس، آنتراکس، و سالمونلا تیفی موریوم با باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا سونئی، اشرشیاکلی، ائروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروجینوزا، سیتروباکتر فروندی، سراشیا مارسسنز، کلبسیلا پنومونیا که به عنوان کنترل منفی استفاده شدند، مورد PCR قرار گرفتند که هیچ بانندی 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 2×10^6 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.

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 freundi</i>	PTCC 1600	
<i>Serratia marcesens</i>	PTCC 1111	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 7881	

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

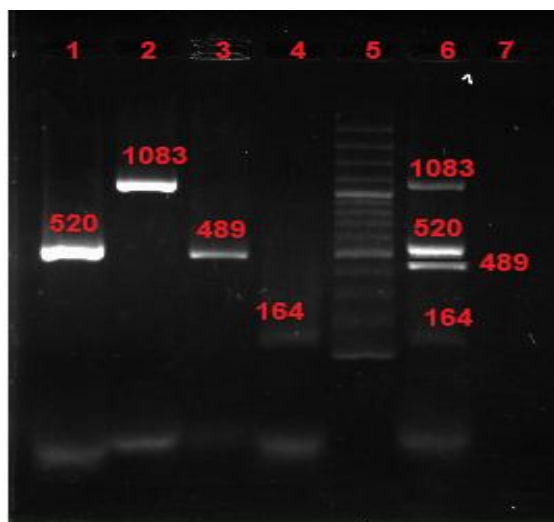
شماره پرایمر	جایگاه ژن، پلاسمید/کروموزوم	اندازه محصول	پروتئین
S12-s13 سالمونلا	کروموزوم	373bp	invA
T سالمونلا	کروموزوم	489bp	hp
125/126 آنتراکس	PXO1	1083 bp واجدسایت	pA
HindIII			
129-130 آنتراکس	کروموزوم	164 bp	chr
Yer یرسینیا	pPst1	520 bp	pla

جدول ۳: سکانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

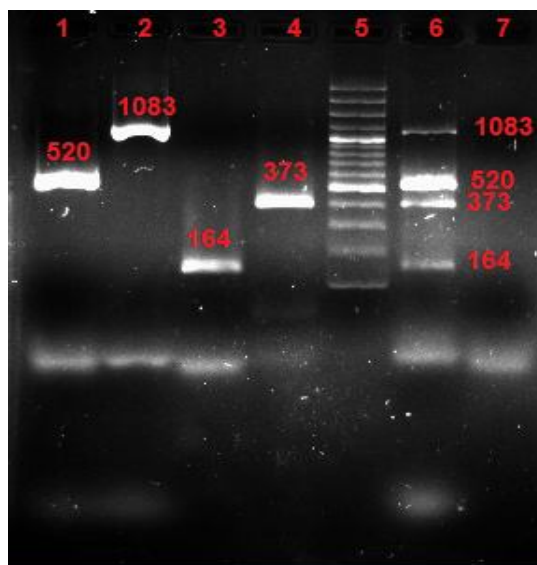
S12F:	gta ttg ttg att aat gag atc cg
S13R:	ata tta cgc acg gaa aca cgt t
Salmonella TF:	tgt ccg ctg tct gaa gtc atc
Salmonella TR:	atc tca ggc aaa ctc aca agg g
Antherax 125:	tta atg cga ttg tct acg at
Antherax 126:	gat caa ttg cga ccg tac ttg aa
Antherax 129:	ccc agg ggg aca aac gat agc tcc
Antherax 130:	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	Mgcl2mM	۱ پیکومول
۴	dNTPmix (100mM each)	۰/۵ پیکومول
۵	پرایمر F	۱ پیکومول
۶	پرایمر R	۱ پیکومول
۷	DNA	۱ پیکومول
۸	انزیم Taq	۲،۵ یونیت
۹	جمع	۲۵ پیکومول



