

Isolation of *Listeria monocytogenes* from meat products and study on prfA gene in bacteria isolated and comparing with clinical and standard samples

Jamileh N¹, Siasie torrbati E², Baharvand R^{3*}

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

Received:22.Jul.2013, Accepted: 23.Oct.2013

Abstract

Backgrounds: *Listeria* is a gram positive, facultative intracellular bacteria. This study was to investigate *Listeria monocytogenes* in various meat products and presence of prf A gene in bacteria isolated from food samples and compare them with clinical and standard samples.

Materials and Method: In this descriptive-analytical study, sixty samples of beef, chicken, ham, cocktail, and sausage were collected from Khoramabad slaughterhouse and shops in Khoramabad and Tehran. *L. monocytogenes* was isolated by cold enrichment method and presence of prfA gene was assessed by Polymerase Chain Reaction method.

Results: From 60 samples of meat and meat products, 8 (%13.3) were positive for *Listeria* spp. Four samples (% 6.6) were *L. monocytogenes*, three (%5) were *L. innocua* and 1 sample (%1.6) was *L. welshimeri*. *Listeria innocua* was isolated from meat and poultry samples, *L. monocytogenes* from meat, chicken, ham, and *L. welshimeri* was isolated from meat. Prf A gene was detected in isolated *L. monocytogenes* and donated bacteria from dairy products, clinical and standard samples. Two of donated samples of vegetable contained prf A genes.

Conclusions: *Listeria* bacteria is transmitted through food and is a serious threat to public health. So by identification of bacteria and especially its genes, perhaps we find a way to prevent disease caused by the bacteria.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Meat, Meat Products, Polymerase Chain Reaction, PrfA protein

*Corresponding author:

Adress: Tehran-Kharimkhan avenue-Hafez avenue-Rast avenue – Ghomi lane –no.4-3
email: baharkia44@yahoo.com

جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از محصولات گوشتی و بررسی ژن prf A در باکتری‌های جداسازی شده و مقایسه آن با نمونه‌های کلینیکی و نمونه استاندارد

جمیله نوروزی¹، الهام سیاسی تربتی²، رباب بهاروند^{3*}

1. استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
2. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
3. کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/4/31 تاریخ پذیرش: 92/8/1

چکیده

زمینه و هدف: لیستریا باکتری گرم مثبت، درون سلولی اختیاریست. هدف این مطالعه بررسی میزان حضور باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محصولات گوشتی مختلف و حضور ژن prf A در باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های غذایی و مقایسه آن با نمونه‌های کلینیکی و نمونه استاندارد بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، طی 6 ماه 60 نمونه گوشت، مرغ، ژامبون، کوکتل و سوسیس از کشتارگاه خرم آباد و فروشگاه‌های شهرهای تهران و خرم آباد جمع‌آوری شد. لیستریا مونوسیتوژنز بر اساس روش غنی‌سازی در سرما جداسازی و حضور ژن prf A توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از 60 نمونه محصولات گوشتی مورد بررسی، 8 مورد (13/3 درصد)، گونه لیستریا مثبت بودند. 4 نمونه لیستریا مونوسیتوژنز (6/6 درصد)، 3 مورد لیستریا اینوکوآ (5 درصد) و 1 مورد لیستریا ولشیمیری (1/6 درصد) جداسازی گردید که لیستریا اینوکوآ، از گوشت و نمونه مرغ، لیستریا مونوسیتوژنز از گوشت، مرغ، ژامبون و لیستریا ولشیمیری از گوشت جداسازی شد. ژن prf A در لیستریا مونوسیتوژنز ایزوله و باکتری‌های اهدایی ایزوله از محصولات لبنی، نمونه‌های کلینیکی و استاندارد نیز مشاهده گردید. 2 مورد از نمونه‌های اهدایی مربوط به سزیجات، دارای ژن prf A بودند.

نتیجه گیری: به دلیل اینکه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از طریق غذا منتقل می‌شود و تهدیدی جدی برای سلامت عموم می‌باشد، بنابراین با شناسایی این باکتری و به ویژه ژن‌های آن شاید بتوان راهکاری جهت پیش‌گیری از این باکتری و بیماری ناشی از آن یافت.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، گوشت، محصولات گوشتی، پروتئین prf A، PCR

