تشخیص و تعیین فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های مواد غذایی با بررسی مولکولی ژن *hlyA*

سوسن اشرفی[a]، نسرین بهمنی[b]، فاطمه کشاورزی [c]*

[a] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
[b] استادیار مرکز تحقیقات زئونوز، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
[c] دانشیار گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.4.5.9 DOI: 10.30495/jftn.2023.72669.11245

چکیده

مقدمه: لیستریولیزین(LLO) isteriolysin O o یک همولیزین فعال شده با سولفیدریل متصل به کلسترول است که توسط ژن *hlyA* *لیستریا مونوسیتوژنز* کدگذاری می‌شود هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های مواد غذایی با بررسی مولکولی ژن *hlyA* است.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی- توصیفی است. نمونه‌گیری از اواسط مهر ماه ۱۳۹۸تا پایان دی ماه همان سال به طول انجامید. صدو شصد و پنج نمونه انواع مختلف گوشت، سبزیجات، همبرگر و میگو مورد بررسی قرار گرفت. جمع‌آوری نمونه‌ها به صورت تصادفی از رستوران‌ها، اغذیه فروشی‌ها، مکان‌های تهیه غذای آماده و سوپر مارکت‌های مختلف انجام شد. کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده، با آزمایشات فنوتیپیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های مشکوک به *لیستریا مونوسیتوژنز* پس از استخراج DNA با روش جوشاندن با پرایمرهای احتصاصی برای ژن *hlyA* ارزیابی شد.

یافته‌ها: بررسی‌های فنوتیپیک (کشت میکروبی و بررسی بیوشیمیایی) ۱۸ نمونه آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* را تایید کرد، از این تعداد بطریق PCR ژن *hlyA* ۱۰(۶/۰۶٪) نمونه *لیستریامونوسیتوز* مثبت بود. شیوع آلودگی در کباب کوبیده ۹/۳۷ ٪، انواع گوشت مرغ ۴/۴۴ ٪، همبرگر محلی ۱۶/۶۶ ٪ و کاهو ۱۳/۳۳ ٪ بود. این یافته‌ها در مقایسه با دیگر مطالعات در برخی مواد غذایی (همبرگر محلی) شیوع بیشتری داشت و در بعضی مواد غذایی (گوشت مرغ) کمتر بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از روش بیوشیمیایی در تعیین فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های مواد غذایی در شهرستان سنندج از درصد بالای مثبت کاذب برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: ژن *hly A*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، مواد غذایی

* نویسنده مسئول مکاتبات email: F.keshavarzi@iausdj.ac.ir

مقدمه

لیستریا[1] یک باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی- بی هوازی اختیاری است که به صورت داخل سلولی قادر به رشد است. این جنس شامل شش گونه زیر است :*لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، *لیستریا ولشیمیری* (*Listeria welshimeri*)، *لیستریا ایوانووی* (*Listeria ivanovii*)، *لیستریا گرایی* (*Listeria grayi*)، *لیستریا اینوکوآ* (*Listeria innocua*) و *لیستریا سیلگری* (*Listeria seeligeri*). اگرچه تنها *لیستریا مونوسیتوژنز* پاتوژن عمده انسان است، ولی وجود بیماریهای ناشی از *لیستریا ایوانووی*، *لیستریا سیلگری* و *لیستریا اینوکوآ* به صورت نادر گزارش شده است (Perrin *et al*., 2007). *لیستریا مونوسیتوژنز* عامل بیماری لیستریوز[2] است. این بیماری می‌تواند در افراد مسن و نوزادان و کسانی که به هر دلیلی دستگاه ایمنی ضعیفی دارند خطر ناک باشد. جایگاه اولیه *لیستریا مونوسیتوژنز* غالباً محیط می‌باشد و این باکتری در خاک، گیاهان در حال فساد، فاضلاب و آب وجود دارد. این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب است که معمولاً از طریق غذاهای از قبل آماده و فرآورده‌های لبنی و گوشت و برخی سبزیجات آلوده به انسان منتقل می‌شود. به دلیل مقاومت بالای این باکتری نسبت به شرایط محیطی سخت از جمله غلظت بالای کلرید سدیم و pH اسیدی و همچنین تحمل دمای 1 درجه سلسیوس به عنوان یکی از باکتری‌های مهم منتقل شونده از مواد غذایی و همچنین یک نگرانی عمده در بهداشت عمومی و صنعت غذایی در نظر گرفته می‌شود(Liu *et al*., 2006; Carpentier *et al*., 2011). چندین مورد از همه‌گیری لیستریوزیس در رابطه با مصرف مواد غذایی به ویژه محصولات غذایی از قبل آماده از قبیل پنیر نرم، کشک، عصاره مرغ، گوشت‌های منجمد و غیره در کشورهای صنعتی گزارش شده است (Liu *et al*., 2006; Carpentier *et al*., 2011).

اینترنالین‌های B و A از ساختارهای سطحی مهم در *لیستریا مونوسیتوژنز* محسوب می‌شوند که در ورود ارگانیسم به سلول‌های میزبان، برقراری عفونت و در نتیجه بیماریزایی آن در افرادِ در معرض خطر نقش بسزایی دارند (Orndorff *et al*., 2006; Bierne *et al*., 2007; Almeida *et al*., 2000). مطالعاتی در مورد مکانیسم پروتئین‌های موثر در عفونت درون سلولی *لیستریا* انجام شده است. از جمله این پروتئین‌ها InlA, PlcA, PlcB, InlB لیستریولیزین O و ActA می باشد. این پروتئین‌های بیماری زا، تحت کنترل تنظیم کننده رونویسی prf A هستند، که تنظیم کننده prf A خود متعلق به خانواده Crp/Fnr می‌باشد و هم فعال کننده رونویسی و هم خود تنظیم شونده است (Kaur *et al*., 2018; Freitag *et al*., 1993).

محققین برای تشخیص حضور *لیستریا مونوسیتوژنز* بیماری زا و مهاجم در شیر خام، گوشت خردشده و محصولات لبنی از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مختلفی از قبیل: *actA, hly, iap, inlA, inlB, plcA plcB* و *prfA* استفاده نموده‌اند (Rawool *et al*., 2007). به دلیل اینکه این ژن‌ها اختصاصی گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده و سایر گونه‌های *لیستریا* و دیگر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فاقد آن می‌باشند، لذا شناسایی این ارگانیسم از طریق تکنیک PCR بر مبنای وجود این ژن، امکان پذیر است (Liu *et al*., 2006).

