

Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from pregnant women with and without history of abortion and detection of hemolysin (hlyA) gene in clinical samples

Somayeh Heidari¹, Mohammad Mahdi Soltan Dallal²

1. Master of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research branch, Tehran, Iran, Tel:087-33669068

Email:heidari.somayeh1@yahoo.com

2. Department of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Abortion is one of the most important medical problems which imposes a high cost on the households. *Listeria monocytogenes* is one of the most important causes of abortion and postpartum infection in the newborns. The aim of this study was to determine the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the pregnant women and compare its prevalence rates between women with and without a history of abortion in Tehran and also prevalence of hlyA virulence gene.

Materials and Method: In this cross sectional study, from May 2016 to December 2016 clinical samples of vaginal discharge were taken from pregnant women with and without a history of abortion. All of the samples (100 sample) were collected from the patients referring to Arash Hospital in Tehran, by a gynecologist. The women filled out a questionnaire. The pregnant women who had received antibiotic were excluded from the study. All samples were transferred to the microbiological lab, rapidly.

Results: After culture and differential tests, among 100 sample we isolated *Listeria* from 7 % (7 strains) of the samples (4 strains of *L. monocytogenes* and 3 strains of *Listeria seeligeri*). In the samples taken from pregnant women with a history of abortion we found 3 stains of *L. monocytogenes* and one strain of *Listeria seeligeri*. In the samples obtained from pregnant women without a history of abortion one stains of *L. monocytogenes* and 2 strains of *Listeria seeligeri* were detected.

Conclusion: The results of this study showed that the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the pregnant women with a history of abortion is more than that in the pregnant women without a history of abortion.

Despite the fact that this bacterium was not confirmed as a major cause of abortion in our study, but it may expose pregnant women to the risk of this problem.

Key words: Abortion, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, Pregnancy

How to cite the article:

Somayeh Heidari, Mohammad Mahdi Soltan Dallal. Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from pregnant women with and without history of abortion and detection of hemolysin (hlyA) gene in clinical samples. SJKU.2018;23(4):100-111. URL: <http://sjku.muk.ac.ir/article-1-3586-fa.html>

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از خانم های باردار با و بدون سابقه سقط و تعیین ژن همولیزین (*hlyA*)

سمیه حیدری^۱، محمد مهدی سلطان دلال^۲

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۳۳۶۶۹۰۶۸-

heidarisomayeh1@yahoo.com.۰۰۸۷

۲. استاد بخش میکروبی‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سقط یکی از معضلات مهم پزشکی پیش روی جوامع هست که متحمل کننده ی هزینه‌های زیادی به خانوار است. لیستریا مونوسیتوژنز (L.m) از جمله باکتری‌های بالقوه مؤثر بر سقط جنین و عفونت پس از زایمان در نوزادان است. هدف از انجام این تحقیق تعیین میزان فراوانی این باکتری در زنان باردار و مقایسه آن در زنان باردار با سابقه سقط و بدون سابقه سقط جنین در تهران و همچنین بررسی شیوع ژن ویروولانس *hlyA* در آن هاست.

روش بررسی: در این مطالعه که به صورت مقطعی انجام گردید. از اردیبهشت سال ۱۳۹۵ تا دی سال ۱۳۹۵، نمونه‌های بالینی (ترشحات واژن) زنان باردار با سابقه سقط و همچنین زنان باردار بدون سابقه سقط جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها (۱۰۰ نمونه) از افراد مراجعه کننده به بیمارستان آرش (تهران) توسط پزشک متخصص زنان گرفته شد. فرم پرسشنامه توسط افراد تکمیل گردید، نمونه‌گیری از خانم‌های باردار دریافت کننده درمان آنتی بیوتیکی صورت نگرفت. تمامی نمونه‌ها در کمترین زمان به آزمایشگاه میکروبی انتقال داده شد.

یافته‌ها: از میان ۱۰۰ نمونه بالینی پس از کشت و آزمایش‌های افتراقی ۷ جدایه (۷ درصد) باکتری لیستریا جداسازی شده که ۴ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۳ جدایه لیستریا سیلیگری (L.S) بودند. در این میان جدایه‌هایی که از زنان باردار با سابقه سقط جداسازی شده بودند شامل ۳ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۱ جدایه لیستریا سیلیگری بودند و جدایه‌هایی که از زنان باردار بدون سابقه سقط جداسازی شده بودند شامل ۱ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۲ جدایه لیستریا سیلیگری بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که موارد آلوده به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در خانم های باردار با سابقه سقط جنین بیشتر از خانم های باردار بدون سابقه سقط جنین است. علی‌رغم اینکه این باکتری در این مطالعه به عنوان عامل اصلی سقط مشخص نشد اما ممکن است این خطر را برای زنان باردار داشته باشد.