* نویسنده مسئول: تهران، خ کریم خان، خ حافظ، خ رشت، کوچه قمی، پلاک 4، واحد 3

مقدمه

باکتری لیستریا یک کوکوباسیل گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز مثبت تخمیر کننده قند و ایجاد کننده محصولات اسیدی، بدون تولید گاز می‌باشد. بیشتر سویه‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس متحرکند ولی در دمای 37 درجه سلسیوس فاقد تحرکند (1). هفت گونه لیستریایی مشخص شده است که شامل: *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. monocytogenes* و *L. ivanovii*, *L. murrayi* می‌باشند. در سال 2009 دو گونه دیگر لیستریا به نام‌های *L. marthii* و *L. rocoutiae* شناسایی و گزارش شده‌اند. *L. monocytogenes* می‌تواند هم به عنوان ساپروفیت و هم به صورت بیماری‌زا عمل کند که به محیط آن بستگی دارد. لیستریوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که به طور عمده ناشی از محصولات غذایی آلوده است. غذا به عنوان حامل برای انتقال لیستریا مونوسی‌توزنر، به طور واضح در ارتباط با بیماری تک گیر (پراکنده) و همه گیر به اثبات رسیده است. گرچه این بیماری نادر است اما زمانی که با بسیاری دیگر از بیماری‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند مقایسه شود، لیستریوزیس اغلب منجر به نتایج وخیم و شدیدتری می‌شود. مشخصاً لیستریوزیس در اشخاص با شرایط و بیماری‌های زمینه‌ای رخ می‌دهد که از آن جمله می‌توان به زنان باردار، نوزادان، افراد دریافت کننده پیوند، افراد الکلی، مصرف کننده‌های داروهای سرکوب کننده ایمنی، افراد دیابتی، افراد مسن و مبتلایان به ایدز و بدخیمی‌ها اشاره نمود. علائم کلینیکی لیستریوزیس شامل مننژیت، مننگوآنسفالیت، سپتی سمی، گاستروانتریت، عفونت‌های قبل از زایمان و سقط جنین می‌باشد (2). لیستریا مونوسی‌توزنر، توزیع همه جایی دارد و توانایی بالایی برای رشد در دامنه وسیعی از شرایط مانند دمای یخچال، pH پایین و غلظت بالای نمک را داراست که آن را قادر می‌سازد تا در محیط فرآوری غذا و در غذا زنده بماند و رشد یابد و در غذاهای سالم و

نگهداری شده به چند برابر برسد و خطر آلودگی غذایی را افزایش دهد (3).

در بین گونه‌های مختلف جنس لیستریا، لیستریا مونوسی‌توزنر، عامل بیماری لیستریوزیس در انسان و حیوان شناخته شده است. لیستریا مونوسی‌توزنر یک عامل بیماری‌زای درون سلولی است (4). مطالعاتی در مورد مکانیسم پروتئین‌های موثر در عفونت درون سلولی لیستریا انجام شده است که این پروتئین‌ها عبارتند از: فسفولیپاز PlcA و PlcB و پروتئین‌های تهاجمی InlA و InlB، توکسین تشکیل دهنده منفذ یا لیستریولیزین O و ActA که باعث حرکت درون سلولی باکتری می‌شود. این عوامل بیماری‌زایی تحت کنترل تنظیم کننده رونویسی prfA تولید می‌شوند که متعلق به خانواده Crp/Fnr بوده و فعال کننده رونویسی است. prfA خود تنظیم شونده می‌باشد (5). هدف این پژوهش، بررسی میزان حضور باکتری لیستریا مونوسی‌توزنر در محصولات گوشتی مختلف و حضور ژن prfA در باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های غذایی و مقایسه آن با نمونه‌های کلینیکی و نمونه استاندارد با به کار گیری روش کشت و روش مولکولی بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی-تحلیلی است. روش‌های BAMFDA و ISO 11290 و روش USDA روش‌های استاندارد به کار رفته برای جداسازی لیستریا از مواد غذایی است اما با توجه به محدودیت‌های موجود در مطالعه حاضر، از تلفیقی از روش‌های به کار رفته در پژوهش‌های انجام گرفته و در نهایت با استفاده از روش غنی سازی در سرما، باکتری لیستریا مونوسی‌توزنر جداسازی گردید. طی این بررسی، 60 نمونه محصولات گوشتی شامل گوشت، مرغ، زامبون، سوسیس و کوکتل از کشتارگاه خرم آباد و مغازه‌های سطح شهر خرم آباد و تهران جمع آوری گردید. 30 نمونه گوشت گرفته شده از کشتارگاه شهر خرم آباد، 10 نمونه مرغ خریداری شده از فروشگاه‌های شهر

جداسازی این باکتری با روش غنی سازی در سرما طی مدت زمان نسبتاً طولانی و در حدود 6 ماه صورت گرفت. پس از جداسازی و خالص سازی باکتری ایزوله شده، کلنی باکتری به محیط نگهدارنده پیتون گلیسرول منتقل گردید و در دمای 20- درجه سلیسیوس نگهداری شد. برای استخراج DNA، ابتدا نمونه باکتری به مدت 24 ساعت روی محیط LB برده شد و در انکوباتور شیکردار قرار گرفت.

