

بررسی تجربی بیماری زایی لیستریا ایوانووی در موش آزمایشگاهی

رضا حکیمی آلی^۱، حمدالله مشتاقی^{۲*}، ایرج کریمی^۳، عزیزالله ابراهیمی^۳

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲ آبان ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۶ اسفند ۱۳۹۱

چکیده

در بررسی حاضر به منظور مطالعه بیماری زایی پنج جدایه باکتری لیستریا (لیستریا ایوانووی) که از گوشت گوسفند جدا شده بود، به صورت داخل صنفای مقدار 10^6 cfu باکتری به موش آزمایشگاهی نژاد سوئیس آلبینو تزریق شد. نتایج نشان داد که سه جدایه از لیستریا ایوانووی بیماری زا بوده و در مدت ۲-۶ روز پس از تزریق باکتری سبب مرگ موش شدند. همچنین مشاهده ارگانیزم‌ها در ارگان‌های مختلف نیز انجام گردید و ضایعات بافتی در کبد، طحال، کلیه، مغز و روده گزارش شد.

کلمات کلیدی: لیستریا ایوانووی، بیماری‌زایی، موش

* نویسنده مسئول: حمدالله مشتاقی

آدرس: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۶

پست الکترونیک: moshtaghi@vet.sku.ac.ir

مقدمه

سلول‌های مجاور از طریق گسترش پاهای کاذب می‌باشد (۱۵).

این باکتری را می‌توان از کشت خون، جفت، مایع مغزی نخاعی، ادرار، ترشحات واژن، مغز، شیر، فراورده‌های لبنی، گوشت، سبزیجات و غیره جدا کرد (۱۱).

تاکنون حیوانات مختلفی برای ایجاد لیستریوز تجربی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. موش از چندین لحاظ حیوان مناسب‌تری برای بررسی لیستریوز تجربی می‌باشد. بنابراین بیشترین اطلاعات محققان درباره چگونگی عملکرد این باکتری، از آلوده کردن تجربی موش به دست آمده است (۳).

از آن جایی که در سه دهه اخیر لیستریا یکی از عوامل مهم عفونت غذازاد در انسان معرفی شده است و اهمیت آلودگی گوشت‌های قرمز به این باکتری و مصرف چنین گوشت‌های آلوده، احتمال ایجاد عفونت لیستریایی در انسان را در پی خواهد داشت، تصمیم گرفته شد که بیماری‌زایی جدایه‌های این باکتری از گوشت‌های قرمز در موش آزمایشگاهی بررسی شود.

مواد و روش کار

لیستریای بررسی شده در این تحقیق پنج ایزوله لیستریا ایوانووی بود که از گوشت گوسفند موجود در کشتارگاه شهر کرد جدا شده بود. این جدایه‌ها قبلاً با بررسی میکروسکوپی و بیوشیمیایی و آزمایش PCR مورد تأیید قرار گرفته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شده بودند. در ادامه برای بررسی بیماری‌زایی این جدایه‌ها، جهت احیاء به محیط تریپتوز سوی برات (TSB) برده شدند. بعد از ۲۴ ساعت از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری بر حسب ایجاد کدورت در این محیط مشخص شد. تأیید کلنی

لیستریاها از گروه باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی و کوکوباسیل داخل سلولی می‌باشند (۸). گونه‌های لیستریا که تاکنون شناسایی شده شامل: لیستریا مونوسیٹوژنز (*L. monocytogenes*)، لیستریا ایوانووی (*L. ivanovii*)، لیستریا اینوکوا (*L. innocua*)، لیستریا ولشیمیری (*L. Welshimeri*)، لیستریا سیلیگری (*L. seeligeri*) و لیستریا گرایبی (*L. grayii*) می‌باشد (۱۲). لیستریا مونوسیٹوژنز مهم‌ترین گونه بیماری‌زا در این گروه بوده و لیستریا ایوانووی به عنوان یک پاتوژن با حدت متوسط در نظر گرفته می‌شود. به نظر می‌رسد که بیشترین اثر آن روی نشخوارکنندگان، ایجاد سقط، تولد نوزاد زودرس و سپتی سمی نوزادی باشد اما عفونت‌های سیستم اعصاب مرکزی ندارد (۱۶). با این که بیولوژی سلول‌های آلوده به لیستریا ایوانووی مشابه لیستریا مونوسیٹوژنز است با این همه تفاوت‌های مهمی بین این دو گونه، در رابطه با پاسخ بیماری‌زایی و گرایش میزبانی وجود دارد (۱۴). لیستریا ایوانووی با ایجاد همولیزین قوی دو منطقه‌ای روی آگار خون گوسفند و یک واکنش کمپ مثبت به شکل بیلچه با ردوکوکوس اکوئی از لیستریا مونوسیٹوژنز تشخیص داده می‌شود (۱۳).