مصرف مواد غذایی با منشا دامی از جمله شیر، گوشت قرمز، تخم مرغ، ماهی و گوشت سفید به شکل خام یا نیم پز، مهمترین عامل بروز لیستریوزیس تک‌گیر و حتی اپیدمی‌های لیستریوزیس در بین جوامع است. با توجه به دامنه بیماریزایی و افزایش شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* و فزایش افراد در معرض خطر در جامعه، امروزه نیاز اساسی به روش تشخیصی سریع به‌جای روش‌های سنتی میکروبشناسی به منظور ارزیابی نمونه‌های غذایی مختلف است. هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های مواد غذایی با بررسی مولکولی ژن *hlyA* در شهر سنندج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

صد و شصت و پنج نمونه انواع مختلف گوشت (کباب کوبیده خام و پخته)، گوشت مرغ (جوجه کباب، مرغ گریل شده، خوراک مرغ و ساندویچ مرغ)، سبزیجات (کاهو، تره، گشنیز، جعفری و...)، انواع مختلف همبرگر محلی و یا تولید

[1] Listeria Listerius

[2] Listerius

کارخانه‌ای، ناگت مرغ و ناگت میگو به صورت تصادفی از رستوران‌ها، اغذیه فروشی‌ها، مکان‌های تهیه غذای آماده و سوپر مارکت‌های مختلف در سطح شهر سنندج جمع آوری شد. نمونه گیری از اواسط مهر ماه ۱۳۹۸ تا پایان دی ماه ۱۳۹۸ به طول انجامید. جهت برآورد حداقل حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت ($n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}} P(1-P)}{d^2}$ با d=0.6, Z= 1.96, P=0.5) استفاده شد.

- **کشت نمونه‌ها، انجام رنگ آمیزی**

در مرحله اول ۲۵ گرم از هر نمونه ماده غذایی به محیط BHI (Brain Heart Infusion) broth (Thermo Scientific™, US) که در ارلن‌های درب سنباده‌ای که به حجم۲۲۵ ml تهیه شده بود، انتقال داده شد. بعد از بستن درب ارلن‌ها روی شیکر گذاشته شد تا نمونه‌ها کاملا میکس و یکنواخت شود. در ادامه ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در ادامه ۰/۱ از محیط مذکور به ۰/۹۹ لیتر آبگوشت غنی کننده لیستریا (Himedia, India (Listeria Enrichment Broth Base اضافه شد و برای ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت ۰/۱سی سی آبگوشت غنی کننده به صورت کشت خطی در سطح محیط کشت انتخابی *لیستریا*-PALCAM-Listeria Selective-Agar Base (Thermo Scientific™, US (به همراه مکمل انتخابی (BIOMARK، Listeria Selective Supplement) *لیستریا* کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت۲۴ ساعت در گرم خانه۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای خالص سازی کلنی‌ها در محیط کشت، تک کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت، برای بار دوم در محیط بلاد آگار تهیه شده با خون گوسفندی از شرکت داروا‌ش کشت داده شدند. از کلنی هایی که روی محیط بلاد آگار همولیز بتا دادند، لام تهیه و روی آن رنگ آمیزی گرم انجام شد و با عدسی ۱۰۰ روغنی بررسی گردید (Kaur *et al.*, 2018).

- **تست‌های افتراقی**

پرگنه‌های مشکوک به *لیستریا* پس از رنگ آمیزی گرم جهت تائید و تشخیص گونه با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند. در خصوص آلودگی مواد غذایی مورد بررسی به *لیستریا مونوسیتوژن* به روش بیوشیمیایی بسته به جامد یا مایع بودن نمونه، ۲۵ میلی لیتر یا ۲۵ گرم از نمونه‌های جمع آوری شده مجددا به ۲۲۵ میلی لیتر محیط‌کشت BHI اضافه شد و پس از یکنواخت کردن در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. سپس، ۰/۱ از محیط مذکور به ۹/۹ لیترآبگوشت غنی کننده *لیستریا* اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری شد. از جمله تست‌های بیوشیمیایی که روی نمونه‌های رشد یافته روی محیط کشت انجام شد، تست حرکت در ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد، تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، رامنوز، احیاءاسکولین، احیاء نیترات، تست همولیز بتا و آزمایش CAMP بود. همچنین اگر کوکوباسیل گرم مثبت بود و روی محیط لیستریا سلکتیو آگار کلنی سیاه رنگ تولید کرده بود، تست کاتالاز هم روی آن‌ها انجام شد. گونه‌های *لیستریا* کاتالاز مثبت می‌باشند. بدین ترتیب باکتری‌ها با روش غنی‌سازی در سرما طی مدت زمان نسبتاً طولانی حدود ۶ ماه جدا شدند.

- **ذخیره سازی نمونه‌های مثبت ایزوله شده**

پس از تایید *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط تست‌های افتراقی، یک لوپ پر از کلونی‌های جوان و خالص از محیط کشت۲۴ ساعته باکتری در ۲ سی سی محیط(37g/l) BHI مایع وارد شد و بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه این محیط مایع بمدت ۷ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوب بدست آمده در محیط نوترینت براث (8g/l) (بمیزان ۸۰٪) +گلیسرین (بمیزان ۲۰٪) مخلوط شد و داخل کرایوتیوب‌های استریل ریخته شد و تمامی نمونه‌ها با برچسب و ذکر مشخصات، پس از چند بار اینورت کردن، مستقیما در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این میکروتیوب‌ها تا زمان استخراج DNA نمونه‌ها در این دما نگهداری شدند.

