مطالعه شیوع و بررسی فیلوژنتیک *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از فیله دو نوع ماهی پرورشی در شهرکرد در سال ۱۳۹۷

اسماعیل پیرعلی خیرآبادی[۱]، سیده صدیقه موسوی[۱]، حسن ممتاز[۲]، فرزانه نیکوخواه[۱]، سید پژمان حسینی شکرابی[۳*]، مهدی رییسی[۴]

۱. گروه مهندسی و علوم شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴. گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
* **نویسنده مسئول:** *hosseini@srbiau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴

چکیده

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌تواند ماهی و سایر آبزیان را به صورت مستقیم و غیرمستقیم آلوده کرده و درنتیجه ماهی و فرآورده‌های آن به‌عنوان یک حامل برای انتقال بیماری ناشی از این باکتری تلقی می‌شوند. از این‌رو مطالعه حاضر به بررسی آلودگی ماهیان پرواری قزل آلای رنگین کمان و کپور معمولی به این باکتری و شناسایی فیلوژنتیک ایزوله‌های جدا شده با استفاده از روش PCR پرداخته است. در مجموع ۵۰ نمونه ماهی تازه پرورشی شامل قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی تیرماه تا شهریورماه سال ۱۳۹۷ از مراکز عرضه ماهی در شهرستان شهرکرد جمع آوری شد. بر اساس آزمایشات مولکولی، از جمع ۵۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۸ نمونه (۳۶ درصد) آلوده به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند که ۲۶ و ۱۰ درصد از نمونه‌های آلوده به ترتیب متعلق به قزل آلا رنگین کمان و کپور معمولی بود. از جمع ۱۸ ایزوله‌ی مورد بررسی ۱۲ نمونه (۶۶/۶۶ در صد) مربوط به سروتیپ *4b*، یک نمونه مربوط به سروتیپ $\frac{1}{2}a$ و ۵ نمونه‌ی دیگر متعلق به سروتیپ $\frac{1}{2}b$ بود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، مبنی بر آلودگی ماهیان پرورشی به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و اهمیت آن در بهداشت عمومی، لزوم اعمال نظارت‌های بهداشتی مداوم و دقیق ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه ها: *لیستریا*، فیلوژنتیک، قزل آلای رنگین کمان، کپور معمولی.

مقدمه

آلودگی مواد غذایی به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله مسائل مهم در صنعت غذا بوده که می‌تواند در برخی موارد منجر به بروز مسمومیت‌های غذایی گسترده به شکل اپیدمی‌های فراگیر تبدیل شده و بهداشت عمومی را دچار مخاطره نماید (Starliper, 2008; Krishnasamy et al., 2020; Raissy and Ansari, 2010). از بین عوامل بیماریزایی که از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به انسان انتقال می‌یابند؛ باکتری‌ها نسبت به ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌ها فراوانی و اهمیت بیشتری دارند (Abera et al., 2010; Koohsar et al., 2012). بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا قادر هستند به طور مستقیم از طریق تماس مستقیم یا غیرمستقیم به وسیله ناقلین به محصولات غذایی منتقل شوند (Norhana et al., 2010). برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های با منشاء مواد غذایی باید بطور متناوب به شناسایی عوامل ایجادکننده و بررسی وضعیت آلودگی مواد غذایی اقدام نمود (Kase et al., 2017).

امروزه ماهی و سایر فرآورده‌های شیلاتی نقش با اهمیتی را در امنیت غذایی جهانی و نیازهای تغذیه‌ای انسان در کشورهای در حال توسعه و همچنین توسعه یافته ایفا می‌کنند (Schiller et al., 2018). غالباً کنترل کیفیت ماهی در مقایسه با سایر محصولات غذایی گوشتی

مشکل‌تر بوده و علت آن تنوع در گونه، جنس، سن، محل زندگی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی عضلات ماهی می‌باشد (Feldhusen, 2000). همچنین آبزیان به واسطه محل پرورش یا زندگی، مخزن تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها بوده که بعضی از آنها جزء فلور طبیعی بوده و بقیه در مراحل مختلف از زمان صید تا رسیدن بدست مصرف کننده، آبزی را آلوده می‌کنند (Elbashir et al., 2018; Raissy et al., 2012). بنابراین پایش منظم این گروه از مواد غذایی از نظر عوامل بیماری‌زا ضروری به نظر می‌رسد.

