Study the invasion activity of Listeria monocytogenes isolated from women with repeated abortion by cell line technetion

دراسة القابلية الاجتياحية لجرثومة Listeria monocytogenes المعزولة من النساء المجهضات باستعمال تقنية الزرع النسيجي

د.وفاء صادق ألوزني
كلية العلوم/جامعة كربلاء

البحث مستل من أطروحة اشرف عليها الباحث

الخلاصــة

تم التحري عن جرثومة*Listeria monocytogenes*في 109 عينة سريرية تمثلت بمسحات المهبل العليا (High vaginal swabs) وعينات المشيمة (Placenta) في النساء المجهضات. حيث عزلت بنسب اصابة تمثلت بـ 2.43% من كل مسحات المهبل العليا البالغة 82 عينة و 3.80% من كل عينات المشيمة البالغة 27 عينة. زرعت العزلات التي تم الحصول عليها على الأوساط الانتقائية والتفريقية وتم تشخيصها كيموحيويا" كما اختبرت حساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة إذ أظهرت تلك العزلات مقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد ، فقد كانت جميعها حساسة لكل من المضاد الحيوي الامبسلين (Ampicillin)والجنتامايسين (Gentamicin) ، في حين كانت جميعها مقاومة لحامض الناليديكسيك (Naldixic acid).

أظهرت النتائج وجود اختلاف في قابلية العزلات الجرثومية على اجـتياح المزارع النسيجية أحـادية الطبقة الخاصــة بالخلايا الظهارية السرطانيــة لحنجرة البشر (Human carcinoma larynx epithelial cell (Hep – cell) من خلال الاختلاف في لوغاريتم العدد الجرثومي الحي المسترد من تلك الخلايا فقـــــــد استردت العزلة (Lis-3) المحصل عليها من نسيج المشيمة بأعلى عدد لوغاريتمي من المزارع النسيجية والبالغ (4.71) بينما استردت العزلتين (Lis-1) و (Lis-2) المحصل عليها من مسحات المهبل العليا(3.35)(3.88) على التوالي ، بينما مثل (2.91) لوغاريتم العدد الجرثومي المسترد من العزلة (Lis.S1) .

Abstract

The study was achieved to investigate the ***Listeriamonocytogenes*** in clinical samples such as high vaginal swabs and placenta samples from women with repeated abortion . ***L. monocytogenes***was isolated in percentage of (2.43%) from high vaginal swabs samples and (3.8 %) from placenta samples .The isolated bacteria were diagnosed on the basis of morphology & biochemical reaction. The susceptibility of isolates to different antimicrobial agent was also studied. It appeared that all isolates were totally resistant to Nalidixic acid but they were totallysensitivetoAmpicillinand Gentamicin

In this study determined the invasion activity of isolated bacteria to human epithelial cell line by count the log number of bacteria cell isolates from these cell line after infection by each one of isolated bacteria. The result show that (Lis3) which isolated from placenta give high log number(4.71) followed by the log number of (Lis1) and (Lis2) (3.88) and(3.38) respectively, which obtained from high vaginal swabandlognumberof(LisS1)(2.91).

المقدمة

تتميز جرثومة *Listeria monocytogenes*بأمكانية تنميتها في بعض الأوساط الزراعية الاعتيادية ، فعند تنميتها على وسط زرعي اعتـــــــــــيادي كوسط الغراء المغذي (Nutrient agar) تظهر مستعمراتها بعد (24-48) ساعة بشكل دائرة شفافة مائية القوام ذات حافة كاملة الاستدارة شبيهة بقطرات الندى0وصفت جرثومة *Listeria monocytogenes* مجهريا" بأنها جرثومة موجبة لملون غرام غير مكونة للابواغ والكبسولة ، متحركة وذات شكل عصوي قصير يتراوح طولها مابين0 تتخذ جرثومة الليستريا إشكالا متعددة (Pleomorphic) حسب أماكن تواجدها ونموها فقد توجد بشكل خلايا عصويـة منفردة وعلى هيئــة سلاسل قصيـرة مرتبة على شكل حـرف (V أو L) أو بشكل مكورات مزدوجـة (Diplococci) (1)0

