مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v18i3.2905

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شده از شیر به روش Real-time PCR در استان زنجان و شناسایی ژن‌های ویرولانس

محمدجواد محمدرضایی[۱]، داوود افشار[۱]، کامیار منصوری[۲]، سیامک حیدرزاده[۱*]

۱- گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۲- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۴/۲۱

چکیده

مقدمه: *لیستریا مونوسیتوژنز یکی از مهمترین پاتوژن‌های غذایی است که منابع غذایی مختلفی مانند شیر خام، پنیر، بستنی، سبزیجات، غذاهای آماده (RTE)، مرغ، گوشت و ماهی را آلوده می‌کند. لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند باعث بیماری‌های شدید از جمله مننژوانسفالیت، سقط جنین، سپتی‌سمی‌با میزان مرگ و میر بالا (۳۰٪) در انسان شود. از آنجا که لیستریا مونوسیتوژنز توانایی سقط، زایمان زودرس و تولد نارس نوزادان را دارد که اثرات پایدار و طولانی مدتی بر سیستم عصبی مرکزی و حرکتی (مننگوانسفالیت، سپتی‌سمی) دارد.*

مواد و روش‌ها: *در مطالعه حاضر، ۱۵۰ نمونه شیر خام از استان زنجان به‌صورت دوره‌ای جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط کشت BLEB کشت داده شدند. سپس نمونه‌ها به‌صورت خطی در محیط‌های بلاد آگار و PALCAM آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۵ ℃ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. Real-time PCR روی ژن hlyA انجام شد. وجود یا عدم وجود ژن‌های ویرولانس در نمونه مثبت نیز توسط روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.*

نتایج: *در این مطالعه، از ۱۵۰ نمونه شیر، تنها یک نمونه در هر دو روش Real-time PCR و روش‌های متداول آزمایشگاهی مثبت گزارش گردید. این جدایه حاوی سه ژن ویرولانس (hlyA actA و prf-A) در بین ژن‌های ویرولانس مورد مطالعه بود که در پاتوژنز باکتریایی نقش دارند.*

نتیجه‌گیری: *در مطالعه ما، یک نمونه شیر آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز با روش Real-time PCR گزارش شد که این جدایه در محیط کشت رشد کرد و دارای سه ژن ویرولانس بود. در این مطالعه، شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در استان زنجان نسبت‌به مطالعات قبلی کمتر بود که شیوع کمتر آن را می‌توان به کم بودن تعداد نمونه و فصل نمونه‌برداری نسبت داد، زیرا شیوع این باکتری در فصول مختلف متفاوت است.*

واژه‌های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، **Real-time PCR**، شیر، ژن‌های ویرولانس، زنجان.

***نویسنده مسئول:** زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، **تلفن:** ۰۲۴-۳۳۱۴۰۳۵۵، **نمابر:** ۰۲۴-۳۳۴۴۹۵۵۳ **Email:** heidarzadehsiamak@gmail.com

ارجاع: محمدرضایی محمدجواد، افشار داوود، منصوری کامیار، حیدرزاده سیامک. بررسی مولکولی فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شده از شیر به روش Real-time PCR در استان زنجان و شناسایی ژن‌های ویرولانس. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛۱۸(۳):۲۰-۱۰.

CC BY NC

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز (پاتوژن داخل سلولی منتقله از طریق مواد غذایی) مسئول لیستریوزیس انسانی است که این بیماری، یک بیماری کشنده همراه با علایم گاستروانتریت، سپتی‌سمی، منتژیت، انسفالیت، آبسه کبدی، زایمان زودرس، مرده‌زایی، سقط جنین، مرگ نوزادان و پنومونی در افراد دچار نقص ایمنی می‌باشد (۱ و ۲). با توجه به توانایی لیستریا مونوسیتوژنز برای زنده ماندن در مواد غذایی در شرایط نامطلوب مانند دمای پایین (۴°C)، نمک بالا، pH پایین و وجود مواد شوینده، این باکتری به‌طور گسترده در محیط‌ها و انواع غذاها یافت می‌شود (۱ و ۲). این باکتری در همه جا حاضر بوده و اغلب از شیر خام، پنیر، بستنی، سبزیجات، غذاهای آماده (RTE)، مرغ، گوشت و ماهی جداسازی می‌گردد (۱).

یک گام اساسی در کنترل و جلوگیری از گسترش لیستریوزیس، شناسایی دقیق لیستریا مونوسیتوژنز در منابع محیطی و غذایی در اسرع وقت است (۲). روش‌های تشخیصی بسیاری، از جمله روش‌های سنتی و روش‌های مولکولی، برای شناسایی این باکتری ابداع شده‌اند که در این میان کشت به‌عنوان روش استاندارد طلایی برای شناسایی باکتری‌های موجود در مواد غذایی محسوب می‌شود. با این حال، این تکنیک‌ها پرزحمت و زمان‌بر هستند و ممکن است برای غذاهایی با ماندگاری پایین مناسب نباشند. بنابراین، رویکردهای مبتنی بر اسید نوکلئیک مانند PCR و روش‌های Real-time PCR برای تشخیص مطمئن لیستریا مونوسیتوژنز به‌دلیل سرعت، ویژگی و حساسیت بالا پیشنهاد شده‌اند (۳). بسیاری از محیط‌های کشت و اجزای غذایی ممکن است آزمون PCR را مهار کنند که منجر به کاهش قابل توجه حساسیت و نتایج منفی کاذب می‌شود (۴). ویژگی و حساسیت تست PCR به روش‌های استخراج ژنوم، توالی‌های پرایمر و ژن‌های هدف نیز بستگی دارد. علاوه بر این، روش PCR تنها می‌تواند برای تعیین وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌ها به جای شمارش تعداد باکتری‌ها مناسب باشد. بنابراین، تکنیک‌های جدیدتری مانند Real-time PCR برای ارزیابی کمی‌پیشنهاد شده است (۳). هدف از این مطالعه شناسایی سریع و دقیق لیستریا مونوسیتوژنز در شیر و همچنین شناسایی فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های جداسازی شده بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر ۱۵۰ نمونه شیر خام از استان زنجان به‌صورت دوره‌ای جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در محیط غنی‌سازی لیستریا، BLEB (Merck, Germany) کشت داده شدند و یک شبانه‌روز در دمای ۳۰°C انکوبه شدند. به‌طور همزمان از روش غنی‌سازی سرد برای نمونه‌ها استفاده گردید. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، نمونه‌ها به‌صورت خطی در محیط کشت بلاد آگار و PALCAM آگار (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵°C انکوبه گردیدند. جدایه‌های مشکوک با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند فعالیت همولیتیک، تست CAMP، کاتالاز، اکسیداز، MR/VP، تحرک در دمای ۲۵°C و ۳۷، هیدرولیز اسکولین، تولید اسید از گلوکز، دکستروز، مانیتول، مالتوز، زایلوز و رامنوز، احیاء نیترات و همولیز مورد آزمایش قرار گرفتند (۵). به‌منظور کنترل آزمون‌های مورد استفاده و تأیید تشخیصِ باکتری جداسازی شده از روش‌های مولکولی استفاده گردید.

