

جداسازی لیستریامونوستیوژن و تعیین تیتر آنتی بادی آن در زنان مبتلا به سقط جنین

دکتر احمد فرج زاده شیخ* علی حق روستا** دکتر جلیل وند یوسفی*** دکتر محمدعلی اخوبیزادگان*** سهیلا مرادی بیدهندی*

Isolation of listeria monocytogenes and determination of its antibody titers in women suffering from abortion

A.Farajzadeh Sheikh A.Hagh Roosta J.Vandyusefi M.Akhavizadegan S.Moradi Bidhendi

*Abstract

Background: Listeria monocytogenes is an important cause of meningitis, septicemia, stillbirth, neonatal sepsis and spontaneous abortion.

Objective: The purpose of this study was to detect Listeria monocytogenes by serologic and bacteriologic methods in women suffering from abortion.

Methods: 120 specimens including placenta or curettage material were cultured on blood agar and palcam agar and kept at 37°C for 48-72 hrs. Also Trypticase Soy Broth (TSB) were used as subculture media at 4°C for a period of 6 months. Colonies were identified using several biochemical tests. 120 sera from above patients and 60 sera from control group were also used for the investigation of Listeria specific antibody by indirect immunofluorescence method.

Findings: 2.5% of specimens were positive bacteriologically, that had significant relationship with the serologic results ($P<0.05$). The results of serologic study showed that 25 case of test group, and 6 cases of control group had an antibody titer of $\frac{1}{160}$ against this microorganism. In test group, of 25 patients

who had $\frac{1}{160}$ titer, 12 patients, and in control group, of 6 patients who had $\frac{1}{160}$ antibody titer, 2 patients had $\frac{1}{320}$ antibody titers. Therefore, in test group 20.83% had a titer of $\frac{1}{160}$ and 10% had a titer of 1/320. In control group the rates of the above antibody titers were 6.66% and 3.33% respectively. Overall ratio was 3.2. Also there was significant difference between antibody titer in test and control group ($P<0.02$). All the patients who had positive culture of this bacterium also had a titer of $\frac{1}{320}$ antibody against this microorganism.

Conclusion: Listeria monocytogenes is an important cause of abortion, and all of the patients with positive culture of this bacterium had a $\frac{1}{320}$ antibody titer. The cold enrichment method is suggested as a suitable method for the isolation of this microorganism.

Keywords: Listeria Monocytogenes, Meningitis, Septicemia, Abortion, Mortality, Newborn

* چکیده

زمینه: لیستریامونوستیوژن یکی از عوامل عمدۀ منتهیت، سپتی سمی، سقط های خود به خودی، مرده زایی و مرگ و میر نوزادان محسوب می شود.

هدف: این مطالعه به منظور ارزیابی سروولوژیک و باکتریولوژیک لیستریامونوستیوژن در زنان مبتلا به سقط جنین انجام شد.

مواد و روش ها: ۱۲۰ نمونه جفت یا بقایای کورتاژ زنان مبتلا به سقط که در سال ۱۳۷۸ به بیمارستان امام خمینی و رازی اهواز مراجعه کرده بودند به روش مقطعی مورد مطالعه قرار گرفتند. سن موارد آزمایش بین ۱۴ تا ۴۵ سال بود. نمونه های جفت، بعد از خرد و هموژنیزه شدن، روى محیط های بالاداگار و پالکام آگار کشته و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. همچنین نمونه ها روى محیط بالاداگار و پالکام آگار کشته و به مدت ۶ ماه در سرما نگه داری و هر ماه یک بار روی محیط های پالکام آگار و بالاداگار کشته داده شدند. کلی های مشکوک به لیستریامونوستیوژن به وسیله آزمایش های سروولوژی تأیید شدند. آزمایش های سروولوژی با روش ایمنوفلوروسانس غیر مستقیم بر روی ۱۲۰ مورد آزمایش و ۶۰ نمونه شاهد با زایمان طبیعی انجام شد.

