استخدام طريقة حديثة في الكشف عن بكتريا التسمم الغذائي *Listeria monocytogenes*

*** خميس حبيب مطلك، * محمد موسى جعفر، ** عبد الخالق عباس و* عمار فوزي**
*** وزارة العلوم والتكنولوجيا.**
**** وزارة الصحة.**

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لغرض الكشف عن مدى التلوث ببكتريا *L.monocytogenes* باستخدام طريقة حديثة تدعى طريقة Clearview. وقد اختيرت الاجبان المستوردة لاختبار هذه الطريقة.

اظهرت نتائج الدراسة ان 10% من نماذج الجبن علامة (طعيمه) كانت ملوثه بالبكتريا وكذلك جبنة علامة(بريزدنت) اما جبنة علامة (موزوريلا) فكانت نسبة التلوث 5 % من النماذج المفحوصه في حين خلت نماذج جبنة علامة (لافشكيري) من أي تلوث بهذه البكتريا، كما بينت النتائج اختزال فترة الكشف عن البكتريا بثلاث ايام عند استخدام هذه الطريقه بالمقارنة مع الطريقة التقليديه التي تتم بسبعة ايام. وعند دراسة حساسية عزلات هذه البكتريا للمضادات الحياتيه اوضحت النتائج انها كانت مقاومه بنسبة 100% للمضاد الحيوي الباستراسين والترايموكسازول وحساسة بنسبة 50% للمضاد الحيوي البنسلين والاموكسيسيلين.

المقدمة

تعد بكتريا *Listeria monocytogenes* من المسببات المرضية غير الشائعة، إلا أنها تسبب أمراضا خطرة للإنسان في كل أنحاء العالم مثل الإجهاض المتكرر عند النساء الحوامل (Aportion)، والتهاب السحايا (Meningitis)، وانحلال الدم في الأطفال حديثي الولادة (Septicimia)[1]. وتنتقل جرثومة*L. monocytogenes* بشكل رئيس عن طريق الغذاء الملوث بها إلى جانب العدوى من الإنسان و الحيوان [2] وتنتشر الليستريا بصورة واسعة في النباتات المتحللة، والتربة، وبراز الحيوانات، والأعلاف، والمياه [3].

تمتلك بكتريا *Listeria monocytogenes* العديد من عوامل الفوعة، إلا أن ذيفان Listeriolysin O يستخدم بوصفه مستضداً في الكشف عن بكتريا *L. monocytogenes* لدوره المهم في الغزو والانتشار داخل الخلية (Intracellular spread)، كما انه ينتج من *L. monocytogenes* فقط وليس من الأنواع الأخرى العائدة إلى جنس *Listeria*، لذا أصبح لهذا الذيفان دور بالغ الأهمية في الاختبارات المصلية للكشف عن الأجسام المضادة المتكونة ضده (Anti – Listeriolysin O antibody) في مصول الإنسان والحيوانات المجهضة [4]. ولأهمية ذيفان Listeriolysin O في أمراضية بكتريا *L. monocytogenes*، عمد الكثير من الباحثين إلى استخلاصه وتنقيته [5]، [6].

يعود جنس *Listeria* إلى مجموعة العصيات الإيجابية لصبغة غرام، و من مميزات خلايا جنس *Listeria* إنها خلايا متحركة عند درجة حرارة (25) درجة مئوية و غير مكونة للأبواغ، و يتطلب في تغذيتها أوساطاً غنية حاوية على دم إنسان بنسبة (5%) و عموماً فهي تسبب حل خلايا الدم الحمر، كما يتطلب استخدام أوساطا انتقائية لعزلها من العينات السريرية والغذائية والبيئية(Fraser and Sperber 1988). ومن مميزات جنس الليستريا المستخدمة في التشخيص كونها سالبة لاختبار الاوكسيديز وإيجابية لاختبارالكاتاليز، محللة للاسكيولين [7]. استخدم الباحثين العديد من الطرق للكشف عن بكتريا اللسترية في مختلف المنتجات الغذائية (Gouw and Lidedeman، 2005; Rossman et al. 2006; Rothman et al. 2010). فقد استخدم الباحث D'Agostin et al. 2004 طريقة PCR-based method في الكشف عن بكتريا *L. monocytogenes* في الحليب الخام. في حين اشار Longhi، 2003 الى طريقة جديدة وسريعة للكشف عن هذه البكتريا في الجبن الايطالي (Italian- style soft cheeses). وبالنظر لعدم وجود