- **بررسی ژنوتیپی ایزوله‌ها بروش PCR**

نمونه‌ها از فریز خارج شده و بر روی یک محیط غنی کننده به نام بلاد آگار کشت داده شدند و از کشت تازه جهت استخراج DNA به روش جوشاندن استفاده شد. در اینجا از کنترل مثبت *listeria* IBRC-M 10671

monocytogenes که از انجمن ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شده بود، استفاده شد. نمونه‌های مشکوک برای *لیستریا مونوسیتوژنز* پس از استخراج DNA با روش جوشاندن و تایید آن به روش کمی با خواندن OD آن با دستگاه اسپکتروفتومترو تایید کیفی آن با ژل الکتروفورز، DNAهای جدا شده به وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی درج شده در جدول ۱برای ژن ***hlyA***، که قبلا توسط چوی و هونگ برای ردیابی اختصاصی *لیستریامونوسیتوژنز* (Choi & Hong, 2003) به ثبت رسیده است، مورد آزمون قرار گرفتند.

واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۵ میکرولیتر(۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر Dntp ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Tag پلی‌مراز، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام شد. دماهای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۲ درج شده است. در پایان، محصولات PCR روی ژل آگاروز (سیناژن، ایران) ۱/۵ درصد با استفاده از نشانگر ۱۰۰ جفت بازی پلاس (سیناکلون) الکتروفورز شد.

دمای اتصال در ابتدا برای setup نمونه از دمای ۵۴، ۵۶، ۵۸، ۶۰ استفاده شد و در نهایت دمای مناسب ۵۸ درجه سانتی‌گراد بود.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

داده‌ها وارد نرم‌افزار spss v.23 شد. با استفاده از فرمول‌های آمار توصیفی مانند میانگین، انحراف معیار و درصد فراوانی، داده‌ها تحلیل شدند. با استفاده از نرم افزار اکسل نمودارهای مورد نیاز رسم گردید.

یافته‌ها

از کل ۱۶۵ نمونه مواد غذایی مورد بررسی؛ ۳۲ نمونه کباب کوبیده، ۴۵ مورد انواع مرغ شامل: جوجه کباب، مرغ گریل شده، خوراک مرغ و ساندویچ مرغ، ۱۸ نمونه همبرگر محلی، ۱۵ نمونه کاهو، ۱۰ نمونه کباب کوبیده به صورت خام، ۸ مورد همبرگر صنعتی (کارخانه‌ای)، ۸ مورد کباب مخصوص محلی، ۵ مورد کباب مخصوص صنعتی، ۸ مورد انواع سبزی (شامل تره، گشنیز و.....)، ۵ مورد ماهی پخته و کبابی، ۶ مورد ناگت میگو و ۵ مورد ناگت مرغ بود. از این تعداد نمونه غذایی بطریق فنوتیپیک یعنی کشت میکروبی و آزمایشات بیوشیمیایی، ۱۸(۱۰/۹۰٪) نمونه *لیستریامونوسیتوز* مثبت جدا شد که به تفکیک شامل؛ انواع سبزی ۳ مورد، کباب کوبیده ۳ مورد، کوبیده خام ۲ مورد، انواع گوشت مرغ ۲ مورد، همبرگر محلی ۳ مورد، کاهو ۳ مورد، ناگت مرغ ۱ مورد و همبرگر صنعتی ۱ مورد را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

بطریق PCR ژن ***hlyA*** از کل نمونه‌ها ۱۰(۶/۰۶٪) نمونه لیستریامونوسیتوز مثبت(شکل ۱) بودند، که به تفکیک شامل کباب کوبیده ۳ مورد، انواع گوشت مرغ ۲ مورد، همبرگر محلی ۳ مورد و کاهو ۲ مورد را به خود اختصاص دادند که در بین مواد غذایی آلوده از حداقل ۴/۴۴ ٪(انواع گوشت مرغ) تا حداکثر ۱۶/۶۶ ٪ (همبرگر محلی) را به خود اختصاص داد. سایر مواد غذایی مورد بررسی فاقد آلودگی بودند. در این خصوص کباب کوبیده خام، همبرگر صنعتی، انواع سبزی و ناگت مرغ که به روش بیوشیمیایی دارای آلودگی بودند که با روش PCR آلودگی آنها تایید نگردید (جدول ۴). در نمودارهای شکل ۲ مقایسه‌ای مابین توزیع فراوانی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در مواد غذایی مورد بررسی به دو روش فنوتیپیک و ژنوتیپیک دیده می‌شود.

بحث

لیستریوز یک عفونت غذایی است که توسط *لیستریا مونوسیتوژنس* ایجاد می‌شود و از خطرناکترین زئونوزهای موجود در مواد غذایی با نرخ مرگ و میر تا حد۲۰ –۳۰٪ می‌باشد (Montero *et al*., 2015). اگرچه این بیماری نسبتاً نادر است، بر اساس گزارش اتحادیه اروپا در سال ۲۰۱۵ نرخ شیوع ۰/۴۶ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر بوده که بیشتر عفونت‌ها نیازمند بستری در بیمارستان (۹۷/۴ درصد) بودند. بر اساس همین گزارش در سال ۲۰۱۵، ۲۲۰۶ مورد لیستریوز در انسان گزارش شده که ۲۷۰ مورد منجر به فوت شده است. در لهستان در سال ۲۰۱۵، با نرخ اطلاع‌رسانی ۰/۱۸، ۷۰ نفر از عفونت *لیستریا مونوسیتوژنز* رنج بردند. در طول سال‌های ۲۰۱۲–۲۰۱۵ روند افزایشی قابل توجهی در کشورهای عضو اتحادیه اروپا مشاهده شد، یعنی تعداد مبتلایان از ۱،۵۱۶ مورد در سال ۲۰۱۱ به ۲،۲۴۲ مورد در سال ۲۰۱۴ رسید (EFSA, 2015).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای به کار رفته برای جستجوی اختصاصی *لیستریا مونوسیتوژنز*

Table 1- Characteristics of primers used for *Listeria monocytogenes* specific search

Bacteria	Reference	Primers Sequence	Primers name	Target Gene	Product Size
Listeria monocytogenes	Choi & Hong, 2003	F: 5`-GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA-3` R: 5`- CGCCACACTTGAGATAT- 3`	Prs01 Prs02	(*hlyA*)	370 bp

جدول ۲- برنامه دمایی دستگاه سیکلوترون

Table 2- Temperature Schedule of the Cyclotron

Cycling condition					
genes	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
hlyA	94°C 5 Min	94°C 30 Sec	58°C 30 Sec	72°C 45 Sec	72°C 5 min
Repeated for 34 Cycles					

