

## ***Survey of Polymerase Chain Reaction Efficiency in the Detection of Mycoplasma, Listeria and Brucella in Culture Negative Samples Obtained from Women with Abortion***

Elham Goudarzi<sup>1</sup>,  
Jalil Vande Yousefi<sup>2</sup>,  
Naser Harzandi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Karaj, Karaj Branch, Karaj, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Karaj, Karaj Branch, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Karaj, Karaj Branch, Karaj, Iran

(Received May 17, 2013 ; Accepted August 24, 2012)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Misabortion is a disorder resultant of numerous causes such as infections. It is clear that bacterial infections due to genital *mycoplasma*, *Listeria* and *brucella* can cause septic abortion. A right time diagnosis of these infections can improve women fertility. This study was conducted to survey the efficiency of PCR in detecting the specimens with negative culture results in women suffering from septic abortion. We also did this by considering individual variables.

**Material & methods:** In this analytical and descriptive study, appropriate samples were collected from a total of 87 women with septic abortion who referred to Karaj's hospitals. The samples were cultured into *mycoplasma*, *Listeria* and *brucella* specific media. Then, the bacterial genus was verified by different biochemical tests. PCR test is performed on negative culture cases and SPSS-18 software is used for the statistical analysis of data.

**Results:** From the total of 87 blood samples, 37 samples (42.5 %) were positive for *mycoplasma* and *ureaplasma* (25 cases) and *Listeria monosytogenes* (12 cases) with both culture and PCR method. Our result showed no positive cases for *brucella*. From the total cultured specimens, 12 cases (13.8%) were positive and 75 cases (86.2%) were negative. We performed PCR test for negative cultured results. With PCR method, 25 cases (33.33 %) showed positive results and 50 cases (66.67%) showed negative results. The results also showed a significant statistical relation between PCR test results with recurrent abortion and level of education ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results show that PCR is a more sensitive, easier and faster method in comparison to culture for detecting bacterial cause septic abortion. It is obvious that quick diagnostic and starting antimicrobial therapy at the right time can prevent and decrease abortion's complications, so it recommended then that using PCR in detecting this bacterial cause septic abortion can be more effective.

**Keywords:** Septic Abortion, Culture, PCR

## بررسی میزان توانایی PCR در جداسازی و تشخیص موارد مثبت مایکوپلازما، لیستریا و بروسلا در زنان مبتلا به سقط جنین با نمونه های کشت منفی

الهام گودرزی<sup>۱</sup>  
جلیل وند یوسفی<sup>۲</sup>  
ناصر هرزندی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** سقط جنین عارضه‌ای است که در اثر عوامل مختلفی از جمله عفونت‌های میکروبی رخ می‌دهد. مشخص شده که عفونت‌های باکتریایی ناشی از مایکوپلازماهای ژینتال، لیستریا و بروسلا سبب سقط‌های جنین عفونی در زنان باردار می‌گردند. از این رو تشخیص به موقع این عفونت‌ها می‌تواند سبب بهبود سلامت باروری در زنان گردد با توجه به مراتب فوق هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان توانایی PCR در جداسازی و تشخیص عوامل باکتریایی مذکور در نمونه‌های کشت منفی در زنان مبتلا به سقط جنین به تفکیک برخی متغیرهای فردی و بالینی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۸۷ نمونه از زنان مبتلا به سقط جنین مراجعه کننده به بیمارستان‌های کرج جمع‌آوری شد و در محیط‌های اختصاصی مایکوپلازما، لیستریا و بروسلا کشت داده شده و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی آلودگی به باکتری‌های مذکور در آن‌ها تأیید شد. سپس بر روی نمونه‌های کشت منفی تست PCR انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز از نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد.

**یافته‌ها:** از ۸۷ نمونه بررسی شده، ۳۷ مورد (۴۲/۵ درصد) با مجموع دو روش کشت و PCR از نظر مایکوپلازما و اوره آپلازما (۲۵ مورد) و لیستریا مونوسیتوژنز (۱۲ مورد) مثبت شدند. هیچ مورد مثبتی از آلودگی به باکتری بروسلا یافت نشد. از مجموع نمونه‌ها با روش کشت، ۱۲ نمونه (۱۳/۸ درصد) مثبت و ۷۵ نمونه (۸۶/۲ درصد) منفی تشخیص داده شدند. با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های کشت منفی ۲۵ نمونه (۳۳/۳۳ درصد) مثبت و ۵۰ نمونه (۶۶/۶۷ درصد) منفی شدند. ارتباط معنی‌دار آماری بین نتایج PCR نمونه‌های کشت منفی با داشتن سابقه سقط و میزان تحصیلات ( $p < 0/05$ ) مشاهده گردید.

