

جداسازی و تشخیص لیستریا مونوستیوژن در نمونه‌های واژن به روش PCR

راحله شایان^۱، مرتضی ستاری^{۲*}، مهدی فروزنده^۳

- ۱- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۷/۰۲/۰۹ تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: لیستریا مونوستیوژن باکتری بی‌هوای اختیاری و گرم مثبت است که در خاک، آب، سبزیجات پوسیده، شیر خام و محصولات لبنی آلوده یافت می‌شود. لیستریا مونوستیوژن عامل بیماری لیستریوز است. این بیماری از طریق مدفعی یا لبیتات آلوده از حیوان به انسان منتقل می‌شود. این باکتری باعث بیماری شبیه سرماخوردگی یا انتریت خود محدود شونده می‌شود. اما در سالمندان، نوزادان، زنان باردار و افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند، منجر به بیماری جدی می‌شود. در صورتی که زنان باردار با لیستریا مونوستیوژن آلوده شوند، احتمال این که نوزاد ناقص یا زودهنگام به دنیا بیاید یا سقط شود، زیاد است. به علت اهمیت باکتری در سلامت زنان باردار و نوزادان، مطالعات زیادی روی این باکتری انجام شده است. کشت دادن باکتری مشکل و وقت‌گیر است و حداقل به ۵ روز زمان برای تأیید نیاز دارد. هدف ما از انجام این تحقیق تعیین یک روش مولکولی برای ردیابی سریع این باکتری در نمونه‌های واژن است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه واژن بررسی شد. تمام نمونه‌ها کشت داده شدند و به روش PCR نیز بررسی شدند.

نتایج: در بین نمونه‌های مورد بررسی، ۷ نمونه با استفاده از روش کشت و ۳۶ نمونه با استفاده از روش PCR آلوده به لیستریا مونوستیوژن شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که PCR روش سریع‌تر، حساس‌تر و دقیق‌تری در مقایسه با روش کشت برای تشخیص حضور این باکتری در نمونه‌های واژنیال است.

کلیدواژگان: نمونه واژن، PCR، لیستریا مونوستیوژن، لیستریوز

۱- مقدمه

لیستریا مونوستیوژن در بزرگسالان غیر باردار، منژیت باکتری غیر اسپورزا، غیر شاخه‌دار، منظم، کوتاه، گرم مثبت و اولیه (Primary meningitis)، انسفالیت (Encephalitis) یا سپتیسمی (Septicemia) ایجاد می‌کند. بیماران مسن‌تر یا افرادی که مستعد هستند و اینمی سلولی آن‌ها پایین است، مانند گیرنده‌گان پیوند اعضاء، مبتلایان به لنفوم (Lymphoma) و

لیستریا مونوستیوژن (*Listeria monocytogenes*) باکتری غیر اسپورزا، غیر شاخه‌دار، منظم، کوتاه، گرم مثبت و بی‌هوای اختیاری است که از خاک، غذای حیوانات، آب، مدفعی و بافت‌های انواعی از حیوانات مهره‌دار و بی‌مهره مانند انسان جدا می‌شود [۱].

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۵۸
Email: sattarim@modares.ac.ir

می‌تواند هم برای تشخیص لیستریوز تهاجمی و هم برای گاستروانتریت (Gastroenteritis) تبدیل ارزشمند باشد، گرچه روش‌های سرولوژیک که براساس ردیابی آنتی‌بادی‌های ضد شکل‌های ناقص لیستریولیزین O هستند، می‌توانند اختصاصی‌تر باشند ولی آزمون‌های سرولوژیک در حال حاضر توصیه نمی‌شوند [۱].

آزمون‌های تجاری موجود برای ردیابی سریع لیستریا مونوسیتوژنر در محیط‌های مایع غنی‌شده به صورت انتخابی برای نمونه‌های غذایی براساس سنجش‌های ایمنولوژیکی است که از آنتی‌بادی‌های تک‌تبار (Monoclonal) استفاده می‌کنند یا از کیت ردیابی ایمنوآنزیماتیک (Immunoenzymatic) لیستریا مونوسیتوژنر، ایمنوآسای (Immunoassay) لیستریا مونوسیتوژنر و آزمون سریع لیستریا مونوسیتوژنر استفاده می‌شود. این آزمون‌ها مختص جنس هستند و این کیت‌ها فقط برای ردیابی لیستریا در محصولات غذایی کاربرد دارد و برای آنالیز نمونه‌های بالینی، تشخیص یا درمان طراحی نشده‌اند [۱].

