Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره ششم، بهار ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی و مقایسه روش های تشخیص لیستریا مونوسیتوژن در نمونه های مواد غذایی آلوده

سعید ذاکربستان آباد*[۱]، یلدا سمسار[۲]، تینا دیداری[۳]

[۱] استادیار، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[۲] رزیدنت دهان و دندان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندانپزشکی، تهران، ایران
[۳] کارشناس میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتریمی با لیستریا منوسیتوژن در زنان حامله می تواند به عوارض مختلف در جنین از جمله سقط منجر شود. گر چه تشخیص لیستریوز می تواند با کشت نمونه و جدا سازی باکتری صورت گیرد ولی به دلیل وقت گیر بودن، راندمان پایین ناشی از تعداد کم باکتری و مشکل در تشخیص افتراقی از سایر باکتری ها در بسیاری از آزمایشگاه ها از این روش به طور معمول استفاده نمی شود و هم چنین روش های ایمونولوژی نیز کمتر اهمیت پیدامی کند، لذا تشخیص مولکولی باکتری در نمونه های بیمار و یا مواد غذایی مشکوک از اختصاصیت بالایی برخوردار است. در این مطالعه روش مولکولی در مقایسه با روش های دیگر در افتراق باکتری بکار رفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۱۵۲ مورد مشکوک به لیستریوز مراجعه کننده به آزمایشگاه مسعود که از مواد غذایی آلوده مصرف کرده بودند نمونه اخذ شد و از نظر آنتی بادی های ضد لیستریا مونوسیتوژن به روش IFA تحت بررسی قرار گرفتند. در ضمن نمونه ها با استفاده ازکشت و روش مولکولی بعد از استخراج DNA با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند که تمام روش های مولکولی مورد استفاده از روش استاندارد بوده است.

یافته ها: از تمام نمونه ها ۴۷٪ (۷۱) آن ها در رقت ۱/۱۰۰ و ۱/۴۰۰ در روش ایمونولوژی مثبت گزارش شد. در روش کشت باکتری ۴۱ مورد مثبت شدند ولیکن در روش مولکولی از کل نمونه های مشکوک به تعداد ۵۳ مورد مثبت گزارش گردید.

نتیجه گیری: با توجه به افزایش آمار بیماری زایی لیستریا و هم چنین در ارتباط بودن عفونت با سقط جنین، اهمیت بررسی آلودگی در منابع غذایی توسط باکتری اهمیت بالایی داشته و اخیرا اغلب پزشکان غربالگری زنان باردار را از نظر آلودگی به لیستریا توصیه می نمایند. بر اساس برآورد های WHO استفاده از روش آنتی سرم قابل اطمینان نبوده و روش کشت و مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است، بالاخص در خصوص غربالگری زنان باردار روش مولکولی از اختصاصیت بالایی برخوردار می باشد.

کلمات کلیدی: لیستریا منوسیتوژن، مواد غذایی آلوده

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژن از باکتری های گرم مثبت، بدون کپسول واسپور، فلاژل دار و بی هوازی اختیاری است که می تواند در درون سلول و خارج سلول رشد و تکثیر نماید و انگل اختیاری درون سلولی می باشد (۱ ، ۲، ۳). این میکرو ارگانیسم از طریق مواد غذایی آلوده از قبیل: پنیر، کره، شیر پاستوریزه شده، گوشت و فراورده های آن، سبزیجات خام، غذاهای دریایی، خاک، بقایای گیاهی در حال فساد، لاشه حیوانات سلاخی شده و ناقلین بدون علامت به انسان انتقال می ابد (۴، ۵، ۶). لیستریا مونوسیتوژن در گونه های متعددی از پستانداران، پرندگان، ماهی ها، دوزیستان و حشرات وجود دارد ولیکن ترجیحا به عنوان یک ارگانیسم ساپروفیت در خاک رشد و تکثیر می یابد. درجه حرارت اپتیمم رشد برای این باکتری حدود ۳۷ درجه

