



تشخیص سریع و آسان لیستریا منوسیتوژنز در نمونه های ادرار زنان به کمک واکنش

زنجیره ای پلی مرز و پروب فلورستی ژن *hly A*

محمد سبحانی لاری^{۱*}، نادر شاهرخی^۲، محمد کارگر^۳

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبی شناسی، ^۲ استادیار، انستیتو پاستور ایران، بخش زیست شناسی مولکولی، گروه میکروبی شناسی، ^۳ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبی شناسی

چکیده

سابقه و هدف: لیستریا منوسیتوژنز یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت بدون علامت دستگاه ادراری-تناسلی است که می تواند موجب عفونت نوزادان و مرگ جنین شود. با توجه به چالش های ناشی از کشت این باکتری، این پژوهش با هدف تشخیص لیستریا در ادرار به کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از پروب فلورستی انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۱۰۰ نمونه ادرار بیماران مراجعه کننده به مرکز تخصصی زنان و زایمان در شهرهای لارستان و جهرم انجام شد. ابتدا با استفاده از سویه استاندارد حساسیت تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس پروب ژن *hly-A* طراحی و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز، میزان فلوروستنت با دستگاه ردیاب فلوروستنت تعیین گردید. **یافته ها:** با استفاده از سنجش FLASH-PCR محدوده ردیابی ۵ تا ۱۰ ژن باکتری در هر واکنش تعیین شد. از مجموع ۱۰۰ نمونه بالینی، در ۳۰ مورد (۳۰٪) با استفاده از پروب فلورستی ژن *hly-A* لیستریا شناسایی گردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که برای شناسایی مولکولی لیستریا، پروب فلورستی سرعت، حساسیت و ویژگی بالایی دارد و می تواند جایگزین مناسبی برای الکتروفورز باشد. از این رو با توجه به دقت و غیر تهاجمی بودن این روش، انجام مطالعات گسترده تر به منظور پایش لیستریا در نمونه های بالینی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: لیستریا، ادرار، پروب فلورستی.

پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲

مقدمه

مسن یا کسانی که ایمنی سلولی آن ها پایین است مستعد بیماری هستند. لیستریا منوسیتوژنز در زنان باردار موجب باکتری می مشابه آنفولانزا می شود و به دلیل عبور از جفت می تواند به التهاب جفت، پرده آمیوتیک، عفونت جنین و در نهایت سقط و یا تولد زود هنگام منجر شود (۵). فرم زودرس بیماری، عفونت جنین و فرم دیررس، عفونت نوزاد هنگام تولد از کانال طبیعی زایمان آلوده می باشد (۶). در حال حاضر روش استاندارد تشخیص لیستریا منوسیتوژنز، کشت است. اما به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک در خوراک دام و پتانسیل رشد

لیستریوز بیماری مشترک انسان و حیوان است و عامل آن لیستریا منوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) می باشد (۱). در حیوانات آلوده هیچ گونه علامتی از بیماری وجود ندارد (۲). توانایی رشد این باکتری در خشکی و سرما موجب افزایش بقا و رشد در مواد غذایی موجود در یخچال شده و در پاستوریزاسیون ناقص زنده می ماند (۳ و ۴). با خوردن غذاهای آلوده مانند لبنیات و گوشت، به انسان انتقال می یابد (۲). افراد

(* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبی شناسی.

هدف از این مطالعه تشخیص لیستریا منوسیتوژنز در نمونه های ادرار بیماران مراجعه کننده به پزشک متخصص زنان و زایمان در دو شهر لار و جهرم به کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از پروب فلوروستی بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: پژوهش حاضر به صورت مقطعی-توصیفی با محاسبه فرمول کوکران، بر روی ۱۰۰ بیمار که به صورت تصادفی به کلینیک تخصصی زنان و زایمان در دو شهر لارستان و جهرم مراجعه نموده بودند، پس از تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه و اعلام رضایت کتبی از بیماران انجام شد. در تمامی موارد نمونه ادرار اول تخلیه شده جمع آوری و اطلاعات مربوط به نمونه ها در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه های شهرستان لارستان بلافاصله با حفظ شرایط نگهداری سرد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شهرستان گراش و نمونه های شهرستان جهرم به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم منتقل شدند.

