Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation and Comparison of ELISA and Indirect Immunofluorescence Methods for the Detection of Anti-Listeria Antibodies Among Women with Spontaneous Abortion Referred to Kamali Hospital in Karaj, Iran

Elaheh Tajedini[1], Somayeh Talebi[2], Jalil Vandyousefi[3]

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/07/29
Accepted: 2017/10/09
Available online: 2017/11/20

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(5): 98-106

Corresponding author:

Somayeh Talebi

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Tel: 021-44702268

Email:
romin.talebi.1@gmail.com

Abstract

Background and Aims: *Listeria monocytogenes* is one of the most important causes of abortion and postpartum infection in newborns. This study aimed to compare the indirect ELISA and immunofluorescence methods for the detection of anti-Listeria antibodies among women with spontaneous abortion.

Materials and Methods: In this study, indirect ELISA and immuno-fluorescence methods were used for the detection of anti-Listeria antibodies. Five milliliters of blood sample were collected from mothers with spontaneous abortion during the third trimester of pregnancy in a ward that examines the diseases of female genital tract in Kamali Hospital of Karaj, Iran. The samples were then transferred to the laboratory for examination using relevant kits. The serum titers of positive samples were also assessed via both ELISA and indirect immunofluorescence for evaluation of IgG and IgM antibodies. The antibodies titers were compared using SPSS software while P values <0.001 were considered as significant.

Results: From the 58 evaluated serum samples, 21 were positive for anti-Listeria antibody. Statistical analysis showed that ELISA and indirect immunofluorescence methods had identical sensitivity. Moreover, it was shown that identification of IgG antibody was better performed in both diagnostic methods.

Conclusions: Both ELISA and indirect immunofluorescence methods are suitable methods for the detection of antibodies against *Listeria*.

KeyWords: *Listeria, ELISA, IFA, abortion*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Tajedini E, Talebi S, vandyousefi J. Evaluation and Comparison of ELISA and Indirect Immunofluorescence Methods for the Detection of Anti-Listeria Antibodies Among Women with Spontaneous Abortion Referred to Kamali Hospital in Karaj, Iran . Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (5) :98-106

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۵ – اذر-دی ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی و مقایسه روش‌های الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص آنتی‌بادی ضد *لیستریا* در زنان با سقط‌جنین خود به خودی مراجعه‌کننده به بیمارستان کمالی کرج

الهه تاجدینی[۱]، سمیه طالبی[۲]، جلیل وندیوسفی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM1396;11(5):98-106

نویسنده مسئول:

سمیه طالبی

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۰۲۲۶۸

پست الکترونیک:

romin.talebi.1@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *لیستریا مونوسیتوژنز* یکی از عوامل مهم سقط‌جنین و عفونت پس از زایمان در نوزادان است. این مطالعه با هدف مقایسهٔ روش الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص آنتی‌بادی ضد لیستریا در زنان با سقط‌جنینِ خود به خودی صورت گرفت.

مواد و روش کار: در این تحقیق از دو روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد *لیستریا* استفاده شد. نمونه‌ها شامل ۵ سی‌سی خون از مادران با سقط‌جنین خودبه‌خودی در سه ترم بارداری، از بخشی در بیمارستان کمالی کرج که به بررسی بیماری‌های دستگاه تناسلی زنان می‌پردازد، برای تحقیق در نظر گرفته شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند و با استفاده از کیت‌ها ارزیابی شدند و برای نمونهٔ سرمی مثبت، تیتر آن‌ها برای آنتی‌بادی‌های IgG و IgM نیز برای هر دو روش الایزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم بررسی شد و در پایان با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۰۱ تیتر آنتی‌بادی‌ها مقایسه شدند.

یافته‌ها: از ۵۸ نمونهٔ سرم گرفته‌شده، ۲۱ نمونه ازلحاظ آنتی‌بادی ضد *لیستریا* مثبت بودند. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که روش الیزا و روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم هر دو از حساسیت یکسانی برخوردار هستند و تفاوتی در آن‌ها دیده نشد، ولی از نظر آنتی‌بادی‌ها روشن شد که در دو روش تشخیص آنتی‌بادی *IgG* بهتر صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: هر دو روش الیزا و ایمونوفلورسانسِ غیرمستقیم، روش‌های مناسبی برای ردیابی آنتی‌بادی بر ضد *لیستریا* هستند.

کلمات کلیدی: *لیستریا*، الیزا، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، سقط‌جنین

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سقط‌جنین به معنی از دست رفتن محصول بارداری (جنین یا رویان)، پیش از هفتهٔ بیستم بارداری است؛ زمانی که وزن جنین به حدود ۵۰۰ گرم می‌رسد. سقط‌جنین علل مختلفی دارد؛ یکی از این علل، عفونت‌هایی است که در دوران بارداری ایجاد می‌شود. باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* باکتری‌ای است که بیماری‌هایی مشترک بین حیوانات و انسان‌ها را ایجاد می‌کند (۶-۱). *لیستریا مونوسیتوژنز* باسیل‌های گرم مثبت کوتاه (کوکو باسیل) بدون شاخه با انتهای گرد هستند که در کشت‌های کهنه، گرم متغیر و کوکسی‌شکل به نظر می‌رسند. این باکتری‌ها به‌تنهایی یا به‌صورت زنجیرهٔ کوتاه و گاهی به‌صورت رشته‌ای و یا پالیساد قابل دیدن هستند. مواقعی نیز که در وضعیت دوتایی قرار گیرند، ممکن است با پنوموکوک اشتباه شوند (۷، ۸). این باکتری‌ها همانند کورینه باکتریوم‌ها، کاتالاز مثبت، فاقد کپسول، غیراسیدفست و اکسیدازمنفی هستند و اسید مایکولیک در دیوارهٔ سلولی خود ندارند. دمای رشد مناسب آن‌ها نیز ۳۰ تا ۳۷ درجهٔ سلسیوس است. از ویژگی‌های مهم اعضای جنس لیستریا، متحرک بودن آن‌ها در دمای اتاق (۲۰ الی ۲۵ درجهٔ سلسیوس) است که این باکتری‌ها را از کورینه باکتریوم‌ها متمایز می‌سازد (۹-۱۳).

