



ISMJ 2013; 16(5): 288-295

فصلنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال شانزدهم، شماره ۵، صفحه ۲۹۵ - ۲۸۸ (آذر و دی ۱۳۹۲)

تشخیص نایسریا گونوره در زنان باردار به کمک روش کشت و انجام PCR بر روی ژن *cppB*

جلال مردانه^۱، پروین حسن زاده^{۲*}، محمد معتمدی فر^۳، خدیجه احمدی^۴، فرهاد نیک خواهی^۵

^۱ مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۳ گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۴ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

^۵ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(دریافت مقاله: ۹۰/۶/۵ - پذیرش مقاله: ۹۰/۸/۱۶)

چکیده

زمینه: باکتری نایسریا گونوره یک پاتوژن مطلق انسانی و عامل ایجاد بیماری سوزاک می باشد. عفونت نایسریا گونوره در طول بارداری روی مادر و نوزاد عوارض جبران ناپذیر بهداشتی دارد. هدف از این مطالعه تشخیص نایسریا گونوره در زنان باردار به کمک کشت و روش ملکولی با تکثیر ژن *cppB* در واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، دو نمونه سواب اندوسرویکس از ۱۱۰۰ زن باردار مراجعه کننده به بیمارستان های شیراز گرفته شد. کشت بر روی محیط های انتخابی و غیرانتخابی نایسریا گونوره و آزمایش تکثیر اسید نوکلئیک (NAAT) به منظور جستجوی ژن *cppB* نایسریا گونوره صورت پذیرفت.

یافته ها: نتیجه کشت کلیه نمونه های سواب اندوسرویکس بر روی محیط های کشت انتخابی و غیرانتخابی از نظر نایسریا گونوره منفی بود. نتیجه آزمایش PCR بر روی نمونه های سواب جهت ژن *cppB* نایسریا گونوره در ۱۳ مورد (۱/۱۸ درصد) مثبت بود.

نتیجه گیری: نتایج منفی حاصل از کشت و مثبت شدن آزمایش PCR در این مطالعه نشان می دهد که اگر چه روش کشت به عنوان استاندارد طلایی تشخیص نایسریا گونوره باقی مانده اما به دلیل حساس بودن باکتری، اتولیز ارگانسیم، تکنیک های ضعیف نمونه گیری، نگهداری و انتقال نامناسب نمونه، ارزش کشت در مقایسه با تست های تکثیر اسید نوکلئیک (NAATs) کاهش یافته است.

واژگان کلیدی: نایسریا گونوره، زنان باردار، کشت، PCR

* شیراز، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مقدمه

باکتری نایسریا گونوره یک پاتوژن مطلق انسانی می‌باشد که به جنس نایسریا و خانواده باکتریایی نایسریاسیه تعلق دارد و سبب بیماری سوزاک (Gonorrhoea) که یک بیماری منتقل شونده از طریق جنسی (STD) در بسیاری از کشورها است، می‌گردد. تقریباً ۶۲ میلیون مورد عفونت جدید ناشی از نایسریا گونوره سالیانه در جهان رخ می‌دهد.

نایسریا گونوره غشاءهای مخاطی اورترا، اندوسرویکس، فارنکس و رکتوم را عفونی نموده و سبب بیماری سوزاک می‌گردد. سوزاک همچنین می‌تواند سبب بیماری منتشره و افزایش حساسیت به ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) شده و اختلالاتی که منجر به ناباروری، آبستنی نابجا، درد لگنی مزمن و انتقال مادری سوزاک می‌شوند را ایجاد نماید (۱) و (۲). تشخیص سنتی بیماری سوزاک نیاز به انجام کشت بر روی محیط‌های انتخابی یا مشاهده دیپلوکوک‌های گرم منفی داخل سلولی در اسمیر تهیه شده از نمونه‌های اورترا یا سواب‌های اندوسرویکس دارد. حساسیت کشت در عفونت‌های حاد ۸۵ تا ۹۵ درصد اما در عفونت‌های مزمن تا ۵۰ درصد کاهش می‌یابد. تکنیک‌های ضعیف نمونه‌گیری، نگهداری نامناسب نمونه و انتقال آن می‌تواند حساسیت کشت را کاهش دهد (۱ و ۳).