ب) استخراج DNA ژنومی: برای این منظور ابتدا ۱۰ میلی لیتر از ادرار سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده در ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالیلین حل و در لوله های اپندورف نگهداری شد. برای استخراج DNA ژنومی از کیت تجاری شرکت کیاژن (Kiagen) آلمان مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

ج) طراحی پروب و پرایمر: به منظور بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلی مرز از سویه استاندارد لیستریا منوسیتوژنز خریداری شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور فرانسه (CIP32110) استفاده گردید. از توالی اختصاصی ژن *hlyA* دارای ۱۵۹۰ جفت باز، برای ردیابی باکتری مورد نظر استفاده شد. طراحی پرایمرها (آغازگر) و پروب (نشانگر) ژن اختصاصی با نرم افزار vector NTI نسخه ۱۱ انجام شد. توالی نشانگر 5'AGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGCGTCT (RTQ-1)3' و توالی پرایمر جلویی 5'CATCTCCGCCTGCAAGTCC3' طراحی و پرایمر

درون سلولی باکتری، حساسیت کشت به شدت کاهش می یابد. نکته دیگر این که روش کشت بیشتر از ۳۶ ساعت طول می کشد (۲ و ۷). روش های دیگر تشخیص شامل آزمون ایمونواسی (Immunoassay)، هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیک، فاژ تایپینگ و واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) می باشد. با این حال ضرورت استفاده از روش جداسازی مطلوب وجود دارد (۸).

Real time PCR روشی پیشرفته تر از واکنش زنجیره ای پلی مرز است که ردیابی سریع محصول واکنش با حداقل نمونه و اندازه گیری کمی DNA در نمونه های بالینی را آسان می سازد (۹). این روش بر مبنای فلوروست تولیدی از مولکول گزارشگر می باشد که در طول واکنش افزایش می یابد (۱۰ و ۱۱). پروب های تگمن (TaqMan) (۱۰) و بیکون مولکولی (Molecular Beacon) مورد استفاده در این روش می تواند ردیابی حساس و اختصاصی را امکان پذیر سازند (۱۱ و ۱۲). اما به دلیل هزینه زیاد تهیه دستگاه های ترموسایکلر Real time PCR، بسیاری از آزمایشگاه ها از خرید آن امتنا می کنند.

شرکت DNA تکنولوژی، فلورومتر ساده ای را ارائه نموده است که پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز در ترموسایکلر معمولی، با قرار دادن لوله های واکنش در دستگاه ردیاب فلوروست، بدون باز کردن در لوله ها، می توان فلوروست ایجاد شده را تعیین نمود. در واقع ردیابی در پایان واکنش انجام می شود. روش ردیابی فلوروست در نقطه پایان واکنش (End Point Detection) که با این دستگاه سنجیده می شود، روش FLASH (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization) نامیده شده است. به دلیل استفاده از پروب فلوروستی، این روش ردیابی از اختصاصیت و حساسیت لازم برخوردار است و به جای استفاده از الکتروفورز که دارای حساسیت و اختصاصیت کمتر همراه با گسترش آلودگی آمپلیکون ها است، در آزمایشگاه های تحقیقاتی و طبی می تواند به خوبی مورد استفاده قرار گیرد (۱۷-۱۳).

در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس، و در ادامه ۴۵ چرخه شامل واسرشت شدن ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس، اتصال و طولیل شدن ۱ دقیقه در دمای ۶۳ درجه سلیسیوس انجام گرفت. پس از اتمام واکنش، لوله ها را به دستگاه ردیاب فلوروستی شرکت DNA تکنولوژی (مدل Gene-2) (شکل ۱) انتقال داده و میزان فلوروسنت ایجاد شده با نرم افزار Gene مرتبط با این دستگاه تعیین گردید (شکل ۲). نمونه های مثبت که با روش FLASH مشخص گردیدند، به ژل الکتروفورز انتقال داده شدند و از نظر انجام شدن واکنش افزایش ژن و وجود باندهای مربوط به ژن *hlyA* تأیید گردیدند (شکل ۳).

ه) *آزمون آماری:* به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه پانزدهم نرم افزار SPSS و آزمون های مربع کای، مک نمار، کاپا و اتا استفاده شد. مرز معنی داری بر روی $p < 0/05$ قرار داده شد.

یافته ها

در این مطالعه حداقل سن افراد شرکت کننده ۱۹ و حداکثر ۴۹ سال بود. همچنین میانگین سنی افراد ۳۰ سال با انحراف معیار ۷/۰۳۸ بود. گروه سنی ۱۹-۲۹ سال بیشترین فراوانی را داشتند. ۳۶ نفر (۳۶٪) از افراد تحت بررسی قبلاً عفونت واژن، ۶ نفر (۶٪) سابقه سقط جنین و ۱ نفر (۱٪) سابقه حاملگی خارج رحمی داشته اند.