یافته ها: نتایج باکتریولوژیک میزان جداسازی باکتری را از موارد آزمایش $\frac{2}{5}$ % نشان داده با نتایج سروولوژیک ارتباط معنی داری داشت ($P<0.05$).

نتایج بررسی سروولوژیک نشان داد که ۲۵ نفر از گروه شاهد دارای تیتر آنتی بادی $\frac{1}{160}$ مثبت بر علیه این باکتری بودند. از

نفر تیتر $\frac{1}{160}$ مثبت گروه آزمایش، ۱۲ نفر و از ۶ بیمار تیتر مثبت در گروه شاهد نفر دارای تیتر $\frac{1}{320}$ بودند. به طوری که در گروه آزمایش رقت

سرمی $\frac{1}{320}$ و $\frac{1}{160}$ به ترتیب $20/8\%$ و 10% در گروه شاهد $6/4\%$ ($3/33\%$ مشاهده شد) ($OR=3/2$). همچنین اختلاف معنی داری در تیتر آنتی بادی $\frac{1}{160}$

و $\frac{1}{320}$ در دو گروه آزمایش و شاهد به دست آمد ($P<0.02$). کلیه موارد کشته مثبت لیستریامونوستیوژن، دارای تیتر آنتی بادی $\frac{1}{320}$ بر علیه این

میکروارگانیسم نیز بودند.

نتیجه گیری: لیستریامونوستیوژن می تواند یکی از عوامل سقط باشد و برای جداسازی آن روش نگه داری در سرما پیشنهاد می شود.

کلید واژه ها: لیستریامونوستیوژن، منتهیت، سپتی سمی، سقط جنین، مرگ و میر، نوزاد

* مقدمه :

تا ۴۵ سال بود که در ۶ گروه سنی تقسیم شدند. برای بررسی باکتریولوژیک، نمونه های جفت یا باقیایی کورتاژ زنان مبتلا به سقط در محیط ترانسپورت امیس (Amies transport media) به آزمایشگاه میکروب شناسی انتقال و در هاوون چینی همراه با مقداری محیط Trypticase Soy Broth (TSB) مقداری محیط خرد و با دستگاه ورتكس یکنواخت شدند. نمونه های تهیه شده روی محیط های پالکام آگار (Palcamagar) و محیط ژلوزخون دار با خون گوسفندی کشت داده شدند و در شرایط آتمسفر ۵ تا ۱۰ درصد C_0 ، در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگه داری شدند. کلنی های مشکوک به لیستریامونوستیوژن رنگ آمیزی گرم شدند و نیز مورد آزمایش های بیوشیمیایی به شرح زیر قرار گرفتند:

کاتالاز و حرکت ویژه Tambling در محیط Indol-Motility-SH₂ در درجه حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد، آزمایش کمپ (CAMP) با سوش استاف ارئوس ATCC25923، تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، سالیسین، اسکولین و رامنوز و عدم توان تخمیر گزیلوز، مانیتول و آزمایش های MRVP، Triple Sugar Iron Agar (Urea) و اوره (Gritrate).

باکتری لیستریامونوستیوژن دارای همولیز روی محیط ژلوزخون دار، آزمایش کاتالاز مثبت، دارای حرکت چتری مانند در ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط SIM، تست کمپ و MRVP مثبت و نیترات و اوره منفی است. یک برداشت از هر نمونه در TSB برای نگه داری در سرما به مدت ۶ ماه تهیه شد و هر ماه یک کشت مجدد از آن روی محیط های پالکام آگار و ژلوزخون دار داده شد