نتایج جبران ناپذیر مادری و نوزادی ناشی از عفونت نایسریا گونوره در طول آبستنی، تشخیص آن را ضروری می‌سازد. مرکز پیشگیری و کنترل بیماری (WHO)، غربالگری روتین برای عفونت‌های منتقل شونده از طریق جنسی در اولین حضور پس از بارداری و تکرار آن در سه ماهه سوم را توصیه می‌نماید (۴). روش کشت بعنوان استاندارد طلایی

جهت تشخیص باکتری نایسریا گونوره باقی مانده است. باکتری در شرایط آزمایشگاهی سریعاً اتولیز گشته و از بین می‌رود در نتیجه حساسیت کشت در مقایسه با تست‌های تکثیر اسیدنوکلیک (NAATs) کاهش می‌یابد اما به کمک کشت می‌توان تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی را انجام داد.

از آنجایی که تکنولوژی شناسایی بر پایه NAATs به زنده بودن باکتریایی وابسته نمی‌باشند، به‌منظور جلوگیری از موارد منفی کاذب دارای اهمیت می‌باشد و به سرعت در حال جایگزین شدن بجای کشت برای شناسایی بیماری سوزاک می‌باشد (۵، ۶ و ۷). تست‌های تکثیر اسیدنوکلیک (NAATs) طراحی شده بر اساس ژن *cppB* و ژن 16S rRNA به‌عنوان تست‌های تأییدی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱) و (۳). هدف از این مطالعه تشخیص نایسریا گونوره در زنان باردار با استفاده از روش کشت و تکثیر ژن *cppB* این باکتری به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه:

در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۱۰۰ زن باردار که در ماه آخر بارداری برای زایمان به مراکز درمانی بیمارستان‌های دولتی شیراز در طی ۲۰ ماه مراجعه نمودند، به‌عنوان جامعه مورد مطالعه انتخاب گردیدند و برای هر یک پرسشنامه‌ای تکمیل و کدگذاری گردید. نمونه‌گیری پس از توضیح هدف مطالعه برای افراد و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از آنها انجام گرفت.

روش نمونه‌گیری:

از هر فرد دو نمونه سواب (سواب داکرون) اندوسرویکال به منظور بررسی از نظر آلودگی به نایسریا گونوره توسط پرسنل آموزش دیده مامایی یا پرستاری جمع‌آوری شد. یک سواب جهت کشت و انجام آزمایش‌های میکروبیولوژی و دیگری جهت انجام تست‌های مولکولی تکثیر ژنومی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در ظرف‌های در پیچ‌دار حاوی سالیین فسفات بافر (PBS) قرار گرفته و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام تست‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. یک نمونه سواب جهت کشت در محیط ترانسپورت تایوگلیکولات براث قرار داده شد و در کوتاهترین زمان ممکن به آزمایشگاه انتقال یافت.

بررسی‌های میکروب‌شناسی:

سواب تهیه شده از اندوسرویکس به منظور کشت روی محیط‌های Blood Agar, Chocolate Agar و تایر مارتین اصلاح شده (MTM) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B (۵ میکروگرم/میلی‌لیتر)، ونکومايسين (۳ میکروگرم/میلی‌لیتر)، نیستاتین (۱۲/۵ واحد/میلی‌لیتر) و کلیستین (۷/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ تا ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن (Co₂) به وسیله Candle Jar فراهم گردید) به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه گردید و سپس محیط‌های کشت از نظر وجود کلونی مورد بررسی قرار گرفت. باکتری نایسریا گونوره به کمک تست‌های آزمایشگاهی استاندارد شامل مورفولوژی کلونی (کلونی‌های برآمده ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر قطر، شفاف و شبیه قطره شبنم)، رنگ‌آمیزی گرم (دپلوکوک‌های گرم منفی درون سلولی یا خارج

سلولی)، تست اکسیداز (مثبت)، تست سوپراکسول (مثبت) و تست تجزیه کربوهیدرات (مصرف گلوکز و عدم مصرف مالتوز) تأیید نهایی شد.

