حضور ژن lmo در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از سبزیجات

جمیله نوروزی[۱]، الهام سیاسی تربتی[۲]، محمد رضا کریمی[۳]*

۱-استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲-استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳-کارشناس ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
***نشانی برای مکاتبه:** تهران-اشرفی اصفهانی-پشت مجتمع تجاری تیراژه-کوچه شهید زمانی-پلاک ۱۲-واحد ، ۱۳، تلفن: ۰۹۱۲۳۴۳۹۰۹۶، mrk_rdshow@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: شهریور نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *لیستریا مونوسیتوژنز کوکوباسیل گرم مثبت است که در شرایط محیطی و در درون بدن موجودات زنده توانایی زنده ماندن و رشد را دارد و میتواند باعث بروز بیماری لیستریوزیس گردد. ژن lmo در لیستریا مونوسیتوژنز، عاملی جهت بالا رفتن مقاومت باکتری در برابر شرایط نامساعد محیطی و در بدن میزبان، نظیر تغییرات دما، pH وحتی نمکهای صفراوی است. هدف از این مطالعه، تعیین حضور ژنlmo در لیستریا مونوسیتوژنز جداشده از سبزیجات بوده است.*

روش کار : *از اواخر اردیبهشت ماه تا اواخر آبانماه ۱۳۹۱ و در مدت زمان ۷ ماه، تعداد ۸۲ نمونه سبزیجات مختلف از مزارع اطراف بهشت زهرای تهران، زمینهای کشاورزی ورامین و همچنین تعدادی مغازه سبزی فروشی در سراسر تهران جمع آوری گردید. با استفاده از روش استاندارد باکتریولوژی، لیستریا مونوسیتوژنز جدا گردید. در ادامه با استفاده از PCR ژن lmo در لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شد.*

نتایج: *از ۸۲ نمونه سبزیجات جداسازی شده شامل کاهو۲۳ نمونه، کلم سفید ۱۹ نمونه، کلم قرمز ۱۹ نمونه، کرفس۱۳نمونه و جعفری ۱۲ نمونه، ۸ نمونه (۹/۷٪) حاوی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بودند.در این ۸۲ نمونه، ۴ مورد (۱۷/۳٪) لیستریا مونوسیتوژنز از کاهو، ۳ مورد (۱۵/۷٪) از کلم سفید و ۱مورد (۶/۷٪) از کرفس جدا گردید. از این ۸ نمونه باکتری جداسازی شده، تعداد ۷ نمونه (۸۷/۵٪) حاوی ژن lmo بود. همه نمونه مواد لبنی، بالینی، استاندارد و ۹۰ درصد نمونه های گوشت حاوی لیستریا مونوسیتوژنز دارای ژن lmo بودند.*

نتیجه گیری: *ژن lmo در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده در نمونه های سبزیجات و نمونه های کلینیکی وجود داشته، که با زنده نگاه داشتن باکتری در شرایط نامساعد محیطی و همچنین در درون بدن میزبان می تواند در بقاء و بیماری زایی باکتری موثر باشد. میزان شیوع لیستریا مونوسیتوژنز کم است ولی بدلیل توانایی این باکتری در تولید بیماریهای مهلک، مورد توجه است. پس به منظور جلوگیری از عفونت با لیستریا مونوسیتوژنز لازم است که ضمن رعایت بهداشت، حین تهیه مواد غذایی، تمهیدات لازم جهت جلوگیری از ابتلا به لیستریا مونوسیتوژنز انجام گیرد. که در این مرحله شناخت عوامل بیماریزا در این باکتری میتواند در از بین بردن لیستریا مونوسیتوژنز به ما کمک کند.*

واژگان کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، ژنlmo ، PCR، سبزیجات.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری گرم مثبت، میله ای شکل است(۱،۲). این باکتری توانایی ایجاد کپسول و اسپور را ندارد. باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در دمای ۲۵-۲۰ درجه سیلسیوس دارای تاژک های پری تریش بوده که با میکروسکوپ الکترونی دیده می شود و با کمک آنها حرکتtumbeling دارد. ولی در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس تاژک های خود را از دست داده و یا تنها دارای یک تاژک می باشد. به همین دلیل، در این دما دارای حرکت بسیارکند و یا فاقد حرکت می باشد(۴،۳). این باکتری، هوازی بی هوازی اختیاری بوده و می تواند از CO2 بجای O2 جهت زنده ماندن استفاده کند و با داشتن این ویژگی میتواند در مجرای گوارش پستانداران زنده بماند(۵ ،۶). اکثر گونه های *لیستریا*، توانایی تولید اسید از قندهای مالتوز، تره هالوز و رامنوز داشته، و ازتخمیر این قندها اسید تولید میشود(۷و۸). البته اگر دیگر شرایط محیط نیز برای *لیستریا مونوسیتوژنز*مناسب باشد این باکتری می تواند pH، بین ۴/۲ تا ۹/۸ را نیز تحمل کند(۹).از ویژگی های دیگر این باکتری، توانایی رشد در حرارت های پائین نظیر دمای یخچال می باشد و چون اکثر مواد