از شش گونهٔ *لیستریا* تنها گونهٔ *لیستریا مونوسیتوژنز* در انسان بیماری ایجاد می‌کند. دستِ‌کم ۷ سروتیپ از *لیستریا مونوسیتوژنز* وجود دارد که بر اساس آنتی‌ژن فلاژله و آنتی‌ژن o طبقه‌بندی شده‌اند. بیشتر بیماری‌های ایجادشده در انسان‌ها ناشی از تیپ ba ۴ و ۲a و b ۲ است. به غیر از روش کشت، روش‌های جدید مولکولی نیز برای تشخیص، جداسازی و برای متمایز کردن گروه‌های آن استفاده می‌شوند. تشخیص سرولوژیکی آن فقط در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی انجام می‌شود و ترجیحاً در مطالعات اپیدمیولوژیک کاربرد دارد (۱۴،۱۵). این باکتری در مواردی باعث سقط‌جنین در زنان باردار می‌شود. نوزادان و افراد بالای ۵۰ سال بیشترین گروه مبتلایان را تشکیل می‌دهند. بیماری در سنین یک ماه تا ۱۸ سال نادر است. سقط‌جنین لیستریایی در نیمهٔ دوم حاملگی اتفاق می‌افتد. مننژیت یا مننگوانسفالیت از متداول‌ترین شکل بیماری در بالغین و به‌ویژه گروه سنی بالای ۴۰ سال است (۱۶).

در طی دوران بارداری، ضعیف شدن سیستم ایمنی اتفاق می‌افتد و زنان باردار در معرض ابتلا به باکتریمی لیستریایی هستند. تخمین زده شده است که ریسک خطر در زنان باردار، هفت برابر بیشتر از افراد معمولی است. در جایی که از دسترس سیستم ایمنی به دور است و انتقال آن از سلول به سلول است، تکثیر *لیستریا* در جنین صورت می‌گیرد و می‌تواند از مادر به جنین هم منتقل شود (۸، ۹). عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی از شایع‌ترین و شناخته‌شده‌ترین فرم لیستریوزیس است. باکتریمی بالینی به‌صورت یک بیماری همراه با تب آشکار می‌شود که اغلب با درد عضلانی، درد مفاصل، سردرد و کمردرد همراه است و ممکن است در هر موقع و زمانی در بارداری اتفاق بیفتد (۱۷، ۱۸)، ولی معمولاً در سه‌ماههٔ اول بارداری رخ می‌دهد که احتمالاً ایجاد آن به کاهش ایمنی سلولی در هفتهٔ ۲۶ تا ۳۰ بارداری نیز مربوط است. ۲۲ درصد عفونت در جنین به مرگ جنین می‌انجامد و یا این‌که منجر به به دنیا آمدن جنین مرده می‌شود، همچنین زایمان زودرس نیز ممکن است اتفاق بیفتد (۱۹). زنان باردار ۲۰ برابر بیشتر نسبت به کل جمعیت در معرض خطرند و ۲۷ درصد از کل لیستریوز مربوط به زنان باردار است میزان وفور این باکتری به‌ویژه در خانم‌های باردار، در مناطق گوناگون متفاوت است (۲۰)، بنابراین این مطالعه با هدف مقایسهٔ روش الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص آنتی‌بادی ضد *لیستریا* در زنان با سقط‌جنینِ خود به خودی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

۵ میلی لیتر خون از مادران با سقط‌جنین خودبه‌خودی در سه نوبتِ بارداری از بخش ژنیکولوژی بیمارستان کمالی کرج جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری در طی ۶ ماه از مهر الی اسفندماه سال ۱۳۹۵ انجام شد. پس از تهیهٔ نمونه‌های خون در هر نوبت، آن‌ها به آزمایشگاه نگین واقع در سعادت‌آباد تهران منتقل شدند. سرم نمونه‌های خون جدا شد و با کیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری و تعیین تیتر آنتی‌بادی‌های IgG و IgM اختصاصی *لیستریا مونوسیتوژنز* در سرم مادران، از کیت تجاری *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده شد.

کشت و جداسازی

برای جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* ، در آغاز نمونه‌ها در محیط برین هارت تزریق و پس از ۴۸ ساعت در محیط بلادآگار و محیط اختصاصی PALCAM کشت داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجهٔ سلسیوس و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. سپس کلنی‌ها با استفاده از تست‌هایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط بایل اسکولین، هیدرولیز هیپورات سدیم، کاتالاز، اکسیداز، متیل رد و وگس- پروسکوئر، حرکت در محیط نیمه‌جامد SIM و ازنظر تولید یا عدم تولید گاز H_2S بررسی شدند. در پایان با استفاده از روش‌های شناسایی بیوشیمیایی نظیر تست‌های تولید اسید از قندهای گلوکز، رامنوز و عدم مصرف زایلوز و مانیتول تشخیص نهایی صورت گرفت.

