

مقاله تحقیقی

مقایسه روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلیمرز (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: nilofar_noorbakhsh@yahoo.com

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

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۸

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 نمونه‌ها 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 هم‌زمان و در یک راستا استفاده گردد.

کلید واژه‌ها: لیستریا مونوسیتوژنز، نمونه واژن، کشت، PCR

مقدمه

رشد نموده و سبب آلودگی و انتقال از طریق مواد غذایی می‌شود (۲،۴). از آنجایی که این باکتری یک پاتوژن درون سلولی 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

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری باسیل گرم مثبت کوتاه، درون سلولی 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

مننگوانسفالیت در افراد مسن، زنان باردار، نوزادان و افرادی که سیستم ایمنی آنها آسیب دیده است، می-شود (۵،۶،۷). زنان باردار به مراتب نسبت به عفونت لیستریوز حساس تر بوده و جفت محیط مناسبی برای رشد این باکتری می-باشد. تشخیص لیستریوز را می-توان 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 می-دهند (۸،۹). لیستریا در نوزادان باعث پنومونی، عفونت خون و مننژیت می-شود (۱۰). با توجه به توانایی رشد در دمای پایین، ذخیره نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی-گراد (غنی‌سازی در سرما) به مدت ۲ الی ۸ هفته راندمان کشت را افزایش می-دهد، ولی برای نمونه‌های بالینی وقت‌گیر است (۳). با توجه به نحوه انتشار درون سلولی این باکتری که بر پایه حرکتی اکتین صورت می-گیرد، در معرض آنتی-بادی سرمی، نوتروفیل و آنتی‌بادی‌های موجود در مایع خارج سلولی 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 پلیمرز (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 درون سلولی 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 مونوسیتوزنز 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 مونوسیتوزنز 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 مونوسیتوزنز

سوش استاندارد لیستریا مونوسیتوزنز (PTCC-1294) از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. تست‌های بیوشیمیایی شناسایی سوپه 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 مونوسیتوزنز (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 سوپ واژینال نمونه‌گیری شد. نمونه-برداری از افراد با رضایتمندی کامل و توسط ماما صورت گرفت. در روش نمونه‌برداری از سوپ‌های استریل استفاده شد، به طوری که ماما با استفاده از سوپ، از درون واژن ترشحات را برداشته و سپس سوپ را در لوله‌های حاوی محیط STmed

خریداری شدند. توالی این پرایمرها به صورت زیر می‌باشد:

Forward:

5'-CGCAACAACTGAAGCAAAGG-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 پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۸ میکرولیتر آب مقطر، به همراه ۲۰mM(NH₄)₂SO₄, 75mM Tris-HCL, 1mM, 10x buffer PCR taq, 0.2mM dNTP mix, MgCl₂ 20pm unit polymerase به همراه 1.2. 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.

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

انتقال نمونه‌ها به محیط (BHI broth)

پس از انتقال نمونه‌ها از بیمارستان به آزمایشگاه توسط محیط STmed، در آزمایشگاه سوپاها در محیط BHI broth کشت داده شده و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده 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 کلنی‌های 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، هم‌زمان 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

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* /*رئوس* 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

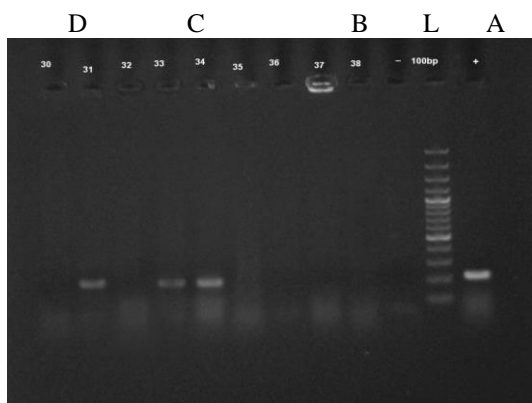
نمونه های کاتالاز مثبت در تماس با پراکسید هیدروژن به صورت تولید حباب مشاهده گردید و نمونه های کاتالاز منفی با عدم تولید حباب مشاهده شد.

