Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Determination of Dominant Serovars and Molecular Analysis of *hly* and *iap* Genes Related to *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Spontaneous Human Abortions in Tehran

Maryam Rezaei [1], Nadia Kazemipour[1], Jalil Vandyousefi *[2], Farokh Rokhbakhshzamin [1], Gholamreza Irajian [3]

1. *Department of Microbiology, Islamic Azad University branch of Kerman, Kerman, Iran*
2. *Shila Medical Diagnostic Laboratory, Tehran, Iran*
3. *Research Center of Microbial Biotechnology of Iran Medical University, Tehran, Iran*

Article Information

Article Subject:
Molecular Microbiology

DOI:

Corresponding author:

Jalil Vandyousefi,
Shila Medical Diagnostic Laboratory, Tehran, Iran

Email:
info@shilalab.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Listeria monocytogenes*, a gram positive, facultative, intracellular bacterium is the causative agent of listeriosis that is transmitted to human through raw and ready-to-eat foods. The aim of the present study was to determine dominant serovars of *L. monocytogenes* isolated from spontaneous abortion using phenotypic and genotypic methods.

Materials and Methods: In present study, 258 clinical specimens including placental secretions, vaginal swabs and blood samples from 123 patients with abortion were selected in sterile condition then bacteriological, serological and molecular tests were conducted; dominant serotypes were identified by Multiplex PCR.

Results: Out of 28 (%18.8) isolates of *L. monocytogenes* 21 (%17.7), 5 (%5.7) and 2 (%3.37) were isolated from placental secretions, vaginal swabs and blood respectively. Maximum and minimum isolated of bacteria related to placental secretions and vaginal swabs with 21 and 2 isolates respectively, of which 14 (%50) 1/2a, 10 (%35.7) 4b and 4 (%14.6) 2c serovars were reported for the first time. All of serovars played a key role in the spontaneous abortion as dominant and common serotypes in Iran. All of the isolates 28 (%22.76) showed *hlyA* gene and 24 isolates (%19.57) were positive for *iap* gene and compaired with control group there was significant different between the two groups (P<0.0002).

Conclusion: The present study showed the isolation dominant and common serotypes of *L. monocytogenes* from spontaneous abortion and demonstrated that the presence of *hlyA* and *iap* were effective genes in increasing aggressive and pathogenicity. Serotypes that lacked the *iap* gene have less pathogenicity and influenced the pathogenesis in mice. It was also concluded that in the absence of access to molecular tests, performing PI-PLC, Congored and in vivo pathogenicity can be effective in detecting pathogenic serotypes from non-pathogenic *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Dominant serotypes, *iap*, *hly*, Spontaneous abortion, Multiplex-PCR

Received: 2019/05/21 Accepted: 2019/07/31 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Rezaei M, Kazemipour N, Vandyousefi J, Rokhbakhshzamin F, Irajian G. Determination of Dominant Serovars and Molecular Analysis of hly and iap Genes Related to Listeria monocytogenes Strains Isolated from Spontaneous Human Abortions in Tehran. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :102-113

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۲ ـ خرداد و تیر ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله پژوهشی

بررسی سروواریته‌های غالب *لیستریا منوسیتوژنز* با فنوتیپ و ژنوتیپ‌های جدا شده از سقط جنین‌های خودبخودی انسانی در تهران

مریم رضائی[۱]، نادیا کاظمی پور[۱]، جلیل وندیوسفی*[۲]، فرخ رخ بخش زمین[۱]، غلامرضا ایراجیان[۳]

۱. گروه میکربشناسی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۲. آزمایشگاه تشخیص پزشکی شیلا، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۳
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱
موضوع:
میکروب‌شناسی مولکولی
IJMM1398;13(2): 102-113

نویسندهٔ مسئول:
جلیل وندیوسفی
آزمایشگاه تشخیص پزشکی شیلا، تهران، ایران
پست الکترونیک:
info@shilalab.com

چکیده

زمینه و هدف: *لیستریا منوسیتوژنز* یک باکتری درون سلولی اختیاری و عامل بیماری لیستریوزیس است که از طریق مواد غذایی خام و آماده مصرف به انسان منتقل می‌شود. هدف پژوهش حاضر بررسی سروواریته‌های غالب *لیستریا منوسیتوژنز* جداشده از سقط جنین‌های خودبخودی با روش های فنوتیپی و ژنوتیپی است.

مواد و روش‌کار: دراین مطالعه تعداد ۲۵۸ نمونهٔ بالینی شامل ترشحات جفت، سواپ واژن و خون از ۱۲۳ بیمار مبتلا به سقط جنین خودبخودی بررسی شدند و آزمایش‌های باکتری‌شناسی، سرولوژی و تسمت بیماریزایی انجام و سروتیپ‌های غالب با استفاده از Multiplex PCR شناسایی شدند.

یافته‌ها: در این پژوهش ۲۸ (۱۸/۸٪) *لیستریا منوسیتوژنز* جدا گردید که تعداد ۲۱ (۱۷/۷٪)، ۵ (۵/۷٪) و ۲ (۳/۷٪) از ترشحات جفت، واژینال و خون جدا شدند که ۱۴ (۵۰٪) سروواریته a ۱/۲ و ۱۰ (۳۵/۷٪) سروواریته 4b و ۴ (۱۴/۶٪) مورد سروتیپ **2c**، برای نخستین بار از سقط جنین خودبخودی گزارش گردید. ۲۸ مورد (۲۲/۷۶٪) *لیستریا منوسیتوژنز* با ژن *hlyA* و ۲۴ مورد با ژن *iap* (۱۹/۵۷ ٪) در مقایسه با گروه شاهد با اختلاف معنی داری مثبت شدند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص گردید وجود ژن‌های *hlyA* و *iap* افزاینده شدت بیماریزایی بودند و برای اولین بار نشان داده شد سروتیپ‌های فاقد ژن *iap* از شدت بیماریزایی کمتری در موش‌ها برخوردار بودند. این نتیجه حاصل شد که در صورت عدم دسترسی به تشخیص‌های مولکولی، انجام PI-PLC، کنگورد و بیماریزایی in vivo می‌توانند در تشخیص لیستریا موثر باشند.

کلمات کلیدی: *لیستریا منوسیتوژنز*، سروتیپ‌های غالب، ژن‌های *iap* و *hly*، سقط جنین خودبخودی، مولتی پلکس PCR

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

لیستریا منوسیتوژنز، باکتری گرم مثبت پاتوژن درون سلولی فرصت طلب و عامل عمدهٔ عفونت‌های انسانی ناشی از غذا در سراسر جهان است. این باکتری از طریق غذاهای آمادهٔ مصرف و فراورده‌های لبنی و گوشتی به انسان منتقل می‌شود و عامل عفونت‌های خطرناک در خانم‌های باردار، افراد دارای مشکل ایمنی، نوزادان، افراد پیر و ناتوان است (۵-۱). اهمیت *لیستریا منوسیتوژنز* به دلیل مقاومت بالای باکتری در مقابل شرایط دشوار محیطی است. این پاتوژن در دمای ۴ تا ۴۵ درجه سلسیوس و pH ۴/۵ تا ۹ و محیط دارای ۱۰ درصد کلرید سدیم قادر به فعالیت است.

