مقاله

مروری

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۳؛ دوره ۶ (۴): ۹۸۳-۹۹۸
Journal of North Khorasan University 2014;6(4):983-998

مروری بر روش های تشخیص آزمایشگاهی یرسینیا پستیس

خاطره کبیری[۱]، کیوان مجیدزاده[۲]، محمد سلیمانی*[۳]

[۱]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
[۲]استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا تهران، تهران، ایران
[۳]استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
*نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
آدرس الکترونیک:soleimanidor@yahoo.com

چکیده

یرسینیا پستیس عامل سببی بیماری طاعون، یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه می باشد. این باکتری بر طبق طبقه بندی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در آمریکا، به دلیل نرخ بالای مرگ ومیر و انتقال آسان از طریق آئروسل های تنفسی آلوده در دسته A عوامل بیولوژیک قرار گرفته است. در این مطالعه، مروری جامع بر روش‌های تشخیصی رایج، مولکولی و مدرن انجام شده است. بررسی ها نشان داد برای تشخیص این باکتری از روشهای مختلف باکتریولوژیک، سرولوژیک و مولکولی استفاده می‌شود. در حال حاضر کیت‌های متعدد تجاری و دستی برای تشخیص این باکتری در آزمایشگاه‌ها استفاده می-شود. روش‌های مبتنی بر کشت دشوار و وقتگیر است. روش‌های مولکولی سریع و قابل اعتمادند و دارای پتانسیل بالایی برای تشخیص در آزمایشگاه‌ها هستند

واژه های کلیدی: *یرسینیا پستیس، طاعون، روش تشخیص*

وصول: ۹۲/۵/۲
اصلاح: ۹۲/۱۰/۱۱
پذیرش: ۹۲/۱۱/۶

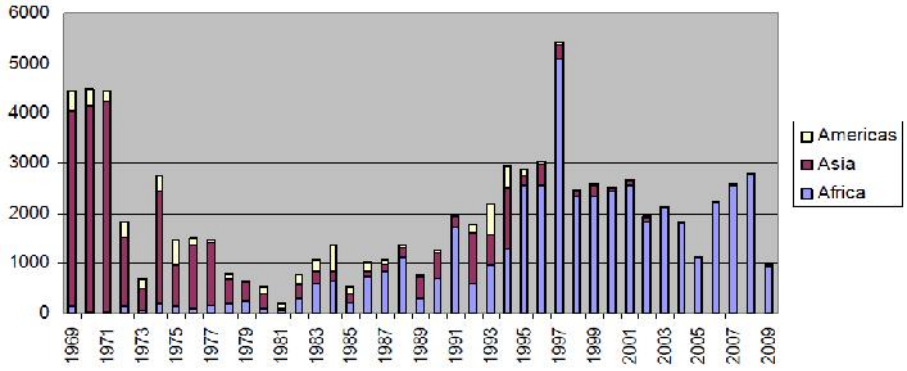
مقدمه

طاعون در جهان: یرسینیا پستیس عامل بیماری طاعون، از طریق کک جوندگان به انسان و از طریق آئروسل های تنفسی به انسان یا حیوانات دیگر انتقال می یابد [۱]. این بیماری در طی سه پاندمی سبب مرگ میلیون‌ها انسان شده است. اولین پاندمی یا طاعون ژوستینی (م۵۴۶-۵۴۱) در آسیا، آفریقا و اروپا منجر به مرگ ۱۰۰میلیون نفر گردید. دومین پاندمی مشهور به مرگ سیاه در قرن چهاردهم میلادی (م۱۳۵۰-۱۳۴۷) منجر به مرگ ۵۰ میلیون نفر شد. در این پاندمی بیشترین مرگ و میر مربوط به اروپایی ها بوده است. سومین پاندمی (م۱۹۰۳-۱۸۹۴) در هنگ کنگ شروع و توسط کشتی‌های تجاری در همه جهان انتشار یافت. در همین دوره الکساندر یرسین[1] عامل این بیماری را شناسایی کرد. در سال ۱۹۷۰ این ارگانیسم یرسینیا پستیس نام گرفت [۲، ۳، ۴].

در حال حاضر اگرچه ابتلا به طاعون کاهش یافته است اما هنوز هم مناطق طاعون خیز، تقریبا در همه کشورها به جز استرلیا، مدار استوا و اطراف آن و مناطق گرمسیری دارای دمای ۵۵-۴۰ درجه سانتیگراد وجود دارد. البته کانون‌های طبیعی طاعون تحت تاثیر عواملی چون آب و هوا، طبیعت زمین و مهاجرت جوندگان متغیر هستند. بر اساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی[2] بیشترین اپیدمی های طاعون در دهه ۱۹۷۰ مربوط به آسیا و طی سال های ۲۰۰۹-۱۹۸۰ مربوط به آفریقا بوده است (شکل۱) [۴، ۵، ۶].

در سال ۲۰۰۴ در چین ۱۹ مورد ابتلا و ۸ مورد مرگ، بدنبال شکار و کشتن سنجاب های آلوده به طاعون گزارش شده است [۷]. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶، چندین اپیدمی طاعون در کنگو رخ داده است. این کشور به عنوان یکی از مناطق طاعون خیز فعال دارای اهمیت بسیاری است به طوری که سالانه حدود ۱۰۰۰ مورد ابتلا به طاعون در این کشور ثبت می گردد [۸]. در سال ۲۰۰۹ در حدود ۹۸۴ مورد ابتلا و ۷۱ مورد مرگ ناشی از این بیماری در دنیا ثبت شده که بیشترین موارد به ترتیب مربوط به کشورهای کنگو، ماداگاسکار، اوگاندا، پرو و چین بوده است [۶]. همچنین در ماداگاسکار طی سال ۲۰۱۲، ۲۵۶ مورد ابتلا به طاعون و ۶۰ مورد مرگ و در سال۲۱۰۳، ۴۲ مورد مرگ ثبت گردیده است [۹].

طاعون در ایران: از پزشکان ایرانی نسخه‌هایی مانند رساله طاعون، طب ملکی و کتاب قانون درباره این بیماری به جا مانده است. دردوران صفویه (م۱۷۳۵-۱۴۹۵) طاعون در شهرهای مختلف از جمله قزوین و اردبیل همه گیر و منجر به مرگ ۳۰ هزار نفر گردید. در زمان سلطنت شاه عباس (م۱۶۲۸-۱۵۸۷) شیوع وبا و طاعون از قزوین شروع و به شهر های دیگر سرایت و سبب مرگ ۲۰ هزار نفر شد. در سال های ۱۷۲۷ و ۱۷۳۱ نیز بار دیگر طاعون جان هزاران ایرانی را گرفته است. طاعون در سال ۱۸۷۱ درسقز و بانه و در سال ۱۹۱۳ در کردستان و خراسان اپیدمی شد. در دوران قاجار (۱۹۷۴-۱۹۲۵) علت بسیاری از مرگ



شکل۱: گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال های ۱۹۶۹ تا ۲۰۰۹ [۶].

1 - Alexandre Yersin
2 -World Health Organization

و میرها وبا و طاعون بوده است. درسال ۱۹۴۶ دکتر بالتازار و دکتر کریمی، کانون طاعون خیز کردستان را شناسایی کردند. نتیجه تحقیقات آنها منجر به شناسایی چهار گونه جونده شد که دو گونه مریون لیبیکوس[1] و مریون پرسیکوس[2] نسبت به طاعون مقاوم و دو گونه دیگر به نام های مریون تریسترامی[3] و مریون وینوگرادوی[4] نسبت به آن بسیار مستعد و آسیب پذیر بودند. در طی سال های ۱۹۴۷ تا ۱۹۵۶ در ناحیه غرب ایران ۹ بار طاعون اپیدمی و منجر به مرگ ۱۵۶ نفر گشت [۱۰].