انجام آزمایش PCR:

نمونه‌های سواب گرفته شده از اندوسرویکس در سالیین فسفات بافر (PBS) به منظور آزمایش PCR از فریزر ۲۰- خارج و اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسند سپس به منظور آزاد شدن مواد و سلول‌های چسبیده به سواب‌ها، به مدت یک دقیقه ورتکس شدند، آنگاه سواب‌ها بیرون انداخته و محیط ترانسپورت با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جهت رسوب سلول‌ها سانتریفوژ گشت. سپس مایع‌روبی آسپیره و دور ریخته شد و به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر بافر K (K-buffer) همراه با ۰/۵ درصد توئین ۲۰ غیر یونیک و ۲۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر آنزیم پروتئیناز K اضافه شد و پس از ورتکس آن، سوسپانسیون حاصله در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک ساعت انکوبه و سپس به منظور غیرفعال سازی پروتئیناز K در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. پرایمرهای F (5'-GCT ACG CAT ACC CGC) و R (3'-GTT GC-5') (AGC AGA CA-3') با استفاده از توالی ژن *cppB* که روی کروموزوم باکتری و نیز روی پلاسمید کریپتیک ۴/۲ کیلو بایتی قرار دارد طراحی گردید که در نتیجه تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قطعه‌ای ۳۹۰bp حاصل می‌شود. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 1x PCR، ۲/۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱۱/۸ میکرولیتر

یافته‌ها

از ۱۱۰۰ زن باردار مورد بررسی، ۷۷۴ نفر (۷۰/۳۶ درصد) بارداری اول، ۲۲۰ نفر بارداری دوم (۲۰ درصد)، ۷۰ نفر (۶/۳۶ درصد) بارداری سوم و ۳۶ نفر (۳/۲۸ درصد) بارداری چهارم خود را سپری می‌کردند. هیچ‌کدام از زنان حامله مورد مطالعه، بیماری زمینه‌ای نداشته و تا چند روز قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. تعداد ۸۴ نفر (۷/۶ درصد) ترشحات قبل از زایمان داشتند. اطلاعات مربوط به روش‌های پیشگیری از بارداری مورد استفاده قبل از بارداری در جدول ۱ خلاصه شده است. نتیجه کشت نمونه‌های سواب تهیه شده از اندوسرویکس بر روی محیط‌های کشت انتخابی و غیرانتخابی از نظر نایسریا گونوره منفی بود و در این مطالعه هیچ باکتری دیپلوکوک گرم منفی اکسیداز مثبت یافت نشد. نتیجه آزمایش PCR بر روی ۱۱۰۰ نمونه سواب گرفته شده از اندوسرویکس به‌منظور شناسایی نایسریا گونوره به‌روش مولکولی در ۱۳ مورد (۱/۱۸ درصد) مثبت بود.

آب مقطر دیونیزه، ۵ میکرولیتر نمونه DNA و در نهایت ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز در طی ۳۵ سیکل با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف) انجام گردید. هر سیکل واکنش PCR شامل مرحله دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، آنلینگ در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و یک مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نیز اعمال گردید. محصول PCR با استفاده از آگارز ۱/۵ درصد روی دستگاه الکتروفورز حاوی بافر 1xTAE الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور به‌منظور جستجوی باند ۳۹۰bp مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (SPSS USA, Il. Chicago, Inc) ویرایش ۱۸ استفاده شد.

جدول ۱) روش‌های پیشگیری از بارداری مورد استفاده قبل از بارداری در زنان مورد مطالعه

روش پیشگیری مورد استفاده	افراد با اولین بارداری	افراد با دومین بارداری	افراد با سومین بارداری	افراد با چهارمین بارداری
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
قرص پیشگیری خوراکی (OCP)	۱۸۲ (۲۳/۵)	۶۳ (۲۸/۵)	۳۰ (۴۳)	۱۰ (۲۸)
کاندوم	۲۳۷ (۳۰/۵)	۹۴ (۴۳)	۱۵ (۲۱)	۴ (۱۱)
دستگاه درون رحمی (IUD)	۰	۱۶ (۷)	۵ (۷)	۴ (۱۱)
سایر روش‌ها	۳۵۵ (۴۶)	۴۷ (۲۱/۵)	۲۰ (۲۹)	۱۸ (۵۰)

بحث

نایسریا گونوره به‌همراه کلامیدیا تراکوماتیس دو عامل مهم ایجاد کننده بیماری‌های منتقل شونده از طریق جنسی (STDs) می‌باشند.

