Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جلد دوم،شماره دوم، بهار ۱۳۸۲

جداسازی لیستریا مونوسیتوژن از پنیر با استفاده از روش غنی سازی در سرما و مشاهده باکتری در کشت سلولی هلا

جمیله نوروزی*[۱]، جلیل وندیوسفی[۲]، روحانی کارگرمؤخر[۳]، محمد احمدی جبلی[٤]

خلاصه

سابقه و هدف: لیستریا مونوسیتوژن از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزیجات خام، سالاد آماده فروش و غیره به انسان انتقال می یابد. این باکتری قادر به رشد در خارج و در درون سلول می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارائه روشی ساده و قابل اجرا جهت جداسازی این باکتری از پنیر و مشاهده آن در کشت سلولی هلا در زیر میکروسکوپ نوری بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه‌ای از پنیر تازه محلی در محیط کشت انتخابی غنی کننده همراه با عصاره مخمر کشت داده شد. پس از یک هفته نگهداری در یخچال (۴° C) و رقیق کردن آن با هیدروکسید پتاسیم، در محیط کشت انتخابی پالکام و لیستریا کشت داده شد. بعد از پیدایش کلنی ها، آزمایش های مختلف برای اثبات لیستریا مونوسیتوژن انجام گرفت و سپس، به کشت سلولی هلا وارد گردید و در فواصل زمانی مختلف (پس از ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) به روش گیمسا، رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده و عکسبرداری شد.

یافته‌ها: این بررسی نشان داد که ۹٪ از پنیرهای تازه محلی با لیستریا مونوسیتوژن آلوده بودند. عکس‌های گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که این باکتری در رقت‌های بیش از ۵×۱۰^{۵} بعد از ۲۴ ساعت قادر است به درون سلول هلا وارد شده و بعد از ۴۸ ساعت، سلول را متلاشی سازد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که لیستریا مونوسیتوژن در برخی از پنیرهای آلوده محلی وجود دارد. آلودگی فرآورده های لبنی با لیستریا مونوسیتوژن می‌تواند در طی فرآیندهای تولید، حمل و نقل و توزیع رخ دهد. لذا ضروری است به علت گستردگی مصرف اینگونه فرآورده‌ها در کشور، توجه خاصی بر نحوه تولید و توزیع آنها مبذول گردد تا از شیوع لیستریوز در افراد مستعد جلوگیری گردد.

واژه‌های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژن، پنیر، زندگی درون سلولی، کشت سلولی هلا

۱*- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران (نویسنده مسئول)
۲- موسسه حصارک رازی(بخش میکروبیولوژی)
۳- موسسه حصارک رازی(بخش ویروس‌شناسی)
۴- کارشناس ارشد دانشگاه علوم پزشکی ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژن، باکتری گرم مثبت، بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری است که به صورت خارج سلولی و درون سلولی قادر به رشد و تکثیر می‌باشد. این باکتری از طریق غذاهای آلوده مانند کره [۱۱]، پنیر [۱۰]، شیر پاستوریزه شده [۱۳،۱۵]، سبزیجات خام [۱۳]، گوشت و فرآورده‌های آن [۵] و غذاهای دریایی [۱۷]، به انسان انتقال می‌یابد. چندین مورد شیوع از بیماری لیستریوز انسانی ناشی از آلودگی مواد غذایی مانند گوشت یا فرآورده‌های لبنی و سایر غذاهای فرآیند شده که بدون حرارت کافی یا بدون پاستوریزه شدن مصرف شده‌اند، گزارش شده است که توانایی رشد و تکثیر این باکتری را در حرارت یخچال نشان می‌دهد. لیستریا مونوسیتوژن، یکی از معدود باکتری‌هایی است که می‌تواند از جفت عبور کند. در زنان باردار مبتلا به لیستریوز، این باکتری می‌تواند جنین را آلوده کرده و در نتیجه منجر به سقط جنین، زایمان قبل از موعد یا زایمان نوزاد زنده اما با عفونت سیستمی با این باکتری شود [۹]. علایم کلینیکی لیستریوز تهاجمی معمولاً شدید بوده و به صورت سقط جنین، عفونت خونی[1] و مننژوانسفالیت بروز می‌کند [۱۶].