ختم حاملگی قبل از هفته بیستم راسقط گویند.^(۱) عوامل مادری از علل عمدۀ سقط جنین محسوب می شوند و یکی از عوامل مادری، عفونت های دستگاه تناسلی است. این عفونت ها می تواند به علت عوامل باکتریایی، ویروسی یا انگلی باشد.^(۲) لیستریامونوستیوژن یکی از عوامل باکتریایی سقط جنین است که انتقال این باسیل گرم مثبت، از طریق مواد غذایی صورت می گیرد و مسؤول پاره ای از عفونت ها در اشخاص با ضعف سیستم ایمنی و زنان حامله است.^(۳) عفونت داخل رحمی ممکن است باعث سقط، زایمان زودرس (Stillbirth) یا مرده زایی (Preterm delivery)^(۴) شود. ابتلا به این باکتری در ماه های اول حاملگی باعث مرگ جنین و در نتیجه سقط می شود. گزارش های مختلفی دال بر آلودگی خانم های باردار به این باکتری و در نتیجه سقط جنین در ۵ ماه اول حاملگی منتشر شده است.^(۵) در یک گزارش سقط جنین ناشی از این باکتری ۱/۹ درصد اظهار شده است.^(۶) در مطالعه های دیگر، میزان شیوع باکتری در خانم های مبتلا به سقط ۳/۹، ۱۴ و ۳ درصد گزارش شده است.^(۹) در مطالعه های انجام شده در ایران، میزان شیوع باکتری در زنان مبتلا به سقط ۱، ۴ و ۱/۹ درصد گزارش شده است.^{(۱۰) و (۱۱)}

این بررسی به منظور ارزیابی سرولوژیک و باکتریولوژیک لیستریامونوستیوژن در زنان مبتلا به سقط انجام شد.

* مواد و روش ها :

در این مطالعه مقطعی ۱۲۰ نمونه جفت از زنان مبتلا به سقط که در سال ۱۳۷۸ به بیمارستان های امام خمینی و رازی اهواز مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. سن زنان مورد آزمایش ۱۴

مشخص شد. ۷۸/۳ درصد از موارد سقط مربوط به سقط بار اول بیماران بود. در این بررسی ۳ مورد لیستریا مونو سیتوژن جدا شد و ۲/۵ میزان شیوع این باکتری در این مطالعه درصد بود. میزان شیوع لیستریا مونو سیتوژن بر اساس گروه سنی مورد ارزیابی قرار گرفت که رابطه معنی داری به دست نیامد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- فراوانی لیستریا مونو سیتوژن بر اساس گروه سنی

میزان شیوع	موارد مثبت	درصد	تعداد	گروه سنی
.	.	۱۸/۳۳	۲۲	< ۲۰
۸/۳۳	۱	۲۵/۳۳	۳۱	۲۱-۲۵
.	.	۲۰/۸۳	۲۵	۲۶-۳۰
۸/۳۳	۱	۲۲/۵	۲۷	۳۱-۳۵
۸/۳۳	۱	۹/۱۶	۱۱	۳۶-۴۰
.	.	۳/۲۳	۴	۴۱ >
۲/۵	۳	۱۰۰	۱۲۰	جمع

دو مورد لیستریا مونو سیتوژن جدا شده از زنان مبتلا به سقط در ماه دوم و یک مورد دیگر در ماه سوم حاملگی بود. همچنین دو مورد لیستریا مونو سیتوژن جدا شده مربوط به سقط اول و یک مورد مربوط به سقط دوم زنان مورد مطالعه بود.

آزمایش های سرولوژی بر روی ۱۲۰ مورد سقط شده و ۶۰ مورد با زایمان طبیعی انجام گرفت که فراوانی تیتر آنتی بادی و ارتباط بین نتایج باکتریولوژی و سرولوژی آن ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

و چنانچه کلی مشکوکی رشد می کرد آزمایش های تأییدی فوق روی آن انجام می گرفت. (۱۴ و ۱۳)

