

# جستجوی لیستریا مونوسیتوژنز در شیر خام و پاستوریزه استان کردستان

بهاره رحیمیان ظریف<sup>۱\*</sup>

## چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز در آب، خاک، حیوانات، شیر و مواد غذایی با منشأ حیوانی وجود دارد و پراکندگی آن در جهان زیاد است. لیستریا مونوسیتوژنز در گاو باعث ایجاد آنسفالیت، سقط جنین و سپتی سمی شده و امکان دارد انسان از راه های مختلف به این باکتری آلوده شده و دچار عوارض سختی از جمله سقط جنین در زنان حامله و سپتی سمی در نوزادان گردد که منتهی به اختلالات سیستم عصبی مرکزی، اندوکاردیت و بیماریهای پوستی و گوارشی گردد. به دلیل اینکه شیر یک ماده غذایی اصلی محسوب می شود که در تمام کشورهای پیشرفته مصرف آن در سنین مختلف اهمیت خاصی دارد و نیز یکی از راه های انتقال این باکتری به انسان می باشد و همچنین با توجه به وضعیت کردستان از نظر بهداشتی و مشکلاتی که در این زمینه وجود دارد، در این پژوهش سعی شده است که با آزمایش شیرهای خام و پاستوریزه، وضعیت آلودگی به این باکتری مورد بررسی قرار گیرد. بدین جهت ۱۰۰ نمونه شیر پاستوریزه و ۱۰۰ نمونه شیر خام از شهرهای استان به صورت نمونه گیری خوشه ای تصادفی تهیه و از نظر باکتریولوژی آزمایش شد. پس از جمع آوری نمونه ها و سانتریفوژ آنها، رسوب بدست آمده به لوله حاوی محیط براس غنی کننده لیستریا منتقل شد و پس از گذشت ۷-۳ روز، از محیط غنی کننده نمونه برداری شد و در محیط آگار انتخابی لیستریا به روش خطی کشت گردید و جهت تشخیص و تایید کلونینها در شرایط استاندارد، از تستهای بیوشیمیایی استفاده شد. پس از اتمام آزمایشهای باکتریولوژی از بین ۱۰۰ نمونه شیر خام ۶ مورد (۶٪) باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و از بین ۱۰۰ مورد نمونه شیر پاستوریزه ۱ مورد (۱٪) جدا گردید. با توجه به نتایج مشابه به دست آمده از جستجوی این باکتری در شیر خام توسط محققین سایر کشورها، توجه به اهمیت اصول دقیق پاستوریزاسیون و عدم مصرف شیرهای خام توصیه می شود.

**واژگان کلیدی:** لیستریا مونوسیتوژنز، شیر خام، شیر پاستوریزه، استان کردستان

## مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز کوکوباسیل گرم مثبت،

۱- گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

\*-نویسنده مسئول bahareh\_r\_z@yahoo.com

متحرک در ۲۲ درجه سلسیوس و بی حرکت در ۳۷ درجه سلسیوس، فاقد اسپور، غیر اسید فست non acid (fast) و اندازه آن ۲-۰/۵ میکرون و قطر آن ۰/۵-۰/۴ میکرون می باشد و معمولاً یک قطب باکتری اندکی

در زمستان، دامها بیشتر از غذای سیلو شده تغذیه می‌شوند و نیز آبستنی گاو زمینه را برای ابتلاء مساعد می‌نماید. منبع اصلی لیستریا مونوسیتوژنز در شیر، آلودگی شیر یا مدفوع می‌باشد. این باکتری می‌تواند از شیر گاو دفع شده و در دمای ۴۵-۳۰ درجه سلسیوس و pH ۹/۶-۵/۶ رشد کند (۶).

این باکتری قادر است دمای پاستوریزاسیون طبیعی (۷۲ درجه سلسیوس در مدت ۱۵ ثانیه) را تحمل کند، در نتیجه شیرهایی که فرآیند پاستوریزاسیون طبیعی را طی می‌کنند منبعی برای لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشند به همین جهت برای از بین بردن این باکتری در شیر بایستی درجه پاستوریزاسیون را به ۶/۷۶ درجه سلسیوس برسانیم (۷).