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، عامل بیماری لیستریوزیس، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا بوده که از مواد غذایی مختلف بخصوص فرآورده‌های گوشتی، شیر، سالاد و سبزیجات جدا شده است. مصرف خام غذاهای آلوده به این باکتری به‌ویژه در افراد دارای نقص ایمنی مهم‌ترین روش بروز و انتقال به این بیماری مطرح شده است (Denny and Mclauchin, 2008; Rahimi et al., 2017). شدت بیماری به سویه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و همچنین قابلیت سیستم ایمنی فرد مبتلا بستگی دارد (Gandhi and Chikindas, 2007). توانایی این باکتری برای رشد در دمای یخچال، تحمل شرایط اسیدی و غلظت بالای کلرید سدیم، تشکیل بیوفیلم در سطح تجهیزات کارخانه‌های مواد غذایی و مقاومت به نسبت بالای برخی سویه‌ها از عوامل مهم گسترش این گونه بیماری‌زا در مواد غذایی شده است (Sousa, 2008; Foong et al., 2004). در این میان احتمال آلودگی فرآورده های شیلاتی به این باکتری به‌دلیل راهیابی فاضلاب‌های انسانی به منابع آبی و محیط پرورش ماهیان و همچنین استفاده از کود حیوانی در استخرهای پرورش ماهیان گرمابی (کپور ماهیان) بیشتر گزارش شده است (Todd and Notermans, 2011). گزارشات متعددی از جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از قسمت‌های مختلف ماهیان در ایران و جهان وجود دارد. برای مثال، ۴ درصد از محتویات لوله گوارش ماهی قزل آلای رنگین کمان نمونه برداری شده از ۳۰ استخر پرورش ماهی در سطح استان چهارمحال و بختیاری آلوده به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند (فتاحیان و آذرگون، ۱۳۹۲). همچنین، پیرعلی خیرآبادی و حسینی شکرابی (۱۳۹۶)، وقوع *لیستریا مونوسیتوژنز* را در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان عرضه شده در برخی بازارهای شهرکرد را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند سه جدایه به آنتی بیوتیک اکساسیلین از خود مقاومت نشان داد. در تحقیق دیگر، صادقی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند از مجموع ۲۶۰ نمونه ماهی تازه (۱۶۰ نمونه قزل-آلای رنگین کمان و ۱۰۰ نمونه کپور معمولی) در شهر کرمانشاه ۴۲ مورد از نظر *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت بودند. در مطالعه ممتاز و یدالهی (۲۰۱۳)، ۳۰۰ نمونه از فراورده‌های دریایی مختلف (ماهی، میگو، لابستر و خرچنگ) به روش کشت میکروبی و PCR جهت جستجوی گونه‌های لیستریا آزمایش شد (Momtaz and Yadollahi, 2013). *لیستریا مونوسیتوژنز* از ۱۸ نمونه (۱۷ نمونه ماهی و ۱ نمونه میگو) جدا گردید و سرو تیپ‌های 4b، 1/2a، 1/2b در این ۱۸ ایزوله یافت شد. همچنین، عثمان و همکاران (۲۰۱۶) با مطالعه‌ی فیلوژنتیک ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جداشده از شیر و تولیدات آن در نیجریه بیان داشتند که ۹ جدایه از مجموع ۳۶ جدایه بررسی‌شده دارای حداقل یک ژن حدت بودند (Usman et al., 2016).

بنابراین با توجه به اهمیت و لزوم اجرای تحقیقات دوره‌ای در زمینه شناسایی و شیوع گونه‌های لیستریا در مواد غذایی بخصوص محصولات شیلاتی، مطالعه حاضر به بررسی حضور باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در ماهیان پرورشی تازه و شناسایی خصوصیات مولکولی جهت ردیابی شایع‌ترین عوامل حدت ایزومرهای جدا شده در بازار شهرکرد می‌پردازد.

روش کار

نمونه گیری

در مجموع ۵۰ نمونه تازه ماهیان پرورشی (از ماهیان موجود در سطح بازار شهرکرد) شامل ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن ۸۰۰-۱۰۰۰ گرم و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بامیانگین وزن ۱-۱/۶ کیلوگرم از تیرماه تا شهریورماه سال ۱۳۹۷ بصورت کاملا تصادفی تهیه شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و در مجاورت با یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در اسرع وقت منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش‌های تشخیصی

گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* از نمونه‌های غذایی طبق پروتوکل ISO11290 به روش‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند (Souza et al., 2008). بطور خلاصه، ۲۵ گرم از هر کدام از نمونه‌ها توزین و به مدت ۲ دقیقه در ۲۲۵ میلی لیتر از آبگوشت غنی کننده لیستریا (Merck, Germany) هموژن و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. نمونه‌های غنی شده درمحیط جامد پالکام آگار کشت خطی داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. پلیت ها از نظر حضور پرگنه های لیستریایی (پرگنه سیاه یا فرو رفتگی سیاه) آزمایش شدند. پس از طی این مراحل سه پرگنه از پلیت هایی که دارای پرگنه های مشکوک به لیستریا بود انتخاب و در مرحله‌ی دوم روی محیط تریپتیکاز سوی آگار حاوی ۶ درصد عصاره مخمرکشت داده شدند (TSAYE) و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری گردیدند. پرگنه‌های مشکوک رشد یافته در این پلیت جهت تأیید گونه‌های لیستریا از نظر رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، حرکت در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، احیای نیترات، همولیز، آزمون CAMP و تخمیر قندهایی چون رامنوز، گزیلوز، ریبوز و مانیتول مورد آزمایش قرار گرفتند (Aygun and Pehlivanlar, 2006).

آزمایش‌های ملکولی ایزوله‌ها

جهت استخراج DNA از باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده به روش تشخیصی از کیت Thermo scientific ساخت کشور آلمان طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهایی که در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است، *لیستریا مونوسیتوژنز* و سروتیپ‌های آن ردیابی شدند (Lawrence and Gilmour, 1994). برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای سیکل اول و مابقی سیکل‌ها یک دقیقه برای مرحله واسرشتی، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای مرحله اتصال و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در سیکل آخر به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله گسترش بود.

جدول ۱. توالی پرایمر های مورد استفاده جهت ردیابی گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* براساس ژن 16srRNA.

نام پرایمر	هدف	توالی پرایمرها (3'-5')	اندازه محصول (جفت باز)
Lis1B MonoA	*Listeria monocytogenes*	F: TTATACGCGACCGAAGCCAAC R: CAAACTGCTAACACAGCTACT	۶۶۰

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی سروتیپ‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده

نام پرایمر	هدف	توالی پرایمرها (’3-’5)	اندازه محصول (جفت باز)
prsF prsR	تمام سروتایپ‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	۳۷۰
lmo0737F lmo0737R	سروتیپ 1/2a	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	۶۹۱
ORF2819F ORF2819R	سروتیپ 1/2b	F: AGCAAAATGCCAAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	۴۷۱
ORF2110F ORF2110R	سروتیپ 4b	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	۵۹۷

آزمایش ERIC-PCR

به منظور دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های لیستریا مونوسیتوژنز مورد مطالعه از روش ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR) طبق روش توصیه شده Jersek و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. به منظور آزمایش ERIC-PCR از زوج پرایمرهای ERIC1 (-5’ ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3’) و ERIC2 (-3’ AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-5’) استفاد شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در روش ERIC-PCR جهت دسته بندی ژنتیکی ایزوله‌های جدا شده روی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای سیکل اول و مابقی سیکل‌ها ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای مرحله واسرشتی، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه برای مرحله اتصال و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در سیکل آخر به مدت ۸ دقیقه برای مرحله گسترش تنظیم گردید. در این روش، واکنش PCR، در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر بافر 10x (PCR buffer10x)، ۴ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۱/۷۵ میکرولیتر dNTP Mix، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentas, Lithuania)، ۳ میکرولیتر از زوج پرایمرهای ذکر شده، ۳ میکرولیتر از DNA مربوط به هر یک از ایزوله ها و ۲۹/۶۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت.

