مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره سوم (پیاپی ۲۰) پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۲۲۴-۲۱۴

Original Article

تشخیص سریع و آسان *لیستریا منوسیتوژنز* در نمونه های ادرار زنان به کمک واکنش زنجیره ای پلی مراز و پروب فلئورسنتی 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 میکروب شناسی، [۲] استادیار، انستیتو پاستور ایران، بخش زیست شناسی مولکولی، گروه میکروب شناسی، [۳] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب 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 مراز با استفاده از پروب فلوئورسنتی 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 مراز، میزان فلوئورسنت با دستگاه ردیاب فلوئورسنت 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 فلئورسنتی ژن *hly-A* *لیستریا* شناسایی گردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که برای شناسایی مولکولی *لیستریا*، پروب فلورسنتی 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 فلوئورسنتی.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

مقدمه

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 ٤). با خوردن غذاهای آلوده مانند لبنیات و گوشت، به انسان انتقال می یابد (۲). افراد مسن یا کسانی که ایمنی سلولی آن ها پایین است مستعد بیماری هستند. *لیستریا منوسیتوژنز* در زنان باردار موجب باکتریمی مشابه آنفولانزا می شود و به دلیل عبور از جفت می تواند به التهاب جفت، پرده آمنیوتیک، 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 (٦). در حال حاضر روش استاندارد تشخیص *لیستریا منوسیتوژنز*، کشت است. اما به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک در خوراک دام و پتانسیل رشد

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۷۷۸۲۷۹٤ پست الکترونیک: payamsobhani@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

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 مراز (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 مراز 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 فلئورسنت تولیدی از مولکول گزارشگر می باشد که در طول واکنش افزایش می یابد (۱۰ و ۱۱). پروب های تَگمن (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 مراز در ترموسایکلر معمولی، با قرار دادن لوله های واکنش در دستگاه ردیاب فلوئورسنت، بدون باز کردن در لوله ها، می توان فلوئورسنت ایجاد شده را تعیین نمود. در واقع ردیابی در پایان واکنش انجام می شود. روش ردیابی فلوئورسنت 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 فلوئورسنتی، 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).

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 مراز با استفاده از پروب فلوئورسنتی 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 سایلین 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 مراز 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 5AGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGCGTCT (RTQ-1)3' و توالی پرایمر جلویی 5'CATCTCCGCCTGCAAGTCC3' طراحی و پرایمر

Archive of SID

www.SID.ir

برگشتی 5'TTGGCGGCACATTTGTCACTG3' از مقاله محققین (۷ و ۳۰) با شماره دسترسی (U25452, U25449, U25446, U25443) 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 فلوئورسنت تولیدی و کمترین میزان فلوئورسنت پس زمینه و افزایش ویژگی، پروب هیبریداسیون با ساختار سنجاق سری دارای فلوئوروفور (fluorophore) و خاموش کننده (quencher) طراحی شد. و در واقع این نوع پروب ها بیکن مولکولی می باشند.

د) واکنش زنجیره ای پلی مراز: 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 PCR buffer 10X شرکت بایوبیز (Biobiz)، ۳ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر از نشانگر اختصاصی ژن *لیستریا* دارای فلوئوروفور FAM، ۳/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر و نشانگر اختصاصی ژن *GAPDH* دارای فلوئوروفور HEX به عنوان کنترل داخلی (به منظور ارزیابی اثر تهیه نمونه اسید نوکلئیک و واکنش PCR)، ۰/۳ از آلبومین سرم گاوی و ۷/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به خوبی مخلوط شدند. در ادامه ۱۰ میکرولیتر پارافین گرم شده در دمای ۷۵ درجه سیلیسیوس 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 در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس، و در ادامه ۴۵ چرخه شامل واسرشت شدن ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس، اتصال و طویل شدن ۱ دقیقه در دمای ۶۳ درجه سلیسیوس انجام گرفت. پس از اتمام واکنش، لوله ها را به دستگاه ردیاب فلوئورسنتی شرکت DNA تکنولوژی (مدل Gene-2) (شکل ۱) انتقال داده و میزان فلورسنت 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 فلوئورسنت.

