مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره چهارم (پیاپی ۱۷) زمستان ۱۳۹۲
صفحات ۳۱۹-۳۱۲

Original Article

بررسی فراوانی ژن *ctpA* در باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شده از طیور به روش PCR

صغرا مقصودی[۱]، عباس دوستی*[۲]، هاشم نیری[۳]، محمد چهلگردی[۴]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه بیوشیمی، [۴] کارشناس، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: *لیستریا مونوسیتوژنز* توانایی ایجاد عفونت در انسان و حدود ۵۰ گونه از حیوانات را دارد. گوشت و فرآورده های گوشتی نقش بالقوه ای در انتقال *لیستریا* به انسان دارند و باعث ایجاد بیماری لیستریوز می گردند. هدف از این مطالعه تعیین میزان آلودگی طیور به *لیستریا مونوسیتوژنز* و بررسی فراوانی ژن *ctpA* می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۴۱۰ نمونه جمع آوری شده از طیور در شهرکرد شامل ۱۱۰ نمونه مدفوع و ۱۰۰ نمونه از هر یک از بافت های کبد، طحال و مغز انجام شد. جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از محیط های کشت اختصاصی صورت پذیرفت. آزمایشات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های *16S rRNA* و *ctpA* *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام شد. همچنین تمامی ۴۱۰ نمونه به صورت مستقیم نیز با روش PCR ارزیابی گردیدند.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد پژوهش، با روش کشت ۲۰/۲۴ درصد از نظر *لیستریا* مثبت تشخیص داده شدند. حضور *لیستریا* با روش کشت در نمونه های مدفوع، کبد، طحال و مغز به ترتیب ۳۶/۳۰٪، ۱۹٪، ۱۹٪ و ۱۲٪ تعیین گردید. اما با استفاده از روش PCR از مجموع ۴۱۰ نمونه، ۲۵/۱۲ درصد آلوده به *لیستریا* بودند. همچنین ژن *ctpA* در ۳۴/۹۵٪ از *لیستریا* ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: یافته های ما نشان می دهد که *لیستریا مونوسیتوژنز* در طیور منطقه مورد مطالعه از فراوانی نسبتاً بالایی برخوردار است. با استفاده از روش PCR امکان شناسایی مستقیم آلودگی *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه های تهیه شده از طیور وجود دارد.

واژگان کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز* ، طیور، *ctpA*، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹۲

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*)، باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است، که به صورت درون سلولی و خارج سلولی قادر به رشد و تکثیر می باشد. این باکتری توانایی تولید کپسول، اسپور و تاژه را ندارد و در ۲۵ درجه سانتی گراد متحرک و در ۳۷ درجه سانتی گراد فاقد حرکت است (۱). این باکتری را به طور گسترده از محیط هایی مانند آب، خاک، سبزیجات، حیوانات اهلی و وحشی، گوشت دام و طیور، غذاهای دریایی و فرآورده های حاصل از آنها می توان جدا نمود. همچنین ۵٪ از انسان ها بدون نشان دادن هر گونه علامتی می توانند این باکتری را سال ها در روده خود حمل نمایند (۲ و۳). *لیستریا* از طریق استنشاق، خوردن مواد غذایی آلوده و تماس با فرآورده های حیوانی وارد بدن انسان می شود. در اغلب مواقع انسان از طریق مواد غذایی به لیستریوزیس مبتلا می گردد (۴). افراد مسن و کسانی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند، نوزادان و زنان باردار از گروه های در معرض خطر ابتلا به این بیماری محسوب می شوند.

