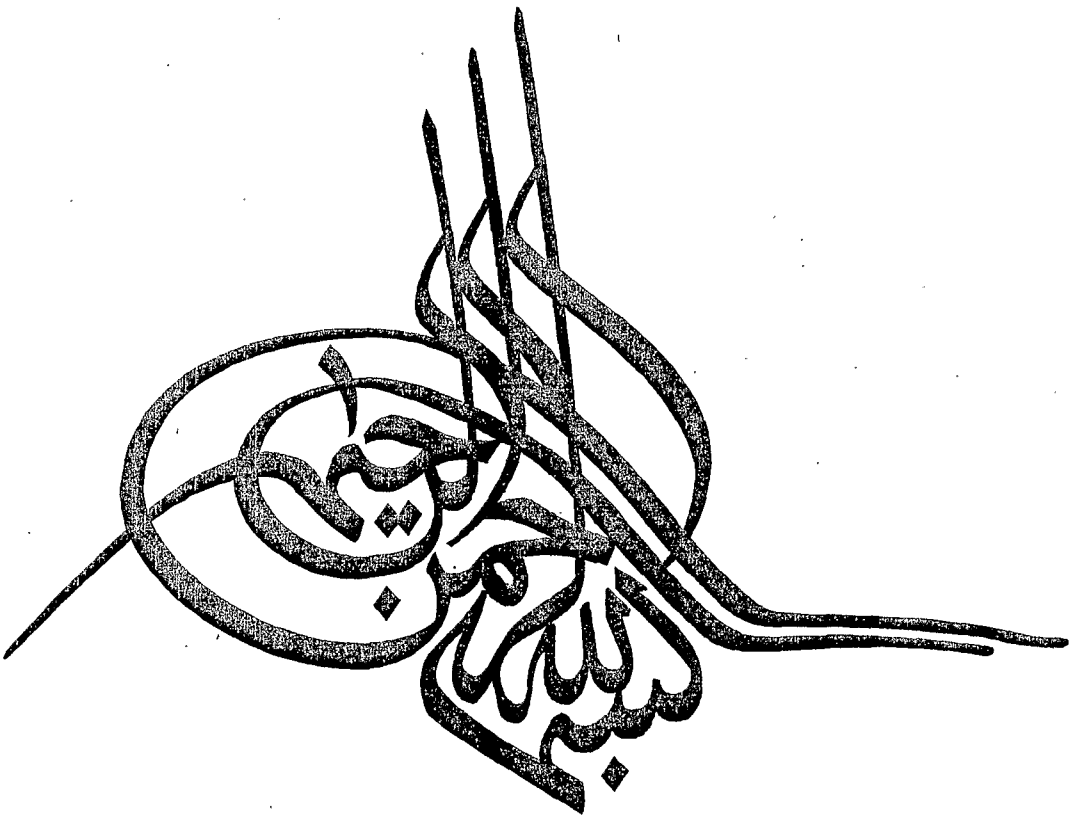

٩/١/٥٥

دانشگاه زنجان
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

بررسی کارایی روش LAMP در تشخیص سالمونلا

اساتید راهنما:

دکتر علی کرمی **دکتر علی حق نظری**

استاد مشاور:

سرکار خانم زینب احمدی

تدوین:

ابوبکر مرادی

۱۳۸۷ /۹/ ۲۳

شهریور ۸۷

۹۸۱۰۵

دانشگاه زنجان

باسمه تعالی

شماره : ۱۵۷۵۳
تاریخ ۸۷/۶/۳۱

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای **ابوبکر مرادی** رشته **بیوتکنولوژی** تحت عنوان **"بررسی کارایی روش LAMP در تشخیص سالمونلا"** در تاریخ ۸۷/۶/۲۷ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه زنجان برگزار گردید و نظر هیأت داوران بشرح زیر می باشد :

☐ قبول (با درجه : عالی امتیاز : ۱۹/۲) ☐ دفاع مجدد ☐ مردود

۱- عالی (۲۰-۱۸)

۲- بسیار خوب (۱۷/۹۹-۱۶)

۳- خوب (۱۵/۹۹-۱۴)

۴- قابل قبول (۱۳/۹۹-۱۲)

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر علی کرمی	دانشیار	
۲- استاد راهنما	دکتر علی حق نظری	استادیار	
۳- استاد مشاور	مهندس زینب احمدی	مربی	
۴- استاد ممتحن	دکتر بهرام ملکی زنجانی	استادیار	
۵- استاد ممتحن	دکتر رضا فتوت	استادیار	
۶- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد حسین شهیر	استادیار	

