Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی
دوره پنجم، شماره هجدهم – بهار ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و تشخیص ژن های *actA, PrfA, InB* لیستریا مونوسیتوژنز در بانوان مبتلا به سقط جنین مراجعه کننده به مراکز درمانی دانشگاهی به روش PCR در سال ۹۲

گیتا اسلامی[۱] ، رقیه صمدی*[۱] ، آرزو طاهر پور[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

چکیده

سابقه و هدف : در چند سال اخیر پدیده سقط خودبخودی جنین ، نظر محققین زیادی را به خود جلب کرده است و باکتری هایی مانند لیستریا مونوسیتوژنز ، استرپتوکوک آگالاکتیه ، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما از عوامل مهم آن به شمار می روند که در صورت عدم شناسایی ، منجر به سقط مکرر و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی خواهند شد . شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز و ژن های ویرولانس آن به نام های *actA, PrfA, InB* در بانوان دچار سقط جنین به روش PCR از اهداف این مطالعه می باشد.

مواد وروش ها : در این مطالعه توصیفی ، سواب واژن از ۹۶ زن دچار سقط جنین مراجعه کننده به بیمارستان های تهران گرفته شد ، نمونه ها در محیط انتقالی TSB مخمر دار به مدت حداقل ۱ ماه در دمای یخچال غنی سازی شد و سپس DNA باکتری به روش کیت فرمنتاز استخراج گردید و حضور ژن های ویرولانس لیستریا مونوسیتوژنز به نام های *PrfA, actA, InlB* با تکنیک PCR انجام شد .

یافته ها : در روش مولکولی فراوانی ژن های *InlB, PrfA, actA* به ترتیب ۱۲/۵٪، ۹/۳٪، ۲٪ بود .

نتیجه گیری : لیستریا مونوسیتوژنز در خانم های دچار سقط جنین ۱۲/۵٪ می باشد و به نظر می رسد ژن های *InlB, PrfA, actA* نقش اساسی در بیماری زایی این باکتری دارد .

واژگان کلیدی : سقط ، لیستریا مونوسیتوژنز ، PCR

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز،کوکوباسیل های گرم مثبت ، بدون اسپور ، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی می باشند که در دمای ۴۵-۰ درجه سانتیگراد قادر به رشد هستند. لیستریا در حیوانات و انسان ایجاد بیماری هایی مانند مننژیت ، انسفالیت ، سپتی سمی ، تولد نوزاد نارس و سقط می شود (۱).

در بالغین ، الگوی لیستریوز به سن و وضعیت ایمنی فرد آلوده بستگی دارد . افراد مسن و بیماران مبتلا به دیابت ، سرطان ، پیوند کلیه و نقایص در عملکرد سلول T معمولا به بیماری سیستمیک بدخیمی مبتلا می شوند که منجر به مننژیت می شوند . دریافت کنندگان پیوند کلیه و بیماران مبتلا به لوسمی ممکن است به آبسه های مغزی دچار شوند . لیستریوز در افراد مسن و بیماران دچار سرکوب سیستم ایمنی با سردرد ، استفراغ ، تب و بی حالی شروع می شود (۲).

زنان باردار و سایر بالغینی که از نظر ایمنی سالم هستند هنگامی که غذای آلوده با لیستریا مونوسیتوژنز را مصرف می کنند ، به یک بیماری شبه انفلونزای خفیف مبتلا می شوند که تظاهرات آن ممکن است شامل تب ، سردرد ، استفراغ ، درد شکم و کرامپ ناحیه پایین و پشت باشد . بیماری در این بالغین خود محدود شونده است . اگرچه زنان باردار آلوده ممکن است عفونت را به نوزادشان منتقل کنند ، بخصوص چنانچه زن باردار در سه ماهه سوم بارداری خود باشد . این حالت ممکن است منجر به سقط ، زایمان زودرس یا عفونت نوزاد شود . نوزادانی که از طریق جفت به لیستریوز مبتلا شده اند ، بیماری زودرس همچون گرانولوماتوز همراه با پنومونی و نوزادانی که در حین تولد با مایعات آلوده در طول کانال زایمانی آلوده می شوند به لیستریوز تأخیری همچون مننژیت مبتلا می شوند(۷و۱۴) .