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
E-mail:Saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

می باشد اما رشد آهسته ای در ۴ درجه سانتی گراد دارد که این ویژگی اساس روش غنی سازی در سرما را تشکیل می دهد (۲، ۷، ۸، ۹). مواردی از شیوع بیماری لیستریوز انسانی ناشی از آلودگی مواد غذایی مانند گوشت یا فراورده های لبنی و هم چنین غذاهای فرآیند شده که بدون حرارت کافی یا بدون پاستوریزه شده مصرف شده اند، گزارش شده است که امکان رشد و تکثیر این باکتری در حرارت یخچال را دارد. این باکتری از معدود میکرو ارگانیسم هایی است که می تواند از جفت عبور نماید و آثار سوء از قبیل سقط جنین، تولد زودرس و هم چنین تولد نوزاد با عفونت های سیستمی را ایجاد نماید که از این نظر در جوامع انسانی مورد اهمیت قرار دارد و تشخیص آن برای متخصصین از اهمیت بالایی برخوردار است (۹، ۱۰). لیستریا از غشای مخاطی عبور کرده و سپس به توسط سلول های بیگانه خوار، فاگوسیتوز می گردد و در درون فاگولیزوزوم ها وارد می گردد. این باکتری، پروتئینی در سطح دیواره سلولی خود به نام اینترنالین دارد که با گیرنده ای در سطح اپی تلیال روده به نام ای کاردین واکنش نموده و به این صورت باکتری به درون سلول های اپی تلیال وارد میشود. بعد از مدتی غشای فاگولیزوزوم ها را پاره کرده و وارد سیتوپلاسم می گردد و در سیتوپلاسم تکثیر نموده و از طریق غشای سیتوپلاسمی در سلول های مجاور نفوذ می کند (۱، ۵، ۹، ۱۰). علائم کلینیکی لیستریوز تهاجمی بوده و به صورت سقط جنین، عفونت خونی و مننژوانسفالیت بروز می کند. لیستریا مونوسیتوژن از طریق مجاری گوارشی و بعد از خوردن غذاهای آلوده به بدن وارد می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی وضعیت غذاهای آلوده مورد مصرف افراد در مناطق های مختلف شهر تهران بوده و مقایسه ای بین روش های تشخیصی این باکتری صورت می گیرد.

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی، نمونه ها از مراجعه کنندگان به آزمایشگاه که از مواد غذایی استفاده نموده و مشکوک به آلودگی با لیستریا بودند، جمع آوری گردید. برای انجام آزمایش از نمونه خون مورد نظر بیماران بعد از جدا نمودن سرم از روش IFA ایمونولوژی (که از آنتی بادی های ضد لیستریولیزین – O استفاده گردید) با رقت های ۱/۱۰۰ و ۱/۴۰۰ انجام گردید.

در ضمن از نمونه مورد نظر در محیط کشت غنی شده لیستریا که به صورت مایع است وارد گردید و برای بررسی از روش غنی سازی در سرما (Cold enrichment) استفاده گردید. در این روش، بطری های محیط کشت در یخچال نگهداری می شوند تا این که از رشد بقیه ی ارگانیسم های فلور طبیعی جلوگیری شود و فقط باکتری لیستریا رشد نموده و تعداد آن در نمونه بیمار افزایش یابد. لیستریا مونوسیتوژن در محیط غنی شده (Listeria enrichment broth) شرایط مناسبی را بدست آورده و تعداد آن افزایش می یابد. نمونه ها در بطری حاوی محیط به مدت یک هفته در دمای یخچال قرار گرفتند و سپس از روی این بطری ها، کشت مجدد بروی محیط آگار مک براید (Mc bride) یا آگار غنی کننده لیستریا انتقال یافت و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