غذایی مثل سبزی جات در این دما نگه داری میشوند لذا شرایط جهت رشد این باکتری ها مساعد میباشد. معمولاً طیف حرارتی مورد نیاز جهت رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* حدود ۴۵-۲ درجه سیلسیوس است. این باکتری توانایی رشد در نمک ۱۰ درصد را دارد(۱۱و۱۰). این باکتری کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است(۱۲). تست CAMP در *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت است. *لیستریا مونوسیتوژنز* توانایی اسکولین (+)، TSI(+)، SIM(+) است.و دارای خاصیت NADH اکسیدازی میباشد. *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط SIM منظره ای شبیه چتر یا سرو وارونه ایجاد میکند(۱۳).

معمولاً باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از طریق مواد غذایی آلوده منتقل می گردد. این مواد غذایی آلوده می توانند شامل سبزی جات خام، گوشت و فرآورده های آن، محصولات لبنی محلی باشند. ولی راه های غیر شایع دیگری نیز وجود دارد که میتواند سبب انتقال *لیستریا مونوسیتوژنز* به انسان شود مثل استنشاق *لیستریاهای* معلق در هوا، تماس با مایعات و فرآورده های حیوانی آلوده با *لیستریا*. درصورت تماس با *لیستریا مونوسیتوژنز* گرانول هایی در محل تماس ایجاد میشود(۱۴). پس می توان انتظار داشت که ورود *لیستریا مونوسیتوژنز* به درون بدن از راه گوارش باشد. معمولا برای ابتلا به بیماری لیستریوزیس مقادیر بسیار زیادی (حدود 10^6 کلنی در واحد) از *لیستریا مونوسیتوژنز* بایستی به بدن وارد شود. این در حالی است که تعداد 10^2*لیستریامونوسیتوژنز* در غذا مجاز است(۱۵). مدت زمان بروز علائم و شدت بروز بیماری به فاکتورهایی مثل مقاومت دفاعی بدن فرد بیمار و تعداد میکروارگانیسم های وارد شده به بدن بستگی دارد. یعنی این بیماری بیشتردر افراد سال خورده، کودکان، زنان باردار، افراد داری نقص سیستم ایمنی، گیرندگان عضو پیوند، الکلیسم ها و دیابتی ها بیشتر بروز می کند. علائم اولیه در این افراد شامل: سردرد تب مداوم، حالت تهوع، استفراغ، اسهال، یبوست و یا علائمی شبیه آنفلوانزای خفیف می باشد و در صورت گسترش عامل بیماری زا به سیستم عصبی مرکزی علائمی نظیر مننژیت، سپتی سمی و انسفالیت دیده میشود و حتی در صورت درمان، علائم نورولوژیک مشهود می باشد. این بیماری در افراد سالم گاهی بصورت بیماری شبه سرماخوردگی و یا انتریت خود محدود شونده دیده می شود(۱۶). خطرناک ترین تظاهرات لیستریوزیس شامل باکتریمی و مننژیت بوده ولی شاخص ترین شکل بالینی آن عفونت در دستگاه تناسلی زنان باردار می باشد. اما متداول ترین تظاهرات بالینی در دوران بارداری برای مادر باکتریمی میباشد که علائمی شبیه آنفلوانزا در مادر پدیدار میگردد. اگر ابتلا به *لیستریا مونوسیتوژنز* در مراحل اولیه بارداری رخ دهد احتمال سقط جنین و یا حتی تولد نوزاد با مننژیت بالا است. عفونت لیستریایی پس از زایمان و تخلیه محتویات رحم خودبخود محدود می شود(۱۷).

ژن lmo موجود در این باکتری نقش موثری را در خنثی کردن نمک های صفراوی برعهده داشته و به زنده ماندن باکتری در محیط قلیایی روده کمک میکند و نقش مهمی در سنتز پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی *لیستریا مونوسیتوژنز*، بخصوص در سلول های طحال را بر عهده داشته، که با ایجاد تغییر در ساختار دیواره سلولی *لیستریا مونوسیتوژنز* در برابر حمله ماکروفاژها، باعث بروز مقاومت در باکتری میشود(۱۸). این مطالعه با هدف تعیین حضور ژن *lmo* در *لیستریا مونوسیتوژنز* های جدا شده از سبزی جات انجام شد.

روش کار

تعداد۸۲ نمونه سبزی جات از مزارع و زمین های کشاورزی اطراف بهشت زهرای تهران و زمین های کشاورزی ورامین و هم چنین از ۹ مغازه میوه فروشی و غذاهای آماده مصرف در سطح شهر تهران انجام گردید. نمونه ها شامل کاهو، کلم سفید و قرمز، کرفس و جعفری بود. انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه محمودیه (بخش میکروب شناسی) و انجام آزمایشات و تستهای لازم جهت ایزوله صورت گرفت. به منظور انجام این مرحله نمونه‌ها درون کیسه‌های فریزر استریل قرار داده شد و بطور مجزا درون فلاسک حاوی یخ گذاشته شد وسریعا به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها در آزمایشگاه بطور کاملا جداگانه درون هاون چینی استریل له و درون لوله‌های آزمایش حاوی محیط BHI Broth ریخته شد.درب لوله‌ها توسط پنبه استریل بسته و لوله‌های حاوی سبزی جات له شده درون یخچال گذاشته شد.