کشت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بطور معمول، روش مرجع برای تشخیص عفونت های لیستریایی است و محیط های متنوعی جهت کشت وجداسازی لیستریا در دسترس است . نمونه های بالینی مناسب نظیر مدفوع ، خون ، مایع مغزی-نخاعی ، مکونیوم ، مایع آمنیوتیک و نمونه های گرفته شده از جفت بایستی ابتدا در محیط تریپتی کیس سوی براث رقیق شده (یک قسمت از نمونه در ۹ قسمت از براث) به همراه عصاره مخمر برده شود و حدود ۲ ماه یا بیشتر در دمای ۴ درجه نگه داری شود ، تا باکتری در سرما غنی گردد سپس در محیط های اختصاصی نظیر PALCAM agar و Oxford agar کشت داده شود و جهت اطمینان از حضور لیستریا مونوسیتوژنز ابتدا

آدرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
پست الکترونیکی : Rsamadi88@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله : ۹۳/۲/۴
تاریخ پذیرش : ۹۳/۵/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

مورفولوژی باکتری با رنگ آمیزی گرم بررسی شد و سپس تست های افتراقی مانند کاتالاز و اکسیداز، هیدرولیز بایل اسکولین ، تست حرکت در دمای ۲۵ درجه انجام شد (۸و۱۶).

پاسخ سرولوژی به آنتی ژن های کل سلول نمی تواند برای تشخیص به کار برده شود، زیرا واکنش متقاطع آنتی ژنی بین لیستریا مونوسیتوژنز و دیگر باکتری های گرم مثبت مثل استافیلوکوک ها (Staphylococcus) ، انتروکوک ها (Enterococcus) و باسیلوس ها (Bacillus) دیده می شود. به علاوه بیمارانی که لیستریوز در آن ها به وسیله کشت تایید شده است، سطح آنتی بادی غیرقابل ردیابی دارند. تعیین سطح آنتی بادی بر علیه لیستریولیزین O (Listeriolysin O) می تواند هم برای تشخیص لیستریوز ت هاجمی و هم برای گاستروانتریت تب دار ارزشمند باشد، گرچه روش های سرولوژیک که بر اساس ردیابی آنتی بادی های ضد شکل های ناقص لیستریولیزین O هستند، می توانند اختصاصی تر باشند ولی آزمون های سرولوژیک در حال حاضر توصیه نمی شود(۷). DNA لیستریا مونوسیتوژنز می تواند برای تشخیص این میکروارگانیسم به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده شود. روش PCR حساسیت و اختصاصیت بالایی دارد و به خصوص هنگامی می تواند استفاده شود که استفاده قبلی بیمار از عوامل ضد میکروبی (آنتی بیوتیک) ، حساسیت استفاده از روش کشت را پایین بیاورد. از آن جا که نمونه های واژن غالبا حاوی فلور طبیعی واژن بوده و باکتری های بی هوازی و هوازی به صورت توام در این نمونه ها حضور دارند و حضور دیگر باکتری ها در واژن می تواند با رشد لیستریا مونوسیتوژنز روی محیط کشت تداخل ایجاد کند (۱۵)، هدف از این مطالعه ، معرفی روش جدید PCR برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های واژن می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی ۹۶ نمونه سواب واژن از بانوان مبتلا به سقط مراجعه کننده به بیمارستان امام حسین و فیاض بخش در سال ۹۲ جمع آوری شد و در محیط انتقالی TSB مخمر دار به آزمایشگاه فرستاده شد و به مدت حداقل ۱ ماه در دمای یخچال غنی سازی گردید و سپس DNA باکتری به روش کیت فرمنتاز به روش زیر استخراج گردید.