استخراج DNA – واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

برای استخراج DNA از روش آب مقطر دو بار دی یونیزه شده و حرارت ۹۰ درجه استفاده گردید که نمونه را سانتریوفوژ نموده و به همراه آب دوبار دی یونیزه شده در حرارت مرطوب ۹۰ درجه به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده و بعد از سانتریوفوژ مجدد DNA جدا می شود. برای انجام PCR یا تکثیر زنجیره اسید نوکلئوئیک از پرایمر استاندارد مطابق جدول ۱استفاده گردید و حجم نهایی واکنش برای انجام واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که ازکیت کیاژن (Qiagen) استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR شامل: ۳/۵ mM، Mgcl۲، ۱۵۰µm دزکسی نوکلئوتید تری فسفات یا dNTP، ۲۵pmol از پرایمر Forward- Reverse و Taq polymerase U۱ بود که در برنامه زمانی ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۵۰ سیکل متوالی – ۹۵ درجه در ۱۵ ثانیه، ۶۱ درجه در ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه در ۳۰ ثانیه انجام گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت. جهت آشکارسازی قطعه تکثیر یافته از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۸٪ استفاده شد. لازم بذکر است که از مواد غذایی آلوده و آلوده نشده علاوه بر کنترل مثبت و منفی در انجام تست ها استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- توالی پرایمرهای اولیگونوکلئیوتیدی مورد استفاده در مطالعه

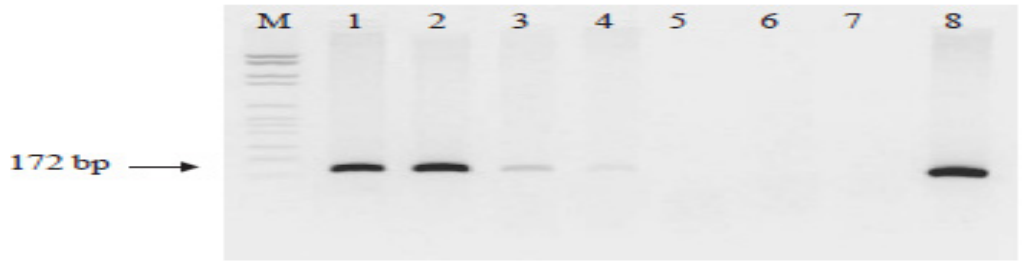
Primer	Orientation	Sequence (5′→3′)	G+C content (%)	Length	T_m	Location within gene (bp)[a]
LL7	Forward	TTG CCA GGA ATG ACT AAT CAA G	40.9	22	62.8	472–493
LL8	Reverse	ATT CAC TGT AAG CCA TTT CGT C	40.9	22	61.8	622–643
LM1[b]	Forward	CCT AAG ACG CCA ATC GAA	50	18	61.3	145–162
LM2[b]	Reverse	AAG CGC TTG CAA CTG CTC	55.5	18	64.5	829–846

[a] From published *hlyA* gene cds for listeriolysin O (GenBank accession no. AF253320).
[b] Herman et al. (1995).