**استنتاج:** نتایج نشان می‌دهد PCR در مقایسه با کشت، روشی حساس، اختصاصی، آسان و سریع تری برای تشخیص باکتری‌های ایجاد کننده سقط جنین می‌باشد. با توجه به این که تشخیص سریع و شروع به موقع درمان ضد میکروبی سبب پیشگیری از وقوع سقط و کاهش عوارض حاملگی می‌شود، لذا پیشنهاد می‌شود از تکنیک PCR در شناسایی عوامل منجر به سقط عفونی استفاده گردد.

**واژه های کلیدی:** سقط جنین، PCR، کشت

### مقدمه

ایمونولوژی، سن بالای مادر، مشکلات آناتومی، هورمونی، دلایل محیطی و عفونت‌ها رخ می‌دهد.

سقط جنین عارضه‌ای است که در اثر عوامل مختلفی نظیر اختلالات ژنتیکی، کروموزومی، مشکلات

E-mail: jalil.vandeyousefi@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** جلیل وند یوسفی - کرج: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۲

دام و انسان می‌باشد که به وسیله گونه‌های مختلف یک باکتری گرم منفی متعلق به جنس بروسلای ایجاد می‌شود. این بیماری مشکلات فراوانی از نظر سلامت عمومی و ایجاد سقط در سراسر جهان و به خصوص در منطقه خاورمیانه از جمله ایران به همراه داشته و موفقیت در پیشگیری و جلوگیری از انتشار این بیماری وابسته به استفاده از روش‌های تشخیصی خوب و دقیق می‌باشد. روش کشت بهترین نتیجه را جهت تشخیص میکروبیولوژی این باکتری به همراه دارد و از حساسیت بسیاری برخوردار است. با این حال حساسیت این روش در بیماران با دوره درمان طولانی مدت و نیز بیماران دچار عوارض کانونی کم‌تر می‌شود (۷-۹). با توجه به این که بروسلای عموماً باعث ایجاد سقط در دام‌ها می‌شود در بررسی‌های مختلف در ایران شواهدی از ایجاد سقط جنین در انسان نیز مشاهده شده است که لزوم تشخیص به موقع این عفونت‌ها را تأیید می‌نماید.

تشریح و گسترش روز افزون بیماری‌های مایکوپلازمایی لیستریوز و بروسلوز ضرورت طراحی روش‌های سریع‌تر و دقیق‌تر را جهت تشخیص و بررسی‌های اپیدمیولوژیک ایجاد می‌کند که در پیشگیری و کنترل این بیماری‌ها نقش به‌سزایی دارد. از آنجایی که روش‌های مرسوم در تشخیص این بیماری مانند روش‌های کشت سرولوژیک و آزمون‌های ایمونولوژیک نظیر<sup>۱</sup> ELISA بسیار زمان‌بر و پرهزینه بوده و واکنش‌های متقاطع فراوان ایجاد می‌کند و امکان آلودگی کاربر را نیز به همراه دارد، لذا شیوه‌های مولکولی نظیر<sup>۲</sup> PCR در تشخیص این بیماری‌ها می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد. استفاده از این آزمون به واسطه سرعت، حساسیت و ویژگی بالای آن نسبت به روش‌های مرسوم، می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع، دقیق، ایمن و اقتصادی در کنار روش‌های مرسوم در کلیه مراکز تحقیقاتی، تشخیصی و آزمایشگاهی تشخیص طبی و... که به طور دقیق با نمونه‌های کلینیکی

مشاهده شده است که از میان عوامل منجر به سقط ۵ درصد آن‌ها ریشه عفونی داشته و از طرفی عوامل عفونی که می‌توانند سقط جنین را ایجاد کنند، متفاوت می‌باشند (۱). مایکوپلازماها از کوچک‌ترین باکتری‌هایی هستند که زندگی آزاد دارند و در محیط کشت فاقد سلول زنده رشد می‌کنند. بعضی از مایکوپلازماها بخشی از فلور طبیعی نواحی مخاطی هستند و تعدادی نیز در بیماری‌های دستگاه تنفسی و ادراری-تناسلی انسان نقش دارند (۲). به طوری که امروزه آن‌ها یکی از عوامل مهم ایجاد کننده سرویسیت، واژینیت، سقط جنین و از عفونت‌های شایع در زنان مراجعه کننده به کلینیک‌های زنان و زایمان به شمار می‌روند. کشت این باکتری‌ها سخت، گران و با اتلاف وقت همراه است زیرا این باکتری‌ها رشد سخت داشته و نیاز به محیط‌های اختصاصی و مکمل‌های غذایی مخصوص و نیز مهارت و تجربه کافی دارند. تشخیص سرولوژیک نیز به دلیل هتروژنی و واکنش‌های متقاطع با مشکلاتی همراه است (۳،۴). باکتری لیستریا پاتوژن درون سلولی و فرصت طلبی است که به دلیل نقشی که در عفونت‌های انسانی ناشی از مواد غذایی در سراسر جهان دارد بسیار با اهمیت شناخته می‌شود. در مقایسه با دیگر پاتوژن‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی، لیستریوزیس مواد غذایی ناشی از لیستریا مونوسیژن، بیماری جدی با نرخ مرگ و میر بالا (۲۰ تا ۳۰ درصد) می‌باشد. لیستریا مونوسیژن در اغلب موارد بر روی کسانی که دارای یک بیماری زمینه‌ای و شدید می‌باشند، زنان باردار، نوزادان متولد نشده و یا تازه متولد شده تأثیر می‌گذارد (۵). به دلیل این که معمولاً کشت‌های آزمایشگاهی از جنین‌هایی که خود به خود سقط می‌شود یا نوزادانی که مرده به دنیا می‌آیند به دست نمی‌آید، لذا میزان واقعی سقط جنین ناشی از عفونت با لیستریا مونوسیژن مشخص نمی‌باشد (۶).