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی. تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

بیماری به دو صورت لیستریوز غیر تهاجمی با علایم اسهال و استفراغ و لیستریوز تهاجمی شدید به صورت سقط جنین در زنان باردار، سپتی سمی نوزادن، عفونت داخل رحمی به صورت گرانولوماتوز، انسفالیت، منتگوانسفالیت، آندوکاردیت، میوکاردیت، نکروز کبدی، عوارض پوستی و گوارشی و علایم متفاوت دیگر در انسان و دام بروز می نماید (۷-۵). میزان بالای مرگ و میر تا حدود ۳۰ درصد و بروز سالانه ۲ تا ۱۰ مورد در هر یک میلیون نفر، توسط سازمان بهداشت جهانی گزارش گردیده است. به طوری که شدت عوارض و بروز مرگ به قابلیت فردی، نوع غذای مصرفی و توان بیماری زایی سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* بستگی دارد (۵ و ۸). جنس *لیستریا* شامل هفت گونه مختلف است که عبارتند از:

لیستریا مونوسیتوژنز، *لیستریا ایوانویی* (*Listeria ivanovii*)، *لیستریا ولشی مری* (*Listeria welshimeri*)، *لیستریا سیلیگری* (*Listeria seeligeri*)، *لیستریا اینوکوا* (*Listeria innocua*)، *لیستریا گرایی* (*Listeria grayi*) و *لیستریا مورایی* (*Listeria murrayi*). بین گونه های یاد شده، تنها *لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد عفونت لیستریوزی در انسان و حیوانات می کند (۹ و ۱۰). محصول ژن *ctpA* پلی پپتیدی است که ۶۵۳ اسید آمینه دارد و شباهت زیادی به کاتیون انتقال ATPase دارد. این پروتئین به خانواده ای از پروتئین های مسوول انتقال یون مس در یوکاریوت ها و پروکاریوت ها شباهت دارد. *لیستریا مونوسیتوژنز* ممکن است برای زنده ماندن مکانیسم هایی داشته باشد که مس را به وسیله عمل *ctpA* از سلول های آلوده به دست آورد. وجود ژن *ctpA* در *لیستریا مونوسیتوژنز* برای پایداری و ایجاد بیماری در موش آلوده، ضروری است (۱۱ و ۱۲). سویه های حاوی *ctpA* دارای مقاومت بالاتری به شرایط محیطی و ایجاد عفونت در انسان هستند. با توجه به پراکنش محیطی باکتری در محیط، *ctpA* می تواند نقش مهمی در زنده ماندن این میکروارگانیسم در محیط طبیعی ایفا نماید. این امر نشان دهنده آن است که همه *لیستریا مونوسیتوژنزها* خاصیت بیماری زایی یکسانی ندارند (۱۱). یکی از مکانیسم های مهم *لیستریا مونوسیتوژنز* برای زنده ماندن در شرایط سخت حفظ هموستازی، مس است. برای انجام این عمل، محصول ژن *ctpA* نقش مهمی ایفا می کند (۱۳). این مطالعه با هدف ارزیابی میزان آلودگی لاشه طیور صنعتی به *لیستریا مونوسیتوژنز* با روش های کشت و PCR و نیز بررسی فراوانی ژن *ctpA* در نمونه ها انجام گردید.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: این تحقیق به صورت مقطعی-توصیفی در تابستان سال ۱۳۹۲ انجام شد. در مجموع ۴۱۰ نمونه شامل ۱۰۰ نمونه مغز، ۱۰۰ نمونه کبد، ۱۰۰ نمونه طحال و ۱۱۰ نمونه مدفوع از طیور ارجاعی به کشتارگاه های صنعتی سطح استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری گردید. در حدود ۱۰ گرم از هر نمونه، در لوله های ۱/۵ میلی لیتری درپوش دار استریل جمع آوری و در کنار یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