ژن‌های ویرولانس لیستریا مونوسیتوژنز شامل hlyA، actA، inlA، inlB، inlC، inlJ، prf-A، iap، plcA، plcB و mpl با استفاده از پرایمرهای فوروارد (رو به جلو) و ریورس (معکوس) تکثیر داده شدند (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR برای ژن‌های ویرولانس

ژن‌های هدف	توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی (′۵ به ′۳)	سایز آمپلیکون	منبع
hlyA	F: GCGCAACAAACTGAAGCAAA R: TAACCTTTTCTTGGCGGCAC	۲۲۱ bp	(۶)
actA	F: ACCGCCTCCAACAGAAGATG R: GGATTACTGGTAGGCTCGGC	۶۴۴ bp	(۵)
prf-A	F: GACCGCAAATAGAGCCAAGC R: GAAGTCATTAGCGAGCAGGC	۱۸۱ bp	(۶)
inlA	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	۸۰۰ bp	(۷)
inlC	F: AATTCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	۵۱۷ bp	(۷)
inlJ	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	۲۳۸ bp	(۷)
inlB	F: GGCTGGGCATAACCAAATTA R: CCTAAACCTCCGACCAAACA	۲۹۳ bp	(۸)
plcA	F: TCCCATTAGGTGGAAAAGCA R: CGGGGAAGTCCATGATTAGA	۸۴۰ bp	(۸)

iapA	F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	۱۳۱ bp	(۹)
plcB	F: CAGCTCCGCATGATATTGAC R: CTGCCAAAGTTTGCTGTGAA	۷۲۳ bp	(۸)
mpl	F: AAAGGTGGAGAAATTGATTCG R: AGTGATCGTATTGTAGGCTGCTT	۴۵۰ bp	(۸)

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی آزمایش PCR برای ژن‌های ویرولانس لیستریا مونوسیتوژنز

مراحل آمپلیکاسیون (تکثیر)	شرایط دمایی و زمانی	تعداد سیکل‌ها
دناتوراسیون اولیه	۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۶۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه	۳۰ سیکل
انلینگ actA	۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه	
انلینگ plcA	۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه	
انلینگ plcB	۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه	
انلینگ hlyA	۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه	
انلینگ prfA		
انلینگ inlA, inlC, inlJ		
انلینگ inlB		
انلینگ iapA	۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه	
انلینگ mpl	۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه	
گسترش	۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه	
گسترش نهایی	۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه	۱ سیکل
نگهداری	۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه	۱ سیکل

برای این منظور ابتدا سویه‌های باکتریایی به مدت ۲۰ ساعت بر روی محیط کشت BHI براث کشت داده شدند. سپس، طبق دستورالعمل کیت استخراج FavorPrep™ Milk Bacterial DNA (Favorgen, Taiwan)، DNA ژنومی‌از باکتری‌های جدا شده استخراج گردید. غلظت DNA استخراج شده توسط نانودراپ و کیفیت آنها نیز پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید. در تمامی مراحل این مطالعه از سویه استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC 1294) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

مخلوط واکنش PCR حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از ماستر‌میکس (2x)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد (۱۰ pmol/µl)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱ میکرولیتر (µl) DNA ژنومی (حاوی تقریباً ۱۰۰ نانوگرم DNA) بود که توسط آب استریل دیونیزه به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رساندیم. پروتکل چرخه شامل: یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه اصلی شامل مرحله دناتوراسیون (واسرشت) در دمای ۹۵°C به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله انلینگ (اتصال) بسته به پرایمر اختصاصی به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود (جدول ۲). آمپلیکون‌ها از طریق الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ (۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۵) بر روی بافر ۰/۵x TBE جداسازی شدند و در زیر نور UV مشاهده گردیدند.

نمونه‌ها از نظر وجود ژن لیستریولیزین O (hlyA) از طریق Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. توالی مجموعه‌های پرایمر اولیگونوکلئوتیدی شامل پرایمر فوروارد hlyA: 5'-GCG CAA CAA ACT GAA GCA AA-3' و پرایمر ریورس hlyA: 5'-TAA CCT TTT CTT GGC GGC AC-3' بود (۶).

آزمون Real Time-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر از مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از ماستر‌میکس گرین (RealQ Plus 2x) [Ampliqon, Copenhagen, Denmark]، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱ میکرولیتر از ۱۰۰ نانوگرم DNA الگوی و ۹/۵ میکرولیتر ddH2O بود. واکنش‌ها در سیستم ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) انجام شد. پروتکل چرخه شامل: ۹۴°C برای ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه اصلی شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله آنلینگ در ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ذوب در ۷۶°C–۹۰ بود. آزمون Real Time-PCR با مقادیر CT (آستانه چرخه) ≤۲۱ به‌عنوان منفی در نظر گرفته شد.

داده‌های مربوطه پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار STATA14 وارد و در نهایت به تعیین و مقایسه حساسیت، ویژگی آزمون Real-time PCR نسبت‌به آزمون استاندارد طلایی (کشت) پرداخته شد و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در مطالعه حاضر، سنجش PCR بر روی ژن‌های ویرولانس سویه جدا شده نشان داد که این ایزوله حاوی ژن‌های hlyA، actA و prf-A می‌باشد (شکل ۱).

در این مرحله Real-time PCR بر روی سویه استاندارد همانند شرایط و پروتکل راه‌اندازی شده انجام گردید که در سویه استاندارد CT=۲۱ به‌دست آمد و نتایج نمودار آن به‌صورت زیر بود (شکل ۲).

