بررسی آلودگی شیرهای محلی کرمان به *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش‌های فنوتیپی و مولکولی

سمیه فرحبخش[۱]، اشرف کریمی‌نیک*[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: a.kariminik@iauk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۲۸، پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۵

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری گرم مثبت و عامل بیماری لیستریوز در انسان و حیوان است و در بیشتر مواد غذایی از جمله لبنیات و شیر حضور دارد. این باکتری در گاو موجب سقط جنین و ورم پستان و در انسان منجر به مسمومیت غذایی شده و می‌تواند در افراد پرخطر مانند زنان باردار، جنین و نوزاد تازه متولد شده به صورت مننژیت سپتی سمی مشاهده گردد. وجود این باکتری به عنوان شاخص بهداشتی و آلودگی در شیر تلقی می‌شود. در این تحقیق ۵۰ نمونه شیر خام و غیرپاستوریزه موجود در سطح شهر کرمان جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل گردید. کشت بر روی محیط کشت اختصاصی *لیستریا* انجام و شناسایی فنوتیپی صورت پذیرفت. جهت شناسایی مولکولی، DNA باکتری‌های شناسایی شده به روش فنوتیپی، با استفاده از کیت تجاری استخراج گردید و تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* با کاربرد کیت IGF اختصاصی شناسایی این باکتری از شرکت ایرانیان ژن فن‌آوران صورت پذیرفت. محصول پی‌سی‌آر با ژل یک درصد الکتروفورز گردید و باندهای اختصاصی مشاهده گردید. نتایج نشان داد ۳۰ و ۲۷ نمونه از شیرهای غیرپاستوریزه به ترتیب بر اساس روش‌های انجام شده، کشت و پی‌سی‌آر نسبت به *لیستریا مونوسیتوژنز* آلودگی نشان دادند. این امر توجه و رعایت شرایط بهداشتی را در طی مراحل تولید و تهیه شیر و ضرورت استفاده از شیر پاستوریزه را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (پی‌سی‌آر)، کشت، شیر، *لیستریا مونوسیتوژنز*

مقدمه

خواص، ارزش غذایی و نقش شیر و فرآورده‌های آن در تغذیه انسان از مدت‌ها قبل شناخته شده است، اما شیر به علت همین ویژگی‌ها و صفات ممتاز غذایی که دارد، به سرعت در معرض آلودگی‌های گوناگون قرار می‌گیرد (۱). یکی از باکتری‌های بیماری‌زا که از طریق مواد غذایی از جمله: شیرخام، سبزیجات به انسان منتقل می‌شود، *لیستریا مونوسیتوژنز* است که باعث بیماری‌های مختلفی از جمله: مسمومیت غذایی، مننژیت، کنژونکتیویت، سپتی سمی و سقط جنین می‌گردد (۲). ویژگی‌هایی همچون پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دامنه وسیعی از pH، تحمل شرایط یخچال و غلظت‌های بالای نمک، باعث گردیده تا باکتری *لیستریا* به عنوان یک بیماری‌زای بسیار خطرناک در صنعت مواد غذایی مطرح باشد (۳). لیستریوز در زنان باردار به سقط جنین و تولد نوزادانی با علایم عفونت خونی و یا مننژیت منتج می‌گردد. افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مانند مبتلایان به ایدز، دریافت‌کنندگان عضو پیوندی و افراد مبتلا به سرطان بیشتر در معرض ابتلا به لیستریوز قرار می‌گیرند (۴). بعضی از محققین تلاش نموده‌اند که این باکتری را با روش پی‌سی‌آر و بدون استفاده از روش‌های غنی‌سازی و کشت مورد شناسایی قرار دهند ولی این روش‌ها نیازمند عملیات پیچیده استخراج ژنوم باکتری است و حساسیت تست نیز کاهش می‌یابد (۵). جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* از مواد