DNA لیستریا مونوسیتوژنر می‌تواند برای تشخیص این میکروارگانیسم به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) استفاده شود. روش PCR حساسیت و اختصاصیت بالایی دارد و به خصوص هنگامی می‌تواند استفاده شود که استفاده قبلی بیمار از عوامل ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها)، حساسیت استفاده از روش کشت را پایین بیاورد [۱].

از آن‌جا که نمونه‌های واژن غالباً حاوی فلور طبیعی واژن بوده و باکتری‌های بی‌هوایی و هوایی به صورت توأم در این نمونه‌ها حضور دارند و حضور دیگر باکتری‌ها در واژن می‌تواند با رشد لیستریا مونوسیتوژنر روی محیط کشت تداخل ایجاد کند، تشخیص این باکتری در کشت نمونه‌های واژن بدون در دست داشتن محیط‌های انتخابی مشکل است. هدف از این مطالعه، معرفی روش جدید PCR برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنر در نمونه‌های واژن و مقایسه این روش با روش کشت است.

(Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) ایدز (AIDS) افرادی هستند که مشخصاً مستعد بیماری هستند. تمایل لیستریا مونوسیتوژنر به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می‌شود که معمولاً میزان کشنندگی آن بالاست (۵۰-۲۵ درصد) و در بین افرادی که از بیماری بهبود یافته‌اند، علاجی نورولوژیک باقی می‌گذارد. بارداری خطر ابتلا به لیستریوز (Listeriosis) را افزایش می‌دهد. لیستریا مونوسیتوژنر در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتریمی (Bacteremia) مشابه آنفولانزا می‌شود که اگر درمان نشود، می‌تواند به التهاب جفت و یا پرده آمیوتیک (Amniotic sac) و عفونت جنین و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا تولد زودهنگام منجر شود، چرا که این باکتری قادر به عبور از جفت است [۲].

تشخیص باکتری بر مبنای جداسازی آن در محیط کشت است. نمونه‌هایی که از جایگاه‌های استریل مثل خون، مایع مغزی-نخاعی، مایع آمیوتیک (Amniotic fluid)، جفت یا بافت بدن جنین گرفته می‌شوند، روی آگار خون دار کشت داده شده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۵ تا ۳۷ درجه انکوبه می‌شوند. نمونه‌هایی که از جایگاه‌های غیراستریل مثل سوپاپ‌های مقعدی، مدفوع، ادرار و دستگاه تناسلی زنان گرفته می‌شوند، روی محیط‌های افتراقی پالکام (Palcam) یا آکسفورد آگار (Oxford agar) کشت داده می‌شوند یا روی محیط کشت آگار خون دار کشت داده می‌شوند و آزمون‌های تشخیصی افتراقی برای شناسایی باکتری نیاز است [۱].

پاسخ سرولوژی به آنتی‌ژن‌های کل سلول نمی‌تواند برای تشخیص به کار بردشود، زیرا واکنش متقاطع آنتی‌ژنی بین لیستریا مونوسیتوژنر و دیگر باکتری‌های گرم مثبت مثل استافیلوکوک‌ها (*Staphylococcus*), انترولوکوک‌ها (*Bacillus*) و باسیلوس‌ها (*Enterococcus*) دیده می‌شود. به علاوه، بیمارانی که لیستریوز در آن‌ها به‌وسیله کشت تأیید شده است، سطح آنتی‌بادی غیرقابل ردیابی دارند. تعیین سطح آنتی‌بادی بر علیه لیستریولیزین O (Listeriolysin O) ۰

(DNP.kit-CinnaGen.Iran). ژن هدف در این مطالعه ژن لیستریولیزین O بود. این ژن یک ژن ۱۵۹۰ کیلوجفت بازی است. بخشی از ژن که انتخاب شد ۳۸۸ جفت بازی بود و آغازگرهای جلویی (Forward primers) و برگشتی (Reverse) برای این بخش قبل‌اً طراحی شده بودند [۹، ۱۰]. آغازگر جلویی:

5'-GAATGTAAACTCGGCGGAATCAG-3'
آغازگر برگشتی:
5'-GCCGTCGATGATTGAACCTCATC-3'
غلظت مواد مورد استفاده در این کار در PCR به صورت زیر بود:

dNTP = ۱ میکرولیتر (۱۰ میلی مول / ۱ میکرولیتر);
 $MgCl_2$ = ۱ میکرولیتر (۵۰ میلی مول / ۱ میکرولیتر); بافر $10 \times$
PCR = ۵ میکرولیتر؛ وزن خشک = $36/5$; مخلوط آغازگر (جلویی + برگشتی) = ۲ میکرولیتر؛ DNA الگو = ۲ میکرولیتر؛ DNA پلیمراز *Taq* (واحد در هر میکرولیتر) = $2/5$ میکرولیتر.
برای انجام PCR دستورالعمل زیر به دستگاه ترموسایکر داده شد:

درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛ $56/5$ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه؛ ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ ۳۰ چرخه؛ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه پس از انجام PCR محصول PCR روی ژل آگارز 0.8% درصد مشاهده شد.

۳-۲- تعیین حساسیت PCR

برای تعیین میزان حساسیت PCR (یعنی کمترین حد ژنوم که با روش PCR فوق قابل ردیابی است) ابتدا لازم است میزان جذب نوری DNA (Optical Density: OD) تخلیص شده از سویه استاندارد در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شود، برای این کار ۱ میکرولیتر DNA ژنومی را با ۴۹ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و توسط بیوفوتومتر OD را در ۲۶۰ نانومتر خوانده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت

صد نمونه به صورت تصادفی از ۳ بیمارستان در استان تهران جمع‌آوری شد. این بیمارستان‌ها شامل بیمارستان ارشد در منطقه پارچین، بیمارستان شهید چمران در شمیرانات و درمانگاه فرج‌بخش در تهران بودند. نمونه‌ها پس از نمونه‌گیری توسط پزشک متخصص زنان و زایمان در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت آگار خون‌دار محتوی آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید B (Nystatin)، نیستاتین (Nalidixic acid) و آمفوتیریسین B (Amphotericin B) کشت داده شد و برای ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرخانه‌گذاری شد.

کلونی‌هایی که دارای همولیز بتا (β hemolysis) بودند، جداسازی و بررسی شدند. رنگ‌آمیزی گرم از نمونه‌ها انجام شد. حرکت باکتری در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد روی محیط SIM (Sulfide Indole Motility) (ساخت شرکت OXOID) بررسی شد (حرکت باکتری در ۲۵ درجه سانتی گراد مشهودتر است و نمای چتری را نشان می‌دهد). علاوه بر SIM باکتری روی محیط بایل-اسکولین (Bile-sculin) (ساخت شرکت K.Difco-U.K) نیز کشت داده شد، لیستریا مونوسیتوژن با هیدرولیز اسکولین، کلونی‌های آبی-قهوه‌ای تیره ایجاد می‌کند. واکنش‌های اکسیداز و کاتالاز نیز بررسی شدند، برای آزمون تأییدی نیز از واکنش‌های (Voges-Proskauer) VP (Methyl Red) MR (Merck-Germany) استفاده شد. کشت در فواصل زمانی ۲ هفته، ۱ ماه، ۲ ماه و ۶ ماه پس از نمونه‌گیری و قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال تکرار شد.

۲-۲- PCR

سویه استاندارد از بیمارستان بوعلی تهران تهییه شد (ATCC 19115). آزمون‌های بیوشیمیایی برای تأیید و تشخیص روی آن انجام شد. استخراج DNA طبق برنامه کیت استخراج DNA از شرکت CinnaGen انجام شد

فرح بخش و ۲ نمونه از ۴ نمونه گرفته شده از مطب از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنر مثبت شناخته شدند.

نتایج به دست آمده از کشت نمونه‌ها برای ریدیابی لیستریا مونوسیتوژنر نشان داد که به طور کلی از ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، ۷ نمونه از نظر آلودگی با لیستریا مونوسیتوژنر مثبت هستند، ۶ مورد از این ۷ مورد در زنانی ریدیابی شد که در سنین بارداری بودند. همچنین، نتایج به دست آمده از انجام PCR روی نمونه‌ها این گونه بود که ۳۶ نمونه از ۱۰۰ نمونه از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنر در روش PCR مثبت بودند. ۳۱ مورد از این زنان در سنین بارداری قرار داشتند (جدول ۱).