در ایالت متحده آمریکا سالیانه حدود ۲۵۰۰ مورد لیستریوز تهاجمی ناشی از *لیستریا منوسیتوژنز* گزارش می‌شود که منجر به مرگ و میر ۵۰۰ نفر در سال می‌شود (۴). طیف بالینی لیستریوزیس از تحت بالینی تا عفونت‌های منتشره با دو هدف اختصاصی یعنی واحد جفت- مادری و سیستم عصبی مرکزی متغیر است (۶).

در سال‌های اخیر، این باکتری به‌عنوان الگویی جهت مطالعه ژنتیکی زندگی میکروارگانیسم‌های داخل سلولی مطرح شده است. این باکتری از مکانیسم‌های ضد میکروبی فاگوسیت‌ها می‌گریزد. *لیستریا منوسیتوژنز* این عمل را با فرار از فاگوزوم به درون فضای

www.SID.ir

Archive of SID

سیتوزولی انجام می‌دهد. پروتئین‌های دخیل در این واکنش، نوعی از همولیزین هستند که غشاء فاگوزومی را هدف قرار می دهند (۶،۴).

از سوی دیگر توانایی باکتری در عبور از واحد جنینی- جفتی اهمیت فراوانی دارد؛ زیرا لیستریوزیس در زنان باردار می‌تواند منجر به سقط جنین، زایمان زودرس و عوارضی جدی بعد از تولد شود. مهمترین عارضه شناخته شده آن، مننژیت نوزادی است (۶،۷). *لیستریا منوسیتوژنز* با باکتری درون سلولی اختیاری است و از طریق ویژگی‌هایی مانند، اشتراک بین انسان و حیوان (zoonotic)، منتقله از راه مصرف مواد غذایی (Food-borne)، خاک و خاشاک (Sapronose) و سرمادوستی (Psyhcrophil)، انسان را آلوده می‌کند. همچنین با توجه سرووواریته‌های مختلف ۷، ۴ c،۴ab، ۱/۲ c،۳c، ۴ a،۴ b، ۱/۲ b،۳a،۳b، ۴ a، ۱/۲ a، ۱/۲، پراکندگی وسیعی در طبیعت دارد شناسایی این سرووواریته ها در مواد غذایی وموارد انسانی به طور پراکنده گزارش شده ولی شناسایی و غالب بودن آن ها در سقط جنین های خودبخودی مورد پژوهش قرار نگرفته است. انجام این پژوهش، ارتباط زنجیره ای بین سروتیپ های جداشده از نمونه های غذایی و سقط جنین های انسانی خودبخودی را ثابت می کند. انجام این پژوهش، ارتباط زنجیره‌ای بین سروتیپ‌های جدا شده از نمونه های غذایی و موارد انسانی اختصاصی سقط جنین‌های خود بخودی را ثابت می‌کند (۱۰-۸).

مطالعات انجام شده در مورد شناسایی ژنوتیپ‌های *لیستریا منوسیتوژنز* فقط نشانگر مجموعه‌ای از ژن‌های (*plc mpl, hlyA,prfA, A,B,act A, iap,ctpA*) در *لیستریا منوسیتوژنز* است. تاکنون مطالعاتی برای تشخیص این که کدام یک از سروتیپ‌های غالب دارای دو ژن تهاجمی *iap* و *hlyA* هستند، انجام نیافته است. ممکن است، یکی از علل سقط‌های خود بخودی، تهاجمی بودن این دو ژن در یک دوره از بارداری باشد و این که چند درصد از سروتیپ‌های حاوی این ژن‌ها در سقط جنین‌های خود بخودی موثر هستند.

معرفی سویه‌های باکتریایی با فنوتیپ‌های پاتوژنتیکی مرگ‌آور و خطرناک، توسعه مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک و همچنین کسب روش‌های جدید انتقال ژن در بین میکروارگانیسم‌های میزبان، محققین را برای شناسایی و کنترل منشاء و انتشار واریانت‌های ژنتیکی داخل یک گونه دچار سردرگمی کرده است. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع عفونت‌های بیمارستانی، شناسایی مخازن آلودگی، جداسازی ژنوتیپ‌های خاص در کونژوگاسیون با یک باکتری خاص را مشخص کرد. در حال حاضر تکنیک‌های متعددی برای تیپ‌بندی و بررسی ارتباط تکاملی *لیستریا منوسیتوژنز* وجود دارد مانند PFGE (Pulsed Filed Gel Electrophoresis) که به‌عنوان استاندارد طلایی تایپینگ برای بسیاری از باکتری‌ها مطرح است ولی این تکنیک بسیار زمان بر، پر هزینه و تفسیر داده‌های آن بسیار مشکل است (۱۴-۱۱).

بهترین روش‌های مولکولی، تکنیک‌های Multilocus MLST (Sequences Typing, HRM (High Resolution Melt Analysis) و Realtime PCR می‌باشند که هریک از روش‌ها، مزیت های خاص خود را دارند. در این پژوهش با توجه به امکانات از روش Multiplex PCR استفاده گردید که از حساسیت و ویژگی خاصی برخودار است (۱۵،۱۶).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۲۵۸ نمونهٔ بالینی شامل ۸۷ (۳۳/۷٪) نمونه سواپ واژن، ۱۱۸(۴۵/۸٪) نمونه جفت و ۵۳ (۲۰/۵٪) در نمونه خون در شرایط استریل از ۱۲۳ بیمار که در بیمارستان‌های مناطق چهارگانه تهران با عارضه سقط جنین خودبخودی که مورد تایید متخصص زنان و زایمان بود تهیه گردیدند. این پژوهش از اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ تا فروردین ماه ۱۳۹۷ انجام شد و تشخیص باکتری بر مبنای جداسازی در محیط کشت بود. نمونه‌ها از ترشحات جفت جنین، ترشحات واژینال و خون تهیه و به مدت ۶-۴ هفته در محیط کشت TSYEB (Trytocase Soy Yeast Extract Broth) در ۴ درجه سلسیوس سرماگذاری شدند. سپس بر روی محیط های پالکام و تریپتوز آگار (همراه با ۰/۶٪ عصاره مخمر با اضافه کردن ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند) کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (۲۰-۱۷).

تعیین فنوتیپ تهاجمی *لیستریا منوسیتوژنز*

کنگورد، ترکیبی محلول در آب است که پس از انحلال در آب تشکیل محلولی قرمز می‌دهد. در میکروب شناسی، این رنگ برای تشخیص کلونی‌های *شیگلا فلکسنری* سروتیپ ۲a به کار می رود. در مورد باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* به نظر می‌رسد کنگورد بیان ژن‌های بیماریزایی را تحریک نماید (۲۱).

تعیین سروتایپ های *لیستریا منوسیتوژنز* با استفاده از آنتی بادی منوکلونال

جهت تعیین سروتایپ و تشخیص سویه‌های غالب جداشده با روش سرواگلوتیناسیون با استفاده از آنتی بادی منوکلونال که از شرکت Denka Seiken Co.Tokyo,Japan تهیه شده بود استفاده گردید (۱۵).