آخرین گزارش رسمی مبنی بر مشاهده طاعون در بین جوندگان، مربوط به سال ۱۹۷۸ در شهرستان سراب واقع در استان آذربایجان شرقی است. پس از آن به مدت سه دهه مطالعه بر روی طاعون انجام نگرفت. در سال ۲۰۱۱ تیم تحقیقاتی انیستیتو پاستور ایران به منظور مطالعه بر روی حیوانات مخزن طاعون در ناحیه غرب ایران (محدوده مرز بین استان های کردستان و همدان)، منطقه ای به مساحت ۲۰۰۰ متر مربع را بررسی کرده و یک قلاده سگ آلوده به طاعون شناسایی نمود. در ادامه تحقیقات در سال ۲۰۱۲ منطقه ای در حدود ۱۲۰۰ متر مربع (منطقه ای که سگ آلوده مشاهده شده بود) بررسی و سه قلاده سگ و یک جونده مبتلا به طاعون مشاهده شد. نتایج آنها نشان داد، اگرچه 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 می باشد [۱۱]. در چنین کانون هایی، باکتری توسط کک های ناقل بین جوندگان دارای مقاومت نسبی به بیماری در حال انتقال است و یک انزیوسی به وجود می آورد. هرگاه انتقال باکتری به جوندگان حساس به این بیماری رخ دهد باعث بروز یک اپیزیوسی می گردد که با مرگ و میر فراوان جوندگان همراه است. وقوع اپیزیوسی از لحاظ ایجاد شرایط مناسب برای رخداد یک اپیدمی در بین جمعیت انسانی اهمیت دارد. نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک در ایران نشان داده است که وقوع یک اپیزیوسی می تواند به مدت ۳-۴ سال به طول انجامد [۱۱، ۱۲].

سوءاستفاده از یرسینیا پستیس در بیوتروریسم: انتقال طاعون ریوی از طریق آئروسل های آلوده به راحتی انجام می شود. بطوری که در طی سه پاندمی مهم طاعون، ۲۰۰ میلیون نفر از طریق تنفس مبتلا شده اند. بر اساس طبقه بندی مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در آمریکا این باکتری در دسته Aعوامل بیوتروریسمی قرار می گیرد. از خصوصیات این دسته، انتقال آسان انسان به انسان و نرخ بالای مرگ و میر می‌باشد. از یرسینیا پستیس بدلیل سهولت در دسترسی، موثر بودن در حالت خشک و قابلیت پخش توسط آئروسل ها برای ساخت سلاح های بیولوژیک استفاده شده است. اولین بار ژاپنی ها در جنگ جهانی دوم از این باکتری برای ایجاد اپیدمی طاعون در چین استفاده کردند. ایالات متحده و شوروی سابق نیز بر روی طاعون به عنوان سلاح زیستی مطالعات زیادی انجام داده اند. بر طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی در صورتی که حدود ۵۰ کیلوگرم باسیل یرسینیا پستیس به صورت افشانه (آئروسل) بر فراز شهری با جمعیت ۵ میلیون نفر رها گردد، حدود ۱۵۰ هزار مورد طاعون ریوی و ۳۶ هزار مورد مرگ بدنبال خواهد داشت [۶، ۱۳، ۱۴، ۱۵].

خصوصیات فیزیولوژیک و ژنتیکی: یرسینیا پستیس از خانواده انتروباکتریاسه و دارای سه بیوتیپ بنام‌های آنتیکوا[5]، ارینتالیس[6] و مدیاوالیس[7] می‌باشد [۲]. این باکتری کوکوباسیل گرم منفی، بدون حرکت، اسپور و کپسول می‌باشد. گرچه در دمای ۴۰-۴ درجه سانتیگراد رشد می‌کند اما دمای بهینه رشد آن ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است. pH بهینه برای آن ۷/۶-۷/۲ است اما شرایط سخت PH بین ۹/۶-۵ را نیز تحمل می‌کند. در حالی که کپسول واقعی ندارد اما در دمای بالاتر از ۳۳ درجه سانتیگراد، پوشش کربوهیدراتی بنام آنتی‌ژن کپسولی f1 پیدا می کند. این باکتری کند رشد و به بیش از ۲۴ تا ۴۸ ساعت برای ایجاد کلنی مشخص نیاز دارد. این باکتری دارای سه پلاسمید موثر در بیماریزایی می-باشد. پلاسمید pPCP1 (pPla، pPst) دارای ۹/۵ kb طول است و کد کننده پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن،

1 - Meriones libycus
2 -Meriones persicus
3 -Meriones tristrami
4 - Meriones vinogradovi

5 -Antigua
6 -Orientalis
7 - Mediaevales

کوآگولاز و پستیسین می باشد. پلاسمید pMT1 (pFra) دارای۱۰۰kb طول و کد کننده آنتی‌ژن کپسولی f1 و توکسین مورین می‌باشد. این دو پلاسمید فقط در یرسینیا پستیس وجود دارند. پلاسمید pCD1 (pCad، pYV) به طول ۷۰kb در یرسینیا پستیس، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکولیتیکا مشترک بوده و عملکرد آن، پاسخ به افت کلسیم و بیان سیستم ترشحی تیپ سه می باشد [۳، ۷، ۱۶].

علائم بالینی طاعون: بیماری طاعون به سه شکل خیارکی[1]، باکتریمی[2] و ریوی[3] مشاهده می شود. طاعون خیارکی در اثر نیش کک جوندگان به انسان منتقل می شود. معمولاً در محل گزش التهاب، تورم و قرمزی پوست مشاهده می شود. باکتری از طریق سیستم لنفاوی به نزدیک ترین گره لنفی (کشاله ران، زیر بغل و گردن) منتقل و سبب تورم و التهاب می گردد. از علائم این بیماری، تب (۴۰-۳۹°C)، لرز، سردرد، التهاب و تورم غدد لنفی به خصوص در ناحیه کشاله ران، افزایش ضربان قلب و کاهش فشار خون می باشد. در طاعون باکتریمی نمونه کشت خون فرد بیمار مثبت است ولی در فرد هیچگونه لنفوآدنوپاتی و ذات الریه ای مشاهده نمی شود. طاعون ریوی معمولاً از طریق آئروسل های تنفسی منتقل می گردد و علائم اولیه آن مشابه آنفولانزا است. از علائم بالینی آن می توان به تب بالا، لرز، سردرد، سرفه (همراه با خلط شفاف یا خونی و آبکی) و تنگی نفس اشاره کرد[۲، ۳، ۱۳].

روش های تشخیص کلاسیک: نمونه‌های بالینی مورد استفاده جهت تشخیص این باکتری خون، آسپیراسیون غده های لنفاوی، خلط گلو، مایع مغزی نخاعی در افراد مشکوک به مننژیت، زخم های پوستی، شستشوی نای و نمونه بافت طحال می‌باشد [۳، ۱۷، ۱۸].

