تحضير مستضد اللسترين (Listerin) كأداة لتشخيص مرض Listeriosis

غازي موسى الخطيب   زينب عبد الزهرة عباس الحداد

سناريا فوزي جرجيس الحسن   سحر حسن علي القطبي

وحدة الأمراض المشتركة

كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

الخلاصة

أستهدف البحث إنتاج مستضد متخصص للكشف عن الإصابة بجراثيم اللستريا مونوسايتوجينس (Listeria monocytogenes)، لما يحيط تشخيص الإصابة بهذا المرض من غموض. تم تحضير المستضد من جراثيم L. monocytogenes ، حيث زرعت الجراثيم على أوساط زرعية ملائمة وتم تكسيرها بالأمواج فوق الصوتية.

أستخدم الفحص الجلدي لتقييم كفاءة المستخلص الذائب الناتج عن عملية التكسير، حيث جرى اختباره في حيوانات خنازير غينيا الممنعة بجراثيم L. monocytogenes على جرعتين وبواقع 0.5 ملليلتر/جرعة وبفارق زمني مقداره 10 أيام بين الجرعتين وكانت طريقة الإعطاء تحت الجلد.

اجري الفحص الجلدي على مرحلتين، بعد(10) أيام وبعد (15) يوما من جرعة الإصابة الثانية وقد جرى قراءة النتائج بعد 24 و 48 ساعة من الحقن حيث أظهرت وجود فرق تثخن واحمرار واضح في جلد منطقة الحقن بعد 24 ساعة والتي أصبحت اكثر وضوحا بعد 48 ساعة من الحقن.

Preparation of Listerin antigen as a tool for Diagnosis of listeriosis

G.M. Al - Khatib Zainab A.A. Al – Haddad
Sanaria Fawzi Al- Hissen Sahar Hassan Al- Kutbi

Unit of Zoonotic diseases, Collage of veterinary Medicine, Al-Amiria, Baghdad, Iraq.

Summary

This study was conducted to produce a specific antigen for detection L. monocytogenes infection. The antigen was prepared by culturing L. monocytogenes on suitable media and then disrupted by ultrasonicatorwaves.

The water – soluble extract of sonically disrupted Listeria were used for skin testing guinea pigs infected with ($1*10^8$ CFU / ml) of a L. monocytogenes. Two infected doses were used for immunization at intervals of (10) days between them.

Two skin tests were done, 10 days and 15 days after the 2nd infected dose. The skin test results were read after 24 & 48 hrs. which showed clear thickening differences and redness at the injection sites after 24 hrs. and become more clear after 48 hrs.

المقدمة

تعد جرثومة L. monocytogenes من الجراثيم عالية الضراوة ذات الانتشار الواسع حيث تتواجد في التربة والمياه الجارية والراكدة والأعلاف ومنتجات الألبان والأغذية المجمدة. كما تعد واحدة من جراثيم الأمراض المشتركة حيث تصيب كل من الإنسان والطيور واللبائن مؤدية إلى إصابتها أما بالتهاب الدماغ والسحايا أو الانتان الدموي أو بالتهاب الرحم والإجهاض في الإناث الحوامل (1) إذ إن نسبة الهلاك عند الإصابة بهذه الجرثومة تتراوح بين 30% – 20. كما وتسبب جرثومة L. monocytogenes التسمم

الغذائي وتعد من المشاكل الرئيسية في مجال الصناعات الغذائية في الوقت الحاضر. وأذ تلعب المناعة الخلوية (Cell mediated immunity) دوراً مميزاً عند الإصابة بهذه الجرثومة (2) لذا وضعت خطة البحث التي تناولت تحضير مستضد ذائب من كامل الجرثومة واستخدامه في تشخيص الإصابة.

المواد وطرائق العمل

1- العترة الجرثومية :- جرثومة (L. monocytogenes) مجهزة من مختبر وحدة الأمراض المشتركة في كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

2- الأوساط الزرعية المستخدمة :- مرق نقيع القلب والدماغ ، وسط اكار الدم ، وسط فول الصويا وكلها حُضرت حسب تعليمات الشركات المنتجة.

3- المحاليل المستخدمة :- محلول الفينول والمحلول الملحي المتعادل حضرت حسب طريقة (4).

4- الحيوانات المختبرية :- خنازير غينيا جهزت من شركة الكندي وكانت بصحة جيدة وجرت مراقبتها لمدة 7 أيام قبل إجراء الفحوصات عليها.

