مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره‌های۲ و۳ تابستان و پائیز ۱۳۸۸، صفحات ۱۴- ۹

تشخیص سریع مولکولی *لیستریامنوسیتوژنز* به روش PCR با استفاده از ژن *hlyA*

علی نجفی[۱]، مهدی قربانعلی زادگان[۱] ، حمید رضا توکلی[۲*]، علی احمدی[۱]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج).
۲)گروه تغذیه مرکز تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج).
نویسنده رابط: گروه تغذیه مرکز تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج).
همراه:۰۹۱۲۲۳۹۳۳۱۹ h.tavakoli1344@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۱/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله :۸۸/۱۲/۱۴

چکیده:

زمینه و اهداف: در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* کشت می‌باشد. به علت این که در خوراک دام از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود و این باکتری داخل سلولی می‌باشد حساسیت کشت به شدت کاهش می‌یابد. به‌علاوه، تشخیص با این روش بیشتر از ۳۶ ساعت طول می‌کشد. لذا، دست‌یابی به آزمونی که بتواند در هر شرایطی وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* را در نمونه بالینی نشان دهد، ارزشمند می‌باشد. هدف این مطالعه تشخیص سریع مولکولی *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش PCR با استفاده از ژن *hlyA* بود.

روش بررسی: ژن *hlyA* به عنوان ژن اختصاصی برای شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* انتخاب گردید. به منظور بهینه سازی آزمایش از سویه استاندارد *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC: 1163 استفاده شد. برای بررسی اختصاصیت از باکتری‌های *سالمونلا تیفی* PTCC: 1609 ، *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC: 1163 و *اشریشیاکلی* ATCC: 35218، استفاده شد. برای استخراج DNA از روش فنل – کلروفرم استفاده شد و محصول ۲۱۰ bp پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ در دمای اتاق با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد شناسایی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که سویه استاندارد محصول مورد نظر را تولید می‌نماید. در حقیقت، جفت پرایمر انتخاب شده محصولی در اندازه 210 bP تولید می‌کند. آزمایش اختصاصیت نشان داد که روش حاضر با هیچ یک از باکتری‌های غیرهدف واکنش نشان نمی‌دهد. بررسی حساسیت نشان داد که حد نهایی تشخیص DNA *لیستریا مونوسیتوژنز* در این روش ۵۰۰fg می‌باشد.

نتیجه گیری : نتایج بهینه سازی نشان داد که روش PCR به‌کار رفته در این مطالعه از سرعت، حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار است و نتیجهٔ نهایی در کمتر از سه ساعت بدست می‌آید. به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌ها تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* را امکان پذیر می‌نماید.

کلید واژه ها: *لیستریامونوسیتوژنز* ، PCR ، ژن *hlyA*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

لیستریوز بیماری مشترک انسان و حیوان است که عامل آن *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد. علت نامگذاری این باکتری ازدیاد تعداد مونوسیت‌ها درحیوانات آلوده آزمایشگاهی بوده است. لیستریا باسیل‌های گرم مثبت کوتاه، بدون کپسول، بدون اسپور، کاتالاز و اکسیداز مثبت هستند(۱). *لیستریا مونوسیتوژنز* دربسیاری ازمحیط‌های کشت مانند مولرهینتون آگار و آگارخوندار به خوبی رشد می‌کند و قادر به ایجاد همولیز بتا درآگارخوندار است. لذا، ممکن است با استربتوکوک‌های بتا همولیتیک اشتباه گردد. این باکتری قادر به رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است (cold enrichment). علاوه بر خصوصیات ذکر شده *لیستریا مونوسیتوژنز* گلوکز، امنوز، هیپورات، متیل رد و وژه پروسکوئر مثبت است ولی H2S ، احیای نیترات ، مانیتول ، ریبوز ، نشاسته ، زایلوز ، ترب ژلاتین ،اندول و اوره آز آن منفی است(۲).

در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص لیستریا *مونوسیتوژنز*، کشت می‌باشد. به علت این که در خوراک دام ازآنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود، و این باکتری درون سلولی می‌باشد، حساسیت کشت به شدت کاهش می‌یابد. به علاوه، تشخیص با این روش بیشتر از ۳۶ ساعت طول می‌کشد. لذا، دست‌یابی به آزمونی که بتواند در هر شرایطی وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* را در نمونه بالینی نشان دهد، ارزشمند می‌باشد. از مهم‌ترین این آزمون‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) را می‌توان نام برد(۳). زیرا، تحت تأثیر درمان آنتی‌بیوتیکی، نحوه انتقال نمونه که سبب مرگ باکتری می‌شود قرار نمی‌گیرد، و حساسیت آن بیش از ۹۰ درصد گزارش شده‌است (۵،۴). از این‌رو، مراکز مختلف تحقیقاتی و درمانی مبادرت به طراحی، ارزیابی و کاربرد واکنش PCR برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* نموده‌اند. به‌طوری با معرفی روش‌های پیشرفته قادر به تشخیص همزمان و سریع چند عامل می‌باشند(۶).

