پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۱، شماره ۴، صفحات ۱۰-۱۶ (دی-اسفند ۱۳۷۶)

بررسی مقدماتی اعتبار روشهای تشخیصی لیستریامنوسیتوژنز و نقش آن در سقط جنین

شهرنازبانو اشرف‌گنجویی و دکتر شهلا منصوری
بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی افضلی‌پور، کرمان

خلاصه

به منظور بررسی نقش لیستریامنوسیتوژنز در سقط جنین روی ۱۵۰ نمونه جفت و مهبل زنانی که مستعد سقط جنین بودند، آزمونهای تشخیصی باکتری‌شناختی در شهر کرمان انجام گرفت. همزمان، آزمایشهای سرم‌شناختی با روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم جهت بررسی میزان پادتن‌های سرمی نیز انجام شد. این آزمایشها -جهت مقایسه- روی نمونه‌های مشابه گرفته شده از ۷۰ مورد زایمان طبیعی صورت پذیرفت. در گروه آزمایش، میزان جداسازی باکتری از جفت بعد از ۲/۵ ماه غنی‌سازی در سرما، ۲/۷ درصد و از مهبل، ۱/۴ درصد بود. از نمونه‌های کنترل باکتری جدا نشد. در آزمایشهای سرولوژیک به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم عیارهای پادتن در هر دو گروه بالاتر از ۱:۱۶۰ مشاهده شد؛ به طوری که در گروه آزمایش عیار پادتن مساوی با ۱:۱۶۰ و ۱:۳۲۰ به ترتیب در ۲۹/۳ و ۱۰/۶ درصد موارد و در گروه کنترل به ترتیب در ۱۲/۹ و ۵/۷ درصد موارد دیده شد.

نتیجه‌گیری. میزان جداسازی لیستریامنوسیتوژنز از موارد سقط جنین حداکثر ۲/۷ درصد و از نمونه‌های گرفته شده از جفت پس از ۲/۵ ماه غنی‌سازی در سرما بود. آزمون سرم‌شناختی ایمنوفلورسنت غیرمستقیم با آزمایشهای باکتری‌شناختی همخوانی نداشته، به علت واکنش تقاطعی با سایر باکتریها، از این آزمونها به تنهایی نمی‌توان برای تشخیص لیستریا استفاده کرد.

مقدمه

سقط جنین عادتی برای مادران مشکل بسیار مهمی است که به طور مکرر شانس داشتن نوزاد را از دست می‌دهند. از عوامل متعدد سقط جنین می‌توان به عفونتهای انگلی و باکتریائی، نظیر لیستریامنوسیتوژنز اشاره کرد (۵ و ۷). لیستریامنوسیتوژنز باسیل گرام مثبت و بدون هاگ است که از راه گوارش وارد بدن می‌شود و در افراد ایمنوسوپرس، زنان حامله و نوزادان ایجاد بیماری می‌کند (۳ و ۸). انواع بیماریزای این باکتری قادر به ترشح همولیزین، فسفولیپاز، کاتالاز و سوپراکسید-دیس‌میوتاز (SOD) می‌باشند. عوامل دیگر بیماریزا شامل ترکیبات سطحی، حرکت، چسبندگی و تهاجم وفیلامنتهائی از جنس اکتین می‌باشند (۹).