کشت و تست های بیوشیمیایی باکتری: برای جداسازی و تهیه کشت خالص باکتری، از محیط های کشت بلاد آگار، نوترینت آگار و مک کانگی آگار استفاده می شود. بر روی محیط مک‌کانگی‌آگار بعد از ۴۸-۲۴ ساعت کلنی‌های ضعیف مسی رنگ و بعد از ۷۲ ساعت کلنی‌های مشخص تر و پررنگ‌تر ایجاد می شود. البته این باکتری کند رشد است و ممکن است تا ۶ روز ظهور کلنی‌های آن به طول بیانجامد. از این کشت، جهت رنگ‌آمیزی و مشاهده میکروسکوپی، مشخص کردن ویژگی‌های رشد در محیط-های مایع و جامد، توصیف ویژگی‌های بیوشیمیایی و سنجش حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی استفاده می-شود. بررسی میکروسکوپی از طریق رنگ‌آمیزی رایت، گیمسا و وایسون انجام می‌شود. در نمونه های رنگ آمیزی شده، یرسینیا پستیس و سایر یرسینیاها، باکتری‌های روده‌ای و برخی باکتری های گرم منفی به ویژه پاستورلا ظاهری دو قطبی پیدا می کنند. به همین دلیل رنگ آمیزی یک تست انحصاری برای این باکتری نیست. تست-های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، ایندول، اوره‌آز، کاتالاز و غیره برای تمایز این باکتری از یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکولیتیکا استفاده می شود. البته در دسترس نبودن روش های مناسب انتقال نمونه ها از مناطق آلوده به مراکز تشخیصی ممکن است باعث خشک شدن آنها، آلودگی نمونه ها یا مرگ باکتری ها گردد [۳، ۱۲، ۱۹].

استفاده از کیت‌های تشخیصی جدید سبب سهولت و سرعت در روش های مبتنی بر کشت شده است. این کیت‌ها دارای تعدادی تیوب حاوی محیط‌های کشت مربوط به تست های بیوشیمیایی مختلف می‌باشند. بعضی از این کیت‌ها مانند: BBL Crystal به صورت نیمه اتوماتیک هستند و بعضی دیگر مانند: Vitek GNI card به صورت اتوماتیک استفاده می شوند[۲۰، ۲۱، ۲۲].

حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی: در سال ۱۹۳۰ ازحساسیت به باکتریو فاژ اختصاصی برا ی فاژ تایپینگ و تشخیص ارگانیسم‌های عفونی استفاده گردید. فاژهای اختصاصی Pokrovskaya، φA1122، L-413C، Yep-phi برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار می گیرند. این روش بدلیل نیاز به شرایط آزمایشگاهی خاص و وقتگیر بودن (۲۴ تا۳۶ ساعت) چندان مناسب نیست [۱۵، ۲۳، ۲۴].

تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی: جوندگانی مانند موش و خوکچه هندی برای تلقیح یرسینیا پستیس استفاده می-

1 - Bubonic plague
2 - Septicaemic plague
3 - Pneumonic plague

شوند. در این روش سوسپانسیونی از باکتری تهیه کرده و به حیوان آزمایشگاهی تلقیح می کنند. مرگ حیوان به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته می شود و حداقل ۳ روز زمان برای آن لازم است.

طی یک مطالعه، انگلتالر[1] و همکاران در سال ۱۹۹۹ از روش تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی برای تشخیص یرسینیا پستیس استفاده کردند. آنها نمونه های بدست آمده از حیوانات تلقیح شده را با روش های آنتی بادی فلورسنت، کشت و PCR نیز بررسی کردند. نتایج نشان داد که در ابتدا تمامی موش ها به طاعون مبتلا شده بودند اما مقاومت نسبی برخی از موش ها به باکتری سبب تاخیر در مرگ آنها گردیده بود. بنابراین استفاده از روش تلقیح و مرگ حیوان آزمایشگاهی به عنوان نقطه انتهایی سنجش، باعث نتایج منفی کاذب می شود [۲۵، ۲۶].

روش های سرولوژی:روش‌های تشخیص سرولوژی این باکتری مبتنی بر سنجش آنتی‌بادی در سرم یا تشخیص باکتری از طریق آنتی‌ژن کپسولی f1 آن می باشد [۲۷]. کائو[2] و همکاران درسال ۱۹۹۵ برای تشخیص آنتی ژن f1 از بیوسنسورهای فیبر نوری استفاده کردند. این تکنیک دارای دقت بالایی است و برای تشخیص آنتی ژن f1 درغلظت‌های ng/ml ۴۰۰-۵۰ در نمونه‌های سرم و خون قابل استفاده می‌باشد. حد تشخیص این روش ng/ml ۵ می‌باشد. این روش به لحاظ زمان و سرعت تشخیص بسیار مناسب است و در مقایسه با جداسازی وکشت باکتری، آسان‌تر و خطر کمتری نیز دارد [۲۸]. سوزوکی[3] و همکاران در سال ۱۹۷۷ از دو روش آگلوتیناسیون بر روی لام و تیتراسیون آنتی بادی در لوله برای تشخیص آنتی بادی ضد آنتی‌ژن کپسولی f1 در سرم بیماران استفاده کردند [۲۹]. ویلیامز[4] و همکاران در سال ۱۹۸۲ از روش آگلوتینانسیون و الایزا برای تشخیص آنتی بادی استفاده و حساسیت الایزا را نشان دادند [۳۰]. توماس[5] و همکاران در سال ۲۰۰۷ به مقایسه کیت های ایمونوفلورسنس میکروسکوپی، الایزا، فلوسایتومتری و ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص باکتری بر اساس آنتی ژن کپسولی f1 پرداختند. گرچه روش ایمونوفلورسنت میکروسکوپی طی دو ساعت انجام می شود اما به دلیل نیاز به کشت باکتری وقت گیر می باشد. کیت های ایمونوکروماتوگرافی مانند: BTA Strips (Tetracore, Gaithersburg, MD)و ABICAP columns (Senova,Jena,Germany) سریع هستند و به صورت دستی نیز قابل استفاده هستند. این کیت ها نیاز به تجهیزات خاصی ندارند و از نظر اقتصادی مناسب می‌باشند. روش فلوسایتومتری پر هزینه است اما می توان چندین هدف مختلف را همزمان شناسایی کرد و برای نمونه هایی با تعداد بالا مناسب است [۳۱].

راجرزان[6] و همکاران در سال ۲۰۰۹ دوکیت ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص آنتی بادی ضد این باکتری طراحی و نتایج آن را با الایزا مقایسه کردند (شکل۲) [۳۲].

روش های تشخیص مولکولی:

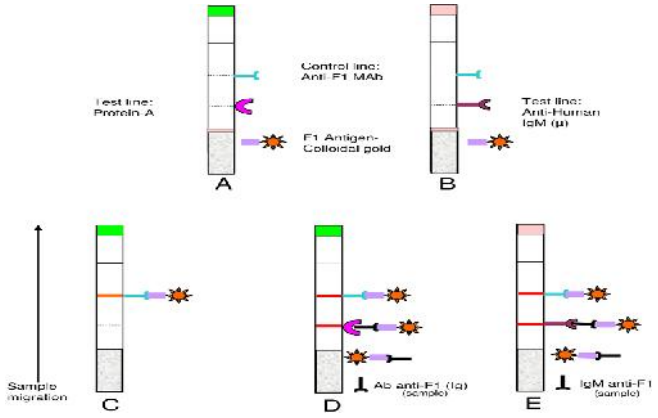
Standard PCR: هینباچ[7] و همکاران در سال ۱۹۹۳ از PCR برای تشخیص جدایه های یرسینیا پستیس از نمونه های کک و انسان (بدست آمده از هر چهار قاره) استفاده کردند. نتایج، ویژگی بالا، زمان کوتاه (۸ ساعت) مورد نیاز و مناسب بودن روش برای بررسی های اپیدمیولوژیک را نشان داد [۳۳].

Multiplex PCR: تسوکانو[8] و همکاران در سال ۱۹۹۶ از روش Multiplex PCR برای تشخیص یرسینیا پستیس از سایر گونه های پاتوژن یرسینیا و انتروباکتریاسه‌ها استفاده کردند و آن را مناسب ارزیابی کردند [۳۴].

