مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۲، شماره: از ۵۱-۵۸
بهار ۱۳۸۸

جداسازی و تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز 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
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۸۷/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش:۸۸/۰۲/۰۹

چکیده

هدف: لیستریا مونوسیتوژنز باکتری بی‌هوازی اختیاری و گرم مثبت است که در خاک، آب، سبزیجات پوسیده، شیر خام و محصولات لبنی آلوده یافت می‌شود. لیستریا مونوسیتوژنز عامل بیماری لیستریوز است. این بیماری از طریق مدفوع یا لبنیات آلوده از حیوان به انسان منتقل می‌شود. این باکتری باعث بیماری شبه 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 صورتی‌که زنان باردار با لیستریا مونوسیتوژنز آلوده شوند، احتمال این‌که نوزاد ناقص یا زودهنگام به دنیا بیاید یا سقط شود، زیاد است.

به‌علت 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 درنمونه‌های 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 مونوسیتوژنز 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 واژینال است.

کلیدواژگان: نمونه واژن، PCR، لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریوز

۱- مقدمه

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

لیستریا منوسیتوژنز در بزرگسالان غیر باردار، مننژیت اولیه (Primary meningitis)، انسفالیت (Encephalitis) یا سپتی‌سمی (Septicemia) ایجاد می‌کند. بیماران مسن‌تر یا افرادی که مستعد هستند و ایمنی سلولی آن‌ها پایین است، مانند گیرندگان پیوند اعضاء، مبتلایان به لنفوم (Lymphoma) و

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

ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) افرادی هستند که مشخصاً مستعد بیماری هستند. تمایل لیستریا مونوسیتوژنز به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می‌شود که معمولاً میزان کشندگی آن بالاست (۲۵- ۵۰ درصد) و در بین افرادی که از بیماری بهبود یافته‌اند، علایم نورولوژیک باقی می‌گذارد. بارداری خطر ابتلا به لیستریوز (Listeriosis) را افزایش می‌دهد. لیستریا مونوسیتوژنز در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتریمی (Bacteremea) مشابه آنفولانزا می‌شود که اگر درمان نشود، می‌تواند به التهاب جفت و یا پرده آمنیوتیک (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 آمینوتیک (Amniotic fluid)، جفت یا بافت بدن جنین گرفته می‌شوند، روی آگار خون‌دار کشت داده شده و به‌مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در ۳۵ تا ۳۷ درجه انکوبه می‌شوند. نمونه‌هایی که از جایگاه‌های غیراستریل مثل سواپ‌های 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 خون‌دار کشت داده می‌شوند و آزمون‌های تشخیصی افتراقی برای شناسایی باکتری نیاز است [۱].

پاسخ سرولوژی به آنتی‌ژن‌های کل سلول نمی‌تواند برای تشخیص به‌کار برده شود، زیرا واکنش متقاطع آنتی‌ژنی بین لیستریا مونوسیتوژنز و دیگر باکتری‌های گرم مثبت مثل استافیلوکوک‌ها (*Staphylococcus*)، انتروکوک‌ها (*Enterococcus*) و باسیلوس‌ها (*Bacillus*) دیده می‌شود. به‌علاوه، بیمارانی که لیستریوز در آن‌ها به‌وسیله کشت تأیید شده است، سطح آنتی‌بادی غیرقابل ردیابی دارند. تعیین سطح آنتی‌بادی بر علیه لیستریولیزین O (Listeriolysin O) می‌تواند هم برای تشخیص لیستریوز تهاجمی و هم برای گاستروانتریت (Gastroenteritis) تب‌دار 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 مونوسیتوژنز در محیط‌های مایع غنی‌شده به‌صورت انتخابی برای نمونه‌های غذایی براساس سنجش‌های ایمنولوژیکی است که از آنتی‌بادی‌های تک‌تبار (Monoclonal) استفاده می‌کنند یا از کیت ردیابی ایمنوآنزیماتیک (Immunoenzymatic) لیستریا مونوسیتوژنز، ایمنواسی (Immunoassay) لیستریا مونوسیتوژنز و آزمون سریع لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز می‌تواند برای تشخیص این میکروارگانیسم به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) استفاده شود. روش PCR حساسیت و اختصاصیت بالایی دارد و به‌خصوص 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 بی‌هوازی و هوازی به‌صورت توأم در این نمونه‌ها حضور دارند و حضور دیگر باکتری‌ها در واژن می‌تواند با رشد لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز در نمونه‌های واژن و مقایسه این روش با روش کشت است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت

صد نمونه به‌صورت تصادفی از ۳ بیمارستان در استان تهران جمع‌آوری شد. این بیمارستان‌ها شامل بیمارستان ارتش در منطقه پارچین، بیمارستان شهید چمران در شمیرانات و درمانگاه فرح‌بخش در تهران بودند. نمونه‌ها پس از نمونه‌گیری توسط پزشک متخصص زنان و زایمان در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت آگار خون‌دار محتوی آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid)، نیستاتین (Nystatin) و آمفوتریسین B (Amphotericin B) کشت داده شد و برای ۱۸- ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری 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 سانتی‌گراد روی محیط SIM (Sulfide Indole Motility) (ساخت شرکت OXOID) بررسی شد (حرکت باکتری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشهودتر است و نمای چتری را نشان می‌دهد). علاوه بر SIM باکتری روی محیط بایل-اسکولین (Bile-sculin) (ساخت شرکت Difco-U.K) نیز کشت داده شد، لیستریا مونوسیتوژنز با هیدرولیز اسکولین، کلونی‌های آبی- قهوه‌ای تیره ایجاد می‌کند. واکنش‌های اکسیداز و کاتالاز نیز بررسی شدند، برای آزمون تأییدی نیز از واکنش‌های MR (Methyl Red) و VP (Voges-Proskauer) (ساخت شرکت Merck-Germany) استفاده شد. کشت در فواصل زمانی ۲ هفته، ۱ ماه، ۲ ماه و ٦ ماه پس از نمونه‌گیری و قرار دادن نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال تکرار شد.

۲-۲- PCR

سویه استاندارد از بیمارستان بوعلی تهران تهیه 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 (DNP.kit-CinnaGen.Iran). ژن هدف در این مطالعه ژن لیستریولیزین O بود. این ژن یک ژن ۱۵۹۰ کیلوجفت‌بازی است. بخشی از ژن که انتخاب شد ۳۸۸ جفت‌بازی بود و آغازگرهای جلویی (Forward primers) و برگشتی (Reverse) برای این بخش قبلاً طراحی شده بودند [۹، ۱۰].

آغازگر جلویی:

5′-GAATGTAAACTTCGGCGGAATCAG-3′

آغازگر برگشتی:

5′-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3′

غلظت مواد مورد استفاده در این کار در PCR به‌صورت زیر بود:

dNTP= ۱ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مول/ ۱ میکرولیتر)؛ $MgCl_2$= ۱ میکرولیتر (۵۰ میلی‌مول/ ۱ میکرلیتر)؛ بافر ۱۰x PCR= ۵ میکرولیتر؛ وزن خشک= ۳٦/۵؛ مخلوط آغازگر (جلویی+ برگشتی)= ۲ میکرولیتر؛ DNA الگو= ۲ میکرولیتر؛ DNA پلیمراز *Taq* (۱ واحد در هر میکرولیتر)= ۲/۵ میکرولیتر.

برای انجام PCR دستورالعمل زیر به دستگاه ترموسایکر داده شد:

۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه و ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه؛ ٥٦/٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه؛ ۳۰ چرخه؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه

پس از انجام PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشاهده شد.

۲-۳- 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 ۲٦۰ نانومتر خوانده شود، برای این کار ۱ میکرولیتر DNA ژنومی را با ٤۹ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و توسط بیوفتومتر OD را در ۲٦۰ نانومتر خوانده شد. DNA

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

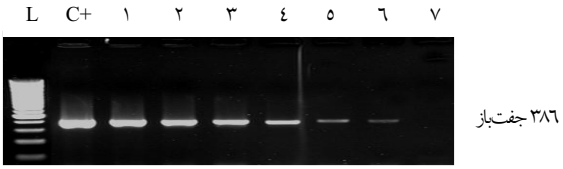
جدول ۱ غلظت DNA رقیق شده

*	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
**	۳۳ ng	۳/۳ ng	۳۳۰ pg	۳۳ pg	۳/۳ pg	۳۳۰ fg	۳۳ fg

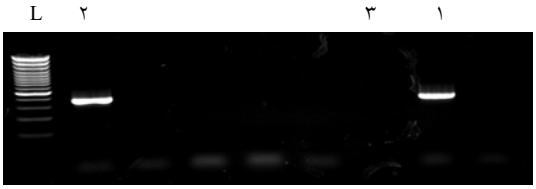
* شماره لوله؛ ** غلظت DNA؛ ng: نانوگرم؛ pg: پیکوگرم؛ fg: فمتوگرم

۳- نتایج

اشکال ۱ و ۲ حد نهایی تشخیص آغازگرها براساس رقت ژنومی (۳۳ فمتوگرم در ۱ میکرولیتر) و یک نمونه مثبت (دارای باند ۳۸٦ جفت‌باز) نشان داده شده است.