جهت استخراج DNA از کیت MBST (ساخت کشور ایران Molecular Biological System Transfer) استفاده شد. مطابق با پروتکل موجود در کیت، DNA باکتری استخراج گردید. جهت بررسی حضور ژن prf A در روش PCR، ابتدا پرایمر مربوط به این ژن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) Blast، گردید و بعد از تایید، پرایمر از شرکت روبین طب خریداری گردید (جدول 1). حضور باند DNA با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

تهران و خرم آباد، به صورت منجمد و فریز شده و 5 نمونه سوسیس، 5 نمونه کوکتل و 10 نمونه ژامبون به همان شکل بسته بندی شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های گوشتی در کنار شعله و با استفاده اسکالپل در اندازه‌های 25 گرمی برش داده شده و در محیط BHI broth (Brain Heart Infusion broth) و Listeria enrichment broth کشت داده شد. محیط حاوی نمونه‌ها در یخچال و در دمای 4 درجه سلیسیوس نگهداری شد و بعد از 7 روز به دفعات روی محیط BHI agar، مولر هیتون و محیط اختصاصی Listeria enrichment agar کشت داده شدند. بعد از کشت دادن نمونه‌ها روی محیط با پایه آگار و نگهداری کردن پلیت‌ها در دمای 37 درجه سلیسیوس به مدت 24 ساعت، کلنی رشد یافته از نظر تست‌های مختلف بیوشیمیایی مانند: تست حرکت، کاتالاز، اکسیداز، بایل - اسکولین، MR-VP (Methyl Red - Voges Proskauer) و تست‌های قندی گلوکز، مالتوز، مانیتول، رامنوز و گزیلوز مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به شرایط رشد لیستریا مونوسیتوزنر،

جدول 1. پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش PCR

نام ژن	پرایمر Forward	پرایمر Reverse
prf A	LIS-F: TCA TCG ACG GCA ACC TCG G	LIS-R: TGA GCA ACG TAT CCT CCA GAG T

استفاده، برای ژن prf A شامل 40 سیکل و به صورت Pre denaturation در 95 درجه سلیسیوس به مدت 5 دقیقه، denaturation در 95 درجه سلیسیوس به مدت 30 ثانیه، annealing در 54 درجه سلیسیوس به مدت 30 ثانیه، extention در 72 درجه سلیسیوس به مدت 30 ثانیه و post extention در 72 درجه سلیسیوس به مدت 5 دقیقه بود. بعد از انجام PCR و برای بررسی وجود یا عدم وجود باند ژن مورد نظر، محصول PCR الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز ابتدا ژل با استفاده از محلول 0/1 TAE تهیه گردید. مقدار 6 میکرولیتر از محصول PCR با 3

در روش PCR، ابتدا Master mix در حجم 25 میکرولیتر تهیه و در لوله‌های 0/2 میلی‌لیتری توزیع شد. مواد مورد نیاز برای آزمایش PCR شامل آب مقطر 18/3 میکرولیتر، بافر 10x یک میکرولیتر، پرایمر F (به غلظت 13 پیکومول) یک میکرولیتر، پرایمر R (به غلظت 13 پیکومول) یک میکرولیتر، dNTP (به غلظت 10 میلی‌مولار) یک میکرولیتر، DNA الگو (به غلظت 100 نانوگرم) یک میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase (به غلظت 5/2 - 1 واحد در 100 میکرولیتر) 0/2 میکرولیتر و $MgCl_2$ یک و نیم میکرولیتر بود. برنامه PCR مورد