غذایی با روش کشت و شناسایی آن با روش‌های بیوشیمیایی نیازمند ۸-۳ روز زمان می‌باشد. از این رو وجود روش‌های سریع و کاربردی برای شناسایی این باکتری در مواد غذایی نیازی ضروری است که به این منظور روش‌هایی مانند پی‌سی‌آر نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵). در این راستا مطالعه‌ای با هدف بررسی میزان فراوانی *لیستریا مونوسیتوژنز* در شیرهای محلی شهر کرمان به دو روش فنوتیپی (کشت) و مولکولی (پی‌سی‌آر) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۵۰ نمونه شیر محلی از سطح مراکز عرضه فرآورده‌های لبنی محلی در شهر کرمان به طور تصادفی جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. میزان ۳۰ سی‌سی از نمونه شیر در لوله‌های فالکونی استریل جمع‌آوری و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شد. هر نمونه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و سپس مایع رویی دور ریخته شد و از رسوب باقیمانده برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. جهت غنی‌سازی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش کشت به یک لیتر محیط کشت مولر هینتون براث، ۴ گرم عصاره مخمر و ۲ گرم قند گلوکز اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط کشت‌های اختصاصی *لیستریا* شامل: محیط کشت کروموژنیک اتاویانی[1] و پالکام آگار[2]، کشت داده شدند. آزمون کاتالاز، تخمیر قندهای رامنوز و زایلوز نیز برای هر کلنی رشد یافته در محیط کشت‌های اختصاصی انجام شد (۶). جهت شناسایی مولکولی باکتری از روش پی‌سی‌آر و دستگاه ترمال سایکلر مدل BIORAD، ساخت امریکا استفاده گردید. استخراج DNA به روش ستونی با کاربرد کیت GTP (پیشگامان انتقال ژن) با شماره کاتالوگ DM05050 مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. به منظور شناسایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از کیت اختصاصی شناسایی این باکتری‌ها به نام IGF با شماره کاتالوگ IGF139 استفاده شد. پس از استخراج DNA، زیر هود لامینار و در شرایط استریل مواد موجود در کیت خارج و روی ظرف یخ قرار داده شد. هر یک از تیوب‌ها به مدت چند ثانیه به آرامی ورتکس شد. مخلوط پی‌سی‌آر در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. به تعداد نمونه‌ها از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل روی ظرف یخ قرار داده شده و نام‌گذاری گردیدند. به عنوان کنترل منفی از آب مقطر یونیزه استفاده شد. کنترل مثبت هم در کیت موجود بود. به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از مخلوط پی‌سی‌آر و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم DNA- تک پلیمراز اضافه شد و تیوب‌ها اسپین شدند. سپس به هر تیوب به میزان ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده اضافه گردید. درب تیوب‌ها بسته و اسپین شدند و پس ازآن به مدت ۳-۵ ثانیه ورتکس شده و بر طبق برنامه دمایی ذیل در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفتند (جدول ۱). محصول پی‌سی‌آر را با ژل آگارز یک درصد الکتروفورز نموده و باندهای ایجاد شده با دستگاه ژل داک کیاژن بررسی گردیدند. مارکر مورد استفاده در این تحقیق Gene ruler DNA Ladder Mix ساخت شرکت فرمنتاز با فاصلهٔ ۱۰۰ جفت باز از ۱۰۰ تا ۱۳۰۰ جفت باز بود.

یافته‌ها

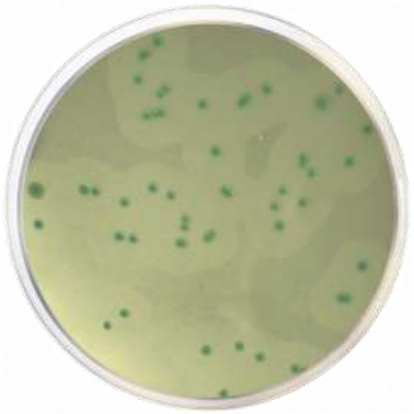
نتایج نشان داد که ۳۰ نمونه از شیرهای غیرپاستوریزه براساس روش کشت نسبت به *لیستریا مونوسیتوژنز* آلودگی نشان دادند. رشد باکتری در محیط کشت اتاویانی با ایجاد کلنی‌های به رنگ سبز تیره و بر محیط کشت پالکام به رنگ تیره مشخص گردید (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج آزمون قندها، نشان داد که جدایه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* قادر به تخمیر قند رامنوز بوده و واکنش مثبت (تشکیل اسید) با ایجاد رنگ زرد مشخص گردید. کلیه جدایه‌ها دارای تست کاتالاز مثبت بودند.

[1] Ottaviani

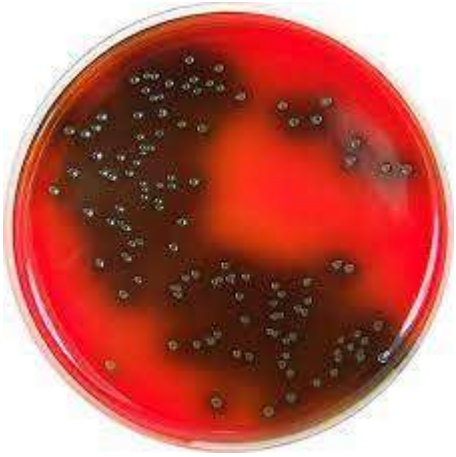
[2] PALCAM agar

جدول ۱- مراحل و پروتکل دمایی واکنش پی‌سی‌آر

مراحل واکنش	زمان	دما (سانتی‌گراد)	سیکل
واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴	۲
اتصال پرایمر	۳۰ ثانیه	۶۲	۳
پلیمریزاسیون	۶۰ ثانیه	۷۲	۴
پلیمریزاسیون نهایی	۷ دقیقه	۷۲	۵
*	۳۵	Cycle (۲-۴)	*