جدول ۱ مقایسه بین نتایج کشت، PCR و سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک

گروه سنی	تعداد	PCR مثبت	*	کشت مثبت	**
۲۰-۲۹	۳۳	۱۴	۶	۲	۰
۳۰-۳۹	۳۵	۱۰	۱	۲	۰
۴۰-۴۹	۱۶	۷	۰	۲	۰
۵۰-۵۹	۱۲	۳	۰	۱	۱
۶۰-۶۹	۳	۱	۰	۰	۰
۷۰-۷۹	۱	۱	۰	۰	۰

* تعداد بیماران دارای نمونه PCR مثبت که در یک ماه اخیر از آنتی‌بیوتیک استفاده کردند.

** تعداد بیماران دارای نمونه کشت مثبت که در یک ماه اخیر از آنتی‌بیوتیک استفاده کردند.

همچنین، مقایسه بین سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و نتایج به دست آمده از کشت و PCR نشان می‌دهد که در کشت نمونه افرادی که ۱ ماه قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک مصرف کرده بودند، لیستریا مونوسیتوژنر قابل ریدیابی نیست، اما روش PCR امکان ریدیابی این باکتری را با وجود مصرف آنتی‌بیوتیک می‌دهد (جدول ۱).

۴- بحث

وضعیت واقعی لیستریا مونوسیتوژنر در ایران ناشناخته است و اطلاعات کمی از حضور لیستریا مونوسیتوژنر در محصولات غذایی که در ایران مصرف می‌شود در دسترس است. لازم به ذکر است که لیستریوز بیماری قابل گزارشی در برنامه سلامت و بهداشت ایران محسوب نمی‌شود. به علاوه هیچ بررسی یا توصیه‌ای مبنی بر حضور لیستریا مونوسیتوژنر

ژنومی با ضریب رقت ۱/۱۰ رقیق و سپس PCR طبق برنامه انجام شد.

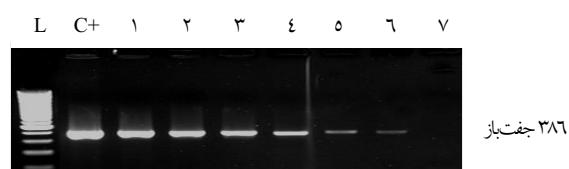
جدول ۱ غلظت DNA رقیق شده

۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	*
۳۳	۳۳۰	۳/۳	۳۳	۳۳۰	۳/۳	۳۳	***
fg	fg	pg	pg	pg	ng	ng	

* شماره لوله؛ ** غلظت DNA؛ ng: نانوگرم؛ pg: پیکوگرم؛ fg: فمتوگرم

۳- نتایج

اشکال ۱ و ۲ حد نهایی تشخیص آغازگرها براساس رقت ژنومی (۳۳ فمتوگرم در ۱ میکرولیتر) و یک نمونه مثبت (دارای باند ۳۸۶ جفت‌باز) نشان داده شده است.



شکل ۱ حد نهایی تشخیص آغازگرها براساس رقت ژنومی:
۱۰۰: Ladder، جفت‌بازی، هر چاهک / کترل مثبت (C+) (۳۳ نانوگرم)، (۱) ۳۳ پیکوگرم، (۲) ۳۳۰ پیکوگرم، (۳) ۳۳۰ پیکوگرم، (۴) ۳/۳ پیکوگرم، (۵) ۳۳۰ فمتوگرم، (۶) ۳۳ فمتوگرم، (۷) کترل منفی



شکل ۲ نتایج حاصل از PCR یک نمونه مثبت در مقایسه با کترل مثبت و منفی؛ (L) ۱۰۰ جفت‌بازی، (۱) نمونه مثبت، (۲) کترل مثبت، (۳) کترل منفی

تعداد ۱۰۰ نمونه از مناطق مختلف شهری تهران گرفته شده است. از ۱۰۰ نمونه گرفته شده ۴۴ نمونه از منطقه پارچین، ۳۵ نمونه از بیمارستان چمران، ۱۷ نمونه از درمانگاه فرج‌بخش و ۴ نمونه از مطب پزشک گرفته شد.