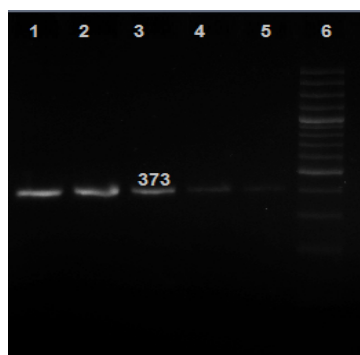
شکل ۱: نتایج Uniplex و Multiplex PCR، خانه‌ی شماره‌ی ۱، *Yersinia pestis* با پرایمر *Yer* (اندازه باند ۵۲۰). خانه‌ی شماره‌ی ۲، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی شماره‌ی ۳، سالمونلا با پرایمر *T* (اندازه باند ۴۸۹). خانه‌ی شماره‌ی ۴، آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴). خانه‌ی شماره‌ی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



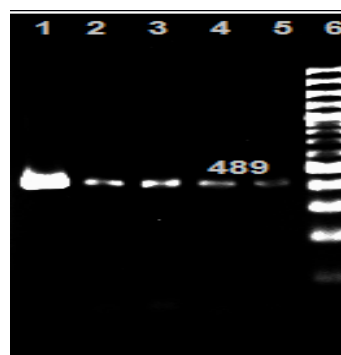
شکل ۲: نتیجه‌ی Uniplex و Multiplex PCR را با ۴ جفت پرایمر نشان داده است. خانه‌ی ۱، *Yersinia pestis* با پرایمر *Yer* (اندازه باند ۵۲۰). خانه‌ی ۲، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳). خانه‌ی ۳، آنتراکس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴). خانه‌ی ۴، سالمونلا با پرایمر *S12* (اندازه باند ۳۷۳). خانه‌ی ۵، وزن مولکولی خانه‌ی ۶، مولتی پلکس پی‌سی‌آر با چهار جفت پرایمر اختصاصی که عبارت است از: آنتراکس با پرایمر ۱۲۹، سالمونلا با پرایمر *S12*، *Yersinia pestis* با پرایمر *Yer*، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵. خانه‌ی ۷، کنترل منفی.



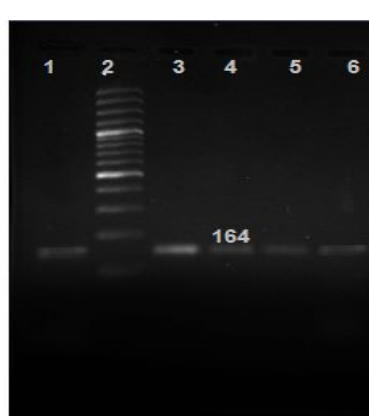
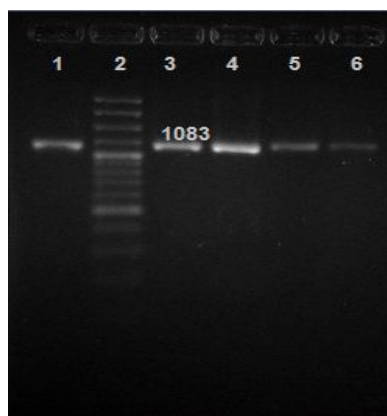
شکل ۳: نتایج Multiplex PCR با پنج جفت پرایمر اختصاصی را نشان داده است. خانه ۱: مولتی پلکس پی سی آر، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۹ (اندازه‌ی باند ۱۶۴)، سالمونلا با پرایمر S12 (اندازه‌ی باند ۳۷۳)، سالمونلا با پرایمر T (اندازه‌ی باند ۴۸۹)، یرسینیا پستیس با پرایمر Yer (اندازه‌ی باند ۵۲۰)، باسیلوس آنتراسیس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه‌ی باند ۱۰۸۳)، خانه ۲: وزن مولکولی خانه ۳: کنترل منفی



