دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

شماره ثبت :

مدل سازی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تحت تاثیر مقادیر مختلف اسانس زنیان، دما، pH و دزهای مختلف تلقیح

به کوشش:

هانیه کیوانی راد

اساتید راهنما:

دکتر سعید خانزادی

دکتر محمد عزیززاده

استاد مشاور:

دکتر عبداله جمشیدی

تیر ماه ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

تعهدنامه

اینجانب **هانیه کیوانی راد** دوره **دکتری حرفه‌ای** ، **دانشکده دامپزشکی**، دانشگاه فردوسی مشهد، عنوان پایان‌نامه: **مدل سازی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تحت تاثیر مقادیر مختلف اسانس زنیان، دما، pH و دزهای مختلف تلقیح**

تحت راهنمایی آقای دکتر سعید خانزادی و آقای دکتر محمد عزیززاده

متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه فردوسی مشهد» و یا «Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

به نام خدا

گواهی اعضای کمیته ی پایان نامه

مدل سازی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تحت تاثیر مقادیر مختلف اسانس زنیان، دما، pH و دزهای مختلف تلقیح

به کوشش:

هانیه کیوانی راد

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی

در رشته دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته ی پایان نامه، با درجه:عالی و نمره: ۱۹/۷۵

استاد راهنما: دکتر سعید خانزادی (استادیار گروه بهداشت و مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد راهنما:: دکتر محمد عزیززاده (استادیار گروه علوم درمانگاهی، بهداشت و پیشگیری از بیماری های دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد مشاور: دکتر عبداله جمشیدی (دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان نامه: دکتر محمد محسن زاده (دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان نامه: دکتر غلامرضا هاشمی تبار (دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد)

تقدیم به

مهربانی که

همیشه

گاه حتی بی آنکه بخواهم

بهترین ها را

برایم رقم می زند.

این پایان نامه را تقدیم می کنم به دو مشعل فروزان آسمان زندگیم:

پدر و مادر عزیزم

دوستت دارم برای آنچه که هستم و برای آنچه که از من ساختی

دوستت دارم برای بخشی از وجودم که تو شکوفایش کردی

دوستت دارم چون یاری کردی که از تخته پاره های زندگی معبدی در خود بنا نهم

این همه را تو هدیه داده ای، بی هیچ کلام یا اشارتی

که نهایت عشق ورزیدن همین است....

تقدیم به فرزانه، ملیحه و سعید عزیزم

که حیاتم از لحظات شیرین و خاطرات روشن ایشان سرشار است.

تقدیم به معنای زندگیم ،همسر مهربان و فرزانه ام **جناب آقای مهندس انصاری**

که وجودش برایم همه مهر است و امید

حضور گرمش مایه روشنی وجودم

همدلی اش ،همواره مایه دلگرمی من

و سرودن از عشق بدون او هدر دادن واژه است و بس. . .

و تقدیم به **خانواده محترم** ،همسرم

به پاس تمام خوبی ها و مهربانی های بی دریغ شان

سپاس گذاری

با سپاس فراوان و بی پایان از زحمات استاد بزرگوارم **جناب آقای دکتر خانزادی** که تدوین این پایان نامه مرهون راهنمایی ها و همکاری صمیمانه ایشان بوده است.

با تشکر فراوان از راهنمایی های ارزشمند **جناب آقای دکتر عزیززاده** به پاس یاری ها و راهنمایی های بی چشمداشت ایشان.

با سپاس بسیار از **جناب آقای دکتر جمشیدی** که عالمانه در طی انجام این پایان نامه مرا یاری رساندند.

با قدردانی بسیار از **جناب آقای دکتر محسن زاده** و **جناب آقای دکتر هاشمی تبار** به پاس راهنمایی های ارزنده و حمایت های بی دریغشان.

با تشکر ویژه از **سرکار خانم مهندس خواجه نصیر** و **سرکار خانم مهندس کهن قدر** که مساعدت های ایشان در اجرای این پایان نامه راه گشا بود.

و با سپاس بسیار از دوستان خوبم در ورودی ۸۴ و ۸۵ که در طی این مسیر همواره همراه و پشتیبانم بودند و همگام با من از تمام اشک ها و لبخندها گذشتند به ویژه سونای عزیزم که بهترین خاطرات دوره دانشجویی را در کنار او سپری نمودم.