آنالیز ایزوآنزیم‌ها به عنوان روشی جهت تایپینگ و شناسایی تیپ باکتری است ولی مهمترین روش تایپینگ به وسیله تست DNA میباشد به وسیله این روش DNA کروموزومی سویه های مورد آزمایش با استفاده از یک اندونوکلاز- محدود کننده (Restriction enzyme) مناسب هضم می‌گردد. برخی از سویه های وابسته سرولوژیکی 4b لیستریا مونوسیتوژنز مربوط به سه نوبت شیوع این بیماری از طریق مواد غذایی مورد آنالیز با آنزیمهای محدود کننده قرار گرفتند و به نظر میرسد که کاربرد ترکیبی از آنزیمهای محدود کننده، تقسیم بندی سرولوژیکی و تقسیم بندی بر اساس فاز امکان ردیابی منشاء لیستریا مونوسیتوژنز عامل لیستریوز حاصل از مواد غذایی و همچنین سویه هایی که در شیوع بیماری دخالت ندارند را فراهم سازد (۲).

لیستریوز بیماری نواحی معتدل است و به طور عمده بیماری نشخوارکنندگان بویژه گوسفند است. در برخی موارد اسب و خوک هم مبتلا میشوند، وقوعش به صورت آنسفالیت یا سقط جنین میباشد ولی هر دو با هم وجود ندارند. کاهش مقاومت بدن بدلیل تغذیه نامناسب، تغییرات ناگهانی در آب و هوا و تاخیر در زایمان و خوردن برگ درخت *Pinus Ponderosa* از

مترجم است و از این نظر شبیه کورینه باکتریوم‌ها میباشد و اشکال کوکسی شکل باکتری اغلب در کشتهای کهنه دیده می‌شود. لیستریا مونوسیتوژنز فاقد کپسول است و در اثر کهنه شدن گرم منفی شده و به اشکال غیر عادی در می‌آید و دراز می‌شود و اندازه آن ممکن است به ۲۰ میکرون هم برسد (۵).

اپیدمیولوژی لیستریا مونوسیتوژنز به صورت معما و مبهم باقی مانده اگرچه ارگانسیم در سطح وسیعی در طبیعت منتشر و پراکنده است.

لیستریا مونوسیتوژنز در خاک و روی گیاهان پوسیده یافت می‌شود و بر روی گیاهان پوسیده نسبت به گیاهان سبز یا گیاهانی که تازه از بین رفته اند بهتر زیست میکند. این میکرو ارگانسیم در علوفه تخمیر شده که به صورت سیلو نگهداری میشود و pH بالاتر از ۴/۵ دارد، مشاهده میشود. این باکتری به صورت ساپروفیت خاک بوده و از هر دو خاک بایر و حاصلخیز جدا شده است و از نظر تعداد بیشترین میزان در خاکهای مرطوب و گل وجود دارد و به میزان ۲۹۵ روز یا بیشتر در آنها پایدار و زنده باقی می‌ماند. این باکتری در آبهای جاری نیز وجود دارد و غالباً در رودخانه ها از نظر تعداد بیشتر از سالمونلا یافت می‌شود ولی بیشترین و بهترین منابع موجود، فاضلابها و پسابهای کشتارگاه ها و مراکز کشتارگاهی طیور می‌باشد (۱).

اخیراً ارتباط قویتری بین لیستریوز و مصرف فراورده های لبنی در مقایسه با سایر فراورده های غذایی گزارش گردیده است و شیر پاستوریزه، شیر غیر پاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه گیری مسمومیت غذایی شناخته شده‌اند. لیستریا مونوسیتوژنز قادر به رشد در شیر غیر پاستوریزه میباشد و احتمال افزایش تعداد ارگانسیم در طول مدت نگهداری در مخازن ذخیره شیر در گاوداری ها وجود دارد. تحقیقات بیانگر این است که وقوع لیستریوز به فصل بستگی داشته، به طوری که در فصل زمستان شیوع بیماری بیشتر گزارش شده که ممکن است به دلیل آن باشد که

لیستریا منتقل شد. این محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در محیط یخچال ۴-۰ درجه سلسیوس به عنوان محیط غنی کننده سرما قرار داده شد (Cold enrichment) و پس از گذشت ۷-۳ روز، از محیط غنی کننده نمونه برداری شد و در محیط آگار انتخابی لیستریا به روش خطی کشت گردید و جهت رشد بهتر از جار حاوی Co2 استفاده شد. این محیط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه روز گذاشته شد و سپس پلیتهای حاوی کلونیهای کوچک مورب و کمی محدب با سطح هموار و مات با اطراف سبز روشن متمایل به آبی شفاف جهت تشخیص نگهداری شد. از این کلونیاها نمونه برداری شد و پس از تهیه گسترش با رنگ گرم رنگ آمیزی شد و کلونیهای باکتری های گرم مثبت کوکوباسیلی شکل جهت پاساژ دادن در محیط آگار انتخابی کشت موجود داده و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بر روی باکتری کلونی خالص، تست کاتالاز جهت تمایز این باکتری از سایر باکتریها انجام شد. باکتریهای کاتالاز مثبت را به محیط مایع MRVP انتقال داده و پس از گرما گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و نتیجه این تست پس از اضافه کردن معرفها بررسی شد که این باکتری از لحاظ MR,VP مثبت است.