از سوی دیگر احتمال بروز اپیدمی‌های لیستروز در جمعیت‌های مختلف و پراکندگی فراوان آن در فراورده‌های گوناگون غذائی (۷)هم مطرح است. لذا، در سال‌های اخیر نظر به ضرورت تشخیص سریع این بیماری و استفاده از فنآوری‌های ژنی و ظهور PCR، امیدهایی در تشخیص سریع *لیستریا مونوسیتوژنز* به وجود آمد(۶ ،۸).

شواهد موجود مؤید آن است که استفاده از PCR توانسته است با دقت بیش از۹۰٪ وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان دهد(۸). از این رو، هدف از این مطالعه، طراحی روش PCR برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* ابود. به طوری که به وسیله آن بتوان این باکتری را سریع‌تر شناسایی نمود.

مواد و روش‌ها:

سالمونلا تیفی PTCC: 1609 ، *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC: 1163 و اشریشیا کلی ATCC: 35218، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و محیط‌های کشت‌های LB broth و LB agar از شرکت Merck تهیه گردیدند.

روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید: توانایی روش الکتروفورز، در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد. لذا، نمونه خالص شده از محیط کشت به صورت رقت سریال ۱/۲ تا ۱/۸۰رقیق گردید و ضعیف‌ترین باند انتخاب شد(۹).

روش تخمین مقدار DNA بر اساس تعداد باکتری (CFU): از آنجایی که هر باکتری دارای یک کروموزوم است و در صورتی که کشت داده شده هر باکتری قادر به تولید یک کلنی می‌باشد. از سوسپانسیون باکتری رقت تهیه گردید و بر اساس روش Misra& Miles میزان باکتری در واحد حجم بر اساس CFU تخمین زده شد(۹).

پرایمر: پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص *لیستریامونوسیتوژ* استفاده شده بود، تمام ژن‌ها و پرایمرهای استفاده شده ، مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای مربوط به ژن *hlyA* , انتخاب و بررسی شدند. بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزارملکولی BLAST پرایمرمطلوبی که مشخصات آن در جدول ۱ ذکر شده است برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* انتخاب گردید(۸). بررسی نرم افزار مولکولی این ژن و پرایمرهای ارایه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن *hlyA* مناسب ترین توالی برای شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: سکانس پرایمر انتخاب شده به منظور تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز*

Primers	Sequences
Forward	5′-CGCAACAAACTGAAGCAAAGG-3′
Reverse	5′-TTGGCGGCACATTTGTCAC-3′(210bp)

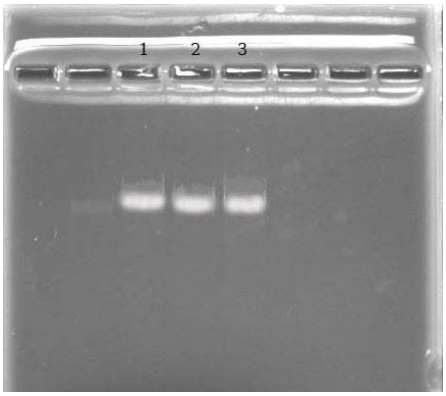
استخراج ژنوم: برای استخراج ژنوم از روش فنل‌کلروفرم استفاده شد. به‌این ترتیب که برای پیاده کردن (set up) آزمایش PCR ابتدا چند کلنی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و سانتریفوژ گردید (۵۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه). به روسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris EDTA افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه مخلوط نمودن آن ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد به‌آن اضافه گردید. پس از آن ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم به‌آن افزوده شد و ۱۰ بار به شدت تکان داده شد. سپس در ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و به محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. پس از نگهداری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منهای ۲۰ درجه سانتریفوژ شد (۱۵۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد). به روسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به‌خوبی مخلوط گردید. به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. به روسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه شد و جهت انجام PCR استفاده گردید.

بهینه سازی مواد لازم برای واکنش **PCR** : برای رسیدن به این هدف چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه‌های استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها ،MgCl2، dNTP و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده شد. در نهایت مناسب‌ترین مقادیر از مواد لازم برای انجام PCR انتخاب گردیدند. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها (Annealing) از درجه حرارت‌های ۵۶ ، ۵۷ ، ۵۸ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

تائید محصول: جهت تائید نهائی محصول بدست آمده، برای تعیین توالی، به شرکت سینا ژن ارسال گردید.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از استخراج ژنوم در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آزمایش دماها، زمان‌ها و غلظت‌های مختلف مواد مصرفی برای دستیابی به بهترین نتیجهٔ PCR در ناحیهٔ bp ۲۱۰ در جدول ۲ نشان ارائه شده است.