تست آنزیماتیک API(Analytical Profile Index)

از کیت‌های ردیابی ایمنوآنزیماتیک (Biomerieux) جهت تایید تشخیص جنس و گونه استفاده شد. از کلونی‌هایی که از نظر اختصاصات ظاهری و بیوشیمیایی به عنوان لیستریا تشخیص داده شدند

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون معادل غلظت یک مک فارلند (۳×۱۰^{۸} CFU) تهیه گردید. روی کیت API ده تستی که حاوی آریل آمیداز، اسکولین، آلفا-مانوزیداز، د- آرابیتول، گلوکز ۱-فسفات، د- گزیولوز، د- ریبوز، ال-رامنوز، آلفا متیل د-گلیکوزید، د- تاگاتوز بودند به نحوی انتقال داده شد که حبابی در چاهک‌ها تشکیل نشد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از طی مدت زمان فوق یک قطره از معرف ZYmB روی خانه متعلق به آریل آمیداز ریخته شد. پس از سه دقیقه تغییرات رنگی چاهک ها با علامت مثبت و منفی و اعداد توصیفی دستورالعمل کیت، کدگذاری شده حاصل یک عدد چهار رقمی شد که با روش نرم‌افزاری کیت، *لیستریا منوسیتوژنز*ها مورد تایید قرار گرفتند (۱۶).

تست تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک های انتخابی

از تعداد ۲۸ جدایه *لیستریا منوسیتوژنز* با سروتیپ‌های مختلف به روش رقت در آگار و تست آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک انجام شد. در آزمایش حساسیت جدایه‌های *لیستریا منوسیتوژنز* از سقط جنین‌های خودبخودی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک‌های استاندارد موجود در بازار که دارای غلظت‌های متفاوتی بودند به روش انتشار از دیسک انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$) تهیه شد و توسط سواپ استریل به صورت یکنواخت در سطح محیط کشت مولرهینتون آگار پخش گردید. پس از ۲ الی ۵ دقیقه، تعداد ۵ تا ۷ دیسک از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط پنس استریل بر روی کشت باکتری قرار داده شدند و ۱۴ تا ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از گذشت زمان لازم، میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد توسط خط کش میلی‌متری با توجه به جدول NCCLS گزارش شدند (۲۲).

بررسی بیماریزایی جدایه ها در شرایط in vivo

جهت بررسی بیماریزایی سروتیپ های *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از سقط جنین‌های خودبخودی در شرایط in vivo با تزریق ۰/۴ سانتی‌متر مکعب از سوسپانسیون سروتیپ‌ها با غلظت ۱ مک‌فارلند (معادل ۳×۱۰^{۸} CFU/ml) به ۳۰ موش ۲۰-۱۸ گرمی در سه گروه ۹ عددی همراه با یک گروه کنترل از راه صفاق انجام گردید (۲۳).

بررسی‌های مولکولی

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابتدا DNA *لیستریا منوسیتوژنز* استخراج شده سپس عمل PCR طبق روش استاندارد انجام گرفت (۲۷-۲۴).

طراحی پرایمر

جدول۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های *hly, iap* در این مطالعه(۲۷-۲۴)

1	2	3
No.	Name	Seq.(5-3)
1	hly A- F	GGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA
2	hly A- R	GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG
3	iap-F	ACAAGCTGCACCTGTTGCAG
4	iap-R	TGACAGCGTGTGTAGTAGCA

واکنش PCR

برای انجام واکنش PCR، ابتدا Master Mix به حجم ۱۳/۵ میکرولیتر (بافر10X PCR، Mgcl2، dNTPs، پرایمر، DNA الگو) تهیه و در لوله های ۰/۲ میلی لیتری تقسیم گردید. به این منظور سویه‌ای که از نظر وجود هر دو ژن مورد مطالعه مثبت بود را پس از تعیین توالی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین کنترل مثبت برای واکنش‌های بیوشیمیایی، *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC7644) استفاده شد. به‌منظور صحت مراحل کار و اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها سویه‌هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923)، به عنوان کنترل منفی این مطالعه در نظر گرفته شدند. همچنین تعیین توالی ژن‌ها و سروتیپ ها مورد مطالعه قرار گرفت (۲۷-۲۴).

جدول ۲. شرایط انجام PCR

مراحل	دما (سلسیوس)	زمان	تعداد تکرار
Primary Denaturation	۹۴	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۹	۵۰ ثانیه	
Extension	۷۲	۷۰ ثانیه	
Final Extension	۷۲	۱۰دقیقه	۱

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز آماری داده ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم افزار Epi Info نسخه ۷,۱,۳,۱۰ و تست Chi-Square به ازای $P > ۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها

در این پژوهش از ۱۲۳ بیمار مبتلا به سقط جنین خودبخودی، تعداد ۲۵۸ نمونه شامل ۱۱۸ (۴۵/۸٪) ترشحات جفت، ۸۷ (۳۳/۷ ٪) ترشحات واژینال و ۵۳ (۲۰/۵ ٪) مورد خون در شرایط کاملا استریل نمونه‌گیری انجام و با استفاده از روش‌های باکتری‌شناسی، سرولوژیکی و مولکولی شناسایی شدند.

سروتیپ‌های غالب، با استفاده از تکنیک‌های ایمنوسرولوژی با به کارگیری آنتی‌بادی‌های منوکلونال و تایید سروتیپ‌های جداشده به روش multiplex PCR در جدول ۴ نشان داده شد.

با روش انتشار از دیسک، ۷۷/۷ ٪ نسبت به پنی سیلین G و ۱۱/۱۱ ٪ نسبت به کلرامفنیکل و استرپتومایسین مقاومت نشان دادند در حالی که نسبت به تریمتوپریم- سولفامتوکسازول، اریترومایسین و نورفلوکساسین حساسیت کامل نشان داده شد (جدول شماره ۵) (۲۲).

جدول ۳. درصد جداسازی *لیستریا منوسیتوژنز* از نمونه های مختلف کلینیکی

تعداد(٪)باکتری جدا شده	تعداد نمونه‌ها	منابع مختلف نمونه‌ها
۲۱ (٪ ۱۷/۷)	۱۱۸ (٪ ۴۵/۸)	ترشحات جفت
۲ (٪ ۳/۷)	۵۳(٪ ۲۰/۵)	خون
۵ (٪ ۵/۷)	۸۷ (٪ ۳۳/۷)	ترشحات واژن
۲۸ (٪ ۱۰/۸)	۲۵۸	مجموع

جدول ۴. درصد فراوانی سروتیپ‌های غالب جداشده *لیستریا منوسیتوژنز* از نمونه‌های کلینیکی

(٪)سروتیپ ۲c	(٪) سروتیپ ۴b	(٪) سروتیپ ۱/۲a	منابع مختلف نمونه ها
۴(٪ ۱۴/۲)	۸(٪ ۳۸)	۹(٪ ۴۲/۸)	ترشحات جفت
-	-	۲(٪۱۰۰)	خون
-	۲(٪ ۴۰)	۳(٪ ۶۰)	ترشحات واژن
۴(٪ ۱۴/۲)	۱۰(٪ ۳۵/۷)	۱۴(٪ ۵۰)	مجموع

جدول شماره ۵. نتیجه حساسیت *لیستریا منوسیتوژنز* به ۱۰ عامل آنتی‌بیوتیکی (اعداد به درصد هستند)