دکتر محمد حسین شهیر

معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی

دکتر نعمت ا... ارشدی

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه

تقدیم به
پدر و مادر
دلسوز و فداکارم

تقدیر و تشکر

حمد بی حد مر خدای پاک را آنکه ایمان داد مشتی خاک را

خداوند متعال را شاکرم که به من این توانایی را عطا فرمود تا در راه علم و آبادانی کشور عزیزم بتوانم گامی، هر چند کوچک بر دارم و در زمرهٔ کاروان سازندگی ایران همیشه سرافراز قرار گیرم.

درود بی پایان به روان پاک بزرگ مرد عالم هستی حضرت محمّد (ص) که با نور اسلام راه سعادت وخوشبختی را برای جوانیان روشن فرمودند.

درودی گرم و جانانه بر پدر، ستون استوار زندگیم و بر مادر، شمع فروزان زندگیم که همواره حامی و روشنگر راه من بودند و سلامی گرم به برادر و خواهران عزیزم که همواره همراه و مشوق من بودند.

از اساتید راهنمای گرامیم، جناب آقای دکتر علی حق نظری که در طول دوران تحصیل از محضرشان کسب فیض نمودم و همواره درس علم و اخلاق را به ما آموختند و جناب آقای دکتر علی کرمی که افتخار شاگردی این بزرگوار را داشتم و با راهنمائیها و نکته سنجیهای استادانه شان راه درست تحقیق و علم آموزی را به بنده آموختند صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

از استاد مشاورم سرکار خانم زینب احمدی که در طول اجرای پایان نامه دلسوزانه راهنمای من بودند و از محضرشان به کسب علم و دانش پرداختم صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر بهرام ملکی زنجانی و جناب آقای دکتر رضا فتوت که زحمت باز خوانی پایان نامه را تقبل نمودند تشکر و قدردانی می نمایم

از جناب آقای دکتر هاشمی مدنی، ریاست محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... که مساعدت و همکاریهای لازم را با بنده جهت اجرای این تحقیق به عمل آوردند و همچنین کارشناسان محترم این مرکز، جناب آقای رضایی و سرکار خانمها سفیری، رمضانی و پورعلی که همواره در طول این تحقیق مرا دلسوزانه یاری کردند تشکر وقدردانی می نماییم.

از اساتید محترمم جناب آقای دکتر یغمائی، سرکار خانم دکتر خرابنده، سرکار خانم دکتر حق نظری، جناب آقای دکتر باغبان، جناب آقای دکتر مسعودی نژاد، جناب آقای دکتر ملکی، جناب آقای دکتر صبا و جناب آقای دکتر جباری که در طول تحصیل از محضر این بزرگواران کسب علم و دانش نمودم تشکر و قدردانی می نماییم.

از جناب آقای دکتر محمدرضا جبه دار که همواره چون پدری دلسوز و مهربان راهنما، پشتیبان و مشوق من بودند. بخاطر تمام زحماتشان از صمیم دل ممنون و سپاسگزارم.

از دوستان عزیز و همسفران دوران تحصیلم آقایان علیرضا جبه دار، یاسر ابراهیم پور، رضا ترینی راد، رضا بازاریان، جلاالدین هیوه چی، صابر یاری، اسمعیل صدقی، جابر نصیری، عمار تقوی، حسن رستمی، مصطفی افشاری، علی فتحی، محمّد علوی، حمزه حمزه، رستم عبدالهی، سجاد صاری خان، شاهویردی، محمد ا...وردی و سرکار خانمها ایلدا محمدی، معصومه عسکری، مرضیه وفا، حنانه شیریان، طیبه آنبفی، ملک فرجزاده، الهه دلیر عبدالهی، غزاله جوادی، رقیه عظیم خانی و مهری که با بذل محبت همواره مرا یاری کردند صمیمانه تشکر وقدردانی می نمایم.

در پایان از خداوند متعال برای تمامی این عزیزان و کسانی که به نحوی در این راه مرا یاری کردند آرزوی توفیق روز افزون، سلامتی و بهروزی را مسألت می نمایم. از تمامی کسانی که این پایان نامه را مطالعه می نمایند تقاضا دارم که هر گونه پیشنهاد، انتقاد و نظر سازنده ای در این راستا دارند را به اطلاع بنده برسانند (moradibio@gmail.com).