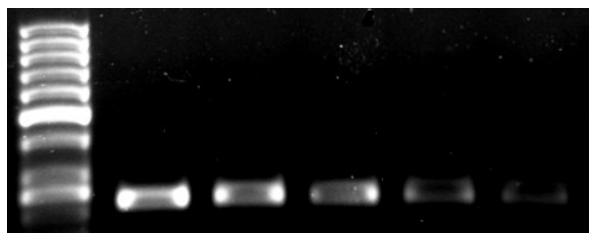


شکل ۱: دستگاه ردیاب فلوروست.

برگشتی '5'TTGGCGGCACATTTGTCCTG3' از مقاله محققین (۷ و ۳۰) با شماره دسترسی (U25443, U25446, U25449, U25452) در سایت بانک ژن انتخاب گردید. طول قطعه انتخاب شده ۱۴۲ جفت باز (موقعیت ۱۲۸ تا ۲۷۰ توالی ژن *hlyA*) بود. به منظور دستیابی به حداکثر فلوروسنت تولیدی و کمترین میزان فلوروسنت پس زمینه و افزایش ویژگی، پروب هیبریداسیون با ساختار سنجاق سری دارای فلوروفور (fluorophore) و خاموش کننده (quencher) طراحی شد. و در واقع این نوع پروب ها بیکن مولکولی می باشند.

د) *واکنش زنجیره ای پلی مرز:* این مرحله در بخش زیست شناسی مولکولی انستیتو پاستور ایران با روش شروع داغ (Hot Start) انجام شد. حجم نهایی مورد استفاده در واکنش، ۳۵ میکرولیتر بود. برای این حجم ابتدا مقدار ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer شرکت بایوبیز (Biobiz)، ۳ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر از نشانگر اختصاصی ژن لیستریا دارای فلوروفور FAM، ۳/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر و نشانگر اختصاصی ژن *GAPDH* دارای فلوروفور HEX به عنوان کنترل داخلی (به منظور ارزیابی اثر تهیه نمونه اسید نوکلئیک و واکنش PCR)، ۰/۳ از آلومین سرم گاوی و ۷/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به خوبی مخلوط شدند. در ادامه ۱۰ میکرولیتر پارافین گرم شده در دمای ۷۵ درجه سلیسیوس به آرامی بر روی مخلوط یاد شده در لوله ریخته شد. سپس بر روی پارافین قسمت بالایی، آنزیم Taq DNA polymerase به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، ۴/۵ میکرولیتر از DNA ژنومی و ۱۰ میکرولیتر از PCR buffer 1X شرکت بایوبیز (Biobiz) اضافه شد.

در نمونه کنترل منفی، از آب مقطر به جای الگوی DNA استفاده شد. همچنین دو لوله شاهد (Blank) با شرایط برابر نسبت به لوله تست، اما بدون آنزیم Taq DNA polymerase استفاده گردید. برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر (گرادیان، شرکت اپندورف، آلمان) با زمان ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه



شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *hlyA* (۱۴۲ جفت باز).

Gene مربوط به دستگاه ردیاب فلوروسنت را نشان می دهد. با آزمون اتا مشخص شد که رابطه معنی داری بین سن و حضور لیستریا در ادرار زنان وجود ندارد. با تقسیم دوره جنسی به سه بخش ابتدا، میانه و انتها، مشخص گردید که بیشترین افراد دارای عفونت لیستریا، در میانه و انتهای دوره جنسی خود بودند. اما این ارتباط از نظر آماری معنی دار نبود.