جهت انجام بررسی سرولوژی، خون ۱۲۰ بیمار مبتلا به سقط و ۶۰ نمونه از خون خانم های با زایمان طبیعی به عنوان شاهد گرفته شد. رقت های سرمی $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{۱۶}$, $\frac{۱}{۸}$, $\frac{۱}{۴}$, $\frac{۱}{۲}$, $\frac{۱}{۱}$, $\frac{۱}{۰}$ میکروپلیت تهیه شد. سپس ۱۰ لانداز سرم ها با رقت های مختلف روی لام مدرج فلورو سنت حاوی ۵ لاندا از آنتی ژن پلی والان لیستریا مونو سیتوژن ثابت شده با استن، اضافه شد. لام ها با مدت نیم ساعت در اطاقک های مرطوب قرار گرفت و پس از آن ۳ بار با محلول با فرفسفات سالین (PBS) شستشو داده شد. سپس ۱۰ لاندا آنتی هیومن گلوبولین نشان دار شده با (FITC) Fluoresceinated isothiocyanat ساخت کارخانه Behring آمان به آن اضافه و به مدت نیم ساعت در اطاقک های مرطوب قرار داده شد. لام ها پس از ۳ بار شستشو با محلول PBS و خشک شدن در هوای آزاد، در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورو سنت مشاهده شد. در رقت های سرمی مثبت، باکتری لیستریا مونو سیتوژن در زیر میکروسکوپ به صورت ذرات سبز درخشان مشاهده شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون های مجدد کاری و فیشر استفاده شد.

* یافته ها :

در این مطالعه بیش ترین فراوانی سقط در گروه سنی ۲۱ تا ۵۰ سال با ۲۵/۸ درصد، ۲۶ تا ۳۰ سال با ۲۰/۸ درصد و ۳۱ تا ۳۵ سال با ۲۲/۵ درصد بود. بیش ترین فراوانی سقط در ماه سوم با ۴۳/۳ درصد و ماه دوم با ۴۰ درصد

جدول ۲- فراوانی تیتر آنتی بادی و کشت های مثبت لیستریامونووسیتوژنر در دو گروه آزمایش و شاهد

فراوانی موارد کشت مثبت		فراوانی تیتر آنتی بادی		تیتر آنتی بادی	
شاهد	آزمایش	شاهد (۶۰ نفر)	آزمایش (۱۲۰ نفر)		
.	.	(۹۳/۳٪) ۵۶	(۷۹/۲٪) ۹۵	تعداد (%)	$<\frac{1}{160}$
.	.	(۶/۷٪) ۴	(۲۰/۸٪) ۲۵	تعداد (%)	$>\frac{1}{160}$
.	(۲/۵٪) ۳	۲ نفر از ۴ نفر فوق	۱۲ از ۲۵ نفر فوق	تعداد (%)	$\frac{1}{320}$

نسبت شانس تیتر آنتی بادی $\frac{1}{160}$ و $\frac{1}{320}$ در گروه آزمایش نسبت به شاهد odds Ratio=۳/۲ بود.

* بحث و نتیجه گیری :

در این مطالعه میزان شیوع لیستریامونووسیتوژنر در جمعیت مورد مطالعه ۲/۵ درصد بود. در مطالعه ای که در کشور هند در سال ۱۹۶۶ بر روی ۱۵۰ بیمار با سابقه سقط صورت گرفت میزان شیوع این باکتری ۱۴ درصد گزارش شده است.^(۸) از طرف دیگر در تحقیقی که از سال ۱۹۷۱ تا ۷۲ در کشور هند بر روی ۱۰۰ مورد سقط انجام گرفت میزان شیوع ۳ درصد گزارش شده است.^(۹) در بررسی لالمند و همکاران در فرانسه بر روی ۲۰۵ مورد سقط، میزان شیوع لیستریامونووسیتوژنر ۳/۹ درصد گزارش شده است.^(۱۰) اختلاف میزان شیوع در نقاط مختلف ممکن است مربوط به عادات غذایی از لحاظ پخته یا نیم پز بودن غذا، وجود ارتباط با دام و مصرف غذاهای خام مثل سبزی های پُربرگ (کلم، کاهو، کرفس) و لبیات خام که از عوامل مؤثر در انتشار این میکرووارگانیسم هستند، باشد.^(۱۱) طبق تحقیق های انجام شده در کشور ما، لیستریامونووسیتوژنر به صورت اسپورادیک وجود دارد ولی در بعضی از کشورها به صورت اپیدمی بروز می کند و طبیعی است که آمار به دست آمده در اپیدمی ها بالاتر از موارد اسپورادیک است.^(۱۲و۱۳و۱۴)