با تقدیم احترام

ابوبکر مرادی

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- اهمیت سالمونلاها در جهان ۲

۱-۲- روشهای آزمایشگاهی معمول تشخیص سالمونلا ۳

۱-۳- رو شهای تشخیصی مبتنی بر PCR ۴

۱-۴- روش تشخیصی LAMP ۵

فصل دوم:بررسی منابع

۲-۱- آشنایی با سالمونلا ۸

۲-۱-۱- باکتری شناسی سالمونلا ۸

۲-۱-۲- طبقه بندی سالمونلا ۸

۲-۱-۳- خواص شکلی ۱۰

۲-۱-۴- خواص کشت ۱۱

۲-۱-۵- ژنتیک سالمونلاها ۱۱

۲-۱-۶- اساس ژنتیک بیماریزای سالمونلاها ۱۲

۲-۱-۷- عوامل بیماریزای کروموزمی ۱۳

۲-۱-۸- عوامل بیماریزای پلاسمیدی ۱۴

۲-۲- آشنایی با واکنش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه(LAMP) ۱۴

۲-۲-۱- بررسی متداولترین روشهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک PCR و Real-time PCR ۱۴

۲-۲-۲- بررسی روشهای تکثیر هم دما و مقایسه آنها با روشهای مبتنی بر PCR ۱۶

۲-۲-۳- روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه LAMP ۱۹

۲-۲-۳-۱- مشخصات روش LAMP ۲۱

۲-۲-۳-۲- میزان حساسیت LAMP ۲۳

۲-۲-۳-۳- مزایای LAMP ۲۳

۲-۲-۳-۴- مواد لازم برای انجام واکنش LAMP ۲۴

۲-۲-۳-۴-۱- *Bst* پلیمراز ۲۴

۲-۲-۳-۴-۲- دزوکسی نوکلئوزید تری فسفاتها (dNTPs) ۲۷

۲-۲-۳-۴-۳- بافر و $MgSO_4$ ۲۷

۲-۲-۳-۴-۴- آغازگرها ۲۸
۲-۲-۳-۴-۴-۱- طراحی آغازگرها ۲۸
۲-۲-۳-۴-۴-۲- نکات مهم در طراحی آغازگر ۲۹
۲-۲-۳-۴-۵- DNA هدف ۳۰
۲-۲-۳-۴-۶- مواد شیمیایی بی ثبات کننده مارپیچ DNA ۳۱
۲-۲-۳-۵- شرایط انجام واکنش ۳۱
۲-۲-۳-۶- مبانی علمی نحوه انجام واکنش LAMP ۳۲
۲-۲-۳-۶-۱- فاز مقدماتی واکنش ۳۲
۲-۲-۳-۶-۱-۱- مرحله اول ۳۲
۲-۲-۳-۶-۱-۲- مرحله دوم ۳۳
۲-۲-۳-۶-۱-۳- مرحله سوم ۳۴
۲-۲-۳-۶-۱-۴- مرحله چهارم ۳۴
۲-۲-۳-۶-۱-۵- مرحله پنجم ۳۵
۲-۲-۳-۶-۱-۶- مرحله ششم ۳۵
۲-۲-۳-۶-۱-۷- مرحله هفتم ۳۶
۲-۲-۳-۶-۲- فاز اصلی واکنش LAMP ۳۶
۲-۲-۳-۶-۲-۱- مرحله هشتم ۳۷
۲-۲-۳-۶-۲-۲- مراحل ۸ تا ۱۱ (چرخه اصلی تکثیر) ۳۷
۲-۲-۳-۷- بهینه سازی شرایط LAMP و عوامل مؤثر در واکنش ۴۰
۲-۲-۳-۸- روشهای آشکارسازی در LAMP ۴۲
۲-۲-۳-۸-۱- روش مشاهده ای ۴۲
۲-۲-۳-۸-۱-۱- تشخیص مشاهده ای بوسیله کدورت سنجی ۴۲
۲-۲-۳-۸-۱-۲- تشخیص مشاهده ای بوسیله فلورسانس ۴۵
۲-۲-۳-۸-۲- روش الکتروفورز ۴۶
۲-۲-۳-۸-۳- روش Real-time LAMP و آنالیز کمی ۴۷
۲-۲-۳-۹- سرعت بخشیدن به واکنش LAMP با استفاده از آغازگرهای حلقوی ۴۷
۲-۲-۳-۹-۱- مزایای آغازگرهای حلقوی ۴۹
۲-۲-۳-۱۰- SNPs typing بر مبنای LAMP ۵۰
۲-۲-۳-۱۱- روش RT-LAMP ۵۱