چکیده

مدل سازی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تحت تاثیر مقادیر مختلف اسانس زنیان، دما، pH و دزهای مختلف تلقیح

به کوشش:

هانیه کیوانی راد

لیستریا مونوسایتوژنز به عنوان یک پاتوژن غذایی نوظهور شناخته می شود که سبب بیماری لیستریوزیس در انسان و حیوان می گردد. این بیماری با عوارضی هم چون مننژیت، آنسفالیت و سپتی سمی همراه است.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات اسانس زنیان (۰، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳و۰/۰۶٪)، دما (۱۵ °C، ۲۵°C و۳۵°C)، pH (۵/۵، ۶/۵ و۷/۳) و دز تلقیح (10^{1} cfu ml^{-1} 10^{4} و10^{6}) بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در محیط BHI براث است. در این تحقیق در مجموع ۷۲ حالت و برای هر حالت ۳ تکرار در نظر گرفته شد و طی مدت زمان ۳۰ روز زمان تلقیح تا مشاهده کدورت برای هر حالت به طور مجزا ثبت گردید. برای دستیابی به هدف فوق، مدل بقای پارامتریک با توزیع وایبال استفاده شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به طور معنی داری ($P<0/05$) تحت تاثیر فاکتورهای در نظر گرفته شده قرار می گیرد.

فاصله زمانی تلقیح تا ایجاد کدورت، در مقایسه با حالات بدون اسانس، برای حالات با غلظت اسانس ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۶٪ به ترتیب ۱/۸۲، ۳/۴۱ و ۱۱/۱۶ برابر بود. هم چنین در مقایسه با pH برابر با ۷/۳، برای حالات با سطوح pH مساوی با ۶/۵ و ۵/۵ به ترتیب ۱/۲۶ و ۱/۷۹ برابر بود. علاوه بر این فاصله زمانی تلقیح تا مشاهده کدورت برای حالات با دز تلقیح 10^{1} cfu ml^{-1} 10^{4}، ۱/۴۴ برابر حالت های با دز تلقیح 10^{1} cfu ml^{-1} 10^{6} بوده و برای حالت های با دمای انکوباسیون ۱۵ °C و ۲۵ °C این زمان به ترتیب ۲/۲۴ و ۱/۳۸ برابر حالت های با دمای انکوباسیون ۳۵ °C بود. مدل نهایی نشان داد که تمامی متغیرهای مستقل در نظر گرفته شده با فاصله زمانی تلقیح تا ایجاد کدورت ارتباط معنی داری دارند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه و هدف پژوهش..... ۲

فصل اول: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۱- خصوصیات باکتری *لیستریا*..... ۵

۱-۱-۱- رده بندی *لیستریا*..... ۵

۱-۱-۱-۱- سروتیپ ها..... ۶

۱-۱-۱-۲- گروه بندی زیرگونه ها..... ۷

۱-۱-۲- عوامل موثر بر رشد *لیستریا مونوسایتوژنز*..... ۷

۱-۱-۲-۱- اثر دما بر رشد باکتری..... ۷

۱-۱-۲-۲- اثر pH بر رشد باکتری..... ۸

۱-۱-۲-۳- اثر ترکیبی pH و NaCl بر رشد باکتری..... ۸

۱-۱-۲-۴- اثر فعالیت آبی بر رشد باکتری..... ۹

۱-۱-۲-۵- اثر نمک بر رشد باکتری..... ۹

۱-۱-۳- عوامل حدت باکتری..... ۹

۱-۱-۳-۱- لیستریولیزین O..... ۹

۱-۱-۳-۲- اسفنگومیلیناز..... ۱۰

۱-۱-۳-۳- فعالیت تولید مونوسیت..... ۱۰

۱-۱-۳-۴- تهاجم درون سلولی..... ۱۰

۱-۱-۳-۵- خواص حرارتی..... ۱۱

۱-۲- انتشار باکتری..... ۱۱
۱-۲-۱- انتشار باکتری در محیط..... ۱۱
۱-۲-۲- انتشار باکتری در مواد غذایی..... ۱۲
۱-۳- بیماری لیستریوزیس..... ۱۳
۱-۳-۱- مقدمه..... ۱۳
۱-۳-۲- شیوع..... ۱۴
۱-۳-۳- منابع انتقال..... ۱۴
۱-۳-۴-راه های انتقال *لیستریا مونوسایتوژنز*..... ۱۵
۱-۳-۵- دوره کمون..... ۱۵
۱-۳-۶- بیماری‌زایی..... ۱۶
۱-۳-۷- علائم بالینی..... ۱۶
۱-۳-۸- آزمایشات تشخیصی..... ۱۷
۱-۳-۸-۱- جداسازی و شناسایی باکتری..... ۱۷
۱-۳-۸-۱-۱- روش‌های سریع جداسازی باکتری..... ۱۹
۱-۳-۸-۱-۲- روش‌های جداسازی و تشخیص باکتری در مواد غذایی..... ۲۰
۱-۳-۸-۱-۳- آزمایش مکمل جداسازی جهت تأیید تشخیص باکتری..... ۲۰
۱-۳-۸-۲- روش های سرولوژیک..... ۲۱
۱-۳-۸-۳- روشهای مولکولی..... ۲۱
۱-۳-۸-۳-۱- PCR (Polymerase Chain Reaction)..... ۲۱
۱-۳-۸-۳-۲- هیبریداسیون DNA..... ۲۱
۱-۳-۸-۳-۳- DNA microarrays..... ۲۲