اردوگان[2] و همکارانش، جداسازی لیستریا مونوسیتوژن را از نمونه‌های مدفوعی با استفاده از غنی سازی در سرما (۴ ^{o}C) به مدت ۱۴ هفته و کشت بر روی محیط انتخابی غنی و قرار دادن در ۳۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند، هنگامی که نمونه مورد بررسی در یخچال در سرم فیزیولوژی فاقد محیط کشت، نگهداری می‌شود در ۹۴٪ موارد، لیستریا مونوسیتوژن در هفته سوم ایزوله می‌گردد. چنانچه، محیط انتخابی آگار با روش غنی‌سازی در سرما همراه شود، در ۱۰۰٪ موارد می‌توان این باکتری را در هفته اول بدست آورد [۷].

لیستریا مونوسیتوژن از طریق مجرای گوارشی بعد از خوردن غذاهای آلوده مانند پنیر به بدن وارد می‌شود. این باکتری، پروتئینی در سطح دیواره سلولی خود به نام اینترنالین[3] دارد که با گیرنده‌ای در سطح اپی تلیال روده به نام ایی‌کاردرین[4] واکنش نموده و بدین ترتیب، باکتری به درون سلول‌های اپی تلیال وارد می‌شود [۸،۱۳].

هدف از این مطالعه، ارائه روشی ساده و قابل اجرا با توجه به امکانات کشور (استفاده از مواد کمتر) جهت جداسازی لیستریا مونوسیتوژن از پنیر تازه محلی و مشاهده آن در درون کشت سلولی هلا توسط میکروسکوپ نوری بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، نمونه برداری از پنیرهای تازه محلی انجام شد. برای انجام آزمایش، ۲۵ گرم از نمونه پنیر محلی به ۲۲۵ میلی لیتر محیط (Trypton Soya Yeast Extract) TSYEکه قبلاً تا ۳۷ درجه سانتیگرادگرم شده بود منتقل گردید. سپس، نمونه را با هم‌زدن مخلوط کرده، به طوری که اجزای آن پراکنده گردید. بعد، در محیط آماده شده به مدت یک تا سه هفته در دمای چهار درجه سانتیگراد یخچال قرار داده شد. بعد از یک هفته و سپس هر دو روز یکبار از محیط فوق نمونه برداشته شد و پس از تهیه رقت ۱۰/۱ با استفاده از محلول ۰/۵ در صد هیدروکسید پتاسیم در روی محیط‌های پالکام و لیستریا سلکتیو آگار[5] کشت داده، یک پلیت از هر کدام در ۳۷ درجه سانتیگراد و یک پلیت در دمای چهار درجه سانتیگراد یخچال قرار داده شد. پلیت‌های موجود در ۳۷ درجه سانتیگراد، بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت و پلیت‌های موجود در یخچال، بعد از یک هفته و سپس دو هفته، مورد بررسی قرار گرفتند.

از پلیت‌هایی که رشد در آنها صورت گرفته بود، پنج کلنی مشخص برداشته و بعد از رنگ‌آمیزی گرم، روی محیط‌های TSYE آگار و بلاد اگار منتقل شد و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد مورد شناسایی قرار گرفت. کلنی‌های ظاهر شده جهت آزمایش‌های حرکت (+)، کاتالاز (+)، همولیزبتا در محیط بلادآگار (+)و تست‌های بیوشیمیایی شامل MRVP (A/A)TSI (+)، استفاده از اسکولین (+)، گلوکز (+)، مالتوز (+)، مانیتول (+)، گزیلوز (-)، رامنوز (+) مورد بررسی قرار گرفت.

1- sepsis
2- Erdogan
3- internalin
4- E cadherin
5- Listeria Selective agar, Palcam

