شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز از شیر خام به روش های کشت سلولی و PCR ژن actA

مستانه غلامی، محسن زرگر*، سیدسهیل آقائی

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۵)

چکیده

مواد غذایی از راه های مختلفی در معرض آلودگی میکروبی قرار می گیرد. یکی از باکتری های بیماری زا که از طریق مواد غذایی از جمله: شیر خام، سبزیجات به انسان منتقل می شود، باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* است که باعث بیماری های مختلفی از جمله: مننژیت، کنژونکتیویت، سپتی سمی و سقط جنین می باشد. با توجه به گزارشاتی که از آلودگی های شیر و فرآورده های آن به *لیستریا مونوسایتوژنز* داریم، به خصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، در این تحقیق کوشش به عمل آمده، آلودگی های شیر و فرآورده های آن به این باکتری در استان قم مورد بررسی قرار گیرد.

مطالعات مختلف حضور ژن های بیماریزا مانند *actA* ، *prF* ، *plcA*، *plcB* *hlyA* ، *mpl* را در *لیستریا مونوسایتوژنز* به اثبات رسانیده است. این باکتری به دلیل توانایی در پلیمریزاسیون اکتین، قادر به حرکت درون سلولی وبین سلولی و فرار از فاگولیزوزوم، مقاومت در برابر دفاع ایمنی همورال و در نهایت تکثیر در سلول میزبان می باشد. پروتئین *actA* نقش مهمی در کنترل فعل و انفعالات رشته های اکتین در سیتوپلاسم محیطی سلول میزبان دارد و موجب تحرک *لیستریا مونوسایتوژنز* می گردد. در این تحقیق بر روی ۱۰۰ نمونه شیر خام، کار شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* انجام گرفت، که با استفاده از روش های میکروبیولوژی و روش های بیوشیمیایی و تایید سرولوژیک و ملوکولی بر اساس ژن *actA* توانستیم ۳ نمونه *لیستریامونوسایتوژنز*(۳٪ آلودگی) جدا کنیم و حضور ژن *actA* را در این سویه ها تایید کنیم.

کلیدواژگان

لیستریا مونوسایتوژنز، ژن act A، Culture method، PCR.

* نویسنده مسئول، رایانامه: zmohsen2002@yahoo.com

مقدمه

لیستریا مونوسایتوژنز کوکوباسیل گرم مثبت، متحرک در ۲۲ درجه سلسیوس و بی تحرک در ۳۷ درجه سلسیوس، فاقد اسپور، غیر اسید فست non aCid (fast) و اندازه آن ۲ - ۰,۵ میکرون و قطر آن ۰,۵ - ۰,۴ میکرون می باشد و معمولا یک قطب باکتری اندکی متورم است و از این نظر شبیه کورینه باکتریوم ها می باشد و اشکال کوکسی شکل باکتری اغلب در کشت های کهنه دیده می شود. *لیستریامونوسایتوژنز* فاقد کپسول است و در اثر کهنه شدن گرم منفی شده وبه اشکال غیر عادی در می آید و دراز می شود و اندازه آن ممکن است به ۲۰ میکرون هم برسد (۱).

لیستریا مونوسایتوژنز بر روی گیاهان پوسیده نسبت به گیاهان سبز یا گیاهانی که از بین رفته اند بهتر زیست میکند. این میکروارگانیسم در علوفه تخمیر شده که به صورت سیلو نگهداری می شود و pH بالاتر از ۴/۵ دارد، مشاهده می شود. این باکتری به صورت ساپروفیت خاک بوده و از هر دو خاک بایر و حاصل خیز جدا شده است و به میزان ۲۹۵ روز یا بیشتر در آن ها پایدار و زنده باقی می ماند (2).

اخیرا ارتباط قوی تری بین لیستریوز و مصرف فرآورده های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده های غذایی گزارش گردیده است و شیر پاستوریزه، شیر غیر پاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه گیری مسمومیت غذایی شناخته شده اند. *لیستریا مونوسایتوژنز* قادر به رشد در شیر غیر پاستوریزه می باشد و احتمال افزایش تعداد ارگانیسم در طول مدت نگهداری در مخازن ذخیره شیر در گاوداری ها وجود دارد. تحقیقات بیانگر این است که وقوع لیستریوز به فصل بستگی داشته، به طوری که در فصل زمستان شیوع بیماری بیشتر گزارش شده که ممکن است به دلیل آن باشد که در زمستان، دامها بیشتر از غذای سیلو شده تغذیه می شوند و نیز آبستنی گاو زمینه را برای ابتلا مساعد می نماید. این باکتری میتواند از شیر گاو دفع شده و در دمای ۴۵-۳۰ درجه سلسیوس و pH ۹/۶-۵/۶ رشد کند (۳).