محصولات گوشتی مورد بررسی، 8 مورد (13/3 درصد) از نظر لیستریا مثبت بودند. در این 60 نمونه، 4 نمونه لیستریا مونوسیتوژنز (6/6 درصد) و 3 مورد لیستریا اینوکو آ (5 درصد) و 1 مورد لیستریا ولشیمیری (1/6 درصد) جداسازی گردید که لیستریا اینوکوآ، تنها از گوشت و نمونه مرغ ایزوله گردید و لیستریا مونوسیتوژنز از گوشت، مرغ، ژامبون و لیستریا ولشیمیری از گوشت جداسازی شد. لیستریا مونوسیتوژنز، 2 مورد (6/6 درصد) از نمونه‌های گوشتی، 1 مورد (10 درصد) از نمونه‌های مرغ و 1 مورد (10 درصد) از نمونه‌های ژامبون جداسازی شد. لیستریا اینوکوآ، 2 مورد (6/6 درصد) از نمونه‌های گوشت و 1 مورد (10 درصد) از نمونه‌های مرغ جداسازی شد. لیستریا ولشیمیری، 1 مورد (3/3 درصد) از نمونه‌های گوشتی جدا سازی گردید. سایر گونه‌های لیستریایی در طی این پژوهش جداسازی نگردیدند (جدول 2 و نمودار 1). باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شده از محصولات گوشتی و همچنین لیستریا مونوسیتوژنز اهدایی ایزوله شده از محصولات لبنی، سبزیجات، نمونه‌های کلینیکی و نمونه استاندارد IRTCC 1293، جهت حضور یا عدم حضور ژن PCR، *prf A* گردیدند که در تمام نمونه‌های مورد بررسی، ژن *prf A* به صورت 100 درصد وجود داشت البته به جز نمونه‌های مربوط به سبزیجات که حضور ژن 28/5 درصد بود (شکل 1 و نمودار 2).

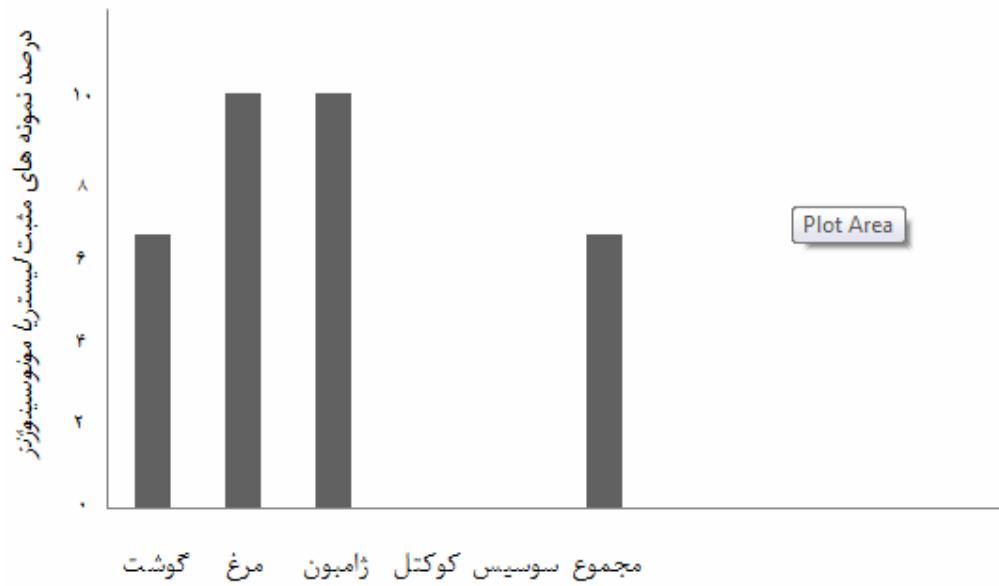
میکرولیتر بافر لودینگ، با سمپلر به خوبی مخلوط گردید و سپس به درون چاهک‌ها در ژل اضافه شد و به چاهک اول 3 میکرولیتر مارکر (mi-8201) DNA Ladder (ساخت شرکت فرمنتاز - کشور آلمان) اضافه شد و دستگاه الکتروفورز روشن شده و عمل الکتروفورز با ولتاژ 45 صورت گرفت. در پایان، ژل به درون رنگ اتیدیوم بروماید برده شد و به مدت 15 دقیقه در رنگ باقی ماند. سپس در آب مقطر شستشو داده شد و در زیر نور UV، وجود یا عدم وجود باند مورد نظر بررسی گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات از طریق برنامه آماری SPSS نسخه 19 صورت گرفت. برای تعیین حجم نمونه از فرمول $n = z^2 p(1-p) / d^2$ با خطای درصد $\alpha = 0/05$ استفاده شد که تعداد نمونه $n = 60$ جمع آوری شد و برای تحلیل آماری نتایج حاصله با استفاده از روش‌های آمار توصیفی و توسط آزمون کای دو در سطح معنی‌دار $p = 0/05$ = مقایسه شدند.