تعد جرثومة*Listeria monocytogenes* واحدة من الجراثيم القادرة على البقاء والتكاثر في مدى واسع من الظروف البيئية المتغايرة حيث تتميز بأنها هوائـــية أو لاهوائيـــة اختيـــارية (Aerobic or Facultative anaerobic) في حين عدها البعض من الأنواع ذات الاحتياج القليل للأوكسجين (Microaerophilic) لكــن معظم البحوث توصلت إلى إن جرثومـة الليستريا تنمو

بصورة أفضل تحت الظروف الهوائية كما تظهر جرثومة الليستريا قابلية عالية للنمو بمدى حراري واسع يتراوح مابين (4-45 مْ) 0إن لقدرة جرثومة *L. monocytogenes* على البقاء في الطبيعة فضلا" عن قابليتها على النمو بدرجة حرارة (4 م) ساعدها على البقاء والتكاثر في مختلف أنواع الأغذية مثل الحليب الخام، الخضروات ، اللحوم الحمراء والبيضاء ومختلف الأغذية البحرية الملوثة بها (2) .

وقد سبب كون هذه الجرثومة واحدة من الجراثيم شائعة الوجود في كل من التربة والماء وحتى في القناة المعوية للحيوانات الداجنة ، تعرض كل من العاملين في المسالخ والمزارع ، النساء الحوامل ، الأطفال حديثي الولادة وكبار السن بالإضافة إلى المرضى ضعيفي الجهاز المناعي مثل مرضى السرطان والسكري إلى الإصابة بجرثومة الليستريا عن طريق تناول الأطعمة الملوثة بها(3) حيث تظهر أعراض الإصابة عادة بعد مرور 11-70 يوما" من تناول الأطعمة الملوثة بها والتي تتمثل باضطراب معوي حاد مشابه لبقية الإمراض المنتقلة مع الغذاء (4) ، إما في النساء الحوامل فتظهر أعراض مشابه لأعراض الإصابة بالأنفلونزا مع حمى وتقيؤ وغثيان وإسهال منتهية بالإجهاض (Miscarriage) ،الولادة المبكرة للجنين (Premature labor) أو موت الجنين (Still birth) عند عدم السيطرة على الإصابة وعبور الجرثومة حاجز المشيمة (5) .

كما إن جرثومة *L. monocytogenes* المحمولة بواسطة الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage) ستنتقل من الأمعاء إلىالأعضاء الأخرى مثل الكبد والطحال والعقد اللمفية بواسطة الدم أو اللمف حيث تقتل اغلب الجراثيم الداخلة إلى الكبد بواسطة الخلايا البلعمية الكبدية Kupffer cells وبسبب حالة الضعف في الجهاز المناعي خصوصا" النقص في الخلايا اللمفية التائية (T cell) التي يعاني منها المرضى ضعيفي الجهاز المناعي والنساء الحوامل تصبح جرثومة *L. monocytogenes* قادرة على التضاعف في الخلايا الكبدية والخلايا البلعمية بعد حوالي 2-5 أيام من بدء ألإصابة وعند عدم السيطرة على الإصابة ستنتقل الجرثومة وهي داخل الخلايا البلعمية مع مجرى الدم إلى العديد من الأعضاء الأخرى كالدماغ والرحم (6و7) وذلك بسبب قدرتها العالية على اختراق الحواجز الثلاثة الرئيسية في جسم المضيف وهي الحاجز المعوي (Intestinal barrier) وكلا" من حاجزي الدم - الدماغ (Blood brain barrier) والمشيمة (Placenta barrier) في المرأة الحامل مؤدية بذلك إلى تطور التهاب السحايا (Meningitis) و الدماغ (Encephalitis) فضلا" عن موت الجنين عند النساء الحوامل (8)0 إما عند حصول الإصابة في النساء الحوامل اللاتي يعانين من نقص في الاستجابة المناعية الخلوية نتيجة للاختلال بالمعدلات الهرمونية من جهة وعملية الضعف المناعي الذي يحدث في جسم المرأة الحامل لتجنب عملية رفض الجنين وضمان بقائه داخل جسم الأم من جهة أخرى (9، 10)0 وبما إن المناعة المؤثرة ضد الإصابة بجرثومة الليستريا تعتمد بصورة رئيسية على المناعة الخلوية المتضمنة إفراز العديد من الوسائط الكيمياوية بواسطة الخلايا اللمفية التائية المساعدة (T-helper cell) والتحليل المباشر للخلايا المصابة بواسطة الخلايا التائية السامة (Cytotoxic T cell) فان الخلل الحاصل بتلك الاستجابة سيساعد جرثومة الليستريا على عبور حاجز المشيمة مؤديا" إلى إصابة الجنين وظهور أعراض الإصابة بالسحايا والتهاب الدماغ بعد 14 يوم من ولادته (11) .