www.SID.ir

Archive of SID

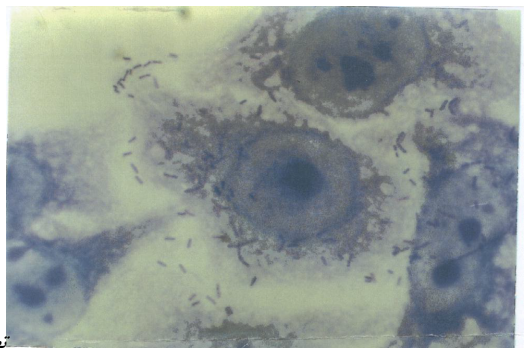
برای مشاهده باکتری در درون سلول، ابتدا سلول‌های هلا (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج) که قبلاً منجمد شده بود، از ازت مایع خارج شده و به منظور مجزا شدن سلول‌ها از یکدیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس لوله‌های کوچک حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از این‌که سلول‌ها ته‌نشین شدند، مایع سطحی شامل DMSO (دی متیل سولفوکساید) و سرم خارج گردید. سلول‌ها در داخل محیط (Dulloecco DMEM's Modified Eagle's Medium) که شامل ده درصد سرم جنین گاو بود، شناور گشته و به داخل فلاسک‌های کشت سلولی انتقال داده شد. فلاسک‌ها در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۷ تا ۱۰ روز که مدت لازم برای تشکیل یک لایه سلولی[1] در سطح فلاسک بود، از گرم‌خانه خارج نموده و مایع روی سلول‌ها خارج شد. با استفاده از پی‌پت‌استریل، یک میلی‌لیتر تریپسین به سلول‌ها اضافه شد و پس از گذشت یک دقیقه، تریپسین از محیط خارج گردید. سپس، سلول‌ها در ۲۰ میلی لیتر DMEM شناور گردید و حدود دو میلی لیتر از این محیط به داخل lighten tube های حامل لامل (cover slip) منتقل شد. در مدت ۳ روز، یک لایه سلولی روی لامل‌ها تشکیل شد که در این حالت، سلول آماده تلقیح باکتری گردید [۱۴]. با استفاده از استاندارد مک فارلند [2]رقت‌های مختلفی از باکتری لیستریا مونوسیتوژن جدا شده از پنیر محلی در محیط نوترینت براث تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های فوق به lighten tube ها منتقل گردید و دو لوله نیز به عنوان شاهد، بدون اضافه کردن باکتری در نظر گرفته شد. Lighten tube های حاوی لامل، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید و پس از گذشت ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت، یک نمونه از هر لوله برداشته و با فیکساتور کارنوی به مدت نیم ساعت تثبیت شدند. سپس کارنوی خالی گردید و بافر نمکی فسفات (PBS) به آن اضافه شد. پس از این مرحله لام‌ها برای رنگ‌آمیزی به روش گیمسا آماده شدند. لام‌های تهیه شده با میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 مشاهده و عکسبرداری شد [۱۴].

1- monolayer
2- Mc Farland

نتایج

در این روش، لیستریا مونوسیتوژن بدون استفاده از محیط‌هایی مانند آکسفورد آگار، اسید نالیدیکسیک، سایکلوهگزامید و آکریفلاوین بدست آمد. پس از پیدایش کلنی‌های مشکوک و انجام تست قندها و سایر آزمایش‌های بیوشیمیایی، باکتری‌ها براساس استاندارد استرالیا – نیوزیلند [۴]، شناسایی شدند. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری لیستریا مونوسیتوژن در ۹٪ از نمونه‌های پنیر تازه محلی وجود داشته است.

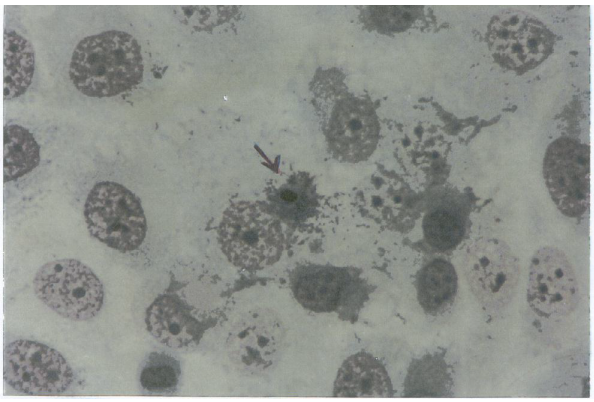
انجام کشت سلولی لیستریا مونوسیتوژن در بخش ویروس‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی حصارک رازی انجام گرفت. در این تحقیق، رقت‌های مختلفی از باکتری لیستریا مونوسیتوژن به درون کشت سلولی هلا تلقیح شد. استفاده از کشت سلولی به منظور نشان دادن توانایی ورود این باکتری به درون سلول بوده است. بررسی عکسهای گرفته شده نشان داد که این باکتری در رقت‌های بیش از $۵ ۱۰^{۵}\times$ موفق شده بود که به درون سلول‌های هلا وارد گردد. همانطور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، مقدار فراوانی از باکتریها در اطراف و تعداد کمی از باکتریها در درون سلول مشاهده می‌شوند. این تصویر بخوبی نشان می‌دهد که لیستریا مونوسیتوژن بعد از ۱۲ ساعت وارد سلول شده و قادر به رشد و تکثیر در درون سلول بوده که بعد از ۴۸ ساعت (در تصویر شماره ۲)، بالاخره موجب متلاشی شدن و مرگ سلول می‌شود.