یافته ها نشان داد که لیستریامونووسیتوژنر می تواند یکی از عوامل سقط جنین در ماه های اولیه حاملگی باشد و نمونه سرمی مبتلایان به سقط، دارای تیتر بالایی از آنتی بادی بر علیه این باکتری است. بیشترین گروه های سنی آسیب پذیر به عوامل سقط جنین، سنین ۲۱ تا ۳۱ سال هستند. این عوامل می توانند انواع عوامل عفونی و غیرعفونی را دربرگیرد.

بیشترین موارد سقط، در ماه دوم و سوم بود. ثابت شده است که بیش از ۸۰ درصد موارد سقط در سه ماهه اول حاملگی رخ می دهد و پس از آن، این میزان به سرعت کاهش می یابد.^(۱۱) به همین دلیل لازم است مراقبت های ویژه ای در سه ماهه اول حاملگی برای پیشگیری از سقط جنین انجام گیرد.

بیشترین موارد سقط مربوط به خانم هایی بود که برای بار اول حامله بودند. به نظر می رسد با افزایش دفعه های حاملگی اینمی لازم بر علیه عوامل سقط زا نیز افزایش می یابد.

در این بررسی نشان داده شد که لیستریامونوستیوژن می تواند یکی از عوامل سقط جنین در ماه های اولیه حاملگی باشد و نمونه سرمی مبتلایان به سقط، دارای تکثیر بالایی از آنتی بادی بر علیه این باکتری است.

* سپاسگزاری :

بدین وسیله از همکاری آقای دکتر محمدجواد کجاف و خانم دکتر منیژه کخدایی تشکر می شود.

* مراجع :

1. Gary G, Norman F, Kenneth J, Larry C, Johan C Katharine D. Williams Obstetrics. 2 lst, Volume2, Megraw- Hill, NewYork Chicago, 2001, 85
2. Stary Pederson B, Stary Pederson S. Etiology factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. AM J Obstet Gynecol 1994; 148(2): 140-6
3. Gellin B G, Broome C V. Listeriosis. T AM Med Assoc 1989; 261:1313-20
4. Simon Craig, Permazel M. Lex Doyle, Mildenhall L, Garland S. Perinatal infection with Listeria monocytogenes. Aust NZ J Obstet Gynecol 1996; 36(3): 286-90
5. Remington G S, Klein G O. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed, W B Saunders CO, Philadelphia, 1995, 1055-73
6. Pezeshkian R, Fernando N, Carne CA, Simanowitz MD. Listeriosis in mother and fetus during the first trimester of pregnancy, Case report. Br J Obstet Gynaecol 1984; 91: 85-6

آزمایش های سرم شناسی بر روی دو گروه آزمایش و شاهد از طریق ایمونوفلوروسنت غیر مستقیم نشان داد که ۱۲ نفر از ۲۵ نفر دارای تیتر بالای $\frac{1}{160}$ در گروه آزمایش و ۲ نفر از ۴ نفر تیتر بالای $\frac{1}{160}$ از گروه شاهد دارای تیتر $\frac{1}{320}$ بودند. با مقایسه نتایج سروولوژی در این دو گروه مشخص شد که تیتر آنتی بادی $\frac{1}{320}$ بار در موارد سقط کرده بیش تر از گروه شاهد بود. همچنین اختلاف معنی داری در تیترهای آنتی بادی $\frac{1}{160}$ و $\frac{1}{320}$ در دو گروه آزمایش و شاهد و ارتباط معنی داری بین نتایج باکتریولوژیک و سروولوژیک وجود داشت.