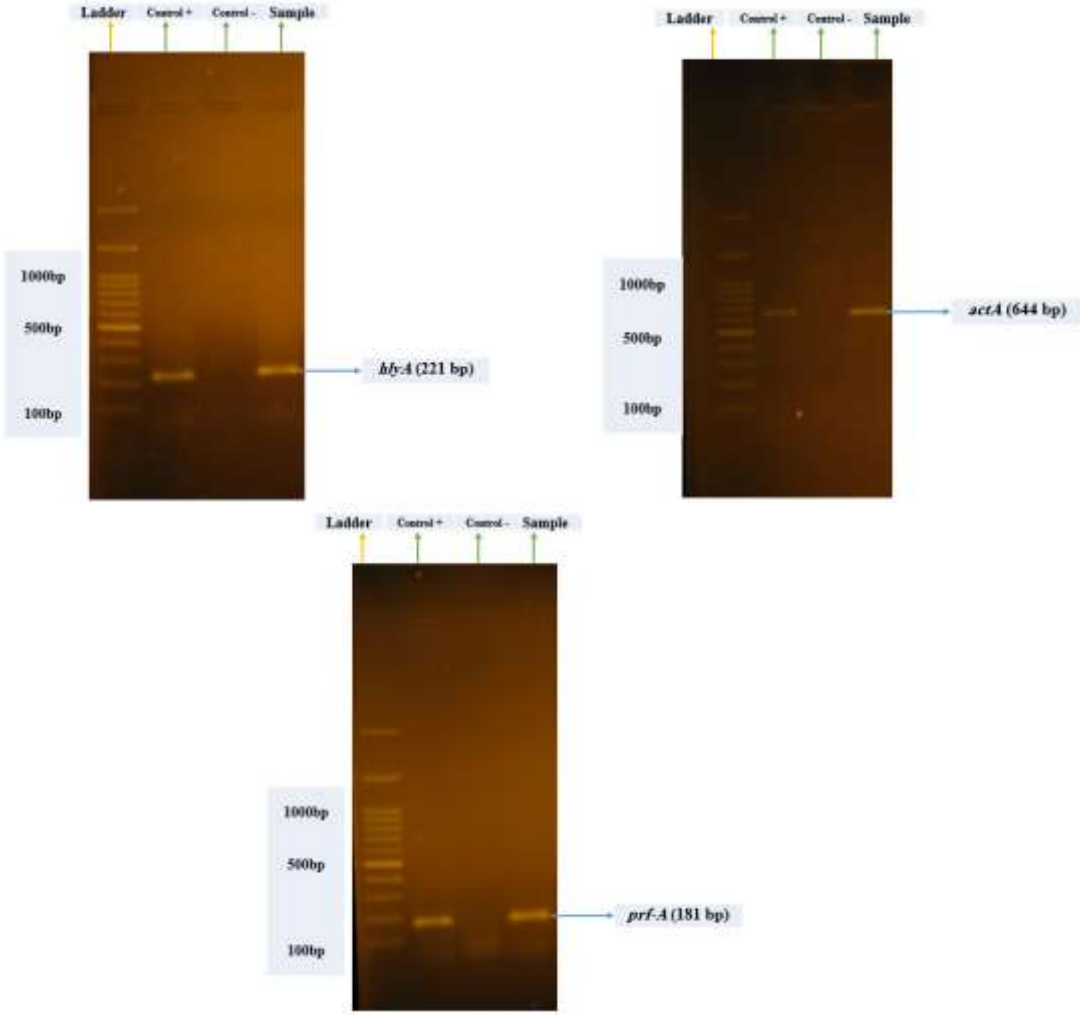
در نمودار Melt Curve سویه استاندارد با مشاهده تک قله بودن نمودار به این نتیجه می‌رسیم که سویه استاندارد دچار آلودگی‌هایی مانند باندهای غیراختصاصی یا پرایمر دایمر نشده است. همچنین TM=83 گزارش گردید و نتایج نمودار آن به‌صورت زیر بود (شکل ۳).

در این مرحله Real-time PCR روی رقت‌های مختلف از سویه استاندارد انجام شد تا مشخص شود آزمایش ما چقدر باکتری را می‌تواند تشخیص دهد و حداقل ارزش تشخیصی مقدار چقدر است (رقتی که در آن باکتری ما Undetected باشد نشان‌دهنده آن نقطه می‌باشد)، که CTهای گزارش شده به شرح زیر بودند (شکل ۴).

در این مرحله Real-time PCR روی نمونه‌های شیر همانند شرایط و پروتکل راه‌اندازی شده انجام گردید و یک نمونه مثبت گزارش گردید که CT این نمونه برابر با ۲۱ شد که در کنار کنترل منفی و نمونه استاندارد نتایج آن به‌صورت زیر می‌باشد (شکل ۵).

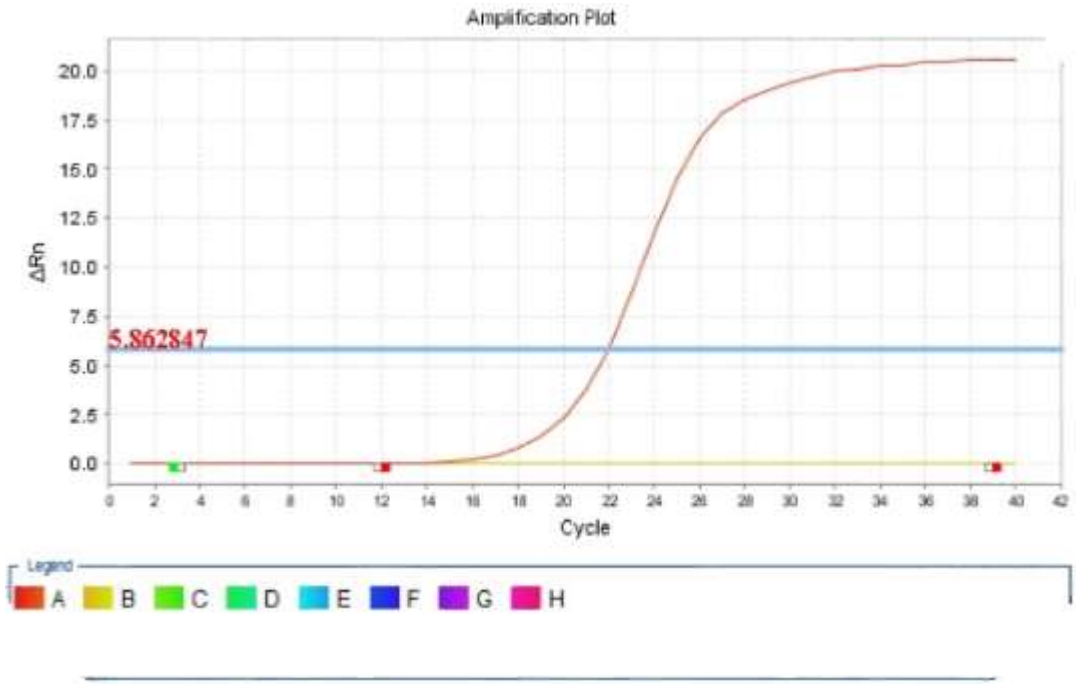
با انجام Real-time PCR روی کنترل مثبت باکتری و نمونه مثبت شیر در نمودار Melt Curve مشاهده گردید که هردو نمودار تک بانده بوده و در واقع آلودگی به باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمرها وجود ندارد. در ضمن TM= ۸۱/۲۳ برای هر دو نمونه گزارش گردید و نمودار زیر به‌دست آمد (شکل ۶).

