

# تأثیر مایع رویی جدا شده از کشت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (مایع NECF)<sup>۱</sup>، در حساسیت لیستریامنوسیتوزنز در مقابل آنتی بیوتیک ها به

## روش In vitro

احمد حیدری نیا\*، حسین معمارباشی\*

با توجه به اینکه لیستریا منوسیتوزنز در انسان باعث عفونت و عوارض دیگر مثل منگوانسفالیت و سپتی سمی و میوکاردیت میگردد و از آنجا که این باکتری بیشتر از طریق مواد غذایی آلوده منتقل می گردد و همچنین به علت مقاوم بودن این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها با استفاده از روشهای کشت استاندارد لیستریامنوسیتوزنز و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و تهیه جمعیت باکتریایی با روش مک فارلند و تهیه مایع NECF و با کمک دیسک های آنتی بیوتیکی مبادرت به بررسی مقاومت و حساسیت لیستریامنوسیتوزنز در حضور و بدون حضور NECF گردید که در اینجا گروه تراسیکین ها موجب کاهش مقاومت لیستریا منوسیتوزنز ولی آنتی بیوتیکهای، پنی سیلین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل، جنتامایسین، اریترومایسین، استرپتومایسین، نئومایسین و کانامایسین موجب افزایش مقاومت لیستریا گردیدند و گروه سوم یعنی تری متوپریم، اموکسی سیلین، کلوکساسیلین و نالید دیکزیک اسید هیچگونه تأثیری در مقاومت لیستریا منوسیتوزنز نداشتند. بهمین خاطر توصیه می شود که چون در فرآورده های لبنی مثل ماست باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس وجود دارد اینگونه فرآورده ها در هنگام معالجه استفاده نشوند در حالیکه مصارف آنها با گروه دیگر که باعث کاهش مقاومت لیستریا میگرددند توصیه می شود، تا همزمان مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: لیستریامنوسیتوزنز، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، باکتریوسین، آنتی بیوتیک.

مقدمه:

لیستریامورایی<sup>۶</sup> لیستریامنوسیتوزنز<sup>۷</sup> در بین هشت گونه فوق بیشتر لیستریامنوسیتوزنز در انسان باعث عفونت و عوارض میگردد. عامل این بیماری ابتدا در انگلستان در یک واگیری کشنده در خرگوش آزمایشگاهی شناخته شد. چون در دام منوسیت های خون افزایش مییابد باکتری عامل بیماری را باکتریوم منوسیتوزنز نامیدند. پیری آنرا در افریقا از یک نوع جونده بنام گریبل<sup>۸</sup> از جراحات شبیه طاعون جدا کرد و آنرا لیسترلانامید ولی چون این نام به دسته ای از قارچها

بر طبق تقسیمات انجام شده در کتب میکروبیولوژی جنس لیستریا شامل هشت گونه گزارش شده است این تقسیمات توسط اسکرمن<sup>۱</sup> و همکاران در ۱۹۸۰ و مورو<sup>۲</sup> و همکاران در ۱۹۸۵ صورت گرفته که عبارتند از: لیستریایوانوی<sup>۳</sup>، لیستریا<sup>۴</sup> و لشمیری<sup>۵</sup>

\* دانشگاه علوم پزشکی اهواز - دانشکده پیراپزشکی

- 1- Neutralized Extera Culture Filetrat
- 2- Skerman
- 3- Moro
- 4- L.inanovi
- 5- Inoguina
- 6- L. Welshimeri

- 7- L.murrayi
- 8- L.monocytogenes
- 9- L.Gerbille

### روش کار، مواد و وسایل مورد استفاده

برای انجام این پروژه تحقیقاتی ابتدا دو سوش باکتری یعنی لیستریامنوسیتوژنزباکد ۱۲۹۴ و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با کد ۱۳۳۲ از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریایهای صنعتی و عفونی ایران وابسته به پژوهشکده بیوتکنولوژی تهیه گردید. در شروع کار باکتریهای مورد نظر که بصورت لیوفیلیزه بودند طبق دستورالعمل ارائه شده از آن مرکز فعال گردیدند. بدینصورت که ابتدا پس از شکستن آمپول حاوی هر یک از سوش ها بکمک پی پت پاستور به هر یک از آمپول ها ۴/۳، از محیط مایع استریل و اختصاصی هر یک از باکتریها یعنی برای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از محیط ام - آ - اس<sup>۱</sup> برات<sup>۲</sup> و برای لیستریامنوسیتوژنز از محیط لیستریانریچمنت برات<sup>۳</sup> استفاده شد که با تکان دادن لوله ها سوسپانسیون یک نواختی تشکیل گردید. برای کشت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از محیط جامد ام-آ-اس و برای لیستریا از محیط لیستریا براید آگار<sup>۳</sup> استفاده گردید (۵).