1- تحضير الجرثومة:

حضرت جرثومة (L. monocytogenes) التي استخدمت للتمنيع بعد أن جرت تنميتها على وسط مرق فول الصويا وحضنت بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة وجرى التأكد من نقاوتها بتحضير شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كرام. وتم حساب عدد الخلايا في المليلتر الواحد بطريقة (3).

2- تحضير مستضد اللسترين:

حضر هذا المستضد بالاستفادة من طريقة (5) مع إجراء بعض التحويرات عليها وكالآتي :

1- زرعت الجرثومة بعد تنشيطها وتنقيتها على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبنسبة 10:1 وحضنت بدرجة 37 ْم لمدة 24 ساعة وقد جرى التأكد من النمو الجرثومي بصبغ شريحة زجاجية بصبغة كرام وإجراء فحص الحركة بطريقة القطرة المعلقة.

2- تم اخذ 4 مليليتر من النمو الجرثومي الناتج على الوسط الزرعي أعلاه وضعت على وسط اكار الدم ووزعت على الأطباق بصورة متساوية عن طريق تحريك الأطباق وتركها لتجف ثم نقلت إلى الحاضنة. تركت في الحاضنة لمدة يومين وبعد التأكد من نقاوة الزرع الجرثومي بدأت عملية حصاد الجراثيم النامية وكالآتي :-

أ- أضيفت (5) مليليتر من محلول الفينول على كل طبق وباستخدام الناشر الجرثومي (Spreader) تم حصاد الجراثيم ووضعت في أنابيب اختبار.

ب- فصلت الجراثيم باستخدام جهاز الطرد المركزي (3000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة) جرى إهمال السائل الطافي ثم غسلت الخلايا الجرثومية مرة واحدة باستخدام المحلول الملحي المتعادل وثلاث مرات باستخدام الماء المقطر المعقم وفي كل مرة يجري إهمال السائل الطافي ثم أضيفت كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم إلى الجراثيم المترسبة.

ج- جرت عملية تكسير الجراثيم باستخدام جهاز التكسير بالأمواج فوق الصوتية (Sonicator MSE - UK) على عدة مراحل لمدة ما مجموعه 15 دقيقة ثم فصلت الخلايا التي جرى تكسيرها باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد 4 ْم وبسرعة 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وجرى الاحتفاظ بالراسب وأضيف جزء من السائل الحاوي على الخلايا المتكسرة إلى الراسب وأعيدت عملية التكسير بنفس الطريقة السابقة لمدة 30 دقيقة أخرى وذلك من اجل الحصول على تكسير كامل للخلايا.

د- فصلت الخلايا المتكسرة باستخدام جهاز الطرد المركزي وبالطريقة السابقة نفسها واخذ السائل الطافي وأضيفت إليه قطرتين من (Merthiolate) كمادة حافظة وبهذا الشكل جرى الحصول على مستضد اللسترين.

3- معايرة المستضد:

تم اختبار المستضد في حيوانات خنازير غينيا لإيجاد التخفيف الأفضل للمستضد حيث تم إجراء الفحص الجلدي بحقن عدة تخافيف من المستضد (مركز، 10/1 ، 100/1) وبجرعة (0.1) مل لكل تخفيف في ثلاثة أماكن جرى تحديدها في جلد منطقة الخاصرة.

استخدمت ثلاثة من حيوانات خنازير غينيا ، اثنان ممنعة بجراثيم اللستريا وواحد غير ممنع بوصفه حيوان سيطرة.

وقد تم قراءة النتائج بعد مقارنة سمك الجلد في منطقة الحقن قبل وبعد حقن المستضد.

4- تمنيع الحيوانات:

تم تمنيع (7) حيوانات من خنازير غينيا وذلك بحقن جراثيم L. monocytogenes تحت الجلد في منطقة طية الفخذ على جرعتين الفارق الزمني بينهما (10) أيام بواقع (0.5) مل لكل جرعة وبعدد بكتيري ($1*10^8$) خلية جرثومية / مل. وقد استخدمت حيوانات أخرى حقنت بمحلول الملح الفسلجي بوصفها حيوانات سيطرة.

5- الفحص الجلدي:

اجري الفحص الجلدي مرتين الأولى بعد 10 أيام من جرعة التمنيع الثانية وفي الجهة اليمنى من جسم الحيوان والثانية بعد 15 يوماً من جرعة التمنيع الثانية في الجهة اليسرى من جسم الحيوان الممنع وذلك لغرض معرفة مقدار التطور الحاصل في المناعة الخلوية. قبل إجراء الحقن تم قص وحلاقة شعر حيوانات التجربة في منطقة الخاصرة وجرى تحديد منطقة الحقن برسم دائرة حولها ومن ثم تم قياس سمك الجلد قبل الحقن.