یافته‌ها

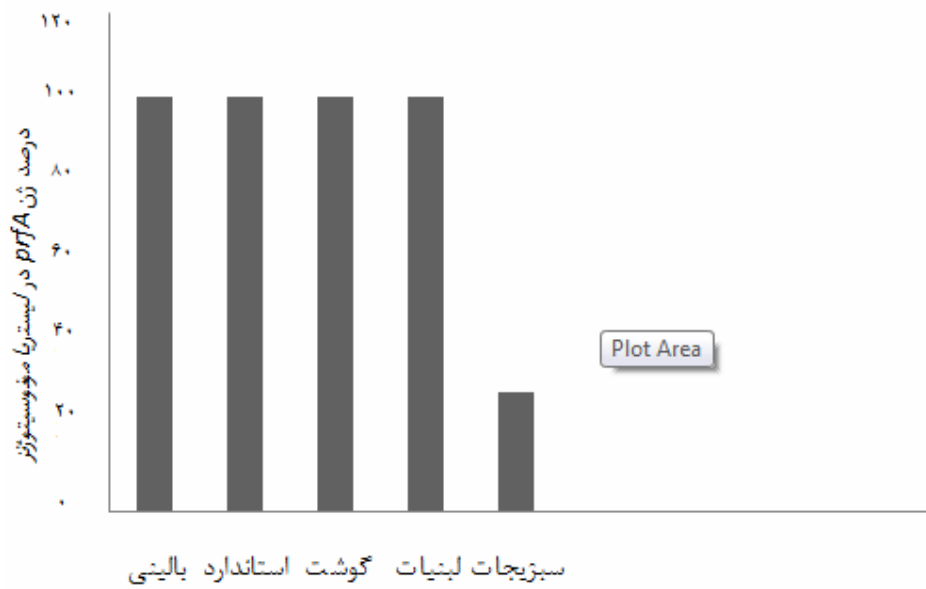
بعد از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به صورت کوکوباسیل گرم مثبت کاتالاز مثبت، متحرک در دمای 28 درجه، بایل اسکولین مثبت، MR - VP مثبت و همولیز مثبت مشاهده گردید. در مجموع 60 نمونه گوشت، مرغ، ژامبون، کوکتل و سوسیس مورد آزمایش قرار گرفت. از 60 نمونه گوشت و

جدول 2. میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی

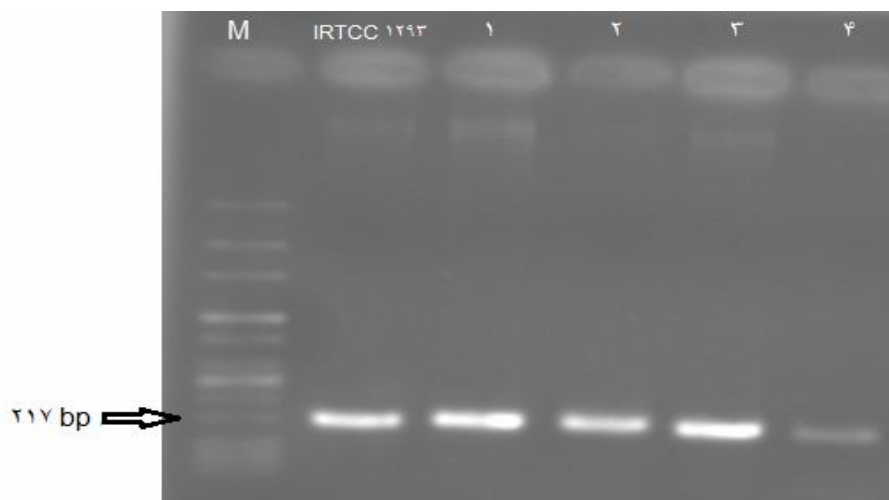
نوع نمونه	تعداد نمونه مورد بررسی	نمونه‌های مثبت	
		تعداد	درصد
گوشت	30	2	6/6
مرغ	10	1	10
ژامبون	10	1	10
کوکتل	5	-	-
سوسیس	5	-	-
مجموع	60	4	6/6



نمودار 1. میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی



نمودار 2. میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی



شکل 1. تصویر الکتروفورز 2 درصد بر روی ژل آگارز از محصول PCR و تکثیر قطعه 217 جفت باز از ژن prf A