روش انجام الیزا

نمونه‌ها و کیت را یک ساعت پیش از آغاز آزمایش از فریزر خارج کردیم تا به دمای محیط برسد. سپس با استفاده از شیکر نمونه‌ها کاملاً مخلوط شدند و طبق مراحلی که خواهد آمد، نمونه‌ها آزمایش شدند؛ نمونه‌های سرم، کنترل مثبت، کنترل منفی و کالیبراتور با استفاده از بافر رقیق‌کنندهٔ نمونهٔ رقیق‌شده و با استفاده از شیکر، کاملاً مخلوط شدند. پس از رقیق‌سازی، ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و کالیبراتور در چاهک‌ها ریخته شدند. سپس میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۱- ۲۵ درجهٔ سلسیوس) انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، سه بار با بافر شستشودهندهٔ رقیق‌شده شستشو داده شد. پس از هر بار شستن، میکروپلیت روی کاغذ جاذب رطوبت قرار گرفت و به‌آرامی چند ضربه به آن وارد شد. پس از خشک شدن، ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کنژوگه به‌تمامی چاهک‌ها افزوده شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۱- ۲۵ درجهٔ

سلسیوس) انکوبه شد. سپس شستشو و خشک کردن انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر TMB به هر چاهک‌ها افزوده شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در مکان تاریک انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به‌تمامی چاهک‌ها افزوده شد. در این مرحله جذب نوری هر چاهک در ۶۳۰- ۴۵۰ نانومتر به‌وسیلهٔ الیزا ریدر قرائت شد.

روش انجام ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

سرم‌ها از فریزر خارج شدند و در داخل میکروپلیت با استفاده از فسفات بافر سالین PBS رقت‌های متوالی ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ و ۱/۴۰۰ از سرم‌ها تهیه شد. لام‌های آنتی‌ژن شماره‌گذاری شدند. برای هر بیمار ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده بر روی هر یک از پلاک‌های آنتی‌ژن ریخته شد؛ به‌طوری‌که سطح پلاک آنتی‌ژن را کاملاً پوشاند. سپس لام‌ها در اتاقک مرطوب گذاشته و به مدت ۳۰ دقیقه در درجهٔ اتاق انکوبه شدند. لام‌ها از اتاقک مرطوب خارج شد و در جار حاوی PBS قرار داده شد و بلافاصله بافر خالی و مجدداً به آن بافر افزوده شد. آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه لام‌ها در جار حاوی بافر انکوبه شد. این عمل (مرحلهٔ شستشو) دو بار تکرار شد. پس از پایان یافتن مرحلهٔ دوم انکوباسیون لام‌های گذاشته‌شده در بافر خارج شد و اجازه داده شد در دمای اتاق خشک شوند. از آنتی‌هیومن کنژوگه که به آن یک قطره اوانس بلو افزوده شده بود، به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی هر یک از پلاک‌های آنتی‌ژن اضافه شد و لام در اتاقک مرطوب گذاشته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از پایان یافتن شستشو، لام‌ها از جار خارج شد و پیش از خشک شدن، بر روی هر لام گلیسرین قرار داده شد و روی لام با لامل پوشیده شد. در این مرحله با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس نمونه‌ها بررسی شدند.

آنالیز آماری

برای مقایسهٔ دو روش الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و آزمون T مستقل و در سطح معناداری کمتر از ۰/۰۰۱ استفاده شد.

یافته‌ها

در بین نمونه‌های بررسی‌شده در زنان با سقط‌جنین، ۳۶٪ *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شد. کلنی‌ها به‌صورت ریز و شبنمی مشاهده شد. *لیستریا مونوسیتوژنز* با هیدرولیز اسکولین، کلنی‌های آبی- قهوه‌ای تیره ایجاد کرد و بر روی محیط بلاد آگار همولیز بتا به وجود آورد. تست کاتالازْ مثبت، اکسیدازْ منفی و هیدرولیز اسکولین و هیپوراتْ مثبت بود. افزون بر این، *لیستریا مونوسیتوژنز* ، گلوکز و رامنوز را تخمیر کرد و زایلوز و مانیتول را نتوانست تخمیر کند. متیل رد و وگس- پروسکوئر مثبت و عدم تولید گاز H_2S توسط این باکتری دیده شد.

