مقاله تحقیقی

مقایسه روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) در تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در زنان باردار

شادی اسدی مقدم، فاطمه نوربخش *

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین –پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسوول مکاتبات:** دکتر فاطمه نوربخش، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران.
آدرس الکترونیکی: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین –پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری بی‌هوازی اختیاری و گرم مثبت است که در خاک، آب و مواد غذایی آلوده یافت می‌شود. این باکتری باعث بیماری شبه سرماخوردگی و انتریت خود محدود شونده می‌شود، اما در سالمندان، نوزادان، زنان باردار و افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند، موجب بیماری می‌گردد. این باکتری یکی از عوامل سقط جنین و مرده‌زایی می‌باشد. با توجه به وجود روش‌های مختلف جداسازی این باکتری، هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه‌ای روش‌های کشت و PCR برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان باردار است. این مطالعه بر روی نمونه واژن زنان باردار انجام شد. ابتدا نمونه ها در محیط Brain Heart Infusion broth (BHI) کشت داده شدند، سپس بر روی نمونه‌های کشت مثبت در محیط BHI broth، PCR و کشت بر روی محیط کشت اختصاصی لیستریا و تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. از ۲۰۰ نمونه تعداد ۵۰ نمونه از نظر وجود باکتری در محیط BHI broth مثبت بوده که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و کشت بر روی محیط کشت اختصاصی لیستریا، تعداد ۲۲ نمونه کشت مثبت، ۱۶ نمونه کشت منفی و ۱۲ نمونه مشکوک و همچنین از نظر واکنش PCR تعداد ۳۵ نمونه PCR مثبت و تعداد ۱۵ نمونه PCR منفی بود. نتایج نشان داد که روش PCR با وجود حساسیت، دقت و اختصاصیت نسبت به روش کشت و انجام تست‌های بیوشیمیایی برتری ندارد و نمی‌توان یکی را بر دیگری ارجح دانست و پیشنهاد می‌شود که در تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* از هر دو روش به صورت هم زمان و در یک راستا استفاده گردد.

کلید واژه ها: *لیستریا مونوسیتوژنز*، نمونه واژن، کشت، PCR

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری باسیل گرم مثبت کوتاه، درون‌سلولی و بی‌هوازی اختیاری بوده و اغلب از راه غذا منتقل می‌شود (۱،۲،۳). چون این باکتری قادر به رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، لذا در مواد غذایی نگهداری شده در یخچال رشد نموده و سبب آلودگی و انتقال از طریق مواد غذایی می‌شود (۲،۴). از آنجایی که این باکتری یک پاتوژن درون‌سلولی است، بیشتر موارد بیماری در افرادی اتفاق می‌افتد که سیستم ایمنی آنها آسیب دیده باشد (۳). این باکتری سبب بیماری مننژیت، عفونت خون، سقط جنین، مرده‌زایی و

منینگوانسفالیت در افراد مسن، زنان باردار، نوزادان و افرادی که سیستم ایمنی آنها آسیب دیده است، می‌شود (۵،۶،۷). زنان باردار به مراتب نسبت به عفونت لیستریوز حساس‌تر بوده و جفت محیط مناسبی برای رشد این باکتری می‌باشد. تشخیص لیستریوز را می‌توان با کشت نمونه‌های کلینیکی مانند: خون، مدفوع، جفت، ترشحات واژن و ادرار انجام داد (۳،۸). اگر چه، عفونت لیستریوز کمیاب است، اما زنان باردار ۲۰ برابر بیشتر نسبت به کل جمعیت در معرض خطرند و ۲۷ درصد از کل لیستریوز در زنان باردار رخ می‌دهند (۸،۹). لیستریا در نوزادان باعث پنومونی، عفونت خون و مننژیت می‌شود (۱۰). با توجه به توانایی رشد در دمای پایین، ذخیره نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (غنی‌سازی در سرما) به مدت ۲ الی ۸ هفته راندمان کشت را افزایش می‌دهد، ولی برای نمونه‌های بالینی وقت‌گیر است (۳). با توجه به نحوه انتشار درون‌سلولی این باکتری که بر پایه حرکتی اکتین صورت می‌گیرد، در معرض آنتی‌بادی سرمی، نوتروفیل و آنتی‌بادی‌های موجود در مایع خارج‌سلولی قرار نمی‌گیرد، هم چنین می‌تواند از سد خونی مغزی و جفت عبور کند (۸). روش‌های تشخیصی این باکتری شامل: کشت، آزمایش ایمونواسی، نوکلئیک اسید هیبریدیزاسیون، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، آزمایش فاژ IUX و آزمایش‌های ترکیبی کشت و مولکولی می‌باشد، با این حال هنوز یک روش جداسازی مطلوب ضروری می‌باشد (۱۱). رنگ‌آمیزی گرم تا ۳۳ درصد می‌تواند مفید باشد، اما با توجه به درون‌سلولی بودن ارگانیسم باعث خطای تشخیصی می‌شود. هم چنین احتمال اشتباه شدن با پنوموکوک (دیپلوکوک)، دیفتروئیدها و هموفیلوس وجود دارد (۸).