تصویر ۱: ۱۲ ساعت پس از تلقیح باکتری ها به کشت سلولی،تعداد فراوانی از باکتری ها در اطراف و تعداد کمی از آنها در درون سلول مشاهده می شوند.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲: ۱۴ ساعت بعد از تلقیح باکتری ها به کشت سلولی، سلول آلوده به علت رشد و تکثیر باکتری ها متلاشی شده است.

بحث

جداسازی لیستریا مونوسیتوژن معمولاً کاری دشوار بوده و به زمان طولانی نیاز دارد. در این بررسی، سعی برآن بوده که با تلفیق کارهای انجام شده توسط پژوهشگران مختلف، ساده‌ترین راه برای جداسازی این باکتری با توجه به امکانات موجود بدست آید. روش پایه برای انجام این پژوهش، استاندارد استرالیا – نیوزیلند ۱۹۹۸ [۴] و نیز استاندارد شماره ۴۵۲۴ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران [۱] بود. در استاندارد استرالیا – نیوزیلند بعد از اضافه کردن نمونه به محیط غنی‌کننده، محیط کشت را در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری نموده و از دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال استفاده ننموده است. در ضمن به محیط کشت غنی‌کننده، آنتی‌بیوتیک و مواد باکتریواستاتیک مانند اسید نالیدیکسیک، سایکلوهگزامید و آکریفلاوین هیدروکلراید اضافه نموده تا از رشد باکتری ها و قارچ‌های مزاحم جلوگیری به عمل آید، در حالی که در این روش بجای استفاده از آنتی‌بیوتیک و مواد باکتریواستاتیک، از دمای یخچال (غنی سازی در سرما) استفاده شد. اردوگان و همکارانش، غنی‌سازی در سرما را برای جداسازی این باکتری توصیه می‌کنند [۷]، که با نتایج ما نیز همآهنگ می‌باشد.

به دلیل اهمیت لیستریا مونوسیتوژن در بهداشت مواد غذایی و نیز سلامت عمومی افراد جامعه، بررسی‌های گوناگونی در بسیاری از کشورها و از جمله کشور ما بر روی این باکتری انجام شده است. برای مثال، در سال ۲۰۰۱ در کارولینای شمالی، ۳ مورد لیستریوز در طی ۲ هفته مشاهده شد که عامل آن، پنیرهای خامه‌ای نرم بود که به صورت خانگی تهیه شده بودند [۳]. در برزیل، از ۱۰۳ نمونه پنیر، ۱۱ نمونه (۱۰/۶٪) با لیستریا مونوسیتوژن آلوده بودند [۶]. در کشور ما، از میان ۲۸ نمونه سوسیس و کالباس، ۳ نمونه (۱۰/۷۱٪) و از ۲۲ نمونه لبنیات، ۳ نمونه (۹/۰۹٪) دارای آلودگی با لیستریا مونوسیتوژن بودند [۲] که با نتایج این بررسی (۹٪) تا حدودی مطابقت دارد.

از آنجا که، شیوع لیستریوز می‌تواند عوارض ناخوشایند و جبران ناپذیری را در سالمندان، افراد مبتلا به نقص ایمنی و زنان باردار ببار آورد، لذا استفاده از روش‌های دقیق و مطمئن، جهت دستیابی و شناسایی این باکتری در مراکز بهداشتی درمانی ضرورت می‌یابد. از طرفی، یکی از علل شیوع لیستریوز غذایی در جوامع مختلف و از جمله کشور ما، پنیرهای آلوده بویژه پنیرهای نرم بوده است و با توجه به مصرف نسبتا بالای انواع پنیرهای سنتی در کشور ما، ضروری است که توجه خاصی از طرف مسئولین امر به تولید و پخش این فرآورده، چه توسط تولیدکنندگان کوچک سنتی و چه کارخانجات مبذول گردد و تا آنجا که ممکن است از مصرف فرآورده‌های لبنیاتی که به صورت سنتی و غیربهداشتی عرضه می‌گردد پرهیز شود.

