

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 ظاهر 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، استریتوکوک آگالاکتیکه، 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 ویروالانس آن به نام های *actA*, *PrfA*, *InB* در بانوان دچار سقط جنین به روش PCR از اهداف این مطالعه می باشد.

مواد و روش 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 ویروالانس لیستریا مونوسیتوژنز به نام های *actA*, *InB*, *PrfA* با تکنیک PCR انجام شد.

یافته ها: در روش مولکولی فراوانی ژن های *actA*, *PrfA*, *InB* 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 *actA*, *PrfA*, *InB* 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 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 (۷ و ۱۴).

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 تربیتی کیس سوی برات رقیق شده (یک قسمت از نمونه در ۹ قسمت از برات) 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

و ۵-۳ بار تکان می دهیم و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm و 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 ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. قسمت بالایی محلول را دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر محلول NaCl 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 دور rpm 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 ۲۶۰/۲۸۰ A میزان جذب سنجیده شد که در صورت وجود DNA میزان جذب بالاتر از ۱/۵ بود. ۳ میکرولیتر 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 در جدول 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=۵'- AAC ACA GAT GAA TGG GAA GAA G۳' R=۵'- TCC ACT TGT ATA GCT GGT CG۳'	۲۷۸ bp	این مطالعه
PrfA	F= ۵'-TCA CGA GTA TTA GCG AGA ACG ۳' R= ۵'- TAG CTA GAC TCT ATC AAA CTT G۳'	۲۴۶ bp	این مطالعه
InlB	F= ۵'-TGA TGC TTT TGC AGA AAC AAT C۳' R=۵'- ATC ACT TAT ACC ATT ATG CTC C۳'	۳۱۹ bp	این مطالعه

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

actA لیستریا مونوسیتوزنز

دما	زمان	تعداد سیکل ها
۹۴	min۵	۱
۹۴	min۱	۳۶
۵۳	min۱	۳۶
۴۷		
۵۳		
۷۲	min۱	۳۶
۷۲	min۵	۱

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 (۱۶و۸).

پاسخ سرولوژی به آنتی ژن های کل سلول نمی تواند برای تشخیص به کار برده شود، زیرا واکنش متقاطع آنتی ژنی بین لیستریا مونوسیتوزنز و دیگر باکتری های گرم مثبت مثل استافیلوکوک ها (*Staphylococcus*) ، انتروکوک ها (*Enterococcus*) و باسیلوس ها (*Bacillus*) دیده می شود. به علاوه بیماری 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 مونوسیتوزنز می تواند برای تشخیص این میکروارگانیسم به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (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 غالباً حاوی فلور طبیعی واژن بوده و باکتری های بی هوازی و هوازی به صورت توأم در این نمونه ها حضور دارند و حضور دیگر باکتری ها در واژن می تواند با رشد لیستریا مونوسیتوزنز روی محیط کشت تداخل ایجاد کند (۱۵)، هدف از این مطالعه ، معرفی روش جدید PCR برای تشخیص لیستریا مونوسیتوزنز در نمونه های واژن می باشد.

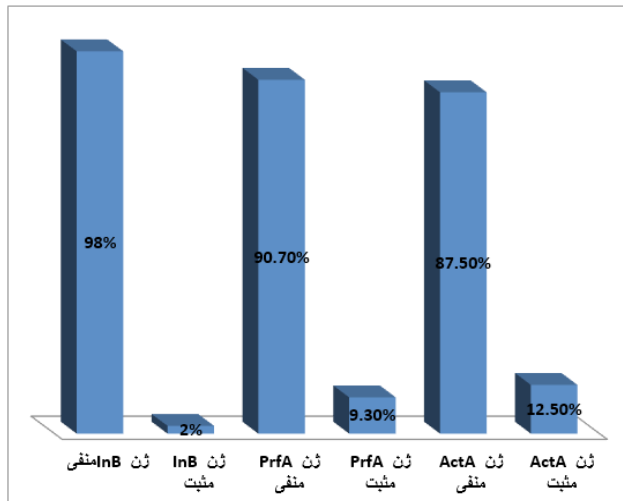
مواد و روش ها

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 قرار داده شد . ۲۰۰ میکرولیتر نمونه را با ۴۰۰ میکرولیتر محلول لایزینس 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

یافته ها

در بین ۶۹ سواب واژن فراوانی ژن های *BnI*, *AfrP*, *Atca* 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.