ب) کشت و جداسازی: هر نمونه به دو قسمت مساوی تقسیم گردید. یکی از نمونه ها بلافاصله برای کشت مورد استفاده قرار گرفت و دیگری به منظور استخراج DNA و انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. *لیستریا* از نمونه های مورد بررسی، بر اساس دستورالعمل ISO11290 جداسازی گردید (۱۴). حدود ۵ گرم از هر کدام از نمونه ها با ۲۵ میلی لیتر محیط آبگوشت غنی کننده *لیستریا* هموژن شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردید. نمونه های غنی شده در محیط پالکام آگار (مرک، آلمان) کشت خطی داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در نهایت پلیت ها از نظر حضور پرگنه های *لیستریایی* (کلنی سیاه) بررسی شدند. سپس سه پرگنه از پلیت های حاوی پرگنه های مشکوک به *لیستریا* انتخاب شد و در مرحله دوم بر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار (مرک، آلمان) حاوی ۶٪ عصاره مخمر کشت داده شدند. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. پرگنه های مشکوک رشد یافته در این پلیت ها به منظور تأیید گونه های *لیستریا* از نظر رنگ آمیزی

گرم، آزمون کاتالاز، حرکت در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد، احیای نیترات، همولیز، آزمون CAMP، آزمون MR/VP و تخمیر قندهایی مانند رامنوز، زایلوز، ریبوز و مانیتول مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵).

ج) آزمون های مولکولی: مطابق دستورالعمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران، DNA ژنومی از باکتری های رشد یافته بر روی محیط کشت و همچنین نمونه های بافت و مدفوع، به صورت مستقیم، تخلیص گردید. کیفیت DNA استخراج شده، پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و تابش نور ماورای بنفش بررسی شد. در تمامی مراحل انجام این تحقیق از سویه استاندارد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC1298) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

به منظور تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* استفاده گردید (جدول ۱) پرایمرهای یاد شده از روی توالی موجود در بانک ژن جهانی با شماره ثبت KC808543 و با نرم افزار Generunner طراحی شدند. همچنین به منظور تشخیص ژن *ctpA* از پرایمرهای اختصاصی ویژه این ژن استفاده گردید (جدول ۱). توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن که برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفت CP006614 بود.

مخلوط واکنشگرهای PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix، ۲ میلی مول $MgCl_2$، 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 *16S rRNA* به منظور تشخیص *لیستریا*، شامل ۷ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برنامه دمایی برای تکثیر ژن *ctpA* نیز به همین ترتیب است با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها برای این ژن ۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید.

محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه تصویر برداری از ژل مورد بررسی قرار گرفت.

د) آزمون آماری: به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نسخه هفدهم نرم افزار آماری SPSS استفاده گردید. مرز معنی داری بر روی $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته ها

بررسی های انجام شده بر روی ۴۱۰ نمونه نشان داد، تعداد ۸۳ مورد (۲۰/۲۴ درصد) با روش کشت و ۱۰۳ مورد (۲۵/۱۲ درصد) با روش PCR از نظر آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت هستند. نتایج حاصل بر اساس تفکیک نوع نمونه در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج PCR مستقیم با به کار بردن پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* نشان داد که بیشترین میزان آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* مربوط به نمونه مدفوع (۴۱/۸۰٪) و کمترین میزان

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های *16S rRNA* و *ctpA*

پرایمر	توالی (۳' → ۵')	اندازه باند	حرارت اتصال
Lis-F	TGTTAATGAACCTACAGGACCTTC	۲۲۶ bp	۶۲
Lis-R	TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA		
CptA-F	GTATCAGTTATGATTATTGCTTGTCC	۲۸۶ bp	۶۰
CptA-R	CTAAAGCTAATGGGTGTTCTGATG		

جدول ۲: فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه های جدا شده از طیور با دو روش کشت و PCR