واژه های کلیدی: سقط جنین، لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا سیلیگری، بارداری

وصول مقاله: ۹۶/۹/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۶/۳۱ پذیرش: ۹۷/۷/۱

مقدمه

در چند سال اخیر پدیده سقط خودبه‌خودی جنین، نظر محققین زیادی را به خود جلب کرده است و باکتری‌هایی مانند لیستریا مونوسی‌توزنر، استرپتوکوک آگالاکتیه، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما از عوامل مهم آن به شمار می‌روند که در صورت عدم شناسایی، منجر به سقط مکرر و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی خواهند شد (۱). لیستریا مونوسی‌توزنر باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که از خاک، غذای حیوانات، آب، مدفوع و بافت‌های انواعی از حیوانات مهره‌دار و بی‌مهره که شامل انسان نیز می‌شود، جدا می‌گردد (۲). میزان لیستریوزیز در طول دهه اخیر ثابت مانده و حتی شدیدتر شده است. وجود لیستریوزیز که از سال ۲۰۰۱ گزارش شده است. توسعه و پیاده‌سازی انواع روش‌های مولکولی این فرصت را برای بهداشت عمومی و سازمان‌های مسئول ایجاد کرده است که سویه‌های میکروارگانیسم بیماری‌زا را ردیابی کنند (۳). جنس لیستریا شامل ۶ گونه است که عبارت‌اند از: لیستریا مونوسی‌توزنر، لیستریا اینوکوا، لیستریا ایوانوی، لیستریا سیلیگری، لیستریا ولشمیری، لیستریا گری. تنها لیستریا مونوسی‌توزنر و لیستریا ایوانوی به علت دوز کشنده ۵۰٪ (ID_{۵۰٪}) در موش و توانایی رشد در کبد و طحال موش پاتوژن محسوب می‌شوند. لیستریا مونوسی‌توزنر پاتوژن انسانی و لیستریا ایوانوی پاتوژن حیوانات محسوب می‌شوند (۴). لیستریا مونوسی‌توزنر در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتریمیک مشابه آنفولانزا می‌شود که اگر درمان نشود، می‌تواند به التهاب جفت و یا پرده آمیوتیک و عفونت جنین و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا تولد زود هنگام منجر شود، چرا که این باکتری قادر به عبور از جفت است. تشخیص زود هنگام می‌تواند با ردیابی لیستریا مونوسی‌توزنر در کشت خون مادر، حین تولد، تشخیص با ردیابی ارگانیزم در مایع مغزی-نخاعی، خون، مایع آمیوتیک، ترشحات دستگاه تنفسی، سوپ‌های جفتی یا جلدی، آسپیره‌های گوارشی یا مدفوع نوزاد جدا شود.

مشاهده مستقیم باسیل‌های گرم مثبت در زیر میکروسکوپ در این نمونه‌ها، تشخیص زود هنگام بیماری را فراهم می‌کند (۵). بیماری‌های مهاجمی در طی دوران بارداری غالباً ناشی از مهاجم باکتری به جنین از طریق جفت و توسعه به شکل کوریوآمینویت (التهاب کوریوآمینون) است. نتیجه آن، سقط جنین، معمولاً پس از پنج ماه از بارداری و یا تولد نوزاد یا جنین مرده دارای عفونت عمومی است. سندرم بالینی آن گرانولوماتوز اینفنتی سبتیکا شناخته می‌شود و با وجود آبسه‌های کوچک pyogranulomatous منتشر در سراسر بدن و نیز مرگ‌ومیر بالا مشخص می‌گردد. عفونت در مادر معمولاً بدون علامت است و یا حدود ۲-۱۴ روز قبل از سقط جنین علائم خفیف شبیه سرماخوردگی همراه با لرز، خستگی، سردرد، درد عضلات و مفاصل وجود دارد (۶). موقعیت‌های زیادی برای آلوده شدن با لیستریا در طی فراوری مواد غذایی وجود دارد زیرا لیستریا مونوسی‌توزنر در همه جا در محیط حاضر است؛ به همین دلیل قرار گرفتن در معرض این باکتری اجتناب ناپذیر است (۷). پس از اینکه لیستریا مونوسی‌توزنر به عنوان بیماری قابل انتقال از طریق مواد غذایی شناخته شد، توجه خاصی به مکانیسم‌های ویروالانس و خصوصیات لیستریا مونوسی‌توزنر شد تا امکان تشخیص و ردیابی سریع این میکروارگانیزم فراهم شود. تعدادی از فاکتورها به عنوان فاکتورهای همراه با ویروالانس در لیستریا مونوسی‌توزنر شناسایی شدند. یکی از این فاکتورها همولیزین بود که به طور اختصاصی در این میکروارگانیزم لیستریولیزین O نامیده شد. به نظر می‌رسد این پاتوژن مقاوم به سرما با از دست دادن فعالیت همولیتیک خود به یک سویه غیرپاتوژن تبدیل می‌شود. همچنین، همولیزین یک کلید مهم در شناسایی و تشخیص لیستریا مونوسی‌توزنر محسوب می‌شود. تنها گونه‌های لیستریا که پاتوژن انسان و حیوانات هستند می‌توانند این همولیزین را تولید کنند. از آنجا که تنها لیستریا مونوسی‌توزنر از بین سایر گونه‌های لیستریا برای انسان بیماری‌زا است، مشاهده همولیز روی

آگار خون‌دار می‌تواند به ردیابی دقیق‌تر این میکروارگانیسم کمک کند (۲). در مطالعه‌ای که توسط شایان و همکاران در سال ۱۳۸۸ در تهران انجام شد، از بین ۱۰۰ نمونه واژن، تعداد ۷ مورد لیستریا مونوسیتوژنز (۷ درصد) با استفاده از کشت جدا گردید (۸). در مطالعه‌ای که گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، از میان ۸۷ نمونه سواپ واژن زنان مبتلا به سقط جنین، ۵ مورد لیستریا مونوسیتوژنز به روش کشت و ۷ مورد لیستریا مونوسیتوژنز از کشت‌های منفی به روش PCR شناسایی گردید که در این مطالعه پیشنهاد می‌شود از روش مولکولی جهت شناسایی باکتری‌های مولد سقط استفاده شود (۹).