ابتدا لوله های حاوی محیط TSB به مدت ۲۰ ثانیه روی شیکر قرار داده تا نمونه ها از سواب به داخل محیط پخش شود . سپس لوله ها را زیر هودی که با پنبه الکل ۷۰٪ تمیز و به مدت ۲۰ دقیقه UV تابانیده شده قرارداده شد . ۲۰۰ میکرولیتر نمونه را با ۴۰۰ میکرولیتر محلول لایزیس به داخل میکروتیوپ استریل ریخته و پیپتاژ شد ، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه به صورت معکوس و صاف کردن (Inverted) قرار گرفت . ۶۰۰ میکرولیتر کلروفورم به میکروتیوپ بالا اضافه کرده و ۵-۳ بار تکان می دهیم و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید ، فاز بالایی محلول، حاوی DNA بوده که به یک میکروتیوپ استریل اضافه شد. ۷۲۰ میکرولیتر آب استریل را به همراه ۸۰ میکرولیتر محلول Percipitation را در یک میکروتیوپ استریل ریخته و آماده شد و ۸۰۰ میکرولیتر از این محلول را به میکروتیوپ حاوی DNA اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه به صورت تکان دادن در دمای اتاق قرار داده شد و سپس با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. قسمت بالایی محلول را دور ریخته و ۱۰۰میکرولیتر محلولNacl به میکروتیوپ اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید ، ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه قرار داده شد و سپس با دورrpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید و اتانول را که در قسمت فوقانی محلول وجود دارد خارج گردید و ۷۰ میکرولیتر آب استریل اضافه شد و سپس میکروتیوپ ها در فریزر ۲۰- نگه داری شد. برای پی بردن به تخلیص استخراج DNA موجود ، با استفاده از دستگاه هایی به نام نانودراپ یا اسپکتوفتومتر در طول موج A۲۸۰/A۲۶۰ میزان جذب سنجیده شد که در صورت وجود DNA میزان جذب بالاتر از ۱/۵ بود.

۳میکرولیتر از DNA استخراج شده به همراه ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس شرکت سیناکلون ، ۷/۵ میکرولیتر از آب استریل و ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر های فوروارد و ریورز را که درجدول شماره ۱ مشخص شده در میکروتیوپ های استریل ۰/۵ میکرولیتری ریخته و آزمایش PCR در دما های ذکر شده طبق جدول شماره ۲ انجام شد

جدول ۱- مشخصات پرایمر ها

ژن	سکانس پرایمر	سایز پرایمر	رفرانس
ActA	F=٥'- AAC ACA GAT GAA TGG GAA GAA G٣-' R=٥'- TCC ACT TGT ATA GCT GGT CG٣-'	bp٢٧٨	این مطالعه
PrfA	F= ٥'-TCA CGA GTA TTA GCG AGA ACG ٣-' R= ٥'- TAG CTA GAC TCT ATC AAA CTT G٣-'	bp ٢۴۶	این مطالعه
InlB	F= ٥'-TGA TGC TTT TGC AGA AAC AAT C٣-' R=٥'- ATC ACT TAT ACC ATT ATG CTC C'٣-	٣١٩ bp	این مطالعه

جدول ۲- برنامه اجرایی PCR برای ژن های *InlB*, *PrfA*, *actA* لیستریا مونوسیتوژنز

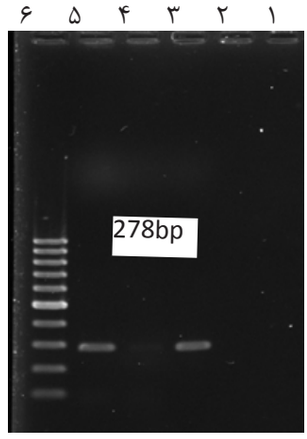
	تعداد سیکل ها	زمان	دما
Pre Denaturation	۱	min۵	۹۴
Denaturation	۳۶	min۱	۹۴
:Annealing ActA PrfA InlB	۳۶	min۱	 ۵۳ ۴۷ ۵۳
Extension	۳۶	min۱	۷۲
Final Extension	۱	min۵	۷۲