برحسب نوع بیماری می‌توان باکتری را از خون، مایع آمنیون، شیر و فرآورده‌های لبنی جدا کرد (۴، ۱۱ و ۱۲). گزارشهای جدید نشانگر افزایش موارد عفونت با لیستریامنوسیتوژنز می‌باشد که می‌تواند در ارتباط با روشهای تشخیصی مناسب‌تر، افزایش تعداد بیماران حاد و زیاد شدن تعداد بیماران با اختلالات در ضعف سیستم ایمنی باشد (۳ و ۸). از لحاظ سرم‌شناختی این باکتری دارای ۱۶ سروتیپ می‌باشد. توزیع سروتیپ‌های لیستریامنوسیتوژنز از نظر اپیدمیولوژی مشخص نیست. این باکتری قادر است که دو شکل زودرس و یا دیررس بیماری را در نوزادان ایجاد کند (۶ و ۱۱). در دانمارک و ایالات متحده آمریکا حدود یک سوم موارد عفونت در طول زایمان یا دوران نوزادی روی می‌دهد؛ در حالی که، در سوئد و آلمان دو سوم موارد در طول این دوره عارض می‌شود و عفونتهای بزرگسالان، بیشتر بالای ۴۰ سالگی گزارش شده است (۳)؛ در کانادا بیشتر موارد عفونت، شکل زودرس بیماری بوده است (۳)؛ در فرانسه نیز لیستریامنوسیتوژنز در ۱/۶ درصد تمام بارداریهایی که منجر به سقط جنین خود به خود شده بودند، از جفت یا جنین جدا شده است (۳ و ۱۰). در این زمینه در ایران تحقیقاتی در تبریز و تهران انجام گرفته که میزان جداسازی باکتری از نمونه‌های سقط جدا شده به ترتیب ۱ و ۲/۴ درصد بوده است (۱ و ۲).

به منظور بررسی نقش لیستریامنوسیتوژنز در سقط جنین و مشخص کردن ارزش تشخیص آزمون سرم‌شناسی ایمنوفلورسنت غیرمستقیم در تشخیص لیستریوز این تحقیق روی زنان مبتلا به سقط جنین و گروه شاهد صورت گرفت. از آنجا که در بیشتر آزمایشگاههای تشخیص طبی ایران روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم، روش تشخیص عفونت با لیستریامنوسیتوژنز می‌باشد، نتیجه این بررسی می‌تواند همخوانی آزمونهای سرم‌شناختی و باکتری‌شناختی را مشخص کند و آزمون یاد شده را از نظر ویژگی و حساسیت مورد مطالعه قرار دهد.

روش مطالعه

۱) جمع‌آوری نمونه

از دی ماه ۱۳۷۳ تا شهریور ۱۳۷۴ از ۱۵۰ زن حامله که با تشخیص پزشک، به طور خود به خود، گرفتار سقط جنین شده بودند با رضایت مادر، نمونه‌هایی از جفت، مهبل و خون گرفته شد. همچنین از تعداد ۷۰ زن حامله که به طور طبیعی زایمان کرده بودند، پس از رضایت مادر نمونه‌های مزبور گرفته شد. برای انتقال نمونه‌های جفت و بقایای کورتاژ به آزمایشگاه از شیشه‌های قهوه‌ای رنگ، با درب پیچ‌دار حاوی آب مقطر استریل استفاده شد. نمونه‌های مهبل توسط سواپ استریل گرفته شد و در محیط کری‌بلیر (Cary blair) قرار داده شد. شیشه محتوی جفت و محیط کری‌بلیر پس از تهیه تا رسیدن به آزمایشگاه میکروب‌شناسی در یخچال نگهداری شدند. نمونه خون بیمار در لوله‌های آزمایش (۱۰۰×۱۶) گرفته شده، سرم آن را جدا کردیم و برای انجام آزمایشهای سرم‌شناختی در فریزر نگهداری شدند.