عفونت گونوکک‌های شایع‌ترین بیماری قابل انتقال در بسیاری از کشورها می‌باشد. این باکتری به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج جهت درمان مقاوم می‌باشد. موارد درمان نشده گونوره سبب انتقال بیماری و هم چنین به سرعت باعث ایجاد مقاومت در باکتری

می‌گردد (۸ و ۹). علاوه بر این مشخص شده است که برخی بیماری‌های منتقل شونده از طریق جنسی نظیر بیماری‌های کلامیدیایی و سوزاک گسترش ویروس بیماری نقص سیستم ایمنی انسان را تسهیل می‌نمایند. مقاومت به داروهای ضد میکروبی یک مشکل عمده‌ی در حال گسترش در درمان بیماری سوزاک است (۹ و ۱۰). سن جوانی یک فاکتور کاملاً شناخته شده از فاکتورهای خطر غیروابسته برای کسب عفونت منتقل شونده از طریق جنسی می‌باشد. خطر انتقال عفونت در زنان نوجوان و بالغ مبتلا به عفونت‌های منتقل شونده از طریق جنسی و با رفتار پرخطر، بالا است (۱۱).

تشخیص و درمان سریع عفونت‌های منتقل شونده از طریق جنسی (STDs) به‌ویژه در زنان، سبب کاهش نقص‌ها و اثرات جانبی ناشی از عفونت، جلوگیری از انتقال عفونت به افراد سالم، کاهش هزینه‌های درمانی و جلوگیری از عدم درمان یا درمان ناقص و نامناسب می‌گردد. نتایج منفی حاصل از کشت و مثبت شدن آزمایش PCR در مطالعه ما نشان می‌دهد که اگر چه روش کشت در تشخیص نایسریا گونوره به‌عنوان استاندارد طلایی باقی مانده و به‌کمک آن می‌توان به تعیین پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری پرداخت ولی این باکتری به شرایط محیطی نامناسب حساس بوده و از بین می‌رود در نتیجه حساسیت کشت در مقایسه با تست‌های تکثیر اسیدنوکلیک (NAATs) کاهش می‌یابد. از آنجایی که روش‌های شناسایی بر پایه NAATs به زنده بودن باکتری وابسته نیستند، در نتیجه این تست‌ها به‌منظور کاهش موارد منفی کاذب بیماری دارای اهمیت می‌باشند.

در مطالعه‌ای که توسط الزهرانی (Alzahrani) و همکاران در عربستان سعودی روی غربالگری زنان آبستن از نظر عفونت‌های ناشی از کلامیدیا

تراکوماتیس و نایسریا گونوره انجام شده است، نایسریا گونوره از زنان باردار جدا نشده است (۱۲). یک پلاسمید کریپتیک، چندین آنزیم بتالاکتاماز کدشونده توسط پلاسمیدها و چندین پلاسمید کونجوگتیو^۱ نیز توسط سویه‌های نایسریا گونوره حمل می‌گردند. تبادل ژنتیکی افقی از طریق ترانسفورمیشن^۲ و کونجوگیشن^۳ به فراوانی بین سویه‌های نایسریا گونوره و همچنین دیگر گونه‌های مشابه رخ می‌دهد. همچنین تبادل ژنی بین نایسریا گونوره و ژنوم سلول‌های میزبان خود که در اثر نکروز و یا به‌دلایل مختلف از بین رفته‌اند، رخ می‌دهد. این تبادلات ژنتیکی افقی فراوان همراه با موتاسیون‌ها سبب تغییرات ژنوتایپی و فنوتایپی در سطح بالا می‌گردد که برای تهاجم و یا انطباق با سیستم ایمنی میزبان و گسترش مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارای اهمیت است (۱۳ و ۱۴).

اگرچه هدف مطالعه حاضر تنها شناسایی افراد آلوده به نایسریا گونوره بود و به حساسیت و ویژگی تست‌ها پرداخته نشد ولی بر اساس مطالعات انجام‌شده به‌طور کلی تست‌های مبتنی بر تکثیر اسیدنوکلیک (NAATs) نسبت به کشت به‌ویژه برای نمونه‌های رکتوم و فارنکس دارای حساسیت بالاتری هستند. موارد مثبت کاذب در نتیجه گونه‌های نایسریا کومانسال نیز ممکن است در تست‌های مبتنی بر NAATs اتفاق بیافتد که این موضوع را می‌توان با تفسیر دقیق نتایج و رفع نتایج مشکوک به‌وسیله انجام دوباره آزمایش روی نمونه‌های اصلی برطرف نمود (۱۳).