www.SID.ir

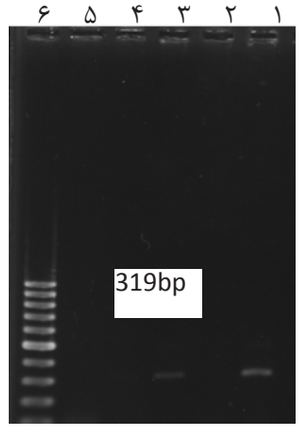
Archive of SID

یافته ها

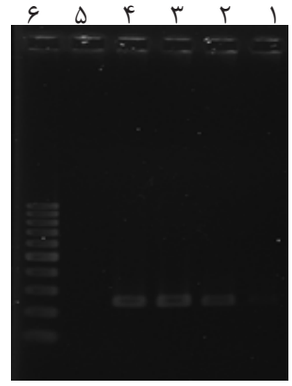
دربین ۶۹ سواب واژن فراوانی ژن های Atca, AfrP, BnI به ترتیب ۲٪ ، ۹/۵٪ ، ۲۱/۵٪ گزارش گردید که در شکل های زیر نشان داده شده است. محصولات بدست آمده جهت تایید نهایی به شرکت سیناژن فرستاده شد تا تعیین توالی گردد و سپس در سایت IBCN ثبت گردید.



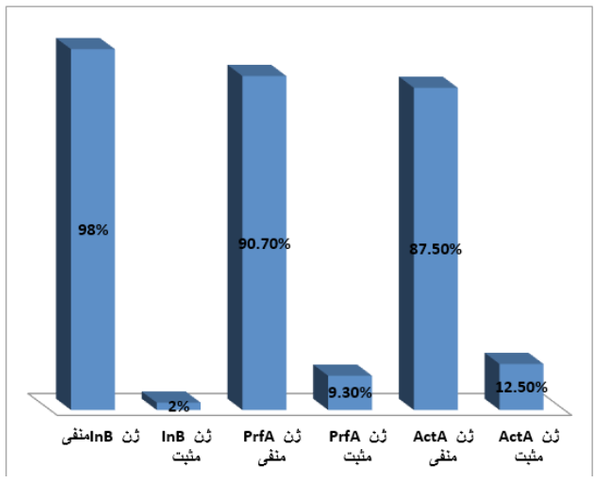
شکل ۱- نمایش محصول PCR ژن ActA لیستریا مونوسیتوژنز در زنان مبتلا به سقط. ستون ۱- لدر bp ۱۰۰ فرمنتانس ، ستون ۲- نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATTCC 7644 ، ستون ۳و۴- نمونه بیمار مثبت ، ستون ۵ – نمونه بیمار منفی ستون ۶ – نمونه کنترل منفی.



مراجعه کننده به بیمارستان های شهید بهشتی در سال ۹۲ . ستون ۱- لدر bp ۱۰۰ فرمنتانس ، ستون ۲ و۳ – نمونه بیمار منفی، ستون ۴- نمونه بیمار مثبت، ستون ۵- نمونه کنترل منفی ، ستون۶- نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATTCC۷۶۴۴.



شکل -۳نمایش محصول PCR ژن PrfA لیستریا مونوسیتوژنز از زنان مبتلا به سقط. ستون ۱- لدر bp ۱۰۰ فرمنتانس ، ستون -۲ نمونه کنترل منفی، ستون ۳و۴ - نمونه بیمار مثبت، ستون ۵ – نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATTCC ۷۶۴۴ ،ستون ۶– نمونه بیمار منفی.



نمودار -۱ بررسی فراوانی ژن های ویرولانس لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های بانوان مبتلا به سقط مراجعه کننده به مراکز دانشگاهی سال ۹۲