سپس جهت تمایز بیشتر، کلونیهای کاتالاز مثبت را روی محیطهای قندی که لیستریا آنها را تخمیر کرده و اسید تولید می کند کشت داده. همچنین از خصوصیات تحرک لیستریا در دمای ۲۲ درجه سلسیوس جهت تشخیص بهتر استفاده شد.

با توجه به خاصیت همولیتیک بودن لیستر یا مونوسیتوزنز، کلونیاها را در ژلوز خوندار کشت داده تا ضمن انجام آزمون همولیز بتوان باکتری را برای مدت بیشتری نگهداری کرد.

عوامل مستعد بوده که ایجاد بستری مناسب برای درگیری حیوان را می نماید (۱).

در مجموع علائم بالینی بیماری در حیوان علاوه بر آنسفالیت و سقط جنین می توان به تورم پستان در گاو که به درمان پاسخ نمی دهد و همچنین بیماری التهاب میلین نخاع (Panophthalmitis) که اندام خلفی حیوان درگیر می شود و سپس فلج رخ می دهد اشاره کرد. علائم بیماری در انسان شامل لیستریوز دوران حاملگی، لیستریوز نوزادی، لیستریوز سیستم عصبی مرکزی، اندوکاردیت، سپتی سمی و بیماری گوارشی اشاره کرد (۱۰).

## مواد و روش کار

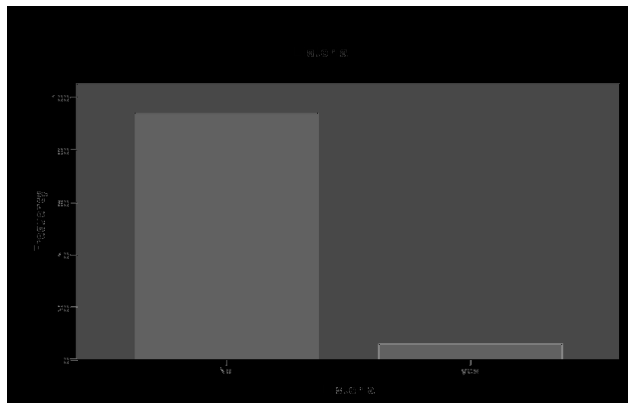
در فاصله زمانی مناسب از ۲۰۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه نمونه برداری صورت گرفت. نمونه برداری به صورت خوشه ای تصادفی از ۱۰ شهر مختلف استان کردستان شامل: سنندج، کامیاران، سقز، دیواندره، میوان، بانه، بوکان، قروه، دهگلان و بیجار بود و از هر شهر ۱۰ نمونه شیر خام گرفته شد. نمونه ها در دو شکل خام و پاستوریزه به صورت مجزا تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه ها از مجموعه شیرهای عرضه شده به بازار از مغازه های عرضه کننده شیر تهیه شد. به این صورت که لوله های آزمایش پس از درب گذاری، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد تا کاملاً سترون گردد سپس از هر پاکت شیر پاستوریزه ۱۰ سی سی شیر به طور مستقیم وارد لوله ها شد. در مورد شیر خام هم به همین صورت عمل شد و از مراکز مختلف عرضه شیر خام در سطح شهر با پراکندگی مناسب نمونه ها تهیه شد سپس همه لوله های حاوی نمونه فوراً به آزمایشگاه منتقل شد. لوله ها در آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد و حدود ۱ سی سی رسوب انتهای لوله جهت کشت به کار رفت. از این رسوب تحت شرایط استریل نمونه برداری شد و به لوله حاوی محیط براس غنی کننده

## جدول شماره ۱ - خصوصیات بیوشیمیایی لیستریا منوسایتوژنز

خصوصیات	گالاکتوز	لاکتوز	سوکروز	گزیلوز	گلیکوژن	L-رامنوز	ملییتوز	بتا-همولیز
لیستریا منوسایتوژنز	-/+	+	-	-	-	+	-/+	+