در نهایت با استفاده از نرم‌افزار STATA14 به تعیین و مقایسه حساسیت، ویژگی تست Real-time PCR نسبت‌به تست استاندارد طلایی (کشت) پرداخته شد. در این روش با استفاده از جدول دو در دو و فرمول‌های مخصوص حساسیت و ویژگی محاسبه گردید که هم حساسیت تست Real-time PCR نسبت به کشت (استاندارد طلایی) ۱۰۰ درصد بود و هم ویژگی تست Real-time PCR نسبت‌به کشت (استاندارد طلایی) ۱۰۰ درصد بود.



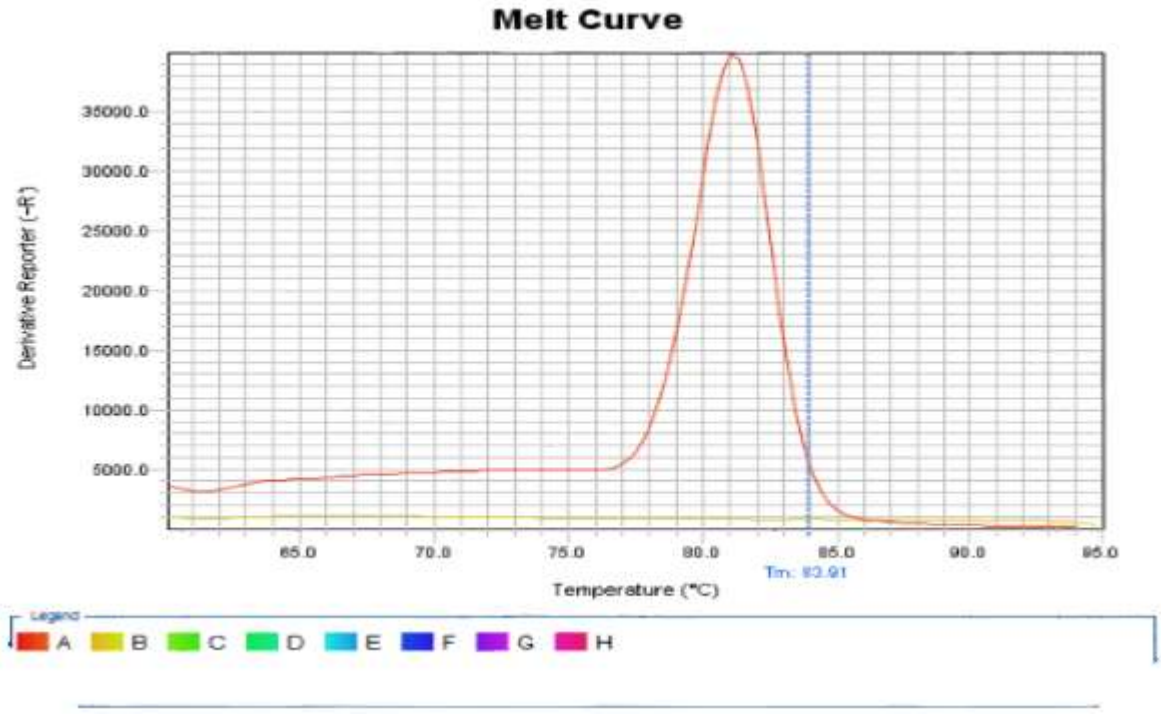
شکل ۱- ژن‌های ویرولانس جدایه لیستریا مونوسیتوژنز

این جدایه حاوی ژن‌های hlyA (۲۲۱ bp)، actA (۶۴۴ bp) و prf-A (۱۸۱ bp) بود.



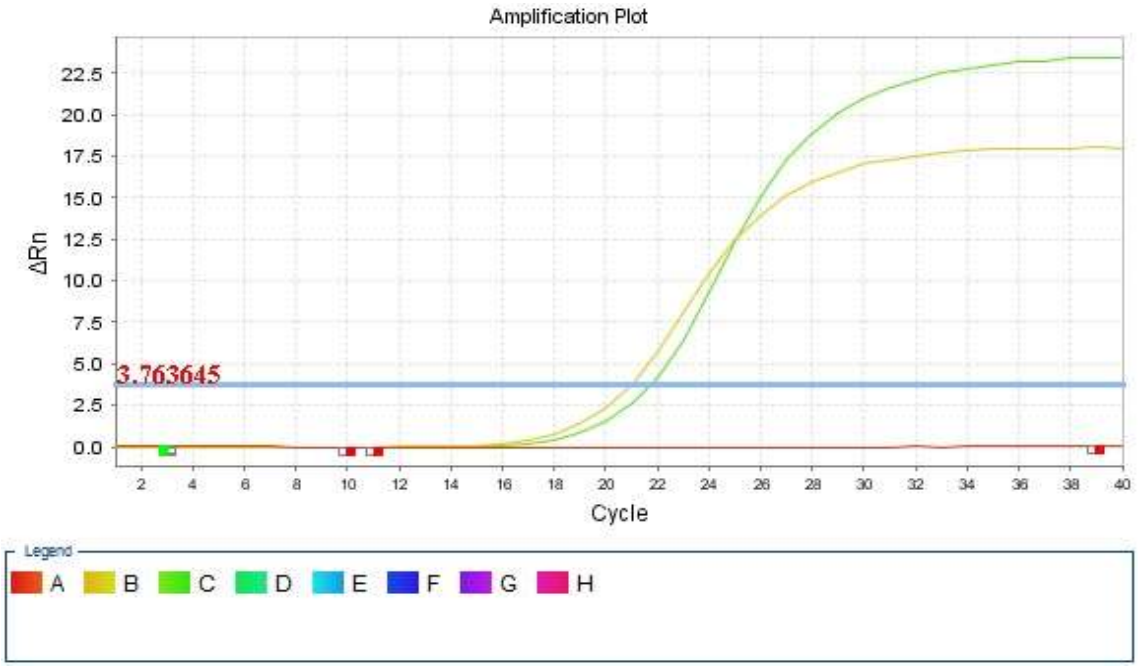
شکل ۲- نتیجه Real-time PCR با سویه استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز

CT به‌دست آمده برابر با ۲۱ بود.