جدول ۳- توزیع فراوانی آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* در مواد غذایی مورد بررسی به روش بیوشیمیایی

Table 3- Frequency distribution of contamination with *Listeria monocytogenes* in foods investigated by biochemical method

Foodstuff	Chicken nugget	Shrimp nuggets	Fish	All kinds of vegetables	Special industrial barbecue	Special local barbecue	Industrial hamburger	Raw barbecue	Lettuce	Local hamburger	Types of chicken meat	kubideh barbecue
Total Frequency	5	6	5	8	5	8	8	10	15	18	45	32
The frequency of contamination	1	0	0	3	0	0	1	2	3	3	2	3
(%)	20.0	0.0	0.0	37.5	0.0	0.0	12.5	20.0	20.0	16.66	4.44	9.37

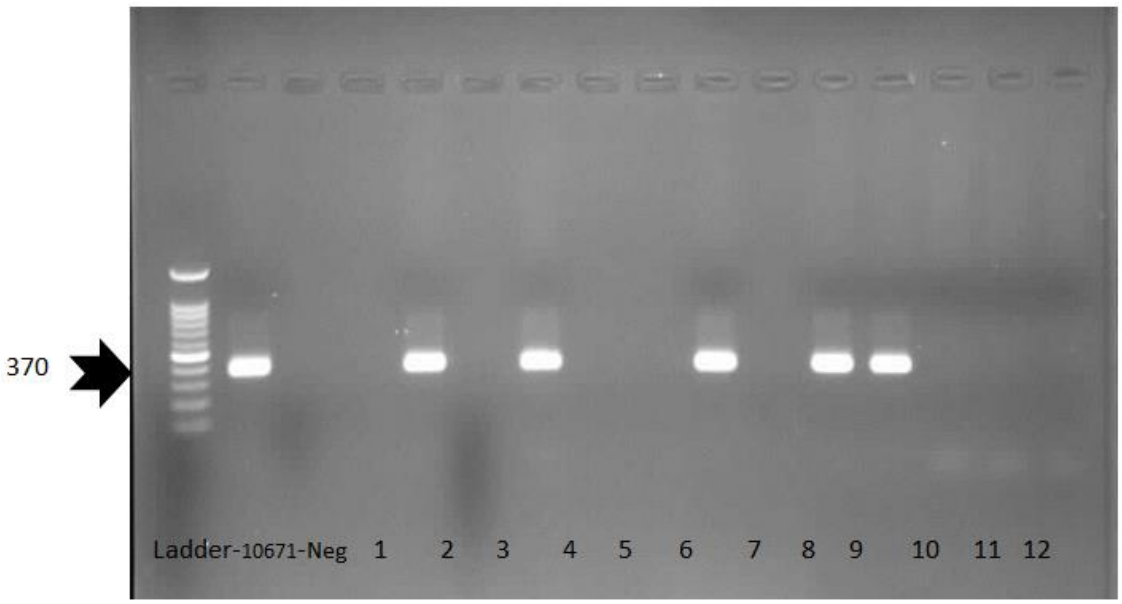

Figure 1- Electrophoresis image on 1.5% agarose gel of PCR product and amplification of 370 bp fragment of *hlyA* gene, that the samples were amplified in 370 bp against the positive control

شکل ۱- تصویر الکتروفورز بر روی ژل آکارز ۱,۵ درصد محصول PCR وتکثیرقطعه ۳۷۰ جفت باز از ژن *hlyA* که نمونه‌ها در مقابل کنترل مثبت در 370 bp تکثیرشده‌اند.

جدول٤- توزیع فراوانی آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* در مواد غذایی مورد بررسی به روش PCR

Table 4- Frequency distribution of *listeria monocytogenes* contamination in food products investigated by PCR method

Foodstuff	Chicken nugget	Shrimp nuggets	Fish	All kinds of vegetables	Special industrial barbecue	Special local barbecue	Industrial hamburger	Raw barbecue	Lettuce	Local hamburger	Types of chicken meat	kubideh barbecue
Total Frequency	5	6	5	8	5	8	8	10	15	18	45	32
The frequency of contamination	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	3
(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.33	16.66	4.44	9.37