۲) آزمایشهای باکتری‌شناسی

برای جداسازی لیستریامنوسیتوژنز از نمونه‌های بافت جفت از روش Gray & Killinger استفاده شد (۱۲). به طور خلاصه نمونه جفت را در هاون استریل در کنار شعله کاملا" خرد کردیم تا به صورت یکنواخت درآمده و ذرات بافت از هم جدا شد. از نمونه خرد شده جفت و نمونه گرفته شده از مهبل گستره مستقیم تهیه شد و به طریق گرام آن را رنگ‌آمیزی کردیم. همچنین نمونه‌های مذکور را روی محیطهای لیستریا آگار انتخابی (Listeria selective agar) و آگار خونی (Blood agar) کشت دادیم. نمونه‌های گرفته شده همچنین در محیط تریپتون سوی برات برای غنی‌سازی در سرما کشت داده شدند (۱۲). این نمونه‌ها به مدت شش ماه در یخچال نگهداری شدند و هر ماه یک بار از آنها روی محیط لیستریای گزینشی آگار خوندار بار دیگر کشت داده شد. پرگنه‌های مشکوك به لیستریامنوسیتوژنز براساس نوع همولیز، شکل پرگنه و استفاده از آزمونهای اختصاصی کاتالاز، حرکت در ۲۲ درجه سانتیگراد و عدم حرکت در ۳۷ درجه سانتیگراد، هیدرولیز اسکولین، آزمونهای VP و MR، تخمیر قندها و آزمونهای In vivo شامل آزمایش Anton و بیماریزایی در موش شناسایی شدند. در این بررسی سایر باکتریهای جدا شده از نمونه‌های بالینی نیز تا مرحله گونه شناسایی شدند. برای تشخیص استافیلوکک‌ها از آزمون کاتالاز، تخمیر قند مانیتول و کوآگولاز استفاده شد. استرپتوکک‌ها را براساس ایجاد همولیز و انجام آزمایشهای تشخیصی حساسیت به باسیتراسین، SXT (Thrimetoprim-Sulfametaxazole)، کشت در محیط SF، رشد در pH ۹/۶، رشد در حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد و نمک ۶/۵ درصد تشخیص دادیم (۳). جهت تشخیص باسیل‌های گرام منفی برای جدا کردن خانواده‌های پسودوموناس و انتروباکتریاسه از تست اکسیداز استفاده شد. باسیل‌های گرام منفی اکسیداز منفی را با انجام آزمایشهای IMViC و سایر آزمونهای بیوشیمیایی لازم شناسایی کردیم (۳).