در هر مرحله از آزمایش PCR جهت ردیابی محصول مورد نظر از ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً ۱ ساعت انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز از ژل حاصله در حضور نور UV به وسیله دستگاه قرائت کننده ژل (Gel Documentation) تصویر برداری شد. همچنین از نشانگر Ladder 1kb DNA (شرکت سیناکلون) برای مشخص‌شدن محدوده اندازهٔ قطعه‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و مدل آماری مربع کای در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<0.05$) استفاده شد. آزمایش ERIC-PCR روی هرکدام ازایزوله‌های مورد مطالعه ۳ نوبت انجام گرفت تا از تعداد و اندازه باندهای ایجادشده در هرایزوله اطمینان حاصل گردد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آنالیز ERIC-PCR و تعیین فاصله ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه، از نرم‌افزار آنلاین in silico استفاده گردید. برای این منظور ابتدا باندهای حاصل از الکتروفورز محصول نشانگر، به صورت داده‌های کمی صفر و یک (وجود باند یا عدم وجود باند)، امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت

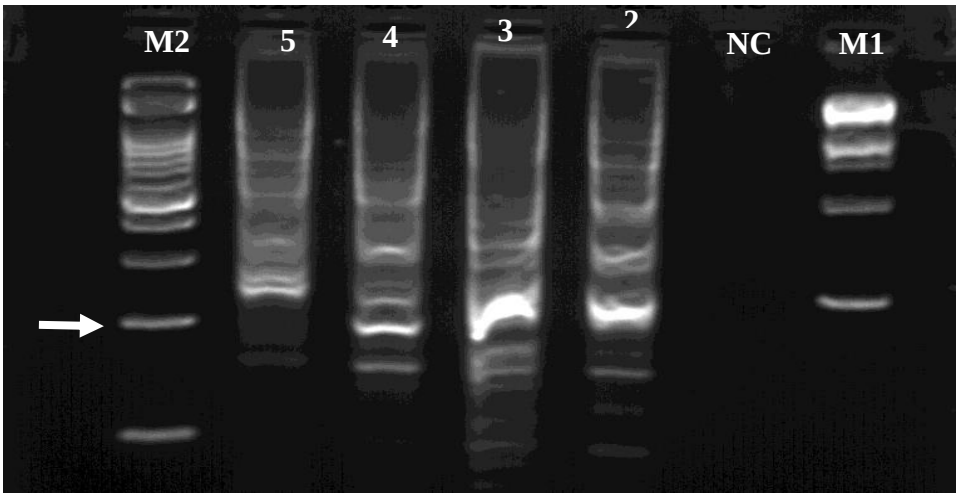
ژنتیکی بر اساس داده‌های صفر و یک با استفاده از ضریب دایس محاسبه شد. به منظور تعیین کارایی روش ERIC تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضرایب تشابه، از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده گردید. سپس برای گروه‌بندی سویه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) بر مبنای ضریب تشابهی که بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک را دارا بود، استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تست‌های تشخیصی نشان داد که از جمع ۵۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۸ نمونه (۳۶ در صد) آلوده به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند، که ۲۶ درصد از نمونه‌های آلوده مربوط به قزل آلای رنگین کمان و ۱۰ درصد مربوط به کپور ماهیان بود (جدول ۳). ایزوله‌های جدا شده از روش کشت میکروبی با ردیابی ژن 16srRNA به روش مولکولی تعیین هویت شدند و محصول حاصل از الکتروفورز PCR مربوط به این ژن در تصویر ۱ نشان داده شده است.

جدول ۳. فراوانی و درصد آلودگی نمونه‌های ماهی به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*

گونه ماهی	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت	تعداد نمونه‌های منفی	درصد نمونه‌های آلوده
قزل آلای رنگین کمان	۳۵	۱۳	۲۲	۲۶/۰۰
کپور معمولی	۱۵	۵	۱۰	۱۰/۰۰
مجموع	۵۰	۱۸	۳۲	۳۶/۰۰



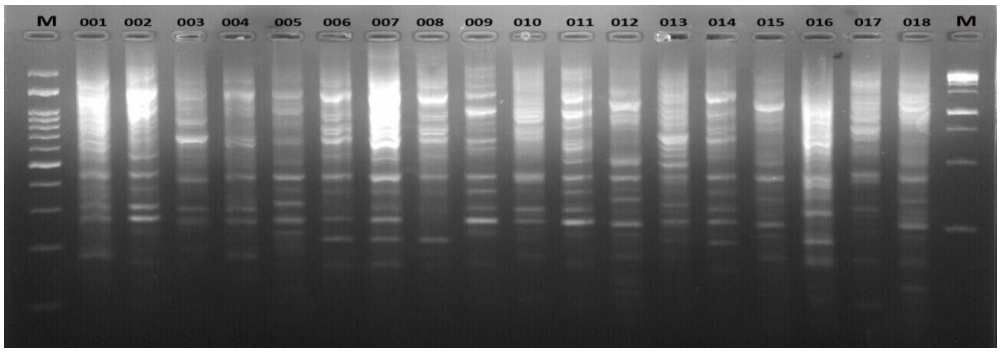
تصویر ۱. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16srRNA در ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از ماهیان پرواری در بازار شهرکرد. ستون M1 = مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون ۱ = کنترل منفی، ستون ۲ تا ۵ (نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۶۶۰ جفت باز) و ستون ۲M = مارکر ۱۵۰۰ جفت باز.

