مطالعه فراوانی ژن حدت *hlyA* باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در سبزیجات تازه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

حسین مومنی[1*]، علی شریف زاده[2]، معصومه بشیری[3]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *Momeni_hossein_dvm@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز یک پاتوژن سرمادوست مهم غذایی است که ممکن است در سبزیجات تازه یافت شود. انواع سبزیجات مختلف می‌توانند در انتقال *لیستریا* به انسان و همه گیری لیستریوز نقش داشته باشند. هدف از این مطالعه ارزیابی شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* و مطالعه فراوانی ژن *hlyA* در سبزیجات تازه در شهرستان شهرکرد بود. این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۱۴۵ نمونه سبزیجات تازه جمع آوری شده از شهرستان شهرکرد انجام گرفت. جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از محیط کشت اختصاصی صورت پذیرفت و سپس فراوانی ژن *hlyA* با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد مطالعه قرار گرفت. از مجموع نمونه‌های مورد مطالعه،۸۱ نمونه (۵۶ درصد) از نظر لیستریا مثبت تشخیص داده شدند که از این تعداد ۵۴ نمونه (۶۷ درصد) دارای ژن *hlyA* بودند. یافته‌های ما نشان می‌دهد که *لیستریا مونوسیتوژنز* در سبزیجات منطقه مورد مطالعه از فراوانی نسبتاً زیادی برخوردار است.

واژگان کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز*، سبزیجات تازه، *hlyA*، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری گرم مثبت، بدون اسپور و هوازی-بی‌هوازی اختیاری است که به صورت خارج سلولی و داخل سلولی قادر به رشد می‌باشد این باکتری مهم‌ترین گونه جنس خود به شمار می‌آید و در محیط و طبیعت گستردگی فراوانی دارد. باکتری مذکور در خاک، آب، مدفوع انسان و دام، سبزیجات، گوشت خام سفید و قرمز، ماهی، فراورده‌های گوشتی و شیر یافت می‌شود و در دام و انسان می‌تواند ایجاد بیماری نماید (Pellicer et al.,2004 and Yucel et al., 2010).

لیستریا از طریق استنشاق و در اغلب مواقع مصرف مواد غذایی آلوده وارد بدن انسان می‌شود (Yin et al., 2011).

لیستریوز که به وسیله *لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد می‌شود، یک بیماری نسبتاً نادر ولی پراهمیت است که میزان مرگ و میر بالایی (۳۰ درصد) در مقایسه با سایر عوامل بیماری‌زای میکروبی با منشأ غذایی از جمله سالمونلا دارد (Broome et al., 1990). بیماری به طور وسیع از قسمت‌های مختلف جهان که حساسیت بیش‌تری دارند گزارش شده است (Bille et al., 1992). *لیستریا مونوسیتوژنز* در غذاهای مختلف از جمله گوشت ماکیان، سبزیجات، غذاهای دریایی در ۱۵ سال اخیر یافت شده است (Endang et al., 2003).

لیستریا مونوسیتوژنز از نظر مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بسیار شبیه سایر گونه‌های *لیستریا* می‌باشد و تفاوت‌های بین گونه‌ای در بیماری‌زایی و همه گیری آن وجود دارد (Liu, 2006). *لیستریا مونوسیتوژنز* از کاهو، کلم، ذرت، جوانه‌ها، سیب‌زمینی، خیار، جعفری و شاهی جداسازی شده است (Odumeru et al., 1997) . موارد بسیاری از عفونت محصولات تازه با این باکتری از نواحی مختلف جهان گزارش شده است (Meldrum et al., 2009). موارد شیوع بیماری که ناشی از میوه‌ها و سبزیجات تازه آلوده بوده است، در

سال‌های اخیر افزایش پیدا کرده است (Mukherjee et al., 2006).

وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* در سبزیجات به دلیل مصرف فراوان سبزیجات تازه تبدیل به یک نگرانی عمومی شده است. سلامت سبزیجات به دلیل گسترش مصرف آن‌ها به عنوان یکی از اجزای مهم رژیم غذایی سالم از اهمیت بسیاری برخوردار است. در ایران این سبزیجات معمولاً از سبزی‌فروشی‌ها خریداری می شوند که معمولاً در شرایط بهداشتی ضعیف عرضه می‌شوند.

