دراسة بالمجهر الالكتروني النافذ لجراثيم *Listeria monocytogenes* المعزولة من الحليب الخام والجبن الطري في مدينة بغداد

Transmission Electron – Microscopic Study of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and soft cheese in Baghdad Province

Ali Hassan Ahmed AL-Shamary
Coll. Vet. Med. / Baghdad University
علي حسن أحمد الشمري
كلية الطب البيطري /جامعة بغداد

المستخلص

أستهدفت الدراسة أستخدام تقنية المجهر الألكتروني النافذ لغرض تأكيد تشخيص جراثيم *Listeria monocytogenes* والتعرف على مصادرها الداخلية والخارجية . أنجز البحث في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد وكلية الطب / جامعة النهرين للمدة من 4/1 لغاية 2008/5/25 . تضمن البحث تحضير المستنبت اللستيري السائل في مختبر صحة الغذاء / قسم الصحة العامة البيطرية /كلية الطب البيطري / جامعة بغداد من العزلات المحلية للجرثومة (المعزولة من الحليب والجبن الطري في مدينة بغداد) بأستخدام الأوساط القياسية الدولية وبعدها نقلت النماذج مبردة الى قسم المجهر الألكتروني / كلية الطب جامعة النهرين حيث عوملت النماذج بمواد خاصة وحساسة ، حيث ألتقطت صور متعددة للجرثومة ومراحل نموها المختلفة . أظهرت النتائج وجود أشكال ومكونات متعددة لجرثومة *Listeria monocytogenes* المهمة من ناحية التشخيص والعلاج مثل شكل حرف V بين الخلايا اللستيريا ، والفسحة قبل الهيولية ، المادة الوراثية المتعددة ذات اللون الباهت للجرثومة ، البلازميدات ، الجزيرات الأمراضية ، منظومات الأفراز الثالث وخلايا سلسلة الصوصج (ظاهرة عدم الأنفصال) . نستنتج أن استخدام تقانة المجهر الالكتروني النافذ تعد اداة مهمة في تشخيص العديد من المسببات المرضية الغذائية المشتركة بين الانسان والحيوان .

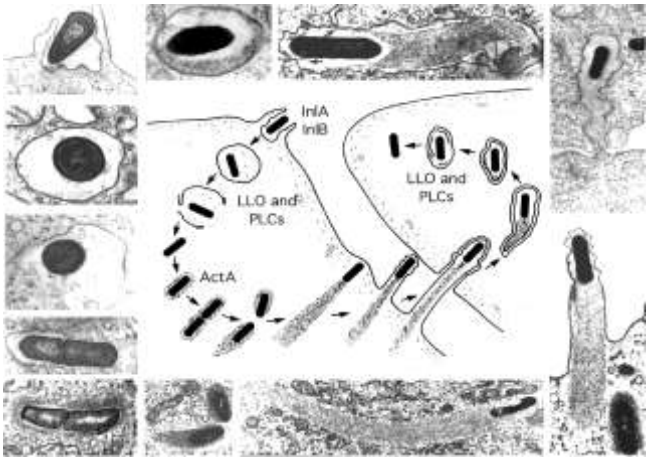
Abstract

The study was designed to confirm and understand the internal and external features of *Listeria monocytogenes* by Transmission electron microscopy (TEM). A study was conducted at the College of Veterinary Medicine/ University of Baghdad and College of Medicine/AL-Nahrain University during April-May 2008. Standard *listerial* broth was prepared in food Lab. at Baghdad Vet. Coll. from locally isolated strains of *Listeria monocytogenes* (from raw milk and soft cheese in Baghdad province) according to standard protocols of food microbiology, transmitted in refrigerated containers to TEM-section at AL-Nahrain Coll. of Med. for processing and photographing the different forms and components of isolates. The results revealed polyforms and components of *Listeria monocytogenes* that important for diagnosis and therapy such as V-shape phenomenon in *listerial* cells, periplasmic space, DNA, plasmids, pathogenicity islands, type 3 secretion systems, and sausage chain in *listerial* cells (Incomplete-dissociation). In conclusion TEM technology is an important tool for diagnosing of zoonotic food borne diseases between animals and man.