این باکتری قادر است دمای پاستوریزاسیون طبیعی (۷۲ درجه سلسیوس در مدت ۱۵ ثانیه) را تحمل کند، در نتیجه شیر هایی که فرایند پاستوریزاسیون طبیعی را طی می کنند منبعی برای *لیستریا مونوسایتوژنز* می باشند به همین جهت برای از بین بردن این باکتری در شیر بایستی درجه پاستوریزاسیون را به ۷۶/۶ درجه سلسیوس برسانیم (۴).

مطالعات مختلف حضور ژن های بیماریزایی مانند actA، hlyA، mpl، prfA، plcA، plcB را در *لیستریا مونوسایتوژنز* به اثبات رسانیده است.

این باکتری به دلیل توانایی در پلیمریزاسیون اکتین، قادر به حرکت درون سلولی و بین سلولی، فرار از فاگولیزوزوم، مقاومت در برابر دفاع ایمنی همورال و در نهایت تکثیر در سلول میزبان می باشد. پروتیین *actA* نقش مهمی در کنترل فعل و انفعالات رشته های اکتین در سیتوپلاسم محیطی سلول میزبان دارد و موجب تحرک لیستریا می گردد (۵).

تمایل *لیستریا مونوسایتوژنز* به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد میشود که معمولا میزان کشندگی آن بالاست (۲۵-۵۰ درصد) و در بین افرادی که از بیماری بهبود یافته اند، علایم نورولوژیک باقی می گذارد. بارداری خطر ابتلا به لیستریوز را افزایش می دهد. *لیستریا مونوسایتوژنز* در زنان باردار معمولا باعث بیماری باکتریمی مشابه آنفولانزا می شود که اگر درمان نشود، میتواند به التهاب جفت یا پرده آمنیوتیک و عفونت جدید و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا تولد زود هنگام منجر شود، چرا که این باکتری قادر به عبور از جفت است (۶).

این باکتری در بسیاری از محیط های کشت مانند

مولرهینتون آگار[1]، آگار خون دار[2]، آکسفورد آگار[3]، پالکام[4] و لیستریاسلکتیو آگار[5] به خوبی رشد می کنند و قادر به ایجاد همولیز بتا در در آگار خوندار است. لذا ممکن است با *استرپتوکوک های* بتاهمولیتیک اشتباه گردد. این باکتری قادر به رشد در دمای ۴ درجه سانتی گراد است (کولد انریچمنت[6]). علاوه بر خصوصیات ذکر شده *لیستریامونوسایتوژنز* گلوکز، رامنوز، هیپورات، متیل رد، وژه پروسکوئر مثبت است. ولی هیدروژن سولفید، احیای نیترات، مانیتول، ریبوز، نشاسته، زایلوز، ذوب ژلاتین، اندول و اوره آز آن منفی است (*۷*).

DNA *لیستریا مونوسایتوژنز* می‌تواند برای تشخیص این میکروارگانیسم به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[7]) استفاده شود. روش PCR حساسیت و اختصاصییت بالایی دارد.

جداسازی *لیستریامونوسایتوژنز* از مواد غذایی با روش کشت و شناسایی آن با روش های بیوشیمیایی نیازمند ۸-۷ روز زمان می باشد. از این رو وجود روش های سریع و کاربردی برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی نیازی ضروری است که به این منظور روش هایی مانند: PCR، DNA hybridization و ... مورد آزمایش قرار گرفته اند.

در مطالعه ی حاضر هدف از این پژوهش: در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص *لیستریا مونوسایتوژنز* کشت می باشد. به علت این که در خوراک دام از آنتی بیوتیک استفاده می شود، این باکتری درون سلولی می باشد، حساسیت کشت به شدت کاهش می یابد. به علاوه تشخیص با این روش بیش از ۳۶ ساعت به طول می انجامد. لذا هدف دستیابی به آزمونی است که بتواند در هر شرایطی وجود *لیستریا مونوسایتوژنز* را در نمونه های بالینی نشان دهد. از مهمترین این آزمون ها واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) را میتوان نام برد (۸).