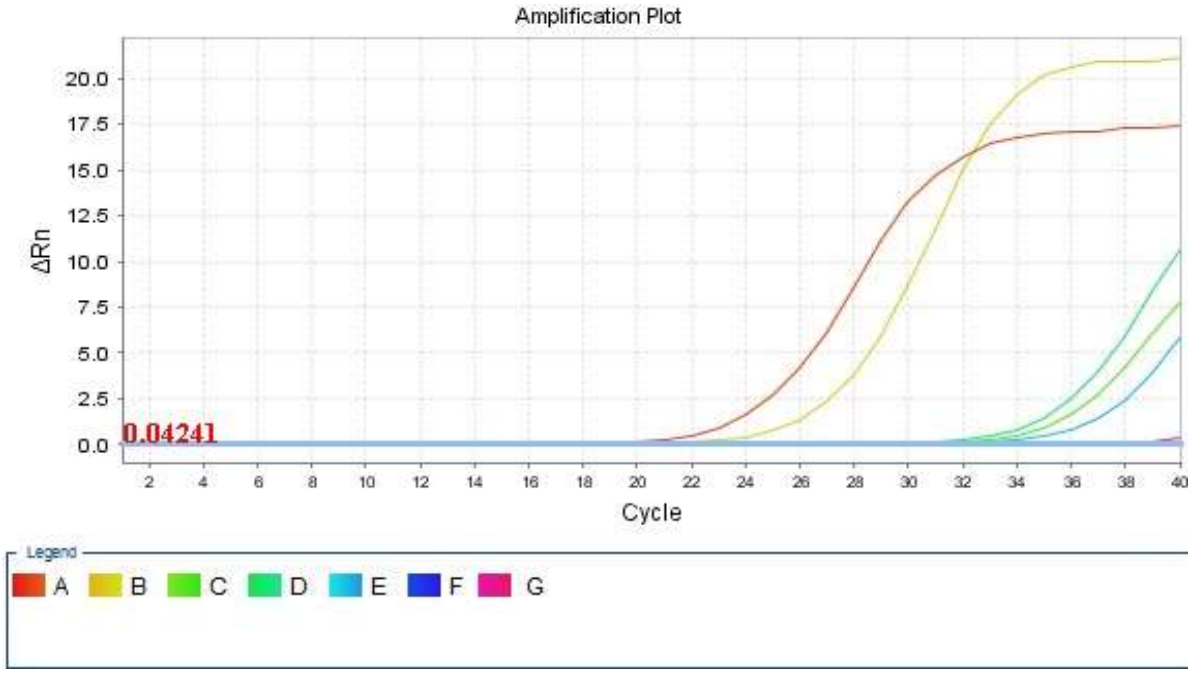
شکل ۳- منحنی ذوب آمپلیکون hlyA

همان‌طور که در تصویر مشخص است نتیجه نشان‌دهنده تک باند بودن واکنش می‌باشد و TM= ۸۳ می‌باشد.



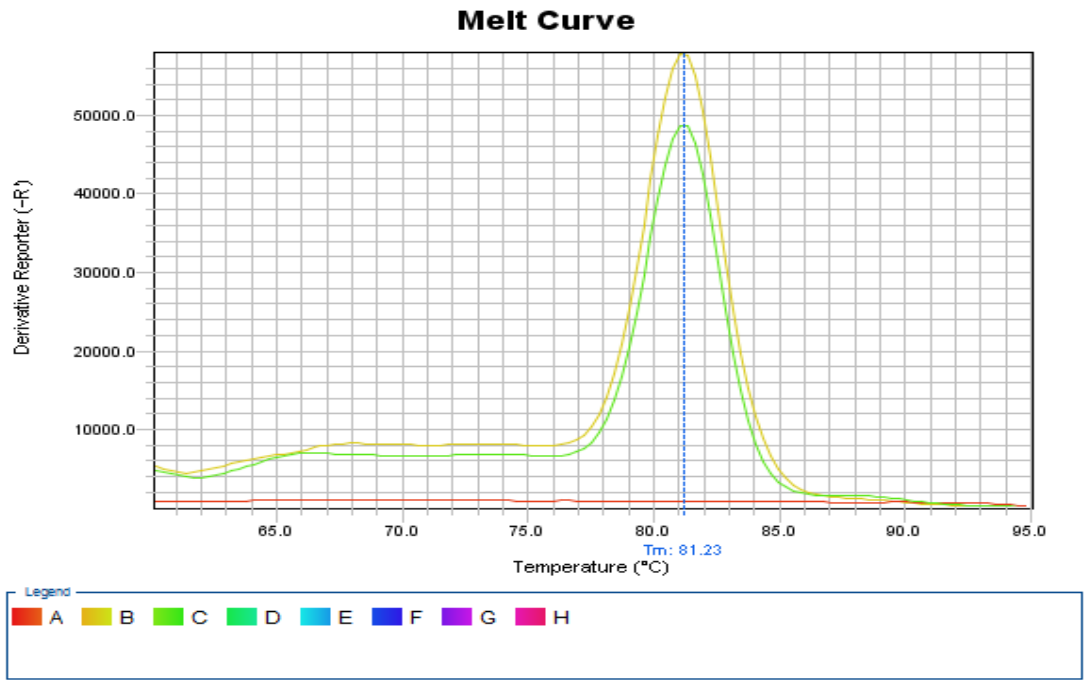
شکل ٤- آمپلیفیکاسیون پلات مربوطبه تست تعیین حساسیت روش Real-time PCR

A: CT:18, B: CT:20, C: CT:29, D: CT:30, E: CT:31, F: Undetected, G: NC (Negative control).



شکل ٥- نتیجه نمونه مثبت با Real-time PCR

چاهک A: کنترل منفی، چاهک B: نمونه استاندارد، چاهک C: نمونه مثبت با CT=۲۱/۷۶.



شکل ٦- منحنی ذوب آمپلیکون hlyA روی نمونه کنترل مثبت لیستریا مونوسیتوژنز و نمونه شیر

همان‌طور که در تصویر مشخص است نتیجه نشان‌دهنده تک باند بودن هر دو نمونه می‌باشد.

در جدول ۳ محاسبات انجام گردید که نتایج آن به شرح زیر بود:

جدول ۳- جدول دو در دو برای تعیین حساسیت و ویژگی تست Real-time PCR نسبت‌به تست استاندارد طلائی (کشت)

	کشت مثبت	کشت منفی
Real-time PCR مثبت	۱	۰
Real-time PCR منفی	۰	۱۴۹
مجموع	۱	۱۴۹

Sensitivity= TP/TP + FN; Sensitivity= 1/1 + 0 = 1/1= 100%
Specificity= TP/FP + TN; Specificity= 149/149 + 0= 100%

بحث

لیستریا مونوسیتوژنز به‌طور گسترده در خاک، آب، غذا، گیاهان، مدفوع، سیلوها، سبزیجات و علوفه کپک‌زده یافت می‌شود و یکی از مهمترین منابع عفونت در حیوانات اهلی و وحشی به‌شمار می‌رود (۱۰ و ۱۱). این ارگانیسم در علوفه تخمیری بسته‌بندی شده رشد می‌کند. این باکتری در علوفه تخمیر شده ذخیره شده در سیلوها (با pH بالاتر و کمتر از ۴/۵) وجود دارد (۱۲). اخیراً ارتباط قوی‌تری بین لیستریوزیس و مصرف محصولات لبنی در مقایسه با سایر محصولات غذایی گزارش شده است و شیر و پنیر پاستوریزه و غیرپاستوریزه به‌عنوان منبع طغیان مسمومیت غذایی شناسایی شده‌اند (۱۳ و ۱۴). لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند در شیر غیرپاستوریزه رشد کند و احتمال افزایش تعداد موجودات در حین نگهداری در مخازن شیر در مزارع و سیلوها وجود دارد (۱۵). منبع اصلی لیستریا مونوسیتوژنز در شیر، آلودگی مدفوع شیر است (۱۵ و ۱۶).