Key words: Transmission Electron Microscopy, *Listeria monocytogenes, Raw Milk, Soft Cheese*

المقدمة

في السنوات الـ 15 الاخيرة تحول مرض Listeriosis من مرض خمجي ذي أهميه محددة الى واحد من الامراض الخمجية المهمة المنتقلة عن طريق السلسلة الغذائية Food chain الى الانسان والحيوان وعدت جراثيم *Listeria monocytogenes* من قبل المختصين في مجال علوم الاحياء المجهرية للاغذية Food microbiology أنموذج بحثي مهم على مستوى العالم من الناحية الجزيئية molecular والخلوية cellular كونها ذات محتوى وراثي متطور يمكنها من مقاومة الظروف الأجهادية المحتملة Stress strategy أثناء دورة حياتها [3,2,1] . هذه الجراثيم محصنة وراثيا بشكل جيد حيث ان لها ميكانيكيات وبروتينات وقائية فعالة وتمتلك الميكانيكيات الذكية Clever strategies التي تمكنها من مقاومة تقانات معاملة الأغذية [6,5,4] ، لذلك فهي خطرة جدا على صحة وسلامة البشر والحيوان كونها تأتي بشكل مباشر عن طريق الغذاء لاسيما السايلج في الحيوان والحليب الخام والجبن الطري والمثلجات اللبنية وغيرها في الانسان (بكتريا الثلاجات) مسببه العديد من المشاكل الصحية لاسيما في الاشخاص المعرضين للأصابة وهم النساء الحوامل وحديثي الولادة والمسنين والاشخاص ذوي المناعة الضعيفة غير السوية immune compromised متضمنة الاجهاض وانتان الدم septicemia وألتهاب السحايا [8,7] ، كما يمكن ان يتطور المرض في الاشخاص الطبيعيين تحت ظروف معينة بهيئة التهاب المعدة والامعاء الحمي febrile gastroenteritis حيث ان هذه الجراثيم تسبب نمط جديد من التسمم الغذائي اللستيري [1،9] ولأجل كل ذلك فقد وضعت العديد من الطرائق والتقانات الحياتية الدولية المتطورة لغرض التعرف على سلوكية هذه الجراثيم [1] ومنها هذه الدراسة حيث كان هدفها كشف معالم اللستيريا (المعزولة محليا بالطرائق الدولية) بأستخدام تقانة المجهر الالكتروني النافذ TEM لغرض تأكيد تشخيصها كما هو موضح من خلال الشكل (1) :



شكل (1): طريقة دخول الجرثومة ومعيشتها الخلوية وتكاثرها داخل الخلايا الهدف[12].
InIA=Internalin-A, InIB=Internalin-B,
LLO=Listeriolysin-O, PLCs=Phospholipases, ActA=Actinalin-A

المواد وطرائق العمل

أجري البحث في قسم صحة الغذاء / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد وفي وحدة المجهر الالكتروني / كلية الطب / جامعة النهرين للمدة من 4/1 لغاية 2008/5/25 ، بأستخدام عزلات من جراثيم *Listeria monocytogenes* المعزولة من نماذج الحليب الخام والجبن الطري المحلي من مناطق مختلفة من مدينة بغداد حسب الطرائق القياسية الدولية [11,10] لغرض التعرف على المعالم الدقيقة لهذه الجراثيم المشتركة بين الانسان والحيوان zoonotic .

طرائق العمل

المستنبت اللستيري (Listerial-broth): حضر حسب الطرائق الدولية المقرة من قبلFDA* , FSIS, NDC, IDF, وغيرها [13,11] حيث أنتقيت مستعمرات قياسية من جراثيم *Listeria monocytogenes* من على سطح طبقة اكار PALCAM وزرعها في الوسط السائل TSB-YE بدرجة حرارة 22 م لمدة (18-24) ساعة داخل قناني قياسية معقمة (Universals) موضوعة داخل حمام مائي هزاز وبعدها تم نقل