۲-۲-۳-۱۲- معایب LAMP ۵۲
۲-۲-۴- چشم انداز آینده ۵۳

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد و بافرها ۵۵
۳-۱-۱- مواد و بافرهای استفاده شده در استخراج DNA ۵۵
۳-۱-۲- طرز تهیه بافر TBE 10x ۵۶
۳-۱-۳- طرز تهیه TBE 1x ۵۶
۳-۱-۴- طرز تهیه EDTA ۵۶
۳-۱-۵- تهیه ژل ۵۶
۳-۱-۶- طرز تهیه محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی ژل ۵۷
۳-۱-۶-۱- محلول استوک ۵۷
۳-۱-۶-۲- محلول کاربردی ۵۷
۳-۱-۷- مارکر مولکولی ۵۷
۳-۱-۸- خصوصیات Loading buffer 6x و مواد موجود در آن ۵۸
۳-۱-۹- محیط کشت باکتریها ۵۸
۳-۲- باکتریها ۵۹
۳-۳- کشت باکتریها ۶۰
۳-۴- استخراج DNA ۶۰
۳-۴-۱- روش استخراج ۶۰
۳-۴-۲- تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراج شده ۶۲
۳-۵- آغازگرها ۶۲
۳-۵-۱- آغازگرهای استفاده شده در PCR ۶۲
۳-۵-۲- آغازگرهای استفاده شده در LAMP ۶۴
۳-۶- انجام واکنش ۶۶
۳-۶-۱- انجام PCR بر روی نمونه های استاندارد ۶۶
۳-۶-۲- انجام LAMP بر روی نمونه های استاندارد ۶۷
۳-۷- انجام الکتروفورز بر روی محصولات تولید شده ۷۰
۳-۷-۱- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۷۰

۳-۷-۲- الکتروفورز محصول LAMP روی ژل آگارز ۷۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- کمیت وکیفیت DNA استخراج شده ۷۲
۴-۲- انجام PCR با سویه های مختلف سالمونلا با استفاده از آغازگرهای S12 و S13 ..... ۷۲
۴-۳- بهینه سازی فاکتورهای موثر در تست LAMP ۷۴
۴-۳-۱- بهینه سازی دما مطلوب جهت انجام واکنش ۷۵
۴-۳-۲- بهینه سازی Betaine جهت انجام واکنش ۷۷
۴-۳-۳- بهینه سازی آنزیم *Bst* پلیمراز ۷۸
۴-۳-۴- بهینه سازی رقت dNTPs ۷۹
۴-۳-۵- بهینه سازی رقت مناسب آغازگرهای FIP و BIP ۸۰
۴-۳-۵-۱- بررسی اثر وجود هر یک از آغازگرها بر روی واکنش LAMP ۸۲
۴-۴- انجام واکنش LAMP با سویه های مختلف سالمونلا با شرایط بهینه سازی شده ۸۳
۴-۵- کدورت سنجی در واکنش LAMP ۸۴
۴-۶- اثر دو برابر کردن زمان و مواد بر روی واکنش LAMP ۸۵
۴-۷- مقایسه اختصاصیت (Speceficity) PCR با LAMP ۸۶
۴-۸- مقایسه حساسیت(Sensentivety) PCR با LAMP ۸۹
۴-۹- نتیجه گیری ۹۳
۴-۱۰- پیشنهادات ۹۴
منابع ۹۶