جهت جدا سازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از مواد غذایی مورد بررسی از روش غنی سازی در سرما استفاده شد . بعلت عدم دسترسی به محیط های اختصاصی جهت رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* مثل محیط پالکام آگار و یا محیط اکسفورد از محیط‌های کشت غیر اختصاصی مثل محیط BHI Broth، برای کشت استفاده شد. بعد از گذشت مدت زمان ۱۴ روز نمونه‌های نگهداری شده در دمای یخچال خارج شده و ازباکتری های رشد یافته موجود در ته لوله آزمایش توسط آنس برداشت نموده و روی محیط های Listeria Enrichment Agar ، Muller Hinton Agarو BHI Agarبصورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها درون انکوباتور در دمای۳۷ درجه سیلسیوس و فشار ۵ اتمسفر به مدت ۲۴ ساعت نگه داری گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از انکوبا تور خارج و بررسی رشد میکروارگانیسم روی محیط‌های درون پلیت‌ها صورت گرفت.جهت جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز تستهای بیوشیمیایی نیز انجام شد.این تستها شامل: MR-VP، همولیز ، کاتالاز، اکسیداز، تست حرکت، تست قندهای گلوکز، رامنوز، مالتوز، گزیلوز و مانیتول بودند.

با توجه به روش غنی سازی در سرما ، جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز حدود ۷ ماه طول کشید.پس از جداسازی باکتری به محیط پپتون گلیسرول منتقل و در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگه داری گردید. قبل از استخراج DNA ، باکتری به مدت ۲۴ ساعت در محیط LB نگهداری شد.

به منظور استخراج DNA از کیت (Molecular Biological System Transfer) MBST استفاده شد. در ادامه به منظور تایید حضور یا عدم حضور ژن lmo در لیستریا مونوسیتوژنز، پرایمر ژن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) مورد BLST قرار گرفت. درPCR ، قطعه‌ای از مولکول DNA با کمک دو پرایمر، Reverse (با توالی TTATTTGTTAACAATGTTTA) و Forward (با توالی ATGTGTACGTCAATAACTTA) تکثیر یافته و این تغییرات با کمک دستگاه الکتروفورز روی ژل آگارز و زیر نور UV مشاهده گردید. مراحل تهیه master mix شامل: ۲/۵µL از محلول Buffer (10X)، µL1 از ماده dNTPs، ۱µL از ماده پرایمر F(Forward)، ۱µL از ماده پرایمر R (Reavers)، ۱µL از ماده DNA Genomic (استخراج شده)، ۱۸/۳µL از آب دیونیزه (آب مقطر) و µL ۰/۲ از ماده آنزیم (آخرین مرحله) تا حجم نمونه به µL ۲۵ بود. لوله‌های حاویmaster mixبا ذکر شماره مشخص روی هر کدام، جهت انجام PCR با برنامه زیر دردون دستگاه PCR ، با برنامه نشان داده شده در جدول ۱، قرار داده شد .