اجري الفحص الجلدي بحقن حيوانات خنازير غينيا بالمستضد الذائب بجرعة (0.1) مل لكل حيوان في الجلد وقد جرى قراءة النتائج بقياس سمك الجلد بعد الحقن بـ 24 و 48

ساعة على التوالي ومقارنتها بالقراءات ما قبل الحقن لتثبيت الفرق بينهما مع قياس قطر منطقة الاحمرار الناشئة عن حقن المستضد.

النتائج

1 - نتائج معايرة المستضد:

لغرض معرفة التخفيف الأمثل لمستضد اللسترين تم إجراء التجربة المرشدة على خنازير غينيا وقد أظهرت نتائج هذه التجربة إن المستضد المركز يعطي النتائج الأفضل.

2 - نتائج الفحص الجلدي:

أ- نتائج الفحص الجلدي الأول

أشارت نتائج الفحص الجلدي الأول إلى ظهور تثخن واضح في الجلد ما لبث أن ازداد بعد 48 ساعة من حقن المستضد في الوقت الذي لم يكن قطر منطقة الاحمرار يمتلك نفس درجة وضوح فرق التثخن إذ تراوحت اقيام فرق التثخن بين 2.7 ملم في الحيوان الثالث في أعلى معدلاتها و 0.2 ملم في اقل معدلاتها في الحيوانين الثاني والخامس وذلك بعد 24 ساعة من حقن المستضدات وهذه الاقيام ما لبثت أن ارتفعت بعد حقن المستضدات بـ 48 ساعة لتتراوح بين 5.4 ملم في أعلى معدلاتها في الحيوان السادس واقل معدلاتها 0.4 ملم في الحيوان الخامس (جدول 1).

ب- نتائج الفحص الجلدي الثاني

بالرجوع إلى الجدول رقم (2) والذي يعكس نتائج الفحص الجلدي الثاني الذي اجري بعد خمسة عشر يوماً من جرعة التمنيع الثانية نلاحظ ارتفاعاً في اقيام فرق التثخن في الجلد ووضوحا اكثر في قطر منطقة الاحمرار إذ نلاحظ أن اقيام فرق التثخن في الجلد تتراوح بين 2.5 ملم في الحيوان الثاني والثالث في أعلى معدلاتها وأوطأ معدلاتها نجدها في الحيوان الرابع 0.9 ملم وذلك بعد 24 ساعة من حقن المستضد ما لبثت هذه الاقيام في مجملها أن ارتفعت بعد 48 ساعة وأصبحت تتراوح بين 1 ملم في الحيوان الخامس و 3.2

ملم في الحيوان السادس، أما عن قطر منطقة الاحمرار فنلاحظ أنها أصبحت اكثر وضوحا في الفحص الجلدي الثاني وكانت تتراوح في القراءة بعد 24 ساعة بين 0.2 ملم في الحيوان الأول والثاني والخامس و 1 ملم في الحيوان السادس وبعد 48 ساعة من حقن المستضد لوحظ أن جزءاً من القراءات ثبتت على اقيامها والجزء الأخر ارتفعت إذ أصبحت تتراوح بين 0.2 ملم في الحيوان الأول والخامس و 1 ملم في الحيوان السادس (جدول 2).

جدول رقم (1) يمثل نتائج الفحص الجلدي الأول

رقم الحيوان	فرق التثخن في الجلد / ملم		قطر منطقة الاحمرار / ملم	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	1.5	3	---	---
2	0.2	2.1	احمرار خفيف	---
3	2.7	2.7	---	---
4	0.5	1	---	---
5	0.2	0.4	---	---
6	2	5.4	احمرار خفيف	---
7	0.7	1.3	---	---

جدول رقم (2) يمثل نتائج الفحص الجلدي الثاني

رقم الحيوان	فرق التثخن في الجلد / ملم		قطر منطقة الاحمرار / ملم	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	2	3	0.2	0.2
2	2.5	2.5	0.2	0.4
3	2.5	3	0.8	0.5
4	0.9	3.1	0.5	0.6
5	1	1	0.2	0.2
6	2.2	3.2	1	1
7	1.4	2.8	0.6	0.5

المناقشة

جرثومة (L. monocytogenes) من الجراثيم اختيارية العيش داخل الخلية وهي تعد من المسببات المرضية الخطيرة لما تمتلكه من خواص تمكنها من اختراق جدران الخلايا والتكاثر داخلها.