در ایران، وضعیت واقعی لیستریا مونوسیتوژنز ناشناخته است و اطلاعات کمی‌در مورد وجود لیستریا مونوسیتوژنز در محصولات غذایی مصرفی در دسترس است (۶). لازم به ذکر است لیستریوزیس یک بیماری قابل گزارش در برنامه سلامت ایران نمی‌باشد. علاوه بر این، مطالعه‌ای با توصیه برای وجود لیستریا مونوسیتوژنز در مواد غذایی در ایران وجود ندارد. عادات غذایی ایرانیان با الگوی کشورهای غربی متفاوت است. به استثنای برخی از غذاهای غربی، بیشتر غذاهای مصرفی در ایران به‌صورت محلی تولید و به‌صورت غذاهای سنتی مصرف می‌شود (۱۷). از آنجایی که لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند باعث سقط جنین، زایمان زودرس و اثرات طولانی مدت بر سیستم عصبی مرکزی و حرکتی نوزادان شود و همچنین میزان مرگ و میر بالایی (تقریباً ۳۰-۲۵٪) در نوزادان ایجاد می‌نماید، بنابراین آگاهی دقیق از شیوع این بیماری ضروری به نظر می‌رسد (۱۸ و ۱۹).

در سال ۱۳۸۳ مجتهدی و همکاران در لرستان (ایران)، ۷۲۰ نمونه لبنیات ارسالی به آزمایشگاه نظارت بر مواد غذایی و بهداشتی استان لرستان را مورد آزمایش قرار دادند و در ۹/۷۲ درصد از نمونه‌ها، لیستریا مونوسیتوژنز را شناسایی نمودند (۲۰). اولین مطالعه در مقیاس بزرگ در مورد شیوع عفونت لیستریا در ایران توسط جلالی و همکاران صورت گرفت. در مطالعه آنها در اصفهان (ایران)، حدود ۶۱۷ نمونه غذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت که لیستریا مونوسیتوژنز در ۲/۱ درصد از نمونه‌ها به دست آمد. میزان آلودگی در گوشت، لبنیات، سبزیجات و

غذاهای آماده به‌ترتیب ۲/۱، ۳/۱، ۷/۶ و ۱۲ درصد گزارش گردید (۲۱). رحیمی و همکاران از سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ در اصفهان (ایران)، ۵۹۴ نمونه شیر و فرآورده‌های لبنی را بررسی نمودند و ۵۵ مورد لیستریا مونوسیتوژنز را جداسازی نمودند (۲۲). در سال ۱۳۸۹ جمشیدی و همکاران در مشهد (ایران)، ۱۰۰ نمونه شیر خام را مورد بررسی قرار دادند که در مطالعه آنها در ۴ درصد از نمونه‌ها، لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شد (۲۳).

در استان زنجان مطالعه‌ای در مورد وضعیت لیستریا مونوسیتوژنز در شیر خام و غیرپاستوریزه انجام نشده است. در بررسی حاضر حدود ۱٪ از نمونه‌ها آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بودند و برخلاف برخی مطالعات دیگر، لیستریا اینوکوا و لیستریا سیلیجری یافت نشد. مطالعات مشابهی در سایر نقاط جهان انجام شده است. در مطالعه Mena و همکاران در پرتغال، آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز در شیر خام ۷/۱۶ درصد بود (۲۴). شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر در کشورهای مختلف از جمله آلمان، ایتالیا، فرانسه و استرالیا به‌ترتیب ۲/۹، ۴/۱۷، ۳/۳ و ۱۰ درصد گزارش شده است (۲۵ و ۲۶). در مطالعه‌ای که توسط نرو و همکاران در برزیل انجام شد، از ۳۶۶ نمونه شیر خام، ۳/۲۵ درصد آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بودند که بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۲۷). در تحقیق دیگری که توسط Arslan در ترکیه انجام شد، در ۸۰ نمونه شیر خام مورد مطالعه، ۱۰ درصد آلودگی به لیستریا مشاهده شد که ۵ درصد آن مربوط به لیستریا مونوسیتوژنز بود (۲۸). نتایج مطالعه ما با نتایج اکثر مطالعات دیگر مطابقت دارد، اما در برخی مطالعات شیوع لیستریا بیشتر از حد معمول گزارش شده است. دلیل این تفاوت به‌نظر می‌رسد مطالعه در زمان‌های مختلف و همچنین آلودگی ثانویه شیر خام در هنگام شیردوشی، حمل و نقل و سایر عوامل محیطی مؤثر بر رشد لیستریا باشد (۲۹). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که وقوع لیستریوزیس وابسته به فصل است، بنابراین در فصل زمستان شیوع این بیماری بیشتر است که ممکن است به این دلیل باشد که در فصل زمستان گاوها با غذای سیلوئی بیشتر تغذیه می‌شوند و همچنین آبستنی گاوها ممکن است یک عامل مستعدکننده عفونت باشد (۳۰).