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 از انجام 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

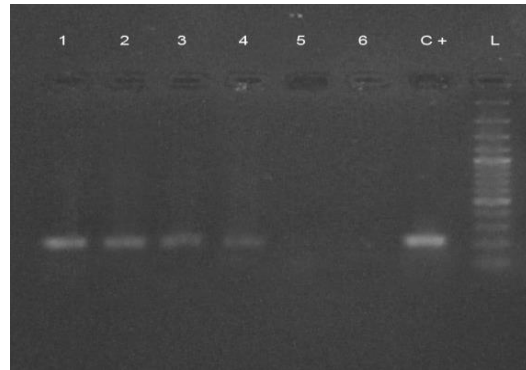
از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از زنان باردار، تعداد ۵۰ نمونه از نظر وجود باکتری در محیط BHI broth مثبت بوده که از این ۵۰ نمونه پس از انجام واکنش PCR تعداد ۳۵ نفر از نظر PCR، مثبت و تعداد ۱۵ نفر از نظر PCR، منفی مشخص گردید (شکل ۱).



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

تست تعیین حساسیت PCR

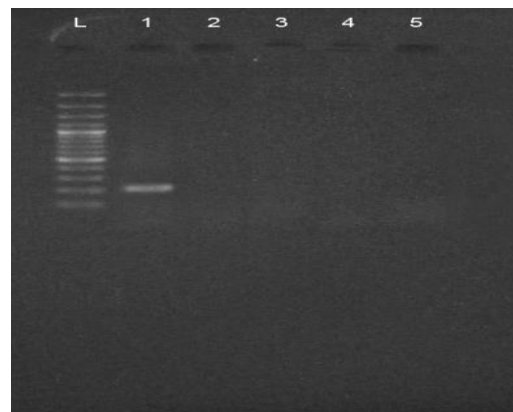
کمترین حد ژنوم که پرایمرها به آن حساس بوده و با روش PCR قابل ردیابی است، مشخص گردید که برابر با غلظت $1/10000$ DNA سوش استاندارد است (شکل ۲).



شکل ۲: محصول تست حساسیت PCR الکتروفورز شده در ژل آگارز $1/1$ ، 1- غلظت $1/10$ ، 2- غلظت $1/100$ ، 3- غلظت $1/1000$ ، 4- غلظت $1/10000$ ، 5- غلظت $1/100000$ ، 6- غلظت $1/1000000$ ، DNA ladder 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 $1/1$ ، 1- DNA ladder 100bp، 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 ۱ و ۲ نشان داده شده است. اغلب نمونه هایی که نتایج PCR آنها مثبت شدند از نظر کشت نیز مثبت بود و اکثر 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 پلیمرز بررسی گردید (جداول ۱ و ۲ و نمودارهای ۳ و ۴). در هر دو روش نتایج یکسانی مشاهده شد.

بحث

روش های اولیه شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز بیشتر بر مبنای خصوصیت فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی کنند. این روش ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتروفژی است. از آنجا که این خصوصیات می توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش های ژنتیکی تصادفی تغییر پیدا کنند، بنابراین استفاده از تست های فنوتیپی گاه منجر به اخذ نتایج کاذب می شود (۱۴ و ۱۵).

به دنبال پیشرفت های جدید در تکنیک های ژنتیک مولکولی، روش هایی که ژن های منحصربه فردی در لیستریا مونوسیتوژنز را نشانه می گیرند، طراحی شده اند و لیستریا مونوسیتوژنز را از سایر گونه ها متمایز می کنند. این روش ها بسیار دقیق تر هستند و کمتر از روش های فنوتیپی با تغییرات محیطی تحت تأثیر قرار می گیرند (۱۵ و ۱۶). در مطالعه ژینونو و همکاران 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 آغاز شد. در سال ۱۹۹۲ بونرت و همکاران با استفاده از پرایمرهای PCRGO و PCRDO برای ژن *hly* ردیابی دقیق تری را برای لیستریا مونوسیتوژنز در لبنیات امکان پذیر 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 نمونه‌ی 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 غیر قابل کشت، اختصاصیت پرایمر، شناسایی مستقیم یا استفاده از مراحل غنی کننده می توانند حساسیت یک روش شناسایی PCR را تحت تأثیر قرار دهند (۲۰).