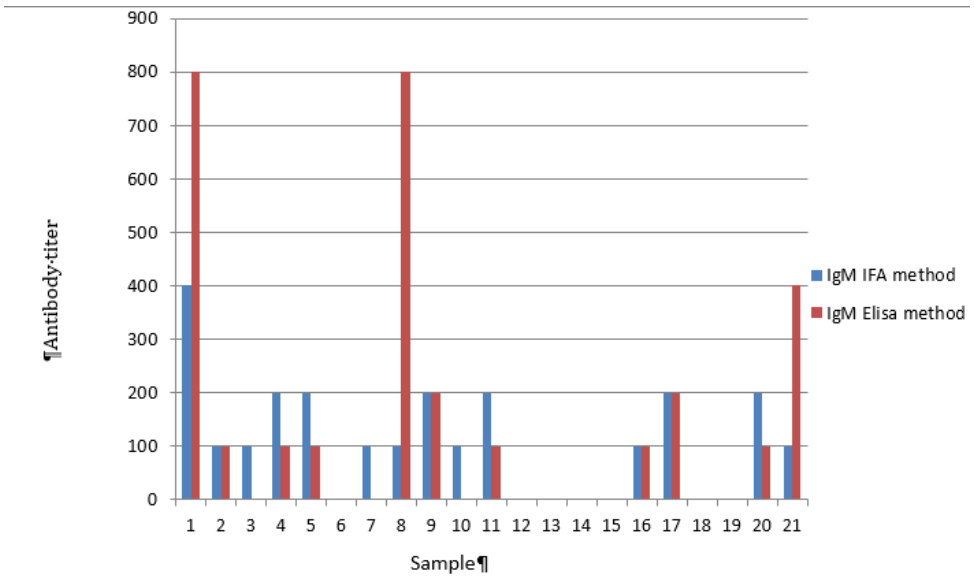
از تعداد ۵۸ نمونه سرم جمع‌آوری‌شده، ۲۱ مورد، آنتی‌بادی‌های ضد *لیستریا* مثبت داشتند که برای این نمونه‌ها تیتر در نظر گرفته شد. بیماران به سه ردهٔ سنی ۳۰-۲۰ و ۴۰-۳۰ و ۵۰-۴۰ تقسیم شدند. تعداد ۳۴ نمونه سقط در محدودهٔ سنی ۲۰-۳۰ (۵۸٪) و ۲۴ نمونه در گروه سنی ۴۰-۳۰ (۴۱٪) دیده شد و محدودهٔ سنی ۵۰-۴۰ بدون سقط‌جنین بودند؛ بنابراین بیشترین تعداد سقط در محدودهٔ سنی ۳۰-۲۰ دیده شد. ماه بارداریِ زنانی که از آن‌ها نمونه‌برداری شد، به سه دورهٔ سه‌ماههٔ اول، سه‌ماههٔ دوم و سه‌ماههٔ سوم تقسیم شدند. ۲۷ نمونه در سه‌ماههٔ اول (۴۶٪)، ۲۹ نمونه در سه‌ماههٔ دوم (۵۰٪) و ۲ نمونه در سه‌ماههٔ سوم (۳٪) دچار سقط‌جنین بودند؛ بنابراین بیشترین تعداد سقط در سه‌ماههٔ اول دیده شد.

ابتدا روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای نمونه‌ها انجام شد. در این روش ابتدا با رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ از سرم استفاده شد و در مواردی که مثبت بودند، رقت‌های بالاتر هم برای آن‌ها گذاشته شد. سپس از روش الیزا برای آزمایش نمونه‌ها استفاده شد که نتایج رقت‌های به‌دست‌آمده به شرح جدول ۱ است. بیشترین میزان تیتر مربوط به رقت ۱/۱۶۰۰ (آنتی‌بادی IgG) و کمترین میزان در رقت ۱/۱۰۰ دیده شد.

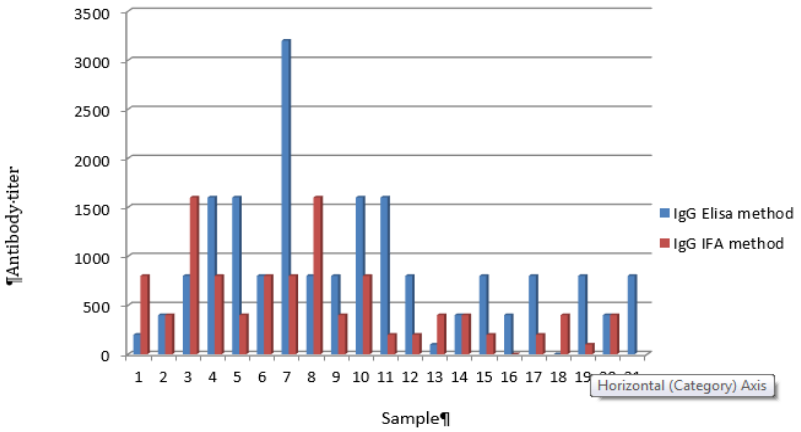
مقایسهٔ تیتر آنتی‌بادی IgM در دو روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا در نمودار ۱ آمده و مقایسهٔ تیتر آنتی‌بادی IgG در دو روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا در نمودار ۲ آمده است.

جدول ۱. تیتر آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* در دو روش الیزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

شمارهٔ نمونه	روش ELISA		روش IFA	
	IgG	IgM	IgM	IgG
۱	۱/۲۰۰	۱/۸۰۰	۱/۴۰۰	۱/۱۰۰
۲	۱/۴۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰	۱/۸۰۰
۳	۱/۸۰۰	_	۱/۱۰۰	۱/۴۰۰
۴	۱/۱۶۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۱۶۰۰
۵	۱/۱۶۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۸۰۰
۶	۱/۸۰۰	_	_	۱/۴۰۰
۷	۱/۳۲۰۰	_	۱/۱۰۰	۱/۸۰۰
۸	۱/۸۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱۰۰	۱/۸۰۰
۹	۱/۸۰۰	۱/۲۰۰	۱/۲۰۰	۱/۱۶۰۰
۱۰	۱/۱۶۰۰	_	۱/۱۰۰	۱/۴۰۰
۱۱	۱/۱۶۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۸۰۰
۱۲	۱/۸۰۰	_	_	۱/۲۰۰
۱۳	۱/۱۰۰	_	_	۱/۲۰۰
۱۴	۱/۴۰۰	_	_	۱/۴۰۰
۱۵	۱/۸۰۰	_	_	۱/۴۰۰
۱۶	۱/۴۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰
۱۷	۱/۸۰۰	۱/۲۰۰	۱/۲۰۰	_
۱۸	_	_	_	۱/۲۰۰
۱۹	۱/۸۰۰	_	_	۱/۴۰۰
۲۰	۱/۴۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۱۰۰
۲۱	۱/۸۰۰	۱/۴۰۰	۱/۱۰۰	۱/۴۰۰