المواد و طرائق العمل Material and Methods

1 جمع العينات السريرية

تم خلال الفترة من شهر تشرين الأول 2004 ولغاية شهر أب 2005 جمع 82 مسحة مهبل عليا (High vaginal swab) من 82 امرأة مجهضة اللاتي يعانين من الإجهاض المتكرر ، تراوحت أعمارهن ما بين 19-40 سنة وبواقع ثلاث مسحات مهبل عليا لكل امرأة مجهضة . كما تم جمع 27 عينة مشيمة (Placenta) من النساء المجهضات حال وصولهن إلى صالات العمليات في كل من مستشفى ابن سيف للنسائية والتوليد / بابل ومستشفى الولادة والأطفال / بابل بالإضافة إلى العديد من العيادات والمختبرات الطبية الخاصة في محافظة بابل0 حيث تم التعامل مع العينات كما يلي

0A مسحات المهبل العليا

قسمت مسحات المهبل العليا إلى ثلاث مجاميع حيث وضعت المسحة الأولى لكل مريضة في الأنابيب الحاوية على 10 مليلتر من وسط Listeria enrichment broth إما المسحة الثانية فقد وضعت في الأنابيب الحاوية على وسط Modified Fraser broth (MFB)في حين زرعت المسحة الثالثة مباشرة على الإطباق الحاوية وسط Oxford agar وسط غراء تربتك الصويا وخلاصة الخميرة الحاوي 5% دم بشري . حضنت الإطباق والأنابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة بعدها نقل عدد من المستعمرات النامية وما يقارب 0.1 مليلتر من العالق الخلوي في الأنابيب المحضونة على سطح وسط Oxford agar ووسط Palcam agar وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ولوحظ نمو الجراثيم (12).

0Bعينات المشيمة

قطعت الكتلة النسيجية (Autopsy) المأخوذة من المشيمة إلى قطع صغيرة يتراوح وزن الواحدة منها مابين 15-20 غرام حيث أخذت القطع القريبة من الحبل السري ووضعت في أنبوبة معقمة ذات غطاء محكم . ثم غسل النسيج جيدا" باستعمال المحلول الملحي المعقم بتركيز 0.85% بعدها أضيف 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي إلى قطعة المشيمة المأخوذة وتم مجانستها (Homogenize)وذلك بتحريك قطعة المشيمة مع المحلول الملحي وبسرعة باليد بدون استخدام خلاط كهربائي واستمرار التحريك لمدة 10 دقائق ثم حضرت سلسلة من التخافيف الثنائية لعالق المشيمة الأصلي (Original suspension)وذلك بأخذ 0.5 مليلتر من عالق المشيمة وإضافته إلى الأنابيب الحاوية على 0.5 مليلتر من وسط مرق نقيع القلب والدماغ المضاف له 1% كلوريد الليثيوم وبهذا يتم الحصول على التراكيز (1:2 – 1:128) عندها نشر 0.1 مليلتر من كل تخفيف على الإطباق الحاوية

وسط أغار تربتون الصويا ووسط أغار ليستريا الانتقائي الأساس وبمعدل طبقين لكل تخفيف وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 26 م و 37 م لمدة 24 ساعة .
لوحظ شكل وعدد المستعمرات النامية على الأطباق الصلبة ثم نقل عدد من المستعمرات على الأوساط المذكورة بعد الحضن إلى الأنابيب الحاوية على وسط مرق فراسر المحور (MFB) وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة تتراوح من 24-48 ساعة . نقل بعدها 0.1 مليلتر من وسط (MFB) إلى وسط Palcam agar وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة كما ترك العالق الأصلي للمشيمة بدرجة حرارة 4 م لمدة 7 أسابيع على إن تكرر عملية التخفيف لعالق المشيمة الأصلي المخزون أسبوعيا" (12)0