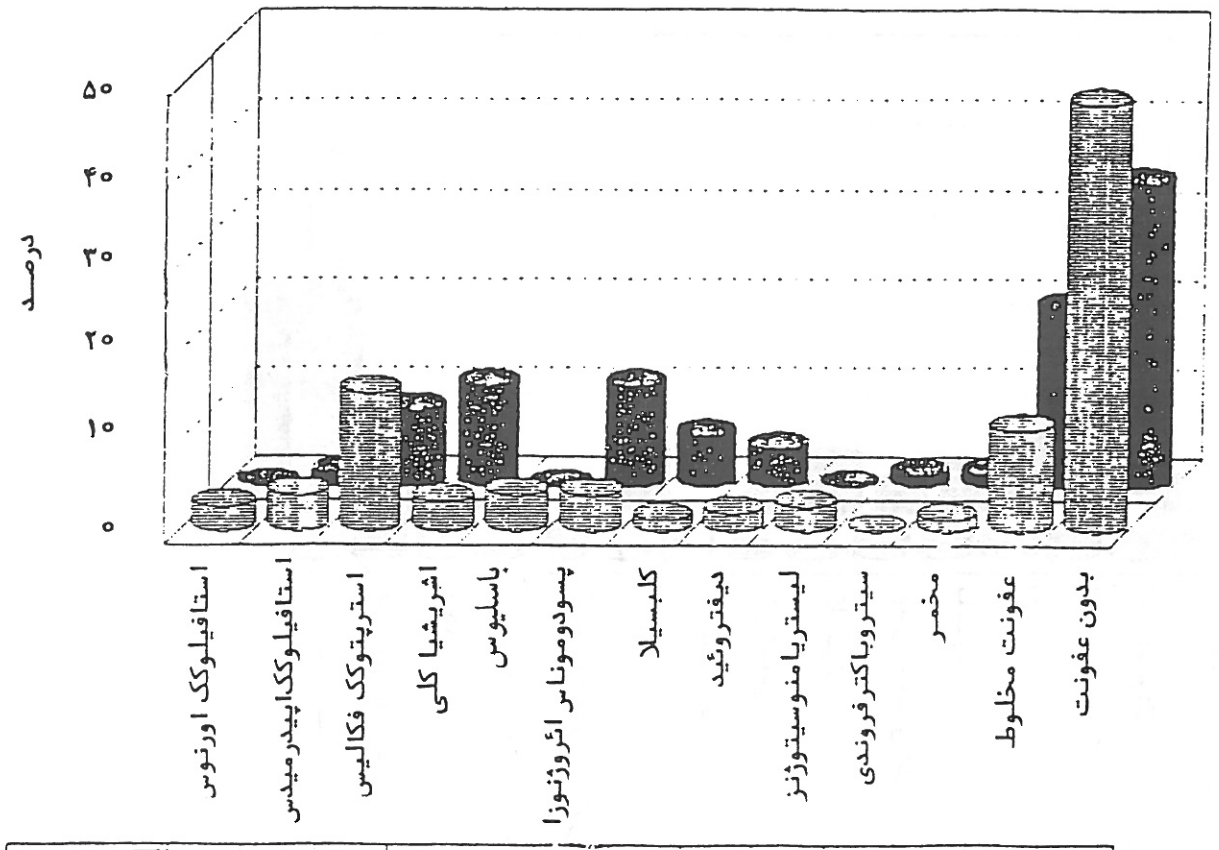
۳) آزمایشهای سرم‌شناسی

جهت تعیین عیار پادتن علیه لیستریامنوسیتوژنز، روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم (Indirect Immunoflourescence) به کار برده شد (۱۳). پادگن از سویه‌های لیستریامنوسیتوژنز (2,4b.1a) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سرم را با رقتهای $\frac{1}{640}$، $\frac{1}{320}$، $\frac{1}{160}$، $\frac{1}{80}$، $\frac{1}{40}$ تهیه کردیم. برای شستشوی لامها بافر PBS با pH ۷/۶ به کار گرفته شد و آنتی‌گلوبولین کونژوگه انسانی از شرکت رامیساك تهیه شد.

آزمونهای آماری. از آزمون آماری Z جهت بررسی نتایج استفاده شد.