دراسات محلية لاستنباط طرق حديثة في الكشف عن بكتريا التسمم الغذائي بصورة عامة وبكتريا اللستريا خاصة، جاءت هذه الدراسة هادفة الى:

1- عزل بكتريا *Listeria. monocytogenes* من مواد غذائية (الاجبان الطريه المستوردة).

الحصول على طريقه سريعه ودقيقه للكشف عن البكتريا بأستخدام طريقة Clear view.

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة بالتعاون مع مختبر الصحة المركزي/ وزارة الصحة حيث تم التحري عن البكتريا في نماذج من الاجبان المستوردة (جبن طعيمة، بريزدنت، موزوريلا وجبن لافيشكيري). تم تشخيص البكتريا وذلك بأخذ وزن مقداره 25 غم من النموذج واضافته الى 225 مليلتر من الوسط الزرعي الاغنائي (وسط فريزر السائل) وترك في الحاضنه لمدة 48 ساعه/30 درجة مئوي ثم تم نقل Loopfull الى الوسط الزرعي (الاوكسفورد الصلب) وتم تخطيط الوسط وحضن لمدة **24** ساعة/37 درجه مئوي حيث تتكون مستعمرات سوداء على سطح الوسط الاصفر. t (Harley and Presco, 1996) استخدمت تقنية سريعة تعتمد على تفاعلات الاضداد لذيفان البكتريا، Listeriolysin O وهي طريقة Clear view وكما موضحة في الشكل (1) حيث يمثل الشباكC السيطره والشباكT لوضع النموذج اما الشباك S فهو لقراءة النتيجة.

تم اخذ المستعمره الفتيه ووضعها في الحمام المائي بدرجة 80 درجه مئوي لمدة 20 دقيقه لتحطيم البكتريا وخروج الذيفان بعدها ينقل الذيفان البكتيري الى العده التي تحتوي على الاجسام المضاده ويضاف الى الشباكS فأن تكون الحزمه الزرقاء يعني النتيجه موجبه حيث تقرا في الشباك T دلالة على وجود السم البكتيري. (Longhietal.2003). اجريت حساسية البكتريا للمضادات الحياتية (الباستراسين، الترايموكسازال، البنسيلين، والاموكسيسيلين) باستخدام طريقة الاقراص

حيث توضع فوق الوسط الغذائي النامية عليه البكتريا .Troxle et.AL 20009)

شكل (1) عدة Clearview لتشخيص بكتريا Listeria.

النتائج والمناقشه

يبين جدول رقم (1) نسبة تلوث في عينات الاجبان المستوردة موضع الدراسة حيث كانت نسبة التلوث 10% في جبنة علامة طعيمة وعلامة برزدنت اما جبنة موزوريلا فكانت 5%، بينما اكدت الفحوصات المختبريه ان جبنة لافشكري خاليه من اية حالة تلوث ببكتريا اللستريا المسببة للتسمم الغذائي.

ان سبب تواجد البكتريا في هذه الانواع من الاجبان يعود الى تلوث المواد الاولية الداخلة في تصنيع الاجبان كالحليب الخام، التلوث اثناء التصنيع، تلوث العاملين، اضافة الى عوامل التلوث الاخرى كالماءوالمعدات الاخرى المستخدمة في الصناعة (1980WHO).واشارت الدراسات إن نسبة عزل جرثومة *L. monocytogenes* من الأسماك المطبوخة تصل الى 22.% و بأعداد تتراوح ما بين 10^{3}–10^{4} خلية/ غرام من لحم السمك، وتعد *L. monocytogenes* من الجراثيم الخطرة على صحة الإنسان، إذ تسبب تقريباً 2.500 حالة تسمم سببت وفاة 500 شخص في الولايات المتحدة لوحدها نتيجة لتناول الأطعمة الملوثة بتلك البكتريا. (FDA، 2001).