آنتی‌بیوتیک	حساس	بینابین	مقاوم
کلرامفنیکل	۲۲/۲۳	۶۶/۶۶	۱۱/۱۱
پنی سیلین G	-	۲۲/۲۳	۷۷/۷۷
استرپتومایسین	۸۸/۸۹	۲	۱۱/۱۱
تتراسیکلین	۸۹	-	-
تریمتوپریم- سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)	۸۸	۱۱/۱۱	-
سیپروفلوکساسین	۱۰۰	-	-
آمپی سیلین	۶۶/۶۷	۳۳/۳۳	-
سفوتاکسیم	۸۸/۸۹	۱۱/۱۱	۷
نورفلوکساسین	۱۰۰	-	-
سفوتاکسیم	۲۲/۲۳	-	۷۷/۷۷
اریترومایسین	۱۰۰	-	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

در محیط پالکام، پرگنه‌های سبز قهوه‌ای با هالهٔ تیره‌رنگ و درمحیط خون‌دار، پرگنه‌های درخشان با همولیز بتا ظاهر شدند. با آزمایشات بیوشیمیایی، آنزیماتیک و آزمایش بیمایزایی روی موش انجام شد که در جدول ۶ مشخص شده است.

در تعین بیماریزایی (in vivo) جدایه‌های تزریق شده به موش که پس از ۷۲ ساعت باعث مرگ موش‌ها شد فقط تعداد ۳ موش پس از ۵ روز مردند. این مرگ و میر مربوط به سروتیپ‌هایی فاقد ژن *iap* بودند. از آنجایی که تمام سروتیپ‌ها دارای PI-PLC مثبت بودند اثرگذاری آنزیم پروتئاز A در مرگ و میر موش‌ها تایید شد. در کالبد شکافی موش‌ها از ارگان‌های طحال، کبد و روده‌های ملتهب، نمونه‌برداری و پس از بررسی‌های فنوتیپی، *لیستریا منوسیتوژنز* جداسازی و با روش مولکولی تایید شدند.

جدول ۶. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و API *لیستریا منوسیتوژنز* جدا شده از نمونه‌های سقط جنین خودبخودی

جدایه ها	منبع	CAMP(S*)	API	PI-PLC	تزریق به موش	C. red test	حرکت چتری
۱	ترشحات جفت	+	+	+	+	+	+
۲	“	+	+	+	W۴	+	+
۳	“	+	+	-	+	+	+
۴	“	+	+	+	+	+	W۴
۵	“	+	w	+	+	+	+
۶	“	W۴	+	+	W۴	+	+
۷	“	+	+	+	+	-	+
۸	“	+	+	+	+	+	+
۹	“	+	+	W۴	+	+	+
۱۰	“	+	+	+	۴۴	+	+
۱۱	“	+	+	+	W۴	+	+
۱۲	“	+	+	+	+	+	+
۱۳	“	+	W۴	W۴	+	+	+
۱۴	“	+	-	+	+	+	+
۱۵	“	+	+	+	+	-	+
۱۶	“	+	+	+	+	+	+
۱۷	“	+	+	W۴	+	+	+
۱۸	“	+	+	W۴	+	+	+
۱۹	“	+	+	+	+	+	-
۲۰	“	+	+	+	+	+	+
۲۱	“	+	+	+	W۴	+	+
۲۲	خون	+	+	+	W۴	+	+
۲۳	“	+	+	+	+	+	+
۲۴	سواب واژینال	+	+	+	+	+	+
۲۵	“	+	+	+	+	+	+
۲۶	“	+	+	+	+	+	-
۲۷	“	+	+	+	W۴	+	+
۲۸	“	+	W۴	+	+	+	+

www.SID.ir

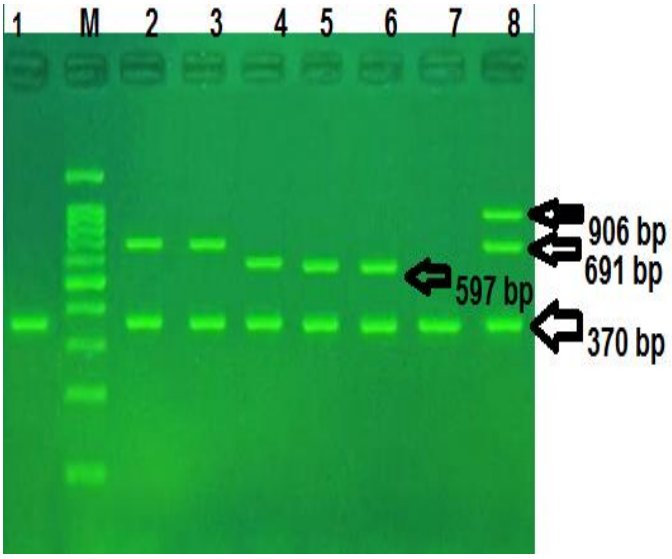
Archive of SID

نتایج حاصل از Multiplex – PCR

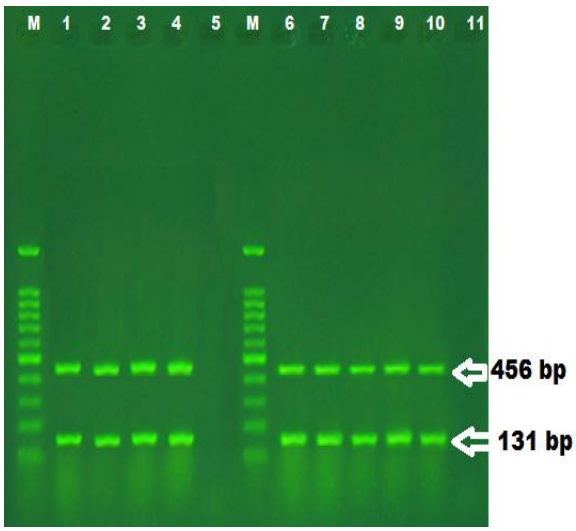
از ۱۲۳ بیمار مبتلا به سقط در ۲۸ (۲۲/۷۶ ٪) مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* با ژن *hlyA* و ژن *iap* در ۲۴ (۱۹/۵۱ ٪) شناسایی شدند. اما از ۱۵۰ نمونه زن سالم که سقط نداشتند و بارداری موفقی داشتند در ۶ (۴٪) مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* با ژن *hlyA* مثبت یافت شد (شکل شماره ۱). مقایسه آماری فراوانی ژن *hlyA* در دو گروه بیمار و گروه کنترل نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود دارد ($P< ۰/۰۰۰۲$). از طرفی این ژن شانس سقط (OR) را حدود ۷/۱۶ برابر در زنان افزایش می‌دهد.

مطابق جدول شماره ۷، سروواریته‌های غالب ۱/۲a و ۴b به ترتیب ۵۰ ٪ و ۳۵/۷ ٪ و سروواریته ۲c ۱۴/۲ ٪ بوده است که با ارزیابی دو ژن *hly* و *iap* با روش مولتی پلکس در هر ۲۸ مورد *لیستریا منوسیتوژنز*، ۱۰۰ ٪ ژن *hly* و ۲۴ مورد (۸۵/۷۱ ٪) ژن *iap* مشخص گردید(شکل شماره ۲) (۲۸).