2-تشخيص الجرثومة

تم التشخيص الأولي للجرثومة بعد إجراء كافة الفحوصات البايوكيمياوية التشخيصية الأولية في المختبر. وبالمقارنة مع النتائج المرجعية المبينة في (13)0

03 اختبار حساسية الجرثومة للمضادات الحيوية المختلفة

اختبرت حساسية جرثومية *Listeria monocytogenes* للمضادات الحيوية المختلفة على وفق طريقة (14) . وقرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط ومقارنتها بالجداول القياسية المحددة من قبل أطلس وجماعته (15)

04تحديد القابلية الاجتياحيةلعزلات جرثومة *L. monocytogenes* باستعمال تقنية الزرع النسيجي

اجري هذا الفحص وفق ماجاء في (17 ,16) وعلى النحو التالي :

A- تم الحصول على العالق الخلوي من الخلايا الظهارية السرطانية لحنجرة البشر Human carcinoma larynx epithelial cell (Hep-cell)) بصورة جاهزة ومنشطة وبتركيز 1×10^6 خلية/ مليلتر في وسط RPMI 1640) من مركز التقنيات الإحيائية /جامعة النهرين.

B– زرعت كل عزلة من عزلات جرثومة *L. monocytogenes* في 250مليلتر من وسط نقيع القلب والدماغ وحضنت لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 37مثم نبذ المزروع الجرثومي بالمنبذه المبردة بسرعة 6000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة 4 م غسلت الخلايا المجموعة مرتين باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي ذو الباء هاء 7.2, وأخيرا" علق الراسب بكمية مناسبة من دارئ الغسل نفسه ليعطى امتصاصية قيمتها 1 بجهاز المطياف وعلى طول موجي 600 نانومتر .للحصول على عالق جرثومي بتركيز 1×10^9 خلية / مليلتر ثم خفف تخفيف عشري للحصول على التركيز 1×10^8 خلية /مليلتر .

C- نقل0.1 مليلتر من العالق الخلوي المذكور في الفقرة (A) إلى كل حفرة من حفر صفيحة الزرع النسيجي (Multi-well plate) ثم حفظت الصفيحة لمدة 24-48 ساعة في الحاضنة بدرجة حرارة 37م وبوجود 5% غاز ثاني اوكسيد الكاربون (CO_2) . بعد التأكد من وجود النمو الخلوي تم إضافة 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي الخاص بكل عزلة من العزلات الجرثومية المحضرة وفق الفقرة (B) إلى كل حفرة من حفر الصفيحة وبواقع 5 مكررات للعزلة الواحدة بحيث تكون نسبة الخلايا الجرثومية إلى الخلايا الجسمية الحية 1:100 خلية جرثومية /خلية جسمية. تركت المزارع النسيجية بالحاضنة بدرجة 37 م لمدة ساعتين عندها غسلت الخلايا مرتين باستعمال محلول دارئ الفوسفات الملحي . بعدها أضيف0.1 مليلتر من محلول المضاد الحيوي جنتامايسين إلى كل حفرة من حفر الصفيحة الخلوية وتركت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة 20- 25 م. بعدها غسلت الصفيحة الخلوية باستعمال محلول دارئ الفوسفات الملحي عدة مرات . أخيرا" علقت خلايا كل حفرة باستعمال 0.1 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي وذلك من خلال القيام بعملية التحريك الميكانيكي باستعمال ماصة باستور (Pasteur pipette) .عندها حضرت 4أنابيب معقمة في كل منها 0.9 مليلتر من ماء مقطر معقم بارد لكل حفرة من حفر الصفيحة الخلوية .ونقل حجم 0.1 مليلتر من العالق الخلوي إلى الأنبوب الأول ورج بشكل جيد ثم عملت سلسلة التخافيف العشرية بنفس الطريقة . بعدها نقل 0.1 مليلتر من كل أنبوب إلى سطح وسط أغار تربتون الصويا وخلاصة الخميرة . وباستعمال الناشر الزجاجي المعقم نشر العالق جيدا" وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .عندها تم حساب عدد المستعمرات الجرثومية النامية وسجلت النتائج بعد زرع الجراثيم النامية على الأوساط الانتقائية وعمل بعض الفحوصات التشخيصية كعمل مسحة ملون غرام وفحوصات الحركة والكاتالاز وغيرها .

5- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم تحليل النتائج وفق التصميم العشوائي الكامل Complete randomized design باستخدام اختبار (F) للاستدلال على المعنوية واستخدام اقل فرق معنوي (Significant difference test (LSD) لإظهار معنوية النتائج . كما تم حساب الانحراف المعياري ((Standard deviation (SD) لهذه البيانات (18) .

النتائج والمناقشة

01عزل وتشخيص العزلات الجرثومية

أظهرت نتائج الدراسة الحالية الحصول على عزلتين 2 (2.43%) فقط من جرثومة *Listeria monocytogenes* من كل عينات المهبل العليا (High vaginal swabs) البالغة 82 عينة والتي أعطي لهما الرمز(Lis-1 ,Lis-2) وعزلة واحدة فقط 3.7 % من كل عينات المشيمة (Placenta) البالغة 27 عينة وأعطى لها الرمز(Lis -3) جدول (1) 0كما حصل أيضا" على عزلة واحدة من تلك الجرثومة من (مختبر الصحة المركزي / بغداد) والتي أعطيت الرمز (Lis- S1) .
لوحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية صعوبة عزل جرثومة *L.monocytogenes* من العينات السريرية المختلفة ، توافقت هذه النتيجة مع الدراسة المسحية التي قام بها بعض الباحثين للفترة من 1971 ولغاية 1997 والتي أثبت فيها قلة أعداد هذه الجرثومة

المعزولة من العينات السريرية المختلفة 11% مقارنة بنسبة عزلها العالية 83 % من المصادر البيئية والغذائية المختلفة (17) .

عزى العديد من الباحثين العلاقة العكسية بين القدرة العالية لجرثومة الليستريا لإصابة المشيمة المقرون بموت الجنين وقلة عزلها من هذا النسيج لقابلية الجرثومة الواضحة لاجتياح وعبور حاجز المشيمة وإحداث الإصابة فيه بفعل ماتمتلكة من عوامل اجتياحية مهمة كبروتين Internalin B (الذي يتميز بدوره الفعال في عبور الجرثومة للخلايا البطانية المبطنة للحبل السري في الإنسان) إلى جانب الانخفاض الواضح في نسبة الخلايا التائية المساعدة (T- helper cells) ونظام المتمم ضمن نسيج المشيمة لتجنب رفض الجنين ، كما إن لقدرة الخلايا اللمفية السامة (Cytotoxic T cells) الموجودة بنسب مرتفعة ضمن نسيج المشيمة على تحليل الخلايا المصابة بجرثومة الليستريا بسرعة وإثارة العديد من التفاعلات المناعية الحادة ضمن هذا النسيج الأثر الواضح في قلة عزل تلك الجرثومة من ذلك النسيج وأحداث الإجهاض (19،21،20)

أما صعوبة عزل جرثومة الليستريا من 144 مسحة مهبل لنساء يعانين من الإجهاض المتكرر فقد أرجعها الباحثين إلى البيئة الحامضية في منطقة المهبل بسبب وجود جرثومة *Lactobacillus* التي تعد النبيت الطبيعي المهم في تلك المنطقة والتي تتميز بقابليتها العالية على إنتاج Bacteriocin والأحماض العضوية التي تعد من المثبطات لنمو جرثومة الليستريا والجراثيم الملوثة الأخرى في تلك المنطقة فضلا" عن عمليات الإزاحة الميكانيكية الناتجة من حالة النزف الدموي التي تعاني منها المرأة المجهضة (22).

جدول (1): عدد العزلات والنسبة المئوية لعزل جرثومة*Listeria monocytogenes* من العينات السريرية.

مصدر العزل	عدد العينات الكلي	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل
مسحات المهبل العليا High vaginal swab	82	2	% 2.43
المشيمة Placenta	27	1	% 3.80
المجموع الكلي	109	3	% 2.3