از نظر مثبت بودن نمونه‌ها، ۲۰ نمونه از ۴۴ نمونه گرفته شده از بیمارستان ارتش در پارچین، ۸ نمونه از ۳۵ نمونه گرفته شده از بیمارستان چمران، ۶ نمونه از ۱۷ نمونه گرفته شده از درمانگاه

زیاد باکتری‌های دیگر به علت تداخل در رشد لیستریا مونوسیتوژنر منجر به ایجاد نتایج منفی شود [۵].

در ۱۹۶۳ ژیونو (Giono) و پرز میراووت (Perez Miravet) در مکزیک لیستریا مونوسیتوژنر را از ترشحات واژن به روش کشت جدا کردند [۶].

در ۱۹۸۶ لامونت (Lamont) و پستبتویت (Postlethwaite) در یک مطالعه، ناقلين مدفععی، سرویکوواژینال (Cervicovaginal) و اوروفارثیال (Oropharyngeal) گونه‌های لیستریا را در میان ۵۴ زن باردار سالم و ۶۰ زن غیر باردار سالم در اسکاتلنده تعیین نمودند. نمونه‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد برای مرحله غنی‌سازی در سرما نگهداری شدند و سپس روی محیط انتخابی شامل آکری‌فلاوین (Acriflavine)، نالیدیکسیک اسید و پتابسیم تیوسیانات کشت داده شدند. لیستریا مونوسیتوژنر از مدفعع یک زن باردار (۲ درصد) و ۲ زن غیر باردار سالم (۳/۴ درصد) جداسازی شد. اما از نمونه‌های سرویکوواژینال و اوروفارثیال لیستریا مونوسیتوژنر جداسازی نشد [۷].

در سال ۲۰۰۶ نتیجه مطالعه دراز مدتی که استفانوویچ (Stepanovih) و وکوویچ (Vukovih) در بلگراد (صربستان) انجام دادند، متشر شد. آن‌ها از ۹۵۸ زن (۷۹۹ بیمار با سقط جنین و ۱۵۹ بیمار نابارور) از ژانویه ۱۹۹۲ تا آگوست ۲۰۰۶ نمونه‌گیری از واژن را انجام دادند. پس از نمونه‌گیری، نمونه به صورت مستقیم در پلیت محتوى بلاد آگار کلمبیا (Columbia blood agar) کشت داده شد و هر سوپ در تریپتیکاز سوی براث (Trypticase soy broth) در ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۵ هفته نگهداری شد. از این تعداد نمونه تنها ۱ نمونه محتوى لیستریا مونوسیتوژنر بود که از زنی با سابقه سقط جدا شد [۸].

در تحقیق حاضر برای کشت نمونه‌ها، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. کشت از هر نمونه در ۳ نوبت انجام گرفت. ۲ هفته پس از نمونه‌گیری، یک ماه پس از نمونه‌گیری و

در مواد غذایی در ایران وجود ندارد. عادت‌های غذا خوردن ایرانیان نیز با الگوی کشورهای غربی متفاوت است. به جز برخی از غذاهای غربی غذاهای مصرفی در ایران به صورت محلی تولید می‌شود و به شکل غذاهای سنتی این کشور مصرف می‌شود [۳].

روش‌های اولیه شناسایی لیستریا مونوسیتوژنر بیشتر بر مبنای خصوصیت فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی‌کنند. این روش‌ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتریوفاژی است. از آنجا که این خصوصیات می‌توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش‌های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، بنابراین استفاده از آزمون‌های فنوتیپی گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می‌شود [۴].

به دنبال پیشرفت‌های جدید در روش‌های ژنتیک مولکولی، روش‌هایی که ژن‌های منحصر به فردی در لیستریا مونوسیتوژنر را نشانه می‌گیرند، طراحی شده‌اند و لیستریا مونوسیتوژنر را از سایر گونه‌ها متمایز می‌کنند. این روش‌ها بسیار دقیق‌تر هستند و کمتر از روش‌های فنوتیپی با تغییرات محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۴].