در این بررسی مشخص شد که تمام موارد دارای کشت مثبت لیستریامونوستیوژن تیتر سرمی $\frac{1}{320}$ بر علیه این باکتری دارند. در تحقیقی که در سال ۱۳۷۵ در کرمان انجام شد، ۱۰/۶ درصد نمونه های مورد آزمایش و ۵/۷ درصد نمونه های شاهد دارای تیتر بالای $\frac{1}{320}$ بر علیه لیستریامونوستیوژن بودند.^(۱)

در بررسی مختلف ثابت شده است که لیستریامونوستیوژن دارای نشانه های آنتی ژنی با برخی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی است. ممکن است وجود آنتی ژن غیرگونه ای در تعدادی از باکتری های گرم مثبت باعث ایجاد پاسخ های ایمونولوژیک متقاطع بین این باکتری و سایر باکتری ها شود.^(۱۹،۱۸،۱۳) دلیل دیگر احتمالاً برخورد اشخاص با این باکتری در دوران زندگی است که می تواند باعث ایجاد آنتی بادی شود.^(۱۴،۱۵،۱۶) ممکن است داخل سلولی بودن و تأخیر در آزاد شدن باکتری از داخل سلول، تراکم کم در نمونه یا حضور مواد متوقف کننده باکتری در بالغین، باعث شود که در مواردی باکتری از طریق کشت یافت نشود.

13. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins co. 1986; 2: 1235-1245
14. Joklike WK, Willet HP, Bernardamos D, et al. Zinsser's Microbiology, 20th ed. Appleton and lange co. 1992; 481-4
15. Drew RM. Occurrence of two immunological groups within the genus listeria, studies based upon precipitation reactions. Proc Soc Exp Biol Med 1946; 61: 30-3
16. Busch LA, Human listeriosis in the united states, 1967-1969. J Infect Dis 1971; 123: 328
17. Larsson S, et al. Listeriosis during pregnancy and neonatal period in Sweden 1958-1974. Acta. Pediateric. Scan. 1979; 68: 485-93
18. Sonnenwirth AC, Jarett L. Gradwohls clinical laboratory methods and diagnosis. Toronto, C V Mosby, 1989, 1673-978
19. Welshimer HJ. Staphylococcal antibody production in response to injections with Listeria monocytogenes. J Bacteriol 1960; 79: 456-7
۲۰. ادیب فر پرویز. میکروب شناسی پزشکی. چاپ سوم، تهران، انتشارات بهمن، ۱۳۷۲، ۶۲-۲۵۰
21. Mandell Gl, Douglas RG, Bennet JE. Principles and practice of infectious disease. 4th ed, Churchill Livingstone co, 1996, 1880-5
7. Gray ML, and Killinger AH. Listeria monocytogenes and listeria infections. Bacteriol. Rev. 1966; 30:309-82
8. Bhujwale RA, Hingorani V, Chandra R.Genital listeriosis in Delhi (India): 2 pilot study. Indian J Med Res 1973; 6(19): 1284-8
9. Lallemand AV, Gaillard DA, paradis PH, et al. Fetal Listeriosis during the second trimester of gestation. pediatr. pathol. 1992; 12(5): 665-71
۱۰. نجفی کیا یوسف. بررسی لیستریامونوستیوزن در حاملگی و سقط جنین ها با ایزولاسیون و تیتر آنتی بادی. سومین کنگره سراسری بیوشیمی و علوم آزمایشگاهی ایران، ۱۳۷۴-۸-۱۱ مهرماه ۶۳،
۱۱. گنجوی اشرف، بانو شهرناز، منصوری شهلا. بررسی مقدماتی اعتبار روش های تشخیصی لیستریامونوستیوزنز و نقش آن در سقط جنین. پژوهش در پزشکی (محله پژوهش دانشکده پزشکی) دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دی - اسفند ۱۳۷۶، ۱۰-۱۶
۱۲. وندیوسفی جلیل، جباری احمد رضا، زاهدی موحد امیرحسین، ارجمند حسن، طاهری راد احمد، اخوان سپهی عباس. بررسی میزان آلودگی مواد غذایی با منشاً دامی و تعیین سهم احتمالی لیستریا در موارد سقط جنین انسان و دام. پژوهش و سازندگی، ۱۳۷۸، ۹-۴۰، ۲-۱۰۶