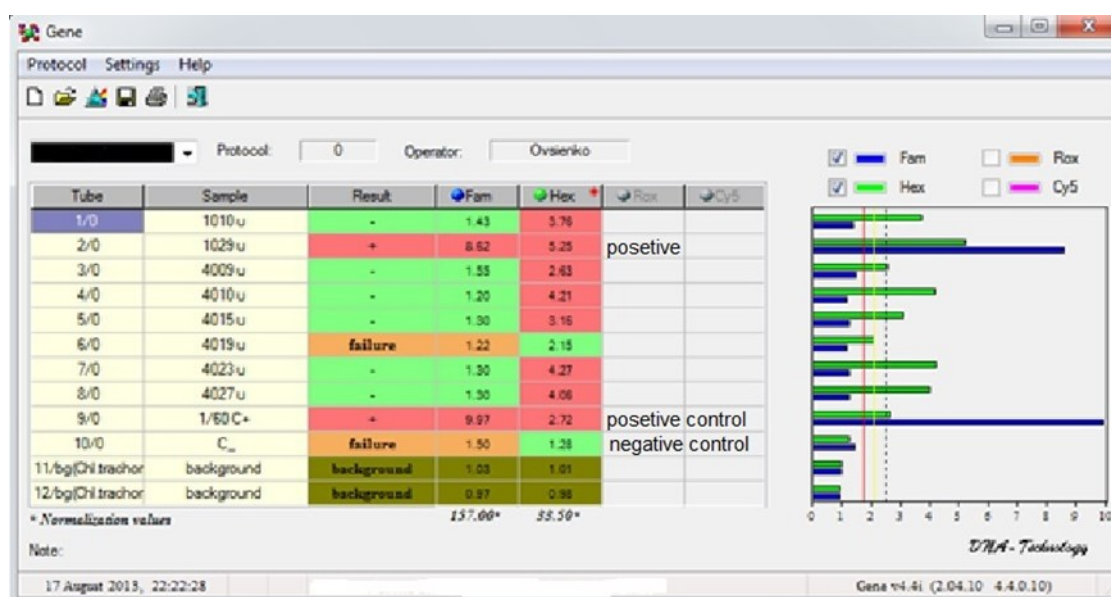
بحث

در مطالعه حاضر روشی برای تشخیص سریع و آسان لیستریا منوسیتوژنز در ادرار به کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز و با استفاده از پروب فلوروسنتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این روش علاوه بر راحتی و سرعت بالا، از

با آزمون رقت های محلول ژنوم لیستریا منوسیتوژنز، سنجش (Fluorescent Amplification based FLASH-PCR) Specific Hybridization-PCR) بازه ردیابی ۵ تا ۱۰ ژن باکتری لیستریا منوسیتوژنز در واکنش شناسایی شد. از ۱۰۰ نمونه ادرار مورد بررسی، ۳۰ نمونه (۳۰٪) حاوی ژن *hlyA* لیستریا منوسیتوژنز بود. از این میان ۱۲ نمونه (۴۰٪) مربوط به شهر لار و ۱۸ نمونه (۶۰٪) مربوط به شهر جهرم بودند (جدول ۱).

از تمامی مراجعه کنندگان به پزشک متخصص، معاینه و بررسی واژن صورت گرفت. پزشک با مشاهده و بررسی واژن و علائم ظاهری در مورد افراد مثبت از نظر عفونت لیستریا که با آزمون آزمایشگاهی تعیین شدند، ۱۳ مورد (۴۳/۳۳٪) عدم مشاهده علائم بالینی، ۱۲ مورد (۴۰٪) عفونت قارچی، ۳ مورد (۳٪) عفونت باکتریایی غیر از لیستریا، ۱ مورد (۱٪) عفونت ویروسی و ۱ مورد (۱٪) عفونت انگلی گزارش کردند. در مجموع در این مطالعه تشخیص بالینی پزشک متخصص با نوع بیماری ردیابی شده با روش تشخیص آزمایشگاهی مطابقت نداشت.

شکل ۲ ارزیابی تعدادی از نمونه های بالینی را با نرم افزار



شکل ۲: نتایج روش FLASH-PCR نرم افزار Gene مربوط به دستگاه ردیاب فلوروسنت. نمونه ادرار شماره 1029 μ مثبت شده است.

جدول ۱: مقایسه نتایج به دست آمده از دو شهر لارستان و جهرم.

شهر	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه مثبت	درصد نمونه مثبت	میانگین سنی افراد (سال)	عفونت قبلی و وزن	سابقه سقط جنین
لارستان	۵۰	۱۲	۲۴٪	۲۹	۱۵	۲
جهرم	۵۰	۱۸	۳۶٪	۳۲	۲۱	۴

می تواند منجر به بروز نتایج کاذب گردد (۸). روش های میکروب شناسی موجود شامل رشد باکتری بر روی محیط کشت، جداسازی، آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیک می باشد. با این وجود ردیابی لیستریا منوسیتوژنز در نمونه ها با روش های استاندارد کشت نیز مشکل است. آلودگی تک گیر مواد غذایی، سطوح پایین آلودگی، حضور میکروفلور زیاد یا ارگانیزم رقیب از مواردی هستند که تشخیص باکتری بر روی محیط کشت را با مشکل مواجه می کنند. این روش ها زمان بر بوده و حداقل به ۵ روز برای تشخیص لیستریا منوسیتوژنز (با آزمون های تأییدی) نیاز دارد. در حالی که در صورت بروز برخی از موارد آلودگی به عملکرد فوری نیاز است. به علاوه این روش ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه به مقدار زیاد باکتری های دیگر به دلیل تداخل در رشد لیستریا منوسیتوژنز منجر به ایجاد نتایج منفی نیز گردد (۲۴).