پس از اینکه لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان بیماری قابل انتقال از طریق مواد غذایی شناخته شد، توجه خاصی به مکانیسم‌های ویرولانسی و خصوصیات لیستریا مونوسیتوژنز شد تا امکان تشخیص و ردیابی سریع این میکروارگانیسم فراهم شود. تعدادی از فاکتورها به عنوان فاکتورهای همراه با ویرولانسی در لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شدند. یکی از این فاکتورها همولیزین بود که به طور اختصاصی در این میکروارگانیسم لیستریولیزین O نامیده شد. به نظر می‌رسد این پاتوژن مقاوم به سرما با از دست دادن فعالیت همولیتیک خود به یک سویه غیرپاتوژن تبدیل می‌شود. همچنین، همولیزین یک کلید مهم در شناسایی و تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز محسوب می‌شود. تنها گونه‌های لیستریا که پاتوژن انسان و حیوانات هستند می‌توانند این همولیزین را تولید کنند. از آنجا که تنها لیستریا مونوسیتوژنز از بین سایر گونه‌های لیستریا برای انسان بیماری‌زا است، مشاهده همولیز روی آگار خون‌دار می‌تواند به ردیابی دقیق‌تر این میکروارگانیسم کمک کند (۲).

از آن جایی که این باکتری در همه جا یافت می‌شود باید با کنترل بیشتر چرخه تولید و توزیع مواد غذایی تلاش خود را برای پیشگیری از این عفونت افزایش دهیم. این مطالعه برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در زنان باردار با و بدون

سابقه سقط و نقش همولیزین hlyA در سقط بانوان انجام می‌شود.

روش بررسی

در این مطالعه که به صورت مقطعی انجام گردید از اردیبهشت سال ۱۳۹۵ تا دی سال ۱۳۹۵ نمونه‌های بالینی (ترشحات واژن) از زنان باردار جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها از افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان آرش (تهران) و توسط پزشک متخصص زنان گرفته شد. فرم پرسشنامه (پیوست) توسط افراد تکمیل گردید. همچنین فرم رضایت‌نامه توسط تمامی افراد مورد بررسی تکمیل شد. نمونه‌گیری از خانم‌های باردار دریافت‌کننده درمان آنتی‌بیوتیکی صورت نگرفت. تمامی نمونه‌ها در کمترین زمان به آزمایشگاه میکروبی انتقال داده شد. جامعه آماری مورد بررسی این مطالعه از زنان بیمارستان آرش (تهران) بود که از این بین ۱۰۰ نفر به عنوان حجم نمونه و با روش نمونه‌گیری تصادفی انتخاب گردید. در این مطالعه زنان باردار با سابقه (۵۲ نفر) و بدون سابقه (۴۸ نفر) سقط و نمونه‌های بالینی (ترشحات واژن) به عنوان ورودی در نظر گرفته می‌شود، از نمونه‌های آزمایش شده نیز به‌عنوان خروجی ۷

جدایه (۷٪) باکتری لیستریا جداسازی شد.

در ابتدا پرسش‌نامه همراه با سواپ و محیط انتقالی TSB (Tryptic Soy Broth) در اختیار متخصص زنان در بیمارستان قرار داده شد. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها (ترشحات واژن) آن‌ها را به آزمایشگاه انتقال دادیم و بعد از آن نمونه‌ها بر روی محیط غنی‌کننده BLEB (buffered listeria enrichment broth) انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از ۲۴ ساعت از محیط غنی‌کننده روی محیط‌های اختصاصی پالکام و اکسفورد (حاوی اسکولین) کشت داده شد و در انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ روز قرار داده شد و بعد در صورت رشد باکتری و

شدند. جهت شناسایی لیستریا، کلنی‌های جدا شده تحت آزمایش‌های بیوشیمیایی تأییدی قرار گرفتند. این آزمایش‌های شامل آزمون رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، حرکت، تولید اسید از دکستروز، رامنوز، گزیلوز، احیای نترات (اختیاری)، TSI و هیدرولیز اسکولین است. برای تأیید بیشتر از سایر روش‌های بیوشیمیایی مانند فعالیت همولیتیک و تست CAMP نیز استفاده شد.

پژوهشگران مختلفی برای ارزیابی همولیز و اطمینان از تفاوت واقعی بین گونه‌های همولیز: لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا سیلگری تست CAMP توصیه می‌کنند (۹). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لیستریای جدا شده توسط انتشار دیسک بررسی شد و در نهایت ژن *hlyA* توسط PCR شناسایی گردید. آزمایش‌های انجام شده مذکور توسط نویسنده‌های این پژوهش با توجه به جدول ۱ صورت گرفته است (۱۲ و ۱۱).

شک ما به لیستریا مونوسیتوژنز بر اساس تغییر رنگ محیط تست‌های بیوشیمیایی و فوتیپی انجام شد.

انتخاب کلنی تیپیک

بر اساس محیط انتخابی به کار رفته کلنی‌های لیستریا مونوسیتوژنز مشخص شدند. چند کلنی مشکوک بر روی تریتون سوی آگار که حاوی ۰/۶ عصاره مخمر است، کشت خطی داده شدند تا کلنی خالص به دست آید و در ۳۰ (یا ۳۵) درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. از کلنی‌های مجزای لیستریا (محدب - بی‌رنگ - مات - با کناره‌های یکنواخت - قطر ۱-۲ میلی‌متر) برای انجام آزمون‌های تأییدی استفاده شد.