بحث

از دیرباز سقط یکی از معضلات مهم پزشکی در جوامع به حساب می آید . این معضل در جوامع کم درآمد بیشتر نمایان گر شده و به عنوان یکی از عوامل شکست خانواده می باشد زیرا مادر خانواده یکی از منابع دخیل در اقتصاد خانواده است و سقط باعث هزینه زیادی از بابت رسیدگی و مخارج به خود اختصاص می دهد و همچنین سقط می تواند از نظر روحی یک ضربه روانی شدید برای خانواده و مادر باشد (۱۱). از میان عوامل متعددی که در ایجاد سقط جنین در بانوان موثر شناخته شده اند ، عفونت باکتریایی دستگاه ژنیتال یکی از عوامل عمده و مهم در سقط می توان نام برد . به طوریکه تحقیقات نشان می دهند که عفونت دستگاه ژنیتال با ۲۵٪-۱۹٪ موارد سقط بانوان را تشکیل می دهد. وجود پاتوژن های باکتریایی در دستگاه ژنیتال به دلیل عدم تشخیص به موقع با اثرات مخربی که ایجاد می کنند بسیار با اهمیت می باشند . اما متاسفانه به نظر می رسد که در کشور ما نقش عفونت ها در سقط چندان مورد توجه نبوده و یا در آزمایشات کشت در یافتن باکتری های سخت رشد و روش های مولکولار در آزمایشگاه تشخیص طبی کمتر به کار گرفته می شود . از میان انواع عوامل باکتریایی که پتانسیل تاثیر بر سقط را دارند ، شایعترین و مهمترین آن ها لیستریا مونوسیتوژنز ، نایسریا گونوره ، مایکوپلاسما و کلامیدیا هستند . این گروه از باکتری ها با ایجاد عفونت در مجاری اوروژنیتال می توانند نقش اتیولوژیک مهمی در سقط زنان ایفا نمایند(۱۵و۱۷) . در تحقیق حاضر تعداد ۹۶ نمونه سقط با روش مولکولار از لحاظ حضور باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و ژن های ویرولانس آن مورد ارزیابی قرار گرفت ؛ که شیوع ژن های InlB ، PrfA ، ActA به ترتیب ۱۲/۵٪ ، ۹/۳٪ و ۲٪ گزارش گردید.

مطالعه ای توسط لیدا لطف اللهی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه تهران روی شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در سقط های خود به خودی در انسان انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه های کلینیکی از خانم های با سابقه سقط بستری شده در بیمارستان شریعتی تهران در طول سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۰ جمع آوری شد پس از انجام کشت از میان ۱۰۰ نمونه ۹ نمونه آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بود که شش ایزوله مربوط به بافت جفت وسواپ واژن و دو ایزوله مربوط به سواپ مقعدی و یک ایزوله مربوط به ادرار بوده (۱۰) که دلیل انتخاب نمونه های سواب واژن دراین مطالعه شیوع باکتری لیستریا در این ناحیه می باشد .در مطالعه ای که گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند ، از میان ۸۷ نمونه سواب واژن زنان مبتلا به سقط جنین ، ۵ مورد لیستریا مونوسیتوژنز به روش کشت و ۷ مورد لیستریا مونوسیتوژنز از کشت های منفی به روش PCR شناسایی گردید که در این مطالعه پیشن هاد می شود از روش مولکولی جهت شناسایی باکتری های مولد سقط استفاده شود (۴). در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای توسط جامی و همکاران در مشهد بر روی شیوع ژن PrfA در ۱۰۰ نمونه رندوم شیرانجام شد ، ۴٪ از نمونه های آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز دارای ژن PrfA بود(۶). مطالعه ای توسط Kaur و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی شیوع ژن های ویرولانس لیستریا مونوسیتوژنز (PLCA,PrfA, iap, hlyA, actA) انجام شد ، در این مطالعه از ۶۱ زن دچار سقط جنین ، ۳۰۵ نمونه که شامل خون ، ادرار ، سواب واژن ، سواب رکتال و بافت جنینی گرفته شد . بعد از انجام آزمایشات فنوتیپی ۱۰ نمونه آلوده به لیستریا بود که با انجام آزمایشات افتراقی ۴ نمونه مربوط به لیستریا مونوسیتوژنز بود و با انجام تست PCR مشخص شد که ۲ نمونه از ۴ نمونه آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز دارای ژن های PLCA,PrfA, iap, hlyA, actA می باشد و ا نمونه دارای ژن های iap, hlyA, actAمی باشد (۹). در مطالعه ما شیوع ژن actA و PrfA به ترتیب ۱۲,۵٪ و ۹,۳٪ گزارش شد که با مطالعه فوق هم خوانی ندارد که علت آن می تواند ناشی از تعداد و نوع نمونه باشد چرا که در مطالعه ما از ۹۶ زن دچار سقط جنین نمونه سواب واژن گرفته شد درحالی که در مطالعه Kaur و همکاران از ۶۱ زن دچار سقط نمونه های مختلف خون و سواب واژن و رکتال گرفته شد.