اگرچه روش‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی سنتی به‌عنوان تست‌های ارزان و ساده از حساسیت خوبی برخوردار هستند، اما استفاده از روش‌های مولکولی به‌دلیل سرعت و دقت بالا می‌تواند نقش عمده‌ای در جداسازی و تشخیص عوامل بیماری‌زای غذایی داشته باشد (۲۹). تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز به روش‌های تشخیصی سریع‌تر و راحت‌تر مانند Real-time PCR نیاز دارد (۳۱ و ۳۲). Real-time PCR دارای مزایای متعددی نسبت‌به PCR معمولی است، از جمله خطر کمتر آلودگی متقابل، عدم نیاز به پردازش آمپلیکون‌ها پس از PCR، خطی بودن سیگنال فلورسنت متناسب با سطح DNA هدف در نمونه و قابلیت اتوماسیون (۲). این تکنیک همچنین سریع‌تر از روش‌های سنتی است و بسیار حساس و اختصاصی می‌باشد و امکان شناسایی همزمان ژن‌های مختلف و/یا باکتری‌های مختلف را فراهم می‌کند (۲). رایج‌ترین رنگ غیراختصاصی، SYBR Green I است که در صورت اتصال به DNA دو رشته‌ای توسط فلورسنت شناسایی می‌شود (۳۱ و ۳۲). در این تحقیق از روش Real Time PCR حساس و اختصاصی برای شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در شیر با استفاده از ژن لیستریولیزین O(hlyA) استفاده شد. این ژن نقش مهمی‌در پاتوژنز لیستریا مونوسیتوژنز دارد و در تمامی‌سویه‌های این باکتری وجود دارد. در سال ۲۰۱۴، کیم و همکاران نشان دادند که Real-time PCR از نظر آماری در حساسیت تشخیص، برتری دارد (P>۰/۰۵) و نسبت‌به روش‌های کشت استاندارد آسان‌تر و سریع‌تر می‌باشد (۳۳). در سال ۲۰۱۷، کدراک و همکاران یک آزمایش Real-time PCR را به‌منظور شناسایی ژن هومولیزین (hlyA) لیستریا مونوسیتوژنز راه‌اندازی کردند (۳۴). در مطالعه Heo و همکاران، از ۵۳۳ نمونه مورد بررسی، چهار نمونه (۰/۸ درصد) مثبت در Real-time PCR نشان داده شد. دو نمونه سوسیس (۱/۶ درصد) و ۲ نمونه ژامبون (۰/۹ درصد) از نظر لیستریا مونوسیتوژنز (در 100 CFU/g) مثبت گزارش گردید (۳). همچنین در مطالعه وانگاس و همکاران بر روی ۸۱ نمونه، ۱۳ نمونه با روش کشت مثبت شدند و ۲۱ نمونه توسط تکنیک Real-time PCR مثبت شدند (۳۵).

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که به‌منظور جداسازی و شناسایی مطمئن گونه‌های لیستریا در غذاهای حاوی سطوح بالایِ میکروفلور (به ویژه شیر) باید از روش‌های دقیق‌تری استفاده نمود. همچنین نتایج این مطالعه همانند نتایج سایر مطالعات نشان می‌دهد کهReal Time PCR می‌تواند به‌عنوان یک ابزار غربالگری بسیار مؤثر و حساس برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در ماتریس‌های غذایی استفاده شود. اگرچه در این مطالعه میزان جداسازی و شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در شیرهای مصرفی استان زنجان کم بود، اما با توجه به اهمیت این باکتری از نظر بیماری‌زایی برای انسان و رشد آن در شرایط سردخانه، تولید و تأمین بهداشتی شیر پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند که از تمامی مشارکت کنندگانی که در این پژوهش همکاری کردند نهایت تشکر و قدردانی نمایند.

ملاحظات اخلاقی، تعارض منافع و مشارکت نویسندگان

هیچگونه تعارض منافعی از سوی نویسندگان وجود ندارد. تمامی نویسندگان در تمامی مراحل انجام پژوهش و نگارش مقاله سهیم بوده و از محتوای علمی و نگارشی آن آگاه بودند.

حمایت مالی

تحقیق حاضر با نظارت و تصویب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام گردید. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی زنجان (کد پروژه: A-12-1175-9) انجام شد.

کد اخلاق

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق (کد اخلاقی: IR.ZUMS.REC.1399.062) تأیید گردید.

References

1. Lopes-Luz L, Mendonça M, Bernardes Fogaça M, Kipnis A, Bhunia AK, Bührer-Sékula S. Listeria monocytogenes: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. Critical Reviews in Microbiology 2021:1-20. doi: 10.1080/1040841X.2021.1911930

2. Chen J-Q, Healey S, Regan P, Laksanalamai P, Hu Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii in foods and environmental sources. Food Science and Human Wellness 2017;6:39-59. doi: 10.1016/j.fshw.2017.03.001

3. Heo EJ, Song BR, Park HJ, Kim YJ, Moon JS, Wee SH, et al. Rapid detection of Listeria monocytogenes by real-time PCR in processed meat and dairy products. Journal of Food Protection 2014;77:453-8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-318

4. Rodríguez-Lázaro D, Pla M, Scortti M, Monzó HJ, Vázquez-Boland JA. A novel real-time PCR for Listeria monocytogenes that monitors analytical performance via an internal amplification control. Applied and Environmental Microbiology 2005;71:9008-12. doi: 10.1128/AEM.71.12.9008-9012.2005

5. Nayak DN, Savalia C, Kalyani I, Kumar R, Kshirsagar D. Isolation, identification, and characterization of Listeria spp. from various animal origin foods. Veterinary World 2015;8:695-701. doi: 10.14202/vetworld.2015.695-701

6. Heidarzadeh S, Dallal MMS, Pourmand MR, Pirjani R, Foroushani AR, Noori M, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, serotyping and virulence genes screening of Listeria monocytogenes strains at a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Iranian Journal of Microbiology 2018;10:307.

7. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of Listeria monocytogenes. J Microbiol Methods 2007;71:133-40. doi: 10.1016/j.mimet.2007.08.007

8. Montero D, Bodero M, Riveros G, Lapierre L, Gaggero A, Vidal RM, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. Frontiers in Microbiology 2015;6:384. doi: 10.3389/fmicb.2015.00384

9. Kayode AJ, Semerjian L, Osaili T, Olapade O, Okoh AI. Occurrence of multidrug-resistant Listeria monocytogenes in environmental Waters: A menace of environmental and public health concern. Frontiers in Environmental Science 2021;9. doi: 10.3389/fenvs.2021.737435

10. Rodriguez C, Taminiau B, García-Fuentes E, Daube G, Korsak N. Listeria monocytogenes dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. Food Control 2021;120:107540. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107540

11. Jooste P, Jordan K, Leong D, Alvarez-Ord, oñez A. Listeria monocytogenes in food: Control by monitoring the food processing environment. African Journal of Microbiology Research 2016;10:1-14. doi: 10.5897/AJMR2015.7832

12. Pauly T, Tham W. Survival of Listeria monocytogenes in wilted and additive-treated grass silage. Acta Veterinaria Scandinavica 2003;44:1-14. doi: 10.1186/1751-0147-44-73

13. Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, et al. Hypervirulent Listeria monocytogenes clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. Nature Communications 2019;10:1-13. doi: 10.1038/s41467-019-10380-0

14. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection 2007;9:1236-43. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011

26. Carrique-Mas J, Hökeberg I, Andersson Y, Arneborn M, Tham W, Danielsson-Tham M-L, et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese–an outbreak of listeriosis? Epidemiology & Infection 2003;130:79-86. doi: 10.1017/S0950268802008014