بحث

طی سال‌های 2001-1997، 317 نمونه گوشت خوک، 317 نمونه گوشت گاو و 84 نمونه سوسیس پخته را مورد آزمایش قرار داد. روش کشت بر اساس ISO 112901 بود. در نمونه گوشت خوک 45 نمونه (9 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز، در نمونه گوشت گاو 27 مورد (8/5 درصد) و در نمونه سوسیس پخته شده 2 مورد (2/3 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز وجود داشت (9). نتایج این بررسی با مطالعه فوق هم خوانی ندارد که علت آن احتمالاً عدم استفاده از روش‌های مختلف جداسازی استاندارد بوده است و تنها 2 مورد (6/6 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز از گوشت جداسازی شد و هیچ موردی از این باکتری در سوسیس یافت نشد. از علل دیگر می‌توان به سطح بهداشت کارخانجات سوسیس سازی و سطح بهداشت در گوشت‌های مصرفی مورد استفاده در تهیه سوسیس و آلودگی ناشی از محیط‌های فرآوری محصولات گوشتی، اشاره کرد. همچنین میزان مواد افزودنی و انواع مختلف نگهدارنده‌ها، می‌تواند در رشد باکتری در مواد غذایی موثر بوده باشد. کلارک و همکارانش در سال 2010 در کانادا، 80 نمونه غذای آماده مصرف را مورد آزمایش قرار دادند (10). 8 مورد (10 درصد) از نمونه‌ها برای لیستریا مثبت بود که لیستریا ولشیمیری 4/8 درصد، لیستریا اینوکوآ 2/8 درصد و لیستریا مونوسیتوژنز 2/8 درصد بود. این مطالعه در خصوص جداسازی لیستریا ولشیمیری با بررسی فعلی هم خوانی دارد

در مطالعه حاضر میزان کل سویه‌های لیستریایی ایزوله شده 13/3 درصد و میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز 6/6 درصد بود. که این گزارش با شیوع لیستریا مونوسیتوژنز ارائه شده در سایر کشورها تقریباً مطابقت دارد، به طوری که میزان 5/1 درصد در اتیوپی و 4/9 درصد در محصولات گوشتی در بلژیک و 5 درصد در مصر گزارش شده است. عبدالعزیز و همکارانش در سال 2004 از 100 نمونه محصولات گوشتی، 5 مورد (5 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی نمودند (6) و محمد اشرف و همکارانش در سال 2010، در کشور مصر از 100 نمونه گوشت منجمد 5 مورد (5 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی نمودند که این پژوهش‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (7). نیتیا و همکارانش در سال 2011 در کشور تایلند، از 134 نمونه گوشت خام از 104 نمونه گوشت خام، 61 نمونه (85 درصد) گونه لیستریا جدا کردند (8). در مقایسه با مطالعه حاضر میزان شیوع این باکتری بسیار بالاست که ممکن است در ارتباط با سطح بهداشت گوشت و شیوه نامناسب نظارت بر بهداشت گوشت و مواد غذایی گوشتی در این کشور باشد. همچنین مصرف مواد گوشتی در کشور تایلند، به صورت خام رایج است در صورتی که در کشور ایران، به طور معمول مواد غذایی قبل از مصرف حرارت زیاد داده می‌شوند. ویتیک

که 3/3 درصد در نمونه گوشت گزارش گردید اما در مورد سویه‌های لیستریا مونوسیوتوزنر و لیستریا اینوکوآ که به ترتیب 6/6 درصد و 6/6 درصد در نمونه گوشت مشاهده شد، مغایرت دارد. به نظر می‌رسد سویه‌های غیر پاتوژن مانند لیستریا ولشیمیری، دارای رشد سریع‌تر می‌باشند و مانع رشد سویه‌های دیگر سویه‌ها از جمله، لیستریا مونوسیوتوزنر می‌شوند. شریتی وی هاشینی و همکارانش در سال 2010، از 134 نمونه غذایی 51 نمونه (38 درصد) لیستریا مونوسیوتوزنر جدا سازی کردند (11). در این مطالعه نمونه‌های غذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. در صورتی که در مطالعه حاضر تنها محصولات گوشتی و گوشت مورد آزمایش قرار گرفته شد. در واقع میزان آلودگی مواد مختلف غذایی، می‌تواند متغیر باشد زیرا در نمونه‌های غذایی متفاوت عوامل مختلفی از جمله pH، میزان فعالیت آب و حضور مواد مغذی در فراهم کردن شرایط مناسب جهت رشد لیستریا مونوسیوتوزنر موثر هستند. در مطالعه الشیخ و همکارانش نیز در مدت دو سال، 500 نمونه گوشت مرغ را برای حضور لیستریا مونوسیوتوزنر، با استفاده از روش ISO مورد بررسی قرار دادند (12). در بررسی آنها لیستریا مونوسیوتوزنر 13/6 درصد، لیستریا ایوانووی 19/8 درصد، لیستریا گرایبی 4/6 درصد، لیستریا سیلیجری 1 درصد و لیستریا ولشیمیری 2 درصد جداسازی شد. این یافته‌ها با مطالعه حاضر مغایرت داشت که می‌تواند به دلیل استفاده از محیط‌های اختصاصی و همچنین رعایت سطح بهداشت در کارخانه یا انتقال آلودگی توسط کارکنان در نمونه‌های مورد بررسی باشد. همچنین در مطالعه حاضر، با توجه به استفاده از مواد آنتی بیوتیکی در طی پرورش دادن طیور، احتمالاً این آنتی بیوتیک‌ها تا حد زیادی از رشد لیستریا مونوسیوتوزنر جلوگیری می‌کنند.