كما بينت النتائج الموضحة في الجدول (2) ان استخدام تقنية Clearview تمكن من الحصول و الكشف عن هذه البكتريا خلال ثلاثة ايام اعتمادا على تفاعلات الاجسام المضادة الني تحويها هذه العدة، بالمقارنة بالطريقة التقليدية التي تعتمد على الفحوصات البايوكيميائية التفريقية والفحوصات السيرولوجية التي تتم خلال 5-7 ايام. اعتمدت

الكثير من المختبرات العالمية الطرق الحديثة في الكشف عن بكتريا اللستريا، فقد قارنت دراسة Rodrigues et al., 2000 [17] في الكشف عن نظامين للاختبار السريع لليستيريا (اختبار Clearview واسلوب وباكس [TM]) للفحص عن انواع الليستيرياتحليل ما مجموعه 413 من عينات الدجاج من مصادر مختلفة، اظهرت النتائج وجود علاقة ممتازة بين البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام طريقة Clearview وبكفاءة 99٪. في عزل بكتريا Listeria اما طريقة وباكس TM فكانت بكفاءة 71.1% وعند دراسة حساسية بكتريا اللستريا الى عدد من المضادات الحياتية اظهرت النتائج وكما موضح في الجدول (3) انها كانت مقاومة وبنسبة 100% للمضادات الحياتية الباستراسين والترايموكسازول في حين كانت حساسة وبنسبة 50% للمضاد الحيوي البنيسيلين والاموكسيلين.

وجد EL-Sherbini *et al.*,1998 ان العديد من المضادات الحيوية تثبط بكتريا اللستريا مثل المضاد الحيوي الأمبسلين، والأريثرومايسين، والسلفاميثوكسازول، من جهة أخرى تقاوم بكتريا الليستريا حوالي (2-9) مضاد حيوي، وأن بكتريا *L.monocytogenes* حساسة للمضاد الحيوي البنسلين، والكلورامفينكول، والترايمثبريم،والأريثرومايسين، والجنتامايسين، والريفامبسين، والتتراسايكلين ومقاومة للسيفالوسبورينات.

جدول (1)

الكشف عن بكتريا *Listeria monocytogenes* في انواع من الاجبان المستوردة.

المنشا	عدد النماذج المسحوبه	عدد العزلات	النسبه المؤيه
مصري	20	2	10%
دنمارك	20	Zero	Zero
مصري	20	2	10%
تركي	20	1	5%

جدول (2)

تقييم طرق عزل بكتريا Listeria monocytogenes.

النموذج	الطريقة	Clear view	التقليديه
جبن بريزدنت		3	7-5
جبن لافشكري		3	7-5
جبن طعيمه		3	7-5
جبن موزوريلا		3	7-5

جدول (3)

حساسية بكتريا L. monocytogenes لعدد من المضادات الحياتية.

نوع المضاد الحيوي	الحساسية	المقاومة
مضاد الباستراسين	-	100%
مضاد الترايموكسازول	-	100%
مضاد البنيسيلين	50%	-
مضاد الاموكسيلين	50%	-

References

[1] Baetz, A. L.; Wesley, I. V. and steves, M. G. The use of listeriolysin O in an ELISA, a skin test and a lymphocyte blastogenesis assay on sheep experimentally infected with Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii or Listeria innocua. Veterinary microbiology . 51:151-159. 1996.

[2] Beuchat, L. and Ryu, J. Produce handling and processing practices. Emerg. Infect. Dis . 3: 459-465. 1997.

[3] Zaki, M.; Daoud, A. S.; AL-Saleh, Q; and Abd-AL-Rasool. M. M. Bacterial meningitis in the newborn: a kuwaiti experience. J. Trop. Pediatr. 36:63-65. 1990.

[4] -Mylonakis E., Hohmann E. L., Calderwood S. B. (1998). Central nervous system infection with Listeria monocytogenes. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. Medicine 77:313–336. 1998.