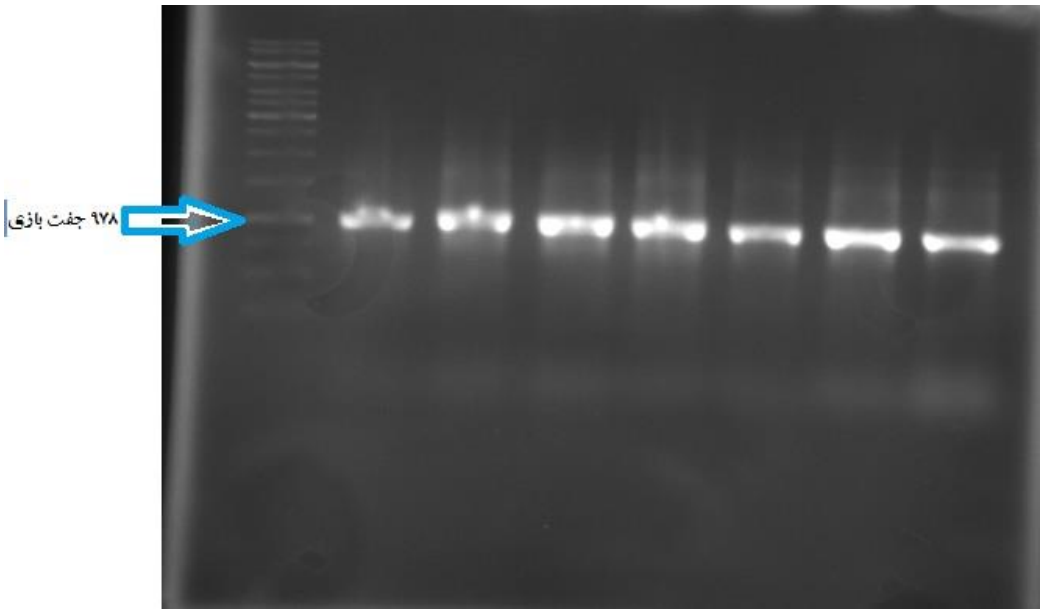
جدول ۱- برنامهPCR

دمای Pre demodulation	۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴ دقیقه
دمای Denaturation	۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه
دمای Annealing	۴۵ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه
دمای Extention	۷۲ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه
دمای post extention	۷۲ درجه سیلسیوس به مدت پنج دقیقه
Amplified	۳۵ چرخه

جهت مشاهده باند مربوط به نمونه‌های PCRشده، عمل الکتروفورز شامل مراحل: - ترکیب۳µl نمونه به همراه ۷ میکرو لیتر رنگ بروموتیمول بلو و تزریق آنها بدرون چاهک‌های ژل، - برقراری جریان برق ۴۵V در دستگاه الکتروفورز ، Run ژن ها بعد از گذشت مدت زمان یک ساعت و ۱۴ دقیقه، خاموش کردن دستگاه و استخراج ژل، قرار دادن ژل درون اتیدیوم بروماید به مدت ۱۲ دقیقه، و انتقال آن به درون دستگاه UV بعد از خروج از اتیدیوم بروماید بود.

یافته ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۱ و طی مدت زمان ۸ ماه در آزمایشگاه محمودیه وابسته به دانشگاه آزاد اسلامی- تهران شمال انجام گردید. در این پژوهش، تعداد ۸۲ نمونه سبزی جات مختلف از مزارع اطراف بهشت زهرای تهران و زمین های کشاورزی ورامین و برخی از فروشگاه های سطح شهر تهران شامل: کاهو ۲۳ نمونه، کلم سفید ۱۹ نمونه، کلم قرمز ۱۵ نمونه، کرفس۱۳نمونه و جعفری ۱۲ نمونه ببررسی شد. با استفاده از روش غنی سازی در سرما و با استفاده از محیطهای نظیر BHI Broth و Listeria Enrichment Broth کشت داده شدو بعد از انجام آزمونهای بیوشیمیایی و جداسازی و خالص سازی،باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ایزوله گردید. که از این تعداد نمونه ها ۸ نمونه (۹/۷٪)حاوی باکتری *لیستریا* مونوسیتوژنز بودند.در این ۸۲ نمونه، ۴ مورد (۱۷/۳٪) لیستریا منوسیتوژنز از کاهو، ۳ مورد (۱۵/۷٪) از کلم سفید و ۱ مورد (۶/۷٪) از کرفس جدا گردید. در هفت نمونه از موارد مثبت از نظر به *لیستریا مونوسیتوژنز* ژن lmo به طول ۹۷۸ جفت باز جدا شد. در تمام نمونه های بالینی، لبنی و استاندارد و در ۹۰ درصد نمونه های گوشت بررسی شده نیز این ژن بدست آمد(شکل ۱).



شکل ۱- ژن lmo در نمونه های آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز*(چاهک اول DNAمارکر، چاهک دوم DNA نمونه استاندارد، و چاهک های بعدی نمونه های مواد غذایی و کلینیکی هستند)

بحث

در تحقیقات صورت گرفته شده تعداد ۸۲ نمونه سبزیجات مختلف طی ۷ ماه جمع آوری گردید و پس از انجام تستهای لازم، تعداد ۸ نمونه (۹/۷۵٪)آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* که هفت نمونه آنها دارای ژن *lmo* بود.

Liu و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ازموسسات ATCC(American Type Culture Collection) و موسسه NCTC(Ntional Collection of Type Culture) تعداد ۲۹ نمونه *لیستریا مونوسیتوژنز* را تهیه و پس از جداسازی DNA و انجام PCR موفق به شناسایی ژن lmo در تمامی نمونه ها (۱۰۰ درصد) شدند(۱۹). این پژوهش با تحقیق انجام شده همخوانی دارد.

Wald وPosfay در سال ۲۰۰۴ با استفاده از محیط Listeria Enrichment Broth از ۱۰۰ نمونه مواد غذایی شامل سبزیجات ، موفق به جداسازی ۴۱ نمونه (۴۱٪) *لیستریا مونوسیتوژنز* شدند (۲۰).