آلمدیا[9] و همکاران در سال ۱۹۹۹ از روش PCR Multiplex برای تشخیص این باکتری استفاده کردند. از دست دادن پلاسمید حاوی ژن caf1 باعث نتایج منفی کاذب در نمونه های بدست آمده از کک‌ها، انسان‌ها و جوندگان بود. استفاده از این روش سبب شد به اهمیت بررسی حضور چند پلاسمید مختلف به صورت همزمان پی ببرند [۳۵].

1 -Engelthaler
2 - Cao
3 - Suzuki
4 - Williams
5 - Tomaso

6 - Rajerison
7 -Hinnebusch
8 - Tsukano
9 -Almeida



شکل۲: تست ایمونوکروماتوگرافی برای شناسایی IgM و IgG. A: تست SIgT، B: تست HIgM ، C: تست کنترل منفی، D: تست مثبت برای Ig anti-F1، E: تست مثبت برای IgM anti-F1. در این روش نوار ایمونوکروماتو گرافی از سه قسمت جذب، اتصال و واکنش تشکیل شده است. در بالای نواحی مذکور قسمت کنترل قرار گرفته است. در تست SIgT که برای شناسایی IgG طراحی شده ابتدا نمونه سرم بیمار در ناحیه جذب افزوده می‌شود. در ناحیه اتصال، آنتی‌ژن کپسولی f1 پوشیده از طلا قرار گرفته است. آنتی‌بادی و آنـتی‌ژن در این ناحیه کمپلکس شده و توسط خاصیت مویینگی به سمت بالا حرکت می‌کنند. در قسمت واکنش، پروتئین A برای به دام انداختن ناحیه Fc آنتی-بادی‌ها قرار گرفته است. تجمع کمپلکس آنتی‌بادی و آنتـی‌ژن در این ناحیه سبب تولید سیگنال می شود. تغییر رنگ این ناحیه به رنگ صورتی نشانه واکنش مثبت است. برای تایید صحت و درستی آزمایش ناحیه کنترل نیز طراحی شده است. در ناحیه کنترل مونوکلونال آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن f1 قرار گرفت است. اتصال آنتی‌ژن به این ناحیه سبب تغییر رنگ این ناحیه به صورتی می شود. کیت HIgM برای شناسایی IgM طراحی شده است و در ناحیه واکنش آن anti-human IgM قرار گرفته است [۳۲]

سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ از روش Uniplex PCR و Multiplex PCR برای تشخیص این باکتری استفاده کردند. در این بررسی از ۱۴ گونه باکتری به عنوان کنترل منفی و از ژنوم سوش وحشی یرسینیا پستیس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. حد تشخیص این روش برای ژن caf1 برابر با ۳۷۰ کپی و برای ژن Pla برابر با ۲۱ کپی بود. در مقایسه دو روش، Multiplex PCR به لحاظ زمان و هزینه مناسب‌تر ارزیابی شد [۱۲].

کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۳ از روش Multiplex PCR برای شناسایی سالمونلا تیفی، باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس استفاده کردند. آنها نشان دادند این روش قادر است ۱ تا ۱۰ کپی ژنوم و یا ۱ تا ۱۰ واحد کلنی ساز برای هر کدام از باکتری های به طور اختصاصی تشخیص دهد [۳۶].

سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از روش PCR بر اساس ژن های caf1 و pla یرسینیا پستیس استفاده کردند. آنها در این مطالعه از ۵۰ نمونه خون و سرم که به

طور مصنوعی آلوده شده بودند و از ۵۰ نمونه غیر آلوده استفاده کردند. در این بررسی حساسیت و ویژگی برابر با ۱۰۰٪ گزارش گردید [۳۷].

Suicide PCR: رالت[1] و همکاران در سال ۲۰۰۰ از روش روش suicide PCR برا ی تشخیص یرسینیا پستیس در نمونه‌های بدست آمده از دندان یک کودک و دو بزرگسال (مربوط به قرن۱۴) استفاده کردند. نمونه‌های باستانی معمولاً در معرض آلودگی‌های مختلف هستند و ممکن است فلور طبیعی نیز در آنها کلونیزه و سبب نتیجه مثبت کاذب گردد. استفاده از این روش سبب به حداقل رسیدن نتایج مثبت کاذب گردید [۳۸].

Nested PCR: کمبل[2] و همکاران در سال ۱۹۹۳ از این روش برای تشخیص یرسینیا پستیس در۴۳ نمونه بدست آمده از انسان، کک و جونده استفاده کردند. نتایج آنها ویژگی بالای این روش و عدم تکثیر سویه های نزدیک مانند یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و یرسینیا انتروکولیتیکا را نشان داد [۳۹].

Variable-Number Tandem Repeat (VNTR): آدیر[3] و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش تکرارهای تصادفی با تعداد متغیر یا VNTRبه شناسایی تترا نوکلئوتیدهای تکراری (CAAA) ژن lcrV پرداختند. این ناحیه نوکلئوتیدی متغیر دارای تنوع زیادی در ۳۵ سویه مورد مطالعه بود و این امر موجب تمایز سویه‌های مختلف از یکدیگرشد. این روش ابزاری با وضوح بالا برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک و شناسایی سویه‌های مختلف یرسینیا پستیس می باشد [۴۰].

Real-time PCR: هیگینز[4] و همکاران در سال ۱۹۹۸ از Real-time PCR با پروب Taq Man برای تشخیص یرسینیا پستیس استفاده کردند. دراین بررسی حدتشخیص برابر با $۲/۱\times۱۰^{۵}$ کپی بدست آمد. در بین نتایج، یک مورد منفی به دلیل از دست دادن پلاسمید حاوی ژن هدف مشاهده شد [۴۱].

لیندلر[5] و همکاران در سال ۲۰۰۱ از Real-time PCR برای تشخیص یرسینیا پستیس‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین استفاده کردند. سیپروفلوکساسین یکی از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌هایی است که یرسینیا پستیس به آن مقاومت نشان می‌دهد. این آنتی‌بیوتیک با تاثیر بر روی عملکرد DNA ژیراز سبب اختلال در همانند سازی می‌شود. مقاومت به سیپروفلوکساسین در اثر ۴ نوع موتاسیون نقطه‌ای و یا تغییر در عملکرد غشا به وجود می‌آید. در تشخیص کلاسیک مقاومت به سیپروفلوکساسین، رشد ارگانیسم در حضور آنتی بیوتیک (انتشار آنتی بیوتیک بر روی محیط آگار) یا انکوباسیون ارگانیسم در غلظت های مختلف دارویی برای تعیین MIC استفاده می شود. این دو روش وابسته به رشد باکتری و بسیار وقت گیر می باشند. در این بررسی پروب و پرایمرها برای ناحیه‌ای از ژن gyrA (کد کننده مقاومت به کینولون) طراحی گردید [۴۲].

لویز[6] و همکاران در سال ۲۰۰۳ از روش Real-time PCR برای بررسی نمونه های ریوی آلوده به یرسینیا پستیس استفاده کردند. آنها به هر واکنش یک کنترل مثبت داخلی برای بررسی وجود یا عدم وجود مهارکننده اضافه کردند. نتایج نشان داد زمانی که مهار کننده ای در واکنش ها نباشد ویژگی روش ۱۰۰٪و حساسیت آن برابر با $۱۰^{۲}$ CFU/ml است. در صورت وجود مهارکننده، مدت زمان انجام آزمایش طولانی تر شده و برای تشخیص به حداقل غلظتی برابر با $۱۰^{۴}$ CFU/ml از باکتری نیاز است. این روش، برای استفاده در هنگام حملات بیوتروریسم و همچنین موارد طاعون ریوی توصیه گردید [۴۳].

چاز[7] و همکاران در سال ۲۰۰۵ از Real-time PCR با استفاده از سه پروب MGB Eclipse probe، Simple-Probe و TaqMan برای تمایز یرسینیا پستیس از یرسینیا سودوتوبرکلوزیس استفاده کردند [۱].