همچنین تعیین توالی ژن های سروتیپ های مختلف توسط نرم افزارBlast انجام گرفت (شکل های شماره ۳و ۴)



شکل ۱. نتایج جداسازی محصولات multiplex PCR در ۵ ایزوله منتخب چاهک M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱ و ۷: نمونهٔ لیستریا مثبت نمونه کنترل مثبت (*لیستریا منوسیتوژنز* ATCC=7644) حاوی فقط باند ۳۷۰ جفت باز، چاهک ۲ و ۳: نمونه حاوی لیستریا ۲a، چاهک ۴ تا ۶: نمونه‌های لیستریا ۴b، چاهک ۸ نمونه لیستریا ۲c.

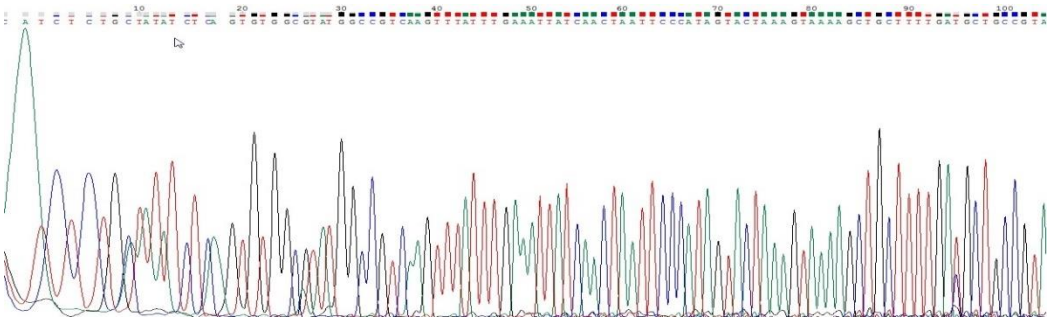


شکل ۲. نتایج جداسازی محصولات multiplex PCR در ۶ نمونه منتخب: چاهک M : مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱ : نمونه کنترل مثبت *لیستریا منوسیتوژنز*، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۶ تا ۱۰ : نمونه لیستریا مثبت از نظر ۲ ژن *hlyA* به اندازه ۴۵۶ جفت باز و *iap* به اندازه ۱۳۱ جفت باز، چاهک ۵ و ۱۱ : نمونه حاوی کنترل منفی (*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923)

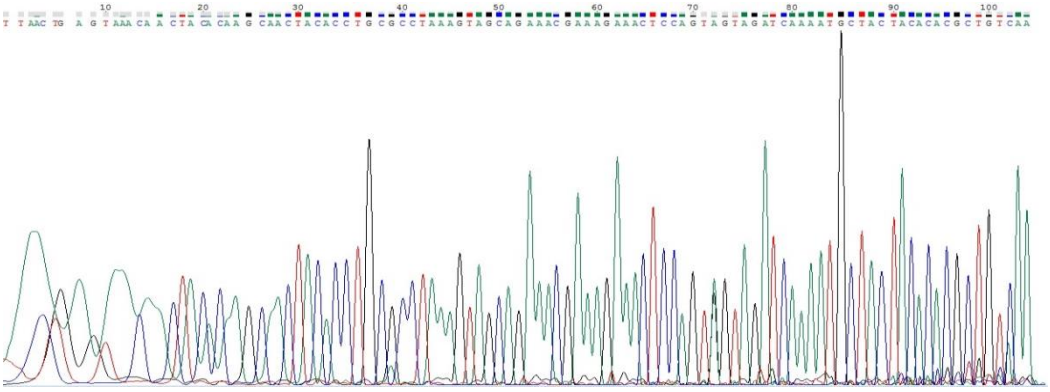
محل نمونه برداری	تعداد نمونه ها	فراوانی *لیستریا منوسیتوژنز* جداشده	تعداد و درصد سروتیپ ۱/۲a	تعداد و درصد سروتیپ ۴b	تعداد و درصد سروتیپ ۲c	تعداد سروواریته‌های دارای ***hlyA***	تعداد سروواریته‌های دارای ژن ***iap***
ترشحات جفت	۱۱۸	۲۱(٪ ۱۷/۷)	۹(٪ ۴۲/۸)	۸(٪ ۳۸)	۴(٪ ۱۴/۲)	۲۱(٪ ۱۰۰)	۱۷(٪ ۸۰/۹۵)
ترشحات واژن	۸۷	۵(٪ ۵/۷)	۳(٪ ۶۰)	۲(٪ ۴۰)	۰	۵(٪ ۱۰۰)	۵(٪ ۱۰۰)
خون	۵۳	۲(٪ ۳/۷)	۲(٪ ۱۰۰)	۰	۰	۲(٪ ۱۰۰)	۲(٪ ۱۰۰)
مجموع	۲۵۸	۲۸(٪ ۱۰/۸)	۱۴(٪ ۵۰)	۱۰(٪ ۳۵/۷) ۰	۴(٪ ۱۴/۲)	۲۸(٪ ۱۰۰)	۲۴(٪ ۸۵/۷)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. تعیین توالی و با استفاده از نرم افزار Blast(*Listeria monocytogenes hlyA*)



شکل ۴. تعیین توالی و با استفاده از نرم افزار Blast (*Listeria monocytogenes* 2c *iap*)

بحث

بروز لیستریوز در زنان باردار با سقط جنین‌های خودبخودی، ۱۲ نفر از هر صد هزار نفر است در صورتی که در افراد سالم ۰/۰۷ درصد گزارش شده است (۷) که طبق گزارشات، یک سوم از لیستریوزیس انسانی مربوط به سقط جنین خودبخودی بوده است و اغلب در سه ماهه دوم یا اوایل سه ماهه سوم اتفاق می افتد (۷، ۲۷). لذا بر اهمیت تشخیص این باکتری تاکید می‌شود. در این پژوهش با اخذ نمونه‌های کلینیکی از ۱۲۳ بیمار سقط جنین خودبخودی که شامل ۲۵۸ نمونه‌هایی از جفت جنین (۱۱۸)، ترشحات واژینال (۸۷) و خون بیمار (۵۳) مورد بودند انجام پذیرفت.

با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، ۲۸ مورد (۱۰/۸ ٪) *لیستریا منوسیتوژنز* که ۲۱ مورد (۱۷/۷٪) از جفت و ۲ مورد (۳/۷ ٪) از خون و ۵ مورد (۵/۷ ٪) از ترشحات واژینال، *لیستریا منوسیتوژنز* جدا گردید که سروتیپ‌های ۱/۲a، ۹مورد (۴۲/۸ ٪) از جفت جنین و ۲ مورد (۱۰۰ ٪) از خون و ۳ مورد (۶۰ ٪) از ترشحات واژینال و همچنین سروتیپ ۴b به ترتیب ۸ مورد (۳۸ ٪)، صفر مورد (صفر٪) و ۲ مورد (۴۰ ٪) از ترشحات جفت جنین، خون و ترشحات واژینال شناسایی شدند. غالب بودن سروتیپ ۱/۲a با ۱۴ مورد (۵۰ ٪) نسبت به سروتیپ ۴b با ۱۰ مورد (۳۵/۷ ٪) مشخص گردید. همچنین ۴ مورد (۱۴/۲ ٪) سروتیپ ۲c از سقط جنین‌های خودبخودی برای اولین بار در ایران گزارش و با تطبیق مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی با سویه‌های پراکنده که با سروتیپ‌های ۱/۲a و ۴b از مواد غذایی در ایران گزارش شده در این بررسی مطالعه شدند. جهت ارزیابی دو ژن *hly, iap* که موثرترین ژن‌ها در سقط جنین‌های خود بخودی هستند از نظر ژنوتیپی مطالعه هستند. طبق یافته‌های مولکولی با روش Multiplex PCR وجود ژن *hlyA* در تمام سرووواریته‌های غالب (۱۰۰ ٪) و ژن *iap* با (۸۵/۷ ٪) در ۲۴ مورد از سرووواریته‌های غالب، بیانگر این مهم است که وجود این دو ژن در این سروتیپ‌ها باعث بروز سقط جنین‌های خودبخودی است و از نظر این که ۴ مورد از سرووواریته‌های ۱/۲a فاقد ژن *iap* بودند، همین مسئله باعث کاهش شدت و حدت باکتری شده و عامل مهم و موثر در تاخیر سقط جینن‌های خودبخودی بوده که از یافته‌های بسیار مهم این مطالعه است.