لیستریا مونوسیٹوژنز و لیستریا ایوانووی هر کدام شش ژن حد (*PrfA*, *PlcA*, *PlcB*, *MpL*, *ActA*, *hlyA*) دارند که به صورت خوشه‌ای در جزایر بیماری‌زای باکتری قرار دارد (۱۱). این ژن‌ها در مراحل بیماری‌زایی باکتری نقش ایفا می‌کنند. این مراحل شامل ورود باکتری به داخل سلول میزبان، فرار باکتری از داخل واکوئل درون سلولی، حرکت باکتری با پلیمریزه شدن اکتین سلول میزبان و انتشار باکتری به

میزان مرگ و میر موش‌ها در کل دوره تیمار انجام گرفت.

به غیر از پنج موشی که در طی دوره تیمار تلف شدند بقیه موش‌ها در روز سیزدهم توسط تری کلرومتانول بی هوش شده و کالبد گشایی شدند. کالبد گشایی به این صورت بود که پس از برش در خط میانی شکم و کنار زدن پوست، ارگان‌های داخلی به صورت ماکروسکوپی مورد مشاهده قرار گرفته و در صورت مشاهده تغییرات، از موضع عکس برداری انجام گرفت. از پنج ارگان کبد، طحال، کلیه، روده و مغز نمونه‌گیری شد و بعد از فیکس شدن در فرمالین ده درصد، اسلایدهای میکروسکوپی از آنها تهیه شد.

نتایج

در طول دوره تیمار، موش‌ها در یک گوشه قفس جمع می‌شدند و تمایل به حرکت و جنب و جوش نداشتند. میزان مصرف غذا و آب در آنها کم شده بود و اکثر آنها کسل بودند طوری که با دست بردن به قفس آنها نسبت به روزهای قبل از تزریق، واکنش سریع از خود نشان نمی‌دادند. در طول دوره تیمار ۵ سر موش تلف شد که دو سر از گروه کنترل مثبت و سه سر بقیه مربوط به گروه‌های II، III و V بود.

در حین کالبد شکافی بیشترین و بارزترین تغییر در کبد و طحال دیده شد که این دو اندام بزرگ و پررنگ شده بودند و دارای کانون‌های رنگ پریده بودند. بزرگ شدن طحال و کبد سبب شده بود ناحیه شکم موش متورم دیده شود (تصویر شماره ۱). بزرگی و رنگ پریدگی کلیه هم در چندین مورد مشاهده شد.

در بررسی اسلایدهای تهیه شده از ارگان‌های موش علائم آسیبی در بافت‌های مورد نظر دیده شد. علائم و ضایعات ایجاد شده در کبد عبارت بودند از: نکروز،

