Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(78): 101-110

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

Jamileh N[1], Siasie torrbati E[2], 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. monocytogens 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

Archive of SID

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

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 9 (شماره پیاپی 78)، آذر 1392، 110-101

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

جمیله نوروزی[1]، الهام سیاسی تربتی[2]، 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 سبزیجات، 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، واحد3

email: baharkia44@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

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 سیلسیوس متحر کند ولی در دمای 37 درجه سیلسیوس فاقد تحرکند(1). هفت گونه لیستریایی مشخص شده است که شامل: L.seeligeri, L.welshimeri, L.innocua, L.grayi , L.murray, L.ivanovii و L.monocytogenes می باشند. 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 مونوسیتوژنز، 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. مشخصا لیستریوزیس در اشخاص با شرایط و بیماری‌های زمینه‌ای رخ می‌دهد که از آن جمله می توان 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 منتژیت، منگوانسفالیت، سپتی سمی، گاستروانتریت، عفونت‌های قبل از زایمان و سقط جنین می‌باشد(2). لیستریا مونوسیتوژنز، 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 درمحیط 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 مونوسیتوژنز، عامل بیماری لیستریوزیس در انسان و حیوان شناخته شده است. لیستریا مونوسیتوژنز 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 prf A تولید می‌شوند که متعلق به خانواده Crp/Fnr بوده و فعال کننده رونویسی است. prf A خود تنظیم شونده می‌باشد(5). هدف این پژوهش، 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 با به کار گیری روش کشت و روش مولکولی بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی- تحلیلی است. روش‌های BAM FDA 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 درنهایت با استفاده از روش غنی سازی در سرما، باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی گردید. طی این بررسی، 60 نمونه محصولات گوشتی شامل گوشت، مرغ، ژامبون، 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 سیلسیوس نگهداری شد و بعد از 7 روز به دفعات روی محیط BHI agar، مولر هینتون 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 سیلسیوس 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 مونوسیتوژنز، جداسازی این باکتری با روش غنی سازی در سرما طی مدت زمان نسبتا طولانی و در حدود 6 ماه صورت گرفت. پس از جداسازی و خالص سازی باکتری ایزوله شده، کلنی باکتری به محیط نگهدارنده پپتون گلیسرول منتقل گردید و در دمای 20- درجه سیلسیوس 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.

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

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 18/3میکرولیتر، 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 polymerse (به غلظت 5/2 -1 واحد در 100 میکرولیتر) 0/2میکرولیتر و $MgCl_2$ یک و نیم میکرولیتر بود. برنامه PCR مورد استفاده، برای ژن prf A شامل 40 سیکل و به صورت Pre denaturation در 95 درجه سیلسیوس به مدت 5 دقیقه، denaturation در 95 درجه سیلسیوس به مدت 30 ثانیه، annealing در 54 درجه سیلسیوس به مدت30 ثانیه، extention در 72 درجه سیلسیوس به مدت 30 ثانیه و post extention در 72 درجه سیلسیوس 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 TAE 0/1 تهیه گردید. مقدار 6 میکرولیتر از محصول PCR با 3

Archive of SID

www.SID.ir

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 DNA Ladder (mi-8201) (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 $n = z^2p(1-p)/d^2$ 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.