ریم[8] و همکاران در سال ۲۰۱۰ روش Real-time PCR (۵´ نوکلئاز و پروب هیبریداسیون) را با روش های ایمونو-کروماتوگرافی و کشت بر روی نمونه های ۱۴۹بیمار

1 - Raoult
2 - Campbell
3 - Adair
4 Higgins

5 - Lindler
6 -Loiez
7 - Chase
8 - Riehm

مشکوک به طاعون خیارکی مقایسه کردند. از این تعداد، ۴۰ مورد توسط کشت، ۸۸ مورد توسط ایمونوکروماتوگرافی، ۱۲۰مورد با تکثیر ژن caf1 و ۱۱۹مورد با تکثیر ژن pla مثبت شد. با مقایسه دو پروب فوق، ۵ نوکلئاز روش مناسبی برای تشخیص افراد مشکوک به طاعون خیارکی معرفی شد [۴۴].

شی کیو[1] و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از روش Real-time PCR با استفاده از پروب TaqMan برای تشخیص این باکتری استفاده کرند. آنها تلاش کردند روش‌هایی را برای پایداری بیشتر واکنش گرها معرفی کنند. وکیوم و خشک کردن واکنشگرها سبب پایداری غلظت‌های پایین برای ۴۹ روز و غلظت‌های بالا برای ۷۹روزشد [۲۷].

کبیری و همکاران در سال ۲۰۱۳ از روش Real-time PCR با استفاد ه از پروب Taq Man برای تشخیص بر اساس ژن caf1 استفاده کردند. کمترین حد تشخیص برابر با ۳×۱۰^{۲} کپی بود. نتایج، سرعت ، دقت و قابل اطمینان بودن روش را نشان داد [۴۵].

کبیری و همکاران در سال ۲۰۱۳ یک کنترل مثبت داخلی رقابتی (IPC) برای تشخیص ژن های *pla* وcaf1 باکتری با استفاده از روش Real-time PCR طراحی کردند. برای ساخت ترادف IPC از ژن Aox1 مخمر پیکیا پاستوریس استفاد شد. نتایج نشان داد استفاده از یک کنترل مثبت داخلی از نتایج منفی و مثبت کاذب جلوگیری می کند و سبب اطمینان بخشیدن به نتایج می شود [۴۶].

Quadruplex Real-time PCR: توماس[2] و همکاران درسال ۲۰۰۶ از روش Multiplex Real-time PCR با استفاده از پروب Taq Man به تشخیص یرسینیا پستیس با هدف گذار ی ۴ ژن پرداختند. ویژگی این روش ٪۱۰۰ و حساسیت آن به کمتر از ۸۵ cfu رسید [۴۷].

استوارت[3] و همکاران در سال ۲۰۰۸ از روش Quadruplex Real-time PCR با استفاده از پروب TaqMan برای تشخیص یک ژن کروموزومی و سه ژن پلاسمیدی استفاده کردند. تکثیر ژن کروموزومی yihn ویژگی ٪۱۰۰، ژن‌های pla و*caf1* ویژگی ٪۹۸ و ژن *lcvV* ویژگی ٪۷۵ را نشان داد. این روش به دلیل حساسیت پایین ناشی از انجام واکنش Multiplex، بیشتر برای تایید یرسینیا پستیس‌های جدا شده از کشت مناسب است [۴۸].

TaqMan Array Card: راشوال[4] و همکاران در سال ۲۰۱۲ از روش TaqMan Array Card برای تشخیص این باکتری استفاده کردند. این روش به طور معمول برای بررسی بیان ژن‌ها کاربرد دارد. از این روش برای شناسایی تعدادی از عوامل باکتریایی از جمله یرسینیا پستیس، بورخولدریا مالئی، فرانسیسلا تولارنسیس و باسیلوس آنتراسیس که همگی دارای پتانسیل استفاده در بیوتروریسم هستند استفاده شد. نتایج نشان داد که بالاترین ویژگی مربوط به یرسینیا پستیس (٪۱۰۰) می-باشد [۴۹].

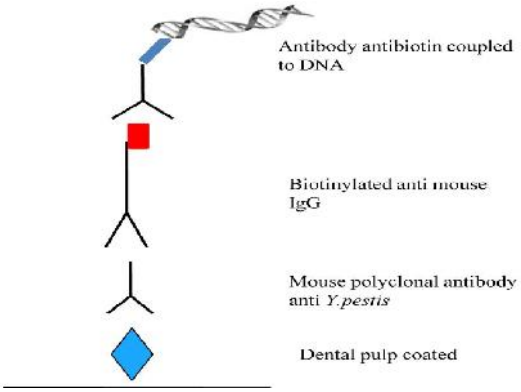
Immuno-PCR: در سال ۱۹۹۲ برای اولین بار از Immuno-PCR (ترکیبی از الایزا و PCR) به منظور تشخیص استفاده شد. مالو[5] و همکاران درسال ۲۰۱۲ از این روش برای تشخیص یرسینیاپستیس در نمونه‌های باستانی (۳۴ نمونه دندان اجساد متعلق به قرن چهاردهم) استفاده کردند. از بین ۳۴ نمونه، ۱۰مورد توسط PCR، ۳مورد توسط الایزا و ۱۴مورد توسط Immuno-PCR مثبت شد. در این بررسی ابتدا به پروتئین های پالپ دندان آنتی بادی ضد f1 افزوده و سپس شستشو داده می شود. در مرحله دوم آنتی بادی ضد آنتی بادی اول افزوده و در مرحله آخر بعد از شستشو، آنتی بادی که حاوی DNAاست افزوده می شود. در صورتی که هر سه آنتی بادی متصل شده باشند، DNA متصل به آنتی بادی سوم توسط Real-time PCR تکثیر و نمودار آن مشاهده می شود. این کار سبب افزایش حساسیت و ویژگی ۱۰۰۰۰-۱۰۰ برابر نسبت به الایزا می شود (شکل ۳) [۵۰].

روش‌های تشخیص نوین:

روش توده سنجی MALDI-TOF: آیادورای[6] و همکاران در سال ۲۰۱۰ از این روش برای تشخیص یرسینیاپستیس

1 - Shi Qu
2 - Tomaso
3- Stewart

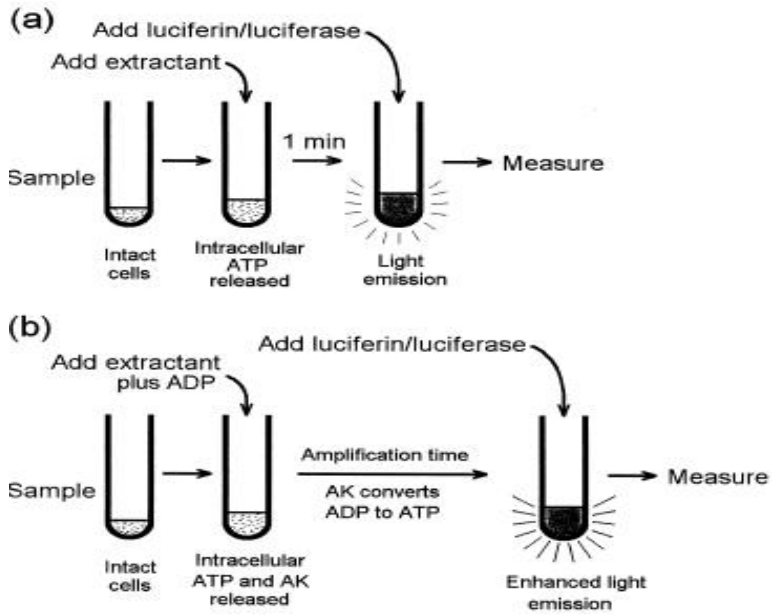
4 - Rachwal
5 - Malou
6 - Ayyadurai



شکل۳: تست Immuno-PCR برای تشخیص آنتی‌ژن f1 یرسینیا پستیس [۵۰].