تشخیص متداول *لیستریا مونوسیتوژنز* در مواد غذائی به وسیله کشت انتخابی و تست‌های بیوشیمیایی صورت می‌پذیرد. در این بررسی پرایمرهای اختصاصی ساخته شده برای تکثیر قطعه ۲۲۴ جفت بازی (bp) ژن حدت *hlyA* در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به کار گرفته شدند.

هدف از این مطالعه، جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* در سبزیجات و استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت مطالعه فراوانی ژن *hlyA* در جدایه‌های حاصل بود.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری

در مجموع ۱۴۵نمونه از انواع سبزیجات شامل نعنا، ترخان، جعفری، تربچه، کاهو، کلم، تره، پیازچه، ریحان، و پیاز در تابستان ۱۳۹۲ به طور تصادفی از مراکز عرضه سبزیجات خام در سطح شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید. نمونه‌ها در لوله‌های در دار استریل جمع آوری و در کنار یخ به مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد منتقل شدند.

در آزمایشگاه حدود ۵ گرم از هر نمونه برداشت و در لوله آزمایش حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط آبگوشت غنی کننده لیستریا هموژن شد. سپس نمونه‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری گردیدند (Varnam, 1991). نمونه‌های غنی شده در محیط پالکام آگار (Quelab, UK) کشت خطی داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند

در نهایت پلیت‌ها از نظر حضور پرگنه‌های لیستریایی (کلونی سیاه) بررسی شدند. سپس پرگنه‌های مشکوک به *لیستریا* با آزمون های بیوشیمیایی شامل آزمون کاتالاز، احیای نیترات، همولیز، تخمیر قندهایی مانند رامنوز، زایلوز، گلوکز و مانیتول مورد بررسی قرار گرفتند (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۹۲).

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مراز

استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت ساخت شرکت سیناژن ایران انجام پذیرفت. کیفیت DNA استخراج شده، پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و تابش نور ماورای بنفش بررسی شد. به منظور تشخیص ژن *hlyA* *لیستریا مونوسیتوژنز* از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) و پرایمر اختصاصی ژن همولیزین بشکل lis-F:5′-TGTTAATGAACCTACAAGACCTTC-3′ *hlyA* lis-R:5′-TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA-3′ استفاده گردید. پرایمرهای یاد شده از روی توالی موجود در بانک ژن جهانی و با استفاده از نرم افزار Gene runner طراحی شدند.

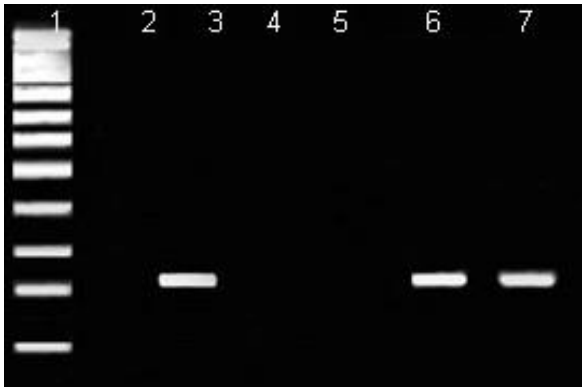
مخلوط واکنش‌گرهای PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱ میکرومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۳ میکرولیتر از DNA مربوطه انجام شد. مواد و واکنش‌گرهای مورد استفاده در PCR ساخت شرکت سیناژن ایران بود. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *hlyA* به منظور تشخیص *لیستریا* شامل ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و

در آخر طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید با استفاده از دستگاه تصویر برداری از ژل مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه ۱۴۵ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که ۸۱ نمونه (۵۶ درصد) با روش کشت از نظر باکتری *لیستریا* مثبت تشخیص داده شدند. نتایج مطالعه جدایه‌ها نشان داد که ۵۴ نمونه (۶۷ درصد) دارای ژن *hlyA* بودند به طوری که فراوانی این ژن در نمونه‌های جعفری، تربچه، کاهو، کلم، تره، پیازچه و ریحان به ترتیب ۸ (۱۴/۸درصد)، ۸ (۱۴/۸درصد)، ۱۰ (۱۸/۵درصد)، ۱۰ (۱۸/۵درصد)، ۱۱ (۲۰/۳درصد)، ۲(۳/۷درصد)و ۵ (۹/۲درصد) مورد بود.