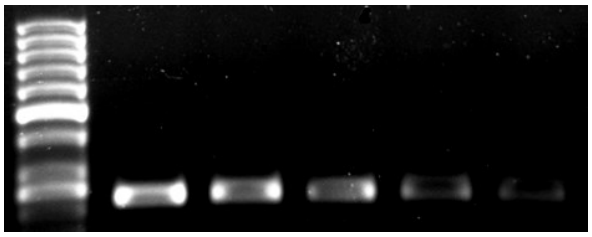
Archive of SID

www.SID.ir

با آزمون رقت های محلول ژنوم *لیستریا منوسیتوژنز*، سنجش FLASH-PCR (Fluorescent Amplification based 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 علایم 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

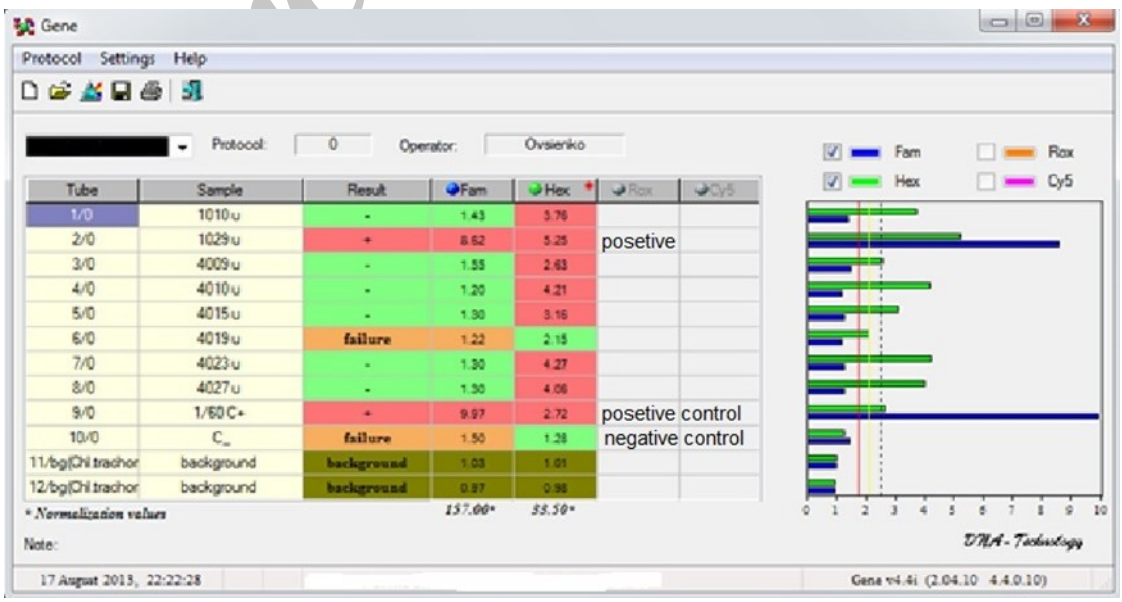


شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *hlyA* (۱۴۲ جفت باز).

Gene مربوط به دستگاه ردیاب فلوئورسنت را نشان می دهد. با آزمون اِتا 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 مراز و با استفاده از پروب فلورسنتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این روش علاوه بر راحتی و سرعت بالا، از



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

Archive of SID

www.SID.ir

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 واژن	سابقه سقط جنین
لارستان	۵۰	۱۲	٪۲٤	۲۹	۱۵	۲
جهرم	۵۰	۱۸	٪۳٦	۳۲	۲۱	٤

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 *hly A* *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 مونوسیتوژنز* 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 و۲۰). 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 (۲۳-۲۱). تخمین زده شده است سالیانه در آمریکا لیستریوز موجب ۱۶۰۰ مورد بیماری، ۱٤۵۵ مورد بستری در بیمارستان و ۲٤۵ مورد مرگ می گردد (۲۳).