از آنجایی که نمونه‌های واژن غالباً حاوی فلور طبیعی بوده و باکتری‌های بی‌هوازی و هوازی به صورت 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، لذا در این مطالعه به مقایسه‌ی روش‌های کشت و PCR در تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان باردار پرداخته شده است. تحقیقات مشابهی در این زمینه در کشورهای مختلف انجام شده، ولی نتایج مشخصی در این مورد در ایران در دسترس نمی‌باشد و با توجه به اینکه سلامت مادر و جنین در دوران بارداری و عفونت‌های هنگام زایمان در سلامت نوزادان از اهمیت خاصی برخوردار است، لذا تشخیص سریع و صحیح موارد بیماری بسیار مهم می‌باشد. از این رو بررسی و انجام این چنین تحقیقاتی جهت بررسی کادر سلامت ضرورت خاصی دارد که در صورت تشخیص سریع بتوان به درمان اقدام نموده و یا بتوان از تولد نوزاد بیمار با عبور از کانال تولد آلوده جلوگیری کرد.

مواد و روش ها

تهیه سوش استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز

سوش استاندارد *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC-1294) از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. تست‌های بیوشیمیایی شناسایی سویه بر روی آن انجام شد. روش شناسایی آن، شامل مشاهده حرکت جهشی (tumbling) باکتری در لام مرطوب، کشت بر روی محیط اختصاصی (Listeria selective agar) *لیستریا مونوسیتوژنز* (Merck)، کشت بر روی بلاد آگار و مشاهده هاله همولیز بتا، رنگ‌آمیزی گرم و حرکت در SIM (Merck) در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همچنین انجام تست کاتالاز و اکسیداز است (۱۲).

نمونه برداری

از ۲۰۰ زن باردار بین هفته‌های ۲۸ الی ۳۷ بارداری مراجعه کننده به بیمارستان مرجع زنان تهران توسط سواپ واژینال نمونه‌گیری شد. نمونه‌برداری از افراد با رضایتمندی کامل و توسط ماما صورت گرفت. در روش نمونه‌برداری از سواپ‌های استریل استفاده شد، به طوری‌که ماما با استفاده از سواپ، از درون واژن ترشحات را برداشته و سپس سواپ را در لوله‌های حاوی محیط STmed

(Merck) قرار داده که این عمل جهت انتقال نمونه‌ها از بیمارستان به آزمایشگاه انجام شد.

انتقال نمونه ها به محیط (BHI broth)

پس از انتقال نمونه‌ها از بیمارستان به آزمایشگاه توسط محیط STmed، در آزمایشگاه سواپ‌ها در محیط BHI broth کشت داده شده و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارداده شد. پس از انجام انکوباسیون، از BHI broth جهت استخراج DNA نمونه‌های بالینی و همچنین کشت این نمونه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی لیستریا استفاده شد.

کشت نمونه‌های بالینی بر روی محیط کشت اختصاصی لیستریا

لوپ استریل را در داخل محیط BHI broth قرار داده و سپس بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی لیستریا به صورت روش ۴ مرحله‌ای کشت داده شد. کشت نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله چراغ گازی صورت گرفت. پلیت‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و از نظر تشکیل کلنی بررسی گردید. از کلنی های ایجاد شده در محیط کشت اختصاصی لیستریا برای رنگ‌آمیزی گرم و انجام تست‌های بیوشیمیایی شامل: تست حرکت (SIM)، تست بایل اسکولین، تست همولیز، تست اکسیداز و تست کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، هم زمان با تمام نمونه‌ها و طی همه موارد لیستریا مونوسیتوژنز استاندارد به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر

ژن هدف در این مطالعه ژن *hly* لیستریولیزین O بوده که این ژن ۱۵۹۰ جفت بازی است (۱۳). پرایمرها از روی ژن کد کننده *hly* طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده قطعه‌ای به اندازه ۲۱۰ جفت باز را تکثیر می‌نمایند. پرایمرها توسط شرکت (TAG Copenhagen) کشور دانمارک سنتز و خریداری شدند. توالی این پرایمرها به صورت زیر می‌باشد:

Forward:
5′-CGCAACAAACTGAAGCAAAGG-3′
Reverse: 5′-TTGGCGGCACATTTGTCAC-3′

دمای اتصال مناسب پرایمرها با توجه به گرادیان دمایی انجام شده برابر با ۶۲ درجه سانتی-گراد بود که توسط نرم‌افزار طراحی پرایمر OLIGO7 به دست آمد.

PCR

بعد از تهیه و استخراج DNA از نمونه‌های بالینی طبق برنامه کیت استخراج DNA (bioflux) PCR انجام شد. غلظت مواد مورد استفاده در PCR به صورت زیر بود:

در هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۸ میکرولیتر آب مقطر، به همراه [20mM(NH4)2SO4,75mM Tris-HCL، 10x buffer PCR ,1mM MgCl ,0.2mM dNTP mix ,taq polymerase 1.2 unit به همراه 20pm پرایمرهای اختصاصی بود. جهت انجام PCR دستورالعمل زیر به دستگاه ترموسایکلر داده شد:

۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه؛ ۳۵ چرخه و ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود و در نهایت، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد.

تعیین حساسیت PCR

جهت تعیین میزان حساسیت PCR ، یعنی تعیین حساسیت پرایمرها با کمترین حد ژنوم که با روش PCR قابل ردیابی است. ابتدا یک میکرولیتر از DNA سوش استاندارد *لیستریا مونوسیتوژنز* را با ۹ میکرولیتر آب مقطر مخلوط کرده که به این صورت غلظت ۱/۱۰ از DNA سوش استاندارد تهیه شود. سپس جهت تهیه غلظت ۱/۱۰۰، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱/۱۰ DNA سوش استاندارد را برداشته و با ۹ میکرولیتر آب مقطر مخلوط کرده، این مراحل تا غلظت ۱/۱۰۰۰۰۰ انجام شد.

تعیین اختصاصیت PCR

از این تست، جهت اختصاصی بودن پرایمرها و اثبات طراحی پرایمرها فقط برای ژن کد کننده *hly* لیستریولیزین O استفاده گردید. برای تعیین میزان اختصاصیت PCR از DNA باکتری های مختلف مانند: *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوک ارئوس* استفاده شد. به این صورت که واکنش PCR بین DNA انواع مختلف باکتری ها و پرایمرهای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز انجام شد.

نتایج

تست حرکت (SIM)

نمونه های بالینی کشت داده شده در محیط (SIM)، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به صورت حرکت چتری با تحرک بالا به وضوح مشاهده شد؛ اما نمونه هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته بودند، به صورت تحرک کم مشاهده شدند.

تست بایل اسکولین

کشت نمونه های بالینی در محیط بایل اسکولین آگار،به صورت نمونه های هیدرولیز کننده ی اسکولین که محیط بایل اسکولین آگار را به رنگ قهوه ای تا مشکی در آورده و بایل اسکولین آنها مثبت بوده و هم چنین نمونه هایی که هیچ گونه تغییر رنگی را در محیط ایجاد نکرده و بایل اسکولین آنها منفی بود.

تست همولیز

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون همولیز بتا در محیط بلاد آگار در اثر لیز شدن گلبول های قرمز صورت گرفت.

تست اکسیداز

نمونه های اکسیداز مثبت به صورت رنگ بنفش ارغوانی تا مشکی مشاهده شد و در دیسک نمونه های اکسیداز منفی تغییر رنگی صورت نگرفت.

تست کاتالاز

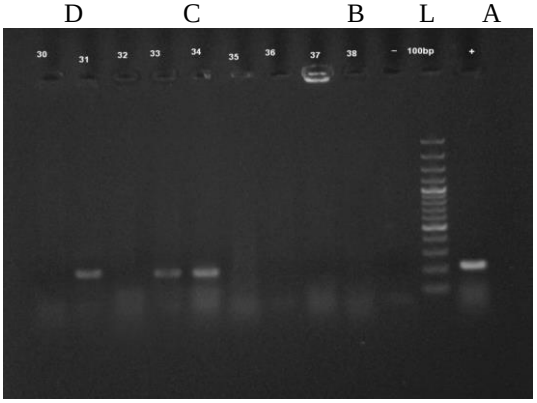
نمونه های کاتالاز مثبت در تماس با پراکسید هیدروژن به صورت تولید حباب مشاهده گردید و نمونه های کاتالاز منفی با عدم تولید حباب مشاهده شد.