در قسمت دیگری از این تحقیق، شایع‌ترین سروتیپ های *لیستریا مونوسیتوژنز* یعنی $a\frac{1}{2}$، $b\frac{1}{2}$ و ۴ b از نمونه‌های آلوده مورد ارزیابی قرار گرفتند که در این میان از جمع ۱۸ ایزوله‌ی مورد بررسی ۱۲ نمونه (۶۶/۶۶ در صد) مربوط به سروتیپ $4b$، یک نمونه مربوط به سروتیپ $a\frac{1}{2}$ و ۵ نمونه‌ی دیگر متعلق به سروتیپ $b\frac{1}{2}$ بودند (جدول ۴).

جدول ۴. فراوانی حضور سروتیپ های *لیستریا مونوسیتوژنز* در ایزوله‌های جدا شده از ماهیان پرواری در بازار شهرکرد

	نوع سروتیپ		
	$4b$	$\frac{1}{2}b$	$\frac{1}{2}a$
تعداد	۱۲	۵	۱
درصد	۶۶/۶۶	۲۷/۷۷	۵/۵۵

۲۲ ایزوله *لیستریا مونوسیتوژنز* در سه نوبت با استفاده از پرایمرهای ERIC۱ و ERIC۲ به روش ERRIC-PCR آزمایش شدند (تصویر ۲) و نشان داده شد که ایزوله‌های مورد مطالعه دارایی الگوی باندی از محدود ۱۱۰ تا ۳۱۰۰ جفت بازی DNA بودند که قطعات تکثیر یافته در ایزوله‌ها در قالب اعداد ۱ (وجود باند) و ۰ (عدموجود باند) امتیازدهی به‌وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌هادر برنامه in silico آنالیز شدند. پس از امتیازدهی ژل‌ها، شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های ۰ و ۱ با استفاده از ضریب دایس محاسبه شد که جدول ماتریس تشابه ژنتیکی بین ۲۲ ایزوله مورد مطالعه در جدول ۵ نشان داده شده است.



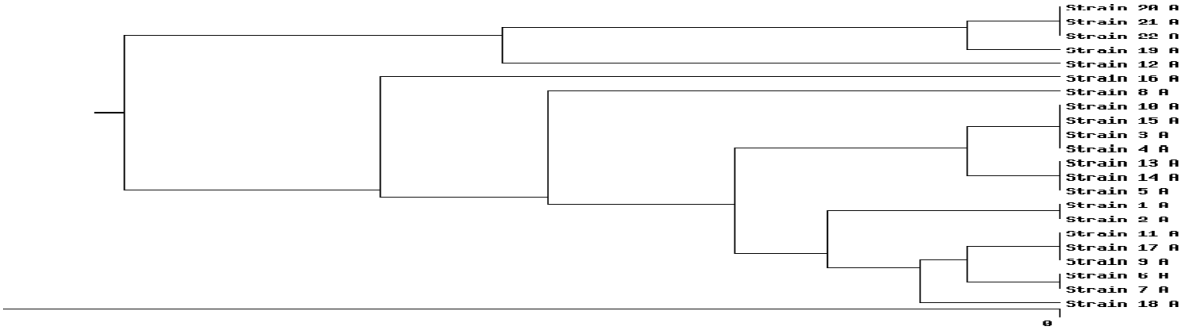
تصویر ۲. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به نشانگر ERIC-PCR روی ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از ماهیان پرواری در بازار شهرکرد (ستون M سمت چپ تصویر = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون M سمت راست تصویر = مارکر ۱ کیلو بازی و سایر ستون‌ها ایزوله‌ها هستند)

طبق اطلاعات جدول ۵، ۲۲ ایزوله مورد مطالعه دارای قرابتی معادل ۷۴ تا ۱۰۰ درصد بودند که در این میان بیشترین قرابت بین ایزوله‌های ۱ و ۲، ۳ و ۴، ۶ و ۷، ۹ و ۱۱، ۱۳ و ۱۴، ۲۰ و ۲۱ و ۲۲ با ۱۰۰ درصد تشابه و کمترین قرابت بین ایزوله‌های ۱۹، ۲۰، ۲۱، و ۲۲ با ایزوله‌های ۱ تا ۱۱ و ۱۳ تا ۱۸ با ۷۴ درصد تشابه مشاهده شد.

جدول ۵. میزان شباهت ژنتیکی (درصد) بین ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از ماهیان پرواری در بازار شهرکرد

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲
۱																						
۲	۱۰۰																					
۳	۹۱	۹۱																				
۴	۹۱	۹۱	۱۰۰																			
۵	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵																		
۶	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱																	
۷	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱	۱۰۰																
۸	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۸															
۹	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵	۸۵/۸														
۱۰	۹۱	۹۱	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵	۹۱	۹۱	۸۵/۸	۹۱													
۱۱	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵	۸۵/۸	۱۰۰	۹۱												
۱۲	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴											
۱۳	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵	۱۰۰	۹۱	۹۱	۸۵/۸	۹۱	۹۷/۵	۹۱	۷۴										
۱۴	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵	۱۰۰	۹۱	۹۱	۸۵/۸	۹۱	۹۷/۵	۹۱	۷۴	۱۰۰									
۱۵	۹۱	۹۱	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵	۹۱	۹۱	۸۵/۸	۹۱	۱۰۰	۹۱	۷۴	۹۷/۵	۹۷/۵								
۱۶	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲	۷۴	۸۱/۲	۸۱/۲	۸۱/۲							
۱۷	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱	۹۷/۵	۹۷/۵	۸۵/۸	۱۰۰	۹۱	۱۰۰	۷۴	۹۱	۹۱	۹۱	۸۱/۲						
۱۸	۹۳/۵	۹۳/۵	۹۱	۹۱	۹۱	۹۶	۹۶	۸۵/۸	۹۶	۹۱	۹۶	۷۴	۹۱	۹۱	۹۱	۸۱/۲	۹۶					
۱۹	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۸۴/۵	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴				
۲۰	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۸۴/۵	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۹۷/۵			
۲۱	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۸۴/۵	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۹۷/۵	۱۰۰		
۲۲	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۸۴/۵	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۹۷/۵	۱۰۰	۱۰۰	

دندوگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌ها در تصویر ۳ نشان داده شده است که با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ۲۲ ایزوله مورد مطالعه در ۳ پروفایل قرار گرفتند.