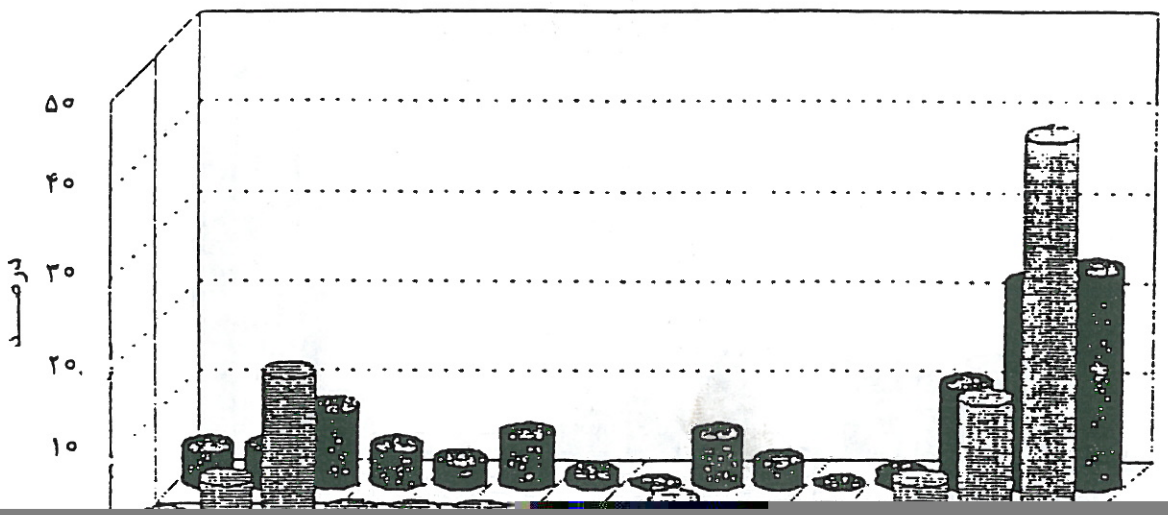
نتایج

در بررسیهای باکتری‌شناختی از نمونه جفت و مهبل ۷۰ زن که زایمان طبیعی کرده بودند، لیستریامنوسیتوژنز جدا نشد؛ در حالی که، از ۱۵۰ مورد نمونه جفت و مهبل مورد مطالعه در گروه آزمایش، بعد از دو ماه و نیم غنی‌سازی در سرما لیستریامنوسیتوژنز در ۴ مورد (۲/۷ درصد) از جفت جدا شد؛ لیستریامنوسیتوژنز از نمونه مهبل ۲ نفر (۱/۴ درصد) از زنان مزبور نیز بعد از دو ماه و نیم غنی‌سازی جدا شد. در یک مورد باکتری جدا شده مربوط به زنی ۲۱ ساله بود که نخستین دوران حاملگی خود را طی می‌کرد و پس از ۱۱ هفته دچار سقط جنین شد. در مورد دوم نیز سقط جنین پس از ۱۱ هفته صورت گرفت که این مادر پنجمین بار بود که حامله شده بود. بیمار ۴۲ ساله پیشینه ۵ سقط جنین داشت. مورد دیگر در هفته هفتم حاملگی روی داد



	استافیلوکک اورئوس	استافیلوکک اپیدرمیدس	استرپتوکک فکالیس	اشریشیا کلی	باسیلوس	پسودوموناس ائروژنوزا	کلبسیلا	دیفتروئید	لیستریا منوسیتوژنز	سیتروباکتر فروندی	مخمر	عفونت مخلوط	بدون عفونت
کنترل	۰	۱/۴	۸/۶	۱۱/۴	۰	۱۱/۴	۵/۸	۴/۳	۰	۱/۴	۱/۴	۲۰	۳۴/۳
تست	۲/۷	۴	۱۵/۴	۳/۳	۴	۴	۱/۳	۲	۲/۷	۰	۱/۳	۱۱/۳	۴۸

نمودار ۱) نوع و درصد باکتریهای جدا شده از نمونه‌های جفت


۵۰
۴۰
۳۰
۲۰
۱۰
درصد

که بارداری پنجم بود و این زن دو کودک نارس ۶ ماهه را به دنیا آورده، یک بار هم سقط جنین کرده بود. این زن ۳۳ سال داشت؛ و در مورد چهارم سقط پس از ۴ هفته در زنی ۳۹ ساله- که سابقه سه سقط جنین داشت- روی داده بود.

سایر میکروبهائی که به میزان بیشتری از نمونه‌های جفت در گروه آزمایش- نسبت به گروه کنترل - جدا شد عبارت بودند از: استرپتوکک فکالیس (۱۵/۴ درصد)، پسودوموناس‌ائروژینوزا (۴ درصد)، اشریشیاکلی (۳/۳ درصد) و مخمرها (۱/۳ درصد). و از مهبل در همین گروه استرپتوکک فکالیس (۱۷/۴ درصد)، پسودوموناس (۲ درصد)، اشریشیاکلی (۲ درصد) و مخمر (۵/۴ درصد) جدا شد (نمودارهای ۱ و ۲).