برای تهیه مایع بدن سلول از کشت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس که به مدت ۱۶ ساعت در محیط ام آ اس - برات در ۴۰ درجه سانتیگراد انکوبه شده بنود استفاده گردید. مایع رویی با استفاده از سانتریفوژ در ۶۵۰۰ دور در دقیقه، بمدت ۲۰ دقیقه و بکمک پی پت پاستور استریل خارج و PH آن به وسیله هیدروکسید سدیم یک نرمال به حدود ۷/۲ رسانیده شد. بمنظور استریل نمودن این مایع از فیلتر ۲۲ میلی متر عبور داده و در ظروف استریل جمع آوری گردید (۶ و ۷).

بکار رفته بود آنرا به لیستریا تغییر دادند. (۱) عفونت حاصل از آن نه تنها از دام آلوده بلکه مصرف مواد غذایی آلوده مثل گوشت خام، شیر و پنیر نیز موجب بیماری میگردد و بهمین خاطر در میکروبیولوژی مواد غذایی مطرح می باشد. طبق آزمایشات انجام شده مشخص گردیده که به بیشتر آنتی بیوتیکها مقاوم می باشد ولی نسبت به گروه تتراسیکلین حساس است.

تحقیق حاضر بمنظور بررسی کیفی پی بردن به اینکه آیا میتوان مقاومت این باکتری را به نحوی نسبت به آنتی بیوتیک ها کاهش داد و یا از بین برد انجام شد، زیرا در بیشتر موارد تشخیص باکتری مذکور بعلت عدم ماده ای که برای این منظور در نظر گرفته شد باکتریوسین حاصل از باکتریهای لاکتیک اسید بود در بین این باکتریها لاکتوباسیلوس بولگاریکوس است که در تهیه ماست بعنوان استارتر مورد استفاده قرار می گیرد

روزانه همراه ماست، پنیر و بعضی دیگر فرآورده های لبنی وارد بدن انسان می شود و خاصیت تولید ترکیبات ضد میکروبی را دارد (۲ و ۳).

باکتریوسین ها اغلب باکتریسید و مقاوم به حرارت بوده بهمین خاطر آنها را بیوپرزرواتیمو می نامند بطوریکه این مواد امروزه در سطح وسیعی به عنوان ضد میکروب در جهت درمان بیماریها و بعنوان کمک کننده به تأثیر بهتر دارو مورد مصرف قرار می گیرند مثلاً در عفونت های رودای تجویز آنتی بیوتیک همراه لاکتوباسیل نتایج درمانی خوبی در مقایسه با مصرف تنها دارو دارد و همینطور در صنایع در پروسه های تولید بمنظور جلوگیری از فساد مواد غذایی استفاده میشوند (۴).

1- Man Rogosa and sharpe

2- Listeria enrichment Brothskerman

3- Listeria Mac Agar

دیگزیک اسید ۳۰ گرمی کلوکساسیلین ۵ گرمی  
داکسی سیلین ۲۵ میکروگرمی نئومایسین ۳۰  
میکروگرمی - استرپتومایسین ۱۰ مینگرمی تتراسیکلین  
۳۰ میکروگرمی - کانامایسین ۳۰ میکروگرمی پنی  
سیلین ۱۰ میلی گرمی - کلرامفنیکل ۳۰ میلی گرمی  
آمی سیلین ۱۰ میلی گرمی.

مراحل آزمایش: بمنظور بررسی تأثیر مایع روی جدا  
شده از کشت لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با غلظت  
 $10^9$  cfu/ml بر حساسیت لیستریامنوسیتوزنز نسبت به  
آنتی بیوتیک، آزمایش در پنج گروه صورت گرفت  
بدینصورت که یک گروه بدون حضور (شاهد) و  
چهار گروه دیگر در حضور غلظت های ۲/۵، ۵-۷/۵  
و ۱۰٪ NECF انجام شد جمعاً برای هر دیسک آنتی  
بیوتیک تعداد ۵ آزمایش انجام گرفت. (۶)

لازم به ذکر است که بمنظور اطمینان از عاری بودن  
لاکتوباسیل در مایع جدا شده قبل از بکار بردن  
باکتریوسین از آن کشت داده شد که هیچگونه رشدی  
مشاهده نگردید.

نتایج: هاله‌های عدم رشد در پلیت های آنتی بیوگرام،  
با توجه به غلظت های مختلف عصاره کشت حاوی  
باکتریوسین مورد استفاده یعنی ۲/۵ - ۵ - ۷/۵ و ۱۰  
در صد و بدون حضور باکتریوسین با هم مقایسه  
گردیدند و نتایج پس از اندازه گیری هاله ها در هر  
مورد بطور مجزا مشخص و ثبت گردید. لازم به  
توضیح است که ملاک عمل در هاله محاسبه قطر عدم  
رشد بر حسب میلی متر صورت می گرفت.