به دنبال پیشرفت های جدید در روش های مولکولی امکان انتخاب ژن های اختصاصی لیستریا منوسیتوژنز و تفکیک آن باکتری از سایر گونه ها وجود دارد (۸). شواهد موجود نشان می دهد که استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز می تواند با دقت بیش از ۹۰ درصد وجود لیستریا منوسیتوژنز را تایید نماید (۲۵). مطالعات واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی لیستریا از سال ۱۹۹۲ با تحقیق بونرت (Bohnert) و همکاران و با استفاده از ژن اختصاصی *hlyA* آغاز گردید (۲۶). هدف اصلی در تمام موارد، بهبود حساسیت واکنش زنجیره ای پلی مرز است. اما بیشترین اطلاعات گزارش شده در مورد افزایش دقت روش واکنش زنجیره ای پلی مرز، به اختصاصیت و حساسیت پرایمر مربوط می شود (۲۷).

روش Real time PCR با استفاده از پروب های جدید

حساسیت و دقت لازم نیز برخوردار و جایگزین مناسب الکتروفورز می باشد. همچنین در این مطالعه ۳۰٪ از کل نمونه های جمع آوری شده حاوی ژن *hlyA* لیستریا بودند. به طور معمول عفونت ایجاد شده به وسیله لیستریا فاقد علامت است. بنابراین به موقع تشخیص داده نمی شود تا درمان آنتی بیوتیکی مفید واقع گردد. در پژوهش حاضر نیز گزارش بالینی پزشک متخصص زنان و زایمان پس از معاینه بیمار، این مساله را تأیید می نماید. زیرا در هیچ یک از بیماران با معاینه بالینی، بیماری لیستریوز تشخیص داده نشد. اغلب اولین علامت شیوع بیماری، تولد نوزاد مرده یا عفونت شدید در بزرگسالان حساس می باشد. به همین دلیل، حداقل ۵ تا ۱۰٪ از بزرگسالان، ناقلین بدون علامت لیستریا منوسیتوژنز هستند (۲). حدود یک سوم از لیستریوز گزارش شده در انسان در دوران بارداری اتفاق می افتد، که ممکن است منجر به سقط خودبه خودی در سه ماهه دوم و سوم بارداری شود (۱۸ و ۱۹).

از سوی دیگر احتمال بروز اپیدمی های لیستریوز در جمعیت های مختلف و پراکندگی آن در فرآورده های گوناگون غذایی نیز مطرح می باشد (۸ و ۲۰). میزان مرگ و میر ناشی از لیستریا در بین عوامل بیماری زای منتقل شونده از طریق غذا بالاترین است. به طوری که گاهی بیش از ۵۰ درصد نیز گزارش شده است (۲۱-۲۳). تخمین زده شده است سالیانه در آمریکا لیستریوز موجب ۱۶۰۰ مورد بیماری، ۱۴۵۵ مورد بستری در بیمارستان و ۲۴۵ مورد مرگ می گردد (۲۳). روش های اولیه شناسایی لیستریا منوسیتوژنز بر مبنای ویژگی های فنوتیپی شامل ویژگی های بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتریوفاژی استوار است. اما به دلیل وجود برخی جهش ها

منظور تعیین میزان حساسیت تشخیص لیستریا منوسیتوژنز با استفاده از رنگ سایبر گرین و پروب تگمن استفاده نمودند. یافته های آنها نشان داد که میزان ردیابی لیستریا با روش Real time PCR در نمونه شیر معادل $3/16 \times 10^0$ تا $3/16 \times 10^5$ نسخه در هر واکنش بوده است (۱۰). در مطالعه شایان (Shayan) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در تهران از مجموع ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده، با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز ۳۶ مورد ژن لیستریا منوسیتوژنز تشخیص داده شد (۳۰).

اسلامی (Eslami) و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرز به بررسی لیستریا منوسیتوژنز در زنان با سقط جنین خودبخودی پرداختند. آنها در روش کشت از ۹۶ نمونه ۷ نمونه مثبت و در روش مولکولی ۱۲ مورد حضور ژن *actA* را تشخیص دادند. این یافته نشان دهنده حساسیت روش مولکولی نسبت به کشت می باشد (۳۱). ویژگی کلیدی روش FLASH در مقایسه با روش PCR، استفاده از پروب های هیبریداسیون با ساختار سنجاق سری دارای مولکول فلوروفور و کوئنچر است که در طول واکنش با فعالیت 5' نوکلئازی DNA پلی مرز هیدرولیز و فلوروفور از کوئنچر آزاد می شود. بنابراین فلوروسنت تولیدی توسط دستگاه ردیاب به صورت کیفی تعیین می گردد.