مواد و روش کار

الف) جمع آوری نمونه

این تحقیق از تیر ماه ۱۳۹۴ تا مرداد ماه ۱۳۹۵ انجام گرفت. مراحل انجام کار از ابتدا تا به آخر به شرح زیر می‌باشد. ۱۰۰ نمونه شیر خام از دامداری‌ها، روستا های سطح شهر و مغازه‌های لبنیات فروشی سراسر شهر قم جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل و داخل لوله‌های استریل درپوش‌دار و در کابین حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. و بعد از گرفتن اطلاعات مربوط به هر گاو از لحاظ وضعیت سلامت و سابقه ابتلا به بیماری های مختلف از هر گاو ۵۰ میلی لیتر نمونه شیر درون ظروف استریل برچسب دار تهیه شد و سریعا به آزمایشگاه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم منتقل گردید.

ب) کشت و جداسازی

به این صورت که لوله های آزمایش پس از درب گذاری، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد تا کاملا سترون گردد و از هر نمونه ۱۰ میلی لیتر به طور مستقیم وارد لوله شد. لوله ها در آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm[8] (دور بر دقیقه) سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد و حدود ۱ میلی لیتر رسوب انتهای لوله جهت کشت به کار رفت. از این رسوب تحت شرایط استریل نمونه برداری شد وبه محیط حاوی براث غنی کننده لیستریا (Listeria Enrichment Broth) منتقل شد. این محیط

1. Mueller hinton agar
2. Blood agar
3. Oxford agar
4. Palcam
5. Listeria selective agar
6. Cold enrichment
7. Polymerase chain reaction
8. Revolutions per minute

کشت به مدت ۷۲ ساعت در محیط یخچال ۴-۰ درجه سلسیوس به عنوان محیط غنی کننده سرما قرار داده شد (cold enrichment) و پس از گذشت ۷-۳ روز، از محیط غنی کننده نمونه برداری شد و در محیط آگار انتخابی لیستریا (Listeria selsctiv agar) به روش خطی کشت گردید. این محیط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز گذاشته شد و سپس پلیت های حاوی کلونی های کوچک و مورب و محدب همراه با سطح هموار و مات جهت تشخیص نگهداری شد. از این کلونی ها نمونه برداری شد و پس از تهیه گسترش با رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی شد و کلونی های باکتری های گرم مثبت کوکوباسیلی شکل جهت پاساژ دادن در محیط آگار انتخابی کشت موجود انتقال داده و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بر روی باکتری کلونی خالص، تست کاتالاز جهت تمایز این باکتری از سایر باکتری ها انجام شد. باکتری های کاتالاز مثبت را به محیط مایعMRVP انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و نتیجه این تست بعد از اضافه کردن معرفها بررسی شد که این باکتری از نظر VP،MR مثبت است.

سپس جهت تمایز بیشتر، کلونی های کاتالاز مثبت را روی محیط های قندی که *لیستریا* آن ها را تخمیر کرده و اسید تولید می کند کشت داده و همچنین خصوصیات تحرک *لیستریا* در دمای ۲۲ درجه سلسیوس جهت تشخیص بهتر استفاده شد.

با توجه به خاصیت همولیتیک بودن *لیستریا مونوسیتوژنز*، کلونی ها را در ژلوز خوندار کشت داده تا ضمن انجام آزمون همولیز بتوان باکتری را برای مدت بیشتری نگهداری کرد.

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی لیستریا مونوسایتوژنز

	گالاکتوز	لاکتوز	مانیتول	گزیلوز	گلیکوژن	بتا-همولیز
لیستریامونوسایتوژنز	+/-	+	-	-	-	+

ج) استخراج DNA

برای این منظور، ابتدا سویه های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط LB کشت داده شدند. مطابق با دستور العمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سینا ژن ایران، DNA ژنومی از باکتری های جداسازی شده و رشد یافته بروی محیط کشت به طور مستقیم، تخلیص گردید. کیفیت DNA استخراج شده، پس از الکتروفروز بروی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و تابش نور ماورای بنفش بررسی شد. در تمام مراحل انجام این تحقیق از سویه استاندارد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

د) انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

به منظور بررسی حضور ژن actA، در ابتدا پرایمر های اختصاصی مربوط به تکثیر این ژن ها در سایت NCBI، توسط محققان این مقاله طراحی و ثبت گردید. در این مطالعه به منظور تکثیر ژن actA در سویه های جدا شده لیستریا مونوسایتوژنز از پرایمر های ژن actA استفاده گردید.