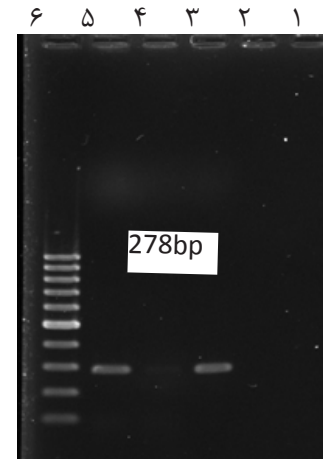


نمودار ۱- بررسی فراوانی ژن های ویروالانس لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های بانوان مبتلا به سقط مراجعه کننده به مراکز دانشگاهی سال ۹۲

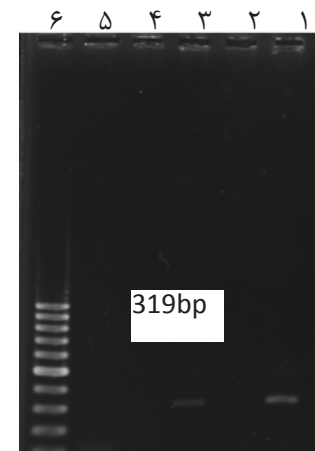
بحث

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 ۱۹٪-۲۵٪ 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 متأسفانه 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 (۱۵ و ۱۷). در تحقیق حاضر تعداد ۹۶ نمونه سقط با روش مولکولار از لحاظ حضور باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و ژن های ویروالانس آن مورد ارزیابی قرار گرفت؛ که شیوع ژن های *ActA*، *PrfA*، *InB* به ترتیب ۱۲/۵٪، ۹/۳٪ و ۲٪ گزارش گردید.

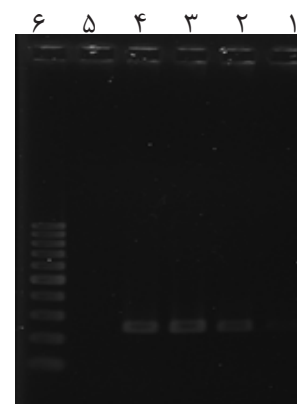
مطالعه ای توسط لیدا لطف الهی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه تهران روی شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در سقط های خود به خودی در انسان انجام شد.



شکل ۱- نمایش محصول PCR ژن *ActA* لیستریا مونوسیتوژنز در زنان مبتلا به سقط. ستون ۱- لدر ۱۰۰ bp فرمنتانس، ستون ۲- نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 7644، ستون ۳- نمونه بیمار مثبت، ستون ۴- نمونه بیمار منفی، ستون ۵- نمونه بیمار منفی ستون ۶- نمونه کنترل منفی.



مراجعه کننده به بیمارستان های شهید بهشتی در سال ۹۲. ستون ۱- لدر ۱۰۰ bp فرمنتانس، ستون ۲ و ۳- نمونه بیمار منفی، ستون ۴- نمونه بیمار مثبت، ستون ۵- نمونه کنترل منفی، ستون ۶- نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 7644.



شکل ۳- نمایش محصول PCR ژن *PrfA* لیستریا مونوسیتوژنز از زنان مبتلا به سقط. ستون ۱- لدر ۱۰۰ bp فرمنتانس، ستون ۲- نمونه کنترل منفی، ستون ۳- نمونه بیمار مثبت، ستون ۴- نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 7644، ستون ۵- نمونه بیمار منفی، ستون ۶- نمونه بیمار منفی.

طالقانی انجام شده است.

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 وسواب واژن و دو ایزوله مربوط به سواب مقعدی و یک ایزوله مربوط به ادرار بوده (۱۰) که دلیل انتخاب نمونه های سواب واژن در این 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 پیشنهاد 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 ویروالانس 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 ۱ نمونه دارای ژن های iap, hlyA, actA می 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

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 Ruminant 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. Listeria 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, Miiia 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 journal 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.