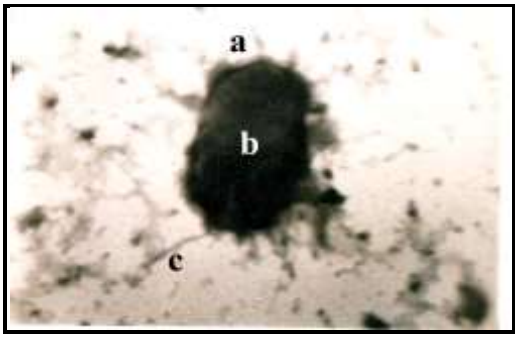
المستنبتات اللستيرية بوساطة حاوية نقل النماذج المبردة بعد تغليفها بأغشية Parafilms الى مختبر المجهر الألكتروني النافذ في كلية الطب/ جامعة النهرين لغرض اجراء الدراسة.

المجهر الألكتروني النافذ TEM: اجريت الدراسة في كلية الطب/ جامعة النهرين حيث عوملت النماذج (المستنبتات اللستيرية) بوساطة محلول دارئ 2.5% من Glutraldehyde لزيادة نفاذية الضوء الى الخلايا اللستيرية لتكون واضحة لمدة (20-30) دقيقة ثم اضيف لها شبكة حساسة تشبه قرص المضاد الحيوي في أختبار فحص الحساسية (شبكتان لكل مستنبت) مع مواد رابطة لتساعد على التصاق الخلايا اللستيرية بالشبكة الحساسة وتركت لتتفاعل داخل المختبر لمدة (20-30) دقيقة وبعدها تم سحب الشبكة بهدوء من داخل النموذج بوساطة ماصة باستور معقمة ونظيفة وتركت لتنشف على ورق الترشيح ثم نقلت الشبكة بحذر الى داخل انبوب اسطواني زجاجي خاص حيث تم ادخاله الى داخل انبوب المجهر الالكتروني (EM-tube) وبعدها أطفئ الضوء داخل المختبر مع تسليط حزمة ضوئيه ليزرية electron-beams خافته على الشبكة داخل المجهر فظهر حقل ضوئي دائري الشكل مساحته تقريبا 20 سم يحتوي على اشكال ومراحل مختلفة للجرثومة وتم التحكم بحساسية ووضوح الصورة وحجمها بوساطة خريطة الكترونية مبرمجة داخل المجهر حيث التقطت صورة متعددة للجرثومة ومراحل نموها المختلفة[1].

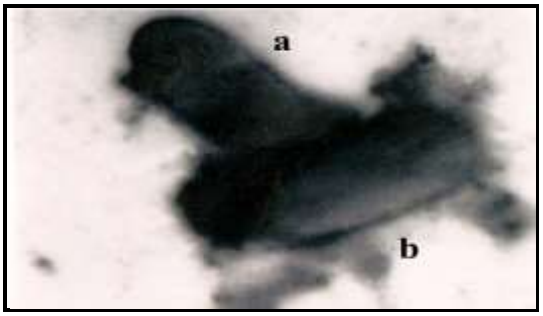
*IDF=International Dairy Federation
NDC=National Dairy Council
FSIS=Federal, Food Safety and Inspection Service
FDA=Federal, Food and Drug Association