تصویر ۳. دندوگرام حاصل از آنالیز ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از ماهیان پرواری در بازار شهرکرد.

بحث

لیستریوزیس یکی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی زئونوتیک با گسترش جهانی بوده که هم از نظر سلامت عمومی و هم از نظر اقتصادی اهمیت دارد (Krishnasamy et al., 2020). *لیستریا مونوسیتوژنز* به عنوان یک باکتری فرصت طلب بیشتر باعث بیمار شدن کودکان، زنان باردار، افراد مسن و افراد دارای نقص ایمنی می‌شود (Denny and Mclauchin, 2008). در مطالعه حاضر، از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۱۸ مورد آلوده به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند و آلودگی به این باکتری در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۶ درصد) بیشتر از کپور معمولی (۱۰ درصد) بود. در مقایسه با نتایج این مطالعه، صادقی و همکاران (۱۳۸۹) شیوع به نسبت پایین‌تری از *لیستریا مونوسیتوژنز* در فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه را با مقادیر ۱۵ درصد در قزل آلای رنگین کمان و ۱۸ درصد در کپور معمولی بیان کردند. همچنین، پیرعلی خیرآبادی و حسینی شکرابی (۱۳۹۶) در مطالعه خود با بررسی ۱۰۰ نمونه ماهی قزل آلای رنگین‌کمان دریافتند که تنها ۴ نمونه آلوده به باکتری با جنس *لیستریا* بودند که ۳ مورد از آنها متعلق به گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. در مطالعه مشابه دیگری، در مطالعه توکلی و همکاران (۱۳۸۷)، ۳۵ نمونه از ۱۰۲ نمونه (۳۱/۳۴ درصد) ماهیان دودی تهیه-شده با روش سنتی از نظر آلودگی *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت گزارش گردید که از این ۳۵ نمونه، ۲۸ مورد (۸۰درصد) در ماهیان فیتوفاگ و ۷ مورد (۲۰درصد) در آزاد ماهیان خزری ثبت گردید. در بررسی‌های انجام شده در سطح بازار خرده فروش‌های استان‌های تهران و گیلان مشخص شد که ۱۲/۵درصد ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان؛ ۱۰درصد کپورماهیان نقره‌ای و ۱۷/۵درصد کپورماهیان معمولی به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* آلوده بودند؛ و در سطح استخرهای پرورشی، ۱۱/۶درصد در قزل آلای رنگین‌کمان و ۸/۳درصد در کپور نقره‌ای و کپور معمولی مشاهده گردید (آخوندزاده و همکاران، ۱۳۸۱). در مطالعه دیگر در ارومیه فراوانی آلودگی با جنس *لیستریا* از ۲۴ میگوی آب شیرین ۵ نمونه (۲۱درصد) *لیستریا مونوسیتوژنز* و ۷ نمونه *لیستریا ایوانوی* (۲۹درصد) بوده در حالی که *لیستریا سیلیگری* از هیچ یک از نمونه‌ها جداسازی نشد (Modaresi et al., 2011).

میتن و ویرتانن (۲۰۰۵) گزارش داده‌اند که شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* در ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی در فنلاند برابر ۱۴/۶ درصد می‌باشد (Miettinen and Wirtanen, 2005). مطالعاتی در یونان نیز در بازارهای ماهی فروشان نشان می‌دهد که شیوع و لود باکتری *لیستریا اینوکوآ* در محیط بازارهای عرضه ماهی بیشتر از محیط مزارع پرورش ماهیان بود (Soultos et al., 2007). در یک گزارش در کشور

ترکیه میزان آلودگی باگونه های *لیستریا* در نمونه‌های آب شیرین ۳۰ درصد و در نمونه‌های ماهی دریایی ۱۰/۴ درصد برآورد گردید که در نمونه‌های آب شیرین بیشترین آلودگی مربوط به گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* (۴۴/۵ درصد) و در نمونه‌های دریایی بیشترین فراوانی مربوط به گونه *لیستریا مورایی* (۸۳/۵ درصد) بود (Yücel et al., 2005) که این میزان شیوع در مقایسه با نتایج ما بیشتر می‌باشد. در مطالعه رحیمی و همکاران (۱۳۹۶)، ۳۰ نمونه از ۲۴۰ نمونه (۱۲/۵۰ درصد) ماهیان شیر، میش ماهی و ماهی کولی آلوده به جنس *لیستریا* بودند؛ و فراوانی گونه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *لیستریا اینوکوآ* و *لیستریا سیلگیری* در این ماهیان آلوده به ترتیب ۱۶/۶۶، ۳۳/۳۳ و ۶/۶۶ درصد بود. در مطالعه مشابه دیگری، شیوع به ترتیب ۲/۵، ۶/۷ و ۱/۶ درصدی از گونه‌های *لیستریا منوسیتوژنز*، *لیستریا اینوکوآ* و *لیستریا سیلیگری* از ۸۰ نمونه ماهی دودی و ۴۰ نمونه ماهی نمک سود از مراکز فروش شهرستان‌های اصفهان و بندر انزلی با استفاده از روش کشت و PCR تعیین شد (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۳). مطالعه اخیر نشان داد که *لیستریا مونوسیتوژنز* در میان گونه‌های لیستریایی غالب می‌باشند. اگرچه بعضی مطالعات نشان می‌دهد که *لیستریا اینوکوآ* در غذاهای دریایی غالب است (Dhanashree et al., 2003; Jeyasekaran et al., 1996). با توجه مطالعات انجام شده و همچنین نتایج مطالعات موجود در سرتاسر جهان و از جمله مناطق مختلف ایران، به نظر می‌رسد عوامل جغرافیایی، نوع نمونه، فصل نمونه‌برداری، وضعیت بهداشتی مراکز عرضه و روش جداسازی و شناسایی *لیستریا* موجب این تفاوت‌ها در مقدار شیوع باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در فرآورده های شیلاتی شده است (Rahimi et al., 2012).