همچنین بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین

1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
2. Polymerase Chain Reaction

سر و کار دارند، مورد استفاده قرار گیرد. هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان توانایی PCR در جداسازی و تشخیص باکتری‌های مایکوپلازما، لیستریا و بروسلا در زنان حامله‌ای که سقط‌های مکرر داشته‌اند ولی کشت ترشحات واژن در آن‌ها منفی گزارش گردید، انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در این بررسی توصیفی-تحلیلی، بیماران زن مبتلا به سقط جنین مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر کرج از بهمن ۹۰ تا خرداد ۹۱ مورد مطالعه قرار گرفتند. در صورت داشتن علائم بالینی مربوط به سقط از این بیماران ۱۰ cc خون و نمونه‌های لازم از جنین‌های سقط شده گرفته شد.

### کشت و جداسازی

مایکوپلازما: به منظور کشت و شناسایی سویه‌های مایکوپلازما نمونه‌های خون و بافت‌های جنینی را پس از عبور از فیلترهای استریل یک‌بار مصرف ۰/۴۵ میکرون، به لوله‌های در پیچ دار حاوی مقدار ۴ میلی‌لیتر محیط کشت PPL0 broth (حاوی پودر محیط PPL0 broth ساخت شرکت Difco، ۱۰ میلی‌لیتر عصاره مخمر ۱۰ درصد، ۲۰ میلی‌لیتر سرم اسب استریل، ۱ میلی‌لیتر محلول فنول رد ۰/۲ درصد و ۱ میلی‌لیتر (U ۵۰۰۰۰) پنی‌سیلین G) منتقل کردیم. تمام لوله‌ها در دمای ۳۷ سیلیسیوس و اتمسفر ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> در جار شمع‌دار گرم خانه‌گذاری شدند و سپس به محیط PPL0 agar (با ترکیب مشابه PPL0 broth ولی استفاده از پودر PPL0 آگار به جای broth) منتقل شدند. به منظور شناسایی مایکوپلازما هومینیس و مایکوپلازما اوره آلیتیکوم به محیط پایه PPL0 broth و PPL0 agar آرژنین ۱۰ درصد و اوره ۱۰ درصد اضافه گردید. تمام محیط‌ها در دمای ۳۷ سیلیسیوس و اتمسفر ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> در جار شمع‌دار، گرم خانه‌گذاری شدند و به طور دوره‌ای به مدت سه هفته برای مشاهده کلنی‌های توتی شکل

قهوه‌ای اوره آپلازما اوره آلیتیکوم و کلنی‌های به شکل تخم مرغ نیمرو شده (Fried egg) مایکوپلازما هومینیس به طریق میکروسکوپی بررسی شدند. اگر در طی این مدت کلنی ایجاد نشد، به عنوان منفی و در صورت ظهور کلنی مثبت در نظر گرفته می‌شد.

لیستریا مونوسیتوژنر: جهت جداسازی لیستریا مونوسیتوژنر نمونه‌ها را در محیط برین هارت تریپت و بعد از ۴۸ ساعت آن‌ها را در محیط‌های بلاد آگار و محیط اختصاصی PALCAM کشت داده و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سیلیسیوس و ۵ درصد CO<sub>2</sub> نگهداری نمودیم. از نظر خصوصیات پرگنه‌ها به صورت ریز و شبنمی مشاهده گردید و از تست‌های اکسیداز، کاتالاز، تحرک بر روی محیط SIM (Sulfide Indole Motility) عدم تولید گاز H<sub>2</sub>S و نیز رنگ آمیزی گرم جهت تأیید نهایی استفاده شد.

بروسلا: به منظور جداسازی بروسلا، نمونه‌ها را وارد محیط مایع بروسلا برات کرده و به دلیل رشد کند بروسلا، به مدت ۴۸ ساعت در محیط نگه داشته و سپس به محیط جامد بروسلا آگار منتقل شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سیلیسیوس و ۵ درصد CO<sub>2</sub> نگهداری شدند. پس از تأیید نمونه‌ها با روش کشت، بر روی نمونه‌های کشت منفی تست PCR انجام شد.