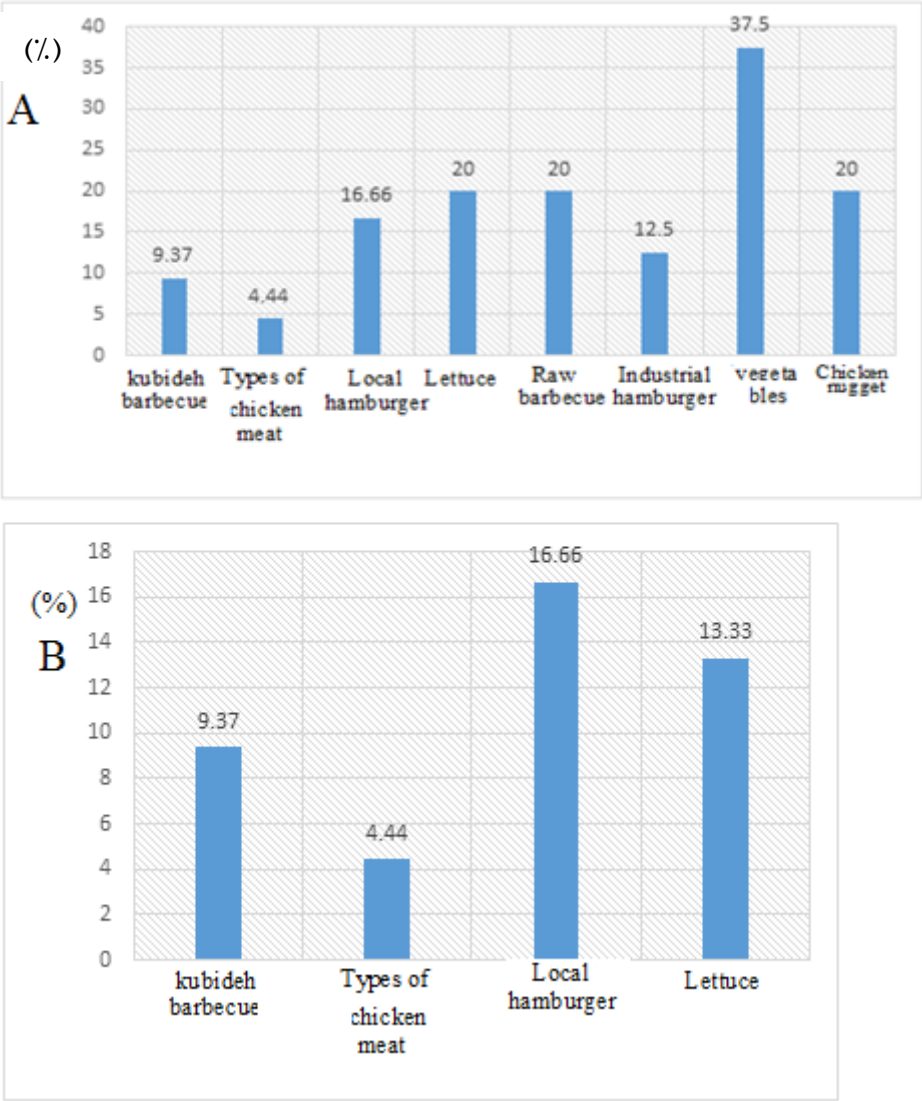

Figure 2- A. Distribution of the frequency of *Listeria monocytogenes* contamination in food products investigated by phenotypic method, B. Distribution of *Listeria monocytogenes* infection frequency in food products examined by PCR method

شکل ۲- الف. توزیع فراوانی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژن در مواد غذایی مورد بررسی به روش فنوتیپیک، ب. توزیع فراوانی آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز در مواد غذایی مورد بررسی به روش PCR

به دلیل اهمیت *لیستریا مونوسیتوژنس* مطالعات بسیاری از نظر آلودگی مواد غذایی به این باکتری در دنیا انجام شده است. در مطالعه‌ای که بر روی نمونه‌های پنیر انجام شده بود شیوع آن را بین صفر تا ۴/۸ ٪ گزارش نمودن (Esho *et al*., 2013)، اما برخی از مطالعات دیگر شیوع را بیش از ۴۰٪ گزارش نموده است (Loncarevic *et al*., 1995; Pintado *et al*., 2005). همچنین مشاهده شد که شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌تواند به میزان زیاد ۲۴/۴ ٪ در پنیر موزارلا مشاهده گردد (Greco *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر که به روش PCR برای ژن *hlyA* انجام شد، میزان آلودگی مواد غذایی مورد بررسی به *لیستریا منوسیتوژن* از ۱۶۵ نمونه ماده غذایی، ۱۰ مورد یا ۶/۰۶ ٪ بود. مواد غذایی آلوده به تفکیک شامل؛ ۳ مورد کباب کوبیده، انواع گوشت مرغ ۲ مورد، همبرگر محلی ۳ مورد و کاهو ۲ مورد، که رنج آلودگی از حداقل ۴/۴۴ ٪ (انواع گوشت مرغ) تا حداکثر ۱۶/۶۶ ٪ (همبرگر محلی) می‌باشد. در این خصوص چندین مطالعه نشان داده اند که انواع مختلف مواد غذایی آماده با منشاء حیوانات، وسیله‌ای برای انتقال *لیستریا منوسیتوژن* به مصرف کنندگان بودند (Hoelzer *et al*., 2012; Kačániová *et al*., 2015). براساس آخرین گزارش EFSA در سال ۲۰۱۵ در کشورهای عضو اتحادیه اروپا، میزان آلودگی محصولات گوشتی آماده ۳/۵ ٪ از ۲۸۴۷ واحد ماهی آزمایش شده و ۴٪ از ۲،۳۶۶ نمونه گوشت تست شده بود (EFSA J, 2016). مقایسه نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعات گذشته نشان داد درصدهای گزارش شده در مطالعات گذشته مشابه نتایج نمونه‌های انواع گوشت مرغ مورد بررسی در این مطالعه بود، البته بسیار کمتر از آلودگی همبرگرهای محلی است که ۱۶/۶۶ ٪ آلودگی را نشان داده اند. در مطالعه‌ای که توسط Kurpas و همکاران صورت گرفت از کل ۱۹۶۲ نمونه جمع آوری شده در مزارع (سواب رکتال و خوراک) و کشتارگاه‌ها (سواب لوزه‌ها، احشا و لاشه)، ۱۱۹ مورد (۶ ٪) از نظر *لیستریا مونوسیتوژنس* مثبت بودند. بیشترین شیوع این باکتری‌ها در لوزه‌ها (۲۴ ٪) و احشا (۵ ٪) حیوانات مشاهده شد، در حالیکه لاشه‌ها فقط ۱٪ آلوده بودند (Kurpas *et al*., 2018).

همچنین در مطالعه‌ای یافته‌ها نشان داد؛ که روش‌های مناسب در هنگام ذبح می‌تواند شیوع این باکتری‌ها را در محصول نهایی کاهش دهد. *لیستریا مونوسیتوژنزهای* جداسازی شده از گوشت چرخ کرده ی لاشه ی سالم، نشان می‌دهد که آلودگی گوشت پس از پردازش در اثر آلودگی متقاطع رخ داده است. این نتایج نشان می‌دهد که *لیستریا مونوسیتوژنز* پس از ذبح حیوانات به علت مخلوط کردن لاشه‌های آلوده و سالم انتقال یافته است (Hellström *et al*., 2010). در مطالعه دیگری مشاهده شد شیوع *لیستریا مونوسیتوژنس* در لاشه (۲/۴ ٪) و در روده‌ها (۹/۳ ٪) نسبت به گوشت بدست آمده از این حیوانات (۵۰/۲ ٪) بسیار کمتر بود. این مسئله نشان می‌دهد انتقال باکتری‌ها پس از کشتار محتمل‌تر است (Kanuganti *et al*., 2002). مزارع اولین مرحله از تولید مواد غذایی آماده[1] هستند. در این سطح، مهمترین جنبه تضمین وضعیت مناسب بهداشت دام است، که بستگی به مدیریت صحیح دامپزشکی و کیفیت خوراک دارد (Gamboa-Marín A. 2012) با این حال، Hellström و همکاران، نشان دادند که حضور *لیستریا مونوسیتوژنس* در خوک‌ها لزوماً به معنای آلودگی محصولات گوشتی با این باکتری‌ها نیست.