کشت نمونه های بالینی

از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از زنان باردار، تعداد ۵۰ نمونه از نظر وجود باکتری در محیط BHI broth مثبت بوده که از این ۵۰ نمونه پس ازانجام تست های بیوشیمیایی و کشت بر روی محیط کشت اختصاصی لیستریا، تعداد ۲۲ نمونه از نظر لیستریا مونوسیتوژنز کشت مثبت و ۱۶ نمونه کشت منفی و ۱۲ نمونه مشکوک (برخی از تست های بیوشیمیایی در یک نمونه تایید کننده لیستریا مونوسیتوژنز بود و برخی از تست ها منفی بودند) مشخص گردید.

PCR نمونه های بالینی

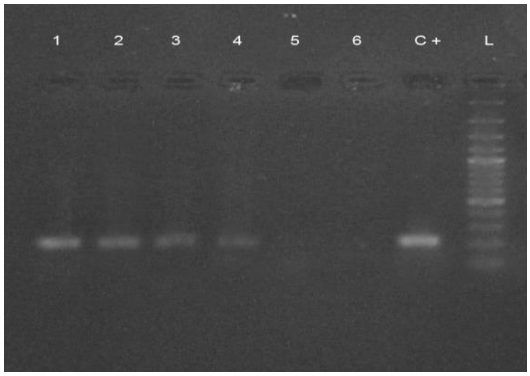
از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از زنان باردار، تعداد ۵۰ نمونه از نظر وجود باکتری در محیط BHI broth مثبت بوده که از این ۵۰ نمونه پس از انجام واکنش PCR تعداد ۳۵ نفر از نظر PCR، مثبت و تعداد۱۵ نفر از نظر PCR، منفی مشخص گردید (شکل ۱).



شکل ۱: محصول PCR الکتروفورز شده در ژل آگارز ۱٪، باند A- کنترل مثبت، L- DNA lader 100bp ، باند B- کنترل منفی، باند C- نمونه بالینی منفی، باند D- نمونه بالینی مثبت.

تست تعیین حساسیت PCR

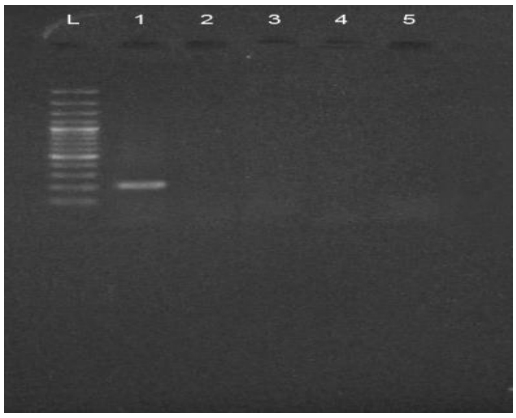
کمترین حد ژنوم که پرایمرها به آن حساس بوده و با روش PCR قابل ردیابی است، مشخص گردید که برابر با غلظت ۱/۱۰۰۰۰ DNA سوش استاندارد است (شکل ۲).



شکل ۲: محصول تست حساسیت PCR الکتروفورز شده در ژل آگارز ۱٪، 1- غلظت ۱/۱۰، 2- غلظت ۱/۱۰۰، 3- غلظت ۱/۱۰۰۰، 4- غلظت ۱/۱۰۰۰۰، 5- غلظت ۱/۱۰۰۰۰۰ ، 6- غلظت ۱/۱۰۰۰۰۰۰ ، L- DNA lader 100bp.

تست تعیین اختصاصیت PCR

اختصاصی بودن کامل پرایمرها برای ژن *hly* لیستریولیزین O مشخص شد و پرایمرها با هیچ یک از DNA باکتری های مختلف واکنش PCR نداده است (شکل ۳).