۱-۳-۸-۴- RT-PCR ۲۲
۱-۳-۸-۵- Real-time PCR ۲۲
۱-۳-۸-۴- تقسیم‌بندی و تعیین تایپ *لیستریا مونوسایتوژنز* ۲۲
۱-۳-۹- درمان ۲۳
۱-۳-۱۰- کنترل ۲۳
۱-۴- اسانس های گیاهی ۲۳
۱-۴-۱- اسانس زنیان ۲۴
۱-۴-۱-۱- ترکیبات شیمیایی ۲۵
۱-۴-۱-۲- محل رویش ۲۵
۱-۴-۱-۳- خواص زنیان ۲۶
۱-۵- میکروبیولوژی غذایی پیشگو ۲۶
۱-۵-۱- مفهوم ۲۷
۱-۵-۲- کاربرد پیش بینی وضعیت میکروبی مواد غذایی ۲۸
۱-۵-۲-۱- HACCP ۲۸
۱-۵-۲-۲- ارزیابی خطر ۲۸
۱-۵-۲-۳- ارتباط زمان- دما ۲۸
۱-۵-۲-۴- طراحی پروتکل کارهای ازمایشگاهی ۲۹
۱-۵-۲-۵- توسعه محصولات غذایی ۲۹
۱-۵-۲-۶- آموزش ۲۹
۱-۵-۳- روش های پیش بینی وضعیت میکروبی مواد غذایی ۳۰
۱-۵-۴- مراحل انجام مدل سازی ۳۱

۱-۵-۵- طبقه بندی مدل ها..... ۳۱
۱-۵-۵-۱- روش طبقه بندی..... ۳۱
۱-۵-۵-۲- توصیف انواع مدل ها..... ۳۲
۱-۵-۶- نرم افزارهای مرتبط با میکروبیولوژی غذایی پیشگو..... ۳۲
۱-۶- مروری بر تحقیقات انجام شده..... ۳۴

فصل دوم : مواد و روش تحقیق

۲- مواد و روش تحقیق..... ۴۴
۲-۱- باکتری مورد آزمایش..... ۴۴
۲-۲- اسانس مورد آزمایش..... ۴۴
۲-۳- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس..... ۴۵
۲-۴- آماده کردن سوبسترا..... ۴۵
۲-۵- آماده سازی باکتری جهت تلقیح..... ۴۶
۲-۶- تلقیح باکتری به سوبسترا، انکوباسیون و قرائت نتایج..... ۴۶
۲-۷- آنالیزآماری..... ۴۷

فصل سوم : نتایج

۳-۱- اجزاء اسانس زنیان..... ۵۰

۳-۲-ارزیابی رشد و عدم رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۱

۳-۳- ارزیابی فاصله زمانی تلقیح باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تا ایجاد کدورت.....۵۱

فصل چهارم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۴-۱- بحث و نتیجه گیری.....۵۷

۴-۲- پیشنهادات.....۶۵

منابع.....۶۶

چکیده انگلیسی.....۷۸

فهرست جداول، تصاویر و نمودارها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: مقایسه‌ی جنس‌های *لیستریا* و *اریسیپلوتریکس*.....۶
جدول ۱-۲: محیط‌های انتخابی جامد که به طور رایج در جداسازی *لیستریا مونوسایتوژنز* مورد استفاده قرار می‌گیرند.....۱۹
جدول ۱-۳: شرایط محیطی که در آن رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* مهار می شود.....۴۲
جدول ۳-۱: اجزاء اسانس زنیان.....۵۰
جدول ۳-۲: مدل وایبال فاکتورهای مؤثر بر فاصله زمانی تلقیح تا ایجاد کدورت باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۴

تصویر ۱-۱: باکتری *لیستریا*.....۵
تصویر ۱-۲: گیاه زنیان.....۲۵

نمودار ۱-۱: راه های انتقال *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۱۵
نمودار ۳-۱: منحنی بقای کاپلان مایر برای اثر سطوح مختلف pH بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۱
نمودار ۳-۲: منحنی بقای کاپلان مایر برای اثر سطوح مختلف اسانس بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۲
نمودار ۳-۳: منحنی بقای کاپلان مایر برای اثر سطوح مختلف دما بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۲
نمودار ۳-۴: منحنی بقای کاپلان مایر برای اثر دزهای مختلف تلقیح بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....۵۳
نمودار ۳-۵: مقایسه فاصله زمانی تلقیح تا ایجاد کدورت مشاهده شده در این آزمایش و پیش بینی شده بر اساس مدل وایبال باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*.....