شکل ۱: نتایج حاصل از استخراج ژنوم

۱- ژنوم *سالمونلا تیفی*، ۲- *ژنوم لیستریامونوسیتوژنز* و ۳- ژنوم *اشرشیا کلی*

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: شرایط نهائی شده مطلوب برای دستیابی به بهترین نتیجهٔ PCR

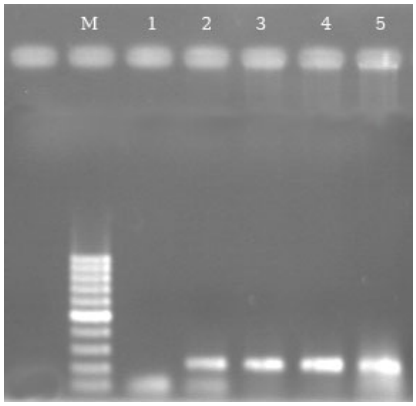
Amplification Condition	
Reaction mixture	
Primer concentration	10 pM
MgCl2 concentration	2.5 mM
dNTP concentration	0.2 mM
taq polymerase	2.5 U
Amplification program	
Dnaturation	94°C for 180 S
Annealing	58°C for 60 S
Extention	72°C for 60 S
Cycle number	30

pM= picomole, *mM* = milimole, U = unit.

دمای اتصال پرایمرها (**Annealing**): درجه حرارت مراحل مختلف در واکنش PCR تغییر داده شد تا بهترین دمای اتصال برای پرایمر مشخص گردد. باتوجه به نتایج بدست آمده دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای Annealing انتخاب گردید.

تعیین اختصاصیت **PCR**: برای تعیین اختصاصیت PCR، ژنوم تمام باکتری‌های مورد آزمایش استخراج شد، آزمایش PCR انجام شد و محصولات آن در ژل آگارز یک درصد و حرارت اتاق الکتروفورز شدند. هیچ یک از باکتری‌های مورد آزمایش ، غیر از *لیستریامونوسیتوژنز*، محصول اختصاصی bp ۲۱۰ را تولید نکردند.

تعیین میزان حساسیت: رقت‌هایی از 10^{-1} تا 10^{-8} از ژنوم سویه استاندارد تهیه گردید و از این رقت‌ها PCR انجام شد. نتایج PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. به این ترتیب PCR طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی ۵۰۰fg از ژنوم *لیستریامونوسیتوژنز* بود.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR از رقت‌های نختلف سویه *لیستریا منوسیتوژنز*

M- Ladder ۱- کنترل منفی ۲- رقت 10^{-1} ، ۳- رقت 10^{-2} ، ۴- رقت 10^{-4} ۵- رقت 10^{-8}

Archive of SID

www.SID.ir

تائید محصول: برای تائید نهائی، محصول بدست آمده برای تعیین توالی به شرکت سینا ژن ارسال گردید، و توالی زیر بدست آمد:

TTGGCGGCACATTTGTCACTGCATCTCCGT
GGTATACTAATACATTGTTTTTATTATAAT
CCAATCCTTGTATATACTTATCGATTTCAT
CCGCGTGTTTCTTTTCGATTGGCGTCTTAG
GACTTGCAGGCGGAGATGCTGGTGGTGCC
ATGGATGAAATTGAATTTTCTTTATTGAAT
GCAGATGCATCCTTTGCTTCAGTTTGTTGC
G

بحث:

هدف اصلی در این تحقیق راه اندازی روش PCR برای تشخیص *لیستریامونوسیتوژنز* بود. زیرا، این روش نسبت به روش‌های موجود نظیر کشت از سرعت و دقت بیشتری برخوردار است. روش استاندارد طلایی برای تشخیص قطعی *لیستریامونوسیتوژنز*، کشت می‌باشد. اما، این روش تحت تأثیر درمان آنتی‌بیوتیکی (که در خوراک دام استفاده می‌شود)، نحوه انتقال نمونه (که سبب مرگ باکتری می‌شود) و درون سلولی بودن باکتری قرار می‌گیرد. به‌علاوه، این روش حداقل ۳۶ ساعت طول می‌کشد. از این‌رو، این تحقیق طراحی و انجام گردید و چنانچه نتایج آن نشان داد، قادر به شناسایی *لیستریامونوسیتوژنز* در مدت ۳ ساعت می‌باشد. در سال‌های اخیر مزایای روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع عوامل مختلف عفونت‌های میکروبی از جمله لیستریامونوسیتوژنز مورد توجه قرار گرفته است (۱).