مطالعات شیوع آلودگی *لیستریا* در محصولات غذایی در ایران منجر به نتایج ناهماهنگی شده است. برای مثال جامی و همکاران نشان دادند آلودگی *لیستریا مونوسیتوژنز* در شیر خام ۳۷٪ است (Jami *et al*., 2010). با اینحال، مطالعات جلالی و همکاران نشان دهنده ی عدم آلودگی شیر خام با *لیستریا مونوسیتوژنز* بود (Jalali & Abedi, 2008). شهبازی و همکاران (۲۰۱۳) ۱۲/۸۵ ٪ نمونه‌های کره را آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* گزارش کردند (Shahbazi *et al*., 2013). با اینحال، در مطالعه دیگری آلودگی با *لیستریا مونوسیتوژنز* را در نمونه‌های کره مشاهده نکردند (Norowzi *et al*. 2013).

در یک مطالعه با ویژگی متاآنالیز در ایران محققین به نتایج زیر رسیدند؛ بالاترین شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب در غذاهای آماده (۹/۲٪)، غذاهای دریایی (۵/۱٪)، طیور (۵ ٪)، لبنیات سنتی (۴ ٪)، گوشت خام (۲/۶ ٪)،

[1] RTE (Ready to Eat)

لبنیات تجاری (۱/۴ ٪) و تخم مرغ (۰/۲ ٪) بود (Hamidiyan *et al*., 2018)، که با نتایج مطالعه حاضر تا حدود زیادی همخوانی دارد. همچنین در مطالعه‌ای در کشور اردن، شیوع آلودگی کلی *لیستریا* را در ۵۰ ٪ محصولات مرغ و *لیستریا مونوسیتوژنس* را در ۱۸/۲ ٪ مشاهده کردند (Osaili *et al*., 2011)، که با مطالعه حاضر (۴/۴۴ ٪) همخوانی ندارد. این در حالی است که در مطالعه‌ای در ترکیه با تشخیص ژن همولیزین (*hlyA*) شیوع کلی *لیستریا مونوسیتوژنس* در۲۱۰ نمونه‌های غذایی آماده ۸/۵٪ بود (Şanlıbaba *et al*., 2018) که در مقایسه با مطالعه حاضر که آلودگی همبرگر محلی ۱۶/۶۶ ٪ بود، خیلی کمتر می‌باشد.

مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف در رابطه با آلودگی مواد غذایی به *لیستریا مونوسیتوژنس* در مواردی مشابهت و در برخی مواد غذایی نتایج متفاوت هستند. بطوریکه در مطالعه‌ای در اسپانیا (Borović *et al*., 2014)، در محصولات گوشت پخته در ۳۱۱ نمونه ۰/۹۶ ٪، اما در محصولات گوشت مرطوب در ۱۱۱ نمونه، ۴/۵ ٪، آلوده بودند. در مطالعه دیگری در اسپانیا (Gómez *et al*., 2015) در محصولات گوشت پخته در ۳۵ نمونه ۵/۷۱ ٪ و در محصولات خام و مرطوب در ۵۷ نمونه ۵/۲۶ ٪ و در محصولات نیمه خشک در ۳۷ نمونه ۲/۷ ٪ آلوده گی مشاهده شد. در مطالعه‌ای در ایتالیا (Di Pinto *et al*., 2010) در ۱۱۲ نمونه سوسیس، آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنس* ۲۰/۵ ٪ بود، که نشان میدهد در کل عذاهای پخته آلودگی کمتری نسبت به مواد عذایی خام داشته‌اند.

در زمینه کاهش آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنس* مطالعات و استانداردهایی تصویب شده است. بطوریکه در اروپا استاندارد بیماری زای باکتری دوز عفونی در مورد لیستریوز بیشتر از 104 cfu / g و برای بیماران با ضعف سیستم ایمنی بدن حتی می‌تواند 100 cfu / g می‌باشد (Swaminathan *et al*., 2007).

در برخی مطالعات تاکید شده؛ در مناطق تولیدی، تدوین روش‌های مؤثر برای تمیز کردن و ضد عفونی سوله هایی که در آن ضد عفونی‌های روتین بی اثر است، لازم است (Gudbjörnsdóttir *et al*., 2004; Henriques *et al*., 2017).

برای انتخاب بهترین راه حل برای یک مرکز تولید خاص، لازم است از ضد عفونی کننده‌های مؤثر مانند محصولات قلیایی، اسید، الکل و مبتنی بر QAC (Quaternary ammonium chloride) و تعیین حداقل غلظت بازدارنده آنها (MIC) Minimum inhibitory concentration) یا حداقل تراکم باکتری (MBC) Minimum bactericidal concentration استفاده شود (Pan *et al*., 2006).

مطالعات نشان داده اند محصولات غذایی خرد شده در مغازه‌های خرده فروشی، معمولاً میزان بالاتری از آلودگی باکتریایی نسبت به محصولات تهیه شده در کارخانه‌های تولید غذاهای گوشتی دارند. علاوه بر این، عدم وجود ضد عفونی کننده‌های مناسب و شستشوی نادرست پلی اتیلن و تخته‌های برش چوبی ممکن است به ماندگاری *لیستریا مونوسیتوژنس* و آلودگی متقابل سایر محصولات غذایی منجر شود (Chaitiemwong *et al*., 2014). در مطالعات انجام شده در ایران جلالی و عابدی از شهر اصفهان گزارش کردند از مجموع ۶۱۷ نمونه ی اخذ شده از مواد غذایی مختلف ۴/۶ درصد از آن‌ها دارای *لیستریا* بودند، که در۱/۲ درصد از آن‌ها *لیستریا مونوسیتوژنز* یافت شد. میزان آلودگی درگوشت، لبنیات، سبزیجات و غذاهای آماده به ترتیب ۶/۷، ۱/۳، ۱/۲ و ۱۲ درصد تعیین شد (Jalali & Abedi, 2008).