### PCR نمونه‌های کشت منفی

طراحی پرایمر: پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص جنس مایکوپلازما، بروسلا و گونه لیستریا مونوسیتوژنر استفاده شده بود، تمام ژن‌ها و پرایمرهای استفاده شده مورد بررسی قرار گرفتند و سپس پرایمرهای مناسب انتخاب شده و با استفاده از برنامه BLAST مورد تأیید قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است (۱۶-۱۰).  
استخراج DNA: استخراج DNA طبق برنامه کیت استخراج DNA (DNG-Plus™) از شرکت سیناژن انجام شد که مراحل استخراج به شرح زیر می‌باشد:

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه خون را به یک میکروتیوب منتقل کرده و به آن ۷۰۰ میکرولیتر DNG-Plus اضافه کرده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. بر روی محلول قبلی ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و ۱۵ ثانیه ورتکس کردیم و به مدت ۲۰ دقیقه محلول را در فریزر ۲۰- درجه سلیسیوس قرار داده و سپس محلول را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ RPM (دور در دقیقه) سانتریفیوژ کردیم. محلول رویی میکروتیوب را به آرامی خارج کرده و ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه کرده و بین ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس و سپس محلول را به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ RPM سانتریفیوژ گردید. محلول رویی میکروتیوب را به آرامی خارج کرده و به مدت ۵ دقیقه در هیتز گذاشته تا کاملاً خشک شود. ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل در داخل میکروتیوب ریخته و به مدت ۵ دقیقه در هیتز قرار دادیم. میکروتیوب‌های حاوی DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمون PCR در شرایط ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد. سوش‌های استاندارد مایکوپلازما، لیستریا و بروسلا را که از انیستیتو پاستور تهیه کرده بودیم، بر روی محیط‌های مناسب مغذی رشد داده و DNA آن‌ها نیز مشابه نمونه‌های مجهول (با این تفاوت که به جای ۷۰۰ میکرولیتر DNG-Plus باید ۴۰۰ میکرولیتر اضافه می‌شد) استخراج شده و به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR: برای واکنش PCR نیز از کیت شرکت سینا ژن استفاده شد. به ازای هر نمونه مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط PCR (Master mix)، ۱

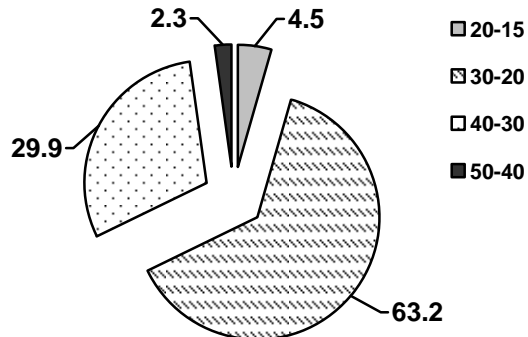
میکرولیتر از هر پرایمر (Forward و Reverse) ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۶ میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر داخل میکروتیوب ریخته شد تا حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر برسد. این موارد را برای هر سه پرایمر به صورت جداگانه انجام دادیم. مخلوط واکنش را ورتکس و برای چند لحظه سانتریفیوژ کرده و روی یخ قرار دادیم. برای اطمینان از صحت انجام PCR، در هر نوبت PCR یک نمونه کنترل مثبت (به جای DNA مجهول DNA استخراج شده سوش استاندارد) و یک نمونه کنترل منفی (استفاده از آب مقطر به جای DNA) همراه با نمونه استفاده می‌شد. میکروتیوب‌های حاوی محلول PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته و برای انجام آزمایش PCR برنامه دمایی نیز مطابق با جدول شماره ۲ و برای هر باکتری جداگانه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR: مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول هر واکنش PCR در ژل آگارز ۱ درصد در بافر 1X TBE به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با DNA safe stain نتیجه در دستگاه ژل داک با اشعه UV مشاهده و عکس گرفته شد. از سایز مارکر kb ladder ۱۰۰ نیز جهت تأیید قطعه PCR استفاده گردید. باندهای ۲۷۰ bp و ۲۲۳ bp و ۳۸۸ bp نشان‌دهنده جنس‌های مایکوپلازما، بروسلا و گونه لیستریا مونوسایتوزنر به ترتیب بود و عدم مشاهده باند به منزله منفی بودن نمونه‌ها تلقی می‌شد.

روش‌های آماری: اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و تست‌های آماری Fisher exact test و student t-test تجزیه و تحلیل گردید.