شکل ۳: محصول تست اختصاصیت PCR الکتروفورز شده در ژل آگارز ۱٪، L- DNA lader 100bp, 1- *Lisreria monocytogenes*, 2- *Escherichia coli* ATCC 25922, 3- *Bacillus cereus* ATCC 9634, 4- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 5- Negative control

نتایج فراوانی PCR و کشت در نمودار های ۱و ۲ نشان داده شده است. اغلب نمونه هایی که نتایج PCR آنهامثبت شدند از نظر کشت نیز مثبت بود واکثر نمونه هایی که از نظر تکثیر ژن*hly* منفی بودند در محیط کشت نیز نتیجه منفی نشان دادند.

در این مطالعه همچنین میزان فراوانی آلودگی با لیستریا مونوسیتوژنز و عفونت ادراری، سابقه سزارین، سابقه سقط و مصرف آنتی بیوتیک با دو روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز بررسی گردید (جداول ۱ و ۲ و نمودارهای ۳ و ۴). در هر دو روش نتایج یکسانی مشاهده شد.

بحث

روش‌های اولیه شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* بیشتر بر مبنای خصوصیت فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی‌کنند. این روش ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتروفاژی است. ازآنجاکه این خصوصیات می‌توانند با تغییر شرایط خارجی،مرحله رشد و جهش های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، بنابراین استفاده از تست‌های فنوتیپی گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می‌شود (۱۴ و۱۵).

به دنبال پیشرفت‌های جدید در تکنیک‌های ژنتیک مولکولی، روش‌هایی که ژن‌های منحصربه‌فردی در *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشانه می‌گیرند، طراحی‌شده‌اند و *لیستریا مونوسیتوژنز* را از سایر گونه‌ها متمایز می کنند. این روش‌ها بسیار دقیق‌تر هستند و کمتر از روش‌های فنوتیپی با تغییرات محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند(۱۵ و۱۶).

در مطالعه ژیونو وهمکاران در سال ۱۹۶۳ در مکزیک لیستریا مونوسیتوژنز را از ترشحات واژن به روش کشت جدا کردند (۱۷).

مطالعات PCR بر روی لیستریا مونوسیتوژنز در دهه ۹۰ آغازشد. در سال ۱۹۹۲ بونرت و همکاران با استفاده ازپرایمرهای PCRGO و PCRDO برای ژن *hly* ردیابی دقیق تری را برای لیستریا مونوسیتوژنز در لبنیات امکانپذیر کردند(۱۸).

در مطالعه ی جهانگیری و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی نمونه هایی مثل: خون، ادرار، جفت و

سرویکس کار کردند و نتایج نشان داد که هیچ مورد مثبتی در روش کشت جداسازی نشد و تنها در روش PCR ژن *hly A* *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شد و روش مولکولی PCR در تشخیص باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از روش کشت اختصاصی تر بوده و بر آن برتری دارد(۱۴). در مطالعه حاضر تنها از نمونه ی واژینال استفاده شد و از هر دو روش تشخیصی کشت به همراه تست های بیوشیمیایی جهت متمایز نمودن *لیستریا مونوسیتوژنز* از سایر باکتری های دیگر و روش PCR موارد مثبتی تعیین شد. نتایج روش کشت و PCR به یکدیگر بسیار نزدیک مشاهده گردید و برتری بین دو روش وجود نداشت.

Bakardjiev و همکاران در سال ۲۰۰۶ به مطالعه ی میزان آلودگی جفت به لیستریا مونوسیتوژنز زنان باردار پرداختند، آنها همچنین مقایسه ای بین مصرف آنتی بیوتیک و نتایج بدست آمده از کشت را انجام دادند و نشان دادند که نمونه ی افرادی که مدتی قبل از نمونه گیری آنتی بیوتیک مصرف کرده بودند امکان ردیابی *لیستریا مونوسیتوژنز* وجود ندارد(۱۶). در مطالعه حاضر نیز عدم امکان ردیابی *لیستریا مونوسیتوژنز* در صورت مصرف آنتی بیوتیک اثبات گردید.

در مطالعه ی جمشیدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در بندرعباس با روش ایمونوفلورسانس به تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان با سابقه سقط و زنان با دوره بارداری کامل پرداختند و نتایج نشان داد که میزان آنتی بادی برای *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان با سابقه سقط بسیار بالاتر از زنان با دوره ی کامل بارداری است(۱۹). در مطالعه حاضر نیز تعداد افراد با سابقه سقط نتایج مثبتی را برای وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* اثبات نمود.

فاکتورهای زیادی مثل حضور بازدارنده های PCR در نمونه، شناسایی سلول های زنده و غیرقابل کشت، اختصاصیت پرایمر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی کننده می توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تأثیر قرار دهند (۲۰).