بحث

لیستریامنوسیتوژنز به عنوان عامل سقط جنین عادتی در موارد زیادی گزارش شده است (۳، ۵ و ۱۲). در این بررسی، لیستریامنوسیتوژنز در ۲/۷ درصد موارد از جفت و ۱/۴ درصد از مهبل زنانی که سقط جنین داشتند، جدا شد. در این زنان پیشینه سقط جنین وجود داشت و در یک مورد، علاوه بر سابقه سقط، پیشینه تولد دو کودک نارس نیز گزارش شده است. در افراد شاهد نیز با روش مشابه آزمونهای باکتری‌شناختی انجام گرفت، لیکن لیستریامنوسیتوژنز در نمونه‌های گرفته شده دیده نشد. در تحقیقاتی مشابه که به وسیله نجفی‌کیا در تبریز صورت گرفت در یک درصد موارد سقط‌جنین، لیستریا جداسازی شد. همچنین در تهران نیز از ۲۰۰ نمونه جفت سقط شده مورد آزمایش ۵ مورد باکتری لیستریامنوسیتوژنز جدا شد که هر دو مورد با گزارش ما همخوانی دارد (۱ و ۲).

در آزمایشهای سرم‌شناختی که روی سرمهای گرفته شده از خون زنان در گروه آزمایش و کنترل به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم انجام گرفت، میزان موارد سرمهای مثبت از موارد کشت مثبت به مراتب بالاتر بوده است. با توجه به اینکه برای کشت از محیط اختصاصی استفاده شد و نمونه‌ها به جهت غنی‌سازی ۶ ماه در سرمای یخچال نگهداری شدند، به نظر نمی‌رسد که در روش کشت اشکالی وجود داشته باشد.

در آزمایشهای باکتری‌شناختی بیشترین باکتری جدا شده در گروه آزمایش و شاهد استرپتوکوکوس فکالیس بوده است که در تمام موارد آلودگی با این باکتری عیار پادتن اندازه‌گیری شده به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم علیه لیستریامنوسیتوژنز بالاتر از $\frac{1}{160}$ بوده، که این می‌تواند به علت تشابه آنتی‌ژنیک بین دو باکتری باشد. از سوی دیگر، در مواردی که باکتریهای دیگر نیز از جفت و مهبل جدا شدند عیار بالای پادتن (بالاتر از $\frac{1}{160}$) در هر دو گروه آزمون و شاهد دیده شده است.

گزارش آزمونهای ایمنوفلورسنت انجام شده در این مورد نشانداد که در تهران و تبریز به ترتیب ۷۰ و ۴۰ درصد موارد مثبت می‌باشد؛ در حالی که، در تبریز از ۲ مورد و در تهران از ۵ مورد باکتری جدا شده است (۱ و ۲). با توجه به شواهد به دست آمده از بررسی ما و مطالعات انجام شده در دیگر نقاط کشور و سایر مناطق دنیا ارزش آزمون ایمنوفلورسنت غیرمستقیم را در تشخیص این باکتری مورد سئوال قرار می‌دهد. عدم جداسازی باکتری از نمونه‌های بیماران با عیار پادتن بالا نیاز به بررسیهای بیشتری دارد. تقاطع آنتی‌ژنیکی بین لیستریامنوسیتوژنز و سایر باکتریها، به ویژه استرپتوکک فکالیس باید مشخص شود. همچنین تلاشی جهت خالص‌سازی پادگن برای آزمونهای ایمنوفلورسنت که در آزمایشگاههای معمولی به سادگی انجام‌پذیر است باید انجام شود. علاوه بر آن، ارزش شیوه‌های الیزا و پادتن‌های تک دودمانی در تشخیص باکتری باید مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد. با توجه به اینکه کشت باکتری

روش استاندارد تشخیص باکتری باید مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد. با توجه به اینکه کشت باکتری روش (Gold standard) استاندارد تشخیص لیستریامنوسیتوژنز می‌باشد، لیکن عملا" به علت زمان طولانی لازم برای جداسازی باکتری و اشکال در تشخیص باکتری پس از رشد در آزمایشگاههای روتین، کشت باکتری انجام نمی‌شود. با توجه به خصوصیات فیزیولوژیک باکتری پیشنهاد می‌شود محیط مناسب‌تر و اختصاصی‌تری برای رشد آن طراحی شود تا با اطمینان بیشتر و در مدت زمان کمتر وجود باکتری در نمونه‌های بالینی تشخیص داده شود.