النسبة المؤوية توضح نسبة عدد العزلات من العدد الكلي للعينات لكل مصدر عزل

02اختبار صفة حساسية عزلات جرثومة *Listeria monocytogenes* للمضادات الحيوية

اختبرت قابلية عزلات جرثومة *L. monocytogenes* المحصل عليها من خلال هذه الدراسة على مقاومة مختلف المضادات الحيوية ، حيث أظهرت هذه العزلات تباينا" واضحا" في نمط مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة فضلا" عن قابلية بعض العزلات لمقاومة أكثر من مضاد حيوي واحد . فقد ظهر وبوضوح من خلال النتائج المحصل عليها في هذه الدراسة إن كل العزلات كانت مقاومة لكل من المضاد الحيوي الباستراسين وحامض الناليديكسيك ، في حين كانت جميعها حساسة للمضاد الحيوي الامبسلينوالجنتامايسين . كما اختلفت قابلية هذه العزلات واحده عن الأخرى في نمط حساسيتها ومقاومتها لباقي المضادات الحيوية المستعملة (جدول2) .علل العديد من الباحثين التباين الظاهر في حساسية ومقاومة عزلات جرثومة *L. monocytogenes*للمضادات الحيوية المختلفة لكون هذه الجرثومة تتميز بقدرتها على اكتساب الجينات المسؤولة عن المقاومة من مصادر خارجية محددة وباستعمال العديد من العوامل الجينية المتحركة (Mobile genetic elements) مثل الجينات المنتقلة الذاتية (Self transferable gene)والبلازميدات المتحركة (Mobilizable plasmids) (23،24)

جدول (2):حساسية ومقاومة عزلات جرثومة*L. monocytogenes* للمضاداتالحيوية

المضاد الحيوي	Lis-1	Lis-2	Lis-3
ارثرومايسين	R	S	R
امبيسلين	S	S	S
اموكسيلين	S	R	R
ترايموكسازول	S	S	R
تتراسايكليين	S	S	S
جنتامايسين	S	S	S
حامض النالديكسك	R	S	R
ستربتومايسين	S	S	R
لينكومايسين	S	S	R
كليندامايسين	S	S	R
كلورامفينيكول	S	R	S
نيومايسين	S	R	R
الباستراسين	R	R	R