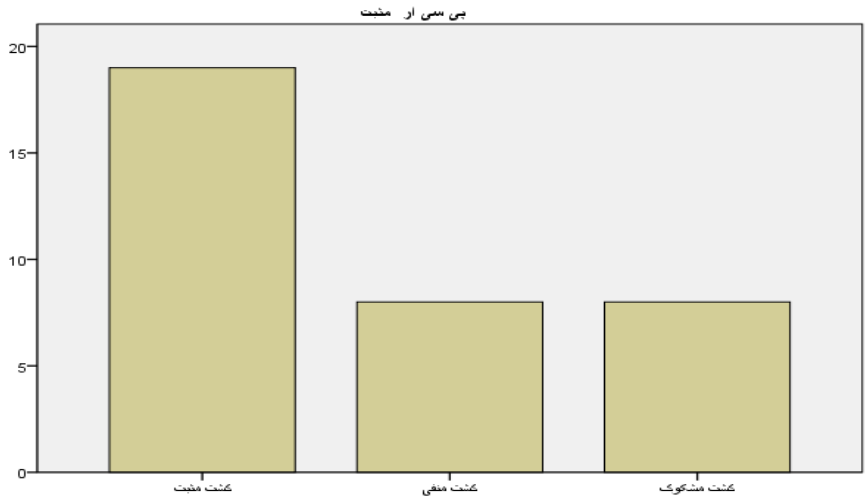
بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی لیستریا مونوسیتوژنز انجام گرفته است براساس ردیابی ژن های ویرولانس *hly* و *iap* که لیستریولیزین O را کد می کند و ژن کدکننده پروتئین P60 سطحی که عامل تهاجم است، بوده است. ژن *hly* در تمام سویه های لیستریا مونوسیتوژنز به صورت ثابت باقی مانده است در حالی که ژن *iap* چنین نیست. ژن *iap* در انتهای ´3و ´5 مناطق ثابتی دارد، در حالی که در مناطق مرکزی بسیار متغیر است و شامل توالی های چندشکل است که حتی در بین سویه های یک سرووارهم متفاوت است(۲۴-۲۱). به دلایل اشاره شده در بالا، در این مطالعه از ژن *hly* ا ستفاده شد.

هدف از این مطالعه مقایسه نتایج بدست آمده در روش کشت استاندارد با روش PCR در زنان باردار بود و نتایج این مطالعه نشان داد که با توجه به بالا بودن میزان حساسیت، دقت و اختصاصیت روش PCR ، این روش در کنار روش کشت دارای بازدهی بیشتر است.

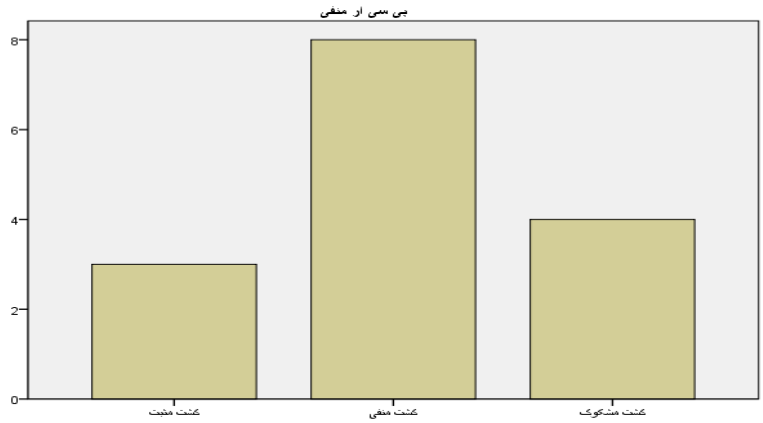
مقایسه بین نتایج کشت و PCR در این مطالعه، برتری را نسبت به هم نشان نداده بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می توان نتیجه گرفت، که با توجه به یکسان بودن نتیجه کشت و PCR به دلیل اینکه روش های کشت وقت گیر و گران است روش PCR نسبت به روش کشت برتری دارد، ولی از آنجا که ارگانیسم زنده و غیر زنده در روش PCR قابل تمیز نیست لذا بهتر است ابتدا با روش مولکولی بررسی انجام گیرد، در صورت مثبت بودن برای تأیید ارگانیسم زنده کشت میکروارگانیسم نیز انجام شود.