روش‌های میکروبیولوژیکی موجود مبنی بر رشد روی محیط کشت به دنبال ایزولاسیون (Isolation) و آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیک است. با این حال ردیابی این بیماری‌زا در نمونه‌ها با روش‌های استاندارد کشت نیز مشکل است. آلدگی تک‌گیر (Sporadic) مواد غذایی، سطوح پایین آلدگی (CFU ≤ 100)، حضور میکروفلور (Microflora) زیاد یا ارگانیسم‌های رقیب که می‌توانند حضور لیستریا مونوسیتوژنر را پنهان کنند، از مواردی هستند که در تشخیص باکتری روی محیط کشت مداخله می‌کنند. این روش‌ها زمانبر است و حداقل به ۵ روز برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنر (با آزمون‌های تأییدی) نیاز دارد. در حالی که در صورت بروز برخی از موارد آلدگی به عملکرد فوری نیاز است. به علاوه این روش‌ها ممکن است در صورت آلدگی نمونه به مقدار

در شناسایی باکتری بیماری را است اما بیشترین اطلاعات گزارش شده در افزایش دقیق روش PCR به اختصاصیت و حساسیت آغازگر برمی‌گردد [۱۰].

بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی لیستریا مونوسیتوژنر انجام گرفته است براساس ردیابی ژن‌های ویرولانس (Virulence) *hly* و *iap* که لیستریولیزین O را کد می‌کند و ژن کدکننده پروتئین P60 سطحی که عامل تهاجم است، بوده است. ژن *hly* در تمام سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنر به صورت ثابت باقی مانده است در حالی که ژن *iap* چنین نیست. ژن *iap* در انتهای ۳' و ۵' مناطق ثابتی دارد، در حالی که در مناطق مرکزی بسیار متغیر است و شامل توالی‌های چندشکل (Polymorph) است که حتی در بین سویه‌های یک سرووار (Serovar) هم متفاوت است [۱۲].

به دلایل اشاره شده در بالا، در این مطالعه از ژن *hly* استفاده شد. آغازگرهای مختلف برای نواحی مختلف این ژن طراحی شده بود. از بین آن‌ها آغازگری انتخاب شد که بالاترین اختصاصیت را داشت. این آغازگر، آغازگری بود که بونرت و همکاران در ۱۹۹۲ برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنر استفاده کرده بودند و دقیق و اختصاصی بودن آن توسط آزمایش‌های آزنار و همکاران تأیید شده بود. این آغازگر پس از بلاست (BLAST) تمام آغازگرهای انتخاب شده برای این ژن، انتخاب شد و PCR نمونه‌ها روی آن انجام گرفت. اختصاصیت PCR با تعیین توالی کردن محصول PCR به دست آمده در این تحقیق انجام گرفت. توالی محصول PCR به دست آمده با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی GenBank ارزیابی و مقایسه شد. این بررسی نشان داد محصول PCR به دست آمده ۱۰۰ درصد اختصاصیت به لیستریا مونوسیتوژنر دارد و به ژن *hly* که بخشی از ژن *prfA* است، تعلق دارد.

هدف از این مطالعه بررسی حساسیت روش PCR و مقایسه آن با حساسیت روش کشت بوده است. مقایسه بین نتایج کشت و PCR نشان می‌دهد که حساسیت، دقیق و اختصاصیت روش PCR بسیار بیش از روش کشت است. در

۲ ماه پس از نمونه‌گیری، از نمونه‌ها کشت انجام شد. برای بهینه کردن شرایط رشد نمونه‌ها، نمونه‌ها در آگار خون‌دار محتوی نالیدیکسیک اسید، آمفورتیسین B و نیستاتین کشت داده شد. بهترین شرایط برای جداسازی لیستریا مونوسیتوژنر در محیط کشت، ۱ ماه پس از قرار دادن نمونه در یخچال بود. در صورت کشت دادن نمونه‌ها ۲ هفته و ۲ ماه پس از نمونه‌گیری، جواب‌های منفی در کشت‌هایی که با یک ماه نگهداری در یخچال جداسازی لیستریا مونوسیتوژنر از آن‌ها امکان‌پذیر شده بود، دیده شد.