27. Nero L, De Mattos M, De Aguiar Ferreira Barros M, Ortolani M, Beloti V, de Melo Franco B. Listeria monocytogenes and salmonella spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. Zoonoses and Public Health 2008;55:299-305. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x

28. Arslan S, Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria spp. in homemade white cheese. Food Control 2008;19:360-3. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.04.009

29. Shamloo Aghakhani E, Jalali M, Mirlohi M, Abdi Moghadam Z, Shamloo Aghakhani E, Reza Maracy M, et al. Prevalence of Listeria species in raw milk in Isfahan, Iran. Journal of Isfahan Medical School 2012;30:1355-63. doi: 10.4103/2277-9183.150384

30. Konosonoka I, Jemeljanovs A, Osmane B, Ikauniece D, Gulbe G. Incidence of listeria spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. International Scholarly Research Notices 2012;2012. doi: 10.5402/2012/435187

31. Barkallah M, Gharbi Y, Hmani M, Mallek Z, Gautier M, Gdoura R, et al. Locked nucleic acid probe-based real-time PCR for the diagnosis of listeria monocytogenes in ruminants. Mol Cell Probes 2016;30:138-45. doi: 10.1016/j.mcp.2016.02.010

32. Denis E, Bielińska K, Wieczorek K, Osek JJJoVR. Multiplex real-time PCRs for detection of Salmonella, Listeria monocytogenes, and verotoxigenic Escherichia coli in carcasses of slaughtered animals. Journal of Veterinary Research 2016;60:287-92. doi: 10.1515/jvetres-2016-0044

33. Kim D-H, Chon J-W, Kim H, Kim H-S, Choi D, Kim Y-J, et al. Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for listeria monocytogenes in foods. Korean J Food Sci Anim Resour 2014;34:665-73. doi: 10.5851/kosfa.2014.34.5.665

34. Kędrak-Jabłońska A, Budniak S, Krupa M, Szczawińska A, Reksa M, Szulowski K, et al. Detection of listeria spp. and listeria monocytogenes in biological samples by SYBR green i and taqman probe-based real-time PCRs. J Vet Res 2017;61:427-32. doi: 10.1515/jvetres-2017-0069

35. Vanegas MC, Vásquez E, Martinez AJ, Rueda AM. Detection of listeria monocytogenes in raw whole milk for human consumption in colombia by real-time PCR. Food Control 2009;20:430-2. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.07.007

15. Mohammed HO, Stipetic K, McDonough PL, Gonzalez RN, Nydam DV, Atwill ER. Identification of potential on-farm sources of Listeria monocytogenes in herds of dairy cattle. American Journal of Veterinary Research 2009;70:383-8. doi: 10.2460/ajvr.70.3.383

16. Fox E, O'Mahony T, Clancy M, Dempsey R, O'Brien M, Jordan K. Listeria monocytogenes in the Irish dairy farm environment. J Food Prot 2009;72:1450-6. doi: 10.4315/0362-028x-72.7.1450

17. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology 2006;55:645-59. doi: 10.1099/jmm.0.46495-0

18. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews 2001;14:584-640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001

19. Heidarzadeh S, Pourmand MR, Hasanvand S, Pirjani R, Afshar D, Noori M, et al. Antimicrobial susceptibility, serotyping, and molecular characterization of antibiotic resistance genes in Listeria monocytogenes isolated from pregnant women with a history of abortion. Iranian Journal of Public Health 2021;50:170-9. doi: 10.18502/ijph.v50i1.5084

20. Mojtahedi A, Tarrahi MJ, Sepahvand A, Khakpour A, Radsari E, Tvasoli M, et al. Frequency determination of listeria contamination in dairy products and their antibiotic resistance pattern. Yafteh 2004;6:27-32.

21. Jalali M, Abedi D. Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. International Journal of Food Microbiology 2008;122:336-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.082

22. Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species isolated from milk and dairy products in Iran. Food Control 2010;21:1448-52. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.03.014

23. Jamshidi A, Khanzadi S. The presence of Listeria monocytogenes in raw milk samples in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research 2011;11:363-7. doi: 10.22099/IJVR.2010.108

24. Mena C, Almeida G, Carneiro Ls, Teixeira P, Hogg T, Gibbs PA. Incidence of Listeria monocytogenes in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology 2004;21:213-6. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00057-1

25. Rudolf M, Scherer S. High incidence of Listeria monocytogenes in European red smear cheese. International Journal of Food Microbiology 2001;63:91-8. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00413-x

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 18, No 3

DOI: 10.22100/jkh.v18i3.2905

Original Article

Molecular Investigation of the Frequency of Listeria Monocytogenes in Raw Milk Samples Collected from Zanjan Province, Iran

Mohammd Javad Mohhamad Rezaei (Ph.D.)[1], Davoud Afshar (Ph.D.)[1], Kamyar Mansori (Ph.D.)[2], Siamak Heidarzadeh (Ph.D.)[1*]

1- Dept. of Microbiology and Virology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
2- Dept. of Epidemiology and Biostatistics, School of Medicine Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Received: 10 February 2022**, Accepted:** 12 July 2022

Abstract:

Introduction: *Listeria monocytogenes is one of the most important foodborne pathogens that infect various food sources such as raw milk, cheese, ice cream, vegetables, ready-to-eat (RTE) foods, poultry, meat, and fish. Listeria monocytogenes can cause severe diseases such as meningoencephalitis, abortion, and septicemia, with a high mortality rate (30%) in humans. Therefore, the present study was carried out to molecularly investigate the frequency of Listeria monocytogenes in raw milk samples.*

Methods: *In this study, 150 raw milk samples from Zanjan province, Iran, were collected at regular intervals. Pure isolates of Listeria monocytogenes were obtained after enrichment in Buffered Listeria enrichment broth (BLEB), followed by plating onto blood agar and PALCAM agar medium and incubation at 35 °C for 48 hours. A hly gene-based PCR assay was developed to detect the presence or absence of virulence genes in isolated Listeria monocytogenes.*

Results: *The results showed that only one sample was positive by both real-time and conventional PCR methods. It contained three virulence genes, including hlyA, actA, and prf-A, among the virulence genes studied.*

Conclusion: *The prevalence of Listeria monocytogenes in Zanjan province was lower than in previous studies, which was attributed to the small number of samples and the sampling season.*

Keywords: Listeria monocytogenes, Real-time PCR, Milk, Virulence genes, Zanjan.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** S. Heidarzadeh, **Email**: heidarzadehsiamak@gmail.com*

Citation: Mohhamad Rezaei M.J, Afshar D, Mansori K, Heidarzadeh Siamak. Molecular investigation of the frequency of Listeria monocytogenes in raw milk samples collected from Zanjan province, Iran. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(3):10-20.