در مطالعه حاضر، بعد از بررسی نمونه‌های غنی سازی شده در سرما هیچ موردی از باکتری لیستریا در نمونه‌های سوسیس و کوکتل جداسازی نشد. در حالی که در مطالعه بونسیس در سال 1991، کام در سال 1992 و موریانا و ونگ در سال 1994 به ترتیب 69 درصد، 14 درصد و 7/5

درصد سوسیس‌های گوشت گاو و خوک، دارای باکتری لیستریا مونوسیوتوزنر بودند (13). در مطالعه حاضر، نمونه‌های مرغ به صورت تازه و منجمد، مورد بررسی قرار گرفتند که 3 مورد باکتری لیستریا اینوکوآ نیز جداسازی شد. کاسیک و همکارانش در سال 2005، 143 نمونه محصول گوشتی مرغ را مورد بررسی قرار دادند. این نمونه‌ها مطابق با روش ISO 112901 مورد آزمایش قرار گرفتند که گونه غالب لیستریا اینوکوآ بود (14). نتایج این مطالعه با پژوهش حاضر مطابقت ندارد که این امر می‌تواند به علت عدم استفاده از محیط‌های کشت غیراختصاصی و در نتیجه کاهش حساسیت کشت جهت تشخیص باشد.

محمد سعید و همکارانش در سال 2009، در کشور مصر برای شناسایی لیستریا مونوسیوتوزنر ایزوله شده از تخم مرغ از روش PCR و پرایمرهای مربوط به ژن prf A استفاده کردند که از 100 نمونه مورد بررسی، 7 ایزوله به عنوان لیستریا مونوسیوتوزنر شناخته شد (15). در بررسی آنها، هر 7 نمونه لیستریا جداسازی شده دارای ژن prf A بودند که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد و در این بررسی صورت گرفته تمام ایزوله‌های گوشت و محصولات گوشتی دارای ژن prf A بودند. در سال 2010، در کشور مصر اشرف محمد و همکارانش برای تشخیص لیستریا مونوسیوتوزنر، ژن prf A را برای PCR انتخاب کردند آنها دو پرایمر LIS-R و F را بر اساس ژن prf A برای لیستریا مونوسیوتوزنر طراحی کردند و از 13 نمونه لیستریایی مورد بررسی، 5 نمونه محصول 217 جفت باز را تکثیر دادند که ویژه ژن prf A در لیستریا مونوسیوتوزنر می‌باشد (16). که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد زیرا ایزوله‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر به جز در نمونه سبزیجات که 28/5 درصد بود، 100 درصد دارای ژن prf A بودند. این تشابه بیانگر این موضوع است که سویه‌های مربوط به دو منطقه جغرافیایی دارای خاصیت بیماری‌زایی بالا می‌باشند (7). در سال 2009، های جین و همکارانش برای تمایز بین لیستریا مونوسیوتوزنر و سویه‌های دیگر لیستریا از

دسته ژن بیماریزا pVGC و prf A از روش PCR استفاده کردند (16).