شکل ۱ حد نهایی تشخیص آغازگرها براساس رقت ژنومی؛ **Ladder**: ۱۰۰ جفت‌بازی، هر چاهک/ کنترل مثبت **(+C)**: ۳۳ نانوگرم، **۱)** ۳۳ نانوگرم، **۲)** ۳۳۰ پیکوگرم، **۳)** ۳۳ پیکوگرم، **٤)** ۳/۳ پیکوگرم، **٥)** ۳۳۰ فمتوگرم، **٦)** ۳۳ فمتوگرم، **۷)** کنترل منفی



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

تعداد ۱۰۰ نمونه از مناطق مختلف شهری تهران گرفته شده است. از ۱۰۰ نمونه گرفته شده ٤٤ نمونه از منطقه پارچین، ۳٥ نمونه از بیمارستان چمران، ۱۷ نمونه از درمانگاه فرحبخش و ٤ نمونه از مطب پزشک گرفته شد.

از نظر مثبت بودن نمونه‌ها، ۲۰ نمونه از ٤٤ نمونه گرفته شده از بیمارستان ارتش در پارچین، ۸ نمونه از ۳٥ نمونه گرفته شده از بیمارستان چمران، ٦ نمونه از ۱۷ نمونه گرفته شده از درمانگاه فرحبخش و ۲ نمونه از ٤ نمونه گرفته شده از مطب از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز مثبت شناخته شدند.

نتایج به‌دست آمده از کشت نمونه‌ها برای ردیابی لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که به‌طور کلی از ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، ۷ نمونه از نظر آلودگی با لیستریا مونوسیتوژنز مثبت هستند، ٦ مورد از این ۷ مورد در زنانی ردیابی شد که در سنین بارداری بودند. همچنین، نتایج به‌دست آمده از انجام PCR روی نمونه‌ها این گونه بود که ۳٦ نمونه از ۱۰۰ نمونه از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز 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	۱٤	٦	۲	۰
۳۰-۳۹	۳٥	۱۰	۱	۲	۰
٤۰-٤۹	۱٦	۷	۰	۲	۰
٥۰-٥۹	۱۲	۳	۰	۱	۰
٦۰-٦۹	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 کرده‌اند.

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

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

٤- بحث

وضعیت واقعی لیستریا مونوسیتوژنز در ایران ناشناخته است و اطلاعات کمی از حضور لیستریا مونوسیتوژنز 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. به‌علاوه هیچ بررسی یا توصیه‌ای مبنی بر حضور لیستریا مونوسیتوژنز

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

روش‌های اولیه شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز بیشتر بر مبنای خصوصیت فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی‌کنند. این روش‌ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی‌ژنی 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 [٤].

به دنبال پیشرفت‌های جدید در روش‌های ژنتیک مولکولی، روش‌هایی که ژن‌های منحصر به فردی در لیستریا مونوسیتوژنز را نشانه می‌گیرند، طراحی شده‌اند و لیستریا مونوسیتوژنز را از سایر گونه‌ها متمایز می‌کنند. این روش‌ها بسیار دقیق‌تر هستند و کمتر از روش‌های فنوتیپی با تغییرات محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند [٤].

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. آلودگی تک‌گیر (Sporadic) مواد غذایی، سطوح پایین آلودگی (≤ ۱۰۰ CFU)، حضور میکروفلور (Microflora) زیاد یا ارگانیسم‌های رقیب که می‌توانند حضور لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز (با آزمون‌های تأییدی) نیاز دارد. در حالی که در صورت بروز برخی از موارد آلودگی به عملکرد فوری نیاز است. به‌علاوه این روش‌ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه به مقدار زیاد باکتری‌های دیگر به‌علت تداخل در رشد لیستریا مونوسیتوژنز منجر به ایجاد نتایج منفی شود [۵].

در ۱۹٦۳ ژیونو (Giono) و پرز میراوت (Perez Miravet) در مکزیک لیستریا مونوسیتوژنز را از ترشحات واژن به روش کشت جدا کردند [٦].