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده در PCR

منبع	شرکت سازنده	ژن هدف	محصول PCR	توالی	پرایمر
Blanchard A et al. (۱۹۹۳) Kuppeveld FJ et al. (۱۹۹۴) vanKuppeveld F. J. M et al.	takapouzist	16srRNA	270 bp	GSO-Forward ( 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T- 3') MGSO-Reverse ( 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3' )	جنس مایکوپلازما
Baily G.G et al. (۱۹۹۲)	takapouzist	BCSP31	223 bp	Forward: B4 : 5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA -3' Reverse: B5 : 5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG -3'	جنس بروسلا
Bohnert M et al. (۱۹۹۲) Aznar R et al. (۲۰۰۳)	takapouzist	hlyA (a-Haemolysin, listeriolysin O)	388 bp	Forward: 5'-GAA TGT AAA CTT CGG CGC AAT CAG-3' Reverse: 5'-GCC GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC-3'	گونه لیستریا مونوسایتوزنر

بالتر یعنی فوق دیپلم با ۶ مورد (۷ درصد) و لیسانس با ۱۰ مورد (۱۱/۴ درصد) را دارا بودند.



نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی نسبی افراد مورد بررسی بر حسب گروه های سنی

بررسی ها نشان داد که مایکوپلازما هومینیس و لیستریا مونوسایتوزنز بیشترین درصد نمونه های به دست آمده با روش کشت با ۴۱/۷ درصد (هر کدام ۵ نمونه) را به خود اختصاص داده بودند. هم چنین هیچ باکتری بروسلائی از بیماران جدا نشده بود. DNA نمونه های مجهول با کیت استخراج شد. مشاهده شد که تعداد موارد مثبتی که با روش PCR به دست آمده بود برابر با ۲۵ نمونه و شایع ترین موارد مربوط به مایکوپلازما (مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلتیکوم) با ۷۲ درصد (۱۸ مورد) بوده است (تصویر شماره ۱). فراوانی نمونه های مجهول به دست آمده با روش PCR برای لیستریا مونوسایتوزنز نیز برابر با ۷ نمونه (۲۸ درصد) بوده (تصویر شماره ۲) و با روش PCR نیز هیچ مورد مثبتی از آلودگی به باکتری بروسلا یافت نشد.

از بررسی های آماری انجام شده، مشاهده گردید که تنها بین سابقه سقط جنین ( $p < 0/0001$ ) و سطح تحصیلات بیماران ( $p < 0/034$ ) با نتایج PCR بر روی نمونه های کشت منفی ارتباط آماری معنی دار وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

جدول شماره ۲: برنامه دمایی استفاده شده برای آزمایش PCR

۱ سیکل ← داتوره شدن اولیه: ۹۴ <sup>0</sup> c ۳ دقیقه	جنس مایکوپلازما ۳۰ سیکل ←	داتوره شدن: ۹۴ دقیقه
اتصال پرایمرها به DNA هدف: ۶۴ دقیقه		طول شدن: ۷۲ دقیقه
۱ سیکل ← طول شدن نهایی: ۷۲ ۱۰ دقیقه		
۱ سیکل ← داتوره شدن اولیه: ۹۴ <sup>0</sup> c ۵ دقیقه		جنس بروسلا ۴۰ سیکل ←
اتصال پرایمرها به DNA هدف: ۶۰ دقیقه	طول شدن: ۷۲ دقیقه	
۱ سیکل ← طول شدن نهایی: ۷۲ ۷ دقیقه		
۱ سیکل ← داتوره شدن اولیه: ۹۴ <sup>0</sup> c ۵ دقیقه	گونه لیستریا مونوسایتوزنز ۳۵ سیکل ←	
اتصال پرایمرها به DNA هدف: ۵۶/۵ دقیقه		طول شدن: ۷۲ دقیقه
۱ سیکل ← طول شدن نهایی: ۷۲ ۷ دقیقه		

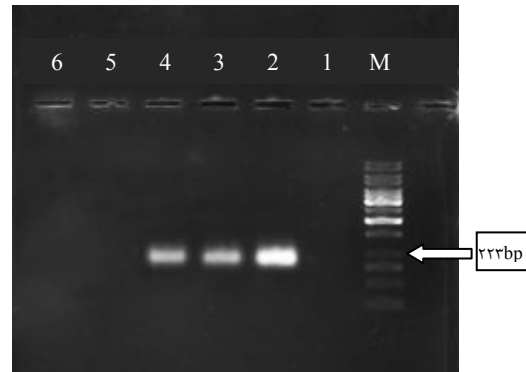
## یافته ها

با توجه به این که آزمایش های معمول بیوشیمیایی و سرولوژیکی که جهت تشخیص مورد استفاده قرار می گیرند به علت واکنش های متقاطع فراوان نتایج مثبت و یا منفی کاذب زیادی را می توانند ایجاد نمایند و نیز تشخیص عفونت های مایکوپلازما، لیستریا و بروسلا از طریق کشت و جداسازی باکتری و انجام آزمایش های سرولوژیکی و بیوشیمیایی می تواند موجب اتلاف وقت فراوان و به تأخیر انداختن روند درمان گردد در این بررسی از تکنیک PCR استفاده گردید. به منظور مقایسه تکنیک کشت و PCR در شناسایی موارد مثبت مایکوپلازما، بروسلا و لیستریا مونوسایتوزنز، بر روی نمونه های کشت منفی PCR انجام شد. نتایج بررسی با توجه به متغیرهای سن، دوره بارداری، سابقه سقط و عوامل میکروبی مورد بررسی نشان داد که بیش تر بیمارانی که دچار سقط جنین به دلیل عفونت شده بودند (۵۰ بیمار)، در محدوده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال (۶۳/۲ درصد، نمودار شماره ۱) بوده، ۴۹ بیمار (۵۶/۳ درصد) در سه ماهه دوم بارداری خود دچار سقط جنین شده بودند و هم چنین ۵۰ بیمار (۵۷/۴ درصد) سابقه قبلی سقط جنین را داشته اند. بیش تر بیماران دارای تحصیلات دیپلم با ۳۰ مورد (۳۰ درصد) و تعداد کمی تحصیلات