Critina Mena و همکارانش در سال ۲۰۰۰ تعداد ۲۰۷ نمونه سبزیجات شامل کدو ۱۰۶ نمونه ، کلم بروکلی۳۷ نمونه، فلفل قرمز ۳۳ نمونه و فلفل سبز۳۱ نمونه را از فروشگاه های کشور پرتقال خریداری کرده و بعد از انجام تستهای لازم توانستند *لیستریا مونوسیتوژنز* را از نمونه سبزیجات بدین شرح شناسایی و جدا کنند. *لیستریا مونوسیتوژنز* در کدو ۱۸ نمونه (۱۷٪) ، در کلم بروکلی۶ نمونه (۱۶/۲٪) ، در فلفل سبز ۷ نمونه (۲۲/۶٪) و در فلفل قرمز موردی یافت نشد(۲۱).

تحقیقات Wald وPosfay و همچنین بررسی های Critina Mena از نظر جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از نمونه سبزیجات با پژوهش انجام شده مطابقت داشته، ولی از نظر درصد جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* با تحقیق انجام شده مطابقت نداشته، که دلیل آن میتواند موقعیت جغرافیایی باشد.

Ana Maria و همکارانش بین سالهای ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۵ تعداد ۷۱۷ نمونه سبزیجات شامل سبزیجات سالادی یخ زده (۳۴۷ نمونه) و سبزیجات تازه آماده خوردن(۲۱۶ نمونه) نمونه و سبزیجات بسته بندی شده توسط کارخانه با تاریخ مصرف ده روزه (۱۵۴ نمونه) را پس از تهیه، به آزمایشگاه برده و بعد از انجام تستهای لازم به این نتیجه رسیدند که در ۱۱۰ نمونه از سبزیجات(۱۵/۳٪) *لیستریا مونوسیتوژنز* وجود دارد (۲۲). این پژوهش با بررسی های انجام شده مطابقت دارد.

Jeyaletchumi و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تعداد ۳۰۶ نمونه سبزیجات شامل جعفری و لوبیا را از فروشگاه های کشور مالزی خریداری کرده و بعد از انجام تستهای لازم و استفاده از روش MPN-PCR(most probable number- polymerase chain reaction) موفق به شناسایی گونه های *لیستریا* در ۱۰۱ نمونه(حدود۳۳/۳ درصد) و *لیستریا مونوسیتوژنز* ۶۸ نمونه (۲۲/۵ درصد) شدند(۲۳). دلیل مشابه نبودن این پژوهش با بررسی انجام شده میتواند بدلیل نحوه جمع آوری نمونه و انتقال آنها به آزمایشگاه باشد.

Chaomei Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۵ باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را خریداری و بعد از انجام تستهای لازم و PCR موفق به شناسایی ژن lmo 0421 و lmo 0422 و همچنین sig C در *لیستریا مونوسیتوژنز* شدند(۲۴). در بررسی انجام شده نیز حضور ژن lmo در نمونه های مواد غذایی و کلینیکی مشاهده گردید که با تحقیق Chaomei Zhang مطابقت دارد.

Wegnerو همکارانش در سال ۱۹۹۱ از دو روش غنی سازی در سرما و روش USDA استفاده کردند. در ارزیابی هایی که توسط این دانشمندان بر روی مواد غذایی آلوده انجام شد با کمک روش USDA توانستند در هر گرم مواد غذایی آلوده حدود۰/۳ کلنی بدست آورند ولی در روش غنی سازی در سرما موفق به شناسایی

لیستریا مونوسیتوژنز نشدند. بدنبال تحقیقات wegner ، Asma نیز در سال ۲۰۰۹ از روش غنی سازی در سرما استفاده کرد . این محقق دو دوره غنی سازی اولیه و غنی سازی ثانویه را جهت جداسازی *لیستریامونوسیتوژنز* بکار بردند و از محیطهای آکسفورد آگار و پالکام آگار نیز به منظور انجام کشت سطحی کمک گرفت. در ادامه این تحقیقات Gray و همکارانش نیز از روش غنی سازی در سرما به منظور جداسازی *لیستریامونوسیتوژنز* از علف تازه، فاضلاب و مدفوع استفاده کردند (۲۵،۲۶).

Ana Maria و همکارانش در سال 2009 در کشور شیلی، نمونه های سبزیجات از مغازه ها جمع آوری کردند. بر روی این نمونه ها دو دوره غنی سازی انجام داده و بر روی محیط LPM حاوی آمونیوم سیترات فریک و اسکولین کشت داده و پس از انجام تستهای بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم به این نتایج دست یافتند:آلودگی سالاد سبزیجات یخ زده به *لیستریا مونوسیتوژنز* به میزان 25/4% ، آلودگی سالاد سبزیجات خام به *لیستریا مونوسیتوژنز* به میزان 10/2% و آلودگی سالاد سبزیجات با فرآوری کم به *لیستریا مونوسیتوژنز* به میزان 5/9% گزارش گردید(۲۷).