طبق نتایج مولتی پلکس PCR، ۲۸ سروتیپ غالب ۱/۲a و ۴b شناسایی که شامل ۱۴ مورد سروتیپ ۱/۲a، ۱۰ مورد سروتیپ ۴b و ۴ مورد سروتیپ ۲c بودند که همگی دارای ژن *hlyA*، کد کننده لیستریولیزین O بودند که عمده‌ترین و مهم‌ترین ژن *لیستریا منوسیتوژنز* از نظر نشانگر ساختن جنس باکتری و سروتیپ‌های وابسته به آن و همچنین از نظر بیماریزایی است. وجود ژن *iap* در

www.SID.ir

Archive of SID

تمام سروتیپ‌ها بر شدت و حدت بیماریزایی باکتری می‌افزاید و برای اولین بار، نشان داده شد. چهار سروتیپ ۱/۲a که فاقدژن *iap* بودند باعث تاخیر در سقط جنین گردیده است به طوریکه هر چهار مورد سقط، در ترم سوم حاملگی رخ داد، و مرگ و میر موش‌ها چهار هفته پس از تزریق اتفاق افتاد، همچنین می‌توان گفت امکان جهش در ژن *iap* به علت پلی‌مورف بودن توالی مرکزی، با پرایمرهای انتخابی پژوهش حاضر دلیل دیگری بر این امر است (۲۸).

در مطالعه حاضر از ۲۵۸ نمونه کلینیکی ۲۸ مورد *لیستریا منوسیتوژنز جدا شده* که سروارهای غالب ۱/۲a و ۴b بودند با مطالعه دکتر Shayan و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی ۱۰۰ نمونه که عمدتا از ترشحات واژن انجام گرفته بود از نظر نسبت آماری با مطالعات نامبرده مطابقت دارد (۲۴) در صورتی که مطالعه کارگر و همکاران در سال ۲۰۰۹ شیوع *لیستریا منوسیتوژنز* در موارد سقط انسانی به صورت ۱۳/۱ ٪ گزارش شده است (۱۸) در مجموع، شیوعِ بالاتر گزارش شده در مطالعات کارگر در مقایسه با پژوهش حاضر می تواند به دلیل انجام مطالعه از مناطق محروم کشور و تفاوت سطح بهداشتی درآن مناطق با تهران باشد.

در سال ۲۰۰۹ انجام مطالعات Jamshidi و همکاران در ارتباط با تیتر آنتی بادی *لیستریا منوسیتوژنز* و سقط های خودبخودی روی سرم ۲۰۰ خانم باردار که درمطالعات کلینیکی احتمال سقط خودبخودی داشتند در منطقه بندر عباس انجام گرفت و عیار بالاتر از ۱/۴۰۰ را جهت پیش آگاهی از بروز سقط جنین‌های خودبخودی اعلام نمودند و سروار غالب در مطالعه ایشان سرووارته ۴b بود (۱۹) در صورتی که دربررسی های پژوهش حاضر سروتیپ ۱/۲a به عنوان سرووارته غالب شناسایی گردید.

در سال ۲۰۱۳ Jamali و همکاران، *لیستریا منوسیتوژنز* را از مواد غذایی مختلف اعم از خام یا آماده به مصرف با استفاده از روش های باکتریولوژیکی، جداسازی و به عنوان یک عامل مخاطره انگیز جهت بهداشت انسان، بخصوص در افراد مسن و افراد با نقص سیستم ایمنی و کودکان وخانم‌های باردار معرفی کردند (۲۰). این بررسی هم از نظر فنوتیپی و هم از نظر ژنوتیپی با بررسی پژوهش حاضر مغایرت داشته ولی نمایانگر این موضوع است که *لیستریا منوسیتوژنز* یک باکتری مخاطره انگیز دربهداشت جامعه است.

دکتر Nematollahi و همکاران درسال ۱۳۹۴ در پژوهشی تحت عنوان «بررسی فراوانی *لیستریا منوسیتوژنز* در زنان باردار اراک» توانستند از ۵۴۰ نمونه واژن و ادرار زن باردار با روش کشت، تعداد ۱۴ مورد *لیستریا منوسیتوژنز* جدا کنند. ۸ مورد دارای سابقه سقط و ۶ مورد فاقد سقط بوده‌اند. در این پژوهش متغیر سن مد نظر بود ولی پژوهش از نظر ژنوتیپی انجام نپذیرفته بود. در این پژوهش فقط پراکندگی *لیستریا منوسیتوژنز* به‌عنوان یکی از عوامل سقط جنین در خانم‌ها گزارش گردیده است (۲۹).

در سال ۲۰۰۹ دکتر Kargar و همکاران تعداد ۴۲۸ نمونه شیر تازه را بررسی کردند و تعداد ۵۶ نمونه (۱۳/۱ ٪) *لیستریا منوسیتوژنز* را جداسازی نمودند که ۹۱/۷ ٪ از آنها با روش مولتی پلکس PCR ژن *hly* را شناسایی و برای اولین بار پراکندگی ژن *hly* را در مواد غذایی و سقط جنین از مرودشت شیراز گزارش نمودند (۱۸). در مطالعه Kargar و همکاران به دلیل انجام پژوهش در مناطق محروم کشور و اختلاف سطح بهداشت در مقایسه با تهران، میزان شیوع بالایی از لیستریوزیس در انسان- نسبت به پژوهش ما- گزارش گردید. این پژوهش از جنبه نقش ژن *hly* در سقط با پژوهش حاضر همسانی داشته اما از جنبه تعیین سایر سروتیپ‌های لیستریا وسایر ژن های موثر مطابقت ندارد.

در سال ۱۳۹۶ Kalantaripour و همکاران، از تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی به صورت تصادفی جمع آوری و با استفاده از روش های متداول کشت جداسازی وشناسایی کردند . از ۱۲ نمونه لیستریای جداشده ۵ جدایه مربوط به *لیستریا منوسیتوژنز* و ۷ نمونه جداشده مربوط به *لیستریا ایوانووی* بودند. ولی از نظر ژنوتیپی جهت بررسی سویه‌های غالب کار پژوهشی انجام ندادند (۳۰).