متأسفانه اطلاعات محدودی در مورد فاکتورهای بیماری زای *لیستریا* در غذاهای دریایی وجود دارد و نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که سرووار‌یته های $\frac{1}{2}$a ، $\frac{1}{2}b$ و 4b با شیوع به ترتیب ۶۶/۶۶ و ۵/۵۵ و ۲۷ درصدی از سروتیپ های متداول جدایه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* در ماهیان نمونه گیری شده از بازار محلی شهرکرد می‌باشند. مطالعات برخی محققان نشان داده که سروتیپ $\frac{1}{2}$a بیشتر از غذا و سروتیپ 4b بیشتر از انسان جدا شده‌اند (Gilot et al., 1996). دومیت و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند که در نهایت ۹۵ درصد از سویه‌های جدا شده *لیستریا* از غذاهای آلوده می‌باشد و مصرف کنندگان عموماً با سروتایپ های$\frac{1}{2}$a و$\frac{1}{2}b$ و$\frac{1}{2}c$ و b۴ دچار عفونت و بیماری می‌شوند (Doumith et al., 2004). مطالعه دیگر روی نمونه‌های شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان نشان می‌دهد که هر سه *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده مربوط به سرووار‌یته 4b بوده‌اند (Yadav et al., 2010). وان و همکاران (۲۰۰۳) استفاده از PCR را برای جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* در ماهی قزل آلا با روش کشت و روش‌های معمول تشخیصی مقایسه نموده و بیان نمودند روش تشخیصی ملکولی از دقت، ایمنی و سرعت العمل بالاتری برخوردار است (Wan et al., 2003). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که کاربرد توأم دو روش کشت و PCR نتایج قابل قبولی ارایه داده و با استفاده از PCR می‌توان سروتایپ های *لیستریا مونوسیتوژنز* را به راحتی تشخیص داد.

یکی از روش‌های معمول در دسته‌بندی *لیستریا مونوسیتوژنز*، سروتایپینگ ایزوله‌های جدا شده می‌باشد که در مطالعه ممتاز و یدالهی (۲۰۱۳) سروتیپ-های$a\frac{1}{2}$و$\frac{1}{2}b$ و *4b* را از ۱۸ ایزوله *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از ماهی و میگو در ایران شناسایی کردند (Momtaz and Yadollahi, 2013). روش ERIC-PCR در مطالعات اپیدمیولوژی روی ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از منابع انسانی، دامی و غذایی پیشنهاد شده است (Jersek et al., 1999). Norwood وGilmoura (۲۰۰۱) امکان استفاده از تکنیک ERIC-PCR در تفکیک ایزوله‌های *لیستریا*

مونوسیتوژنز و قرار دادن آنها در دو گروه I (سروتیپ-های $\frac{1}{2}b$ و $4b$) و گروه Π (سروتیپ‌های $\frac{1}{2}a$ و $\frac{1}{2}c$) را گزارش کردند. روش‌های مختلف ژنوتایپینگ دارای مزایا و معایبی هستند و عوامل مختلفی از جمله قدرت تشخیص، قابلیت تکرارپذیری، سرعت و سهولت انجام کار و هدف از دسته‌بندی در انتخاب روش مناسب جهت آنالیز مولکولی مؤثر است (Londero et al., 2019).

در مطالعه حاضر از روش ERIC-PCR جهت ژنوتایپینگ ۱۸ ایزوله *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از ماهیان بازار شهرکرد استفاده شد که در الکتروفورز محصول PCR مربوط به این نشانگر ۲۲ باند مختلف از محدوده ۱۱۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز در ایزوله‌ها یافت شد. در آنالیز الگوی باندینگ حاصله با استفاده از ضریب تشابه جاکارد قرابتی بین ۹ تا ۹۰/۹ درصد بین ایزوله‌ها مشاهده شد که در این میان بیشترین شباهت بین ایزوله‌های S_8 و S_9 (ضریب شباهت ۰/۹۰) و کمترین شباهت بین ایزوله‌های S_{14} و S_{31} (ضریب شباهت ۰/۰۹۰) و ایزوله‌های S_{14} و S_{39} (ضریب شباهت ۰/۱۷) دیده شد. در درخت فیلوژنی ترسیم شده نیز بر اساس شباهت ایزوله‌ها در سطح تشابه ۱۸ درصد در گروه A (با ۱ ایزوله) و B (با چندین زیرگروه) قرار گرفتند در حالی که در سطح تشابه ۷۳ درصد، تعداد زیرگروه‌ها به ۱۲ زیرگروه افزایش یافت که این خود نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در این ایزوله‌ها می‌باشد. در مطالعه مورمو و همکاران (۲۰۱۴) در برزیل که با هدف تعیین ارتباط ژنتیکی بین ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از گوشت خوک و نمونه‌های بالینی انسان به روش ERIC-PCR انجام شد، در نمونه‌های مربوط به گوشت خوک سروتیپ‌های $\frac{1}{2}b$ و $4b$ یافت شد و همچنین از لحاظ ژنتیکی این ایزوله‌ها در ۳۴ پروفایل مختلف (با روش ERIC-PCR) قرار گرفتند و مشخص گردید که امکان آلودگی گوشت‌های فرآوری شده خوک در فروشگاه‌ها با افراد انسانی زیاد است (Moreno et al., 2014). در مطالعه چن و همکاران (۲۰۱۴) در آزمایش ۵۶۷ نمونه غذای خام آماده مصرف، از ۲۲ درصد نمونه‌ها *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شد که توسط آزمایش ERIC-PCR، در ۶ پروفایل مختلف طبقه بندی شدند (Chen et al., 2014).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، از ۵۰ نمونه ماهیان پرورشی (قزل آلای رنگین کمان و کپور معمولی) مورد بررسی، ۱۵ مورد آلوده به باکتری لیستریامونوسیتوژنز بودند و آلودگی به این باکتری در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیشتر بود. همچنین با توجه به وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در ایزوله‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده در این مطالعه، می‌تواند نشان دهنده منابع مختلف آلودگی از جمله آب، انسانی، وسایل عمل‌آوری و صید فرآورده‌های شیلاتی و وسایل مورد استفاده در حمل و نقل و نگهداری ماهی باشد. از این رو با توجه مطالعات انجام شده و همچنین مطالعه حاضر، مبنی بر بالا بودن نسبی میزان آلودگی ماهیان پرورشی به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و اهمیت قابلیت بیماریزایی این باکتری در مصرف کننده، لزوم اعمال نظارت‌های بهداشتی بیشتر و انجام پایش‌های منظم جهت اجرای برنامه‌های کنترل و پیشگیری از آلودگی به این باکتری بیماری زا را می‌طلبد.