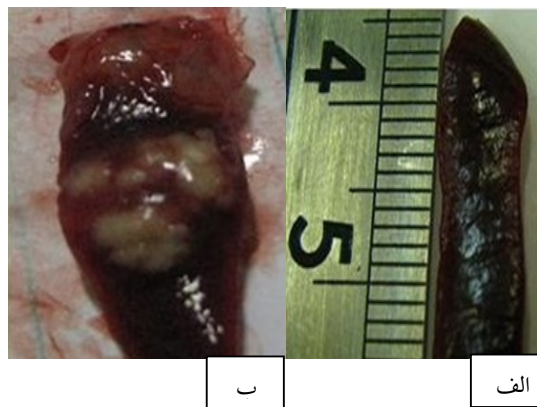
لیستریا ایوانووی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و ایجاد کلنی سیاه در محیط کشت پالکام انجام گرفت. برای شمارش جدایه‌های تلقیح شده به محیط TSA، رقت‌های سری (10^{-1} تا 10^{-8}) تهیه شد و از رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-8} به مقدار ۰/۱ سی سی به صورت مجزا به محیط تریپتوز سوی آگار (TSA) برده شد. بعد از ۲۴ ساعت از انکوبه شدن محیط TSA در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برحسب شمارش کلنی و رقت‌های انجام یافته تعداد باکتری در ۱ میلی لیتر محاسبه شد که این میزان 10^7 عدد باکتری بود. کنترل مثبت ما در این تحقیق لیستریا ایوانووی ATCC 19119 بود که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شده بود.

موش‌هایی که در این تحقیق به کار برده شد موش سفید نژاد سوئیس آلبینو (Swiss Albino) بود که به تعداد ۳۵ سر از دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد تهیه شد و تمامی آنها وزن کشتی شدند که به طور تقریبی بین ۲۲-۱۸ گرم بودند. این موش‌ها در ۷ گروه پنج‌تایی در ۷ قفس مختلف قرار گرفتند که گروه I تا V مربوط به پنج جدایه لیستریا ایوانووی، گروه VI مربوط به کنترل مثبت لیستریا ایوانووی و گروه VII، گروه شاهد ما بود. در ادامه با استفاده از سرنگ انسولین ۱۰۰ واحدی (یک میلی لیتر) مقدار 10^6 cfu از سوسپانسیون باکتری (پنج ایزوله لیستریا ایوانووی و کنترل مثبت) به هر کدام از موش‌ها به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق گردید. در گروه شاهد هم ۰/۱ میلی لیتر محیط TSA فاقد باکتری تزریق گردید.

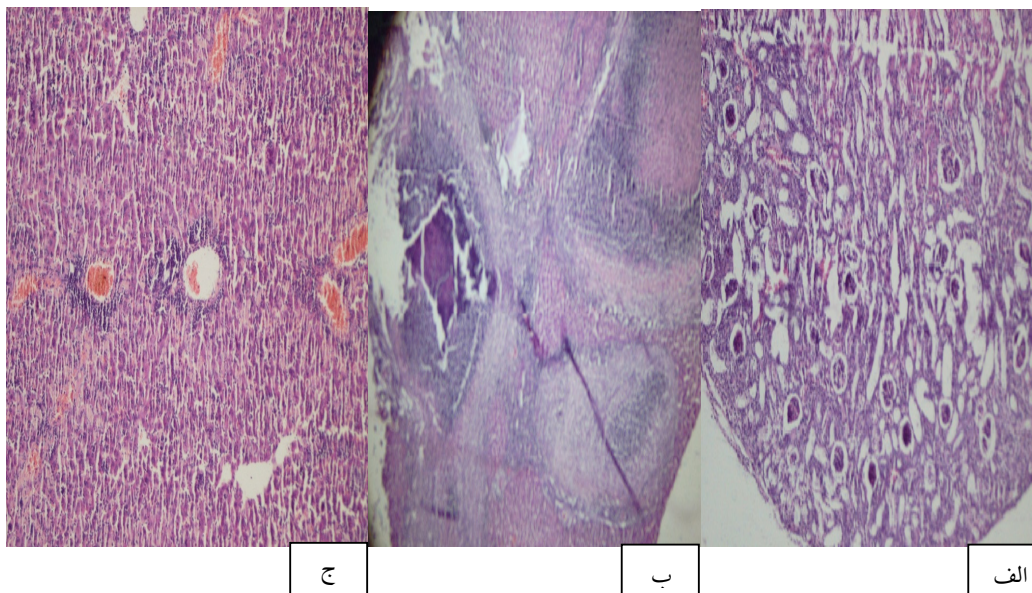
طول دوره تیمار برای بررسی بیماری‌زایی لیستریا ایوانووی ۱۲ روز بود. در طول این مدت آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار داده شد. مراقبت‌ها و مشاهدات روزانه جهت ثبت علائم کلینیکی و هم چنین

پروتئینی در لوله‌های ادراری، اتساع برخی لوله‌های ادراری و اتساع فضای بومن و پرخونی دیده شد (تصویر شماره ۲، ج). در روده و مغز موش علائم میکروسکوپی بارزی دیده نشد. وقوع نکروز در سه ارگان کبد، طحال و کلیه در بین هفت گروه مورد آزمایش در جدول یک آورده شده است.