تست‌های بیوشیمیایی

کلنی‌ها در محیط tryptic soy yeast extract broth تلقیح شدند و در ۳۵ درجه ۲۴ ساعت انکوبه کرده سپس در دمای ۴ درجه برای تست‌های بعدی نگهداری

جدول ۱: تست‌های افتراقی لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا سیلگری

لیستریا سیلگری	لیستریا مونوسیتوژنز	
+	+	کاتالاز
-	-	اکسیداز
+	+	SIM
+	+	همولیز
+	+	CAMP
-	+	رامنوز
+	+	دکستروز
+	-	گزیلوز
A/A	A/A	TSI
+	+	اسکولین

ژن اختصاصی لیستریا مونوسیتوژنز است در این مطالعه توسط نرم‌افزار GeneRunner طراحی شد.

پس از انجام آزمایش‌های تمامی داده‌ها در نرم‌افزار SPSS v22 وارد شد و تحلیل نهایی انجام شد و نمودارهای مربوطه رسم گردید. پرایمر مورد استفاده برای تکثیر ژن *hlyA* که

جدول ۲: پرایمر مورد استفاده

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول
	F: GCGCAACAAACTGAAGCAA	
<i>hlyA</i>	A	۲۲۱ bp
	R: TAACCTTTTCTTGGCGGCAC	

در این میان جدایه‌هایی که از زنان باردار با سابقه سقط جداسازی شده بودند شامل ۳ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۱ جدایه لیستریا سیلیگری بودند. همچنین جدایه‌هایی که از زنان باردار بدون سابقه سقط جداسازی شده بودند شامل ۱ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۲ جدایه لیستریا سیلیگری بودند.

آنالیز آماری داده‌ها

۱- بررسی ارتباط بین جداسازی جنس لیستریا و متغیر سابقه سقط:

توسط آنالیز رگرسیون لجستیک ارتباط بین جداسازی جنس لیستریا و متغیر سابقه سقط بررسی شد. آنالیز جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که ارتباط معنا داری بین سابقه سقط جنین و ابتلا به واژنیت لیستریایی وجود ندارد ($p > 0.05$).

۲- بررسی ارتباط بین سابقه سقط و گونه‌ی لیستریا (در اینجا مونوسیتوژنز و سیلیگری):

به دلیل پایین بودن تعداد سویه‌ها (۷) امکان بررسی دقیق ارتباط بین سابقه سقط و گونه‌ی لیستریا (در اینجا مونوسیتوژنز و سیلیگری) وجود ندارد. خلاصه آنالیز با همین تعداد نمونه در جدول شماره ۴ نشان می‌دهد رابطه‌ای بین نوع گونه‌ی لیستریا و متغیر سابقه سقط وجود ندارد ($p > 0.05$).

جهت انجام تست آماری در پژوهش حاضر از رگرسیون لجستیک از سری تست‌های آماری تحلیل رگرسیون چند متغیره بهره گرفته شده است. رگرسیون لجستیک بدین صورت عمل می‌کند: در بسیاری از پژوهش‌ها متغیر وابسته تنها دو نتیجه ممکن دارد و می‌تواند فقط یکی از دو ارزش صفر یا یک را بپذیرد که ارزش یک به معنای وقوع حادثه و ارزش صفر به معنای دوم وقوع آن (بالعکس) است. در پژوهش حاضر، متغیر وابسته سابقه سقط که یا باسابقه یا بدون سابقه بوده و متغیر مستقل دارای گونه‌ی لیستریا سیلیگری یا مونوسیتوژنز است؛ و نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS بوده است که خروجی‌های این نرم افزار در جداول ۳ و ۴ آمده است.

یافته‌ها

در این مطالعه نمونه‌ی واژن از ۱۰۰ زن باردار نمونه‌گیری شد. از این میان ۵۲ نفر دارای سابقه سقط بودند (به عنوان گروه تست) و ۴۸ نفر نیز بدون سابقه سقط جنین بودند (عنوان گروه شاهد یا کنترل). از میان این تعداد نمونه بالینی پس از کشت و آزمایش‌های افتراقی ۷ جدایه (۷ درصد) باکتری لیستریا جداسازی شده که ۴ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز و ۳ جدایه لیستریا سیلیگری بودند.

جدول ۳: آنالیز رگرسیون لجستیک داده‌ها در ارتباط با جنس لیستریا

درجه اطمینان 95				
کران پایین	کران	e	معداری	درجه آزادی
۵.۸۹۶	۰.۲۵۶	۱.۲۵۰	۰.۷۷۸	۱
				1 ^a
				a: متغیرهای
				:1
				b. معناری

جدول ۴: آنالیز رگرسیون لجستیک داده‌ها در ارتباط با گونه‌ی لیستریا

درجه اطمینان 95				
کران پایین	کران	e	معداری	درجه آزادی
۱۶۲.۵۳۱	۰.۲۲۱	۶۰۰۰	۰.۲۸۷	۱
				1 ^a
				a: متغیرهای
				:1
				b. معناری

جنس لیستریا جدا شده از واژنیت در زنان باردار مقاومت مربوط به تری متوپریم (۵۷ درصد) و همچنین بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سیپروفلوکساسین (۸۵/۵ درصد) است که در جدول شماره ۵ و نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