منابع

۱. آخوندزاده، افشین.، زهرایی صالحی، تقی و میثاقی، علی. (۱۳۸۱). بررسی *لیستریامونوسیتوژنس* در ماهیان پرورشی تازه، دودی شده و یخ‌های مورد استفاده جهت نگهداری سرد ماهیان تازه در استان‌های تهران و گیلان. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۷. شماره ۴، صفحه ۹-۱۲.

۲. پیرعلی خیرآبادی، اسماعیل و حسینی شکرابی، سید پژمان. (۱۳۹۶). مطالعه وقوع *لیستریامونوسیتوژنز* در ماهیان قزل آلای رنگین کمان عرضه شده در برخی

بازارهای شهرکرد. مجله تحقیقات منابع طبیعی تجدیدشونده، سال هشتم، شماره ۲، صفحه ۸۱-۸۸.

۳. توکلی، حمیدرضا.، فربانعلی زادگان، مهدی.، نجفی، علی.، آخوندزاده، افشین و خاکسار، رامین. (۱۳۸۷). آلودگی ماهیان دودی تهیه‌شده با روش سنتی به *لیستریامونوسایتوژنز* و گونه‌های سالمونلا در ایران. فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، سال سیزدهم، شماره ۴۲، صفحه ۵۷-۶۰.

۴. رحیمی، ابراهیم.، صفرپوردهکردی، فرهاد.، یاحقی، عماد و خداوردی، ابراهیم. (۱۳۹۳). شیوع و مقاومت ضد میکروبی گونه های لیستریا جدا شده از ماهی دودی و نمک سود. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، سال هشتم، شماره ۳، صفحه ۳۱-۳۷.

۵. شاکریان، امیر.، ممتاز، حسن.، رحیمی، ابراهیم و محمودیان، پویا. (۱۳۹۲). *لیستریا مونوسیتوژنز* بعنوان یک عامل بالقوه بیماری زا در گوشت طیور. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی. مشهد، ۲۴ الی ۲۵ مهر ۹۲.

۶. صادقی، احسان.، الماسی، علی و بهلولی اسکویی، سمیه. (۱۳۸۹). بررسی شمارش کلی میکروبی و لیستریا مونوسایتوجنز (*Listeria monocytogenes*) در ماهی های تازه در شهر کرمانشاه. مجله علوم و فنون دریایی ایران، سال نهم، شماره ۳، صفحه ۳۰-۳۵.

۷. فتاحیان، آرزو و آذرگون، رضا. (۱۳۹۲). بررسی حضور *لیستریا مونوسیتوژنز* در دستگاه گوارش قزل آلای رنگین کمان. همایش ملی توسعه و پرورش ماهیان سرد آبی. شهرکرد، ۱۰ الی ۱۱ اردیبهشت ۹۲.

8. Abera, B., Biadegelgen, F. and Bezabih, B. 2010. Prevalence of *Salmonella typhi* and intestinal parasites among food handlers in Bahir Dar Town, Northwest Ethiopia. Ethiop J Health Dev. 24(1): 46-50.

9. Aygun, O. and Pehlivanlar, S. 2006. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control. 17(8): 676-679.

10. Björnsdóttir-Butler, K., Bolton, G. E., Jaykus, L. A., McClellan-Green, P. D. and Green, D. P. 2010. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. Int J Food Microbiol. 139(3): 161-167.

11. Chen, M., Wu, Q., Zhang, J. and Wang, J. 2014. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. Food Control. 38: 1-7.

12. Denny, J. and McLauchlin, J. 2008. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe-an opportunity for improved European surveillance. Eurosurveillance. 13(13): 9-10.

13. Dhanashree, B., Otta, S. K., Karunasagar, I. and Goebel, W. 2003. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. Food Microbiol. 20(4): 447-453.

14. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. and Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 42(8): 3819-3822.

15. Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M. and DePaola, A. 2018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. Food Microbiol. 70: 85-93.

16. Feldhusen, F. 2000. The role of seafood in bacterialfoodborne diseases. Microb Infect. 2(13): 1651-1660.

17. Foong, S. C., Gonzalez, G. L. and Dickson, J. S. 2004. Reduction and survival of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meats after irradiation. J Food Prot. 67(1): 77-82.