نمودار ۱. مقایسهٔ تیتر آنتی‌بادی IgM در دو روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا



نمودار ۲. مقایسهٔ تیتر آنتی‌بادی IgG در دو روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا

برای تأیید توصیف داده‌ها و تعمیم نتایج پژوهش به جامعه‌ای که نمونه از آن استخراج شده است و حصول اطمینان بیشتر نسبت به یافته‌های پژوهش، میانگین‌های دو گروه از طریق اجرای آزمون t مستقل مقایسه شد. مقایسهٔ میانگین بین دو گروه IgM الیزا و IgM ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان داد که تفاوتی میان میانگین IgM ELISA, IgM IFA وجود ندارد و بین این دو روش تفاوت معناداری دیده نشد (P=۰/۵۳۵). مقایسهٔ میانگین بین دو گروه IgG الیزا و IgG ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشانگر آن بود که تفاوتی میان میانگین IgG ELISA و IgG IFA وجود ندارد و تفاوت معناداری نیست (P=۰/۲۷). مقایسهٔ میانگین بین تیترهای IgG و IgM الیزا تفاوت نداشتن دو میانگین IgG و IgM در روش الیزا را نشان داد و با توجه به میانگین‌ها، تشخیص آنتی‌بادی IgG (۱/۸۰) بهتر از آنتی‌بادی IgM (۱/۲۷) بود. مقایسهٔ میانگین بین IgG و IgM ایمونوفلوروسانس نشان داد که تشخیص آنتی‌بادی IgG (۱/۴۰) بهتر از IgM (۱/۲۱) بود. میانگین روش‌های الیزا و ایموفلوروسانس غیرمستقیم مقایسه شد و روشن شد که هیچ‌گونه تفاوت معناداری در این دو روش وجود ندارد. این امر بیانگر این است که روش‌ها بر یکدیگر برتری ندارند (P= ۰/۱۷).

بحث و نتیجه گیری

سقط علل و عوامل گوناگونی دارد. یکی از عوامل سقط‌جنین عفونت‌هایی است که در دوران بارداری ایجاد می‌شود. باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* باکتری‌ای است که آلودگی با آن سبب سقط‌جنین می‌شود. *لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد لیستریوزیس می‌کند و باعث ایجاد سقط‌های جنین تکراری، مننژیت، تولد نوزاد نارس و عفونت‌های ناشناخته در اندام‌های داخلی بدن می‌شود (۲۱، ۲۲).

نوزادان کوچک‌تر از یک ماه و افراد بالغ بالای ۶۰ سال بیشتر مستعد مبتلا شدن به لیستریوزیس هستند. زنان باردار نیز حدود ۳۰ درصد از مبتلایان را تشکیل می‌دهند. به غیر از نوزادان، بیش از ۷۰ درصد عفونت‌ها در افراد بالغِ دارای بدخیمی‌های خونی، مبتلایان به ایدز، دریافت‌کنندگان پیوند مغز و استخوان و همچنین کسانی که از کورتیکواستروئیدها استفاده می‌کنند، به وجود می‌آید (۲۳، ۲۴). زنان باردار به عفونت‌های لیستریایی حساس هستند. این ارگانیسم به جفت حمله می‌کند و باعث زایمان‌های زودرس و یا مرگ جنین می‌شود. افزون بر آن، لیستریوزیس در دورهٔ بارداری می‌تواند بدون علامت باشد و یا دارای علائم خفیفی مانند داشتن تب خفیف باشد که در معاینات تشخیص داده نشود. اگر تشخیص داده نشود، عفونت را در جنین ایجاد می‌کند که منجر به زایمان زودرس و سقط‌جنین می‌شود و همچنین ممکن است گرانولوماتوز اینفنتوسپتیکا را به وجود آورد. در دنیا پژوهش‌های زیادی بر روی بیماری‌زایی *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام شده که به برخی از موارد آن در اینجا اشاره می‌شود (۱۶).

در مطالعهٔ پیش رو، در طی ۶ ماه نمونه‌گیری از زنان با سقط‌جنینِ خود به خودی انجام شد. پس از تهیهٔ نمونه‌های خون در هر نوبت این نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها ابتدا کشت داده شدند و کلنی‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و نیز رنگ‌آمیزی گرم تأیید شدند. سرم نمونه‌های خون جدا و با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم بررسی شد. از ۵۸ نمونهٔ گرفته‌شده، تعداد ۳۴ سقط در محدودهٔ سنی ۳۰-۲۰ دیده شد، اما در رِنج سنی ۴۰ تا ۵۰ سال هیچ سقط‌جنینی رخ نداد. بیشترین تعداد سقط در سه‌ماههٔ اول با میزان ۲۷ و کمترین میزان سقط در سه‌ماههٔ دوم با ۲ سقط مشاهده شد.