تجمعاتی از سلول‌های آماسی به صوت کانون‌های متعدد، جزائری از سلول‌های آماسی (نوتروفیل‌ها) در اطراف عروق، تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال و پرخون (تصویر شماره ۲، الف). مهم‌ترین علائم دیده شده در طحال تجمع سلول‌های آماسی، تخلیه لنفاوی در برخی نواحی نکروز و پرخونی بود (تصویر شماره ۲، ب). در کلیه نفریت بینابینی، نکروز و تجمع سلول‌های آماسی در پارانشیم کلیه، قالب‌های



تصویر شماره ۱- الف) بزرگی کبد ب) کانون‌های سفید رنگ روی کبد



تصویر شماره ۲- الف) نکروز و تجمع سلول‌های آماسی در کبد ب) نکروز در طحال ج) اتساع کپسول بومن و لوله‌های ادراری در کلیه (رنگ آمیزی H&E، $\times 4$).

جدول شماره ۱- وقوع نکروز در سه ارگان کبد، طحال و کلیه بین هفت گروه مورد بررسی

ارگان‌ها	موارد وقوع نکروز در گروه‌های مورد مطالعه موش							جمع
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
کبد	۱	۲	۱	۱	۰	۳	۰	۱۱
طحال	۲	۰	۱	۱	۲	۲	۰	۱۱
کلیه	۱	۲	۱	۰	۰	۱	۰	۶
جمع	۴	۴	۳	۲	۲	۶	۰	۲۸

بحث و نتیجه گیری

گوشت خام یکی از مواد غذایی است که به عنوان منشأ شیوع لیستریوز به حساب می‌آید و از آنجایی که لیستریا یک باکتری سرما دوست است و نگهداری گوشت در شرایط سرما سبب تکثیر این باکتری می‌شود باید به نقش گوشت قرمز در انتقال لیستریا توجه نمود (۱۷و۸).

به دلایل ایجاد موارد اندک بیماری در انسان توسط لیستریا ایوانووی مطالعات کمی در مورد بیماری زایی این باکتری انجام شده است ولی از آن جایی که این باکتری در دهه اخیر در چندین مورد سبب گاستروآنتریت و باکتریمی در انسان شده است آن را یک باکتری فرصت طلب برای انسان معرفی کرده و وجود این باکتری در مواد غذایی را به عنوان یک عامل خطر برای سلامتی انسان دانستند (۱۴و۴). در عین حال لیستریا ایوانووی در حیوانات از اهمیت خاصی برخوردار است. بیشترین میزان جدا شده لیستریا ایوانووی از موارد حیوانی، از سقط، مرده‌زایی و سپتی سمی نوزادی در گوسفند و گاو بوده است که نشان می‌دهد که لیستریا ایوانووی یکی از عوامل مهم سقط در حیوانات می‌باشد (۱۶).

در بررسی بیماری زایی لیستریا روش‌های مختلفی به کار رفته است. Huang و همکاران در سال ۱۹۹۰ با تست هیپاتوسیدال موش، بیماری زایی و سمیت چندین گونه لیستریا (لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانووی) را

بررسی کردند. اساس این آزمایش ایجاد تغییرات مورفولوژیکی روی محیط کشت سلولی تک لایه‌ای (Monolayer) و درصد آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز در این محیط بود (۹). Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۸، بیماری زایی لیستریای جدا شده از مواد غذایی را به وسیله سنجش LD50 در موش آزمایشگاهی و سنجش تشکیل پلاک‌های سیتوپاتیک در آزمایشگاه، بررسی کردند. در تحقیق اخیر تشخیص بیماری زایی لیستریا ایوانووی، بر حسب میزان آسیب وارده به ارگان‌های موش بود که این کار با تهیه مقاطع بافتی از ارگان‌ها و بررسی اسلایدهای حاصل از آن بود (۷).