در سال ۲۰۱۳ Jahangir و همکاران ۳۱۱ نمونه را که شامل ادرار، خون، مایع آمنیوتیک و سواپ واژینال از ۱۵۷ زن باردار اخذ شده بود از نظر *لیستریا منوسیتوژنز* مورد بررسی قرار دادند که هدف این مطالعه تاکید بر جداسازی ژن *hly A* بود که ۱۹ نمونه اخذ شده از زنان باردار با سابقه سقط خودبخودی و ۱۲۰ نمونه از خانمهای باردار بدون عوارض سقط جنین تهیه گردیده بودکه با بررسیهای مولکولی نشان دادند ۱۰/۲۸٪ از افراد مورد مطالعه دارای ژن *hly A* بودند که عمدتا در خانمهای با علائم سقط و در سنین بین ۳۰-۲۶ اتفاق افتاده بود (۲۵). در این بررسی بدون این که سایر ژن های مداخله گر را نیز مورد مطالعه قرار دهند عمدتا ژن *hlyA* را به‌عنوان یک ژن تهاجمی معرفی نموده و ژن‌های موثر دیگر را مدنظر قرار نداده و غالب بودن سروتیپ‌ها نیز نامشخص مانده است. در پژوهش حاضر با شناسایی دو عامل فنوتیپی و ژنوتیپی و امکان وجود موتاسیون در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نکات مبهم مشخص شد.

در سال ۲۰۱۴ Eslami و همکاران جهت بررسی فاکتورهای ویرولانس در۹۶ مورد سقط خودبخودی، وجود ژن‌های hly *plcA* R را در ۱۶ مورد به روش PCR شناسایی کردند. میزان درصد بروز ژن hlyدر *لیستریا منوسیتوژنز* بیش از *plcA* بوده است (۲۶). در این

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش نیز بررسی سویه‌های غالب مشخص نشده بود و دلیل انتخاب این دو ژن در سقط جنین‌های مورد مطالعه معلوم نبود. همچنین شناسایی سروتیپ‌های غالب انجام نپذیرفته بود که با مقایسه با پژوهش حاضر مغایرت داشته است.

Pournajaf و همکاران در سال ۲۰۱۶، تعداد ۶۱۷ نمونه از موارد کلینیکی و غیر کلینیکی مشکوک به *لیستریا منوسیتوژنز* را با روش Multiplex PCRجهت ارزیابی ژن های *Inl A,C,J* انجام دادند که از این تعداد نمونه ۴۶ (۷/۴۵٪) مورد *لیستریا منوسیتوژنز* جدا نمودند و نامبردگان نشان دادند وجود این سه ژن بیانگر بیماریزایی *لیستریا منوسیتوژنز* است و متذکر شدند وجود یک ژن برای اثبات بیماریزایی این باکتری کافی و قابل تفسیر نیست (۲۷). این پژوهش با پژوهش حاضر از نظر موضوع کاملا مغایرت داشته فقط بیانگر این حقیقت است که وجود چند ژن در لیستریا می‌تواند حدت بیماریزایی را افزایش داده و عوارض کلینیکی مربوط به این باکتری را بوجود بیاورد. همچنان که در پژوهش ما نقش دو ژن *hly* و *iap* مشخص گردید (۲۸).

در سال ۱۳۹۲ Pournajaf و همکاران تعداد ۴۶(۷/۴ ٪) ایزوله *لیستریا منوسیتوژنز* از کل ۶۱۷ نمونه جمع آوری شده جدا کردند که از ۱۷۰ نمونه بالینی تعداد ۱۴(۸/۲ ٪) به ترتیب ۷/۵ ٪، ۵/۷ ٪، ۱۴/۲ ٪، ۸/۵ ٪ از جفت، ادرار، واژن و رکتال جدا شدند. در مطالعه حاضر فقط گونه *لیستریا منوسیتوژنز* مشخص گردید و پژوهشگران سروتایپینگ سروتیپ های شایع دخیل در لیستریوز انسانی را در مطالعات آینده پیشنهاد نمودند (۳۱). در مطالعهٔ ما تعیین سروتیپ های غالب و دخیل در سقط جنین‌های خودبخودی انسانی مشخص و غالب بودن ۱/۲a و ۴b مشخص گردید و برای اولین بار سروتیپ ۲c که از سقط جنین‌های خودبخودی انسانی جدا شده بود از ایران گزارش شد (۲۸).

Kumar در سال ۲۰۱۵ تعداد ۳۷۰۰ نمونه کلینیکی از خانم های حامله در هند جمع‌آوری و بر اساس آزمایشات سروتایپینگ، ژنوتایپینگ و بیماریزایی در شرایط in vivo مطالعه کرد که از ۳۰ مورد (۰/۸٪) نمونه‌ها پس از آزمایشات لازم، *لیستریا منوسیتوژنز* جدا گردید که اکثر سویه‌ها از سروتیپ ۴b بودند و ۲۰ مورد نمونه‌ها واجد ژن‌های *actA ,prfA, plc A, hly,InlA, inlC,InlY, iap* و ۶ مورد فاقد ژن‌های مذکور بودند (۲۳). این مطالعه با اهداف اصلی پژوهش حاضر چه از نظر روش‌های فنوتیپی و چه از نظر ژنوتیپی مطابقت کامل داشته ولی غالب بودن اکثر سروتیپ‌ها و اولویت تاثیرگذاری ژن‌های جدا شده را مشخص ننموده است.

در سال ۲۰۱۷ Lotfollahi و همکاران، تعداد ۴۴۲ نمونه های انسانی، دامی و غذایی را با روش مولتی پلکس PCR مطالعه کردند و سروتیپ‌های ۱/۲c (یا ۳c)،۴b، ۴d(یا ۴e) و ۱/۲a(یا ۳a) را برای اولین بار از نمونه‌های انسانی و دامی شناسایی نمودند (۳۲) در صورتی که در مطالعه حاضر سروتیپ‌های ۱/۲a و ۴b به عنوان سروتیپ‌های غالب شناسایی و جداسازی ۱/۲c از سقط جنین‌های خودبخودی برای اولین بار در ایران گزارش گردید.

به طور کلی یافته‌های حاصل از تحقیق انجام یافته نشانگر سروتیپ‌های ۱/۲a و ۴bبه‌عنوان سروتیپ‌های غالب *لیستریا منوسیتوژنز* در سقط جنین‌های خودبخودی است و بررسی‌های باکتریولوژیکی و مولکولی نشان داد که سروتیپ ۲c در سقط جنین‌های خودبخودی اثرگذار و برای اولین بار در ایران گزارش شود.