جدول ۲- توالی مربوط به ژن *actA*

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC %
Forward primer	GATTTATGCGTGC GATGATG	20	55.71	45.00
Reverse pr	CGATGATGCTATG GCTTTCC	20	56.73	50.00

جدول ۳- توالی مربوط به ژن ۱۶srRNA

پرایمر	توالی('3->'5)
Lis-F	TGTTAATGAACCTACAGGACCTTC
Lis-R	TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر(غلظت ۱۳ پیکومول)، ۱

میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۱۰۰ نانو گرم) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت۵/۲-۱ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوربت) با شرایط دمایی ۳۰ ثانیه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. و در پایان نیز ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای Extension نهایی به برنامه اضافه شد.

و) الکتروفورز در ژل آگاروز

۱۵ میکرولیتر از محصولات PCR همراه با loading buffer بر روی ژل آگارز ٪۱/۵ بار شد و الکتروفورز انجام شد. مدت الکتروفوز ۳۰ دقیقه و ولتاژ آن ۱۰۰ ولت بود. DNA نمونه ها با استفاده از اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس ازآن ژل ها با ترانسلومیناتور اشعه فرابنفش و سیستم ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۳ نمونه جداشده *لیستریا مونوسایتوژنز* جداشده از محصولات لبنی مورد مطالعه در سطح شهر قم، ازنظر وجود ژن actA به کمک روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

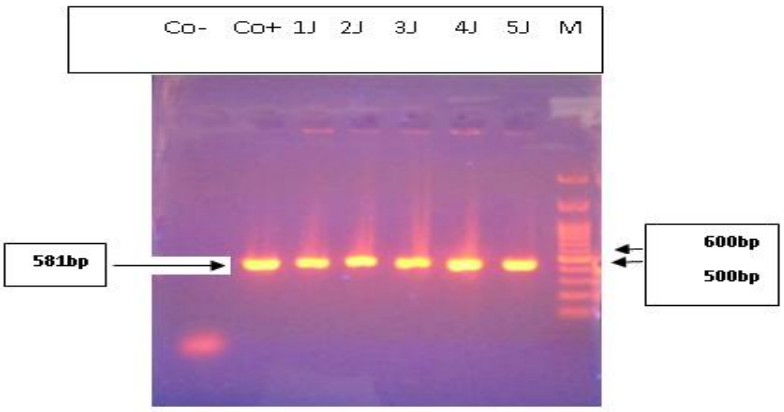
نتایج

پس ازانجام آزمون های بیوشیمیایی، باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به صورت کوکوباسیل گرم مثبت، متحرک در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، بای اسکولین مثبت، MR-VP مثبت، و همولیز مثبت مشاهده گردید.

از مجموع ۱۰۰ نمونه مواد لبنی مورد بررسی، ۳ مورد (٪۳) آلودگی با *لیستریا مونوسایتوژنز* گذارش شد. که از ۱۰۰ نمونه شیر ۳ مورد *لیستریا مونوسایتوژنز*(٪۳) جداسازی گردید.

نتایج مربوط به فراوانی ژن actA توسط PCR

در تمامی نمونه های مورد بررسی شامل باکتری *لیستریامونوسایتوژنز* فراوانی ژن actA به صورت ٪۱۰۰ مشاهده گردید. از مجموع ۳ مورد *لیستریا مونوسایتوژنز* جدا شده ٪۱۰۰ سویه های جدا شده دارای فنوتیپ قرمز کنگو مثبت را داشتند. که این امر نشان دهنده بیماریزا بودن سویه های جداسازی شده می باشد.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن actA (۵۸۱bp) با روش PCR

بحث

لیستریا بیماری عفونی است که به وسیله باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* از مواد غذایی آلوده وحیوانات و محیط آلوده به انسان منتقل می گردد. و از مطالعات سال های (۱۸۸۹) الی (۱۹۸۸) شیوع بیماری به شکل های اپیدمیک-اسپورادیک گزارش شده است(۹).