تشکر

نگارندگان از کارکنان اتاق عمل و زایمان بیمارستان آیت‌ا... کاشانی، خانم راضیه فیروز و آقای مهدی زنگی‌آبادی که در مراحل آزمایش سرولوژیک همکاری داشتند و همچنین از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که هزینه این تحقیق را متقبل شدند، قدردانی می‌کنند.

مراجع

۱) میردامادی سیدسعید: بررسی روشهای سرولوژیکی و باکتریولوژیکی لیستریامنوسیتوژنز. پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۶۹.

۲) نجفی‌کیا یوسف: بررسی لیستریامنوسیتوژن در حاملگی و سقط جنین‌ها با ایزولاسیون و تیتر آنتی‌بادی. سومین کنگره سراسری بیوشیمی و علوم آزمایشگاهی ایران، ۸-۱۱ مهرماه ۱۳۷۴، ص ۶۳.

3) Armstrone D. Listeria monocytogenes. In: G.L Mandel (ed), Principles and practice of Infectious disease. Churchill Livingstone New York, 1990, P 1587.

4) Baron EJ, Finegold SM, Bally & Scott. Diagnostic Microbiology. Mosby, Baltimore, 1990, P 298.

5) Decherney AH. Habitual abortion. In: NG Kase (ed), Principles and practice of clinical Gynecology. Churchill Livingstone, New York, 1991, P 471.

6) Farber JM, Peterkin PJ. Listeria monocytogenes a food-borne pathogen. Microbiology Reviews 1991; 55: 476.

7) Gomel V, Munro MG, Gynecology a practical approach. Williams & Wilkins, London, 1990, P 137.

8) Joklik WK, Willett HP. Zinsser Microbiology. Appleton & Long, Connecticat, 1992, P 481.

9) Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis. A Molecular approach ASM, Washington DC, 1994, P 182.

10) Schlech WF, Lavigne PM. Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. The New England Journal of Medicine 1983; 308: 203.

11) Seeliger HPR, Finger H. Listeriosis. In: J.S Remingtone (ed). Infectious disease of the fetus and Newborn Infant. WB saunders, Phil, 1983, P 264.

12) Sonnenwirth AC. Gradwohl's clinical laboratory, Method's and Diagnosis. CV Mosby, Torento, 1989, P 1673.

Studies on the different methods for diagnosis and identification of Listeria monocytogenes and its relationship to habitual abortion

Ashraf Ganjouyee Sh, and Mansouri SH

Academic Member. Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

SUMMARY

A bacteriologic study has been done over 150 placenta (or the remaining of curettage) and vaginal sample in women inflicted with abortion in Kerman. A long with these tests, serologic tests with indirect immunofluorescence were carried out to determine the amount of serum antibodies. These tests were compared with similar samples derived from 70 normal childbirth cases.

Listeria was isolated from 2.7% of placenta and 1.4% vaginal samples in the test group after 75 days of cold enrichment 4 c. Listeria was not isolated from the samples in the control group.

By indirect immunofluorescence method antibody titer of $1>160$ was found in both the test and control group. So that 29.3% and 10.6% of the subjects in the test group and 12.9% and 5.7% in the control group had antibody titer over 1:160 and 1:320 respectively.

Conclusion: The maximum rate of Listeria isolation from women with abortion was 2.7% which was isolated from placenta samples after 75 days cold enrichment. No correlation was observed between serological and bacteriological test. Due to cross reaction in serological test, immunofluorescence test should not be used alone in the diagnosis of this bacteria.