پرایمرهای استفاده شده محصولی در اندازه ۲۲۴ جفت باز تولید می‌کند. آزمایش اختصاصیت نشان داد که روش حاضر با هیچ یک از باکتری‌های غیر هدف واکنش نشان نمی‌دهد.



شکل ۱- الکتروفورز ژن *hlyA* در لیستریا مونوسیتوژنز (۲۲۴ جفت باز) بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. ستون ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲) کنترل منفی، ستون ۳) کنترل مثبت، ستون‌های ۴ و ۵) نمونه‌های منفی و ستون‌های ۶ و ۷) نمونه‌های مثبت

بحث

در این تحقیق، نمونه‌های مختلفی شامل نعنا، ترخون، جعفری، تربچه، کاهو، کلم، تره، پیازچه،ریحان، پیاز مورد آزمایش قرار گرفت. همه نمونه‌ها از نظر آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش کشت مورد بررسی قرار گرفتند و فراوانی ژن *hlyA* نیز در نمونه‌ها به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضر، فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنزدر* نمونه‌های مورد بررسی ۵۶ درصد و فراوانی ژن *hlyA* در بین باکتری‌های جداسازی شده ۶۷ درصد بود.

سبزیجات یکی از منابع سرشار از ویتامین و مواد معدنی ضروری برای رشد و سلامت بدن می‌باشند، با این وجود پاتوژن‌های بسیاری از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* از طریق مصرف سبزیجات به انسان منتقل می‌گردد. برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های منتقله از غذا و بخصوص سبزیجات، باید وضعیت آلودگی این مواد، روش‌های جداسازی و شناسایی باکتری از آن‌ها و نیز راه‌های آلوده‌سازی مواد غذایی شناخته شوند. در یک مطالعه گذشته‌نگر از سال ۱۹۸۸ تا ۲۰۰۵ طی بررسی‌های مختلف، میزان آلودگی ۲۵۰ نمونه سبزیجات تازه با حداقل فرایند حرارتی، ۳ درصد گزارش شده است (Crepet et al., 2007).

Farber et al. (1989) در کانادا، نشان دادند که از ۱۱۰ نمونه انواع سبزیجات شسته نشده هیچ *لیستریا مونوسایتوژنزی* جداسازی نشده است، در حالی که به

ترتیب از ۱۰ درصد و ۹ درصد نمونه های گشنیز و کاهو، *لیستریا سیلیگری* جدا شد. در بررسی دیگری در خصوص بررسی شیوع گونه‌های *لیستریا* در انواع مواد غذایی در اصفهان، میزان آلودگی مواد غذایی به گونه‌های لیستریا و *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب ۴/۶ و ۱/۲ درصد گزارش شده است (Jalali et al., 2008). در اسپانیا میزان آلودگی سبزیجات فراوری شده به *لیستریا مونوسایتوژنز* ۰/۷ درصد گزارش شده است. بر اساس آمار اداره دارو و غذای آمریکا انواع سالاد مانند سالاد گوشت و سالاد فراورده‌های دریایی بالاترین خطر لیستریوزیس در مصرف‌کنندگان را نسبت به سایر مواد غذایی داشته‌اند (Abadias et al., 2008). چون *لیستریا مونوسایتوژنز* قادر است در شرایط یخچالی رشد کند و از میزان ۱۰۰ باکتری در هر گرم به بیش از 10^5 باکتری در گرم افزایش یابد. در تحقیقات انجام شده قبل از سال ۲۰۰۱ میلادی به دلیل عدم شناسایی کامل ژنوم *لیستریا مونوسیتوژنز* از ژن *hlyA* کمتر استفاده شده است.