علاوه بر این به‌دلیل درجات بالایی از نوترکیبی‌های ژنتیکی درون گونه‌ای، استفاده از آزمایش تأییدی

¹ Conjugative

² Transformation

³ Conjugation

مهارکننده‌ها، واکنش متقاطع با دیگر میکروارگانیسم‌ها، حساسیت محدود، هزینه بالا و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته می‌باشند و محدود به تیپ‌های نمونه‌ی خاصی می‌باشند. اگر چه آزمون‌های تکثیر اسیدنوکلئیک بر پایه ژن *cppB* و ژن 16S rRNA به‌عنوان تست‌های تأییدی مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی در حدود ۵ درصد از سویه‌های نایسریا گونوره پلاسمید *cppB* را حمل نمی‌کنند و همه تست‌های بر پایه 16S rRNA حساسیت و اختصاصیت کافی ندارند (۱ و ۳).

یکی از دلایل عمده‌ی پایین بودن شیوع آلودگی به نایسریا گونوره در این مطالعه را می‌توان به این دلیل دانست که فاکتورهای خطر مؤثر در ابتلا به بیماری منتقله از طریق جنسی نظیر داشتن شریک جنسی متعدد، بیماری‌های زمینه‌ای مؤثر، مصرف الکل و فقر بهداشت شخصی در ایران نسبتاً پایین است و به‌دلیل وجود اعتقادات مذهبی، تعصبات اجتماعی، شرم و حیاء و وجود قانون مدنی در زمینه محدود نمودن ارتباطات جنسی شیوع این آلودگی نسبتاً پایین است. از طرف دیگر، مطالعه حاضر در شهر شیراز که یکی از شهرها با وضعیت نسبتاً مناسب اقتصادی، فرهنگی و بهداشت‌های شخصی می‌باشد، صورت پذیرفته است.

اختصاصی و حساس که دیگر ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد ممکن است در آینده برای همه تست‌های NAATs به‌ویژه برای نمونه‌های خارج تناسلی از قبیل فارنکس ضروری باشد. مزیت روش‌های تشخیصی DNA/RNA، حساسیت بالا و در بسیاری از مورد اختصاصیت بالای آنها، سریع بودن و توانایی استفاده از نمونه‌های تهیه شونده به‌صورت غیرتهاجمی از قبیل ادرار و همچنین عدم نیاز به ارگانیسم‌های زنده در این تست‌ها می‌باشد (۶، ۷، ۱۷-۱۳). اگر چه تست‌های تجاری طراحی شده بر پایه اسیدنوکلئیک جهت شناسایی نایسریا گونوره دارای حساسیت بالاتری نسبت به تست‌های سنتی می‌باشند اما اختصاصیت این قبیل تست‌ها مورد بحث می‌باشد زیرا نوترکیبی درون گونه‌ای و خارج گونه‌ای به‌وفور بین اعضاء جنس نایسریا رخ می‌دهد و واکنش متقاطع با بسیاری از توالی‌های هدف از جمله 16S rRNA شایع است و همچنین در هنگام استفاده از توالی‌های ژن *cppB* جهت شناسایی نایسریا گونوره نتایج مثبت کاذب همراه با نایسریا مننژیتیدیس و نایسریا لاکتامیکا گزارش شده است (۳-۱).

از این رو هر یک از این تست‌ها دارای محدودیت‌هایی از جمله حساسیت‌های متغیر به

References:

1. Mayta H, Calderon M, Taverna J, et al. Use of a reliable PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Peruvian patients. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 809-12.
2. Mhlongo S, Magooa P, Müller EE, et al. Etiology and STI/HIV Coinfections Among Patients With Urethral and Vaginal Discharge Syndromes in South Africa. Sex Transm Dis 2010; 37: 566-70.
3. Geraats-Peters CWM, Brouwers M, Schneeberger PM, et al. Specific and Sensitive Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Clinical Specimens by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2005; 43: 5653-9.
4. Berqqren EK, Patchen L., Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* and Repeat Infection Among Pregnant Urban Adolescents. Sex Transm Dis 2011; 38: 172-4.
5. Hjelmvoll SO, Olsen ME, Ericson Sollid JU, et al. Clinical Validation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of *Neisseria gonorrhoeae* porA Pseudogene Versus Culture Techniques. Sex Transm Dis 2008; 35: 517-20.
6. Dicker LW, Mosure DJ, Steece R, et al. Laboratory Tests Used in U.S. Public Health Laboratories for Sexually Transmitted