استفاده کردند. در این روش حساس و سریع از پروفایل پروتئینی برای تشخیص جنس، گونه و زیر گونه باکتری‌ها استفاده می شود. ابتدا سوسپانسیون حاوی پروتئین‌های یرسینیا پستیس در پلیت‌های مخصوص ریخته و نور لیزر به آن تابانده، سپس طیف حاصل توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری سنجیده می شود. مجموعه ای از طیف-های بیوتایپ‌های مختلف باکتری به این طریق تهیه می-شود و در زمان ظهور بیماری، با مقایسه طیف‌ها، به سویه باکتری مورد آزمایش پی می‌برند. در این روش هر سه بیوتایپ یرسینیا پستیس از طریق طیف های تولید شده شناسایی می شود. از مزایای روش MALDI-TOF، هزینه کم و امکان آماده سازی نمونه ها، اخذ داده ها و ارزیابی آن‌ها به صورت اتوماتیک می باشد [۵۱].

روش های نوین استفاده از فاژ: روش‌های کلاسیک تشخیص باکتری توسط فاژ بسیار وقت گیر است. با توجه به پیشرفت خیلی سریع بیماری و نیاز به درمان آنتی-بیوتیکی صحیح، چندین روش سریع با استفاده از فاژ بررسی شده است [۲۳]. ازجمله این روش‌ها آزاد شدن ATP یا آنزیم‌هایی مانند آدنیلات کیناز و بتاگالاکتوزیداز توسط لیزات سلول است [۱۵]. هنگامی که به تیوب حاوی باکتری مورد نظر فاژهای اختصاصی افزوده شود باکتری لیز و محتویات آن از جمله ATP خارج می‌شود. اگر به این تیوب آنزیم لوسیفراز افزوده شود در حضور ATP نور تولید می‌شود. وقتی محققین علاوه بر ATP از آنزیم آدنیلات کیناز نیز به عنوان بیومارکر استفاده کردند نتیجه بهتری گرفتند و نور بیشتری تولید شد (شکل ۴ مقایسه ای این دو حالت را نشان می دهد) [۵۲]. تشخیص بر اساس آزاد شدن آنزیم بتا گالاکتوزیداز نیز روشی مبتنی بر استفاده از باکتریوفاژ اختصاصی و لیز سلول است. هنگام لیز سلول آنزیم بتا گالاکتوزیداز آزاد می‌شود و محققین با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی این مارکر سلولی را اندازه گیری می‌کنند. این روش دقیق است و به مدت زمان ۸-۶ ساعت نیاز دارد [۵۶]. نوع دیگری از روش‌های تشخیص توسط باکتریوفاژ، تشخیص غیر مستقیم باکتری با استفاده از فاژهای مهندسی شده برای بیان ژن های گزارشگر لوسیفراز و پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و سایر ژن ها است [۱۵]. در روش مشابه دیگر ژن لوسیفراز وارد فاژ اختصاصی φA1122 می گردد.



شکل ۴: مقایسه سنجش آنزیم آدنیلات کیناز در افزایش نور توسط آنزیم لوسیفراز در آزمایش تشخیص باکتری با استفاده از لیز سلولی توسط فاژ اختصاصی [۵۲].

وقتی به تیوب حاوی باکتری، فاژ نوترکیب اضافه می‌شود نور سبز ی تولید می‌شود که توسط دستگاه لومینیتور قابل سنجش است [۲۳، ۵۳]

سرگوو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۰ از تکنیک Real-time PCR به همراه باکتریوفاژهای اختصاصی استفاده کردند. در این بررسی اندازه پلاک، طول چرخه لایتیک و مدت زمان لیز توسط دو باکتریوفاژ اختصاصی L-413 و φA1122 بررسی گردید. حساسیت تشخیص هنگام استفاده از فاژ φA1122 برابر با 10^3 CFU/ml و در مورد فاژ L-413 حدود ۱۰۰ باکتری تعیین شد. در روش‌های مولکولی که تشخیص بر اساس ژن های پلاسمیدی است، از دست دادن پلاسمید حاوی ژن های هدف سبب به وجود آمدن نتایج منفی کاذب می‌شود اما استفاده از فاژ ارتباطی با ژن های پلاسمید ندارد و می توان از این طریق بر این نتایج کاذب غلبه کرد. این روش تنها برای تشخیص نمونه هایی که دارای باکتری زنده، مناسب است [۱۵].

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH):

کنی[2] و همکاران در سال ۲۰۰۸ از روش FISH با استفاده از پروب پپتید نوکلئیک اسید (PNA) استفاده کردند. اساس روش FISH بر پایه اتصال پروب PNA به مناطق اختصاصی از RNA می‌باشد. نتایج نشان داد این روش قادر به تشخیص باکتری زنده می باشد و از آن برای تشخیص سریع در جنگ های میکروبی می توان استفاده کرد [۱۳].

1 - Sergueev

2 - Kenny

بحث

روش‌های تشخیص کلاسیک مانند تست های بیوشیمیایی، حساسیت به باکتریوفاژ اختصاصی، رنگ آمیزی و غیره، مبتنی بر کشت می باشند. اما بدلیل کند رشد بودن باکتری، انکوباسیون و تشخیص آن بسیار وقت گیر و ممکن است ۵ روز طول بکشد. همچنین به دلیل خطرناک بودن باکتری، روش های کلاسیک مبتنی بر کشت تنها در آزمایشگاه های دارای BSL3 قابل استفاده می باشد. روش های رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت و رادیوایزوتوپ های بر چسب دار نیز نیاز به کشت باکتریایی دارند و وقت گیر می باشند.

در روش‌های سرولوژی، آنتی‌ژن کپسولی f1 فقط بین دمای ۳۳-۳۷°C بیان می‌شود به همین دلیل انکوبه کردن کشت باکتری در دمای کمتر از این طیف و بیش از ۳۰ ساعت منجر به نتیجه منفی کاذب می شود. گرچه روش ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص آنتی ژن کپسولی f1، سریع بوده و اجرای آن ۲۰ دقیقه زمان لازم دارد اما کیت تجاری آن هنوز در دسترس نیست. به طور کلی روش های سرولوژی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و تایید گذشته نگر عفونت مناسب هستند، اما برای تشخیص عفونت در فاز حاد بیماری ارزش کمی دارند. بنابراین در هنگام حملات بیوتروریستی استفاده از تست های سرولوژی برای تشخیص، نگران کننده خواهد بود. علاوه بر این یرسینیا پستیس یک ارگانیسم دارای تنوع آنتی ژنیک است. بنابراین دارای ظرفیت دست ورزی برای تغییر ترادف های ژنتیکی نیز می باشد که ممکن است موجب بی اثر شدن استفاده از سنسورهای رایج در تشخیص گرد [۱۲، ۴۴، ۵۰]. در روش تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی نیز مشاهده مرگ جاندار به عنوان نقطه انتهایی سنجش سبب به وجود آمدن نتایج منفی کاذب می شود [۲۶].