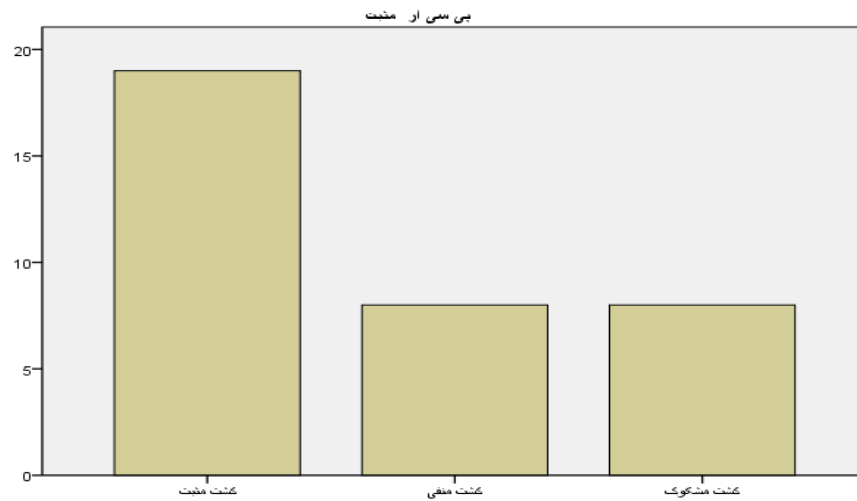
بسیاری از تحقیقات بر مبنای PCR که روی لیستریا مونوسیتوژنز انجام گرفته است براساس ردیابی ژن های ویروالانس *hly* و *iap* که لیستریولیزین O را کد می کند و ژن کدکننده پروتئین P60 سطحی که عامل تهاجم است، بوده است. ژن *hly* در تمام سویه های لیستریا مونوسیتوژنز به صورت ثابت باقی مانده است در حالی که ژن *iap* چنین نیست. ژن *iap* در انتهای 3 و 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 سروارهم متفاوت است (۲۴-۲۱). به دلایل اشاره شده در بالا، در این مطالعه از ژن *hly* استفاده 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.

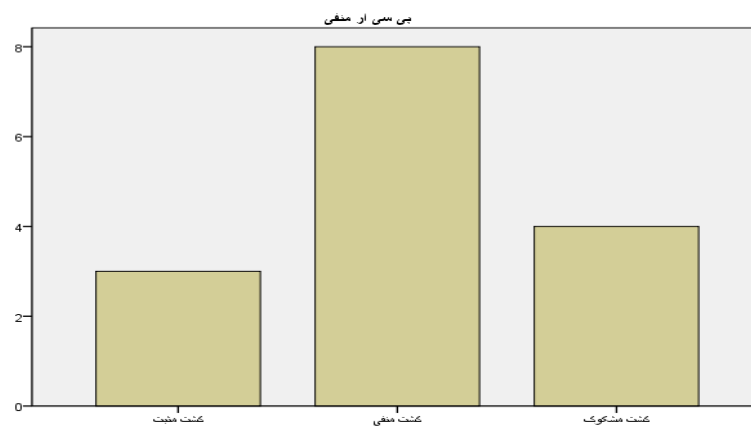
مقایسه بین نتایج کشت و PCR در این مطالعه، برتری را نسبت به هم نشان نداده بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می توان نتیجه گرفت، که با توجه به یکسان بودن نتیجه کشت و PCR به دلیل اینکه روش های کشت وقت گیر و گران است روش PCR نسبت به روش کشت برتری دارد، ولی از آنجا که ارگانسیم زنده و غیر زنده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