Vazvelho و همکارانش در سال ۲۰۰۱ یکصد نمونه سبزیجات شامل کاهو، کلم و اسفناج را از مزارع جمع آوری کرده و نمونه ها بصورت جداگانه در درون کیسه هایی قرار داده شد و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید. نمونه سبزیجات پس از قطعه قطعه شدن در محیط Listeria Enrichment Broth قرار داده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس نگهداری گردید. یک یا دو نمونه از سبزیجات موجود در LEB به محیط Listeria Selective agar انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگداری گردید. پلیت ها به منظور تشکیل کلنی با هاله سیاه ناشی از *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد ارزیابی قرار گرفت. کلنی های مشکوک به محیط TSA منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس نگهداری گردیدند. در ادامه تستهای بیوشیمیایی نظیر تست گرم، کاتالاز، اکسیداز، حرکت و توانایی تخمیر قندها جهت اطمینان از حضور *لیستریامونوسیتوژنز* بر روی نمونه ها انجام گرفت.در ۱۰ نمونه از سبزیجات *لیستریا* وجود داشت که از این تعداد ۶/۶ درصد *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند (۲۸).

Arora ,Cheesbrough& Nurrung در سال ۲۰۰۰ تعداد ۱۰۱ نمونه سبزیجات شامل ۳۷ نمونه کلم بروکلی، ۲۷ نمونه نخود سبز، ۳۷ نمونه فلفل از مغازه های سبزی فروشی در کشور پرتقال جمع آوری کرده و با استفاده از روش VIDAS-LMO موفق به شناسایی ۱۲/۹٪ *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه سبزیجات شدند().

Kiran pingulkar و همکارانش در سال ۲۰۰۱ تعداد ۸۰ نمونه سبزیجات تازه شامل ۶۲ نمونه گوجه فرنگی، ۴ نمونه گل کلم، ۱۰ نمونه برگ گشنیز و ۴ نمونه اسفناج از رستورانها و سوپر مارکت های شهر بمبئی در کشور هندوستان جمع آوری کردند. و به این نتایج رسیدند. درصد *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه گوجه فرنگی ۱۱/۲ ٪، در گل کلم ۲۵٪، در اسفناج ۵۰٪ ولی در سایر نمونه ها موردی از حضور *لیستریا مونوسیتوژنز* یافت نشد(۳۰).

Vitas و همکارانش در سال ۲۰۰۴، تعداد ۷۰ نمونه سبزیجات شامل اسفناج، کلم بروکلی و کلم مخصوص سالاد را از مغازه های ناوارا در کشور اسپانیا خریداری کرده و بصورت استریل به آزمایشگاه منتقل کردند. و بعد از انجام تستهای لازم ۴/۲۸٪ از نمونه سبزیجات (دو نمونه کلم بروکلی و یک نمونه اسفناج) حاوی *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند(۳۱). این بررسی از نظر جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* با تحقیق انجام شده تطابق دارد، ولی از نظر درصد *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده با تحقیق انجام شده مطابقت نداشته، و علت آن میتواند در استفاده از سبزیجات با آلودگی کمتر باشد.

Taylor و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در کشور انگلستان نمونه های سالاد سبزیجات آماده را پس از جمع آوری در دمای ۸ درجه سیلسیوس نگهداری کرده و با انجام آزمایشات، موفق به شناسایی گونه های *لیستریا* در ۱۰/۸٪ از نمونه ها شدند که از این میزان ۴/۸٪ *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند(۳۲).

Franzو همکارانش در سال ۲۰۱۰ نمونه های سبزیجات موجود در سالاد را از رستورانهای موجود در کشور هندوستان جمع آوری کرده و پس از انتقال در بسته های مجزا و استریل به آزمایشگاه، نمونه ها را در دمای کمتر از ۵ درجه سیلسیوس نگهداری کردند. بعد از انجام تستهای مربوطه موفق به شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۱۹/۴٪ از نمونه سبزیجات شدند(۳۳).

Moreno و همکارانش در سال ۲۰۱۱ تعداد ۱۹۱ نمونه از سبزیجات را پس از جمع آوری از سوپر مارکت های کشور اسپانیا و بعد از انجام تستهای بیوشیمیایی لازم در ۱۴/۹٪ از نمونه ها *لیستریامونوسیتوژنز* مشاهده گردید(۳۴).

Kovacevic و همکارانش در سال ۲۰۱۲ تعداد ۱۰۰ نمونه از سبزیجات آماده شامل کاهو، گل کلم و کلم قرمز را از سوپر مارکت های موجود در کرواسی جمع آوری کرده و پس از نگهداری در یخچال و غنی سازی و انجام تستهای بیوشیمیایی موفق به شناسایی گونه های *لیستریا* در حدود ۲۰٪ نمونه ها شدند، که از این میان ۱٪ *لیستریاها، لیستریا مونوسیتوژنز* بودند(۳۵). دلیل عدم تطابق این پژوهش با بررسی انجام شده میتواند ناشی از بروز آلودگی هنگام تماس توسط افرادی باشد که نمونه ها را به آزمایشگاه در کشور کرواسی منتقل کرده اند.