لذا، با طراحی پرایمرهای مختلف اقدام به بسط روش PCR برای شناسایی *لیستریامونوسیتوژنز* شد(۳). بررسی نرم افزار مولکولی پرایمر ژن *hlyA* معرفی شده در این تحقیق نسبت به پرایمرهای ارایه شده در دیگر مقالات (۵) از اختصاصیت بیشتری برخوردار است. لذا این پرایمر در تحقیق حاضر انتخاب گردید. در تحقیقات انجام شده قبل از سال ۲۰۰۱ میلادی به‌دلیل عدم شناسایی کامل ژنوم *لیستریامونوسیتوژنز* از ژن *hlyA* کمتر استفاده شده است(۸). هر چند از سال ۲۰۰۱ میلادی تا کنون برای این ژن پرایمرهایی معرفی گردیده است اما پروتکل ارایه شده برای PCR با این پرایمرها بیشتر برای دستگاه‌های جدید مانند Real – Time PCR می‌باشد(۷). همچنین، برای افزایش حساسیت آزمایش از پروب استفاده نموده‌اند(۵)که به‌دلیل عدم وجود گسترده این دستگاه‌ها در کشور ما، انجام این روش‌ها میسر نیستند. در این تحقیق برای افزایش حساسیت و اختصاصیت آزمایش از پروب استفاده نشد بلکه با تغییر غلظت مواد مصرفی در واکنش و نیز تغییر دماها و سیکل‌های واکنش توانستیم سویه استاندارد *لیستریامونوسیتوژنز* را شناسایی نماییم. نتایج آزمایشات مختلف با ژنوم باکتری‌های دیگر، غیر از *لیستریامونوسیتوژنز* ، نشان داد که این پرایمر با هیچ یک از آنها واکنش نشان نمی‌دهد. در نهایت با این تحقیق توان شناسایی *لیستریامونوسیتوژنز* با استفاده از دستگاه‌های موجود و با رنگ آمیزی اتیدیم بروماید در ژل آگارز و بدون نیاز به پروب با حساسیت و اختصاصیت قابل قبول حاصل گردید.

نتیجه‌گیری:

روش PCR به‌کار رفته در این مطالعه از سرعت، حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار است. زیرا پرایمرهای مصرفی با هیچ یک از ارگانیسم‌های دیگر واکنش نشان نمی‌دهد. نتیجهٔ نهایی این روش در کمتر از سه ساعت حاصل می‌شود. بکارگیری آن در آزمایشگاه‌ها، تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* را امکان‌پذیر می‌نماید.

تقدیر و تشکر:

مطالعه حاظر حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی است که با حمایت مالی مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) به انجام رسیده است. بدینوسیله از تمامی همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) ـ مرکز تحقیقات بهداشت که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مراجع:

1. Inatsu Y, Bari ML, Kawasaki S, Isshiki K. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in Kimchi. *J Food Prot*. 2004 ; **67**(7):1497-500.
2. Murray PA, Baron JA, Jorgensen JH. *Mannual of Clinical Microbiology*.8th ed, Washington DC, ASM Press, 2003;PP:95-100
3. Carola Burtscher , Stefan Wuertz. Evaluation of the Use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for Detection of Pathogenic Bacteria in Biosolids from Anaerobic Digestors and Aerobic Composters. *Appl Environ Microbiol.* 2003; **96**(8): 4618–4627.
4. Shearer AE, Strapp CM, Joerger RD. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, Listeria spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. *J Food Prot*. 2001 ; **64**(6):788-95.
5. Maria Consuelo Vanegas , Elizabeth V squez , Aida Juliana Martinez, Adriana M. Rueda. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control* .2009; **20** :430–432.
6. Keith A. Lampel L, Palmer A. Orlandi I, AND Leroy K. Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens. *Appl Environ Microbiol*.2000**; 66**(10): 4539–4542.
7. حمید رضا توکلی، مهدی قربانعلی زادگان، علی نجفی، افشین آخوند زاده بستی، رامین خاکسار. بررسی آلودگی ماهیان دودی تهیه شده به روش سنتی به *لیستریا مونوسایتوژنز* و گونه‌های سالمونلا در ایران. فصل نامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری ۱۳۸۷، سال سیزدهم: شماره ۴۲ صص ۶۱ تا ۶۷ .
8. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J Microbiol*. 2006 Feb; **44**(1):92-7.
9. Sambrook J. & Russell David W: Molecular cloning (a laboratory manual). 4th ed, Newyork, Gold Spring , 2001; p p: 1- 11.

Archive of SID

www.SID.ir