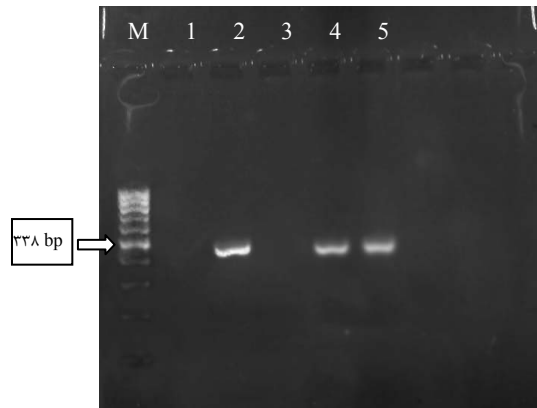
مورد نیاز برای افزودن به محیط‌های کشت، کنترل دقیق pH محیط‌های کشت و نیاز به پرسنل با تجربه را دارند. در این تحقیق از میان این عوامل عفونی، لیستریا مونوسایتوژنز، بروسلای و نیز میکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلتیکوم، به دلیل اهمیت بیماری‌هایی که در انسان ایجاد می‌کنند و نیز به دلیل این که می‌توانند سقط‌های جنین مکرر را در انسان ایجاد نمایند مورد بررسی قرار گرفتند.

اختلاف مشاهده شده در میزان شیوع میکوپلازما، بروسلای و لیستریا مونوسایتوژنز با روش کشت و PCR، ناشی از تفاوت قدرت جداسازی و تعیین هویت این ارگانیسم‌ها با دو تکنیک فوق می‌باشد. به طوری که اگر تشخیص نهایی بر پایه جداسازی ارگانیسم به کمک کشت و مشاهده کلنی قرار گیرد، بسیاری از موارد مثبت را از دست خواهیم داد. در این تحقیق مشاهده گردید میکوپلازما‌های ژنیتال بیش‌ترین نقش را در بروز سقط جنین در میان موارد مثبت مشاهده شده با هر دو روش PCR و کشت داشتند. این نتایج تقریباً مشابه مطالعات صورت گرفته در کشورهای هند و ترکیه (۱۷) می‌باشد که می‌تواند ناشی از نزدیکی فرهنگ این کشورها با ایران باشد. هم‌چنین میزان شیوع این عوامل مشابه با نتایج به دست آمده از کار امیر مظفری و همکارانش در سال ۱۳۸۶ نیز بوده است (۱۸). اختلاف در میزان شیوع عفونت‌های میکوپلازما‌یی دستگاه ژنیتال در جوامع مختلف ناشی از تفاوت در نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه، تعداد نمونه، روش نمونه‌گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی (کشت و نوع PCR) می‌باشد (۱۹).

در این تحقیق هم‌چنین مشاهده شد که با روش کشت ۵۸/۴ درصد و با تکنیک PCR نیز ۷۲ درصد برای میکوپلازما و اوره آپلازما مثبت شدند. این نتیجه نشان دهنده حساسیت بیش‌تر PCR در مقایسه با کشت می‌باشد. نتایج مشابهی در مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر به دست آمد:



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات PCR، DNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی برای تشخیص باکتری میکوپلازما (چاهک M: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۱: نمونه کنترل منفی، چاهک ۲: نمونه کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ و ۴: نمونه بالینی مثبت میکوپلازما با باند ۲۲۳bp، چاهک‌های ۵ و ۶: نمونه بالینی منفی)



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصولات PCR، DNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی برای تشخیص باکتری لیستریا مونوسایتوژنز (چاهک M: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۱: نمونه کنترل منفی، چاهک ۲: نمونه کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ و ۴: نمونه بالینی مثبت لیستریا مونوسایتوژنز با باند ۳۳۸ bp)

## بحث

تشخیص سریع و دقیق بیماری، یکی از مواردی است که باعث کاهش میزان مرگ و میر و هزینه‌های بیمارستانی می‌شود. روش‌های سنتی مبتنی بر کشت اگرچه هنوز هم به عنوان استاندارد طلایی در شناسایی عوامل عفونی نظیر میکوپلازما، لیستریا و بروسلای مطرح است ولی در مقایسه با تکنیک PCR محدودیت‌هایی از جمله گرانی و ناپایداری محیط‌ها، دشواری تهیه مواد