Yolanda و همکارانش در سال ۲۰۱۲ تعداد ۱۹۱ نمونه سبزیجات تازه یخ زده و بسته بندی شده را جمع آوری کرده و در آزمایشگاه با کمک روشهای انتخابی و همچنین PCR و روش DVC-FISH موفق به جداسازی*لیستریا مونوسیتوژنز* به میزان ۴/۹٪ در نمونه سبزیجات شدند و توانستند ژن lmo را از ۱۰۰ درصد *لیستریا مونوسیتوژنز* های موجود در نمونه سبزیجات شناسایی کنند(۳۶).

نتیجه گیری

حضور *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه مواد غذایی و نمونه های کلینیکی توسط تستهای بیوشیمیایی لازم به اثبات رسید. ژن lmo موجود در این باکتری به بالا بردن میزان مقاومت آن در شرایط نامساعد مثل نمکهای صفراوی و تغییرات دما کمک میکند. حضور این ژن نیز توسط PCR در نمونه سبزیجات و سایر نمونه ها تایید گردید.

پیشنهادات

.-چون ژن *lmo* موجود در *لیستریا مونوسیتوژنز*، عاملی جهت ایجاد مقاومت باکتری در شرایط موجود در لوله گوارش است، لذا میتوان با حذف این ژن ، تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بوجود آمده در باکتری را بررسی کرد.

-میتوان به بررسی اثر پرتو هایی مثل پرتو گاما و پرتو ایکس، در دوزهای مختلف بر روی مواد غذایی پرداخت، به نحوی که در مزه و بوی مواد غذایی و حتی ویتامین ها و ترکیبات مهم در این مواد اثری نداشته باشد ولی باعث مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* و حتی نابودی آن گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش انجام شده با هیچ طرح و تحقیقی مرتبط نبوده و از پایان نامه با عنوان بررسی ژن *lmo* در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از سبزیجات و نمونه های کلینیکی اقتباس گردیده است.از همکارم خانم رباب بهاروند تشکر و قدر دانی مینمایم.

REFERENCES

1-Wolfgang,K.J.1992.Zinssermicrobiology,20thEdition,Appleton&lang.London .pp481-487.

2-Harvel E.A.1986.synthetis and secretion of interferon by murinefibroblast in response to intracellular *Listeria monocytogenes*.Infect.Immun54:787-792.

3-Grandling A.,Burrack L.S., Bouwer H.G.A., Hinggins D.E (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression throuthMogR ,a transcriptional repressor required for virulence "ProcNatl . Acad .Sci . USA 101:12316-12323

4-Vicent.M.F.,Diaz.Pand Bquero.J.C.1990.Penicillin-binding Protein in 3 of *Listeria monocytogenes*as the primary letha ltarget for beta-lactams . Antimicrobiol .Agents . Chemother.,34/4:539-542.

5-B.Lungu ,S.C.Ricke , M.G.Johnson,(2009). Growth , survival , proliftration and pathogenesis of *Listeriamonocytogene*s under low oxygen or anaerobic conditions: FEM Microbiology Reviews.15;7-17.

6-Patchett.1991. Respiratory activity in *L.monocytogenes* FEMS Microbiol .Lett. 78:95-98.

7-Murray Edg and et al .1963:Aretrospect of *Listeriosis* in .M.I.Gray,ed second symposium Listerio infection Bozeman ,Mt.Artcraft Printer pp.3-6.

8-Ian J.lomski , Margaret M,Gedde , Albert W,Tsang , Joel A.Swanson, and Daniel A.Portnoy , (2002).The *Listeria monocytogenes*hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cell. the Jornal of Cell Biology. 156;1029-1038.l

9-MeghaGandhi,MichelL.Chikindas,(.2006*)Listeria*:A food borne Pathogen that know who to survive.International Journal of food Microbiology.Articlein Press, 13;1-15.

10-Gilbert G. 2002; infection in pregnant women. Medical Journal of Australia. 176:229-36.

11-Journal,J.R.1988: Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non heamolitic Listeria J.Appl.Bacteriol.65:321-327.

12-Pirie.K.H.H.(1927),Anew disease of wild rodents."Tiger River disease" .Publ . S.Afr.Inst.Med.Res.3:163-186.

13-Uta Gasanov , Denise Hughes , Philip M.Hansbro, (2005). Method for the isolation and identification of *Listeria*spp.and*Listeria monocytogenes*.FEM Microbiology Reviews.29;851-875.

14-Roberts , A. J , Williams S.K , Weidmann M, Nightingal K.K , (2009) . some*listeria monocytogenes* outbreak strain demonstrate significantly reduced in Vasion , in LA transcript levels , and swarming motility invitro. Appl Environ Microbiol. 75(17) , 5647-580 Epub 2009 Jul 60.

15-Lonna M.Barmpalia- Davis ,IfigeniaGeonaras, Patricia A.Kendall and John N.Sofos, (2008), Difference in survival among *13 Listeria monocytogenes*model of the stomach and small iIntestine. APPL Environ Microbiol , 74;5563-5567.

16- RamaswamyV,Cresence VM , Re Jitha J.S , Lekshimi Mu , Dharsama KS , Prasad SP , et al,(2002). pathogenesis. J Microbiol Immune Infect: 40(1) , 4-13.