در این زمینه، Ikeh و همکارانش در سال ۲۰۱۰، بیماری زایی لیستریاهای جدا شده از گوشت و سبزیجات را در موش آزمایشگاهی بررسی کردند که از بین لیستریاهای جدا شده تنها لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا ایوانووی در موش بیماری‌زا بودند و سبب مرگ آن‌ها در طول مدت ۵ روز شدند و بیشترین ضایعه ایجاد شده در کبد گزارش داده شد (۶).

در مطالعه Conner و همکاران در سال ۱۹۸۹، از ۲۱۸ مورد لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از مواد غذایی، ۲۰۳ مورد بیماری‌زا بودند (۵). محمدی در سال ۱۳۸۳، بیماری زایی شش سویه لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از مواد غذایی را با تزریق 10^6 cfu از باکتری مورد نظر به رت مورد بررسی قرار داد. علائم دیده شده در مغز شامل پرخونی، گلیوز و یک مورد میکروآبسه بود.

نکروز در کبد، تجمع سلول‌های آماسی در ریه و تخلیه لنفوی در در طحال دیده شد (۲).

طی تحقیق سلطانی در سال ۱۳۸۳، با تزریق 10^6 cfu لیستریا مونوسیژنر به صورت صفاقی به موش آزمایشگاهی، اغلب موش‌ها (۲۴ سر از ۳۰ سر موش) در طول دوره تیمار (۱۲ روز) تلف شدند که بیشترین تلفات در روز دوم بعد از تلقیح (۱۸ مورد) رخ داد (۱).

در این تحقیق همه پنج ایزوله لیستریا ایوانووی تا حدودی باعث ایجاد آسیب‌های بافتی در ارگان‌های موش (کبد، طحال و کلیه) شدند ولی میزان آسیب وارد شده در گروه‌های II، III و V زیاد بوده و سبب تلف شدن موش در طول دوره تیمار هم شدند. هم چنین در گروه کنترل مثبت که لیستریا ایوانووی شاخص تزریق شده بود علائم مشابهی ایجاد شد و در گروه کنترل منفی هم هیچ علائم بالینی، مرگ و میر و یا آسیب بافتی دیده نشد.

نتایج حاصل از این بررسی با گزارش‌های محمدی در سال ۱۳۸۲، سلطانی در سال ۱۳۸۳، Ikeh و همکاران در سال ۲۰۱۰، مطابقت داشت. در این تحقیق جدایه‌های لیستریا ایوانووی از گوشت قرمز مانند لیستریا مونوسیژنر، در موش بیماری‌زا بودند. با این همه هیچ ضایعه‌ای مانند گلیوز، مننژیت و یا میکروآبسه در مغز مشاهده نشد و این نشان داد که لیستریا ایوانووی برخلاف لیستریا مونوسیژنر در مغز آسیبی وارد نمی‌کند که این امر دلایل زیادی می‌تواند داشته باشد از جمله این که لیستریا ایوانووی شاید به علت نداشتن فاکتورهای چسبندگی خاص، به سیستم اعصاب مرکزی نمی‌تواند راه یابد. خون ریزی و میکروآبسه در هیچ کدام از ارگان‌های موش مطالعه شده در تحقیق اخیر دیده نشد. اما این دو علائم در ارگان‌های موش آلوده شده با لیستریا مونوسیژنر، در تحقیق سلطانی و

محمدی دیده شد که این هم به نوبه خود تفاوت علائم حاصله را در بین دو گونه لیستریا مونوسیژنر و لیستریا ایوانووی بیان می‌کند. همچنین زمان مرگ موش‌ها در این تحقیق مانند تحقیقات انجام گرفته روی لیستریا مونوسیژنر در بین روزهای دوم تا ششم بعد از تلقیح عامل رخ داده است.