در مطالعات مشابه توسط Benshushan و همکاران (۲۰۰۲)، تحقیقی از ۶۵۰۲۲ زن باردار در طی ۱۰ سال انجام شد که نشان داد ۱۱۰۰ زن باردار و نوزادان آن‌ها به عفونت لیستریایی دچار بودند. از هر ۵ جنین، در یکی از آن‌ها تورم پردهٔ آمنیوتیک و آبسه‌های متعدد دیده شد (۱۰). مطالعهٔ دیگری توسط Martne (۱۹۹۱) انجام شد که در آن پاسخ‌های سرولوژیکی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان بارداری که بدون علائم کلینیکی بودند، بررسی شد. در این مطالعه پژوهشگر توانست شمار زیادی از عفونت‌های نهفتهٔ بیماران را تشخیص دهد (۱۱). پژوهش دیگری توسط Mylonakis (۲۰۰۲) نشان داد که عفونت لیستریایی روی جنین اثر می‌گذارد و باعث سقط‌جنین و یا به دنیا آمدن نوزاد نارس می‌شود. در این مطالعه از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده کردند. از ۳۰۷ زن باردار که بدون علامت عفونت بودند، ۲۰۷ نفر دچار سقط‌جنین شدند که در این زنان بالا بودن تیتر آنتی‌بادی آن‌ها نشان داد که به عفونت لیستریایی دچار بودند و این دلیل سقط‌جنین در آن‌ها بود. درمان زنان بارداری که آنتی‌بادی آن‌ها مثبت بود، باعث به دنیا آمدن ۱۵۲ نوزاد سالم شد (۱۲).

در مطالعهٔ دیگری در روسیه، پاسخ‌های سرولوژیکی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در زنان بارداری که بدون علائم کلینیکی بودند، ارزیابی شد. برای این نمونه‌ها از روش ایمونوفلورسانس استفاده شد که پژوهشگران آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌بادی‌های ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* را به کار بردند. این پژوهشگران در این مطالعه توانستند شمار زیادی از عفونت‌های نهفتهٔ بیماران را تشخیص دهند (۱۸). در سال ۱۳۸۷ در ایران پژوهشی توسط Yaghoobi و همکاران انجام شد که بر اساس آن اثر *لیستریا مونوسیتوژنز* بر روی زنان باردار و ارتباط بین لیستریوزیس و سقط‌جنین در ۲۰۴ زن در شهر جهرم به مدت یک سال ارزیابی شد. بر روی سرم این زنان روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم انجام شد. در این تحقیق نشان داده شد که ۱۲/۵ درصد از سقط‌جنین‌ها در اثر آلودگی با *لیستریا* اتفاق افتاده است. گروه سنی‌ای که بیشترین آلودگی را داشته‌اند، گروه سنی ۱۶ تا ۲۰ سال و ۲۵ تا ۳۰ سال بودند (۱۴). تحقیقی در سال ۱۳۸۸ توسط Mahin و همکاران انجام شد. در این تحقیق ۲۵۰ نفر از زنانی که دارای سقط‌جنین خودبه‌خودی بودند و یک گروه ۲۰۰ نفری از زنانی که دارای زایمان عادی بودند، در نظر گرفته شدند. از همهٔ این افراد نمونهٔ خون گرفته شد و سرم آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر روی همهٔ این سرم‌ها روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم انجام شد. ۳۵/۶ درصد از زنانی که سقط‌جنین داشتند و ۱۷/۵ درصد از زنانی که بدون سقط‌جنین بودند، از نظر آنتی‌بادی‌های ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت بودند (۱۵).

در مطالعهٔ پیش رو، در مدت زمان ۶ ماه، سرم ۵۸ تن از زنانی که دارای سقط‌جنین خود به خودی بودند، از بخش ژنیکولوژی بیمارستان کمالی کرج گردآوری شد. برای تشخیص وجود یا عدم وجود آنتی‌بادی ضد *لیستریا* در این نمونه‌ها از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شد. از این ۵۸ نمونه ۲۱ نمونه ازلحاظ آنتی‌بادی ضد *لیستریا* با هر دو روش مثبت بودند. برای نمونهٔ سرم‌های مثبت تیتر آن‌ها برای آنتی‌بادی‌های IgG و IgM نیز بررسی شد. برای روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم این کار انجام شد. مقایسهٔ میانگین بین IgG و IgM ایمونوفلوروسانس تفاوت معناداری را نشان داد.

در مطالعهٔ ما هدف معرفی روشی بود که بتوان توسط آن آنتی‌بادی‌های ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* را شناسایی کرد تا به تشخیص زودهنگام عفونت ایجادشده توسط این باکتری رسید و نیز بتوان از این روش به‌سادگی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده کرد. در این پژوهش از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شد. از نظر آنتی‌بادی‌ها نشان داده شد که در دو روش تشخیص آنتی‌بادی IgG بهتر صورت گرفت و در ۷ مورد از نمونه‌ها تیتر IgM دیده نشد. در مطالعه‌ای، Nasrolahei و همکاران (۲۰۰۶)، با بررسی سرولوژیکی، عوامل ایجادکنندهٔ سقط و مرگ جنین در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی ساری، به این نتیجه رسیدند که مایکوپلاسما، سایتومگالوویروس و روبلا عامل سقط‌جنین در زنان بودند و استفاده از روش ELISA افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG علیه میکروارگانیسم‌های اشاره‌شده را نشان داد (۲۱). در مطالعهٔ دیگر توسط Sotoodeh Jahromi و همکاران (۲۰۱۱)، سرم زنانی که دچار سقط‌جنین شده بودند و نیز زنان که دچار سقط نشده بودند را از نظر آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد روبلا با روش ELISA بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که تفاوت معنادار تیتر آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد روبلا نسبت به گروه کنترل دیده شد (۲۲).