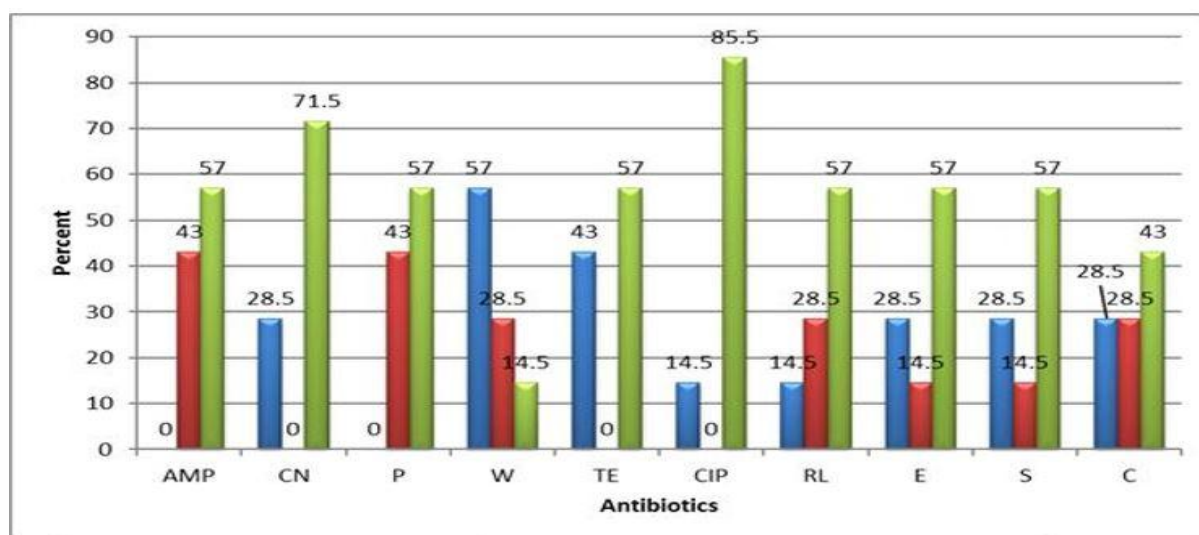
با توجه به خطر بالای مرگ و میر ناشی از عفونت لیستریایی، عموماً درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون آمپی‌سلین، تتراسایکلین، صورت می‌گیرد اریترومایسین و جنتامایسن صورت می‌گیرد (۱۴) نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک برای ۷ سویه جدا شده: بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در

جدول ۵: پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا سیلیگری جداسازی شده از نمونه‌های بالینی

حساس	نیمه مقاوم	مقاوم	دز $\mu\text{g}/\text{disc}$	
٪۵۷ (۴)	٪۴۳ (۳)	---	۱۰	آمپی‌سلین
٪۷۱/۵ (۵)	---	(۲)	۱۰	جنتامایسن
		۲۸/۵		
		٪		
٪۵۷ (۴)	٪۴۳ (۳)	---	۱۰	پنی‌سیلین G
٪۱۴/۵ (۱)	(۲)	(۴)	۵	تری‌متوپریم
	٪۲۸/۵	٪۵۷		
٪۵۷ (۴)	---	(۳)	۳۰	تتراسایکلین
		٪۴۳		
٪۸۵/۵ (۶)	---	(۱)	۵	سیپروفلوکساسین
		۱۴/۵		

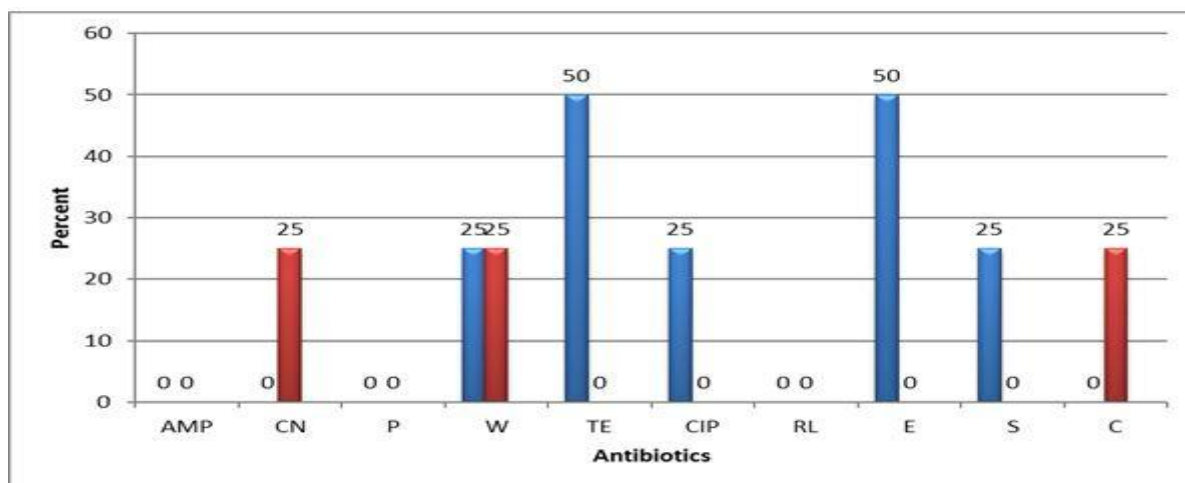
%				
سولفاتمتوکسازول	۲۵	(۱)	(۲)	٪۵۷ (۴)
		٪۲۸/۵	۱۴/۵	
%				
اریترومایسین	۱۵	(۱)	(۲)	٪۵۷ (۴)
		٪۱۴/۵	۲۸/۵	
%				
استرپتومایسین	۱۰	(۱)	(۲)	٪۵۷ (۴)
		٪۱۴/۵	۲۸/۵	
%				
کلرامفنیکل	۳۰	(۲)	(۲)	٪۴۳ (۳)
		٪۲۸/۵	۲۸/۵	
%				