18. Gandhi, M. and Chikindas, M. L. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol. 113(1): 1-15.

19. Gilot, P., Genicot, A. and Andre, P. 1996. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human

patients with listeriosis in Belgium. J Clin Microbiol. 34(4): 1007-1010.
20. Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E. and Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. Sci Total Environ. 407(13): 4022-4027.
21. Jeršek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E. and Herman, L. 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. J Clin Microbiol. 37(1): 103-109.
22. Jeyasekaran, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 1996. Incidence of *Listeria* spp. in tropical fish. Int J Food Microbiol. 31(1-3): 333-340.
23. Kase, J. A., Zhang, G. and Chen, Y. 2017. Recent foodborne outbreaks in the United States linked to atypical vehicles—lessons learned. Curr Opin Food Sci. 18: 56-63.
24. Koohsar, F., Amini, A., Ayatollahi, A. A., Noshak, G. H., HedayatMofidi, H. S. and Namjoo, M. 2012). The prevalence of intestinal parasitic infections in food handlers in Gorgan, Iran. Med Lab J. 6(1): 26-34.
25. Krishnasamy, V. P., Marshall, K., Dewey-Mattia, D. and Wise, M. 2020. Outbreak characteristics and epidemic curves for multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with produce: United States, 2009–2015. Foodborne Pathog Dis. 17(1): 15-22.
26. Lawrence, L.M. and Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and their rapid confirmations by multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 60: 4600–4604.
27. Londero, A., Costa, M., Sucari, A. and Leotta, G. 2019. Comparison of three molecular subtyping techniques for *Listeria monocytogenes*. Rev Argen Microbiol. 51(4): 359-362.
28. Miettinen, H. and Wirtanen, G. 2005. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. Int J Food Microbiol. 104(2): 135-143.
29. Modaresi, R., Mardani, K., Tukmechi, A. and Ownagh, A. 2011. Prevalence of *Listeria* spp. in fish obtained from Urmia fish markets. Afr J Microbiol Res. 5(30): 5398-5401.
30. Momtaz, H. and Yadollahi, S. 2013. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. Diagn Pathol. 8(1): 1-6.
31. Moreno, L. Z., Paixão, R., Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Ferreira, T. P., Moreno, A. M. and Matté, M. H. 2014. Characterization of antibiotic resistance in Listeria spp. isolated from slaughterhouse environments, pork and human infections. J Infect Dev Ctries. 8: 416–423.
32. Norhana, M. W., Poole, S. E., Deeth, H. C. and Dykes, G. A. 2010. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. Food Control. 21(4): 343-361.
33. Norwood, D. E. and Gilmour, A. 2001. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. Lett Appl Microbiol. 33(4): 320-324.
34. Rahimi, E., Yazdi, F. and Farzinezhadizadeh, H. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species isolated from different types of raw meat in Iran. J Food Prot. 75(12): 2223-2227.
35. Rahimi, E., Jahanmard, M.J., safari, S., Ansari, M., Torki baghbadorani, Z. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from filleted *Argyrosomus hololepidotus*, *Scomberomorus commerson* and *Alburnus* spp. J Food Microbiol.3: 1-9.
36. Raissy, M. Ansari, M. 2010. In vitro susceptibility of commonly used antibiotics against *Vibrio* spp. isolated from lobster (*Panulirus homarus*), Afr J Microbiol Res. 23: 629-631.

37. Raissy, M., Moumeni, M., Ansari, M and Rahimi, E. 2012. Occurrence of *Vibrio* spp. in lobster and crab from the Persian Gulf, J Food Saf. 32: 198-203.
38. Schiller, L., Bailey, M., Jacquet, J. and Sala, E. 2018. High seas fisheries play a negligible role in addressing global food security. Sci Adv. 4(8): 83-91.
39. Soultos, N., Abrahim, A., Papageorgiou, K. and Steris, V. 2007. Incidence of *Listeria* spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. Food Control. 18(5): 554-557.
40. Sousa, C. P. D. 2008. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. Braz Arch Biol Technol. 51(4): 615-623.
41. Starliper, C. E. 2008. Recovery of a fish pathogenic bacterium, *Aeromonas salmonicida*, from ebonyshell mussels Fusconaia ebena using nondestructive sample collection procedures. J Shellfish Res. 27(4): 775-782.
42. Todd, E. C. D. and Notermans, S. 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control. 22(9): 1484-1490.
43. Usman, U. B., Kwaga, J. K. P., Kabir, J. and Olonitola, O. S. 2016. Isolation and antimicrobial susceptability of *Listeria monocytogenes* from raw milk and milk products in Northern Kaduna State, Nigeria. Appl Environ Microbiol. 4(3): 46-54.
44. Wan, J., King, K., Forsyth, S. and Coventry, M. J. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using the Probelia polymerase chain reaction system. J Food Prot. 66(3): 436-440.
45. Yadav, M. M., Roy, A., Bhanderi, B. and Joshi, C. 2010. Pheno-genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from bovine clinical mastitis. Buffalo Bull. 29(1): 29-38.
46. Yücel, N., Cıtak, S. and Önder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiol. 22(2-3): 241-245.

Prevalence and phylogenetic analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from the fillets of two farmed fish in Shahrekord in 2018

Pirali Khairabadi E[1], Mousavi S S[1], Momtaz H[2], Nikokhah F[1], Hosseini Shekarabi S P[3*], Raissy M[4]

1. Department of Fisheries Engineering and Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran.

2. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran.

2. Department of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

4. Department of Aquatic Animal Health, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran.

***Corresponding author:** *hosseini@srbiau.ac.ir*

Received: 2 September 2020 Accepted: 14 November 2020

Abstract

Fish and other aquatic animals can, directly and indirectly, be contaminated with *Listeria monocytogenes* and consequently, fish and their products are considered as a carrier for this bacterium. Therefore, the present study investigated the contamination of rainbow trout and common carp farmed fish with this bacterium as well as the phylogenetics of the isolates. A total of 50 samples of farmed fish were obtained from local fish supply centers in Shahrekord city from July to September 2018. Based on the molecular experiments, 18 samples (36%) from the 50 studied samples were contaminated with *L. monocytogenes* as 26% and 10% of the isolates were found in trout and carp, respectively. From 18 isolates, 12 samples (66.66%) belonged to serotype 4b, one sample belonged to serotype 1/2a and the other 5 samples belonged to serotype 1/2b. According to the results of the present study and regarding the importance of the bacteria in terms of public health, continuous and accurate hygienic monitoring seems to be necessary.

Keywords: *Listeria*, Phylogenetics, Rainbow trout, Common carp.