در مطالعه حاضر، برخلاف مطالعات گذشته که در مورد ویروس‌هایی مانند مایکوپلاسما، سایتومگالوویروس و روبلا انجام شده بود، پژوهش بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام گرفت و همانند مطالعات گفته‌شده در این مقاله، از روش الیزا استفاده شد. مقایسهٔ میانگین بین تیترهای IgG و IgM، عدم تفاوت بین

میانگین IgG و IgM در روش الیزا را نشان داد و با توجه به میانگین‌ها، تشخیص آنتی‌بادی IgG (۱/۸۰) بهتر از آنتی‌بادی IgM (۱/۲۷) بود. به‌طورکلی مقایسهٔ میانگین بین دو گروه IgM الیزا و IgM ایمونوفلورسانس غیرمستقیم بیانگر آن است که تفاوتی بین میانگین IgM ELISA و IgM IFA وجود ندارد و می‌توان نتیجه گرفت بین این دو روش تفاوت معناداری دیده نمی‌شود ($P=$ ۰/۵۳۵). مقایسهٔ میانگین بین دو گروه IgG الیزا و IgG ایمونوفلورسانسِ غیرمستقیم نیز بیانگر آن است که تفاوتی میان میانگین IgG ELISA و IgG IFA وجود ندارد و تفاوت معناداری را نمی‌توان دید ($P>$۰/۰۰۱). همچنین مقایسهٔ میانگین روش‌های الیزا و ایموفلوروسانس غیرمستقیم نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت معناداری در این دو روش وجود ندارد و بیانگر این است که این روش‌ها بر یکدیگر برتری ندارند (۰/۰۰۱ $P>$).

در تحقیقاتی که انجام‌شده، نشان داده شده است که بیشتر سقط‌جنین‌ها در زنانی رخ می‌دهد که اولین بارداری را تجربه می‌کنند. این ممکن است نشان‌دهندهٔ آن باشد که افزایش در تعداد دفعات بارداری می‌تواند ایمنی بدن را در برابر عوامل سقط‌جنین افزایش دهد. همچنین نشان داده شد که زنان جوان‌تر باوجوداینکه آنتی‌بادی *لیستریا* در آن‌ها مثبت بود، می‌توانستند یک زایمان موفق را داشته باشند. ممکن است بر اساس تشابه *لیستریا مونوسیتوژنز* و بعضی دیگر از باکتری‌ها بر هم کنش‌های ایمونولوژیکی هم اتفاق بیفتد (**۵، ۲۵، ۲۶**). در این مطالعات نشان داده شد که عفونت‌های ناشی از *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌توانند یکی از علل سقط‌جنین در زنان باردار باشند. بر اساس نتایج، سقط‌جنین‌های قبلی و استفاده از داروها، همراه شدن برخی از عفونت‌ها در دوران بارداری و در تماس بودن با حیوانات به‌طور مستقیم، با عفونت‌های لیستریایی در ارتباط است. همچنین عفونت‌های لیستریایی از راه منابع غذایی هم ایجاد می‌شوند که می‌توان به سادگی از بروز آن‌ها جلوگیری کرد (**۲۷،۲۸**).

در مطالعات پیشین تنها از یک روش استفاده شده، ولی در مطالعهٔ حاضر دو روش به‌صورت مقایسه‌ای به کار گرفته شده و سعی بر این بوده است که یک روش انتخاب شود تا بتوان از آن برای تشخیص در آزمایشگاه‌ها استفاده کرد و از سقط‌جنین‌هایی که بر اثر عفونت‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* رخ می‌دهند، جلوگیری کرد.

تشخیص سریع و دقیق بیماری، یکی از مواردی است که باعث کاهش میزان مرگ‌ومیر و هزینه‌های بیمارستانی می‌شود. روش‌های سنتی مبنی بر کشت، اگرچه هنوز هم به‌عنوان استاندارد طلایی در شناسایی عوامل عفونی نظیر *لیستریا* مطرح است، ولی در مقایسه با روش‌های الیزا و ایمونوفلورسانس محدودیت‌هایی از جمله گرانی و ناپایداری محیط‌ها، دشواری تهیهٔ مواد موردنیاز برای افزودن به محیط‌های کشت، کنترل دقیق pH محیط‌های کشت و نیاز به کارکنان باتجربه را دارند. در این تحقیق، *لیستریا* به دلیل اهمیتی که در ایجاد بیماری‌ها در انسان دارد و نیز به دلیل اینکه می‌تواند سقط‌جنین مکرر را در انسان ایجاد کند، بررسی شد. با توجه به اینکه تشخیص سریع و شروع به‌موقع درمانِ ضدمیکروبی سبب پیشگیری از وقوع سقط و کاهش عوارض بارداری می‌شود، بنابراین پیشنهاد می‌شود از روش‌های الیزا و ایمنوفلورسانسِ غیرمستقیم در شناسایی عوامل منجر به سقط استفاده شود.