Antibiotics: Ampicillin, Amp; Gentamicin, CN; Penicillin G, p; Trimethoprim, w; Tetracycline, TE; Ciprofloxacin, CIP; Sulfamethoxazole, RL; Erythromycin, E; Streptomycin, S; Cloramphenicol, C



نمودار ۱: پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا سیلیگری جدا سازی شده از نمونه های بالینی (آبی: مقاوم، قرمز: نیمه حساس، سبز: حساس)

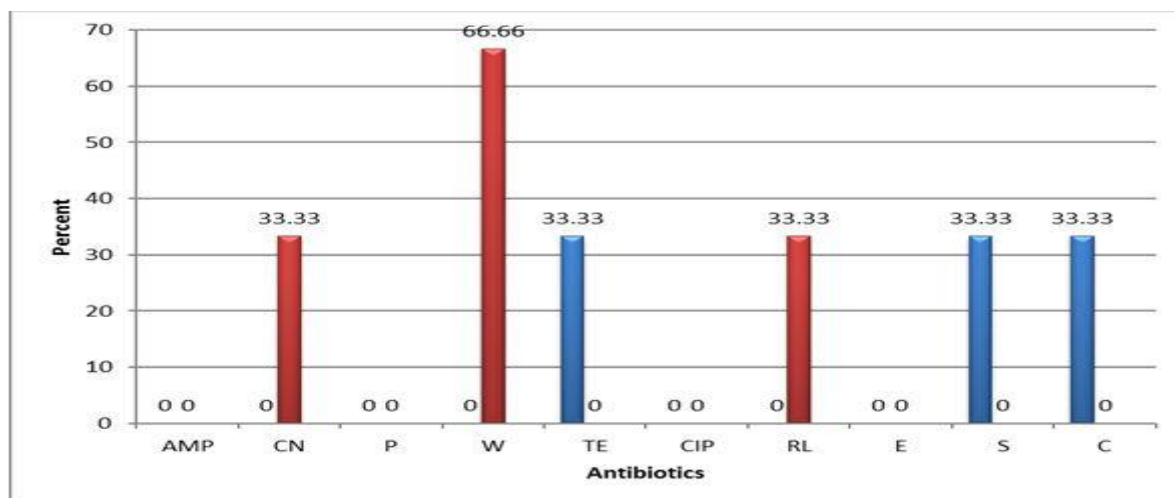
بیشترین مقاومت کامل در سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از زنان باردار با سابقه سقط تتراسیکلین و اریترومایسین (هر دو ۵۰ درصد) و همچنین بیشترین مقاومت کامل آنتی بیوتیکی در سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از زنان باردار بدون سابقه سقط مربوط به جنتامایسین، تری متوپریم و کلرامفنیکل (هر کدام ۲۵ درصد) است که در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲: پروفایل مقاومت کامل آنتی بیوتیکی سویه های لیستریا سیلیگری جداسازی شده از نمونه های بالینی از زنان باردار با سابقه سقط و بدون سابقه سقط (آبی: با سابقه سقط، قرمز: بدون سابقه سقط)

لیستریا سیلیگری جدا شده از زنان باردار بدون سابقه سقط مربوط به تری متوپریم (۶۶/۶۶ درصد) که در نمودار ۳ نشان داده شده است.

بیشترین مقاومت کامل در سویه های لیستریا سیلیگری جدا شده از زنان باردار با سابقه سقط تتراسیکلین و استرپتومایسین و کلرامفنیکل (هر کدام ۳۳/۳۳ درصد) و همچنین بیشترین مقاومت کامل آنتی بیوتیکی در سویه های



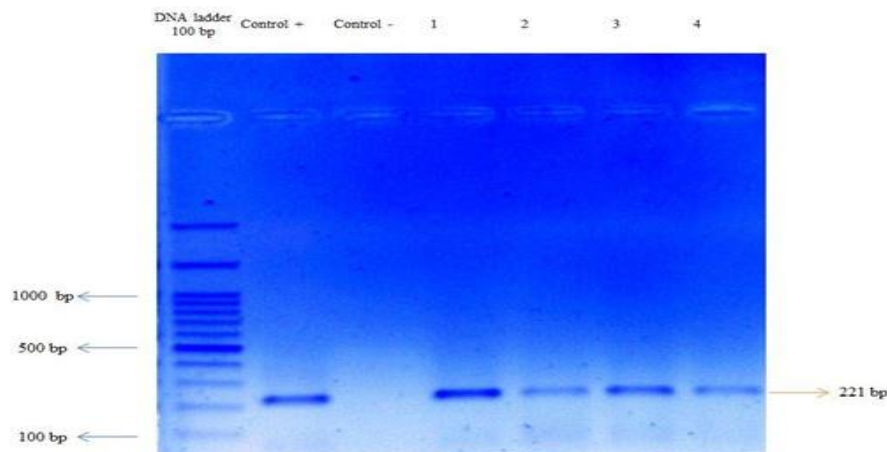
نمودار ۳: پروفایل مقاومت کامل آنتی بیوتیکی سویه های لیستریا سیلیگری جداسازی شده از نمونه های بالینی از زنان باردار با سابقه سقط و بدون سابقه سقط (آبی: با سابقه سقط، قرمز: بدون سابقه سقط)

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

۱۰۰ درصدی در این سویه‌ها را نشان می‌دهد هرچند برای اثبات شیوع دقیق آن باید تعداد نمونه‌ها بیشتر باشد.