فهرست شکل ها

عنوان — صفحه

شکل ۲-۱- شکل باکتری سالمونلا همراه با نمایش شماتیک اجزاء داخلی ۱۰
شکل ۲-۲- الف- نحوه انجام فرایند PCR، ب- دستگاه چرخه حرارتی (ترموسایکلر) ۱۵
شکل ۲-۳- الف- نحوه انجام فرایند Real-time PCR، ب- دستگاه Real-time PCR ۱۶
شکل ۲-۴- نمایش شماتیک فعالیت Strand Displacement آنزیم *Bst* پلیمراز ۲۶
شکل ۲-۵- نمایش آغازگرها و ژن هدف در واکنش LAMP ۲۸
شکل ۲-۶- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله اول ۳۳
شکل ۲-۷- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله دوم ۳۳
شکل ۲-۸- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله سوم ۳۴
شکل ۲-۹- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله چهارم ۳۴
شکل ۲-۱۰- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله پنجم ۳۵
شکل ۲-۱۱- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله ششم ۳۶
شکل ۲-۱۲- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله هفتم ۳۶
شکل ۲-۱۳- فاز اصلی واکنش LAMP مرحله هشتم ۳۷
شکل ۲-۱۴- بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله هشتم تا یازدهم ۳۹
شکل ۲-۱۵- محصولات حد واسط و نهایی چرخه واکنش LAMP به صورت شماتیک و به شکل DNA خطی شده نشان داده شده اند ۳۹
شکل۲ -۱۶- نمایش شماتیک مکانیسم عمل آغازگرهای حلقوی در واکنش LAMP ۴۸
شکل ۲-۱۷- نحوه قرارگیری آغازگرهای حلقوی ۴۹
شکل ۲-۱۸- مکانیسم واکنش SNPs typing بر مبنای LAMP ۵۱
شکل ۳-۱- نمایش شماتیک ژن *invA* و محل قرار گیری آغازگرها ۶۵
شکل ۳-۲- نمایش شماتیک آغازگرهای طراحی شده از ژن *invA* برای انجام واکنش LAMP و نحوه قرارگیری آنها روی ژن *invA* ۶۶
شکل ۳-۳- دستگاه ترموبلاک که یک بلوک حرارتی ساده و ارزان قیمت می باشد ۶۸
شکل ۴-۱- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده بروی آگارز ۱٪ ران پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۷۲
شکل ۴-۲- الکتروفورز محصول PCR برای ژن *invA* با استفاده از آغازگرهای S12 و S13 ... ۷۳

شکل ۴-۳- الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب دمای مؤثر بر واکنش ۷۵
شکل ۴-۴- الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب Betaine ۷۸
شکل ۴-۵- الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب آنزیم *Bst* پلیمراز ۷۹
شکل ۴-۶- الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب dNTPs ۸۰
شکل ۴-۷- الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب آغازگرهای FIP و BIP . ۸۱
شکل ۴-۸- بررسی اثر وجود هر یک از آغازگرها بر روی واکنش LAMP ۸۲
شکل ۴-۹- انجام واکنش LAMP با سویه های مختلف سالمونلا بعد از بهینه سازی شرایط واکنش..... ۸۴
شکل ۴-۱۰- کدورت سنجی بعد از انجام واکنش LAMP ۸۵
شکل ۴-۱۱- اثر دو برابر کردن زمان و مواد بر روی واکنش LAMP، مشاهده و سنجش بوسیله کدورت سنجی و ژل الکتروفورز ۸۶
شکل ۴-۱۲- مقایسه اختصاصیت (Speceficity) LAMP با PCR ۸۷
شکل ۴-۱۳- مقایسه حساسیت (Sensitivity) PCR با LAMP ۹۰

فهرست جداول و نمودارها

عنوان | صفحه

جدول ۲-۱- مقایسه بین *Bst* پلیمراز و *Taq* پلیمراز ۲۶

جدول ۳-۱- مواد و بافرهای استفاده شده در طی پروسه استخراج DNA ۵۵

جدول ۳-۲- توالی آغازگرهای استفاده شده برای واکنش PCR ۶۳

جدول ۳-۳- توالی آغازگرهای استفاده شده در LAMP ۶۵

جدول ۳-۴- زمان و دمای لازم جهت انجام چرخه های دمایی در PCR ۶۶

جدول ۳-۵- مقادیر ترکیبات استفاده شده در PCR ۶۷

جدول ۳-۶- مقادیر ترکیبات استفاده شده در LAMP ۶۹

نمودار ۲-۱- مقایسه بین روش اصلی LAMP و روش تسریع (استفاده از آغازگرهای حلقوی) شده با Real-time LAMP ۴۹