در ۱۹۸٦ لامونت (Lamont) و پستبت‌ویت (Postlethwaite) در یک مطالعه، ناقلین مدفوعی، سرویکوواژینال (Cervicovaginal) و اوروفارنژیال (Oropharyngeal) گونه‌های لیستریا را در میان ٥٤ زن باردار سالم و ٦۰ زن غیر باردار سالم در اسکاتلند تعیین نمودند. نمونه‌ها در ٤ درجه سانتی‌گراد برای مرحله غنی‌سازی در سرما نگهداری شدند و سپس روی محیط انتخابی شامل آکری‌فلاوین (Acriflavine)، نالیدیکسیک اسید و پتاسیم تیوسیانات کشت داده شدند. لیستریا مونوسیتوژنز از مدفوع یک زن باردار (۲ درصد) و ۲ زن غیر باردار سالم (۳/٤ درصد) جداسازی شد. اما از نمونه‌های سرویکوواژینال و اوروفارنژیال لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی نشد [۷].

در سال ۲۰۰٦ نتیجه مطالعه دراز مدتی که استفانوویچ (Stepanovih) و وکوویچ (Vukovih) در بلگراد (صربستان) انجام دادند، منتشر شد. آن‌ها از ۹۵۸ زن (۷۹۹ بیمار با سقط جنین و ۱۵۹ بیمار نابارور) از ژانویه ۱۹۹۲ تا آگوست ۲۰۰٦ نمونه‌گیری از واژن را انجام دادند. پس از نمونه‌گیری، نمونه به‌صورت مستقیم در پلیت محتوی بلاد آگار کلمبیا (Columbia blood agar) کشت داده شد و هر سواپ در تریپتیکاز سوی براث (Trypticase soy broth) در ٤ درجه سانتی‌گراد تا ۵ هفته نگهداری شد. از این تعداد نمونه تنها ۱ نمونه محتوی لیستریا مونوسیتوژنز 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 ٤ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. کشت از هر نمونه در ۳ نوبت انجام گرفت. ۲ هفته پس از نمونه‌گیری، یک ماه پس از نمونه‌گیری و

۲ ماه پس از نمونه‌گیری، از نمونه‌ها کشت انجام شد. برای بهینه کردن شرایط رشد نمونه‌ها، نمونه‌ها در آگار خون‌دار محتوی نالیدیکسیک اسید، آمفوتریسین B و نیستاتین کشت داده شد. بهترین شرایط برای جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز از آن‌ها امکان‌پذیر شده بود، دیده شد.

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

در سال ۲۰۰٦ تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های واژن به روش PCR انجام شد. این آزمون، توسط شاکونتالا (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 سواپ واژن ٤٤/٤ درصد بوفالوهایی که مشکل تولیدمثلی داشتند لیستریا مونوسیتوژنز را به‌وسیله 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 در شناسایی باکتری بیماری‌زا است اما بیشترین اطلاعات گزارش شده در افزایش دقت روش PCR به اختصاصیت و حساسیت آغازگر برمی‌گردد [۱۰].

بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز به‌صورت ثابت باقی مانده است در حالی‌که ژن *iap* چنین نیست. ژن *iap* در انتهای ′3 و ′5 مناطق ثابتی دارد، در حالی‌که 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 مختلفی 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 مونوسیتوژنز استفاده کرده بودند و دقت 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 به‌دست آمده در این تحقیق انجام گرفت. توالی محصول PCR به‌دست آمده با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی GenBank ارزیابی و مقایسه شد. این بررسی نشان داد محصول PCR به‌دست آمده ۱۰۰ درصد اختصاصیت به لیستریا مونوسیتوژنز 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، دقت و اختصاصیت روش PCR بسیار بیش از روش کشت است. در

روش PCR ژنوم ارگانیسم مورد نظر ردیابی می‌شود و احتمال ردیابی ارگانیسم غیرفعال یا مرده نیز وجود دارد. اما روش کشت برمبنای 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 برمبنای مراجعه و نمونه‌گیری زنانی است که به‌علت بیماری به پزشک مراجعه کرده‌اند و ثانیاً علاوه بر روش PCR از روش‌های شناسایی دیگری مانند سرولوژی، کشت خون یا انجام PCR روی نمونه‌های خون هم به‌عنوان روش‌های مکمل استفاده شود.

۵- تشکر و قدردانی

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

٦- منابع

[1] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Listeria and Erysipelothrix. 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] 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: 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 ferequency 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

Quantitative detection of Listeria mono-cytogenes 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.

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.