ژن *hlyA* در ۴ سویه‌ی لیستریا مونسیتوزنز مورد بررسی قرار گرفت که در هر ۴ سویه این ژن وجود داشت که شیوع

شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن *hlyA* با آنزیم Taq DNA Polymerase بر روی ژل آگارز ۱ درصد (TBE 1%) ستون شماره ۱: مارکر مولکولی (DNA ladder ۱۰۰ bp)، ستون شماره ۲: کنترل مثبت، ستون شماره ۳: کنترل منفی، ستون‌های شماره ۱-۴: محصول PCR ژن *hlyA* (۲۲۱ bp).



بحث

همچنین دیده شد که بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های لیستریا سیلیگری جدا شده از زنان باردار با سابقه سقط ۳۳/۳۳ درصد بود که مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، تری‌متوپریم، سیپروفلوکساسین، سولفامتوکسازول و اریترومایسین بود و همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های لیستریا سیلیگری جدا شده از زنان باردار بدون سابقه سقط نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها ۶۶/۶۶ درصد بوده و فقط نسبت به پنی‌سیلین و تری‌متوپریم حساسیت نداشتند. نتایج PCR نشان داد که ژن *hlyA* در هر ۴ سویه‌ی لیستریا مونسیتوزنز این ژن وجود داشت که فراوانی ۱۰۰ درصدی در این سویه‌ها را نشان می‌دهد هرچند برای اثبات شیوع دقیق آن باید تعداد سویه‌ها بیشتر باشد.

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین آلودگی با لیستریا مونسیتوزنز و سقط جنین در خانم‌های باردار دیده نشد. در عین حال، این ارتباط را می‌توان در بسیاری از مطالعات دیگر مشاهده نمود. علت این امر ممکن است نوع نمونه جمع‌آوری شده باشد؛ به عبارت دیگر، چنانچه نمونه

نتایج تحقیق نشان می‌دهد که شیوع باکتری لیستریا مونسیتوزنز در بین خانم‌های باردار ۴ درصد (۴ سویه) بود. در این میان ۳ مورد از زنان باردار با سابقه سقط و ۱ مورد نیز از زنان بدون سابقه سقط جدا شد. همچنین نتایج درباره‌ی لیستریا سیلیگری به این گونه بود که شیوع این باکتری در بین خانم‌های باردار ۳ درصد (۳ سویه) بود. در این میان ۱ مورد از زنان باردار با سابقه سقط و ۲ مورد نیز از زنان بدون سابقه سقط جدا شد. در این مطالعه هیچ گونه رابطه‌ای بین سابقه سقط جنین و ابتلا به عفونت لیستریایی در زنان باردار یافت نشد ($p > 0.05$). نتایج نشان که بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های لیستریا مونسیتوزنز جدا شده از زنان باردار با سابقه سقط مربوط به سولفامتوکسازول و جنتامایسین (هر دو ۷۵ درصد) و همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های لیستریا مونسیتوزنز جدا شده از زنان باردار بدون سابقه سقط نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۵ درصد بوده و فقط نسبت به جنتامایسین، کلرامفنیکل و تری‌متوپریم حساسیت نداشتند.

های جمع آوری شده از خانم های با سابقه سقط، بلافاصله پس از سقط جنین جمع آوری گردند، احتمال جدا سازی تعداد نمونه های بیشتری از لیستریا مونوسیتوژنز بالاتر خواهد رفت؛ بنابراین در مطالعاتی که بلافاصله پس از سقط جنین نمونه گیری انجام داده اند لیستریا مونوسیتوژنز بیشتری جدا کرده و بدیهی است که در ارتباط با سقط باشد. مطالعه ای توسط لیدا لطف اللهی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه تهران روی شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در سقط های خود به خودی در انسان انجام شد. 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 (۹ درصد) که شش ایزوله مربوط به بافت جفت و سوپ و واژن و دو ایزوله مربوط به سوپ مقعدی و یک ایزوله مربوط به ادرار بوده که دلیل انتخاب نمونه های سوپ واژن در این مطالعه شیوع باکتری لیستریا در این ناحیه است (۱۲). در مقایسه ای نتایج آن ها با مطالعه ای حاضر می توان گفت که شیوع در مطالعه ای لطف اللهی بالاتر بوده چون در مطالعه حاضر لیستریا مونوسیتوژنز ۴ درصد شیوع داشت. دلیل اصلی این تفاوت این است که آن ها نمونه های مقعدی، بافت جفت، ادرار و واژن را بررسی کرده ولی در مطالعه ای حاضر فقط نمونه های واژن زنان باردار بررسی شده است. در مطالعه ای اسلامی و همکاران در سال ۲۰۱۴ که با عنوان شناسایی ژن *actA* و *InIB* در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از زنان با سقط (بیمارستان های تهران) انجام شد. ۹۶ نمونه سوپ از واژن زنان گرفته شد و کشت اختصاصی لیستریا مونوسیتوژنز انجام گرفت. نتایج آن ها نشان می دهد که در کشت، ۷ نمونه از ۹۶ نمونه برای لیستریا مونوسیتوژنز مثبت بودند. شیوع لیستریا مونوسیتوژنز بیماری زا در موارد سقط ۱۲/۵ درصد بود (۱۶). در مطالعه ای حاضر ۵۲ فرد دارای سابقه سقط بررسی شدند که از میان آن ها ۳ سویه لیستریا مونوسیتوژنز جدا سازی و شناسایی شدند (۵/۷۶ درصد). اسلامی و همکاران ۱۲/۵ درصد لیستریا