در تحقیقی که ایمانی فولادی (Imani Fooladi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تهران انجام دادند، از روش FLASH-PCR به منظور بررسی میکوباکتریوم توبرکلوسیس و مقایسه روش استاندارد کشت و مشاهده لام میکروسکوپی استفاده کردند. در مطالعه آنها حساسیت و اختصاصیت روش FLASH-PCR در ردیابی باکتری به ترتیب ۹۳/۳۳٪ و ۹۲/۵۰٪ تعیین گردید. در مجموع ۱۱/۷٪ از موارد مثبت با روش FLASH-PCR، ۵/۸٪ با روش کشت و ۴/۳٪ با اسمیر میکروسکوپی مشخص گردید. یافته های آنها نشان داد که تشخیص میکوباکتریوم توبرکلوسیس با روش FLASH-PCR در مقایسه با روش کشت و اسمیر به طور معناداری از سرعت و حساسیت بیشتری برخوردار است (۱۴). خاتمی (Khatami) و همکاران در سال ۲۰۱۲ از روش FLASH-PCR به منظور ردیابی اشریشیا کلی

فلوروستنتی، ردیابی حساس تر و اختصاصی تری را نسبت به واکنش زنجیره ای پلی مرز معمولی میسر می سازد (۱۰). هر چند از سال ۲۰۰۱ میلادی تاکنون پرایمرهایی برای ژن *hlyA* معرفی گردیده است، اما دستورالعمل ارائه شده برای واکنش زنجیره ای پلی مرز با این پرایمرها بیشتر برای دستگاه های جدید مانند Real time PCR می باشد. همچنین به منظور افزایش حساسیت آزمایش از پروب استفاده نموده اند. اما به دلیل عدم وجود گسترده این دستگاه ها در کشور ما، انجام این روش ها امکان پذیر نمی باشد (۷).

نتایج این تحقیق نشان داد که ردیابی ژن *hlyA* لیستریا منوسیتوژنز در نمونه های ادرار زنان از حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار است. همان گونه که نجفی (Najafi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ به ارزیابی روش واکنش زنجیره ای پلی مرز با انتخاب ژن اختصاصی *hlyA* لیستریا بدون استفاده از پروب پرداختند. آنها با بررسی نتایج آزمایشات مختلف با ژنوم باکتری های دیگر، غیر از لیستریا منوسیتوژنز نشان دادند که پرایمر طراحی شده برای ژن *hlyA* با هیچ یک از آنها واکنش نشان نمی دهد (۷). کارگر (Kargar) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مرودشت با استفاده از ژن *hlyA* لیستریا منوسیتوژنز به بررسی این باکتری در پنییر تازه پرداختند. نتایج آنها نشان داد که از مجموع ۴۲۸ نمونه، در ۵۶ مورد (۱۳/۱٪) حضور ژن لیستریا تایید گردید (۲۸).

اوراوکووا (Oravcova) و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش Real time PCR و طراحی پروب فلوروستنتی تگمن برای ردیابی ژن *actA* به مقایسه این روش با واکنش زنجیره ای پلی مرز متداول پرداختند (۲۹). کاتور (Kaur) و همکاران در سال ۲۰۰۷ به جستجوی لیستریا منوسیتوژنز در نمونه های خون، ادرار، جفت، سواب واژن و مقعد پرداختند. آنها با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز تنها در ۳ مورد ژن های بیماری زا را جداسازی نمودند (۱۹). مطالعه حاضر از نظر نمونه ادرار و استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز با این تحقیق مشابهت دارد.

دادخواه (Dadkhah) و همکاران از روش Real time PCR به

بهداشت و درمان توصیه می گردد. همچنین لازم است پزشکان متخصص زنان علاوه بر معاینه بالینی بیمار قبل از اقدام به درمان دارویی، مبادرت به ارجاع بیمار به آزمایشگاه جهت آزمایش تشخیصی نمایند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که برای شناسایی مولکولی لیستریا، پروب فلورستی سرعت، حساسیت و ویژگی بالایی دارد و می تواند جایگزین مناسبی برای الکتروفورز باشد. با توجه به دقت و غیر تهاجمی بودن این روش، انجام مطالعات گسترده تر به منظور پایش لیستریا در نمونه های بالینی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از بخش زیست شناسی مولکولی انستیتو پاستور ایران، مرکز تخصصی زنان و زایمان شهرستان لارستان و جهرم، مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی امام صادق (ع) گراش و دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

سویه O157:H7 استفاده کردند. یافته های آنها نشان داد که این روش از حساسیت و سرعت بالایی برخوردار است و به دلیل باز نشدن درب لوله های واکنش پس از انجام PCR، از آلودگی آمپلیکون ها جلوگیری نموده و جایگزین مناسبی برای الکتروفورز می باشد (۱۵). این مساله با پژوهش ما هم خوانی دارد.

لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده با روش FLASH-PCR بدون نیاز به تجهیزات گران قیمت، در مدت چند ساعت قابل انجام است (۱۴ و ۳۲). از سوی دیگر، این روش خطر آلودگی قطعات تکثیر شده را کاهش می دهد. در حالی که آلودگی در تشخیص با روش الکتروفورز اجتناب ناپذیر است (۱۵ و ۳۳). پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی علاوه بر نمونه ادرار از نمونه های دیگر بالینی نیز استفاده شود و حساسیت روش FLASH-PCR مورد بررسی قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می گردد علاوه بر ژن *hlyA* ژن های دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گیرند. به نظر می رسد لیستریا در شهر لار و جهرم از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار می باشد. بنابراین مطالعه ای وسیع به منظور ارزیابی شیوع از سوی وزارت

References

1. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. *Listeria* and *Erysipelothrix*. Man Clin Microbiol. 2003; 1: 4619.
2. Salirs A, Wait D. Molecular mechanism of bacterial pathogenesis. Norozi J, Kagar M. Tehran, Jafari Press. 2008. [In Persian]
3. Narratilova P, Schlegelova J, Sustackova A, Napravnikova E, Lukasova J, Klimiva E. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. Vet Med Czech. 2004; 49: 243-252.
4. Rahimi E, Behzadnia A, Shakerian A, Momtaz H. Frequency of *Listeria* species from raw milk, traditional cheese and ice-cream in Shahrekord and Shiraz. J Microbial World. 2010; 2 (4): 34-45. [In Persian]
5. Orndorff P, Hamrick T, Smoak I, Havell E. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Vet Microbiol. 2006; 114 (12): 115.

6. Herman L, Block J, Moermans R. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 2: 817-819.
7. Njafi A, Ghorbanali Zadegan M, Tavakkoli H, Ahmadi A. Molecular rapid detection *Listeria monocytogenes* with used *hlyA*. *IMM J.* 2009; 3: 9-14. [In Persian]
8. Jahangirisiskht A, Kargar M, Mirzaee M, Aramesh SH, Akbartabar M, Mohamadkhani N, Rezaee Z. Comparison the standard culture method and PCR in diagnosis of *Listeria monocytogenes* in pregnant women. *Armaghane Danesh, Yasuj Uni Med Sci J.* 2012; 3: 12-19. [In Persian]
9. Jerome K, Huang M, Wald A, Selke S, Corey L. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 3: 2609-2611.
10. Dadkhah H, Bassami M, Hashemi S, Shahraz F, Hosseini H, Kimon Andreas G, Karatzas R. Evaluation and comparison of SYBR Green I Real-Time PCR and TaqMan Real-Time RCR methods for quantitative assay of *Listeria monocytogenes* in nutrient broth and milk. *Afr J Microbiol Res.* 2012; 6(9): 1908-1917.
11. Espy M, Hull J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, Yao J, Wengenack N, Rosenblatt J. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 4: 165-256.
12. Tyagi S, Kramer F. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 2012; 14: 303-308.
13. Saadatmandzadeh M, Eshghi H, Rahimizadeh M, Sankian M, Jamehdar SA. Detection of *Clostridium tetani* by fluorescent amplification based specific hybridization. *Afr J Microbiol Res.* 2011; 5(30): 5489-5492.
14. Imani Fooladi A, Tarvedi zadeh Y, Mehrab R, Halabian R, Azizi T. Evaluation of FLASH – PCR for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens. *Iran J Microbiol.* 2013; 5(4): 383-339.
15. Khatami F, Heidari M, Khatami M. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by fluorescent amplification–based specific hybridization (FLASH) PCR. *Iran Red Crescent Med J.* 2012; 14(9): 511-517.
16. Abramova S, Ryazantsev D, Voinova T, Zavriev S. Diagnostics of phytopathogen fungi; *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* by fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH) PCR. *Bioorg Khim.* 2008; 34: 97-102.