نظر به این که حیوانات می‌توانند بدون نشان دادن بیماری ناقل باکتری لیستریا باشند و مواد غذایی با منشأ دامی همانند گوشت و محصولات شیر را آلوده کنند. لذا وجود لیستریا‌های پاتوژن در محصولات دامی از نظر سلامت عمومی اهمیت خاصی دارد (۶). با استناد به این و نتیجه بیماری‌زا بودن لیستریا ایوانووی جدا شده از گوشت قرمز، این نکته را باید یادآور شد که وجود این باکتری‌ها در گوشت می‌تواند به عنوان یک خطر جدی برای سلامت عموم باشد و این خود لزوم توجه هرچه بیشتر به کنترل بهداشت مواد غذایی را می‌طلبد.

منابع

۱. سلطانی، ع. (۱۳۸۲). بیماری‌زایی لیستریا مونوسیژنر در موش آزمایشگاهی. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، صفحات ۶۳-۴۳.
۲. محمدی، ن. (۱۳۸۳). بررسی بیماری‌زایی لیستریا مونوسیژنر در رت. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، صفحات ۶۴-۵۵.
۳. نسیمی، آ. (۱۳۷۶). باکتری‌شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی، موسسه نشر جهاد، چاپ اول، تهران، ۱۲۵-۱۱۴.
4. Busch, L.A. (1971). Human listeriosis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* **123**:328-32.
5. Conner, D.E., Scott, V.N., Sumner, S.S. (1989). Pathogenicity of foodborne,

- Listeria spp. Research in Microbiology* **146**: 303-13.
14. Snapir, Y.M., Vaisbein, E., Nassar, F. (2006). Low virulence but potentially fatal outcome- *Listeria ivanovii*. *European Journal of Internal Medicine* **17**: 286-7.
 15. Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology* **109**: 1597-608.
 16. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 584-640.
 17. Yücel, N., Citak, S., Onder, M. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara. *Turkey Food Microbiology* **22**: 241-5.
 - environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Food Science* **54**: 1553-6.
 6. Ikeh, M.A., Obi, S.K., Ezeasor, D.N, Ezeonu, I.M., Moneke, A.N. (2010). Incidence and pathogenicity profile of *Listeria spp.* isolated from food and environmental samples in Nsukka, Nigeri. *African Journal of Biotechnology* **9**: 4776-82.
 7. Jiang, L., Chen, J., Xu, J., Zhang, X., Wang, SH. (2008). Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in Eastern China. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 53-9.
 8. Johnson, J.L., Doyle M.P., Cassens R.G., Schoeni, J.L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 497-501.
 9. Huang, J.C., Huang, H.S., Jurima-Romet, M., Ashton, f., Thomas, B.H. (1999). Hepatocidol toxicity of *Listeria* species. *FEMS Microbiology Letters* **72**: 249-52.
 10. Kreft, J., Vásquez-Boland, J.A., Goebel, W. (1999). *Virulence Gene Clusters and Putative Pathogenicity Islands in Listeria*. In: Karper, J.B. (Ed.) *Pathogenicity Islands and Other Mobil Virulence Elements*. Washington: 219-32.
 11. Lorber, B. (1997). Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* **24**: 1-11.
 12. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **5**: 607-25.
 13. Sripio, M.T., Geoffroy, C., Dominguez-Bernal, G. (1995). The sulphHydryl-activated cytolysin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP like) haemolysis of

An Experimental Study on Pathogenicity of *Listeria ivanovii* in Mice

Hakimi alni, R.¹, Moshtaghi, H.^{2*}, karimi, I.³, Ebrahimi, A.³

1- Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

2- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

3-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord,
Shahrekord, Iran

Received Date: 12 Nov 2012

Accepted Date: 26 Jan 2013

Abstract

Pathogenicity and histopathology of five *Listeria ivanovii* isolates from sheep meat in mice were done. Swiss albino mice (18-22 g) were used as experimental animals. Three isolates were pathogenic and caused mortality within 2 to 6 days after intraperitoneal injection. The reisolation of the microorganism from different organs was done. Pathological changes in the liver, spleen, brain, kidneys and intestines were recorded.

Keywords: *Listeria ivanovii*, Pathogenecity, Mice

*Corresponding author: Moshtaghi, H.

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. Tel: 03814424426

Email: moshtaghi@vet.sku.ac.ir