در کشور کانادا Luki و همکارانش در سال ۱۹۹۸، تحقیقی بر روی ۴۷ نمونه ترشحات واژن از زنان حامله دارای علائم، برای جداسازی مایکوپلاسمای ژنیتال با روش کشت و PCR انجام دادند که نتیجه کشت برای مایکوپلاسمای هومینیس و مایکوپلاسمای ژنیتالوم منفی بود، اما با روش PCR شیوع ۱۵ درصد برای مایکوپلاسمای هومینیس و ۲ درصد برای گونه مایکوپلاسمای ژنیتالوم به دست آمد و برای اوره آپلاسمای اوره آلیتیکوم با روش کشت شیوعی برابر با ۴۹ درصد و با تکنیک PCR شیوع ۶۱/۷ درصد به دست آمد (۲۰).

در بررسی که توسط شیپده وطنی و همکاران در سال ۱۳۸۴ بر روی ۱۷۴ بیمار مبتلا به واژینوز باکتریایی مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تهران در سال ۱۳۸۴ صورت گرفت مشاهده شد که از ۱۷۴ نمونه، ۷۱ نمونه (۴۰/۸ درصد) از نظر وجود مایکوپلاسمای یا اوره آپلاسمای استفاده از کشت مثبت شده و ۱۰۳ نمونه (۵۹/۲ درصد) نیز منفی شدند. بر روی موارد منفی PCR انجام شد که از میان آن‌ها ۸۹ نمونه منفی و ۱۴ نمونه مثبت شدند (۲۱).

مایکوپلاسمای ژنیتال در صورت عدم تشخیص و عدم درمان علاوه بر عفونت‌های حادی که در دستگاه تناسلی ایجاد می‌کنند و علاوه بر اثراتشان بر روی سلامت خانم‌های باردار و جنین، قادر به ایجاد عفونت‌های مزمن در خارج از دستگاه تناسلی نیز می‌باشند. کشت میکروبی مایکوپلاسمای ژنیتال یک استاندارد طلایی به شمار می‌رود، اما این روش مشکلاتی را نیز در پی دارد، از جمله زمان طولانی جداسازی، که امکان تشخیص سریع عفونت‌های ژنیتال را فراهم نمی‌کند. بنابراین با توجه به مطالعه انجام شده، PCR در مقایسه با کشت روش حساس، اختصاصی و سریع برای شناسایی مایکوپلاسمای ژنیتال به شمار می‌رود. هم‌چنین در این بررسی از ۸۷ نمونه سقط، جنین ۵ مورد با تکنیک کشت و ۷ مورد با PCR بر روی نمونه‌های کشت منفی از نظر وجود لیستریا مونوسیتوژنز

مثبت به دست آمد. بنابراین یافته‌های پژوهش نشان داد که تست PCR روش مناسبی برای شناسایی عفونت لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. در بررسی که توسط شایان و همکاران در سال ۱۳۸۸ به منظور جداسازی و تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های واژن به روش PCR انجام شد نیز مشاهده گردید که از بین ۱۰۰ نمونه واژن مورد بررسی، ۷ نمونه با استفاده از روش کشت و ۳۶ نمونه با استفاده از روش PCR آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز شناخته شدند که با نتایج حاصل مبنی بر برتری روش PCR نسبت به کشت در تشخیص عفونت‌های ژنیتال ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز هم‌خوانی داشت (۲۲).

در مورد باکتری عامل بروسلا نیز با توجه به این که این عامل بیش‌تر در دام به دلیل حضور میزان زیاد قند اریتریتول در بافت رحم آن‌ها، که یک عامل مهم در رشد باکتری می‌باشد، می‌تواند سقط جنین را ایجاد کند، در پژوهش‌هایی چند مشخص شد که باکتری بروسلا در انسان نیز می‌تواند سقط جنین را ایجاد نماید. از جمله در بررسی که توسط صدیقی کسمائی و جلیل‌وند یوسفی در سال ۱۳۸۵ به بررسی سرواپیدمیولوژیکی موارد سقط جنین‌های عفونی ناشی از عوامل میکروبی (توکسوپلاسمای مایکوپلاسمای لیستریا، بروسلا و کلامیدیا) در شهرستان کرج به روش‌های الایزا، IFA و کشت پرداخته بود، میزان شیوع ۹/۵ درصد از موارد سقط جنین در زنان حامله به این باکتری نسبت داده شد که در اثر مصرف شیر و فرآورده‌های دامی آلوده به انسان سرایت کرده بود. بنابراین در این بررسی به جست و جوی این باکتری به عنوان عاملی که می‌تواند سقط جنین را ایجاد نماید اقدام گردید. از میان ۸۷ نمونه مورد بررسی هیچ مورد مثبتی چه با کشت و چه با PCR برای بروسلا مشاهده نگردید. نتیجه مشاهده شده می‌تواند به دلیل محدودیت در زمان خون‌گیری که می‌بایست در مرحله تب‌دار عفونت به خصوص در زمان اوج حرارت بدن انجام گیرد و شرایط پیچیده محیط کشت که باکتری‌های بروسلا نیاز دارند، باشد.