در جمعییت های مختلفی که به باکتری آلوده می شوند بسته به نوع مقاومت دفاعی بدن، عفونت لیستریایی تظاهرات کلینیکی منحصر به خود را دارد.

در زنان باردار به صورت انفولانزا و یا به صورت باکتریمی خود را نشان می دهد که از جفت به جنین منتقل و باعث بیماری گرانولوماتوز سپتیک است و منجر به مرگ جنین یا سقط می گردد. در نوزادان اگر با آلودگی لیستریوز به دنیا آماده باشند علائم مرضی تشنج، سیانوز، اسهال، استفراغ مشاهده می شود.

در گروه سنی بالاتر از ۶۰ سال اغلب به صورت مننژیت لیستریایی بروز پیدا می کند.در افرادی که سرطان با بیماری زمینه ای دارند باعث ایجاد باکتریمی و مننژیت می گردد(*۱۰و۱۱*).

در ایران وضعیت واقعی *لیستریا مونوسایتوژنز* ناشناخته است و اطلاعات کمی از حضور لیستریا مونوسایتوژنز در محصولات غذایی که در ایران مصرف می شود در دسترس است. لازم به ذکر است که لیستریوز بیماری قابل گزارشی در برنامه سلامت و بهداشت ایران محسوب نمی شود. به علاوه هیچ بررسی با توصیه ای مبنی بر حضور *لیستریا مونوسایتوژنز* در مواد غذایی در ایران وجود ندارد. عادت های غذا خوردن ایرانیان با الگوی کشور های غربی متفاوت است. به جز برخی از غذا های غربی، غذا های مصرفی در ایران به صورت محلی تولید می شوند و به شکل غذاهای سنتی در این کشور مصرف می شوند (۱۲).

پس از آنجایی که *لیستریا مونوسایتوژنز* یک پاتوژن غذایی است و در محصولات لبنی از جمله شیر خام یافت می شود و با توجه به اینکه مواد لبنی آماده مصرف می باشند لذا جدا سازی و تشخیص این باکتری از محصولات لبنی از اهمییت بالایی برخوردار است. روش های اولیه شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* بیشتر بر مبنای خصوصییات فنوتیپی هستند و محصولات ژنی را شناسایی نمی کنند. این روش ها شامل بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، آنتی ژنی و باکتریوفاژی است(۱۳).

استفاده از روش های مولکولی برای تشخیص و شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* به سال ۱۹۹۰ بر می گردد. در ۱۰ سال گذشته در تعداد قابل ملاحظه ای از مطالعات از روش های مولکولی استفاده شده است (۱۴). در سال های اخیر مزایای روش های مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع عوامل مختلف عفونت های میکروبی از جمله لیستریا مونوسایتوژنز مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). لذا با طراحی پرایمر های مختلف اقدام به بسط روش PCR برای شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* شد (*۱۶*).

در این تحقیق که در سطح استان شهرستان قم صورت گرفت، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام از دامداری ها و مغازه ها و روستاهای شهرستان قم از سال ۱۳۹۴ تا سال ۱۳۹۵ جمع آوری شده بودند, به ازمایشگاه منتقل گردیدند. ابتدا بار میکروبی شیرهای خام تعیین گردید، سپس جهت غنی سازی *لیستریا مونوسایتوژنز*، ۲۵ میلی لیتر از هر نمونه شیر در ۲۲۵ میلی لیتر محیط LEB[1] غنی سازی شد. نمونه های غنی شده روی محیط لیستریا سلکتیو آگار کشت داده شدند. کلنی های مشکوک با انجام آزمایشات باکتریولوژی و تست های افتراقی از نظر *لیستریا مونوسایتوژنز* تایید شدند. و در آخر برای تایید نهایی بروی محیط کروم آگار که محیط اختصاصی *لیستریا مونوسایتوژنز* است

1. Listeria enrichment broth

کشت داده شد. در مرحله بعد، برای تایید نهایی باکتری های جدا شده و نیز بررسی ژن برخی فاکتور های ویرولانس، از روش PCR استفاده شد. ابتدا DNA باکتری ها با استفاده از کیت تخلیص DNA شرکت Roche استخراج شد. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن های 16srRNA، actA انجام گردید.