با توجه به افزایش خطر ابتلا به لیستریوز در دوران بارداری که منجر به التهاب جفت، عفونت جنین، سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا تولد زود هنگام می شود، در نتیجه سلامت مادر و جنین در دوران بارداری از اهمیت خاصی برخوردار است لذا ضروری به نظر می رسد که تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان باردار به سرعت و با دقت بالاانجام گیرد، که در صورت تشخیص سریع بتوان به

درمان اقدام نموده و یا بتوان از تولد نوزاد بیمار با
عبور از کانال تولد آلوده جلوگیری کرد.



نمودار ۱: فراوانی توصیفی نتایج PCR مثبت و نتایج کشت.



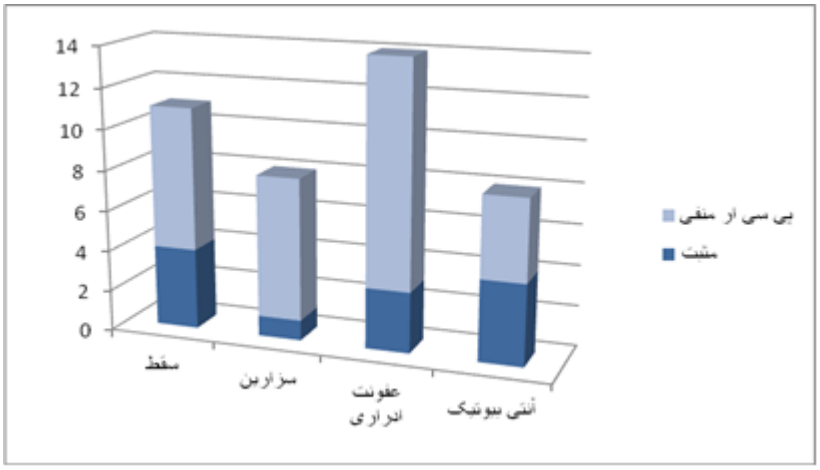
نمودار ۲ : فراوانی توصیفی نتایج PCR منفی و نتایج کشت.

جدول ۱: فراوانی توصیفی نتایج PCR و نتایج سابقه سقط، سابقه سزارین، عفونت ادراری و مصرف آنتی بیوتیک.

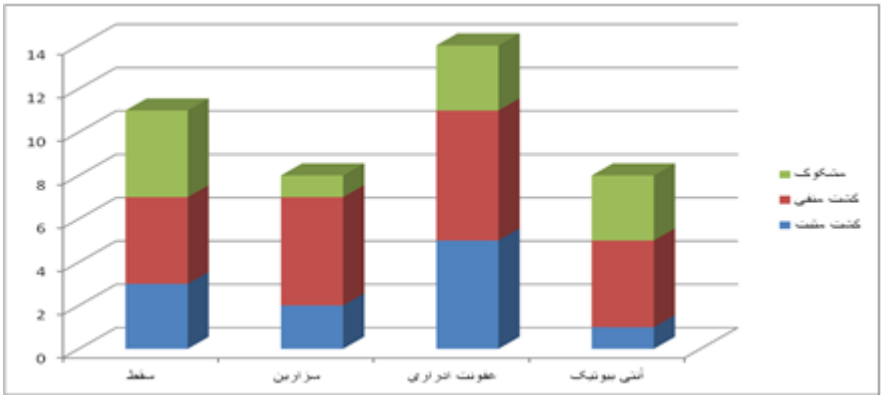
مصرف آنتی بیوتیک	عفونت ادراری	سزارین	سابقه سقط	PCR
۴	۳	۱	۴	مثبت
۴	۱۱	۷	۷	منفی

جدول ۲: فراوانی توصیفی نتایج کشت و نتایج سابقه سقط، سابقه سزارین، عفونت ادراری و مصرف آنتی بیوتیک

مصرف آنتی بیوتیک	عفونت ادراری	سزارین	سابقه سقط	کشت
۱	۵	۲	۳	مثبت
۴	۶	۵	۴	منفی
۳	۳	۱	۴	مشکوک



نمودار ۳ : فراوانی توصیفی نتایج PCR و نتایج سابقه سقط، سابقه سزارین، عفونت ادراری و مصرف آنتی بیوتیک.



نمودار ۴ : فراوانی توصیفی نتایج کشت و نتایج سابقه سقط، سابقه سزارین، عفونت ادراری و مصرف آنتی بیوتیک.