17-Vanitha Janakiraman , (2008). Listeriosis in pregnancy: Diagnosis , Treatment, and Prevalention, Rev Obstet Gynecol.4; 179-185.

18- Schubert K, Bichlmaier AM, Mager E, Wolff K, Ruhland G, et al. (2000) P45,an extracellular 45 kDa protein of *Listeria monocytogenes* with similarity to proteinp60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity. Arch Microbiol 173: 21–28.

19-Liu, d., Ainsworth , A. J .,Austin , F.W.&Lawren , M.L. (2003). Identification of*Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene . FEMS MicrobiolLett 223,205-210.

20-Posfey – Barbe , K.M. and Wald , E. r. (2004), Prevalence of *Listeria monocytogenes* and related spesies in minimally processed vegetables. Listeriosis – Pediatr , Res . , 25:151-159.

21-Cristina Mena , ConcaloAlmedia , Luisa Carneiro , Paulo Teixeria , Tim Hogg , paul A. Gibbs(2004), Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Potugal.21; 213-216.

22-Ana Maria ,Cordano Christine Jacquet (2012), *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables salads sold at supermarket and strain characterization ,I.J.FoodMicrobiol, 132,176-179.

23-Jeyaletchumi Ponniah , Tunung Robin , Margaret Selina Paie , Son Radu , Farinazleen Mohammad Ghazali , Chean Yoke Kqueen, (2010) , *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia , 21;774-778.

24-Chaomei Zhang , Toe Niefeldt , Min Zhang and Andrew K.Benson, (2005) , Functional consequence of genome evolution in *Listeria monocytogenes* :the *lmo* 0421 and *lmo* 0422 Gene Encode *sig C* and *Lst R* , Lineage II- specific Heat Shock System. 187;7243-7253

25-Asma M. M. A. Abdelgadir ,KunwarK.Srivastava and P. Gopal , (2009). Detection *Listeria monocytogenes* in ready to eat. Meat products. American Journal of animal and veterinary science . 4(4), 101-107.

26-Peggy S.Hayes , Lewis M . Grares , Gloria W. Ajello , B . Swamminathan , Robert E. Weaver , Jay D. Wenger , Anne Schuchat , ClalreV.Broome , (1991) . Comparison of cold enrichment and U.S. department of agriculture methods for isolating *Listeri amonocytogene s* from naturally contaminated foods.Applied and environmental Microbiology. pp:2109-2113.

27-Ana Maria cordano, Christine Jacquet, (2009). *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salad sold at supermarkets in santiago, chile:prevalence and strain characterization international Journal of food Microbiology , 132, pp:176-179.

28-Vaz-Velho, M., Duarte, G., McLauchlin, J., Gibbs, P..(, 2001)Characterization of Listeria monocytogenes isolated fromproduction lines of vegetables. J. Appl. Microbiol; 91: 556-562.

29-Norrung, B.(,2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. Int. J. Food Microbiol .62 , 217-221.

30-Kiran Pingulkar ,AnuKamat , DilipBongirwar, (2001). Microbiological quality of fresh leafy vegetables , salad component and ready-to- eat salads, and evidence of *Listeria monocytogenes* in tomatoes, Food Technology Division Bhabha Atomic Rsearch center, Mumbai, India, 52, 1-3.

31-Vitas AI ,AguadoV,Garcia-Jalon I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed food in Navara (Spain) International Journal of food Microbiology . 90:349-356.

32-C.L.Little ,F.C.Taylor , S.K.Sago , I.A. Gillespie , K. Grant, J.McLaunchlin , (2007) . Prevalence and level of *Listeriamonocytogenes* and other *listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetanle salads in UK.24,711-717.

33-Franz , E, Tromp, S.O.,Rijgersberg, H.,Van der Fels-Kler X,H.J.(2010). Quantitative Microbial Risk Assesment for Escherechia coli o157:H7, Salmonella, and *Listeria monocytogenes* in leafy Green vegetables Consumed at Salad Bars, 12, 247-285.

34-Moreno ,Y., Ballesteros, L.,Garcia-Hernandez , J.,Santiago , P.,Gonzalez , A., & .Ferrus, M.A.(2011).Specific detectionof viable *Listetriamonocytogenes* in spanish waste water treatment plants by fluorescent in situ hybridization and PCR , Water Research , 45,4634-4640.

35-Kovacevic M, BurazinJ ,Pavlovic H , Kopjar M , PilizotaV. (2013), Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other Listeria sp. In ready-to-eat minimally processed and refrigerated vegetables. Institute of public Health for the Osjiek-Baranayacounty. 29(4):707-12.

36-Yolanda Moreno , Javier Sanchez-Contras, Rosa M. Montes , Jorges Garcia-Hernandez , Lorena Ballesteros , M.AntoniaFerrus, (2012). Detection and enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cell form ready-to-eat and Prossed vegetables foods by culture and DVC-FISH; 27:374-379.