نتایج به دست آمده نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه مواد لبنی مورد بررسی در این تحقیق، ۳ نمونه (۳ ٪ نمونه ها) آلوده به این باکتری بودند.

نکته حائز اهمیت در این تحقیق این است که نمونه های مثبت از نظر *لیستریا مونوسایتوژنز*، در فصل پاییز به دست آمده اند. در واقع تحقیقات نشان می دهد که وقوع لیستریوز با فصل وابستگی داشته است، به طوری که در فصل پاییز و زمستان شیوع بیماری گزارش شده که ممکن است به دلیل آن باشد که در پاییز و زمستان، دام ها با غذای سیلو شده تغذیه می شوند (*۱۷*). در این تحقیق از آنجایی که جمع آوری نمونه ها از تیر ماه ۱۳۹۴ شروع گردید و تعداد نمونه هایی که در فصل پاییز و زمستان جمع آوری شد کم بودند شاید به دلیل کم جدا کردن نمونه در این فصول به دلیل نداشتن شیر در دام ها بود.

از آنجایی که در تحقیق حاضر ۳٪ درصد نمونه ها آلوده به *لیستریا مونوسایتوژنز* بودند و در تحقیق *کالوری و همکارانش* ۵/۱ درصد نمونه ها آلوده به این باکتری بودند، مقایسه نتایج نشان می دهد که میزان آلودگی شیر های شهر قم به این باکتری نسبت به هندوستان پایین تر است.

در سال ۱۳۸۸ خانم *رحیمیان ظریف* در استان کردستان وضعیت آلودگی به *لیستریا مونوسایتوژنز* را در شیر های خام و پاستوریزه مورد بررسی قرار دادند. برای این منظور، ۱۰۰ نمونه شیر پاستوریزه و ۱۰۰ نمونه شیر خام از شهر های استان به صورت نمونه گیری خوشه ای تصادفی تهیه و از نظر باکتریولوژی آزمایش شد که پس از جمع آوری نمونه ها و سانترفیوژ آن ها، رسوب به دست آمده به لوله حاوی محیط براث غنی کننده لیستریا منتقل شد و پس از گذشت ۷-۳ روز از محیط غنی کننده نمونه برداری شد و در محیط آگار انتخابی لیستریا کشت گردید و جهت تشخیص و تایید نهایی کلنی ها از تست های بیوشیمیایی استفاده شد که پس از اتمام آزمایشات باکتریولوژی از بین ۱۰۰ نمونه شیر خام ، ۶ مورد و از بین ۱۰۰ مورد شیر پاستوریزه ۱ مورد *لیستریا مونوسایتوژنز* جدا گردید (*۱۸*).

با توجه به اینکه در تحقیق حاضر ۳٪ درصد نمونه ها آلوده به *لیستریا مونوسایتوژنز* بودند و در تحقیق خانم *رحیمیان ظریف* ۶ درصد آلودگی به این باکتری گزارش شد، مقایسه نتایج نشان می دهد که میزان آلودگی شیر های قم به این باکتری نسبت به کردستان پایین تر می باشد.

در سال ۲۰۰۶ در کشور فرانسه، *تاهاموسادک حمدی و همکارانش* روی شناسایی و تعیین ویژگی مولکولی *لیستریا مونوسایتوژنز* از شیر خام، بخش آب مانند شیر و شیر لخته شده تولید شده و جمع آوری شده در ناحیه Algiers و Blida بین ستامبر ۲۰۰۳ و ژولای ۲۰۰۴ جدا گردید. ۴ تا از ۱۵۳ (۲/۶۱ ٪) نمونه های شیر دامداری و ۶ تا از ۸۰ (۷/۵۰ ٪) نمونه های تانکر تست شده، برای *لیستریا مونوسایتوژنز* مثبت بودند. همه نمونه های بخش آب مانند شیر و شیر لخته شده (n-12) از نظر حضور *لیستریا مونوسایتوژنز* منفی بودند. اما ۲ تا از ۲۲ نمونه های بخش آب مانند شیر آلوده *به لیستریا اینوکوآ* بودند. *لیستریا مونوسایتوژنزهای* جدا شده به وسیله تکنیک PFGE[1] تعیین ویژگی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیر خام و فرآورده های شیر خام، منابع بالقوه

1. Pulsed-field gel electrophoresis

لیستریا مونوسایتوژنز هستند و این نشان دهنده یک خطر بالقوه برای مصرف کننده می باشد (۱۹).