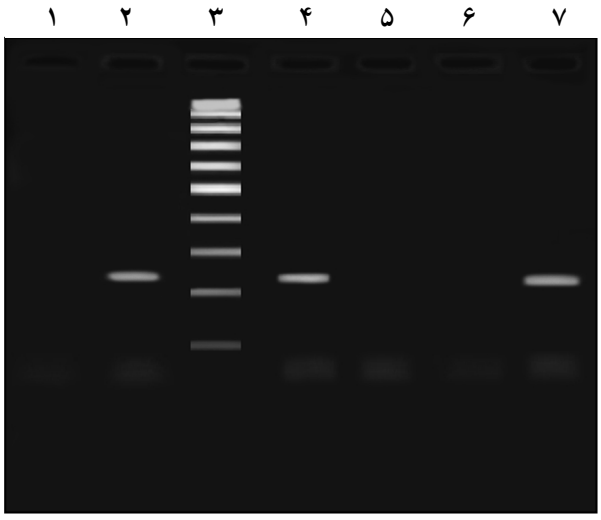
نوع نمونه	تعداد نمونه ها	کشت	PCR (ژن *16S rRNA*)
کبد	۱۰۰	۱۹ مورد (۱۹ درصد)	۲۲ مورد (۲۲ درصد)
طحال	۱۰۰	۱۹ مورد (۱۹ درصد)	۲۶ مورد (۲۶ درصد)
مغز	۱۰۰	۱۲ مورد (۱۲ درصد)	۱۷ مورد (۱۷ درصد)
مدفوع	۱۱۰	۳۳ مورد (۳۶/۳۰ درصد)	۳۸ مورد (۴۱/۸۰ درصد)
جمع	۴۱۰	۸۳ مورد (۲۰/۲۴ درصد)	۱۰۳ مورد (۲۵/۱۲ درصد)

مربوط به نمونه مغز (۱۷٪) می باشد. کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت اختصاصی نیز با انجام PCR، از نظر وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* تایید گردیدند (شکل ۱ و ۲).

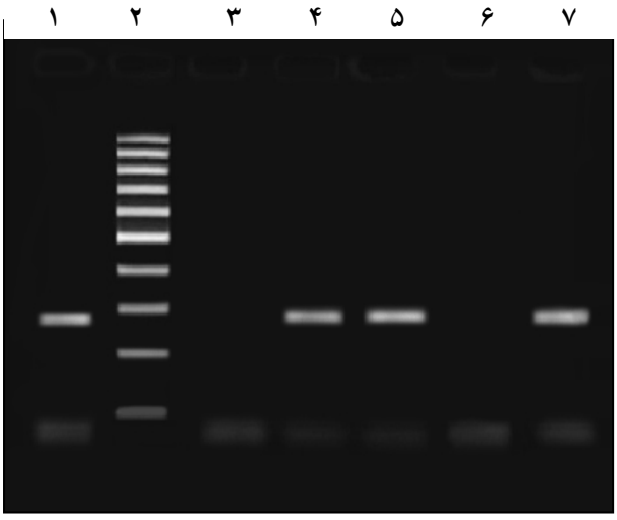
از مجموع ۱۰۳ نمونه آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز*، حضور ژن *ctpA* در ۳۶ مورد (۳۴/۹۵ درصد) تایید گردید. به طوری که فراوانی این ژن در نمونه های کبد، طحال، مغز و مدفوع به ترتیب ۸ مورد (۳۶/۳۶)، ۷ مورد (۲۶/۹۲)، ۹ مورد (۵۲/۹۴) و ۱۲ مورد (۳۱/۵۷) تعیین شد. بیشترین فراوانی ژن *ctpA* در نمونه های مغز و کمترین آن مربوط به نمونه های طحال بود ($p<۰/۰۵$).

بحث

در این پژوهش نمونه های مختلفی شامل کبد، طحال، مغز و مدفوع از طیور صنعتی مورد آزمایش قرار گرفت. همه نمونه ها از نظر آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* به دو روش کشت و PCR بررسی گردیدند و فراوانی ژن *ctpA* نیز در نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضر، فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه های مورد بررسی ۲۵/۱۲ درصد و فراوانی ژن *ctpA* در بین باکتری های جداسازی شده، ۳۴/۹۵ درصد بود. با توجه به این که گوشت مرغ و فرآورده های حاصل از آن یکی از منابع سرشار از مواد پروتئینی با ارزش