مقدمه

مقدمه و هدف پژوهش

لیستریامونوسایتوژنز[1] تنها پاتوژن انسانی مهم در بین هفت گونه‌ای است که اخیراً در جنس *لیستریا* شناسایی شده‌اند(۱).

این ارگانیسم اولین بار در سال ۱۹۲۶ توسط مورای[2] به عنوان عفونت و یک پاتوژن داخل سلولی در ارتباط با مونوسیت‌های خونی سطحی معرفی شده و از آن زمان به بعد این ارگانیسم به عنوان یک پاتوژن حیوانی و انسانی شناخته شد. به عنوان یک مسئله مهم دامپزشکی، این ارگانیسم دو فرم اصلی از بیماری ایجاد می‌نماید: فرم مننگوآنسفالیت[3] که بیشتر در نشخوارکنندگان بالغ نظیر گاو و گوسفند رایج است و فرم احشایی[4] که در آن ارگانیسم سایر اندام‌ها به جز مغز را مورد هجوم قرار می‌دهد و موجب تولد نوزاد مرده، سقط جنین و عفونت عمومی[5] می‌شود که بیشتر در تک‌معده‌ای‌ها و نشخوارکنندگان جوان رایج است(۱).

در انسان توجه وسیعی که این بیماری اخیراً به خود جلب نموده عمدتاً به مواردی نظیر تشخیص ماده غذایی به عنوان یک منبع عمده عفونت (که اولین بار در سال ۱۹۲۷ پیشنهاد گردید)، خصوصیت سرمادوستی ارگانیسم و ضریب کشندگی بالای این بیماری نسبت داده می‌شود(۱).

میکروبیولوژی پیشگو ترکیبی از اطلاعات پاسخ های رشد میکروارگانیسم ها در محدوده شرایط معین با توانایی مدل سازی ریاضی است که قادر به پیشگویی رشد میکروب ها می باشد و از سال ۱۹۲۰ میلادی با موفقیت زیاد مورد استفاده قرار گرفته است(۲،۱). اغلب مدل های ریاضی به منظور شبیه سازی رشد میکروارگانیسم ها در ارتباط با شرایط محیطی توسعه یافته است، بنابراین با استفاده از این مدل ها می توان پاسخ میکروب ها، به طور خاص میکروارگانیسم های بیماری زا مانند *لیستریا مونوسایتوژنز* در حضور فاکتورهای متغیر محیطی را پیشگویی نمود(۳).

از جمله انواع طبقه بندی برای مدل ها، طبقه بندی پیشنهادی وایتینگ و بوچانان (۱۹۹۳) است که مدل ها را به سه دسته اولیه، ثانویه و مدل های سطح سوم تقسیم می نماید. مدل های اولیه، تغییر تعداد باکتری ها را طی زمان و تحت شرایط محیطی ویژه توصیف می کند. پاسخ ها را به طور

[1] . *Listeria monocytogenes*
[2] . Murray
[3] . Meningoencephalitis
[4] . Visceral form
[5] . Septicaemia

مستقیم می توان به وسیله شمارش کلی میکروب[6] (TVC)، تشکیل توکسین، سطح سوبسترا یا محصولات متابولیکی و یا به طور غیر مستقیم بوسیله جذب نوری اندازه گیری نمود. مدل های ثانویه، پاسخ یک یا چند پارامتر از مدل اولیه را نسبت به یک یا چند متغیر در شرایط کشت یا محیط رشد، مثل pH، دما و ... توصیف می نماید. مدل سطح سوم، اصولا از فرم نهایی مدل سازی استفاده می کند. این مدل ها، کاربردهایی از یک یا چند مدل اولیه و ثانویه محسوب می شوند که در یک بسته نرم افزاری جمع آوری شده اند. این مدل ها، ترکیب کننده متغیرهای مختلفی نظیر دما، pH یا a_w می باشند. در این مطالعه مدل سازی رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تحت تاثیر مقادیر مختلف اسانس زنیان، pH، دمای نگهداری و دزهای مختلف تلقیح باکتری انجام پذیرفت(۱).

[6] .Total Viable Count