سپاسگزاری

از تمامی همکارانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Khamiri M. Vandyousefi J. Investigation of Listeria monocytogenes stability during the manufacture and storage of Iranian white cheese. Pajoohesh and Sazandegi Journal.26:15-110
2. Sadatzadeh H. 1350. Listeriosis in Iran. Journal of Medical collage of Tehran Medical Science University Tehran, Iran25:289-293
3. Ashwani K, Sunita G, Virender K. 2015.Exploring specific primers targeted against different genes for a multiplex PCR for detection of Listeria monocytogenes. Biotech Jun, 5(3):265-269 [DOI:10.1007/s13205-014-0225-x] [PMID] [PMCID]
4. Mead P. S, L. Slutsker, Slutsker L., Dietz V, Mc Caig LF., Bresee JS. Shapiro C. Griffin PM. Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States.Emerg. Infect Dis.5:607-25 [DOI:10.3201/eid0505.990502] [PMID] [PMCID]

www.SID.ir

Archive of SID

5. Vandyousefi J.1990.Listeriosis in Iran.International Congress for infection disease. July15-19p:195
6. Jose A. Vazquez -B, Emilia K, Mariela S. 2017.Listeria placental infection. American Society for Microbioligy.8(3):949-57
7. Kaur S, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Veidya VN. Barbuddhe SB. 2007. In spontaneous abortion in human and its detection by Multiplex PCR. J Appl.Microbiol,20:145-52
8. Hudson JA. 1992. Efficacy of high sodium chloride concentration for the destruction Listeria monocytogenes. Lett Appl Microbiol.,14:178-180 [DOI:10.1111/j.1472-765X.1992.tb00678.x]
9. Low JC and Donachie W. 1997. A review of Listeria monocytogenes and listeriosis Vet J 153:9-29 [DOI:10.1016/S1090-0233(97)80005-6]
10. Schmid M. Walcher M, Bubert A, Wagner M, Schleifer KH. Nucleic acid bases, cultivation in depended detection of Listeria spp. And genotypes of Listeria monocytogenes. Immun. Medical Microb. 2003,35:215-225 [DOI:10.1016/S0928-8244(02)00456-X]
11. Winkhaus-Schindle I, Seeliger HP, etal. Listeriosis as a conformed in several patients with Habitual abortios. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2004,26:137-9
12. Sadeghi B, Pournajaf P. etal. Genotypic characterization invasion index and antimicrobial resistance pattern in Listeria monocytogenes strains isolated from clinical samples.2015, Journal of Accute Disease.141-146 [DOI:10.1016/S2221-6189(15)30024-X]
13. Kalekar S. Rodrigues J. Costa DD. Doijad S. Ashok kumar J. etal. 2016. Genotypic characterization of Listeria monocytogenes isolated from humans in India.Ann Trop Med Parasitol 105(5):351-358 [DOI:10.1179/1364859411Y.0000000023] [PMID] [PMCID]
14. Dongyou L, Lawrence L, W. Austin F, Ainsworth A. A multiplex PCR for species determination of Listeria monocytogenes.2007Journal of Microbiological Methods,17:133-140 [DOI:10.1016/j.mimet.2007.08.007] [PMID]
15. Monica K, Borucki R. 2003. Listeria monocytogenes serotype identification by PCR. J. Clinic. Microbiol,5537-5540 [DOI:10.1128/JCM.41.12.5537-5540.2003] [PMID] [PMCID]
16. Setiani B.E, Elegado F.B, Perez MTM, Mabesa RC, Dizon EI, Sevilla CC.2015. API Listeria rapid kit for confirmatory phenotypic conventional biochemical test of the prevalence Listeria monocytogenes in selected meat and meat products, PROCEDIA Food Science. 3:445-52 [DOI:10.1016/j.profoo.2015.01.049]
17. Zilma das Graças Nunes; Ernesto Hofer.1994. Evaluation of phenotypic markers associated with pathogenicity in the genus Listeria. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.36 no.4 [DOI:10.1590/S0036-46651994000400001] [PMID]
18. Kargar M, Ghasemi. A.2009. Role of Listeria monocytogenes hlyA gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. J. Clinic Infect Dis. 4(4):214-8
19. Jamshidi M. Sotoodeh J. 2009. Seropositivity for Listeri amojnocytogenes in women with spontaneous abortion, A case control study in Iran. Tiwan Jopstet Gynecol. Vol8(1):46-48 [DOI:10.1016/S1028-4559(09)60034-6]
20. Jamali H. Chai L.C 2013.Detection and isolation of Listeria spp and Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods with various selective culture media. Food Contr32:19-24 [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.11.033]
21. Nowroozi J. Moradi bidhendi S. Shafiee M.2013. detection of acta gene in listeria monocytogenes isolated from dairy products. Journal of microbial world 6, Number 3 (16); Page(s) 246 To 252.
22. Lotfollahi L. Nowroozi J. 2011. Prevalence and antimicrobial resistence profiles of Listeria monocytogenes in spontaneous abortions in humans. African Journal of Microbiology Research, 5(14):1990-93 [DOI:10.5897/AJMR11.498]
23. Kumar D. Singh DV. Dubey SK.2015. Pregnancy-associated human Listeriosis: Virulence and genotypic analysis of Listeria monocytogenes from clinical samples. Journal of Microbiology 53(9):653-660 [DOI:10.1007/s12275-015-5243-9] [PMID]
24. Shayan R. Sattari M. Forouzandeh M. 1388. Identification of Listeria monocytogenes in vaginal samples by PCR. Medical Journal of Modares.12:51-58
25. Jahangir. A Kargar M. 2013 "Assesing Listeria monocytogenes hly A genes in pregnant women with spontaneous abortion using PCR method in Yasouj South west of Iran" African Journal of microbiology research.vol.7(33):4257-60
26. Eslami G. Gudarzi H.2014June. "Identification of Listeria monocytogenes virulence factors in women with abortion by PCR." Arch clin infect dis 9(3): e199 [DOI:10.5812/archcid.19931]
27. Pournajaf A. Rajabnia R. Sedighi M.2016.Prevalence and virulence determination of Listeria monocytogenes strains isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex-PCR.Rev Soc Bros

www.SID.ir

Archive of SID

Med Tropi.49(5):6024-27 [DOI:10.1590/0037-8682-0403-2015] [PMID]

28. Rezaei M. Kazemipour N. Vandyousefi J, Rokhbakhsh zamin F. Irajian G.2018. Determination of dominant serovars of Listeria monocytogenes strains isolated from spontaneous human abortion in Tehran, Iran. EurAsian Journal of Bioscience, (12):377-83 [DOI:10.18502/ijml.v5i4.158]
29. Nematollahi S, Ghaznavi E. Zamani A.2016.Studing the prevalence of Listeria monocytogenes in pregnant women in Arak. Arak medical university journal,18(105):44-50
30. Kalantaripour A. Hanifian Sh.1396. Listaria isolated from traditional cheese of Tabriz area: Occurrence, diversity and phenotypic characteristics.3:83-96
31. Pournajaf A. LotfollahI L. Irajian G. Ardebili A. Sadeghi B. Taghizadeh M. Prevalence of Listeria monocytogenes strains isolated from clinical and non-clinical samples by phenotypic and multiplex-PCR1392. Iranian Journal Medical Microbiology:7(2): p14-19
32. Lotfollahi L. Chaharbalesh A. Ahangarzade rezaee M. Hasani A.2017.Prevalence antimicrobial susceptibility and multiplex-PCR serotyping of Liusteria monocytogenes isolated from humans, foods and livestock in Iran. Microbial pathogenesis.107:425-429 [DOI:10.1016/j.micpath.2017.04.029] [PMID]
33. Bubade S. warke S. Karoley D.2016.Virulence gene profiling and serotyping of Listeria monocytogenes from infertility cases from women. International journal of health science and research. vol6:440-449

www.SID.ir