با استفاده از تجزیه و تحلیل های آماری به روش  
آنالیز واریانس تست های این ویترو<sup>۱</sup> نشان داد  
باکتریوسین موجود در فرآورده های لبنی مثل ماست

تهیه استاندارد کدورت - بمنظور تخمین جمعیت  
میکروبی اقدام به تهیه محیط مک فارلند شد که از  
مقایسه کدورت استاندارد آن با کدورت سوسپانسیون  
میکروبی حدود جمعیت میکروبی مشخص گردید.

در تست حساسیت سوسپانسیون میکروبی باید حاوی  
cfu/ml ۱۰ از میکروارگانیسم مورد آزمایش باشد که  
این مقدار معادل غلظت (۱/۵) مک فارلند است.

بررسی تأثیر عصاره کشت حاوی باکتریوسین جدا  
شده (ان-ای سی-اف) از کشت لاکتوباسیلوس  
بولگاریکوس بر حساسیت لیستریامنوسیتوزنز نسبت  
به آنتی بیوتیکها؛ برای انجام آنتی بیوگرام از محیط  
مولر هیتون آگار استفاده شد برای تهیه محیطهای  
حاوی ان ای سی اف (مایع رویی جدا شده از کشت  
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس)، مقادیر مختلفی از مایع  
جدا شده به محیط مولر هیتون در دمای ۵۰ درجه  
سانتیگراد اضافه گردیده و خوب مخلوط می شوند تا  
کاملاً هموزن شود در اینصورت برای تهیه هر غلظت  
از ان ای سی اف باید از یک ارلن استفاده می شد و  
سپس محیطهای آماده در پتری ها به روش معمول  
تقسیم می شدند (۶)

در این بررسی از چهار رقت ۲/۵ - ۵ - ۷/۵ و ۱۰ در  
صد ان-ای-سی-اف در محیط مولر هیتون استفاده  
شد. انتخاب آنتی بیوتیک ها در این تحقیق  
بدینصورت بود که از هر گروه داروهای با ساختمان  
شیمیایی وابسته یک نماینده با یک طیف تقریباً یکسان  
بر علیه ارگانیسم ها استفاده شد ولی بخاطر دقت در  
تأثیر باکتریوسین در بعضی موارد از دو آنتی بیوتیک  
هم خانواده با طیف تأثیر مختلف استفاده شد. (۷)  
دیسک های بکار رفته عبارت بودند از:

اریترومایسین ۱۵ میلی گرمی - اموکسی سیلین ۲۵  
میلی گرمی تری متوپریم ۵۰ میلی گرمی نالید

جدول ۱: قطر‌ها عدم رشد دیسک های انتی بیوتیک بر حسب میلیمتر در محیط کشت لیستریا منوسیتوز در حضور غلظت های NECF

ردیف	انتی بیوتیک	محتوی دیسک	تعداد آزارهای مشاهده شده	گروه شاهد	غلظت ۱/۵	غلظت ۱/۱۰	غلظت ۱/۲۰	غلظت ۱/۴۰	غلظت ۱/۸۰	عدد P
۱	پنی سیلین	۱۰ mg	۵	۰.۳	۲۵	۲۵	۳۱	۳۸	۵۲	۰
۲	آمپی سیلین	۱۰ mg	۵	۵.۳	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۲۶	۰
۳	کلرامفنیکل	۳۰ mg	۵	۱.۳	۳۵	۳۸	۳۸	۳۸	۳۷	۰
۴	جتنامایسین	۱۰ mg	۵	۰.۳	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۲۲	۰
۵	نری متوتریم	۵۰ mg	۵	۰.۵	۵۰	۶۳	۶۳	۶۳	۶۳	۰.۰۰۰۰/۰
۶	آموکسی سیلین	۲۵ mg		۰.۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۷	اریترومایسین	۱۵ mg	۱۳	۳.۸	۳۳	۳۸	۳۸	۳۸	۳۸	۰
۸	کلوک سیلین	۵ mg	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۹	نالدیسپیک اسید	۵ mg	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰	استرپتومایسین	۱۰ mg	۵	۳.۰	۲۵	۲۸	۲۸	۲۰	۸۱	۰
۱۱	داکسی سیکلین	۲۵ mg	۵	۵.۳	۳۳	۴۳	۴۳	۰.۵	۵.۵	۰
۱۲	نترومایسین	۳۰ mg	۵	۲.۵	۲۰	۲۱	۲۱	۳۱	۲۱	۰
۱۳	کانامایسین	۳۰ mg	۵	۴.۰	۳۳	۳۰	۳۰	۳۰	۲۶	۰
۱۴	تتراسیکلین	۱۰ mg	۵	۳.۳	۳۴	۳۷	۳۹	۳۹	۵۳	۰

مقاومت بعضی از میکرواورگانیزم‌های پاتوژن انجام شده بود نتایج مثبت بدست آمده بود چون معمولاً لیستریامنوسیتوزن در مقایسه با اکثر باکتریها در مقابل آنتی بیوتیکها بیشتر مقاوم است بنابراین هدف این بود که در مورد این میکرواورگانیزم خطرناک غلظت های مختلف باکتریوسین لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در کاهش مقاوم لیستریامنوسیتوزن در مقابل آنتی بیوتیک ها بررسی شود.