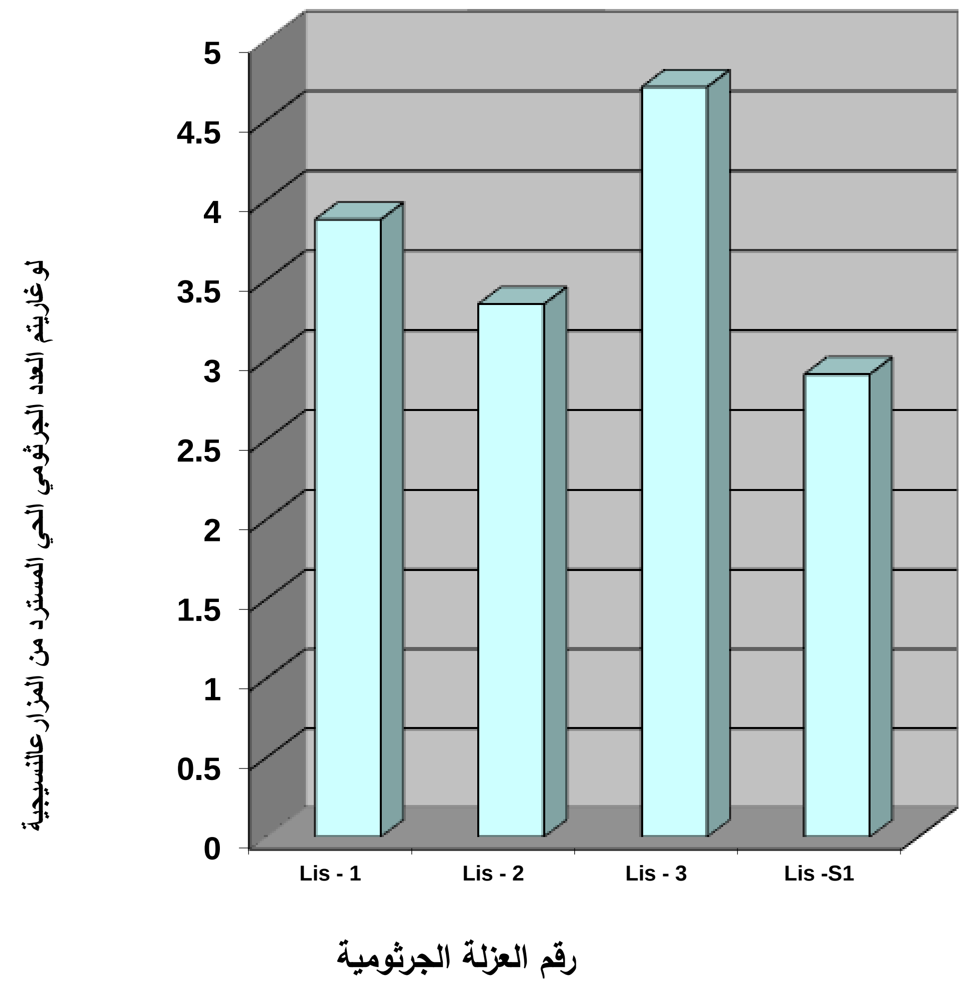
R مقاومة
S حساسة

03 دراسة القابلية الاجتياحية لجرثومة *Listeria monocytogenes*باستعمال المزارع النسيجية .

اختبرت قابلية عزلات جرثومة *Listeria monocytogenes* المحصل عليها في هذه الدراسة على اجتياح المزارع النسيجية أحادية الطبقة الخاصة بالخلايا الظهارية السرطانية لحنجرة البشر Human carcinoma larynx epithelial cell) (Hep – cell)، حيث أظهرت النتائج وجود اختلاف في قابلية العزلات الجرثومية على اجتياح تلك المزارع النسيجية من خلال الاختلاف في لوغاريتم العدد الجرثومي الحي المسترد من تلك الخلايا بعد إصابتها و تحليلها لحساب عدد الجراثيم الداخلة فيها شكل (1) .

إن العزلة (Lis-3) استردت بأعلى عدد لوغاريتمي من المزارع النسيجية والبالغ(4.71) ، في حين بلغ لوغاريتم العدد الجرثومي الحي المسترد لكل من العزلتين (Lis-1) و (3.35)(3.88)(Lis-2) على التوالي ، بينما مثل (2.91) لوغاريتم العدد الجرثومي المسترد من العزلة (Lis.S1) ، الشيء الذي أكد القدرة الاجتياحيه العالية التي تتميز بها العزلة (Lis-3) مقارنة بالعزلات الجرثومية الأخرى خصوصا" العزلة (Lis.S1) التي كانت نسبة استردادها من المزارع النسيجية قليلا" بصورة عامة .

استخدمت العديد من المزارع النسيجية لتحديد القابلية الاجتياحيه لجرثومة *L. monocytogenes* مثل المزارع النسيجية الخاصة بالخلايا الكبدية (Hepatocyte cells)والظهاريه(Epithelial cells) حيث تم اختيار تلك المزارع النسيجية اعتمادا" على وجود مستقبلات خاصة لنوع بروتيني خاص على سطح خلايا تلك الجرثومة يدعى Internalin B الذي يلعب دورا" مهما" في اجتياح جرثومة الليستريا للأنسجة البشرية المختلفة (25) حيث تعمل تلك الجراثيم على إنتاج بروتين Internalin B بكمية كبيرة عند وجودها داخل خلايا المضيف وذلك لزيادة القدرة الاجتياحيه لها وعبور الحواجز المختلفة مثل حاجز المشيمة من جهة والهروب من المناعة الخلطيه المتمثلة بالأجسام المضادة والمتممات من جهة أخرى (26) .



شكل (1): تحديد العزلة الجرثومية الأكثر كفاءة في اجتياحالمزارعالنسيجي

References

1.Dallmier, A. and Martin, S. (1988). Catalase and superdismutaseactivities after heat Injury of Listeria monocytogenes . Appl. Environ.3(1): 33 -32.

2. Ahmed ,M .E. (1990). Isolation of Listeria monoclonal milk cansEgypt.T. Vet .Sci. 27. 22-28.

3. Beltra, N.; Gillern, R.; Castilloenho, A. and Valderssean, S(1991). Bacteriamicmeningoencephalitisdue to Listeria monocytogenin animmunocompetent adult . Rev. Med. Chil . 119 (4): 436- 439.

4.Sfier, J.; Bloomfield, J.; Aspillag, C. and Ferreiro, M. (1990). Early onsetneonatalsepticemia caused by Listeria monocytogenesRev. Chil.Pediat. 61:330.

5.Silver, HM. (1998). Listeriosis during pregnancy. Obstel. Gynecol. Surv.53:737-740.