## نتایج

پس از انجام کلیه مراحل آزمون و با صرف دقت لازم در انجام مراحل نمونه برداری تا سنجش آزمایشگاهی (جدول شماره ۱) تنها یک مورد باکتری در شیر پاستوریزه استان کردستان مشاهده شد ولی در مورد شیر خام در نهایت ۶ مورد لیستریا منوسیتوژنز مشخص شد که از بین این ۶ مورد، ۳ مورد مربوط به شهر دیواندره، ۲ مورد مربوط به شهر سقز و یک مورد مربوط به شهر بوکان بود و از نمونه شیرهای جمع آوری شده از شهرهای قروه، کامیاران، بیجار، بانه، مریوان و سنندج هیچ باکتری لیستریا منوسیتوژنز جدا نشد و میزان آلودگی این باکتری در شیر خام ۰.۶٪ و در شیر پاستوریزه ۰.۱٪ است (جدول شماره ۲)



نمودار شماره ۱: بررسی فراوانی تعداد لیستریا منوسایتوژنز در شیر خام

## بحث

لیستریا منوسایتوژنز بطور گسترده در خاک، آب، گیاهان، موادخوراکی، مدفوع و بخصوص آب، سیلوها، سبزیجات و علوفه کهنه کپک زده وجود دارد و یکی از مهمترین منابع عفونت در حیوانات اهلی و وحشی بشمار می‌رود (۱، ۲، ۷). لیستریا منوسایتوژنز در علوفه‌های تخمیر شده قالبی و با بسته‌بندی بزرگ وجود داشته، رشد می‌کند. این ارگانیزم در علوفه‌های تخمیر شده که بصورت سیلو نگهداری می‌شوند با pH بالاتر و پائینتر از ۴/۵ مشاهده می‌گردند (۴، ۳).

اخیرا ارتباط قویتری بین لیستریوز و مصرف فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده‌های غذایی گزارش گردیده و شیر پاستوریزه و غیر پاستوریزه و پنیر بعنوان منبع همه گیری مسمومیت غذایی شناخته شده است. لیستریا منوسایتوژنز قادر به رشد در شیر غیرپاستوریزه می باشد و احتمال افزایش تعداد ارگانیزم در طول مدت نگهداری در مخازن ذخیره شیر در گاوداریها و سیلوها وجود دارد. تحقیقات نشان می دهد وقوع لیستریوزیس با فصل وابستگی داشته است، بطوری که در فصل زمستان شیوع بیماری بیشتر گزارش شده که ممکن است بدلیل

## جدول شماره ۲- تعداد درصد موارد مثبت لیستریا منوسایتوژنز در شیر خام استان کردستان

نام شهر	تعداد کل نمونه	تعداد موارد مثبت	درصد آلودگی
دیواندره	۱۰	۳	۳۰
سقز	۱۰	۲	۲۰
بوکان	۱۰	۱	۱۰
قروه	۱۰	۰	۰
کامیاران	۱۰	۰	۰
مریوان	۱۰	۰	۰
بیجار	۱۰	۰	۰
بانه	۱۰	۰	۰
سنندج	۱۰	۰	۰
دهگلان	۱۰	۰	۰

میزان ۰.۶٪ باکتری در شیر خام استان از دید بهداشت عمومی و طب انسانی اهمیت ویژه دارد. بیماریهای آنسفالیت، سقط جنین، سپتی سمی، آندوکاردیت، بیماریهای جلدی، گوارشی و نوزادان از جمله بیماری‌هایی است که در صورت کم توجهی به این امر می‌تواند خطرآفرین باشد.

در هر صورت بنظر می‌رسد که توجه به عدم مصرف شیرهای خام، انجام اصول صحیح پاستوریزاسیون، عدم مصرف شیرهای تاریخ مصرف گذشته و نگهداری صحیح شیر پاستوریزه، می‌تواند در کاهش آلودگی به این باکتری نقش بسزایی داشته باشد.

### سپاسگزاری

با سپاس و تشکر فراوان از کارخانه شیر سنندج، آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و کلیه عزیزانی که من را در این امر یاری کردند.