منابع مورد استفاده

1. Mahdizadeh, M., Rastegar, H., Farshimrad, F., Listerios due to food. Kerman University of Medical Science: 181-190.
2. Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Regitha, J. S., Lekshm, M., Dharsana, K. S., Prasad, P., 2007. Listeria – review of epidemiology and pathogenesis. J Microbial Immunol Infect 40: 4-13.
3. Sedighimoghadam, B., 2001. Assessment to indirect method of hemagglutinatinin diagnosis of Listeria monocytogenes and other comparison with indirect immunofloresence method. Journal of Semnan University of Medical Science 3(4): 123-9.
4. Walker, S., Archer, P. J. B., 1990. Growth of Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology 68: 157–62.
5. Kargar, M., Ghasemi, A., 2009. Role of Listeria monocytogenes hly gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. Iranian Journal of Clinical Infection Diseases 4(4): 214-8.
6. Kaur, S., Malik, S. V. S., Vaidya, V. M., Barbudde, S. B., 2009. Listeria monocytogenes in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology 103: 1889-96.
7. Low, J. C., Donachie, W., 1999. Areview of Listeria monocytogenes and listeriosis. Journal of Medical Microbiology 153: 9-29.
8. Janakiraman, V., 2008. Listeriosis in pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. Review in Obstetrics and Gynecology 1(4): 179-85.
9. Ogunmodede, F., Jones, J. L., Scheftel, J., Kirkland, F., Schulkin, J., Lynfield, R., 2010. Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 13(1): 11-5.
10. Pourjafar, M., Badiei, K., Oryan, A., Tabatabei, M., Ghane, M., Ahmadi, N., 2011. Clinico-pathological, bacteriological and PCR findings of ovine listeriosis: An

Emerging disease in southern iran. J Perinat Med 39: 227–36.
11. Pron, B., BoumailaC, Jaubert F, Sarnacki S, Monnet J, Berche P, et al. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infection and Immunity. 1998; 66(2): 747-55.
12. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Faller, M. A., 2009. Listeria and Erysipelothrix. Medical Microbiology, 8th ed. 1: 178-183.
13. Aznar, R., Alarcón, B., 2003. PCR detection of Listeria monocytogenes: a study of multiple factors affecting sensitivity. J Appl Microbiol 95(5): 958-66.
14. Jahangirisisakht, A., Kargar, M., Mirzaee, A., Aramesh, S. H., Akbartabar, M., Mohamadkhani, N., Rezaee, Z., 2012. Comparison the standard culture method and molecular method in diagnosis of Listeria monocytogenes. Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ). 17(2): 156-163.
15. Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important food borne pathogen. Journal of Medical Microbiology 55: 645–59.
16. Bakardjiev, A. I., Theriot Julie, A., Portnoy, D. A., 2006. Listeria monocytogenes Trafics from Maternal organs to the placenta and Bak. Plos pathogens 2: 623-31.
17. Giono, S., Perez Miravete, A., 1963. Perinatal Listeria infection in Mexico and investigation of Listeria monocytogenes in the vaginal exudate. Rev Inst Salubr Enferm Trop 23: 95-101.
18. Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J. P. C., 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of Listeria monocytogenes in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. Research in Microbiology 143(3): 271-80.
19. Jamshidi, M., Sotoodeh Jahromi, A., Davoodian, P., Amiryan, N., Zangeneh, M., Jadcareh, F., 2009. Seropositivity for Listeria monocytogenes in women with spontaneous abortion: A case-control study in iran. Taiwan J Obstet Gynecol 48(1): 46-8.
20. Bessesen, M. T., Luo, H. A., Rotbart, M. J., Blaser, R. T., 1990. Detection of Listeria monocytogenes by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 56: 2930-2932.
21. Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., Scortti, M., Esteve, T., Vazquez-Boland, J. M. P., 2004. Quantitative Detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by Real-Time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483. Targets and AmpliFluor Technology Applied and Environmental Microbiology 70(3):1366-77.
22. Chen, Y., Kumar, N., Siddique, N., 2011. Development and evaluation of a real time polymerase chain reaction assay targeting iap for the detection of Listeria monocytogenes in select food matrices. FEMS Immunol Med Microbio 8(10): 1063–1069.
23. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., 1999. Detection and differentiation of Listeria spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Application of Environmental Microbiology 65: 4688–92.
24. Stepanovic, S., Vukovih, D., Djukic, S., Cirkovic, I., Svabic Vlahovic, M., 2007. Long term analysis of Listeria monocytogenes vaginal carriage frequency in Belgrade, Serbia. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 54(2): 195-9.