چکیده

سالمونلاها گروهی از باکتریهای میله ای شکل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه هستند. که باعث آلودگی مواد غذایی و ایجاد بیماریهای عفونی مختلفی در انسان و حیوانات می شوند. بنابراین تشخیص سریع، دقیق و به موقع آنها ضروری به نظر می رسد. برای تشخیص سالمونلاها روشهای مختلفی وجود دارد که می توان به روش کشت، روشهای سرولوژیک و ایمنولوژیک، ELISA اشاره نمود. تمام این روشها به زمان طولانی، تعداد زیاد باکتری درنمونه اولیه، تجهیزات گران قیمت آزمایشگاهی و افراد متخصص نیاز دارند. با توجه به مشکلات روشهای تشخیصی معمول، روشهایی که بر پایه ژنوم و DNA هستند می‌توانند تکنیکهای بهتری جهت تشخیص این باکتریها باشند. PCR، روشی سریع و حساس است و به علت کارایی بالا و قدرت زیاد در سالهای اخیر به طور گسترده ای در تشخیص سریع پاتوژنهای غذایی نظیر سالمونلا به کار گرفته شده است. گرچه این روش دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیتهایی نیز می باشد: ۱) استفاده از چرخه های حرارتی که زمان زیادی را می طلبد. ۲) استفاده از دستگاه ترموسایکلر که گران است ۳) روشهای آشکارسازی و تشخیص محصول که عمدتاً با مشکلاتی نظیر استفاده از مواد سمی و خطرناک مثل اتیدیوم بروماید همراه است. به همین دلیل جهت رفع این مشکلات در این تحقیق روشی به کار گرفته شد که معایب روشهای مبتنی بر PCR را به حداقل برساند. در این بررسی از روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه یا LAMP استفاده شد و با PCR مورد مقایسه قرار گرفت. برای مقایسه PCR و LAMP از ۷ سویه مختلف سالمونلا استفاده شد. برای انجام PCR علاوه بر نیاز به دستگاه بالغ بر ۳ ساعت زمان صرف شد اما روش LAMP بدون نیاز به دستگاه و تنها با استفاده از یک بلوک دمایی ساده، زمان مورد نیاز برای تشخیص را به ۶۰ دقیقه تقلیل داد. بر اساس نتایج این تحقیق روش LAMP در مقایسه با PCR معمولی برای تشخیص سالمونلا و انواع دیگر عوامل بیماریزا سریعتر، ارزانتر و اختصاصی تر است. مزیت دیگر این روش عدم وابستگی به چرخه های دمایی و دستگاه ترموسایکلر بوده و به جای آن از یک بستر حرارتی بسیار ساده و ارزان، ساخت داخل کشور استفاده شده است.

واژگان کلیدی: سالمونلا، انتروباکتریاسه، سرولوژیک، ژنوم، ایمنولوژیک، ترموسایکلر، ELISA، PCR، DNA، LAMP

فصل اول
مقدمه

مقدمه:

۱-۱. اهمیت سالمونلاها در جهان

باکتریهای سالمونلا یکی از پاتوژنهای مهم و اصلی موجود در مواد غذایی هستند و موجب مسمومیت غذایی انسان در سراسر جهان می گردند. محققان زیادی از جنبه‌های مختلفی نظیر ژنتیک، ساختمان یاخته‌ای، فیزیولوژی و بیماریزایی این باکتریها را مورد بررسی قرارداده اند. گونه‌های بسیاری از موجودات توسط سروتیپهای مختلف سالمونلا آلوده می‌شوند. بعضی از سروتیپهای سالمونلا نسبت به یک میزبان اختصاص یافته‌اند در حالیکه سروتیپهای دیگر می‌توانند دامنهٔ وسیعی از میزبانها را آلوده نمایند. سالمونلاها به وسیله آلوده کردن مواد غذایی بویژه تخم مرغ، شیر، گوشت ماکیان، گوشت قرمز، آب، سبزیجات و میوه جات باعث بیماریهای روده ای و دیگر بیماریها در انسان می شوند. تشخیص باکتریهای بیماریزا نظیر سالمونلا، جهت نظارت و مراقبت در جلوگیری و کنترل بیماریهای ناشی از مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است (آنتونیو و همکاران[۱]، ۲۰۰۰؛ والس و همکاران[۲]، ۲۰۰۰؛ هربوید[۳]، ۲۰۰۰ و برسچر و همکاران[۴]، ۱۹۹۹).

به گزارش سازمان جهانی بهداشت ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ سالیانه یک معضل بزرگ بهداشتی در جهان بخصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می باشد (بل و همکاران[۵]، ۲۰۰۰ و ابی هانکر و همکاران[۶]، ۲۰۰۰).