17. Ryazantsev D, Zavriev S. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Mol Biol.* 2009; 43(3): 515-523.
18. Centre for Disease Control and Prevention. Listeriosis. Coordinating Center for Infectious Diseases / Division of Bacterial and Mycotic Diseases, CDC, Atlanta, GA 30033. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm#greatrisk. (Assessed 20 November, 2006).
19. Kaur S, Malik S, Vaidya V, Barbuddhe S. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 2007; 5: 1364-1372.
20. Tavakkoli H, Ghorbanalizadegan M, Najafi A, Akhodzadeb-asti A, Khaksar R. Contamination of smoked fish prepared by traditional methods for *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp in Iran. *J Infect Dis Trop Med.* 2008; 42: 61-67.
21. Lindbäck T, Secic I, Rørvik L. A Contingency locus in *prfA* in a *Listeria monocytogenes* subgroup allows reactivation of the PrfA virulence regulator during infection in mice. *Appl. Environ Microbiol.* 2011; 77: 3478-3483.
22. Bhunia A. Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. NY: Springer, New York. 2008; pp: 165-182.
23. Eruteya O, Odunfa S. Species and virulence determination of *Listeria monocytogenes* isolated from goat meat in Port Harcourt, Nigeria. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014; 3(5): 32-39.
24. Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, Brandi G, Magnani M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Cont.* 2007; 18: 113742.
25. Park Y, Lee S, Kim Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J Microbiol.* 2006; 44(1): 92-97.
26. Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol.* 1992; 143(3): 27180.
27. Aznar R, Alarcón B, PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(5): 95866.
28. Kargar M, Ghasemi A. Role of *Listeria monocytogenes hlyA* gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. *Iran J Clin Infect Dis.* 2009; 4(4): 214-218.

29. Oravcova' K, Kaclic'kova' E, Krascenicsova' K, Pangallo D, Brez'na' B, Siekel P, Kuchta T. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. Letters Appl Microbiol. 2006; 42: 15-18.
30. Shayan R, Satari M, Ferozande M. Isolated and detection of *Listeria monocytogenes* in vaginal specimens by PCR. J Modares Med Sci. 2009; 12: 51-58. [In Persian]
31. Eslami G, Samadi R, Taherpor A, Baseri N. Detection of *actA* and *inlB* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from women with spontaneous abortions. Novelty Biomedicine. 2014; 2: 18-21. [In Persian]
32. Ryazantsev D, Abramova S, Evstratova S, Gagkaeva T, Zavriev S. FLASH-PCR diagnostics of toxigenic fungi of the genus *Fusarium*. Bioorg Khim. 2008; 34: 716-724.
33. Abramova S, Ryazantsev D, Voinova T, Zavriev S. Diagnostics of phytopathogen fungi; *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* by fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH) PCR. Bioorg Khim. 2008; 34: 97-102.



A fast and easy detection for *Listeria monocytogenes* in urine of women using polymerase chain reaction and fluorescent probes *hlyA* gene

Mohammad Sobhani Lari¹, Nader Shahrokhi², Mohammad Kargar³

¹MS.c., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²Associate Professor, Department of Molecular Biology, Microbiology Group, Pasteur Institute, Tehran, Iran.

³Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Listeria monocytogenes* is one of the etiologic causes of asymptomatic infection that can cause urogenital tract infection in infants and fetal death. Given the challenges posed by growing the bacteria, this study aimed to detect *Listeria* in urine using polymerase chain reaction and fluorescent probes.

Materials & Methods: This cross-sectional study was carried out on 100 urine samples obtained from the patients who were referred to a specialized center for women in Jahrom and Larestan. The sensitivity of the technique was evaluated using a standard strain. Then *hlyA* gene probes were designed using the polymerase chain reaction, and fluorescence level was determined by fluorescent probes.

Results: Based on FLASH-PCR assay between 5 to 10 genes were detected in each reaction. Using fluorescent probes for *L. monocytogenes hlyA* gene overall, 30 out of 100 clinical samples (30%) were infected to this bacterium.

Conclusion: The results showed that fluorescent probe increase speed, sensitivity and specificity of the molecular identification of *Listeria* and therefore it can be a suitable alternative to electrophoresis. Thus, with respect to the accuracy of this non-invasive method it is possible to monitor larger amounts of samples suspected to *L. monocytogenes* infections.

Keywords: *Listeria*, Urine, Fluorescent probe.

Correspondence to: Mohammad Sobhani Lari

Tel: +989177827941

E-mail: payamsobhani@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(3): 214-224.