

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

جمیله نوری*^۱، جلیل وندیوسفی^۲، روحانی کارگرمؤخر^۳، محمد احمدی جلی^۴

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 می باشد. 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 روش ها: در این مطالعه تجربی، نمونه ای از پنیر تازه محلی در محیط کشت انتخابی غنی کننده همراه با عصاره مخمر کشت داده شد. پس از یک هفته نگهداری در یخچال (C 4^o) 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.

یافته ها: این بررسی نشان داد که ۹٪ از پنیرهای تازه محلی با لیستریا مونوسیتوژن آلوده بودند. عکس های گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که این باکتری در رقت های بیش از $10^5 \times 5$ بعد از ۲۴ ساعت قادر است به درون سلول هلا وارد شده و بعد از ۴۸ ساعت، سلول را متلاشی سازد.

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

واژه های 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 ویروس شناسی)

۴ - کارشناس ارشد دانشگاه علوم پزشکی ایران

مقدمه

لیستریا مونوسیتوزن، 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 مونوسیتوزن، 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]. علائم کلینیکی لیستریوز تهاجمی معمولاً شدید بوده و به صورت سقط جنین، عفونت خونی^۱ و مننژوانسفالیت بروز می‌کند [۱۶].

اردوگان^۲ و همکارانش، جداسازی لیستریا مونوسیتوزن را از نمونه‌های مدفوعی با استفاده از غنی سازی در سرما (۴ °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 مونوسیتوزن 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 مونوسیتوزن 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^۳ دارد که با گیرنده‌ای در سطح اپی تلیال روده به نام

اپی‌کاردین^۴ 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 مونوسیتوزن 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) TSYE که قبلاً تا ۳۷ درجه سانتیگراد گرم 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 ۱/۱۰ با استفاده از محلول ۰/۵ در صد هیدروکسید پتاسیم در روی محیط‌های پالکام و لیستریا سلکتیو آگار^۵ 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 آگار منتقل شد و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد مورد شناسایی قرار گرفت. کلنی‌های ظاهر شده جهت آزمایش‌های حرکت (+)، کاتالاز (+)، همولیزیتا در محیط بلاد آگار (+) 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

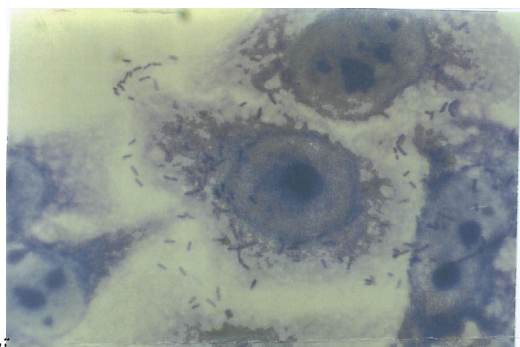
4- E cadherin
5- Listeria Selective agar, Palcam

میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 مشاهده و عکسبرداری شد [۱۴].

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 واکنس 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 $10^5 \times 5$ 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.

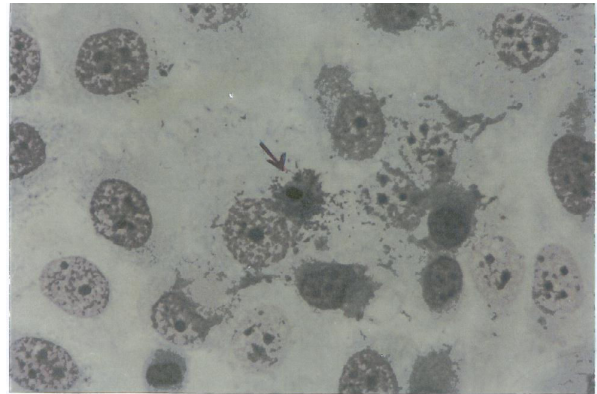


ویر ۱: ۱۲ ساعت پس از تلقیح باکتری‌ها به کشت سلولی، تعداد فراوانی از

برای مشاهده باکتری در درون سلول، ابتدا سلول‌های هلا (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکنس 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 سانتریفیوژ گردید. بعد از این که سلول‌ها ته‌نشین شدند، مایع سطحی شامل DMSO (دی متیل سولفوکساید) و سرم خارج گردید. سلول‌ها در داخل محیط (Dulbecco 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^۱ 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^۲ رقت‌های مختلفی از باکتری لیستریا مونوسیتوژن جدا شده از پنیر محلی در محیط نوترینت برات 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

1- monolayer
2- Mc Farland

باکتری ها در اطراف و تعداد کمی از آنها در درون سلول مشاهده می شوند.