نتایج آزمایشات مختلف با ژنوم باکتری‌های دیگر غیر از *لیستریا مونوسیتوژنز*، نشان داد که این پرایمر با هیچ یک از آنها واکنش نشان نمی‌دهد. در نهایت با این تحقیق توان شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از دستگاه‌های موجود و با رنگ آمیزی اتیدیم بروماید در ژل آگارز و بدون نیاز به پروب با حساسیت و اختصاصیت قابل قبول حاصل گردید.

لازم به ذکر است که مطالعه حاضر با توجه به میزان آلودگی به لیستریا (۵۶ درصد) سبزیجات فرآوری نشده در شهرستان شهرکرد حاکی از میزان بالای آلودگی به این باکتری در مقایسه با گزارشات دیگر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که درصد نسبتاً بالایی از سبزیجات عرضه شده در بازار حامل *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشند، بنابراین با توجه به وجود ژن حدت در ۵۴ نمونه، رعایت اصول بهداشتی قبل از مصرف این مواد غذایی نقش به سزایی در کنترل آلودگی و پیشگیری از لیستریوزیس دارد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که روش‌های مولکولی مثل PCR در مقایسه با کشت، روش دقیق‌تر و حساس‌تری برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشند.

منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۲). راهنمای کاربرد اصول کلی بهداشت مواد غذایی برای کنترل *لیستریا مونوسیتوژنز*. استاندارد شماره ۱۱۵۵۳.

2. Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., and vinas, I. 2008. Microbiological quality of fresh minimally processed fruits and vegetables, and sprouts from retail establishments. J Food Microbiol. 123: 121-129.
3. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.N., and Caniaux, I. 1992.API Listeria, a new and promising one-day system to identify Listeria isolates. Appl Enviro Microbiol. 58: 1857-1860.
4. Broome, C.V., Gellin, B., and Schwartz, B. 1990. Epidemiology of listeriosis in the United States. In Miller, A.J., Smith, J.L. and Somkuti,G.A. (Eds.), Foodborne listeriosis, pp. 61-65.
5. Crepet, A., Albert, I., Dervin, C., and Carlin, F. 2007. Estimation of Microbial contamination of food from prevalence and concentration data: Application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. Appl Enviro Microbiol. 73: 250-258.
6. Endang, P., Radu, S., Ismail, A., Kqueen, C.Y. and Maurice, L. 2003. Characterization of *Listeria monocytogenes*isolated from chicken meat: Evidence of conjugal transfer of plasmid-mediated resistance to antibiotic. J Anim Vet Adv. 2: 237-246.

7.Farber JM,and Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food–borne pathogen. Microbiol Rev. 55: 476-511.

8. Jalali, M., Abedi, D. 2008.Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. J Food Microbiol. 122: 336-340.

9. Liu D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol. 55: 645-659.

10. Meldrum, R.J., Little, C.L., Sagoo, S., Mithani, V., McLauchlin, J. and de Pinna, E. 2009. Assessment of microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. J Food Microb. 36: 1-5.

11. Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A.T., Buesing, K.M. and Diez-Gonzalez, F. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. J Food Protec. 69: 1928-1936.

12. Odumeru, J.A., Mitchell, S.J., Alves, D.M., Lynch, J.A., Yee, J.A., Wang, S.L., et al. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. J Food Protec. 60: 954-960.

13. Pellicer, K.E., Copes, J.A., Nosetto, E.O., Echeverria, M.G. 2004. Characterization of *Listeria* spp. isolated from ready-toeatproducts in Argentina using SDS-PAGE and restriction endonuclease. Food Res Inter. 37: 1013-1019.

14. Varnam, A.H. 1991. Foodborne Pathogens. Wolf publishing Ltd, London, UK.

15. Yin, Y., Tian, D., Jiao, H., Zhang, C., Pan, Z., Zhang, X., Wang, X., Jiao, X. 2011. Pathogenicity and immunogenicity of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* in the chicken infection model. Clin Vac Immunol. 18: 500-505.

16.Yucel, N., Balci, S. 2010. Prevalence of *listeria, Aeromonas,* and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J Food Protec. 73: 380-384.