النتائج والمناقشة

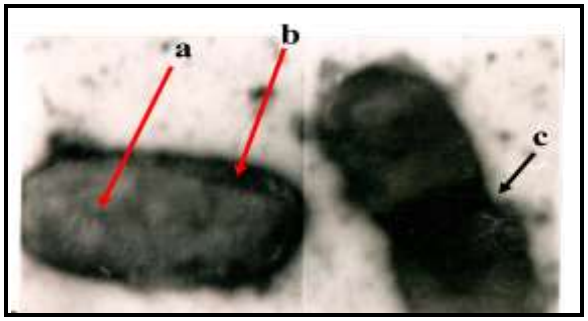
في الوقت الذي تمكنت دول اوربا لاسيما فرنسا وبريطانيا والمانيا ودول امريكا وكندا من احداث طفرة نوعيه وعصريه هائله في مجال صناعة ومعاملة الاغذية والعنايه الصحيه الكفؤة بحيوانات الغذاء من المزرعة الى المعمل ثم الى المستهللك ووسائل التحري الدقيقه والعدد التشخيصيه السريعة المتطورة وتقانات تفاعل سلسلة البلمرة PCR والهندسة الوراثية عن أهم المسببات المرضية المشتركة المنتقله عن طريق السلسلة الغذائية ومنها جراثيم Listeria monocytogenes [1] ، كانت الدول النامية ومنها العراق غير مهتمة بشكل واقعي بالتلوث اللستيري ولاتمتلك وسائل الكشف الدقيقه والبرامج المتطورة للكشف عن هذه الملوثات الميكروبيه الغذائيه الخطرة على صحة وسلامة الانسان والحيوان لذلك بدأت البحوث والدراسات حول هذا الجانب تزداد ومنها هذه الدراسة والتي تسلط الضوء عن بعض الجوانب المهمة لهذه الجراثيم وسلوكيتها والصور الأتية من(1-5) توضح نتائج المجهر الألكتروني النافذ لجراثيم *Listeria monocytogenes* والتي تكشف معالم الجرثومة ومكوناتها وأشكالها المختلفة وهذا مهم من ناحية التشخيص والعلاج .



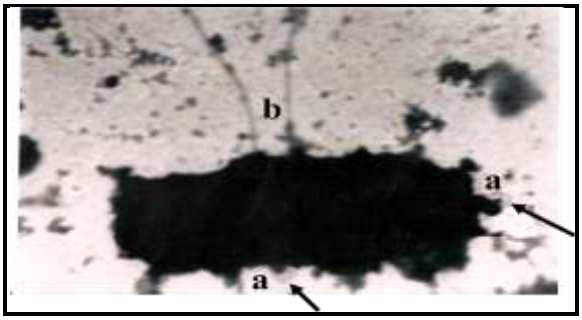
صورة(1): الشكل الحقيقي للجرثومة (عصيات قصيرة كروية) حيث نلاحظ وجود الغشاء الخلوي (a) والهيولي (b) وسوط الحركة (c) تحت قوة تكبير (34000X).



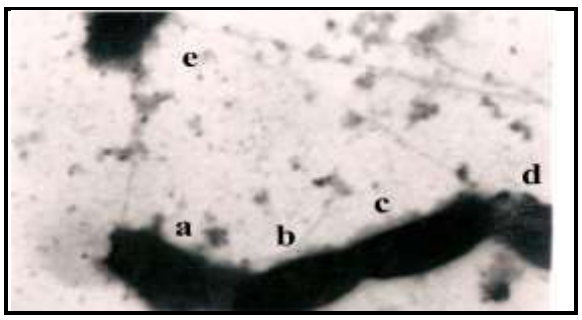
صورة (2): خليتين *Listeria monocytogenes* متماسة بشكل حرف V وهي ظاهرة تشخيصية مهمة في العائلة اللستيرية تحت قوة تكبير (34000X) , سببها تفسيران متداخلان ، الأول وجود البروتين السطحي الأكتينالين Actinalin type A حيث يعمل على الالتصاق بالخلية الثانية من جهة القطب Pole نتيجة التجاذب الكهرومغناطيسي ، والثاني يعود الى أختلاف الشحنات الكهربائية في الخلايا الجنسية المختلفة اي وجود خلايا لستيرية ترتيب شحناتها السطحية هو(+- + -) حيث تنجذب الى خلايا لستيرية ترتيب شحناتها السطحية هو (- + - +) [1].



صورة (3): المادة الوراثية المتعددة ذات اللون الباهت للجرثومة (a) مع الفسحة قبل الهيولية periplasmic-space المميزة للجرثومة (b) مع أنقسام الخلايا اللستيرية (c) تحت قوة تكبير (46000X), سببها أمتلاك الجرثومة لثلاث منظومات وراثية هي (DNA)والبلازميدات Plasmid والجزيرات الأمراضية Pathogenicity Islands [14] مع مكونات شبيهة بمكونات الجراثيم السالبة لصبغة Gram مثل الفسحة قبل الهيولية [15].