[16] Harley, J. and Prescott, L. In Laboratory Exercises in Microbiolog. (1996).
[17] Troxler R., von Graevenitz A., Funke G., Wiedemann B., Stock I. Natural antibiotic susceptibility of Listeria species: L. grayi, L. innocua, L. ivanovii, L. monocytogenes, L. seeligeri and L. welshimeri strains. Clin. Microbiol. Infect. 6:525. 2000.
[18] WHO working group. Food borne listeriosis. WHO/ EHE/ FOS 88.5. [Abstract] 3thed, U. S. A.
[19] FDA/ Center for Food safety and Applied Nutrition. Processing parameters needed to control pathogens in cold–smoked fish, potential hazards in cold–smoked fish Listeria monocytogenes. March, 2001.
[20] AUTHOR(S) Rodrigues D.; Landgraf M.; Destro M.T Evaluation of two commercial methods for the detection of Listeria sp. and Listeria monocytogenes in a chicken nugget processing plant: Canadian Journal of Microbiology, Volume 48, Number 3, pp. 275-278. 2002.
[21] EL-Sherbini, M.; AL-Agili, S. and Garbaj, A. Isolation of Listeria from farm milk and abortion cases of women. Estern Mediterranean Health, WHO. 4:589-592. 1998.

Abstract

This study was conducted for detection of *Listeria monocytogenes* using recent method called Clearview for some imported types of cheeses. Results showed that samples of cheeses were contaminated with *Listeria monoicytogenes* in different percentages (10%) of the cheese type Tehama,(10%) of cheese type Presedant, (5%) of the cheese type Mozhurella while Lafschri samples have not any statement of contamination with this bacteria. Clearview is a recent method used for isolatation and identification of *Listeria monocytogenes* which reduced detection time to three days compared to seven days with the rotine method.The antibiotics sensitivity test revealed that bacteria was resistant to pastracin and triymocsoxal(100%) and sensitive to penicillin and amoxycilin (50%).

[5] Mahmood, M.; Ahmed, A. and Hussain, I. Prevalence of Listeria monocytogenes in poultry meat products and other related inanimates of Faisalabad. Pakistan Journal of Nutrition. 2:346-349. 2003.
[6] Boerlin, P.; Boerlin –Petzold, F. and Thomas, J. Used of Listeriolysin O and Internalin A in a seroepidemiological study of listeriosis in Swiss dairy cows. J. Clin. Micrbiol. 41:1055-1061. 2003.
[7] Oladepo, D. K., Candlish, A. A. and Stimson, W. H. Detection of Listeria monocytogenes using polyclonal antibody. Letters in Applied Microbiology. 14:26-29. 1992.
[8] Karpova, L.; Belyi, I.; Tartakovskii, I. and Prozorovskii, S. The Purification and characteristics of listeriolysin O from Listeria monocytogenes. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 4:3. 1994.
[9] -Fraser, J. and Sperber, W. Rapid detection of Listeria in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Prot. 51:762-765. 1988.
[10] Fraber, J. M. and Peterkin, P. I. Listeria monocytogenes, a food –borne pathogen. Microbiol. Rev. 55:476-511. 1991.
[11] Gouws P. A., Lidedemann. Evalution of diagnostic PCR for the detection of Listeria monocytogenes in food products. Food Technol. Biotechnol. 43:201–205. 2005.
[12] Rossman P., Dressing M., Wagner M., Hein I. Detection of Listeria monocytogenes in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene. Res. Microbiol. 157:763–771. 2006.
[13] Rothman R., et al. Use of quantitative broad-based polymerase chain reaction for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. Acad. Emerg. Med.17:741–747. 2010.
[14] D'Agostino M. A validated PCR-based method to detect Listeria monocytogenes using raw milk as a food model—towards an international standar J. Food Prot. 67:1646–1655. 2004.
[15] Longhi C., Detection of Listeria monocytogenes in Italian-style soft cheese. Appl. Microbiol. 94:879–885. 2003.