6. Cossart, P. G. and Lecuit, M. K. (1998). Interactions of Listeria monocytogeneswith mammalian cell during entry and actins based movementbacterial factors cellular ligands and signaling. EMBO. J.17:3797-3806.

7. Desprez, D.; Feldman, G. and Michell, H. (1994) . Acute hepatitis causedbyListeria monocytogenes infection. Gastroenterol. Clin. Biol.18 : 516 -519.

8. Dussurget, D. S.; Pizarr, J. D.andCossart. P. H. (2004). Molecular determinants ofListeria monocytogenes virulence. Ann. Rev. Microbiol. 58: 587-610.

9. Bakardjiev ,A.; Stacy, B; Fish, S. and Portnoy, D.(2004).Listeriosisinthe pregnant guinea pig : a model of vertical transmission.Infect .Immun .72 (1) :489 -497 .

10. Marino, M.; Braun, L.; Cossartt, P. and Ghosher, P. (2000). A frameworkfor interpreting the lucine rich repeats of the Listeria internalins. PNAS.97(16):8784-8788.

11. Benshushan, A.; Tsafrir, A.; Arbell, R. M.; Rahawer, G.M.; Ariel, I. andRoj,N.M. (2002). Listeria infection during pregnancy : A (10)yearexperience .IMAJ. 4 :776 -780.

12. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmon, A. (1996) Mackie and McCartney medical microbiology. 14thed ., The Churchill livingstone.Inc. USA.

13. Baron, E. J.; Petersonee, L. R. and Finegoldens, S. M. (1995). BaileyScottsDiagnostic microbiology. 9thed.,The C.V. Mosby Company,USA.

14. Harley, J. H. and Prescott, L. F. (1996). Laboratory exercises in microbiology. 3rd.,USA.

15. Atlas , R. M.; Parks, L. C. and Brown, A. E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby. Year book, Inc. st. Louis. Baltimore.

16. Parida, S. K.; Domann, E.; Rohde, M.; Muller, S.; Darji, A.; Hain, T.; Wehhland, J. and Chakraborty, T. (1998). Internaline B is essential for adhesion and mediates the invasion of Listeria monocytogenesinto humanendothelial cells. Mol. Mic. 28(1): 81-93.

17. Hofer, E.; Ribero, R. and Feitosa, D. (2000).Species and serovars of the genusListeria isolated from different sources in Brazil from 1971to1997. Mem. Inst. Oswldo. Cruz. 95(5):615 - 620.

18- الراوي ، خاشع محمود (2000) مدخل إلى الإحصاء . الطبعة الثالثة . كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل .

19. Langman, J. (1995). Medical embryology. William and Wilkins Co. Baltimor,London.

20. Schuchat, A. J. ; Swaminathan, B. T. and Broomes, C. V. (1991). Epidemiology of human Listeriosis. Clin. Microbiol. 4 (6): 211- 213.

21. Delcorral. F.; Buchanan, L.; Benciven, M. and Cookese, P. (1990). Quantitative comparison of selected virulence association characteristics in food and clinical isolation of Listeria. J.Food. Prot. 53 : 1003-1009.

22. Embil, J. A. ; Ewan, E. P. and MacDon, S. W. (1984). Surveillance of Listeria onocytogenes in human and environmental septicemia in nova scotia, 1974 to 1981. Clin. Invest. Med. 4: 325-327.

23. Cherubin, C. E.; Applemant, M. D.; Heseltinee, P. N.; Khayren, W. andStrath, Q. (1991). Epidemiological spectrum and currentreatment ofListeriosis. Rev. Infect. Dis.13 (6): 1108 - 1114.

24. Poyart, S. C.; Carlier, C.; Cuotter, P.; Courtieu, L. and Courvalin, P. (1990).Transferableplasmid- mediated antibiotic resistance in Listeriamonocytogenes.Lancet. 335:1422-1426.

25. Dramsi, S.; Biswas, F.; Maguin, E.; Braun, L.; Materoenii, P. and Cossart, P.(1995).Entery of Listeria monocytogenes protein of the internalinmultigenefamily.Mol. Microbiol. 16: 251-261.

26. Baldwin, D. N.; Vanchina, V.; Brown, P. O. and Therio, J. A. (2002) Ageneexpression program reflecting the innate immune response of culturedintestinal epithelial cells to infection byListeriamonocytogenes. GenomeBiology. 4(1):1-24.