همچنین در مطالعه ی دیگری میزان آلودگی ماهی تازه به *لیستریا مونوسیتوژنز* ۲/۶ درصد گزارش شده است (Akhondzadeh & Basti, 2006)، در حالیکه این مطالعه ماهی‌های مورد بررسی فاقد آلودگی بودند. در مطالعه بهاروند بر روی ۲۱۲ نمونه غذایی مختلف جمع آوری شده از شهرهای مختلف با روش غنی سازی در سرما و جداسازی بابررسی حضور ژن *prf A* *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۴۱ مورد *لیستریا* مثبت گزارش شد که ۲۲ نمونه آن *لیستریا مونوسیتوژنز* بود و ژن*prf A* در هر ۲۲ نمونه مثبت بود (Baharvand R. 2015). در مطالعه‌ای بر روی غذاهای آماده مصرف (سالاد الویه،سالاد ماکارونی،سالاد فصل و..) گزارش شد که آلودگی این مواد غذایی به عواملی مانند *لیستریا* به خصوص *لیستریا مونوسیتوژنز*خطر بالقوه‌ای را برای مصرف کننده به همراه داشته است (Rahimi & Shakarian, 2014).

در مطالعه‌ای بر روی جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از محصولات گوشتی با بررسی ژن*prfA* مشاهده شد در ۶۰ نمونه گوشت، مرغ، ژامبون و کوکتل، ۴ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* (۶٫۶ درصد) و۳ مورد *لیستریا اینوکوآ* (۵ درصد) یک مورد *لیستریا ولشیمیری* (۱٫۶ درصد) شناسایی شد (Norowzi *et al*., 2013). در مقایسه این یافته‌ها با نتایج مطالعه انجام شده به نظر می‌رسد میزان شیوع *لیستریا مونوسیتوز* در مواد غذایی مورد بررسی در مطالعه حاضر بیشتر بوده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها از سویی نشان داد روش بیوشیمیایی در تشخیص *لیستریا مونوسیتوز* از درصد بالای مثبت کاذب برخوردار است. از طرف دیگر نتایج اخیر حاکی از آلودگی بالای همبرگرهای محلی (۱۶/۶۶ ٪)، کاهو (۱۳/۳۳ ٪)، کباب کوبیده (۹/۳۷ ٪) و کمترین میزان مربوط به انواع گوشت مرغ با ۴/۴۴ ٪ بود. هرچند دیگر مواد غذایی مورد بررسی مانند: همبرگر صنعتی، کباب مخصوص محلی، انواع سبزی، ماهی پخته و ناگت مرغ و میگو فاقد آلودگی بودند (با روش PCR).

منابع

Almeida, P.F. & Almeida, R.C.C. (2000). A PCR protocol using inl gene as a target for specific detection of Listeria monocytogenes. Food Control, 11(2), 97-10. https://doi.org/10.1016/s0956-7135(99)00067-5

Anon. (2016). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal, 14. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634

Akhondzadeh Basati, A., Misaghi, A., Salehi Zahraei, T. & Kamkar, A. (2006). Bacterial pathogens in fresh smoked and salted Irainian fish. Food Control, 17(3), 183-188. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.001

Baharvand, R. (2015). A gene in Listeria monocytogenes isolated from food. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences, 19 (1), 24-31. [In Persian]

Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N. & Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-richrepeat-containing proteins in Listeria monocytogenes. Microbes and Infection, 9, 1156-66. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.003

Borović, B.B., Baltić, T., Lakićević, B., Janković, V., Mitrović, R. Jovanović, J. & Lilić S. (2014). Prevalence of Listeria monocytogenes in ready–to–eat food of animal origin. Meat Technology, 55, 117–122. https://doi.org/10.5937/tehmesa1402117b

Carpentier, B. & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. International Journal of Food Microbiology, 145, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005

Chaitiemwong, N., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R. & Zwietering, M.H. (2014). Quantification of transfer of Listeria monocytogenes between cooked ham and slicing machine surface. Food Control, 44, 177–184. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.056

Choi, W.S. & Hong, C. (2003). Rapid enumeration of Listeria monocytogenes in milk using competitive PCR. International Journal of Food Microbiology, 84, 79– 85. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00401-4

Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E. & Tantillo G. (2010). Occurrence of Listeria monocytogenes in ready to eat foods from supermarkets in southern Italy. New Microbiology, 33, 249–252.

Esho, F. K., Enkhtuya, B., Kusumoto, A. & Kawamoto, K. (2013). Microbial Assessment and Prevalence of Foodborne Pathogens in Natural Cheeses in Japan. BioMed Research International, 20580, 1–6. https://doi.org/10.1155/2013/205801

Freitag, N.E., Rong, L. & Portnoy, D.A. (1993). Regulation of the prfA transcriptional activator of Listeria monocytogenes: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. Infect Immune, 61 (6), 2537. https://doi.org/10.1128/iai.61.6.2537-2544.1993

Gamboa-Marín A., Buitrago S.M., Pérez-Pérez K., Mercado M.R., Poutou-Piñales R. & Carrascal-Camacho A. (2012). Prevalence of Listeria monocytogenes in pork-meat and other

processed products from the Colombian swine industry. Rev MVZ Cordoba, 17, 2827–2833. https://doi.org/10.21897/rmvz.250

Greco, S., Tolli, R., Bossù, T., Flores Rodas, E. M., Di Giamberardino, F., Di Sirio, A., Vita, S., De 633 Angelis, V., Bilei, S., Sonnessa, M., Gattuso, A. & Lanni, L. (2014). Case of contamination 634 by Listeria monocytogenes in mozzarella cheese. Italian Journal of Food Safety, 3(1), 51-53.22. https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1708

Gómez, D., Pilar Iguácel, L., Rota, C., Carramiñana, J.J., Ariño, A. & Yangüela, J. (2015). Occurrence of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. Foods, 4, 271–282. https://doi.org/10.3390/foods4030271

Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., Niclasen, O. & Bredholt, S. (2004). The incidence of Listeria monocytogenes in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. Food Microbial, 21, 217–222. https://doi.org/10.1016/s0740-0020(03)00012-1

Hamidiyan, N., Salehi-Abargouei, A., Rezaei, Z., Dehghani-Tafti, R. & Akrami-Mohajeri, F. (2018). The prevalence of Listeria spp. Food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis. Food Research International, 107, 437-50. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.038

Hellström, S., Laukkanen, R., Siekkinen, K.M., Jukka, R., Maijala, R. & Korkeala, H. (2010). Listeria monocytogenes contamination in pork can originate from farms. Journal of Food Protection, 73, 641–648. https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.4.641