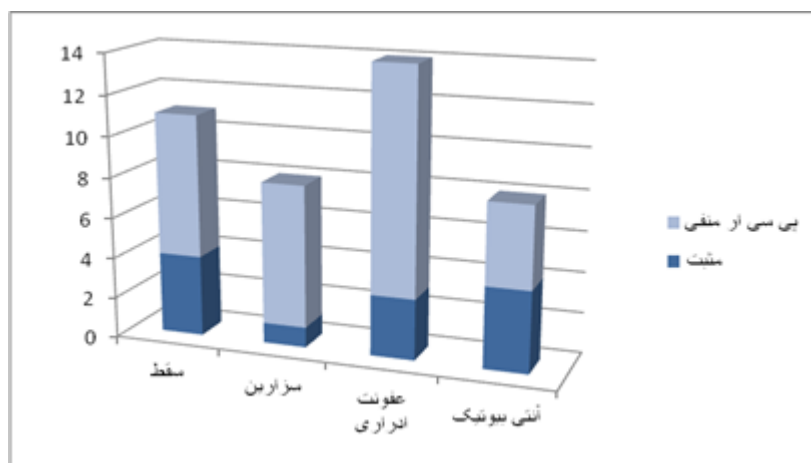
نمودار ۲: فراوانی توصیفی نتایج PCR منفی و نتایج کشت.

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

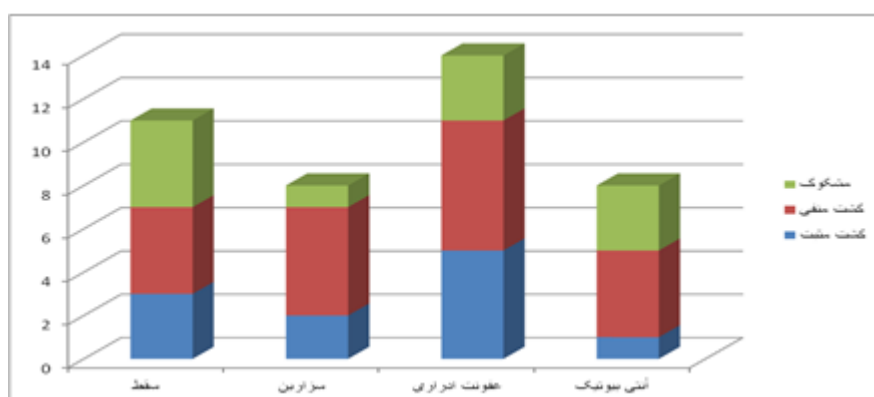
PCR	سابقه سقط	سزارین	عفونت ادراری	مصرف آنتی بیوتیک
مثبت	۴	۱	۳	۴
منفی	۷	۷	۱۱	۴

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

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



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

- Mahdizadeh, M., Rastegar, H., Farshimrad, F., Listerios due to food. Kerman University of Medical Science: 181-190.
- 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.
- Sedighimoghadam, B., 2001. Assessment to indirect method of hemagglutininin diagnosis of Listeria monocytogenes and other comparison with indirect immunofloresence method. Journal of Semnan University of Medical Science 3(4): 123-9.
- Walker, S., Archer, P. J. B., 1990. Growth of Listeria monocytogenes at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology 68: 157-62.
- 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.
- 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.
- Low, J. C., Donachie, W., 1999. Areview of Listeria monocytogenes and listeriosis. Journal of Medical Microbiology 153: 9-29.
- Janakiraman, V., 2008. Listeriosis in pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. Review in Obstetrics and Gynecology 1(4): 179-85.
- 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.
- Pourjafar, M., Badiei, K., Oryan, A., Tabatabaei, 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., Boumaila C, 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. Jahangirisakht, 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* Traffics 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., Scotti, 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., Vukovich, 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.