---

[۱] Antonio *et al.*
[۲] Wallace *et al.*
[۳] Herboid
[۴] Burtscher *et al.*
[۵] Bell *et al.*
[۶] Abhyankar *et al.*

۱-۲. روشهای آزمایشگاهی معمول تشخیص سالمونلا

تشخیص به موقع و درست این باکتری در مواد غذایی، حیوانات و افراد مشکوک به آلودگی ضروری به نظر می رسد. روشهای تشخیصی متعددی جهت شناسائی این باکتری وجود دارد که به هر یک اشاره می شود. روشهای حساس کشت که بر مبنای استفاده از دو مرحله غنی کردن است. در ابتدا کشت در محیطهایی مثل (BPW)[۱] یا (TSB)[۲] و در ادامه کشت در (RVB)[۳] و (TTB)[۴] و کشت روی محیط انتخابی آگار مثل (XLD)[۵] که نهایتاً بعد از انجام این مراحل سالمونلا تشخیص داده می شود. روشهای کشت حداقل به بیش از سه روز زمان نیاز دارند (مور و همکاران[۶]، ۲۰۰۵؛ هراکودا و و همکاران[۷]، ۲۰۰۱ و اندرسو و همکاران[۸]، ۱۹۹۸).

از دیگر روشها می توان به روش تشخیصی سریعی مثل (EIA)[۹]، روشهای سرولوژیک، تکنیکهای الکتریکی و آنالیز نشانگرهای اسیدهای نوکلئیک اشاره نمود، اما هنوز مشکلات بسیاری در رابطه با حساسیت و اختصاصیت این روشها وجود دارد و زمان آنالیز بسته به حساسیت سیستم تشخیصی از چند ساعت تا چندین روز متفاوت است. همچنین نیاز به جمعیت اولیه زیادی از پاتوژن هدف برای تشخیص دارند. به علت مشکلات تکنیکی، سختی کار و زمان زیاد جهت تشخیص، این روشها عمومیت چندانی نیافته اند، همچنین کارایی و بازده لازم را از این روشها نمی توان انتظار داشت (هورفار و همکاران[۱۰]، ۲۰۰۰ و چاپمن و همکاران[۱۱]، ۲۰۰۱).

---

[۱] Buffered Peptone Water
[۲] Trypticase Soy Broth
[۳] Rappaport–Vassiliadis broth
[۴] Tetrathionate broth
[۵] Xylose Lysine Deoxycholate
[۶] Moore *et al.*
[۷] Hara-Kudo *et al.*
[۸] Andrews *et al.*
[۹] Enzyme Immuno Assay
[۱۰] Hoorfar *et al.*
[۱۱] Chapman *et al.*

۱-۳. رو شهای تشخیصی مبتنی بر PCR

با توجه به مشکلات روشهای تشخیصی معمول، روشهایی که بر پایه ژنوم و DNA هستند می‌توانند تکنیکهای بهتری جهت تشخیص این باکتریها باشند. روش واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR که در دهه های اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، روشی سریع و حساس است که قادر است تعداد نسخه اندکی از DNA هدف را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص باشد تکثیر نماید. به علت کارایی بالا و قدرت زیاد PCR این روش در سالهای اخیر به طور گسترده ای در تشخیص سریع پاتوژنهای غذایی نظیر سالمونلا به کار گرفته شده است. گرچه این روش دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیتهایی نیز می باشد که می توان به این موارد اشاره نمود: ۱) استفاده از چرخه های حرارتی جهت تکثیر (۳۰ تا ۴۰ چرخه) که زمان زیادی را می طلبد. ۲) استفاده از دستگاه ترموسایکلر که گران است ۳) روشهای آشکارسازی و تشخیص محصول PCR، که عمدتاً با مشکلاتی نظیر استفاده از مواد سمی و خطرناک مثل اتیدیوم بروماید همراه است (آلیور و همکاران[۱]، ۲۰۰۲ و فیگارو-بوسی و همکاران[۲]، ۱۹۹۹).

اخیراً استفاده از Real-time PCR محققان را قادر ساخته تا با سرعت، حساسیت و اختصاصیت بالا پاتوژنها را شناسائی نمایند. متأسفانه در این روش کارایی تکثیر می تواند از نمونه ای به نمونه دیگر متفاوت باشد. به دلیل بازدارنده های تکثیر، حساسیت به آلودگی و خطای آزمایشی راه استفاده از این روش قدرتمند دشوار می گردد. همچنین این روش نیاز به دستگاه و مواد بسیار گران قیمت با آشکارسازهای[۳] فلورسانت دارد و تنها افراد متخصص قادر به کارگیری این تکنیک می باشند

---

[۱] Oliveira *et al.*
[۲] Figueroa-Bossi *et al.*
[۳] Detector

(کلرک و همکاران[۱]، ۲۰۰۴؛ آریسیند و همکاران[۲]، ۲۰۰۳ و مالا و همکاران[۳]، ۱۹۹۸).