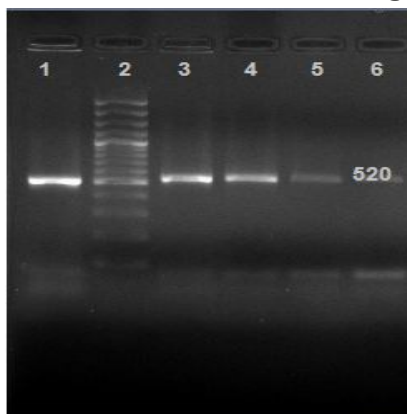
شکل ۴- ب



شکل ۴- الف

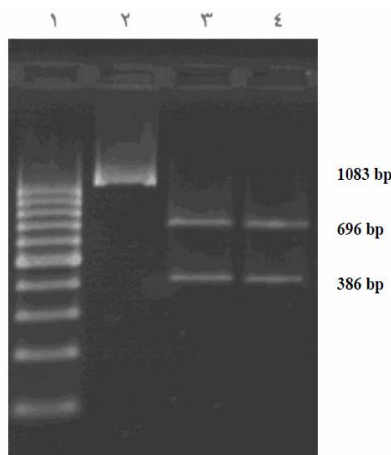


شکل ۴-ج



شکل ۴-د

شکل ۴: 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 *Yer* یرسینیا پستیس (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} ، وزن مولکولی، آنتراکس با پرایمر ۱۲۵ (اندازه باند ۱۰۸۳) (شکل ۴-د)، ۱۲۹ (اندازه باند ۱۶۴) (شکل ۴-ج) و یرسینیا پستیس با پرایمر *Yer* (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 1083bp واکنش PCR توسط آنزیم *HindIII*

آنزیم محدودالایر برش دهنده *HindIII*، دوقطعه با اندازه‌های 386bp و 696bp حاصل می‌شود که تایید کننده‌ی درستی

تایید محصول واکنش Multiplex PCR آنتراکس با پرایمر ۱۲۵: نتایج حاصل از برش آنزیمی محصول 1083 bp توسط

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 ویروالانس بودند که حتما باید از نمونه‌های بالینی آلوده تهیه شوند، اما در نتایج آزمایش حاضر هم می‌توان از ژن‌های ویروالانس و هم غیر ویروالانس برای تشخیص بیماری استفاده کرد. دریک بررسی با پنج جفت پرایمر مبتنی بر ژن‌های *viaB, fliC, tyv(rfbE), prt(rfbS)* 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 پی‌سی‌آر 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

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، 1083bp. 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 ویروالان 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 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

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 کنترلی بیماری و بررسی‌های اپیدمیولوژی قابل استناد است. تفاوت با آزمایش حاضر در این است که روش مورد استفاده تنها یونی پلکس پی سی آر است؛ اما تحقیق ما روش مولتی پلکس پی سی آر استفاده شده که باعث صرفه جویی 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 هزینه‌ی 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 به‌شمار آید (۳۰). روش مولتی پلکس نسبت به روش یونی پلکس نه تنها کم هزینه‌تر و سریع‌تر می‌باشد؛ بلکه موارد منفی کاذب را نیز به‌طور کامل حذف خواهد کرد. در این تحقیق که بر اساس ژن‌های *invA* و *hp* سالمونلا تیفی، *pA* و *chr* آتراکس 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 پی سی آر می‌توان جهت تشخیص عوامل مختلف عفونی از جمله تشخیص این سه عامل آتراکس، سالمونلا تیفی موریوم، یرسینیا پستیس

استفاده کرد. عامل اساسی در به‌کارگیری 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 پی سی آر می‌تواند جهت تشخیص سریع و همزمان سه باکتری سالمونلا تیفی موریوم، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا 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، به‌طوری‌که 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 به‌طور همزمان صورت می‌گیرد نیاز به انجام PCR های متعدد جهت تشخیص هر عامل به‌طور 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 مزایای 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

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 تشکر از 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.
- 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 Cosvivo. 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; 1980-1984.

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

Safari Foroshani N¹, Karami A², Pourali F², Aidi A¹

¹Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

²Research 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