أشارت العديد من البحوث والدراسات لدور المناعة الخلوية عند الإصابة بهذه الجرثومة والمتأتية من كون الجرثومة وبكامل التركيب المستضدي الخاص بها قادرة على أن تحفز خلايا المناعة الخلوية والتي تتم بآليتين تتداخل عناصرهما ممثلة بالمقاومة الطبيعية التي تكون العدلات وخلايا البلعم الكبير والخلايا القاتلة الطبيعية مسؤولة عنها والآلية الثانية المكتسبة والمسؤولة عنها خلايا T اللمفاوية (9,8,7,6).

جرى التخطيط لهذا البحث اعتماداً على خصائص التركيب المستضدي للجرثومة الكاملة وليس على أجزاء معينة منها والغرض من ذلك تحضير مستضد فعال ذو قابلية متخصصة للكشف عن الإصابة بمرض اللستريوسز (Listeriosis) نلاحظ أن النتائج التي جرى التوصل إليها أشارت إلى كفاءة هذا المستضد في تشخيص الإصابة أو تحسيس الحيوانات وتأكد هذا واصبح اكثر وضوحاً في نتائج الفحص الجلدي الثاني الذي أجري بعد جرعة التمنيع الثانية لخمسة عشر يوماً ويتفق هذا مع الباحثين (11,10) اللذين أشارا أن جدار الخلية لها القدرة على تنشيط خلايا البلعم الكبير والخلايا المتعددة كما ويتفق مع ما أشار إليه (12) لكون متعدد السكريدات له تأثير مستضدي عالي وأيضاً لأن الببتايدوكلايكان يمتلك قوة العامل المساعد المسؤول عن فرط الحساسية المتأخر كما ويجب أن لا نغفل تأثير

المستضدات الجسمية الأخرى مثل Lipoteichoic acid والذي قد يمثل محدداً مناعياً كيمياوياً جيداً ويسبب تطور المناعة الخلوية وهذا يتوائم مع نتائج العديد من الباحثين (16,15,14,13) وأيضا فأن الجرثومة تمتلك المستضد السوطي والذي يمكن وجوده في كل أنواع اللستريا ويعمل كأحد المحفزات المناعية القوية ويتفق هذا مع ما أشار إليه (17).

لاحظ (18) وجود بروتينات على سطح الخلية لها ارتباط وثيق بمرضية الجرثومة منها بروتين Actin A الموجود في قطب الخلية وبروتين الانترنالين الموزع على سطح الخلية واللذان يؤديان لاستجابة مناعية خلوية وخلطية. أن جميع هذه البحوث والدراسات تشير إلى أن جسم الخلية الكامل يؤدي إلى تحفيز الاستجابة المناعية واعتماداً على هذه الأفكار جرى تحضير المستضد الخاص بهذا البحث بعده مستضداً حاوياً على اغلب المحددات الأنتيجينية الخاصة بالجرثومة وبالنتيجة فأنه يساعد بصورة كبيرة على كشف الإصابة بهذه الجرثومة.

هنالك بعض البحوث تشير إلى دور الأنزيمات والسموم التي تنتجها هذه الجرثومة والتي أشارت الكثير من المصادر العلمية إلى قابليتها على تحفيز الاستجابة المناعية مثل:- Haemolysin, Lecithinase, Phospholipase, Listeriolysin, (19). وهذا ما يتعارض مع نتائج هذا البحث إذ أشار (22,21,20). إلى وجود ذيفان خارجي يطلق عليه Listeriolysin O تنتجه هذه الجراثيم ويكون ذو قابلية مناعية عالية ويمكن أن يستخدم كمستضد نقي لتشخيص الإصابة بمرض اللستريا سواء باستخدام الفحص الجلدي للكشف عن

فرط الحساسية المتأخر أو باستخدام الفحوصات المصلية مثل فحص الاليزا للكشف عن الأجسام المضادة.

من كل ما تقدم يمكن القول بأن المستضد Listerin الذي جرى تحضيره يعد مادة حاملة لأغلب عناصر الضراوة التي تمتلكها هذه الجرثومة والتي من الممكن أن تكون عوامل محفزة للجهاز المناعي لكي يبدأ بالمقاومة وبالتالي تستطيع هذه المادة أن تكشف هذه المقاومة المتأتية من إصابة الكائن الحي بجراثيم اللستريا.

References

1- Rouquette, C. & Berch, P. (1996): The pathogenesis of infection by Listeria monocytogenes. Microbiologia. 12. 245-258.

2- Schlech, W.F. (1996): pathogenesis & immunology of Listeria monocytogenes. Pathol. Biol. Paris. 44. 775-782.