مطالعات PCR روی لیستریا مونوسیتوژنر در دهه ۹۰ آغاز شد. در سال ۱۹۹۲ بونرت (Bohnert) و همکاران با استفاده از آغازگرهای PCRCGO و PCRCGO برای ژن *hly* ردیابی دقیق‌تری را برای لیستریا مونوسیتوژنر در لبیات امکان‌پذیر کردند [۹]. در سال ۲۰۰۳ آزنار (Aznar) و همکاران روی انتخاب حساس‌ترین آغازگر برای جداسازی لیستریا مونوسیتوژنر در نمونه‌های مواد غذایی کار کردند. آن‌ها با استفاده از شرایط یکسان برای PCR حرارتی و تنها با استفاده از دماهای اتصال متفاوت برای آغازگرهای، توانستند حساس‌ترین آغازگرها را شناسایی کنند. این آغازگرها LM2/LM1 و PCRDO/PCRCGO بودند [۱۰].

در سال ۲۰۰۶ تشخیص لیستریا مونوسیتوژنر در نمونه‌های واژن به روش PCR انجام شد. این آزمون، توسط شاکونتala (Shakuntala) و همکاران در هندوستان روی بوفالوهایی انجام شد که نقص دستگاه تناسلی داشتند و توانایی زایمان در آن‌ها وجود نداشت. این دانشمندان توانستند از سواب واژن ۴/۴ درصد بوفالوهایی که مشکل تولیدمثلی داشتند لیستریا مونوسیتوژنر را به وسیله PCR شناسایی کرده و حضور این باکتری را در دستگاه تناسلی این حیوانات تأیید کنند [۱۱].

فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده‌های PCR در نمونه، شناسایی سلول‌های زنده و غیرقابل کشت، اختصاصیت آغازگر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی‌کننده می‌توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تأثیر قرار دهند. هدف اصلی در تمام موارد، بهبود حساسیت PCR

دیگری مانند سرولوژی، کشت خون یا انجام PCR روی نمونه‌های خون هم به عنوان روش‌های مکمل استفاده شود.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

روش PCR ژنوم ارگانیسم مورد نظر ردیابی می‌شود و احتمال ردیابی ارگانیسم غیرفعال یا مرده نیز وجود دارد. اما روش کشت برمنای شناسایی ارگانیسم‌های زنده است. از این جهت پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اولاً نمونه‌برداری جمعیت یکسان باشد و نمونه‌برداری از جمعیت سالم نیز انجام شود. چرا که آمار داده شده در این تحقیق برمنای مراجعه و نمونه‌گیری زنانی است که به علت بیماری به پزشک مراجعه کرده‌اند و ثانیاً علاوه بر روش PCR از روش‌های شناسایی

۶- منابع

- [1] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaffer MA. Listeria and Erysipeloethrix. *Man Clin Microbiol* 2003; 1: 461-9.
- [2] Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114(1-2): 1-15.
- [3] Jalali M, Abedi D. Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. *Int J Food Microbiol* 2008; 122(3): 336-40.
- [4] Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55: 645-59.
- [5] Amaglani G, Giannarini 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: 1137-42.
- [6] Giono S, Perez Miravet A. Perinatal Listeria Infection In Mexico. I. Investigation of Listeria monocytogenes in the vaginal exudate. *Rev Inst Salubr Enferm Trop* 1963; 23: 95-101.
- [7] Lamont RJ, Postlethwaite R. Carriage of *Listeria monocytogenes* and related species in pregnant and non-pregnant women in Aberdeen, Scotland. *J Infect* 1986; 13(2): 187-93.
- [8] Stepanovih S, Vukovih D, Djukic S, Cirkovic I, Svabic-Vlahovic M. Long-term analysis of *Listeria monocytogenes* vaginal carriage frequency in Belgrade, Serbia (short communication). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2007; 54(2): 195-9.
- [9] 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): 271-80.
- [10] Aznar R, Alarcón B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J Appl Microbiol* 2003; 95(5): 958-66.
- [11] Shakuntala I, Malik SV, Barbuddhe SB, Rawool DB. Isolation of *Listeria monocytogenes* from

- buffaloes with reproductive disorders and its confirmation by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 2006; 117(2-4): 229–34.
- [12] Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scortti M, Esteve T, Vázquez-Boland JA, Pla M. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and ampliFluor technology. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(3): 1366-77.