با تکنیک PCR می‌توان زمان جداسازی این عوامل را بسیار کاهش داده و با توجه به این که در سالیان اخیر نقش این باکتری‌ها در ایجاد بیماری‌ها و عفونت‌های مختلف و نیز سقط جنین شناخته شده است، کوتاه شدن زمان تشخیص توسط تکنیک فوق بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از طرفی تشخیص سریع عفونت‌های ژنیتال به ویژه در درمان نوزادان نارس که به هنگام تولد از کانال زایمان مبتلا شده‌اند نیز بسیار حائز اهمیت است.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به مزایا و معایب تکنیک PCR، هم‌چنین مشکلات روش کشت و عدم اختصاصی بودن تست‌های سرولوژیک در تشخیص عفونت‌های مایکوپلازما هومینیس، اوره آپلازما اوره آلتیکوم، لیستریا مونوسایتوژنز و بروسلایا تکنیک PCR به عنوان ابزار تشخیصی ارزشمندی در جداسازی این باکتری‌ها در عفونت‌های ژنیتال و عوامل منجر به سقط عفونی جنین پیشنهاد می‌شود. زیرا دارای حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص این عوامل می‌باشد.

## References

- Karimzadeh Meybodi MA, Taheripناه R. Infections in Recurrent Miscarriage. J Reprod Infertil 2000; 1(2): 24-34 (Persian).
- Baczynska A, Svenstrup H, Fedder J, Birkelund S, Christianse G. Development of real-time Polymeras Chain Reation for detection of *Mycoplasma hominis*. BMC Microbiol 2004; 4(35): 1-13.
- Taylor RD. The role of *mycoplasmas* in pregnancy outcome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21(3): 425-438.
- Zammit TA. A preliminary note on the examination of the blood on Goats suffering from mediterranea fever, in Reports of the commision on mediterranea fever. Harison London 1995; 83(7).
- Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Vet Microbiol 2006; 114(1-2): 1-15.
- Da Silva O, Gregson D, Hammerberg O. Role of *Ureaplasma urealiticum* and *Chlamydia trachomatis* in development of bronchpulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(4): 364-369.
- Essenberg RC, Sgarma K. Cloning of genes for proline and leucine biosynthesis from *Brucella abortus* by functional complementation in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 1993; 139(1): 87-93.
- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. *Brucellosis* 2005; 352(22): 2325-2336.
- Tonna I, Tonna A. *Brucellosis*. N Engl J Med 2005; 353(10): 1071-1072.
- Aznar R, Alarcón B. Polymeras Chain Reaction detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. J Appl Microbiol 2003; 95(5): 958-966.
- Baily G, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella Melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992; 95(4): 271-275.
- Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by Ppolymerase Chain Reaction. Res Microbiol 1992; 143(3): 271-280.
- Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell H. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16SrRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. J

- Clin Microbiol 1993; 31(5): 1358-1361.
14. Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, Van der Logt GT, et al. Detection of *mycoplasma* contamination in cell cultures by a *Mycoplasma* group-specific Polymeras Chain Reation. Appl. Environ. Microbiol 1994; 60(1): 149-152.
  15. Yassin KM. Incidence and socioeconomic determinant of abortion in rural upper Egypt. Public Health 2000; 114(4): 269-272.
  16. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. *Brucellosis* in pregnant women. Clin infect Dis 2001; 32(8): 1172-1177.
  17. Kilic D, Basar MM, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of Chlamydia tracomatis, Ureaplasma urealyticum, and Mycoplasma hominis in patients with non-gonococdal urethritis. Jpn J Infect Dis 2004; 57(1): 17-20.
  18. Amirmozafari N, Jeddi F, Masjedian F, Haghighi L. Prevalance of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Genital Tract Infections. J Iran Univ Med Sci 2008; 15(60): 19-25 (Persian).
  19. Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital *mycoplasmas* among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symputoms in la Crosse, Wisconsin. J Clin Micr Obiol 2004; 42(10): 4636-4640.
  20. Luki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of polymerase Chain Reaction Assay With Culture for Detection of Genital *Mycoplasmas* inperinatal Infectious. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17(4): 255-263.
  21. Vatani Sh, Ghazisaidi K, Mohamadi M, Naji AR, Fateminasab F, Zeraati H, et al. The survey of contmination with genital mycoplasma in women with bactrial vaginalis by PCR method. J Gorgan Uni Med Sci 2006; 8(1): 45-50 (Persian).
  22. Sattari M, Forouzande M. Isolation and identification of Listeria monocytogenes in vaginal samples by PCR. Modares J Med Sci 2009; 12(1): 51-58 (Persian).