با توجه به اینکه لیستریا مونوسیتوژن، خارج از سلول و روی محیط‌های کشت سنتزی قادر به رشد و تکثیر است و با تست آنتی بیوگرام، امکان تعیین داروی مناسب برای مبارزه با این باکتری وجود دارد، با این همه، عود مجدد عفونت با لیستریا (۳۰٪)، مدرکی است دال بر اینکه، این باکتری، درون سلولی بوده و مصرف آنتی بیوتیک‌ها، تنها قادر است باکتری‌های خارج سلولی را از بین ببرد، اما باکتری‌های درون سلولی از اثر کشندگی آنتی بیوتیک‌ها در امان می‌مانند [۱۲].

نتایج این مطالعه نشان داد که لیستریا مونوسیتوژن بخوبی وارد سلول میزبان شده و سلول را متلاشی می‌کند. با توجه به رقت‌های مشخص شده (بیش از ۵×۱۰^{۵}) و فواصل زمانی نشان داده شده (۱۲ تا ۴۸ ساعت) در این بررسی، که باکتری وارد سلول شده و موجب مرگ سلول می‌شود، می توان در تحقیقات آینده در طرح ساختن واکسن مورد توجه قرار داد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[۱] موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران: استاندارد روش جستجو و شناسایی لیستریا مونوسیتوژن در شیر و فرآورده‌های آن، سال ۱۳۷۷، استاندارد شماره ۴۵۲۴. صفحه ۲۸-۱.

[۲] نوروزی ج، جعفری نژاد ع، شهیدی س: تعیین میزان فراوانی لیستریامونوسیتوژن در فرآورده‌های لبنی و گوشتی و مشاهده پلاسمید آنها توسط الکتروفورز. خلاصه مقالات چهارمین کنگره میکروب شناسی (با گرایش باکتری شناسی). ۱۷-۱۵ آبان ۱۳۸۰، صفحه ۱۳۹.

[3] Anonymous: Outbreak of listerosis associated with home made Mexican – style cheese in north Caroline, *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2000;. 6; 50(26): 560-2.

[4] Australian/New Zealand Standard: Examinati_ on for specific organisms, Listeria monocytog_ enes in dairy products. Food. *Microbiol. Method* 2.15: 1-10 1998.

[5] Carroll SA, Carrol LE, Mallinson ET, Lamichanne 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 Dec; 49(10): 502-6.

[8] Goldberg M: Actin–based motility of intracell_ ular microbial pathogens, *Microbiol mo biolo rev*. 2001; 65(4): 595-626.

[9] Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA: Medical Microbiology; 22nd ed; 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.

[11] Lyytikainen O, Autio T, Maijala R, Ruutu P, Honkanen-Buzalski T, Miettinen M, M, et. Al: Siitonen A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J. Infect. Dis*. 2000, 181(5): 1838-41.

[12] Moulder JW: Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev*. 1985; (3) 49: 2998-337

[13] Ryser ET, Marth HM: Listeria, Listeriosis and food safety. 2 nd ed. Newyork. Mercel Dekker. 1999.

[14] Takano A, Adachi H, Mizuno M, Kawamura K, Sobue G Direct staining of blood culture sample enabled the early diagnosis of brain abscess due to Listeria monocytogenes. *Rinsho-Shinkeigaku*. 1999; 39(11): 1164-7.

[15] Teo AYL, Knabel SL Development of a simple recovery enrichment system for enhanced detection of heat injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J Food Protec*. 2000; 63(4).462-720.

[16] Vazques- Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G: Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clin Microbiol rev*. 2001;.14(3). 584-640.

[17] Weagant SD, Sado PN, Colburn KG, Torkleson JD, Stanley FA The incidence of Listeria species in frozen seafood products. *J Food Protect*. 1988; 51: 655-7.

www.SID.ir