روش های تشخیص مولکولی (PCR و Real-time PCR) غالباً سریع (۸-۴ ساعت) و قابل اطمینان برای شناسایی هستند. این روش ها برای شناسایی یرسینیا پستیس در نمونه های مختلفی از جمله مواد غذایی، بالینی، حقیقی یا شبیه سازی شده، نمونه های باستانی و غیره استفاده می شوند. در این روش‌ها تشخیص بر اساس ژن‌های بیماری زا می باشد. ژن‌هایی مانند pla و caf1 که به ترتیب بر روی پلاسمید های $pPCP_1$ و pMT_1 قرار گرفته اند بدلیل انحصاری بودن برای یرسینیا پستیس بهترین ژن ها برای تشخیص می باشند. در بین ژن‌های کروموزومی، ژن های yinh و irp2 به دلیل آنکه منحصراً در یرسینیا پستیس قرار دارند نیز مناسب می باشند. در اکثر سویه ها معمولاً هر سه پلاسمید بیماری‌زا وجود دارند ولی گاهی در بعضی بیماران، سویه‌های غیر معمولی مشاهده می‌شوند که فاقد یک یا تعداد بیشتری از پلاسمیدهای بیماری‌زا هستند در نتیجه سبب ایجاد نتایج منفی کاذب می گردند به همین دلیل در بیشتر طراحی-های تشخیص مولکولی معمولاً چندین ژن برای تشخیص استفاده می شوند [۱، ۱۲، ۱۵، ۳۵، ۴۸]. البته DNA سویه های یرسینیا پستیس دارای ۹۰٪ تشابه با سویه های یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، سویه های پاتوژن انتریک و سویه هایی که به طور معمول از نمونه های محیطی بدست می‌آیند می باشند. این تشابه نوکلئوتیدی ممکن است سبب به وجود آمدن نتایج مثبت کاذب گردد. این انعطاف پذیری ژنومی نتیجه عناصر ژنتیکی متحرک از جمله ترانسپوزون ها، قطعات الحاقی متحرک و باکتریوفاژهای ادغام شونده می باشد [۵۴]. تکنیک های مولکولی دارای مزایای بسیاری زیادی نسبت روش های کلاسیک هستند. در آزمایشگاه های بالینی هنگامی که پرسنل با نمونه های آلوده برای انجام کشت، تست های بیوشیمیایی و غربالگری نمونه های آلوده یرسینیا پستیس سروکار دارند امکان ابتلا وجود دارد. اما اگر DNA نمونه ها بطور اتوماتیک استخراج و خالص شود، ایمن تر و ریسک احتمال آلودگی پرسنل تنها درمدت زمان محدودی قبل از استخراج DNA وجود خواهد داشت. روش های مولکولی علاوه بر برخورداری از سرعت و حساسیت بالا قادر به تشخیص باکتری های غیرزنده نیز می باشند. در روش PCR یک زمان اضافی برای آنالیز محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز لازم است که سبب زمان بر شدن می شود علاوه بر این، امکان آلودگی متقاطع محیط آزمایشگاه توسط محصول PCR وجود دارد. اما در روش Real-time PCR نیازی به الکتروفورز محصول نیست، درنتیجه در زمان هم صرفه جویی می شود. همچنین بر خلاف PCR که باید فرایند تکثیر کامل

انجام شود تا محققین بتوانند نتیجه کار خود را مشاهده کنند در این روش به کمک فلورسنتی که پروب ساطع می کند امکان مشاهده پیشرفت لحظه به لحظه واکنش وجود دارد. همچنین تکنیک های Multiplex PCR، Quadruplex Real-time PCR و Multiplex Real-time PCR به دلیل آنکه چند ژن را هدف قرار می دهند و امکان بررسی چندین پلاسمید تنها در یک واکنش را دارند، سبب کاهش نتایج منفی کاذب می گردند [۱۲، ۱۵، ۳۵، ۴۷، ۴۸].

نتیجه گیری

در حال حاضر روش های کلاسیک و نوین متنوعی برای تشخیص باکتری یرسینیا پستیس وجود دارد. هر کدام از این روش ها دارای معایب و مزایایی می باشند. اما مقایسه آنها نشان دهنده اهمیت و سرعت روش های مولکولی، به خصوص Real-time PCR است. مطالعات انجام گرفته و همچنین تلاش شرکت های مختلف برای تولید و ارائه کیت های تشخیص مولکولی برا ی این باکتری، نشاندهنده این واقعیت می باشد. وجود کانون طاعون خیز در ایران، اهمیت سوء استفاده در بیوتروریسم و همچنین کمبود آزمایشگاه های مجهز دارای سطح ایمنی زیستی ۳ برای کشت این باکتری، اهمیت توجه به روش های مولکولی را بیشتر می کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر صمیمانه خود را از کلیه مسئولینی که در دانشگاه علوم پزشکی آجا در انجام این مطالعه همکاری نموده اند، ابراز می کنند.

References

1. Chase CJ, Ulrich MP, Wasieloski LP, Kondig JP, Garrison J, Lindler LE, “et al”, Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of Yersinia pestis, Clin Chem. 2005;51(10):1778-1785.
2. Rollins SE, Rollins SM, Ryan ET, Yersinia pestis and the plague, Am J Clin Pathol, 2003;119(1): 78-85.
3. Perry RD, Fetherston JD, Yersinia pestis etiologic agent of plague, Clin Microbiol Rev, 1997;10(1):35-66.
4. Anker M, Schaaf D, WHO report on global surveillance of epidemic prone infectious diseases, Available from: URL: http://www.who.int/en/, (Accessed: 10 March 2013).
5. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases Plague, Availablefrom:URL:http://www.who.int/csr/resources/publications/plague/CSR_ISR_2000_1/en/index6.html:, (Accessed: 11 December 2013).
6. Bertherat E, Human Plague in the 21st century, Available from:URL: http://www.who.int/en/, (Accessed: 11 December 2013).
7. Butler T, Plague into the 21st century,CID, 2009;49(5):736-42.
8. Global Alert and Response (GAR), Available from: URL: http://www.who.int/csr/don/archive/disease/plague/en/, (Accessed: 11 December 2013).
9. Bubonic Plague Kills at least 20 People in Madagascar, Available from: URL: http://entomologytoday.org, (Accessed: 11 December 2013).
10. Azizi MH, Azizi F, A History of the Human Plague in Iran, Archives of Iranian medicine, 2010; 13(6): 563[Persian]
11. 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]
12. Soleimani M, Eini F, Raufi MF, Azari F, Farzampour S, Jamshidian E, “et al”, Design of Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for Molecular Detection of Yersinia pestis Bacterium, Cell Journal (Yakhteh), 2010;12(3):363-70[Persian]
13. Kenny JH, Zhou Y, Schriefer ME, Bearden SW, Detection of viable Yersinia pestis by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes, J Microbiol Methods, 2008; 75(2):293-301.
14. Woron AM, Nazarian EJ, Egan C, McDonough KA, Cirino NM, Limberger RJ, “et al”, 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. 2006; 56(3): 261-8
15. Sergueev KV, He Y, Borschel RH, Nikolich MP, Filippov AA, Rapid and sensitive detection of Yersinia pestis using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by Real-time PCR, PLoS One, 2010; 5(6): e11337.
16. Anisimov AP, Amoako KK, Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics, Journal of medical microbiology, 2006;55(11): 1461-1475.
17. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB, Intraspecific diversity of Yersinia pestis, Clin Microbiol Rev, 2004; 17(2): 434-464.
18. Nagoba B, Nagoba BR, Microbiology for Dental Students, BI Publications Pvt Ltd, 2007, 131-133
19. Keyes DC, Burstein JL, Schwartz RB, Swienton RE, Medical response to terrorism: Preparedness and clinical practice, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2004, 70-80.
20. Wilmoth BA, Chu MC, Quan TJ, Identification of Yersinia pestis by BBL Crystal Enteric Nonfermenter Identification System, J Clin Microbiol, 1996; 34(11):2829-30
21. Stepp CA, Woods M, Laboratory procedures for medical office personnel, W.B. Saunders Company, United States of America, 1998, 539-545
22. Linde HJ, Neubauer H, Meyer H, Aleksic S, Lehn N, Identification of Yersinia species by the Vitek GNI card, J Clin Microbiol, 1999; 37(1): 211-4.
23. Schofield DA, Molineux IJ, Westwater C, Diagnostic bioluminescent phage for detection of Yersinia pestis, J Clin Microbiol, 2009; 47(12): 3887-94.