3- Miles, A.A; Misra, S. S; and Irwin. J. O. (1983): The estimation of bactericidal power of blood. J. Hyg. 38: 732-749.

4- Hudson, L. & Hay, F.C. practical Immunology, 2nd edition (1980). Blackwell scientific publications. Pp. 328-340.

5- Halliburton, B. L. & Blazkovec, A. A. (1975): Delayed hyper sensitivity and acquired cellular resistance in guinea pigs infected with Listeria monocytogenes. Infect. Immun. 11. 1-7.

6- Mcgregor, D. D & chen- woan, M. (1984): The cell response to Listeria monocytogenes is mediated by heterogenous population of immuno specific T-cell. Clin. Inves. Mcd. 7. 243.

7- North, R. J. (1975): Nature of memory in T-cell mediated anti-bacterial immunity: anamenstic production of mediator T-cell. Infect. Immun. 12. 754-760.

8- Mielk, M; Niedobitek, G.; stein. H; & Hahn, H. (1989): Acquired resistance to Listeria monocytogenes is mediated by lyt - 2^+ T-cell

independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. J. Exp. Med. 170. 589-594.
9- Harty, J. T. & Bevan, M. J. (1999): Responses of CD^{+}_{8} T-cells to intracellular bacteria. Curr- Opin. Immunol, 11.89-93.
10- Cohen. J. J; Gilberto, E; Rodriguez, P. D. K; & Campbell. P. A. (1975): listeria cell wall fraction AB cell mitogen. J, Immunol. 114. 1132-34
11- Campbell, P. A;sehuffler, C; & Rodriguez, G. C. (1976): Listeria cell wall fraction; AB cell adjuvant. J. Immunol. 116. 590-594.
12- Roots, E. & Strauch, D. (1958): Listeriolisin. P.18. Paul parey in Berlin and Hamburg.
13- Fiedler, F; Seger, J. & Ruhl, G. J. (1984): The biochemistry of murine & cell wall teichoic acids in the genus Listeria monocytogenes. Syst. App. Microbiol. 5. 360-376.
14- Afanso, L. C; Scharton, T. M; Vicira, Q. L.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; & Scott, P. (l994): The Adjuvent effect of inter leukin- 12 in avaccine against leishmania major. Science. 263. 235 - 236.
15- Cleveland, M. G.; Gorhan. J. D.; Murph. T. L.; Tuomanen, E. T.; & Murphy,K. M. (1996): Lipotechoic & Preparation of gram – Positive bacteria induce interlukin - 12 through a CD_{14} - dependent pathway. Infect. Immun. 64. 1906.
16- Dai, J. W.; Bartens, W.; Kohler. G.; Hufnagel, M.; Kopf & Brombacher, F. (1997): Impaired macrophages Listericidal and cytotoxin activities are responsible for the rapid death of Listeria monocytogenes infecied IFN - receptor deficient mice. J. Immunol. 158. 5297.
17- SeeLiger,H. P. R. & Hohn, K. (1979): Serotype of Listeria monocytogenes and related species. Methods in Microbiology. Vol. 13, eds Bergan, T.; Norris, J. R. Academic Press - London. PP. 31 - 49. cited by peel, M. ; Donachie , W. and shaw , W. (1988b) : Physical & antigenic heterogeneity in the flagellin of

Listeria monocytogenes and ivanovii. J. Gen. Microbial. 134. 2593 - 98.

18- Sheehan, B. C.; Kcoks, S.; Dramsi, S.; Gouin, E.; Klarsfeld. A. D.; Menguao, J.; Cossard, P. (1994): Molecular and genetic determinant of the Listeria monocytogenes infection process. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 192. 187-16.

19- Schwarzkopf، A. (1996): Listeria monocytogenes: aspects of pathogenicity. Pathol. Biol. Paris. 44. 769-774.

20- Berche, P.; Gaillard, J. L.; Geoffroy, C. J.; Alouf, J.E. (1987a); T-cell recognition of listeriolysin is induced during infection Listeria monocytogenes. J. Immunol. 139. 3813-3821.

21- Baetz, A. L.; Wesley, I. V.; stevens, M. G. (1996): The use of listeriolysin O in an Elisa, askin test & alymphocyte blastogenesis assay on sheep experimentally infected with Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii or Listeria innocua. vet. Microbial. 51. 151-159.

22- Barbuddhe, S. B.; Malik, S.V. S; shomer, B; Gupta, L. K. (1999): Cytotoxic T-cell, delayed type hyper sensitivity and listeriolysin O in experimental bovin listeriosis. Vet. Microbial. 64. 333-341.