بطور کلی در اینجا سه نتیجه متفاوت بدست آمده است در یک مورد باکتریوسین تأثیر منفی برای بعضی از آنتی بیوتیک ها داشته در موارد بعد هیچگونه تأثیر ی نداشته و در مورد سوم که از خانواده تتراسیکلین بوده نتیجه مثبت و رضایتبخش بود بنابراین اگر توسط محققین دیگر همین آزمایشات بر روی حیوانات آزمایشگاهی بصورت *in vivo* انجام گیرد و نتایج *in vivo* و *in vitro* با هم مطابقت داشته میتواند در مورد همراه بودن مصرف فرآورده های لبنی که معمولاً حاوی باکتریوسین لاکتوباسیلوس بولگاریکوس هستند با آنتی بیوتیک های مختلف در بعضی مورد توصیه و در بعضی موارد که نتایج منفی داشته توصیه حذف مصرف فرآورده های لبنی همزمان با مصرف آنتی بیوتیکها در بیماران آلوده به این باکتری لازم و ضروری می باشد.

و دوع در تأثیر بعضی از آنتی بیوتیکها بر روی لیستریامنوسیتوزن کاهش اثر داشته و بالعکس بر روی بعضی از آنتی بیوتیک ها مثل گروه تتراسیکلین ها موجب افزایش تأثیر آنتی بیوتیک می گردد (جدول ۱). در این بررسی تتراسیکلین و داکسی سیکلین مورد آزمایش قرار گرفت که با افزایش غلظت باکتریوسین در این گروه از آنتی بیوتیک ها این تأثیر بیشتر مشهود بود.

ولی بطور کلی در تحلیل آماری نتایج تأثیر NECF بر روی آنتی بیوتیک های مورد آزمایش بشرح زیر می باشد.

۱- آنتی بیوتیک هایی که تحت تأثیر مایع NECF کاهش اثر داشته اند:

پنی سیلین - آمپی سیلین - کلرامفنیکل - جنتامایسین - اریترومایسین - استرپتومایسین - نئومایسین - کانامایسین

۲- آنتی بیوتیکهایی که تحت تأثیر مایع NECF هیچگونه تغییری در آنها دیده نشده تری متوپریم - آموکسی سیلین - کلوکساسسیلین - نالیدیکزیک اسید

۳- آنتی بیوتیک هایی که در حضور مایع NECF افزایش اثر داشته اند داکسی سیکلین - تتراسیکلین

#### بحث :

با توجه به نتایج بدست آمده همانطوریکه در اهداف طرح منظور شده بود هدف از این کار تأثیر باکتریوسین در تضعیف مقاومت لیستریامنوسیتوزن در مقابل آنتی بیوتیک های مورد استفاده بود در بعضی از تحقیقاتی که اخیراً بر روی تأثیر باکتریوسین جدا شده از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بر روی تضعیف

#### References:

- Farber J M, Petekin P L. Listeria monocytogenes a food borne pathogen. Microbiol. Rev. 1991;55(3):476-511.
- SINHA R P. Antibacterial activity of Lactobacillus bulgaricus isolated from yogourt. Journal of Dairy science 1991;74(supplement.1) 85.
- Fenlon O R. and Wilson T. The incidence of listeria monocytogenes in raw milk from farm bulk tanks in north - east Scotland. J. Appl. Bacteriol. 1989;66:191-196.

4. Sobrino O J Rodriguez J M, Moreita, W L. Fernandez B. Hernandez P E. Antibacterial activity of lactobacillus sake inoculated from dry fermented sausages international Journal of food Microbiology 1991(6) 13 (1): 1-10.
5. Hayes, P.S.Feeley, J.C;Gravaes, L.M.Ajello,G.W. and Fleming, D.W. Isolation of Listeria monocytogenes from raw milk. Appl. Env. Microbiol. 1986; 51(2): 438-440.
6. Varadaraj, M C. Devi, N.Keshava, Nanjrekar, S.P. Antimicrobial activity of neutralized extracellular cultures of lactic acid bacteria isolated from a cultured Indian milk product. International Journal of food Microbiology, 1993 20: 259-267.
7. Bhatia, N.Abraham, P.N.C. Mehita, A.P. Lactobacillus acidophilus inhibits growth of campylobacter pylori Invitro, Journal of Clinical Microbiology, 1989: 2328-2330