روش های اولیه شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* بر مبنای ویژگی های فنوتیپی شامل ویژگی های بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتریوفاژی استوار است. اما به دلیل وجود برخی جهش ها 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 مونوسیتوژنز* در نمونه ها با روش های استاندارد کشت نیز مشکل است. آلودگی تک گیر مواد غذایی، سطوح پایین آلودگی، حضور میکروفلور زیاد یا ارگانیسم 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 مونوسیتوژنز* (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 مونوسیتوژنز* منجر به ایجاد نتایج منفی نیز گردد (۲٤).

به دنبال پیشرفت های جدید در روش های مولکولی امکان انتخاب ژن های اختصاصی *لیستریا مونوسیتوژنز* و تفکیک آن باکتری از سایر گونه ها وجود دارد (۸). شواهد موجود نشان می دهد که استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز می تواند با دقت بیش از ۹۰ درصد وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* را تایید نماید (۲۵). مطالعات واکنش زنجیره ای پلی مراز بر روی *لیستریا* از سال ۱۹۹۲ با تحقیق بونرت (Bohnert) و همکاران و با استفاده از ژن اختصاصی *hlyA* آغاز گردید (۲٦). هدف اصلی در تمام موارد، بهبود حساسیت واکنش زنجیره ای پلی مراز است. اما بیشترین اطلاعات گزارش شده در مورد افزایش دقت روش واکنش زنجیره ای پلی مراز، به اختصاصیت و حساسیت پرایمر مربوط می شود (۲۷).

روش Real time PCR با استفاده از پروب های جدید

Archive of SID

www.SID.ir

فلوئورسنتی، ردیابی حساس تر و اختصاصی تری را نسبت به واکنش زنجیره ای پلی مراز 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 مراز 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 مراز 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 پنیر تازه پرداختند. نتایج آنها نشان داد که از مجموع ٤٢٨ نمونه، در ٥٦ 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 فلوئورسنتی تگمن برای ردیابی ژن *actA* به مقایسه این روش با واکنش زنجیره ای پلی مراز متداول پرداختند (۲۹). کائور (Kaur) و همکاران در سال ۲۰۰۷ به جستجوی *لیستریا منوسیتوژنز* در نمونه های خون، ادرار، جفت، سوآب واژن و مقعد پرداختند. آنها با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز 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 مراز با این تحقیق مشابهت دارد.

دادخواه (Dadkhah) و همکاران از روش Real time PCR به منظور تعیین میزان حساسیت تشخیص *لیستریا منوسیتوژنز* با استفاده از رنگ سایبر گرین و پروب تَگمن استفاده نمودند. یافته های آنها نشان داد که میزان ردیابی *لیستریا* با روش Real time PCR در نمونه شیر معادل ۱۰×۳/۱٦ تا $۱۰^{٥}$×۳/۱٦ 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 مراز ۳٦ مورد ژن *لیستریا منوسیتوژنز* تشخیص داده شد (۳۰).

اسلامی (Eslami) و همکاران در سال ۲۰۱٤ در تهران با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلی مراز به بررسی *لیستریا منوسیتوژنز* در زنان با سقط جنین خودبخودی پرداختند. آنها در روش کشت از ۹٦ 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 فلوئوروفور و کوئنچر است که در طول واکنش با فعالیت 5’ نوکلئازی DNA پلی مراز هیدرولیز و فلوئوروفور از کوئنچر آزاد می شود. بنابراین فلوئورسنت 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 ٤/۳٪ 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 (۱٤). خاتمی (Khatami) و همکاران در سال ۲۰۱۲ از روش FLASH-PCR به منظور ردیابی *اشریشیا کلی*

Archive of SID

www.SID.ir

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 (۱٤ 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 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 فلورسنتی 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.

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Microbial. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

29. Oravcova´ K, Kaclı´kova´ E, Krascsenicsova´ K, Pangallo D, Brezˇna´ 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 & lt; i & gt; Fusarium & lt;/i & gt. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 3, October 2014

Original Article

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

Mohammad Sobhani Lari[1], Nader Shahrokhi[2], Mohammad Kargar[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Molecular Biology, Microbiology Group, Pasteur Institute, Tehran, Iran.
[3]Associate 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.

Archive of SID

www.SID.ir