- Diseases, 2000. Sex Transm Dis 2004; 31: 259-64.
- 7.Schachter J, Moncada J, Liska S, et al. Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Chlamydial and Gonococcal Infections of the Oropharynx and Rectum in Men Who Have Sex With Men. Sex Transm Dis 2008; 35: 637-42.
- 8.Fayemiwo SA, Müller EE, Gumede L, et al. Plasmid-Mediated Penicillin and Tetracycline Resistance Among *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in South Africa: Prevalence, Detection and Typing Using a Novel Molecular Assay. Sex Transm Dis 2011; 38: 329-33.
- 9.Yuan LF, Yin YP, Dai XQ, et al. Resistance to Azithromycin of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From 2 Cities in China. Sex Transm Dis 2011; 38: 764-8.
- 10.Srifeungfung S, Roongpisuthipong A, Asavapiryanont S, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive patients and gonococcal antimicrobial susceptibility: an update in Thailand. Jpn J Infect Dis 2009; 62: 467-70.
- 11.Thurman AR, Holden AE, Shain RN, et al. The Male Sexual Partners of Adult versus Teen Women with Sexually Transmitted Infections. Sex Transm Dis 2009; 36: 768-74.
- 12.Alzahrani AJ, Obeid OE, Hassan MI, et al. Screening of pregnant women attending the antenatal care clinic of a tertiary hospital in eastern Saudi Arabia for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. India J Sex Transm Dis 2010; 31: 81-6.
- 13.Fredlund H, Falk L, Jurstrand M, et al. Molecular genetic methods for diagnosis and characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. APMIS 2004; 112: 771-84.
- 14.Anderson MT, Seifert HS. Opportunity and Means: Horizontal Gene Transfer from the Human Host to a Bacterial Pathogen, mBio 2011; 2: e00005-11.
- 15.Mayer KH, Venkatesh KK. Interactions of HIV, Other Sexually Transmitted Diseases and Genital Tract Inflammation Facilitating Local Pathogen Transmission and Acquisition. Am J Reprod Immunol 2011; 65: 308-16.
- 16.Faber MT, Nielsen A, Nygård M, et al. Genital Chlamydia, Genital Herpes, Trichomonas vaginalis and Gonorrhea Prevalence, and Risk Factors Among Nearly 70,000 Randomly Selected Women in 4 Nordic Countries. Sex Transm Dis 2011; 38: 727-34.
- 17.Azizi F, Zafarmand M, Bayat F. Qualitative analysis of parents, teachers and students' beliefs about education of reproductive health to students using focus group discussion. ISMJ 2003; 6: 69-78.

Original Article

Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* among pregnant women by culture method and PCR on *cppB* gene

J. Mardaneh¹, P. Hasanzadeh^{2*}, M. Motamedifar³, KH. Ahmadi⁴,
F. Nikkhahi⁵

¹Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

²Department of Biology, School of Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

³Department of Bacteriology & Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

⁴Department of Microbiology, School of Medicine, Jondi Shapoor University of Medical Sciences, Ahvaz, IRAN

⁵Department of Pathobiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

(Received 27 Aug, 2011 Accepted 7 Nov, 2011)

Abstract

Background: *Neisseria gonorrhoeae* is a human obligate pathogen and the etiological agent of gonorrhea. Health irreparable complications resulting from gonorrhea disease occur mainly in pregnant women and neonates. Aim of this study was diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* among pregnant women with using culture and molecular method by amplification of *cppB* gene with PCR.

Material and Methods: In this cross-sectional study, two endocervical swab specimens were obtained from 1100 pregnant women who referred to Shiraz Hospitals. Culture on nonselective and selective media and nucleic acid amplification test (NAAT) were performed for detection of *Neisseria gonorrhoeae cppB* gene.

Results: All endocervical swabs cultures on selective and nonselective media were negative for *Neisseria gonorrhoeae*. Among examined endocervical swabs, 13samples (1.18%) were positive by nucleic acid amplification of *Neisseria gonorrhoeae cppB* gene.

Conclusion: Negative results of culture and positive results of PCR in this study indicate that however culture is gold standard method for detection of *Neisseria gonorrhoeae* but due to bacterial autolysis, poor sampling techniques and improper specimen storage and transport, its value decline as compared with Nucleic acid amplification test (NAAT).

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, pregnant women, culture, PCR

*Address for correspondence: Department of Biology, School of Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN; E-mail: hassanzadeh@susc.ac.ir