### منابع

- ۱- تاج بخش، حسن (۱۳۶۸): باکتری شناسی عمومی، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۶۸۷-۶۸۶.
- ۲- ذوقی، اسماعیل (۱۳۷۲): بیماریهای قابل انتقال بین انسان و حیوان، تالیف جیمز اچ استیل، انتشارات جهاد سازندگی، صفحه ۶۴۷-۶۱۷.
- ۳- سرکشیک خبازی، مهدی (۱۳۸۰): بررسی لیستریا منوسایتوژنز در ماهیان پرورشی تازه، دودی شده و یخهای مورد استفاده جهت سرد نگه داشتن ماهیان تازه در استانهای تهران و گیلان، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
- ۴- مرتضوی، علی و همکاران (۱۳۷۶): میکروبیولوژی غذایی مدرن، تالیف جیمز ام. جی، جلد دوم، انتشارات دانشگاه مشهد، صفحه ۴۳۵-۳۸۹.

آن باشد که در زمستان، دامها بیشتر با غذای سیلو شده تغذیه می‌شوند و نیز آبستنی دام زمینه را برای ابتلا مستعد می‌نماید. منبع اصلی لیستریا منوسایتوژنز در شیر، آلودگی شیر با مدفوع می‌باشد (۳).

در مطالعه‌ای، از ۴۰۴ نمونه شیر خام گرفته شده، ۵۱ مورد (۱۲/۶ درصد) لیستریا منوسایتوژنز جدا کرد (۱۲) و محققین از ۳۷۴۶ نمونه از هفت نوع غذا در چین از سال ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۷ از نمونه های شیر پاستوریزه، ۰/۵۲ درصد و در شیر خام ۰/۷۲ درصد لیستریا جدا کرده است (۱۱). دانشمندان در مناطق مختلف آنکارا در ترکیه، ۲۱۱ نمونه شیر خام جمع‌آوری کرده‌اند که پس از جستجو تعداد ۲ باکتری لیستریا (۰/۹۴ درصد) را یافتند (۱۳).

در استان کردستان تاکنون هیچگونه بررسی در مورد بررسی وضعیت لیستریا منوسایتوژنز در شیر پاستوریزه و شیر خام صورت نگرفته است. و در این تحقیق که از تیرماه ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۶ بر روی بررسی وجودی عدم وجود باکتری لیستریا منوسایتوژنز در شیر خام و پاستوریزه استان کردستان صورت گرفت، از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه، ۶ درصد باکتری لیستریا منوسایتوژنز در شیر خام و ۱ درصد در شیر پاستوریزه جدا شد.

گرچه نتایج این تحقیق با نتایج محققین دیگر در داخل و خارج از کشور همخوانی دارد ولی عواملی از جمله تعداد گاوداریهای صنعتی در سطح استان وبالطبع استفاده از سیلو که بعنوان یکی از غذاهای اصلی دامداری محسوب می‌شود را می‌توان در میزان آلودگی موثر دانست. لازم به ذکر است که سیلو در صورتی که خوب تخمیر نشود و pH بالاتر از ۵ را داشته باشد خود به عنوان یکی از منابع بالقوه عفونت محسوب می‌شود. در مورد آلودگی شیر پاستوریزه نظرات مختلفی وجود دارد برخی آلودگی را به پروسه پاستوریزاسیون و برخی به مراحل پس از پاستوریزاسیون نسبت می‌دهند (۶). که این خود نیازمند تحقیق دیگری است. وجود

- 5- Addas B. M. & Jan M.S. (2002): Cerebellar abscess due to *Listeria Monocytogenes*. Saudi med j .feb: 23(2): 226-8.
- 6- Blood, D.C (2000): Veterinary medicine , 9 th edition . PP: 660-665.
- 7- Cother P.D. & Reilly K.(2001): Role of the glutamatedecarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria Monocytogenes* LO28 in low pH foods , j food prot , sep ; 64(9) : 1362-8.
- 8- De Buyser M.L. & Duffer B. (2001) : Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and in different industrialise countries , Int j food microbial. Jul20 ; 67(1-2) : 1-17.
- 9- Desmasures N .and Bazin F. (2005): Microbiological composition of raw milk from
- 10- jayarao B.M & henning D.R. (2006): Prevalence of food-borne pathogens in bulk tank milk , j Dairy sci, oct : 84(10) : 2157-62 .
- 11- Mansfield,B.E., Freitag, N.E. (2003): *Listeria monocytogenes* pathogenesis: Exploration of alternative hosts. Abstracts of the general meeting of the American society for microbiology 103: B-186.
- 12- Nightingale, K.K., etal.(2004): Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment, American society for microbiology, 2004 Aug : 4458-4467.
- 13- Uraz,G. and Yucel , N. (1999): The isolation certain pathogen microorganism from caw milk , cent Eur public health , Aug ; 1(3) : 145-8.