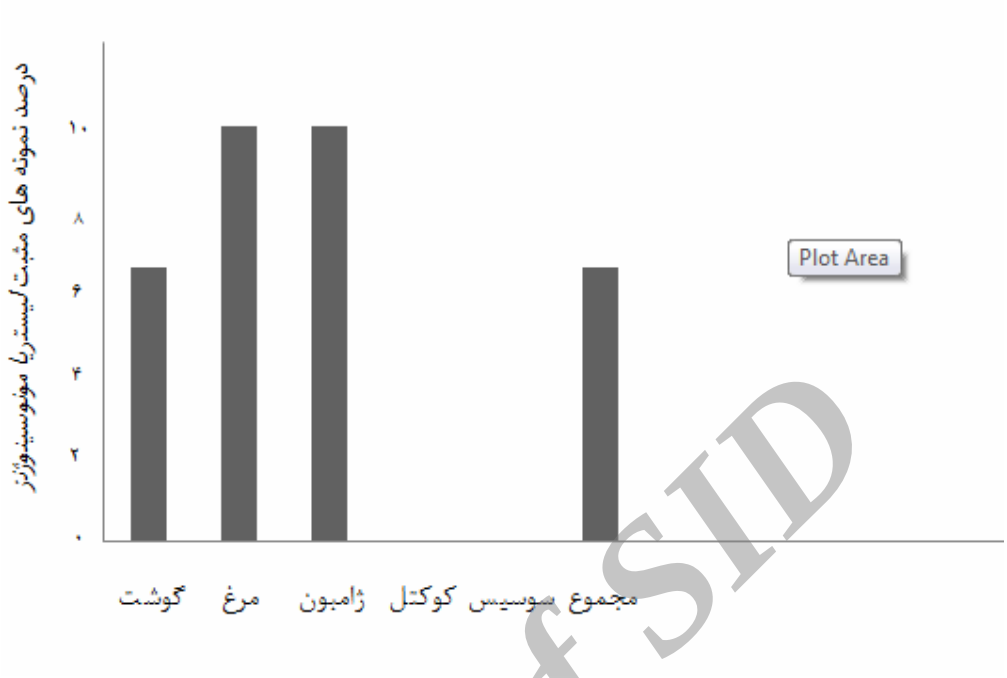
یافته‌ها

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 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 prf A، PCR 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).

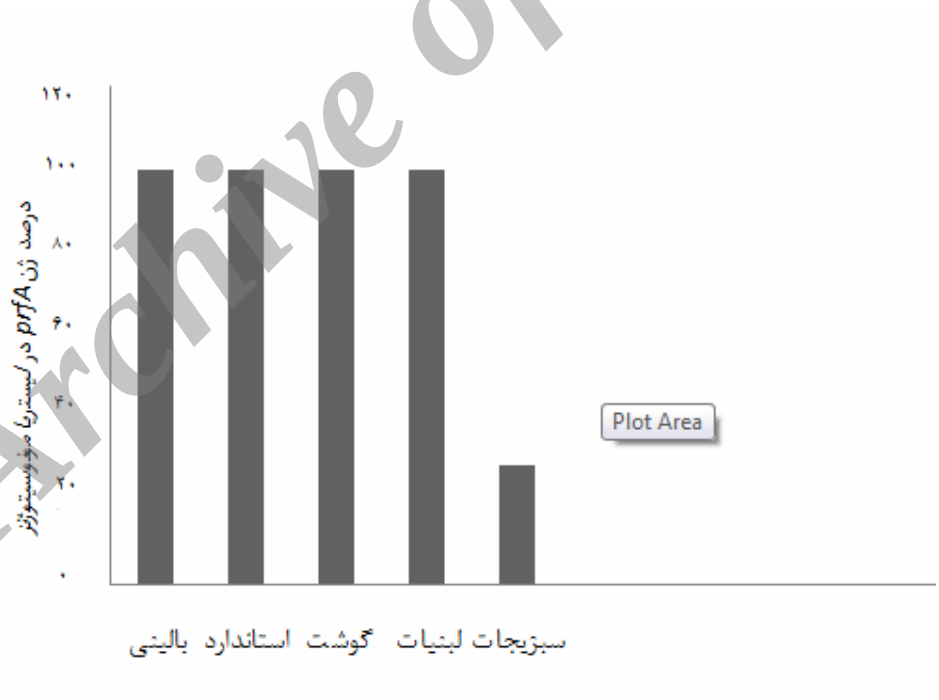
جدول 2. میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی

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

Archive of SID
www.SID.ir



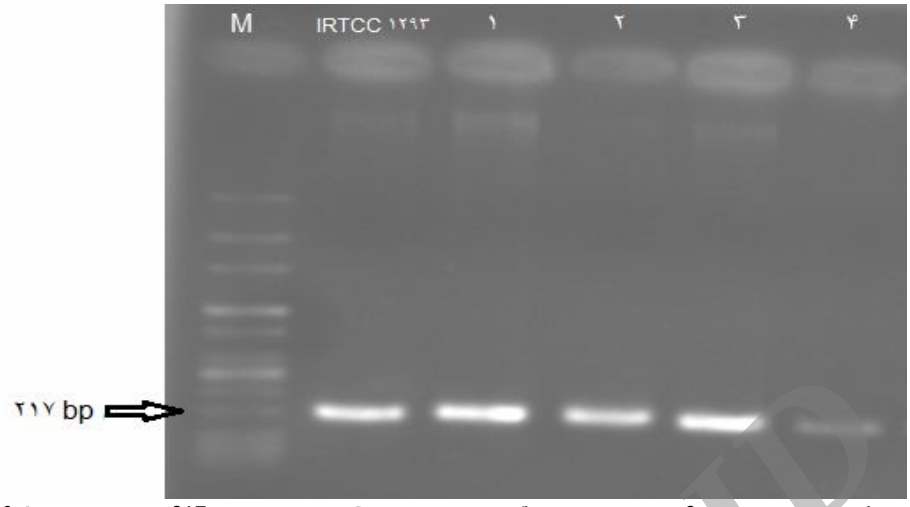
نمودار 1. میزان جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی



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

Archive of SID

www.SID.ir



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

بحث

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 تقریبا 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 کشورتایلند، به صورت خام رایج است در صورتی که در کشور ایران، به طور معمول مواد غذایی قبل از مصرف حرارت زیاد داده می‌شوند. ویتیک 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 احتمالا 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 سال2010 در کانادا، 80 نمونه غذای آماده مصرف را مورد آزمایش قرار دادند(10). 8 مورد (10 درصد) از نمونه ها 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

Archive of SID

www.SID.ir

که 3/3 درصد در نمونه گوشت گزارش گردید اما در مورد سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز می‌شوند. شرینتی وی هاشینی و همکارانش در سال2010، از 134 نمونه غذایی 51 نمونه(38 درصد) لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز موثر هستند.در مطالعه الشیخ و همکارانش نیز در مدت دو سال، 500 نمونه گوشت مرغ را برای حضور لیستریا مونوسیتوژنز، با استفاده از روش ISO مورد بررسی قرار دادند(12). در بررسی آنها لیستریا مونوسیتوژنز 13/6 درصد، لیستریا ایوانووی 19/8 درصد، لیستریا گرایی 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 نمونه های مورد بررسی باشد. همچنین در مطالعه حاضر، با توجه به استفاده از مواد آنتی بیوتیکی درطی پرورش دادن طیور، احتمالا این آنتی بیوتیک‌ها تا حد زیادی از رشد لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز 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 اینوکوآبود(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 مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز، ژن prf Aرا برای PCR انتخاب کردند آنها دو پرایمر LIS-F و LIS-R را بر اساس ژن prf A برای لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز و سویه‌های دیگر لیستریا از

www.SID.ir
Archive of SID

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 مونوسیتوژنز می‌باشند. پیشنهاد می‌شود از این ژن برای اثبات وجود لیستریا مونوسیتوژنز، بدون کشت در روش PCR استفاده شود.

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 مونوسیتوژنز، 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 مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز می‌باشند. آزمون PCR، حضور ژن prf A را 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.

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 هیچ گونه کمک مالی برای آن دریافت نگردید. مقاله حاضر بر گرفته از پایان نامه با عنوان بررسی ژن prf A در لیستریا مونوسیتوژنز جدا سازی شده از گوشت و محصولات گوشتی و نمونه‌های کلینیکی می‌باشد.

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

Archive of SID
www.SID.ir

Listeria species in meat, chicken products and human stools in Assiut city, Egypt with PCR use for rapid identification of Listeria monocytogenes. Vet World. 2010;3(8):353-9.
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. Shrinithivihahshini 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 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. Occurence 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.

Archive of SID

www.SID.ir