نتیجه‌گیری

تیترهایی به‌دست‌آمده پس از تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که تفاوت معناداری بین تیتر آنتی‌بادی‌ها وجود دارد (P بیشتر از ۰/۰۰۱ بود). در دنیا روش کشت به‌عنوان گلد استاندارد در نظر گرفته شده است. روش‌های مولکولی نیز امروزه برای تشخیص وجود دارند، ولی ما در این تحقیق کوشیدیم که روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تری را معرفی کنیم تا بتوان از این روش‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌سادگی بهره برد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه بیمارستان کمالی کرج کمال سپاسگزاری را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Stambach NR, Carr SA, Cox CR, Voorhees KJ. Rapid detection of Listeria by bacteriophage amplification and SERS-Lateral flow immunochromatography. Viruses. 2015;7(12):6631–41.
2. Abfalter CM, Schmidt TP, Wessler S. Proteolytic activities expressed by gastrointestinal pathogens Bacillus cereus, Listeria monocytogenes and Enterococcus faecium in different growth phases. Br Microbiol Res J. 2015;7(2):62–70.
3. Wang Y, Wang Y, Ma A, Li D, Luo L, Liu D et al. The novel multiple inner primers-loop-mediated isothermal amplification (MIP-LAMP) for rapid detection and differentiation of Listeria monocytogenes. Molecules. 2015;20(12):21515–31.
4. Soni DK, Singh DV, Dubey SK. Pregnancy - associated human listeriosis: virulence and genotypic analysis of Listeria monocytogenes from clinical samples. J Microbiol. 2015;53(9):653–60.
5. Pérez-Trallero E, Zigorraga C, Artieda J, Alkorta M, Marimón JM. Two outbreaks of Listeria monocytogenes infection, Northern Spain. Emerg Infect Dis. 2014;20(12):2155–7.
6. Okpo E, Leith J, Smith-Palmer A, Bell J, Parks D, Browning F et al. An outbreak of an unusual strain of Listeria monocytogenes infection in North-East Scotland. J Infect Public Health. 2015;8(6):612–8.
7. Gu Y, Liang X, Huang Z, Yang Y. Outbreak of Listeria Monocytogenes in Pheasants. Poult Sci. 2015;94(12):2905–8.
8. Xiao J, Niu L. Antilisterial peptides released by enzymatic hydrolysis from grass carp proteins and activity on controlling L. monocytogenes inoculated in Surimi Noodle. J Food Sci. 2015;80(11):M2564–9.
9. Fullerton L, Norrish G, Wedderburn CJ, Paget S, Basu Roy R, Cane C. Nosocomial neonatal Listeria monocytogenes transmission by stethoscope. Pediatr Infect Dis J. 2015;34(9):1042–3.
10. Benshushan A, Tsafrir A, Arbel R, Rahav G, Ariel I, Rojansky N. Listeria infection during pregnancy: a 10 year experience. Isr Med Assoc J. 2002;4(10):776–80.
11. Premaratne RJ, Lin WJ, Johnson EA. Development of an improved chemically defined minimal medium for Listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol. 1991;57(10):3046–8.
12. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. Medicine (Baltimore). 2002;81(4):260–9.
13. Pujol I, Vidal A, Joven J. [The seroprevalence of Listeria infections without clinical sign in a population of pregnant women from the Reus area]. Rev Clin Esp. 1990;187(4):175–7.
14. 14. Yaghoobi T, Farshid K. yadollah A M. Listeria monocytogenesis and abortion :a case study of pregnant women in iran. Afr J Microbiol Res. 2009;3(11):826–32.
15. Mahin J, Abdolreza S, Parivash D, Malihe A, Mehrangiz Z, Fatemeh J. Seropositivity for Listeria monocytogenes in women with Spontaneous abortion. Taiwan Obstet Gynecol. 2008;48(11):54–61.
16. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. [Main virulence factors of Listeria monocytogenes and its regulation]. Rev Chilena Infectol. 2013;30(4):407–16.
17. Wang P, Chen Y, Wang H, Yang S, Xu Y, Li T. [A clinical analysis of 16 patients with maternal listeriosis]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2015;54(9):763–7.
18. Chordia N, Sharma NK, Kumar A. An interactomic approach for identification of putative drug targets in Listeria monocytogenes. Int J Bioinform Res Appl. 2015;11(4):315–25.
19. Pightling AW, Petronella N, Pagotto F. The Listeria monocytogenes Core-Genome Sequence Typer (LmCGST): a bioinformatic pipeline for molecular characterization with next-generation sequence data. BMC Microbiol. 2015;15(1):224.
20. Gu Y, Liang X, Huang Z, Yang Y. Outbreak of Listeria Monocytogenes in Pheasants. Poult Sci. 2015;94(12):2905–8.
21. Nasrolahei M, Vahedi M. Serologic study of bacterial and viral causes of abortion and fetus death in the patients referring to Imam Khomeini hospital of Sari N orthem Iran. Int J Mol Med Adv Sci. 2006;2(2):208–10.
22. Sotoodeh Jahromi A, Kazemi A, Manshoori G, Madani A, Moosavy SH, Seddigh B. Seroprevalence of Rubella virus in women with spontaneous abortion. Am J Infect Dis. 2011;7(1):16–9.
23. Prieto M, Martínez C, Aguerre L, Rocca MF, Cipolla L, Callejo R. Antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes in Argentina. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(2):91–5.
24. Lv J, Qin Z, Xu Y, Xie Q. Listeria infection in Chinese pregnant women and neonates from Shandong. Int J Clin Exp Med. 2014;7(9):2730–4.
25. Awofisayo A, Amar C, Ruggles R, Elson R, Adak GK, Mook P et al. Pregnancy-associated listeriosis in England and Wales. Epidemiol Infect. 2015;143(2):249–56.
26. Hardy J, Kirkendoll B, Zhao H, Pisani L, Luong R, Switzer A et al. Infection of pregnant mice with Listeria monocytogenes induces fetal bradycardia. Pediatr Res. 2012;71(5):539–45.
27. adhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes. J Microbiol Methods. 2012;88(3):327–41.
28. Soni DK, Singh DV, Dubey SK. Pregnancy - associated human listeriosis: virulence and genotypic analysis of Listeria monocytogenes from clinical samples. J Microbiol. 2015;53(9):653–60.