در مجموع، یافته‌های حاصل از این مطالعه، شیوع گونه‌های لیستریایی در انواع مختلف محصولات گوشتی را نشان داده است و با انجام آزمون‌های باکتریولوژی و به دنبال آن آزمون PCR، مشخص گردید که مواد غذایی گوشتی چه به صورت خام و چه به صورت فرآوری شده، مستعد آلوده شدن با باکتری لیستریا مونوسیژنز می‌باشند. پیشنهاد می‌شود از این ژن برای اثبات وجود لیستریا مونوسیژنز، بدون کشت در روش PCR استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از سرکار دکتر لیدا لطف الهی و دوستان گرامی سرکار خانم شفیعی و جناب آقای کریمی به خاطر ارائه و تهیه نمونه‌های کلینیکی و نمونه‌های مربوط به محصولات لبنی و سبزیجات بسیار سپاسگزارم. این بررسی در ارتباط با هیچ‌گونه طرحی نبوده و هیچ‌گونه کمک مالی برای آن دریافت نگردید. مقاله حاضر بر گرفته از پایان نامه با عنوان بررسی ژن prf A در لیستریا مونوسیژنز جدا سازی شده از گوشت و محصولات گوشتی و نمونه‌های کلینیکی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به موقعیت ناشناخته لیستریوزیس در ایران و عدم گزارش این بیماری و عدم وجود برنامه کنترلی برای آن در برنامه بهداشت کشور، در خصوص شیوع لیستریا مونوسیژنز، در غذاهای مصرفی در کشور اطلاعات محدودی وجود دارد. شیوع گونه‌های لیستریایی در انواع مختلف گوشت قرمز، مرغ و غذاهای دریایی نشان داده شده است. همچنین با توجه به مصرف روز افزون غذاهای آماده از جمله سوسیس و کالباس در بین افراد جامعه، عدم توجه به بهداشت مواد اولیه این محصولات و آلوده شدن گوشت در حین تهیه، فرآوری و توزیع می‌تواند بهداشت و سلامت عموم را تهدید کند. با توجه به رشد لیستریا مونوسیژنز در دمای یخچال و از آنجائی که اکثر این محصولات در هنگام مصرف به اندازه کافی حرارت نمی‌بینند، خطری بالقوه برای سلامت افراد می‌باشند. با انجام آزمون‌های باکتریولوژی و به دنبال آن آزمون PCR، مشخص گردید که مواد غذایی گوشتی چه به صورت خام چه به صورت فرآوری شده مستعد آلوده شدن با باکتری لیستریا مونوسیژنز می‌باشند. آزمون PCR، حضور ژن prf A در این ایزوله‌ها نشان داد. این ژن تنظیم کننده بیماری‌زایی این باکتری است و حضور آن در نمونه‌های کلینیکی و غذایی می‌تواند تاییدی بر نقش آن در ایجاد بیماری باشد.

منابع

1. Malik SV, Barbuddhe SB, Chaudhari SP. Listeric infections in humans and animals in the Indian subcontinent: a review. *Tropical animal health and production*. 2002;34(5):359-81. Epub 2002/10/16.
2. Acha PN, Szyfres B, Bureau PAS. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitoses: Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization*; 2001.
3. Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International journal of food microbiology*. 1999;53(1):75-80. Epub 1999/12/22.
4. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(Pt 6):1280-8. Epub 2009/08/12.
5. Freitag NE, Rong L, Portnoy DA. Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infection and immunity*. 1993;61(6):2537-44. Epub 1993/06/01.
6. Abd El-Aziz Doaa M. *Microbiological and chemical hazards of some meat products: Assiut University*; 2004.
7. AbdEl-Malek AM, Ali SFH, Moemen RH, Mohamed A, Elsayh KI. Occurrence of

- isolated from frozen and shock frozen dressed broiler chicken in Sudan. *British Microbiology Research Journal*. 2012;4(1):24-34.
13. Buncic S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International journal of food microbiology*. 1991;12(2-3):173-80. Epub 1991/02/01.
 14. Kosek-Pasykowska K, Bania J, Bystron J, Molenda J, Czerw M. Occurrence of *Listeria* spp. in raw poultry meat and poultry meat products. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2005;49(219-222).
 15. Sayed M, Abdel-Azeem M, Farghaly M, Hassanein R. Using of PCR assay for identification of *Listeria monocytogenes* recovered from table eggs. *Vet World*. 2009;2(12):453-5.
 16. Jung HJ, Park SH, Ha SD, Lee KH, Chung DH, Kim CH, et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the *prfA* virulence gene cluster. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(6):1412-5. Epub 2009/06/09.
 8. Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N, Chongsa-Nguan M, Tungtrongchitr A, Makino S, et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. *Journal of health, population, and nutrition*. 2011;29(1):26-38. Epub 2011/05/03.
 9. Kwiatek K. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in selected food of animal origin. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2004;48:269-72.
 10. Clark J. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods (2010). Canada: Health Canada; 2010.
 11. Shrinithiviahshini N, Sheelamary M, Mahamuni D, Chithradevi R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food and ready to eat food products available in Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India *World J Life Sci and Medical Research*. 2011;1(4):70-5.
 12. Alsheikh ADI, Mohammed GE, Abdalla MA, Bakhiet AO. First isolation and identification of *Listeria monocytogenes*