صورة (4): خلية لستيرية ناضجة فيها ظاهرة مميزة هي وجود أنبعاج أصبعي الشكل من الأعلى (a) يمثل عامل مهم من عوامل الضراوة الموجودة في الجراثيم السالبة لصبغة Gram وهو جهاز الأفراز والأختراق الخلوي الثالث Type 3 Secretion System مع الأسواط (b) تحت قوة تكبير 46000 X [16].



صورة (5): خلايا لستيرية منقسمة بشكل غير كامل (a,b,c,d) مع أسواطها (e) أشبه بسلسلة الصوصج تمثل الشكل الخشن للجرثومة بعد 48 ساعة من الزرع نتيجة فقدانها للبروتين السطحي p60 تحت قوة تكبير 25000 X فتظهر منقسمة بشكل غير كامل أو مايعرف بظاهرة عدم الأنفصال (Incomplete-dissociation) [1].

نستنتج من هذه الدراسة أن أستخدام تقانة المجهر الألكتروني النافذ ساهمت في تأكيد تشخيص جراثيم *Listeria monocytogenes* والتعرف على بعض أجزائها الحيوية ولهذا توصي الدراسة بأتباع الوسائل التشخيصية السريعة والمتطورة مثل تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) والتنميط الكهربائي Electrotyping في مجال التقانات الحياتية لغرض التحري عن الملوثات الغذائية المشتركة بين الانسان والحيوان .

المصادر

1.Dongyou Liu. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes* .1st ed.,CRC Press, VSA

2.Robinson, R.K. 2002. Dairy Microbiology, Handbook of milk and milk products .3rd ed., Wiley Interscience , INC., USA.

3.Jay, J.m.; Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. Modern food microbiology .7th ed., Springer, USA.

4.Vazquez–Boland, J.A.; Kuhn, M. and Berche, P. 2001. Listeria Pathogenesis and molecular virulence determinants.Clin.Microbiol.Rev. 14[3]:584-640.

5.Fernands, R. 2009.Microbiology Handbook of Dairy Products.1st ed, .Leath erhead Food International, LTD, UK.

6.Britz, T.J.and Robinson, R.K. 2008.Advanced Dairy science and Technology. 1st ed., Blackwell scientific publishing, UK.

7.Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991.Listeria monocytogenes, afoodborne pathogen. Microbiol.Rev. 55:476-511.

8.Radostits, O.M.; Henderson, J.A.; Blood, D.C.; Arundel, J.T. and Gay, C.C. 1997. Veterinary Medicine :A Textbook of the disease of Cattle, Sheep, Pigs, goats and Horses.8th ed.,Bailliere Tindall comp.,VK.

9.Quinn,P.J;Carter,M.E.;Markey,B.and Carter,G.R. 2004.Clinical Veterinary Microbiology .2nd ed.,Mosby Int.,USA.

10. الشمري ، علي حسن أحمد . 2009 . التحري عن جرثومة *Listeria monocytogenes* في الحليب وبعض منتجات الألبان في بغداد، أطروحةدكتوراه ، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد .

11. Hitchins, A.D. 2003. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods.Chapter101.In :Bacteriological Analytical Manual 10thed.,Jackson ,G.J. Revision A., AOAC Int., Gaithersburg, M.D., USA.

12. Portnoy, D.A.; Auerbuch, V.and Glomski, I.J .2003. The cell biology of *Listeriamonocytogenes* infection of bacterial pathogenesis and cell mediated Immunity.J.cell.Biol.,158 [3]:409-414.

13. Pagotto, F.; Daley, E.; Farber, J.and Warburton, D. 2001. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. MFHPB-30 ,Health Products and food branch, HPB Method, Ottawa, Canada.

14. Hacker, J.and Kaper, J. 2000. The Concept of pathogen city Islands of virulent bacteria: structure, function, and impact on microbial evolution. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.

15. Wexler. and Oppenheim ,J.D. 1979.Isolation ,Characterization and Biological properties of an endotoxin-like material from the Gram- positive Organism *Listeria monocytogenes* . Infect.Immun. 23:845-857.

16. Yashroy, R.C. 1998.Discovery of vesicular exocytosis in Prokaryotes and its role in Salmonella invasion .Curr.Sci. 75[10]:1062-1066.