Hoelzer, K., Pouillot, R., Gallagher, D., Silverman, M.B., Kause, J. & Dennis, S. (2012). Estimation of Listeria monocytogenes transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. International Journal of Food Microbiology, 157(2), 267-77. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.019

Henriques, A.R., Gama, L.T. & Fraqueza, M.J. (2017). Tracking Listeria monocytogenes contamination and virulence associated characteristic in the ready-to-eat meat-based food products industry according to hygiene level. International Journal of Food Microbiology, 242, 101–106. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.020

Jalali, M. & Abedi, D. (2008). Prevalence of Listeria speices in food products in Isfahan Iran. Int J Food Microbiol, 122(3), 336-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.082

Jami, S., Jamshidi, A. & Khanzadi, S. (2010). The presence of Listeria monocytogenes in raw milk samples in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 11(4), 363-367. 10.22099/IJVR.2010.108

Kaur, S., Singh, R., Sran, M.K. & Gill, JP. (2018). Molecular characterization of Listeria monocytogenes in white meat samples from Punjab, India. Indian Journal of Animal Research, 52(11), 1635-41. https://doi.org/10.18805/ijar.b-3414

Kačániová, M., Kluz, M., Petrová, J., Mellen, M. & Kunová, S. (2015). Incidence of Listeria monocytogenes in meat product samples by real time PCR. Modern Chemistry & Applications, 3, 1–5. https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000155

Kurpas, M., Wieczorek, K. & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as a source of Listeria monocytogenes. Journal of Veterinary Research, 62(1), 49-55. https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0007

Kanuganti, S.R., Wesley, I.V., Reddy, P.G., McKean, J. & Hurd, H.S. (2002). Detection Listeria monocytogenes in pigs and pork. Journal of Food Protection, 65, 1470–1474. https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.9.1470

Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology, 55(6), 645-59. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46495-0

Montero, D., Bodero, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R.M. &Vidal, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. Front Microbiology, 6, 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00384

Norowzi, J., Moradi, B. & Shafiee, M. (2013). Detection of actA gene in Listeria monocytogenes isolated from dairy products. Journal of Microbial World, 6(3), 246-252. [In Persian]

Rahimi, E. & Shakarian, A. (2014). Prevalence of Listeria species in ready-to-eat foods in Shahrekord restaurants. Journal of Laboratory Sciences, 2, 87-83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4_16

Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Barbuddhe, S.B., Shakuntala, I. & Aurora, R. (2007). Multiplex PCR for Detection of Virulence Associated Genes in Listeria monocytogenes. Internet Journalof Food Safety, 9, 56-62. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.029

Şanlıbaba, P., Tezel, B.U. & Çakmak, GA. (2018). Prevalence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes isolated from ready-to-eat foods in Turkey. Journal of Food Quality, 7693782. https://doi.org/10.1155/2018/7693782

Shahbazi, A. M., Rashedi, M. & Sohrabi, R. (2013). Comparative contamination of Listeria monocytogenes in traditional dairy products in Esfahan Province, Iran. African Journal of Microbiology Research, 7(16), 1522-1526. https://doi.org/10.5897/ajmr12.1290

Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect, 9, 1236–1243. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011

Osaili, T., Alaboudi, A. & Nesiar, E. (2011). Prevalence of Listeria spp. and antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. Food Control, 22(3), 586-590. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.008

Orndorff, P.E., Hamrick, T.S., Smoak, I.W. & Havell, E.A. (2006). Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Veterinary Microbiology, 16, 114(1-2), 1-5. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.003

Pintado, C. M. B., Oliveira, A., Pampulha, M. E. & Ferreira, M. A. S. (2005). Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes isolated from soft cheese. Food Microbiology, 22(1), 79–85. https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.004

Pan, Y., Breidt, F. Jr. & Kathariou S. (2006). Resistance of Listeria monocytogenes biofilms to sanitizing agents in simulated food processing environment. Applied and Environmental Microbiology, 72, 7711–7717. https://doi.org/10.1128/aem.01065-06

Perrin, M., Bremer, M. & Delamare, C. (2007). Fatal microbiological methods, 71(2), 13.

Food Technology & Nutrition / Fall 2023 / Vol. 20 / No. 4

Detection and Determination of the Frequency of *Listeria monocytogenes* in Food samples by Molecular Analysis of the *hlyA* gene

S. Ashrafi [a], N. Bahmani [b], F. Keshavarzi [c*]

[a] MSc Graduated of Microbiology, Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

[b] Assistant Professor of the Zoonoses Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Received: 10 April 2023 Accepted: 8 July 2023

Abstract

Introduction: Listeriolysin (LLO) is a sulfhydryl-activated hemolysin bound to cholesterol, that is encoded by the *hlyA* gene of *Listeria monocytogenes*. The aim of this study was to detect and determine the frequency of *Listeria monocytogenes* in food samples through molecular analysis of the *hlyA* gene.

Materials and Methods: The present study was a descriptive cross-sectional assay conducted from the middle of October 2018 to the end of January of the same year. One hundred sixty-five samples of different types of meat, vegetables, hamburgers and shrimps were examined. Samples were randomly collected from restaurants, delicatessens, prepared food places, and different supermarkets. All samples were analyzed with phenotypic and biochemical tests. The samples suspected of *Listeria monocytogenes*, after DNA extraction, were evaluated by PCR with specific primers for the *hlyA* gene. Then the data and results were evaluated with using SPSS v.23 software and Excel software.

Results: Phenotypic methods (microbial culture and biochemical investigation) confirmed 18 positive samples for *Listeria monocytogenes*, of which 10 (6.06%) samples were positive for Listeria monocytogenes by PCR of the *hlyA* gene. The rate of contamination in pounded kebab was 37.9%, chicken meat 4.4%, local hamburger 16.66% and lettuce 13.33%. Compared to other studies, these findings were more prevalent in some foods (e.g., local hamburger) and less in others (e.g., chicken meat).

Conclusion: The use of biochemical methods for determining the frequency of Listeria monocytogenes in food samples in Sanandaj had a high percentage of false positives.

Keywords*: *Food, hlyA gene, Listeria monocytogenes.

* Corresponding Author: F.keshavarzi@iausdj.ac.ir

علوم غذایی و تغذیه / پاییز ۱۴۰۲ / سال بیستم / شماره ٤