اگرچه روشهای مبتنی بر PCR روشهای حساس و سریعی هستند، اما محدودیتهای ذکر شده موجب گردیده تا این روشها تنها در آزمایشگاههای مجهز که دارای افراد متخصص در این زمینه اند به کار گرفته شوند و در مواردی که امکان به کارگیری وسایل مجهز آزمایشگاهی وجود ندارد مانند مناطق دور افتاده و محروم که نیاز به تشخیص عوامل میکروبی از جمله سالمونلا جهت جلوگیری از خسارات شدید و احتمال ایجاد اپیدمی در انسانها و حیوانات است، نتوان از این روشها به طور گسترده استفاده نمود (مولر و همکاران[۴]، ۲۰۰۵ و کومار و همکاران[۵]، ۲۰۰۲).

۱-۴. روش تشخیصی LAMP

با توجه به موارد ذکر شده نیاز به روشی ساده با کارایی بالاتر است که بتواند محدودیتهای روشهای پیشین را مرتفع نماید و در آزمایشگاههای عادی و کوچک حتی توسط افراد غیر متخصص نیز قابل انجام باشد. روش جدیدی جهت تکثیر اسیدهای نوکلئیک به نام تکثیر هم دمای وابسته به حلقه[۶] (LAMP)، توسط نوتومی و همکاران[۷] در سال ۲۰۰۰ معرفی گردید که واجد این مشخصات است. در این روش DNA با کارایی و سرعت بالا به صورت اختصاصی در یک دما تکثیر می شود.

در این روش از ۴ آغازگر (دو آغازگر داخلی و دو آغازگر خارجی) استفاده می شود که در مجموع ۶ ناحیه ژنی از DNA هدف را مورد شناسایی قرار می دهند. که همین امر باعث اختصاصیت بسیار بالای این روش می گردد و طی فرایند پیوسته و دنباله داری با تشکیل نواحی سنجاق سری در

---

۱ Klerks *et al.*
۲ Aricind *et al.*
۳ Mullah *et al.*
۴ Morel *et al.*
۵ kumar *et al.*
۶ Loop-Mediated Isothermal Amplification
۷ Notomi *et al.*

دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتیگراد و استفاده از یک آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت با خاصیت جایگزینی رشته[۱] تکثیر[۲] می یابد (نوتومی و همکاران[۳]، ۲۰۰۰).

کارایی تکثیر در روش LAMP بسیار بالاست و قادر است مقدار اندکی از DNA (حتی کمتر از ۶ کپی در مخلوط) را تا $۱۰^{۱۰}$ کپی تکثیر نماید. امکان آشکارسازی نتیجه نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش که به واسطه آزاد شدن پیروفسفات از dNTPها و ترکیب آنها با یونهای منیزیم در حین واکنش ایجاد می گردد، امکان آنالیز نتایج را آسان می نماید که این مورد در بین تمام روشهای ملکولی تکثیر DNA بی نظیر است (موری و همکاران[۴]، ۲۰۰۱).

روش LAMP ساده و انجام آن آسان است و تنها نیاز به آغازگر، DNA پلیمراز و مخلوط واکنش دارد. در این روش نیازی به دستگاه ترموسایکلر نبوده و واکنش در یک حمام آب گرم یا بلوک حرارتی قابل انجام است (نوتومی و همکاران، ۲۰۰۰).

مزایای LAMP باعث گردیده که به عنوان روشی سریع و دقیق در تشخیص پاتوژنهای مختلف در انسان، حیوان و گیاه به کار رود و منجر به ایجاد روشهای تشخیصی سیار و سریع در مناطقی که امکان استفاده از آزمایشگاههای مجهز وجود ندارد گردد. در این مطالعه هر دو روش PCR و LAMP جهت تشخیص سالمونلا به کار رفت و نتایج نشان داد که روش LAMP نسبت به PCR حساسستر، آسانتر، سریعتر، دقیقتر و بسیار ارزانتر است.

---

[۱] Strand Displacement
[۲] Amplification
[۳] Notomi *et al.*
[۴] Mori *et al.*

فصل دوم
بررسی منابع