مونوسیتوژنز را از موارد سقط جدا کرده اند. این تفاوت شیوع می تواند مربوط به این باشد که آن ها از چندین بیمارستان در تهران نمونه گیری کرده اند اما مطالعه ای حاضر فقط از یک بیمارستان در تهران نمونه گیری انجام داده است. در مطالعه ای شوکت و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مجموع ۱۴۱ نمونه بالینی برای جدا سازی و شناسایی گونه های لیستریا استفاده شد. در نتایج چهار جدا به لیستریا مونوسیتوژنز مشخص شد، در حالی که ۲۴ گونه لیستریا غیر بیماری زا در مابقی نمونه ها وجود داشت. از چهار لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده، دو نمونه از بافت مغز جنین سقط شده (BrS10 و BrG36) جدا شده بود، در حالی که دو تای دیگر یکی از سوپ واژن (Vd13) و یکی سوپ رکتال (RS11) جدا شد. شیوع لیستریا مونوسیتوژنز ۲/۸۳ درصد در کل نمونه ها و سویه ی غیر بیماری زای لیستریا ۱۷/۰۲ درصد بود (۱۵). شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در مطالعه ای شوکت ۲/۸۳ درصد بود که کمتر از مطالعه ای حاضر با ۴ درصد شیوع بود. منطقه و نوع نمونه ها در مطالعه ای آن ها با مطالعه ای ما تفاوت دارد. در کل می توان با این دید به این پژوهش ها نگرست که پژوهشگران ممکن است با در نظر گرفتن موارد مختلف پژوهش هایی با عناوین و نتایج مختلف مورد بررسی قرار دهند. زیرا لیستریا مونوسیتوژنز در همه جا در محیط حاضر است، برای مثال از حیوانات اهلی، وحشی، پرندگان، حشرات، مواد غذایی و غیره، قابل انتقال است و همچنین با توجه به اینکه لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه های که از جایگاه های استریل گرفته می شود به سادگی قابل جدا شدن است، جایگاه هایی مثل خون، مایع مغزی- نخاعی، مایع آمنیوتیک، جفت یا بافت بدن جنین یا از سوپهای رکتال؛ مدفوع؛ ادرار و دستگاه تناسلی زنان جدا می شود. و بنابراین به دلیل تنوع در جایگاه های مختلف نتایج متفاوت است.

نتیجه گیری

نظارت بر عرضه محصولات غذایی و همچنین ارتقاء کیفی سلامت جامعه در ایران خواهد شد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همه کسانی که ما را در این تحقیق همراهی کردند سپاسگزاریم.

این باکتری در این مطالعه به عنوان عامل اصلی سقط مشخص نشد، اما ممکن است این خطر را برای زنان باردار داشته باشد، زیرا باعث آلودگی در آنها می‌گردد؛ بنابراین، استفاده از یک تکنیک ساده و استاندارد جهت ردیابی سریع این باکتری از منابع مختلف سبب بهبود کیفیت

Reference

1. Barkallah M, Gharbi Y, Slima AB, Elleuch F, Mallek Z, Saad RB, et al. Simultaneous detection of *Waddlia chondrophila* and *Listeria monocytogenes* in aborted ruminant samples by real-time quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 2016; 125: 64-9
2. Bille J, Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of clinical microbiology, *Listeria* and *erysipelothrix*. 9 nd ed, 2006; 474-84.
3. Robert L. Buchanan, Leon G.M. Gorris, Melinda M. Hayman, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 2017; 75: 1-13.
4. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3819-22.
5. Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114: 1-15.
6. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 584-640.
7. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana K, Prasad SP, et al. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 4-13.
8. Shayan R, Satari M, Ferozande M. Isolated and detection of *listeria monocytogenes* in vaginal specimens by PCR. *Modares Journal of Medical Sciences (Pathobiology)* 2009; 12: 51-8. [In Persian]
9. Goudarzi E HN, 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 Uni Medi Sci* 2013; 23: 61-9. [In Persian]
10. Carlos Camargo A. Uncovering the *Listeria monocytogenes* virulence traits. [dissertation]. USA: Universidade Federal de Vicosa. 2017
11. Mérida LGR, de Salim AM, Graterol AYA, Gamboa O. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Arch Latinoam Nutr* 2010; 60: 254.
12. Moura GF, de Oliveira Sigarini C, de Souza Figueiredo EE. *Listeria monocytogenes* in Chicken Meat. *J Food Nut Res* 2016;4: 436-41.
13. Lotfollahi L, Nowrouzi J, Irajian G, Masjedian F, Kazemi B, Falahat LEA, et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans. *African J Microbiol Res* 2011; 5: 1990-3.
14. Santos Oliveira T, Milen Varjão L, Nunesda Silva LN, Castro Lisboa Pereira R, Hofer E, Cristina Vallimb D, Comastri de Castro Almeida R. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food control* 2018; 88: 131-8.

15. Shoukat S, Malik S, Rawool D, Kumar A, Kumar S, Shrivastava S, et al. A study on detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* in ovine's of Kashmir region having abortion or history of abortion. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biolo Sci 2014; 84: 311-6.
16. Eslami G, Samadi R, Taherpanah R, Taherpor A, Baseri N. Detection of actA and InlB genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from women with Spontaneous abortions. NBM 2014; 2: 18-21. [In Persian]