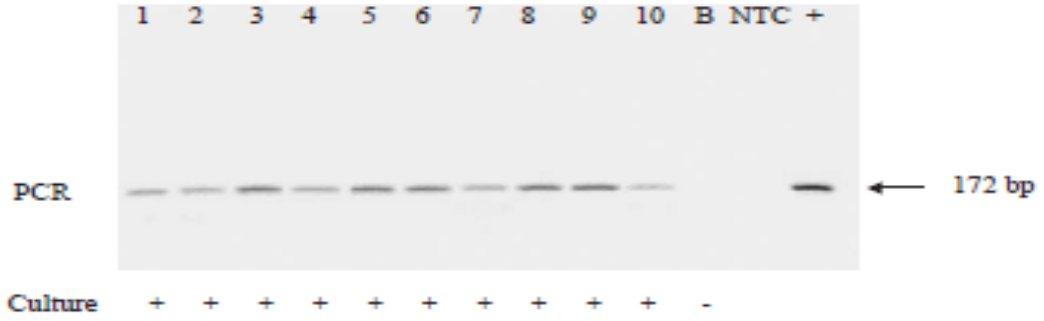
یافته ها

در این مطالعه، ۱۵۲ مورد مشکوک به لیستریوز مراجعه کننده به آزمایشگاه مسعود که از مواد غذایی آلوده مصرف کرده بودند نمونه اخذ شد. در تست ایمونو فلورسانس غیر مستقیم، تیتر سرمی بیماران از نظر آنتی بادی ضد لیستریا در رقت ۱/۱۰۰ و ۱/۴۰۰ بدست آمد. تیتر های سرمی ۱/۴۰۰ و ۱/۱۰۰ به عنوان تیتر سرمی مثبت در نظر گرفته شدند و تیتر های دیگر به عنوان منفی گزارش شدند. از تمام نمونه ها ۴۷٪ (۷۱) نفر در رقت ۱۰۰/ ۱ و ۴۰۰/ ۱در روش ایمونولوژی، مثبت گزارش شد.

در مجموع در روش کشت که ۴۱ مورد مثبت گزارش شد و نتیجه آن ها با تست های بیوشیمایی مختص لیستریا مونوسیتوژن تایید گردید که ۶ مورد اختلاف بین روش ایمونوفلورسانس و کشت بدست آمد. از تمام نمونه ها که جداسازی DNA صورت گرفت، تعداد ۱۴۹ مورد در روش مولکولی PCR مورد بهره برداری قرار گرفت که در این روش تعداد ۵۳ مورد مثبت بدست آمد که اندازه قطعه مورد مطالعه که به عنوان مثبت تلقی گردید ۱۷۲bp بود (شکل ۱، ۲).



شکل ۱- شماره ۲-۱ موارد مثبت، شماره ۳ و۴ مواد غذایی آلوده شده، ۵ موارد منفی، شماره ۶ ماده غذایی سالم، شماره ۷ کنترل منفی و شماره ۸ کنترل مثبت می باشد.



شکل ۲- شماره های ۱۰-۱ موارد مثبت می باشد، B مورد ماده غذایی سالم، NTC کنترل منفی و + به عنوان کنترل مثبت می باشد که در زیر شکل مواردی کشت مثبت یا منفی بوده برای مقایسه قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

جداسازی و شناسایی لیستریا مونوسیتوژن معمولا کاری دشوار بوده و به زمان زیادی نیاز دارد. در این مطالعه سعی بر آن شد تا علاوه بر مقایسه روش های مختلف شناسایی، بتوان به آماری در آلودگی مواد غذایی به این باکتری رسید. در استرالیا بعد از اضافه کردن نمونه به محیط غنی کننده، محیط کشت را در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری نموده و از دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچالی نیز استفاده شده است (۲، ۷). در ضمن به محیط کشت غنی کننده، آنتی بیوتیک و مواد باکتری و استاتیک مانند اسید نالیدیکسیک، سیکلوهگزامید و آکریفلاوین هیدروکلراید اضافه نموده تا از رشد باکتری ها و قارچ های مزاحم جلوگیری به عمل آید، در حالی که در این روش فقط از سرما در مدت زمان بیشتر برای احیای رشد لیستریا استفاده گردید. اردوگان و همکارانش، غنی سازی در سرما را برای جداسازی توصیه نمودند که با نتایج ما نیز هماهنگی داشت. به دلیل اهمیت این باکتری در بهداشت مواد غذایی و نیز سلامت عمومی افراد جامعه، بررسی های گوناگونی در بسیاری از کشورها و از جمله کشور ما نیز شده که در این تحقیق در میدان کوچک تر شهر تهران بررسی شد. در برزیل از ۱۰۳ نمونه پنیر، ۱۱ نمونه با لیستریا آلوده بود (۶). در کشور ما از میان ۲۸ نمونه سوسیس و کالباس، ۳ نمونه و از ۲۲ نمونه لبنیات ۳ نمونه دارای آلودگی بودند که در نتایج ما از موارد ۵۳ مورد مثبت تعداد ۵ نمونه به علت استفاده از مواد غذایی آلوده بود (۲).