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR (ژن *16S rRNA*) برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز*. ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۲) کنترل مثبت، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)، ستون های ۴ و ۷) نمونه های مثبت از نظر حضور باکتری (دارای باند ۲۲۶ جفت بازی)، ستون های ۵ و ۶) نمونه های منفی از نظر حضور باکتری.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR برای تشخیص ژن *ctpA* در *لیستریا مونوسیتوژنز*. ستون ۱) کنترل مثبت، ستون ۲) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)، ستون ۳) کنترل منفی، ستون های ۴، ۵ و ۷) نمونه های حاوی ژن *ctpA* (دارای باند۲۸۶ جفت بازی)، ستون ۵) نمونه فاقد ژن *ctpA*.

غذایی بالا، چربی و مواد معدنی ضروری برای رشد و سلامت بدن می باشد، در چند دهه گذشته مصرف گوشت مرغ و فرآورده های حاصل از آن با افزایش جمعیت، رشد روز افزون یافته است. با این وجود ممکن است پاتوژن های خطرناک زیادی با مصرف گوشت مرغ و فرآورده های حاصل از آن و حتی در مواد غذایی نگهداری شده در یخچال منتقل شوند (۱۸-۱۶). *لیستریا* باکتری است که می تواند یک بیماری وابسته به مواد غذایی با میزان مرگ و میر بالا ایجاد نماید. به طوری که درصد مرگ و میر ناشی از آن در جمعیت های مستعد ۲۵ تا ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۹). بیش از ۱۷ گونه از پرندگان مستعد ابتلا به *لیستریا مونوسیتوژنز* می باشند. به طوری که مواردی از لیستریوز در مرغ، بوقلمون، کبوتر و مرغابی گزارش و تایید شده است. پرندگان از طریق استنشاق هوای آلوده و یا خوردن غذا آلوده می شوند. پرندگان جوان بیش از پرندگان مسن مستعد آلودگی با *لیستریا مونوسیتوژنز* می باشند و لیستریوز اغلب به صورت سپتی سمی در آنها ظاهر می شود. مطالعات قبلی نشان می دهد که تماس با محتویات روده، خطری برای شیوع گونه های لیستریایی در نمونه های غذایی محسوب می شود (۲۰). ژن *ctpA* در هموستازی مس در بدن نقش دارد. نام این ژن Imoo135 است و پروتئین حاصل از آن ABC الیگو پپتید نامیده می شود. نقش آن حمل و نقل پروتئین متصل به سوبسترا است و از طرفی با پروتئین ۳-دهیدروکوینات سنتتاز همولوژی دارد (۱۷). در مطالعه انجام شده درصد آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* در طیور ۳۳/۶۵٪ و میزان پراکندگی ژن *ctpA* ۲۷/۵۳٪ مشاهده شد. آلودگی گوشت مرغ در آمریکا ۲۵-۰/۲٪ (۲۱)، ۱۷/۷٪ در پرتغال (۲۲)، ۱۷-۱۵٪، ۳۶/۱٪ در اسپانیا (۲۳)، ۳۰/۲٪ در کره جنوبی، ۷۰٪ در استونی و ۱۰٪ در فرانسه اعلام شده است (۲۱ و ۲۳). در ایران تحقیقات بسیار کمی در زمینه جداسازی این باکتری از گوشت مرغ صورت گرفته است، که می توان به آلودگی گوشت مرغ در اهواز به میزان ۵٪ (۲۴)، اشاره نمود. با توجه به آمار ارائه شده در سطح جهان و در داخل کشور، میزان آلودگی گوشت مرغ به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در ایران در گزارش های قبلی، کمتر از حداقل جهانی و حتی در برخی موارد صفر درصد گزارش شده است. البته این درصد پایین را نمی توان دلیلی بر عدم وجود یا پایین بودن میزان این باکتری در محیط و طبیعت دانست بلکه عوامل زیادی در میزان جداسازی این باکتری دخالت داشته اند. آلودگی های ثانویه گوشت مرغ به باکتری های سرمادوست که ممکن است رشد و جداسازی *لیستریا* مونوسیتوژنز را غیر ممکن سازد. تفاوت در درصدهای بیان شده در کشورهای مختلف را می توان به تکنیک ها و روش های متفاوت برای تشخیص باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، تفاوت در مناطق مورد مطالعه و همچنین نوع و تعداد نمونه ها دانست. در رابطه با میزان پراکندگی ژن *ctpA* گزارش های بسیار کمی در ایران و جهان وجود دارد. دو گزارش در سال های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۴ توسط نوروزی (Nourouzi) و همکاران به صورت زیر اعلام شد:

در گزارش اول ۱۸۰ نمونه از مغز، کبد، مدفوع طیور، مواد غذایی و دامی با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع ۲۵ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده، ژن *ctpA* در ۲۰ درصد از نمونه ها مشاهده گردید. در گزارش دیگر از ۶۹ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی، ۳۸ درصد از آنها حاوی ژن *ctpA* بودند (۲۴). بر اساس گزارش های موجود، به احتمال زیاد حضور ژن *ctpA* می تواند نقش مهمی در بیماری زا بودن باکتری داشته باشد. به طوری که ممکن است برخی از مواد غذایی آلوده به این باکتری باشند اما به دلیل عدم حضور ژن *ctpA*، ایجاد بیماری ننمایند و یا شدت بیماری خیلی خفیف باشد (۱۱).

نتیجه گیری

در ایران اطلاعات زیادی در مورد ژن های بیماری زای *لیستریا مونوسیتوژنز از جمله* ژن *ctpA* در دسترس نمی باشد. آنچه مسلم است این است که ژن *ctpA* نقش موثری در بقا و پایداری باکتری در سلول میزبان ایفا می نماید. همچنین می توان نتیجه گرفت که روش های مولکولی مانند PCR در

مقایسه با کشت، روش دقیق تر و حساس تری برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* می باشند. به طوری که با این روش می توان به صورت موفقیت آمیزی *لیستریا* را از نمونه های مواد غذایی یا سایر منابع با دقت و سرعت بالا تشخیص داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و نیز گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Milohanic E, Glaser P, Coppée JY, Frangeul L, Vega Y, Vázquez-Boland JA, Kunst F, Cossart P, Buchrieser C. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. Mol Microbiol. 2003; 47(6): 1613-1625.

2. Tirziu E, Nichita I, Cumpanasolu C, Gros RV, Seres M. *Listeria monocytogenes*, monographic study. Anim Sci Biotechnol. 2010; 43: 441-446.

3. Barros MA, Nero LA, Silva LC, d'Ovidio L, Monteiro FA, Tamanini R, Fagnani R, Hofer E, Beloti V. *Listeria monocytogenes*: occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. Meat Sci. 2007; 76(4): 591-596.

4. Yin Y, Tian D, Jiao H, Zhang C, Pan Z, Zhang X, Wang X, Jiao X. Pathogenicity and immunogenicity of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* in the chicken infection model. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(3): 500-505.

5. Autio T. Tracing the sources of *Listeria Monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic disertation, Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 2003.

6. Izar B, Mraheil MA, Hain T. Identification and role of regulatory non-coding RNAs in *Listeria monocytogenes*. Int J Mol Sci. 2011; 12(8): 5070-5079.

7. Vivant AL, Garmyn D, Piveteau P. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. Front Cell Infect Microbiol. 2013; 3: 87.

8. Rocourt J, Benembarek P, Toyofuku H, Schlundt J. Quantitive risk assessment of *Listeria*. Min ready to eat foods. The FAO/WHO Approach. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 35: 236-267.

9. Jamali H, Paydar M, Looi CY, Wong WF. Prevalence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes in ready mayonnaise salads and salad vegetables in Iran. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(19): 1903-1906.

10. Williams SK, Roof S, Boyle EA, Burson D, Thippareddi H, Geornaras I, Sofos JN, Wiedmann M, Nightingale K. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready to eat meat processing plants. J Food Prot. 2011; 74(1): 63-77.