24.Filippov AA, Sergueev KV, He Y, Huang XZ, Gnade BT, Mueller AJ, "et al", Bacteriophage-resistant mutants in Yersinia pestis: identification of phage receptors and attenuation for mice, PLoS One, 2011; 6(9): e25486.
25.Baltazard M, Davis D, Devignat R, Girard G, Gohar M, Kartman L, "et al", Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague, Bull World Health Organ, 1956; 14(3): 457.
26.Engelthaler DM, Gage KL, Montenieri JA, Chu M, Carter LG, PCR detection of Yersinia pestis in fleas: comparison with mouse inoculation, J Clin Microbiol, 1999; 37(6):1980-4.
27.Qu S, Shi Q, Zhou L, Guo Z, Zhou D ,Zhai J," et al", Ambient stable quantitative PCR reagents for the detection of Yersinia pestis, PLoS One, 2010; 4(3): 629.
28.Cao LK, Anderson GP, Ligler FS, Ezzell J, Detection of Yersinia pestis fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor, J Clin Microbiol, 1995; 33(2): 336-41
29.Suzuki S, Sakakibara H, Hotta S, Latex agglutination tests for measurement of antiplague antibodies, J Clin Microbiol,1977;6(4):332-6.
30.Williams JE, Arntzen L, Robinson DM, Cavanaugh DC, Comparison of passive haemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of plague, Bull World Health Organ. 1982; 60(5): 777.
31.Tomaso H, Thullier P, Seibold E, Guglielmo V, Buckendahl A, Rahalison L, "et al", Comparison of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of Yersinia pestis, J Clin Microbiol 2007; 45(10): 3404-7.
32.Rajerison M, Dartevelle S, Ralafiarisoa LA, Bitam I, Tuyet DTN, Andrianaivoarimanana V," et al", 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.
33.Hinnebusch J ,Schwan T, New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect Yersinia pestis in fleas, J Clin Microbiol, 1993; 31(6): 1511-4.
34.Tsukano H, Itoh K, Suzuki S, Watanabe H, Detection and identification of Yersinia pestis by polymerase
35.Leal NC, Almeida AMP, Diagnosis of plague and identification of virulence markers in Yersinia pestis by multiplex-PCR, Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1999; 41(6): 339-42
36.Karami A, Safari Foroshani N, Aeidi A, Simultaneous Detection of Salmonella typhi, Bacillus antheracis, and Yersinea pestis by Multiplex PCR, scientific jornal of zanjan, 2013, 21(85): 93-107
37.Soleimani M, Majidzadeh K, Mohseni A, Kabiri KH, Verification and validation of a homemade Yersinia pestis PCR detection assay for blood and serum specimens, The 5th International Congress of Laboratory & Clinic, 2012.
38.Raoult D, Aboudharam G, Crubézy E, Larrouy G, Ludes B, Drancourt M. Molecular identification by "suicide PCR" of Yersinia pestis as the agent of Medieval Black Death, Natl Acad Sci U S A, 2000; 97(23):12800-3.
39.Campbell J, Lowe J, Walz S, Ezzell J, Rapid and specific identification of Yersinia pestis by using a nested polymerase chain reaction procedure, J Clin Microbiol, 1993; 31(3): 758-9.
40.Adair D, Worsham P, Hill K, Klevytska A, Jackson P, Friedlander A, "et al", Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat fromYersinia pestis, J Appl Microbiol,2000; 38(4): 1516-9.
41.Higgins JA, Ezzell J, Hinnebusch BJ, Shipley M, Henchal EA, Ibrahim MS. 5′ Nuclease PCR Assay To DetectYersinia pestis, J Clin Microbiol.8-2284: (8)36; 1998.
42.Lindler LE, Fan W, Jahan N, Detection of Ciprofloxacin-ResistantYersinia pestis by Fluorogenic PCR Using the LightCycler. J Clin Microbiol,2001; 39(10): 3649-55.
43.Loiez C, Herwegh S, Wallet F, Armand S, Guinet F, Courcol RJ, Detection of Yersinia pestis in sputum by real-time PCR, J Clin Microbiol, 2003; 41(10): 4873-5
44.Riehm JM, Rahalison L, Scholz HC, Thoma B, Pfeffer M, Razanakoto LM, "et al", Detection of Yersinia pestis using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague, Mol Cell Probes 2011;25(1): 8-12
45.Kabiri KH, Majidzadeh K, Soleimani M, Quantitative Real-time PCR assay targeting caf1gene of Yersinia pestis, The 14th International Iranian Congress of Microbiology, 2013.

46.Kabiri KH, Desining a Real time PCR method to detected Yersinia pestis bacterium, Dissertation for the degree of MSc of Education, Islamic Azad University, Qom Branch, Septeember 2013[Persian]
47.Tomaso H, Reisinger EC, Dahouk S, Frangoulidis D, Rakin A, Landt O,“ et al”, Rapid detection of Yersinia pestis with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes, FEMS Immunol Med Microbiol, 2006; 38(2): 117-26.
48.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, J Med Microbiol, 2008; 57(3): 324-31.
49.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.
50.Malou N, Nappez C, Signoli M, Le Forestier C, Castex D, Drancourt M, “et al”, Immuno-PCR-A New Tool for Paleomicrobiology: The Plague Paradigm, PLoS One, 2012; 7(2): e31744.
51.Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M, 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, 2010; 10(1): 285.
52.Blasco R, Murphy M, Sanders M, Squirrell D, Specific assays for bacteria using phage mediated release of adenylate kinase, J Appl Microbiol, 2002;84(4):661-6.
53.Loessner MJ, Rees C, Stewart G, Scherer S, Construction of luciferase reporter bacteriophage A511: luxAB for rapid and sensitive detection of viable Listeria cells, Appl Environ Microbiol,1996; 62(4):1133-40.
54.Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, Worsham PL ,Andersen GL, Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of Yersinia pestis, Appl Environ Microbiol, 2001; 67(8): 3759-62.

Review on the Laboratory Diagnosis of Yersinia pestis

Kabiri KH[1], *Majidzadeh K*2, *Soleimani M*[3]*

[1]M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University Qom Branch , Qom, Iran.
[2]Assistant Professor of Biotechnology, Tasnim Biotechnology of Research Center (TBRC), Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University Qom Branch, Qom, Iran.
***Corresponding Author:** Islamic Azad University Qom Branch, Qom, Iran.
E-mail: soleimanidor@yahoo.com

Abstract

Yersinia pestis, the causative agent of plague is a Gram negative rod belonging to family of Entrobacteriaceae. CDC has categorized the organism as a priority A biological agent because of its high morbidity and mortality and easy distribution through infective respiratory droplets. We conducted a comprehensive study for the conventional, molecular and modern diagnostic methods of the organism. Biological safety, cultivation and detection assays are the main parts of the present paper. Y.pestis can be recognized in the laboratory by bacteriologic, serologic and molecular methods. Currently, there are various homemade and commercially molecular methods to apply in the clinical laboratories. Culture based methods to detect Yersinia pestis are laborious and time consuming. The molecular methods are rapid, accurate and reliable, so they have high potential to apply in clinical laboratories.

Key words: *Yersinia pestis, Plague, Diagnosis method*

Journal of North Khorasan University 2014;6(4):983-998

Recivied:3 Aug 2013
Revised: 1 Jan 2014
Accepted: 26 Jan 2014