ار آنجا که شیوع لیستریوز می تواند ناخوشایند و جبران ناپذیر در سالمندان، افراد مبتلا به نقص ایمنی و زنان باردار به بار می آورد، لازم است که از روش های دقیق جهت دستیابی و گزارش صحیح استفاده نمود. از طرفی، یکی از علل شیوع لیستریوز در جوامع و کشور ما، پنیرهای آلوده و سنتی و نیز غذاهای آماده می باشد. ضروری است که مسئولین امر در تولید مواد غذایی و پخش فراورده های غذایی حتی الامکان از مصرف مواد آلوده و سنتی در تولیدات پرهیز نموده و در مراکز عرضه مواد غذایی رعایت موارد بهداشتی کنترل گردد. نتایج تحقیق حاضر مبین این موضوع شد که علاوه بر روش های ایمونولوژی و میکروبی (کشت) در موارد های خاص، خصوصا در موارد بیماری های سالمندان مشکوک به لیستریوز که تشخیص مشکل است و نیز در مواردی که در زنان باردار سقط های مکرر گزارش می گردد به عنوان یک روش دقیق در پانل تشخیصی از روش مولکولی PCR استفاده نمود. در ضمن در کنترل و بازرسی فروشگاه های عرضه مواد غذایی در مناطق شلوغ شهر می بایست با توجه به اهمیت موضوع و نیز بدست نیاوردن باکتری در روش های ایمونولوژی (در سرم فرد مشکوک) و میکروبی به علت های مختلف از قبیل تعداد کم باکتری و خطای آزمایشگاهی و پرسنلی از روش مولکولی بهره برد.

تشکر و قدر دانی

در این تحقیق از همکاران بخش میکروب شناسی آزمایشگاه مسعود که صمیمانه در انجام کار همکاری نمودند کمال تشکر را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(۱)- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران:استاندارد روش جستجو و شناسایی لیستریا مونوسیتوژن در شیر و فراورده های ان . سال ۱۳۷۷، استاندارد شماره ۴۵۲۴. صفحه۲۸-۱.

(۲)- نوروزی ج، جعفری نژاد ع، شهیدی س . تعیین میزان فراوانی لیستریامونوسیتوژن در فراورده های لبنی و گوشتی و مشاهده پلاسمید ان ها توسط الکتروفورز. خلاصه مقالات چهارمین کنگره میکروب شناسی (با گرایش باکتری شناسی). ۱۳۸۰، صفحه ۱۳۹.

(3)- Anonymous: Outbreak of Iisterosis Associated with Home Made Mexican-Style Cheese in North Caroline. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2000; 6:50(26):560-2.

(4)- Australian /New Zealad Standard: Examination for Specific Organisms, Listeria monocytogenes in Dairy Products. Food Microbiol Method, 1998; 2(15):1-10.

(5)- Carroll SA, Carrol LE, Mallinson ET, L amichanne C, Rice BE, Rollins DM, Joseph SW: Development and evaluation of a 24 Hour Method for the Detection and Quantification of Listeria monocytogenes in Meat Products .J Food Prot, 2000; 63(3):347-53.

(6)- Da Silva MC, Hofer E, Tibana A: Incidence of L. monocytogenes in Cheese Produced in Rio de Janeiro Brazil. J Food Prot, 1998; 61(3):354-6.

(7)- Erdogan HM, Cripps PJ, Morgan KL: Optimization of a Culture Technique for the Isolation of Listeria monocytogenes from Faecal Samples. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002; 49(10):502-6.

(8)- Goldberg M: Actin-Based Motility of Intracell- Uiar Microbial Pathogens. Microbiol Mo Biolo Rev, 2001; 65(4):595-626.

(9)- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA :Medical Microbiology; 22ed; Appleton and Lang. 2001.

(10)-Larson AE, Johnson EA, Nelson JH:Survival of Listeria Monocytogenes in Commercial Cheese Brines. J Dairy Sci, 1999; 82:1860-8.

www.SID.ir