11. Nourouzi J. Investigation *ctpA* gene among *Listeria monocytogenes* and transferring it into *E. coli*. Yakhteh Med J. 2003; 4(16): 207-211. [In Persian]

12. Francis MS, Thomas CJ. The *Listeria monocytogenes* gene *ctpA* encodes a putative P-type

ATPase involved in copper transport. Mol Gen Genet. 1997; 253(4): 484-491.

13. Mei M, Kpii B. The role of PCT. 18 in copper, tolerance for *Listeria movocytogenes*. Appl Sci. 2003; 3: 66-133.

14. Souza VMD, Alves VF, Destro MT, De Martinis ECP. Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed surubim fish (*Pseudoplatytoma* sp). Braz J Microbiol. 2008; 39: 527-528.

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

16. Kabuki DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. J Dairy Sci. 2004; 87(9): 2803-2812.

17. Schauer K, Geginat G, Liang C, Goebel W, Dandekar T, Fuchs TM. Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. BMC Genomics. 2010; 11: 573.

18. Silva IM, Almeida RC, Alves MA, Almeida PF. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. Int J Food Microbiol. 2003; 81 (3): 241-248.

19. Mahmood MS, Ahmed AN, Hussain I. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat, poultry meat products and other related inanimates at Faisalabad. Pak J Nutr. 2003; 2(6): 346-349.

20. Ertas H B, Seker E. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fish intestines and RAPD analysis. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 1007-1011.

21. Yucel N, Citak S, Onder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in meat products in Ankara. Food Microbiol. 2005; 22: 241-245.

22. Mena C, Almeida G. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food product commercialized in Portugal. Food Microbiol. 2004; 21: 213-216.

23. Vitas AI, Garcia-Jalon VA. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Int J Food Microbiol. 2004; 90(3): 349-356.

24. Maktabi S, Fazlara A, Ebrahimian S. Incidence of *Listeria* species in farmed tropical fish in Khuzestan, Iran. World J Fish Marine Sci. 2011; 3(3): 206-209.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 4, January 2014

Original Article

The frequency of *ctpA* gene in *Listeria monocytogenes* isolated from poultry using PCR

Soghra Maghsoudi[1], Abbas Doosti[2], Hashem Nayeri[3], Mohammad Chehelgerdi[4]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Islamic Azad University,Falavarjan Branch, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[4]BS.c., Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Listeria monocytogenes* is able to cause infections in humans and around 50 species of animals. Meats and their derivatives show a potential role in the transmission of *Listeria* to humans and epidemy of listeriosis. The aim of this study was to determine the contamination of poultry meats whit *L. monocytogenes* and to find out the frequency of *ctpA* gene.
Materials and Methods: This cross-sectional study was carried out on 410 samples collected from poultry, including 110 fecal samples and 100 samples from each of liver, spleen and brain samples. Isolation of *L. monocytogenes* was performed using specific medium. PCR was performed using *L. monocytogenes* 16S rRNA and *ctpA* gene specific primers. Also, all of the 410 samples were tested directly using PCR.
Results: Totally, 20.24% of the samples were positive for *Listeria* in culture method. The presence of *Listeria* in fecal, liver, spleen and brain specimens were 36.30%, 19%, 19% and 12%, respectively. However, based on PCR, 25.12% out of 410 samples were infected to *Listeria*. Furthermore, *ctpA* gene was found in 34.95% of *Listeria.*
Conclusion: The results indicate that the frequency of *L. monocytogenes* in the poultry samples of this region is relatively high. PCR techniques make it possible to determine the *L. monocytogenes* infection directly in fresh samples.
Keywords: *Listeria monocytogenes*, Poultry, *ctpA*, PCR.

Correspondence to: Abbas Doosti
Tel: +989133838830
E-mail: abbasdoosti@yahoo.com
Journal of Microbial World 2014, 6(4): 312-319.