در کشور ایران با توجه باینکه امکانات کافی برای سایر تکنیک های جداسازی *لیستریا مونوسایتوژنز* از قبیل سرولوژی، ژنتیک PCR و استفاده از پراب های DNA لیستریا و از این قبیل غالبا در دسترس نیست ناچارا بایستی در حال حاضر از روش های کشت و بیوشیمیایی برای جداسازی و شناسایی این باکتری استفاده شود اگرچه وقت گیر و پر زحمت باشد و برای تایید نهایی از روش های سرولوژیک استفاده کرد.

منابع و مآخذ

1. Adds B.M.&Jan M.S.(2002): Cerebellar abscess due to Listeria Monocytogenes. Saudi med j.feb:23(2):226-8.

2. Aynor S, Alonso B. Detection of E.coli O157H7 in water samples by chromogenic media. J. Applied and Environ. Mic . 2004; 69: 6103-6110.

3. Blood, DC(2000):Veterinary medicine, 9 th edition PP:660-665.

4.Cother P.D.& Reilly K(2001): Role of the glutarhatedecarboxylase acid resistance Monocytogenes LO28 in low PH food s, j food prot,Sep;64(9):1362-8.

5. Curtis.G.D.W,Lee,W.H.1995.Culture media and methods for the isolation of Listeria monocytogenes. International Journal of food Microbiogy.26:1-13.

6. Murray PA,Baron JA,Jorgensen JH.Mannual of Clinical Microbiology.8 th ed,Washington DC,ASM Prees,2003;PP:95-100.

7. Carole Burtscher , Stefan Wuertz. Evaluation of the Use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for Detection of Pathogenic Bacteria in Biosolids from Anaerobic Digestors and Aerobic Composters. Appl Environ Microbiol.2003; 96(8): 4618–4627.

8. Afnor S, Alonso B. Detection of E.coli O157H7 in water samples by chromogenic media. J. Applied and Environ. Mic . 2004; 69: 6103-6110.

9. Brzoza KL, Rockel AB, Hiltbold EM. Cytoplasmic entry of Listeria monocytogenes enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. J Immunol 2004;173(4): 2641–51.

10. Geginat G, Schenk S, Skoberne M, Goebel W, Hof H. A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from Listeria monocytogenes. J Immunol 2001; 166(3): 1877-84.

11. Jamali H, Paydar M, Looi C Y, Wong WF. Prevalence of Listeria monocytogenes Serotypes in ready mayonnaise Salads and salad vegetables in Iran. Afr J Microbiol RES. 2013; 1(19): 1903-1906.

12. Liu D. Identification sabtyping and virolence determination of Listeria monocytogenes an important food borh pathogen. J Med Microbiol. 2006;55:645-659.

13. Rodriguez Quantitive detection of listeria monocytogenes and listeria innocua by real-time PCR: assessment of hly,iap, and lin 02483 targets and ampliFluor technology. Envion.

14. Inatsury,Bari MI,Kawasaki S,Isshiki K.Survival of Escherichia coli O157:H7,Salmonela entritidis,Staphylococcous aureus, and Listeria monosytogenes in Kimchioj food port. 2004:67(7):1497-500.

15. Barros MA, Nero LA, Silva LG,dO vidiol,Monteiro FA,Tamanini R ,Hofer E, Beloti V.Listeria monocytogenes: occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing Plants.Meat Sci. 2007;76(4):591-596.

16. Aygun O, Pen livanlars. Listeria SPP. In theraw Milk and dairy Productsin Ahtakya, Turkey. Food Control. 2006; 17:676-679.

17. A.Abrahim, A.Sarimvci, C.Panoubution and prevalence of Listeria Spp.in domestic,retail and industrial refrigeration is Greece.International Journal of food Microbiology.34:171-177.

18. Hegmans JP, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrech BN. Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate–pulsed dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(10): 1168-77.

19. Lanzavechia A, Sallusto F. Regulation of Tcell immunity by dendritic cells. Cell2001;106(3): 263–6.