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 مونوسیتوزن معمولاً کاری دشوار بوده و به زمان طولانی نیاز دارد. در این بررسی، سعی بر آن 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 نموده است. در ضمن به محیط کشت غنی‌کننده، آنتی‌بیوتیک و مواد باکتريواستاتیک مانند اسید نالیدیسیک، 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 باکتريواستاتیک، 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 مونوسیتوزن 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 مونوسیتوزن 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 مونوسیتوزن 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 ویژه پنیرهای نرم بوده است و با توجه به مصرف نسبتاً 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 مونوسیتوزن، 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 مونوسیتوزن بخوبی وارد سلول میزبان شده و سلول را متلاشی می‌کند. با توجه به رقت‌های مشخص شده (بیش از $10^5 \times 5$) و فواصل زمانی نشان داده شده (۱۲ تا ۴۸ ساعت) در این بررسی، که باکتری وارد سلول شده و موجب مرگ سلول می‌شود، می‌توان در تحقیقات آینده در طرح ساختن واکسن مورد توجه قرار داد.

منابع

- [۱] موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران: استاندارد روش جستجو و شناسایی لیستریا مونوسیتوزن در شیر و فرآورده‌های آن، سال ۱۳۷۷، استاندارد شماره ۴۵۲۴. صفحه ۲۸-۱.
- [۲] نوروزی ج، جعفری نژاد ع، شهیدی س: تعیین میزان فراوانی لیستریا مونوسیتوزن در فرآورده‌های لبنی و گوشتی و مشاهده پلاسمید آنها توسط الکتروفورز. خلاصه مقالات چهارمین کنگره میکروبی شناسی (با گرایش باکتری شناسی). ۱۷-۱۵ آبان ۱۳۸۰، صفحه ۱۳۹.
- [3] Anonymous: Outbreak of listeriosis 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: Examination for specific organisms, *Listeria monocytogenes* 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 intracellular 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] Lyytikäinen O, Autio T, Majjala 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.

Isolation of *Listeria Monocytogenes* from Cheese by Cold Enrichment Method and Detection of this Bacteria in Hela Cell Culture

J. Nowroozi Ph.D¹, J. Vand Yousefi Ph.D², R. Kargar Moakhar Ph.D², M. Ahmadi Jebelli MS.c¹

1- Associate Professor of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Dept. of Microbiology Hesarak Razi Institute of Iran

3- Dept. of Virology Hesarak Razi Institute of Iran

4- Academic Member, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background: *Listeria monocytogenes* is frequently transmitted from contaminated food such as cheese, raw vegetables, prepacked salad and etc, to humans. This bacteria can grow inter and extracellular. The aim of this study was to present a simple practical method for isolation of this bacteria from cheese, and detection of it in Hela cell culture by light microscopy

Materials and Methods: In this experimental study, the sample of fresh local cheese was suspended in selective enrichment medium with yeast extract and kept at 4°C for one week. Then, the sample was diluted with potassium hydroxide and cultured on Palkam and *Listeria* Selective agar. After colonies appeared, they were examined for the existence of *L. monocytogenes* and then were inoculated in Hela cell culture. Samples were taken intervally (12, 24, 36, 48 hrs), stained with Gimsa, detected by light microscopy and photographed.

Results: This study showed that 9% of fresh local cheese was contaminated by *L. monocytogenes*. Pictures, taken by microscope, indicated that this bacteria in concentration more than 5×10^5 after 12 hours can enter into hella cells and after 48 hours lysed the host cells.

Conclusion: The results of this study showed that *L. monocytogenes* exist in some contaminated local cheese. Contamination of dairy products by *Listeria monocytogenes* can occur during preparation, transport and distribution. So, because of the high consumption of these products in our country, it is necessary to specific surveillance of the production and distribution of dairy products to prevent the incidence of listeriosis in susceptible people.

Keywords: *L. Monocytogenes*, Cheese, Intracellular Bacteria, Hela Cell Cultures

Corresponding author tel: (021) 2726450

Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, 2003, 2(2): 82-87