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین شیوع لیستریا مونوسیتوژنز و سقط در بانوان به روش PCR بود که نشان می دهد روش مولکولی مورد استفاده مناسب می باشد ولی جهت بیان ارتباط با اطمینان بالا نیاز به مطالعات با جامعه آماری بالا هستیم و همچنین به دلیل نمونه گیری مشکل سواب واژن از نمونه های دیگر مثل خون بیماران مبتلا به سقط نیز استفاده شود تا بتوان جامعه مورد مطالعه را افزایش داد .

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد باکتری شناسی با حمایت مالی مرکز تحقیقات باروری و ناباروری بیمارستان طالقانی انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Ajello L, Hay RJ, Borriell PS, Murray P, Funke G, Editor. Topley & Wilson`s microbiology. 2th ed. New York: Springer;2001.

2- Bahador A, Alikhani MY, Mansouri SH, Piri Dogahe H, Taheri M, Translator. Walker`s microbiology. 2th ed. Iran: Spring;2009.

3- Brug J. re-picoux, ovine listeriosis, small Ruuminant Research. Microbiol 2008;76(1):12-20.

4- Goudarzi E, Harzandi N, Yousefi J. Survey of PCR efficiency in the detection of Listeria, Brucella and mycoplasma in culture negative samples obtained from women with abortion. J Mazandaran University Medicine Science. 2013;23(105):61-69 (Persian).

5- Gray C, Nancy E. Identification of novel listeria monocytogenes secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. Infection and Immunity 2007;75(10):5886-97

6- Jami S, Jmshidi A, Khanzadi S. The presence of Listeria monocytogenes in raw milk samples in Mashhad, Iran. Iranian journal of Veterinary Research 2010;11(4):33-6.

7- Jamshidi M, Jahromi A, Davoodian P, Amirian M, Zangeneh M. Seropositivity for Listeria monocytogenes in women spontaneous abortion. Taiw J Obste Gyneco 1 2009;48(1):46-48.

8- Jose A, Michael K, Patrich B. Listeria pathogenesis and Molecular virulence determinants. Clini Microbiol Revi 2001;14(3):548-640.

9- Kaur S, Malik SV, Vaidya VM, Barbaddhe SB. Listera monocytogenes in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. J. Appl. Microbiol 2007;103:1889-96.

10- Lotfollahi L, Nowrouzi J, Irajian GH, Kazemi B. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Listeria monocytogenes in spontaneous abortions in humans. African Journal of Microbiology Research 2011;5(14):1990-93.

11-Mandell GL, Douglas RG. Principles and practice of infectious diseases. Volumes 1 and 2: John Wiley& Sons.; 1979.

12- Mirjami M, Miia L, Panu S, Annukka M, Hannu K. Role of flhA and motA in growth of Listeria monocytogenes at low temperatures. International of Food Microbiology 2010;148(20):177-83.

13- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Listeria and Erysipelothrix. Man Clin Microbiol 2003;1:461-9.

14- Rawool D, Malik S, Barbuddhe S, Shakunta I. Multipex PCR for detection of virulence associated genes in Listeria monocytogenes. Internet jounal of food safety 2007;9(1):56-62

15- Reissbrodt R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic listeria spp. an overview. Int J Food Microbiol 2004;95:1-9.

16- Shayan R, Sattari M, Forouzande M. Isolation and identification of listeria monocytogenes in vaginal samples by PCR. Modares J Med Sci 2009;12(1):51-58 (Persian).

17- Vasconcelos RM, Almeida A, Marin VA. Multiplex-PCR serotyping of listeria monocytogenes isolated from human clinical specimens. Men Inst Oswaldo Cruz 2008;103(8):349-55.

www.SID.ir