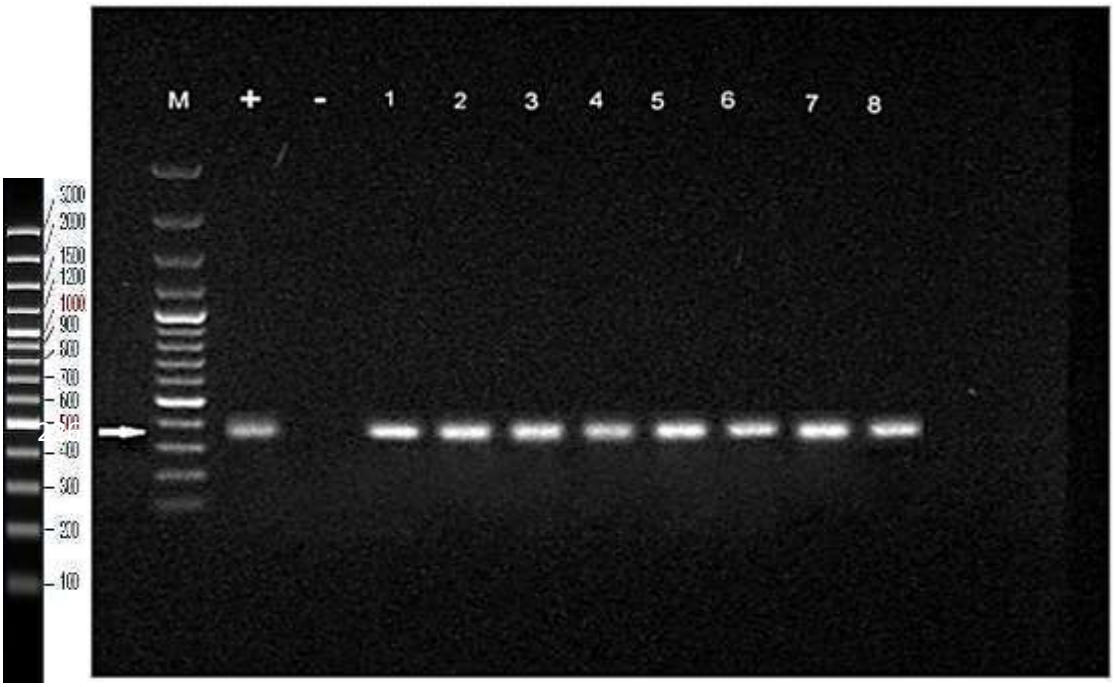


شکل ۱- کشت *لیستریا مونوسیتوژنز* بر محیط کشت کروموژنیک اتاویانی



شکل ۲- کشت *لیستریا مونوسیتوژنز* بر محیط پالکام

نتایج نشان داد که ۲۷ نمونه بر اساس روش پی‌سی‌آر نسبت به *لیستریا مونوسیتوژنز* آلودگی داشتند. شکل ۳ نتایج الکتروفورز ژل و باندهای تشکیل شده را نشان می‌دهد. بر اساس دستورالعمل کیت شناسایی *لیستریا مونوسیتوژنز*، مشاهده باند ۲۲۶ جفت بازی نشانه حضور این باکتری در نمونه مورد آزمایش می‌باشد.



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگر اختصاصی *لیستریا مونوسیتوژنز*

باندهای bp ۲۲۶ در ۸ نمونه‌ی مثبت نشان داده شده است. نمونه‌های ۱-۸؛ کنترل مثبت؛ کنترل منفی؛ M: Marker

بحث و نتیجه‌گیری

از آن جا که شیوع لیستریوز می‌تواند عوارض ناخوشایند و جبران‌ناپذیری را در سالمندان، افراد مبتلا به نقص ایمنی و زنان باردار ایجاد نماید، لذا استفاده از روش‌های دقیق و مطمئن، جهت دستیابی و شناسایی این باکتری امری بسیار ضروری است (۷). از طرفی، یکی از علل شیوع لیستریوز غذایی در جوامع مختلف و از جمله کشور ما، ایران، مصرف شیر و پنیرهای تهیه شده به روش سنتی است. به دلیل اهمیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در بهداشت مواد غذایی و نیز سلامت عمومی افراد جامعه، پژوهش‌های گوناگونی در بسیاری از کشورها و از جمله کشور ما بر روی این باکتری انجام شده است. نوروزی و همکاران، (۱۳۹۲) در مطالعه‌ی ارزیابی ژن *actA* در *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از لبنیات بر روی ۷۰ نمونه جمع‌آوری شده از فرآورده‌های لبنی مختلف در شهرهای تهران و بابلسر از خرداد ماه ۱۳۹۱ تا مرداد ماه ۱۳۹۱ به روش پی‌سی‌آر استفاده شد که در مجموع ۱۰ مورد آلودگی با *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۴ مورد *لیستریا اینوکوآ*[1]، ۲ مورد *لیستریا ولشیمری*[2] و ۱ مورد *لیستریا سلیگری*[3] در نمونه‌های شیر، پنیر معمولی و پنیر نرم شناسایی گردید (۸). در مطالعه دیگری که بر روی شیوع گونه‌های *لیستریا* در شیر خام عرضه شده در سطح شهرستان اصفهان با روش پیشنهادی سازمان کشاورزی امریکا (USDH) روش‌های بیوشیمیایی و واکنش پی‌سی‌آر انجام شد، ۹۱ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از سطح شهرستان اصفهان ۵ نمونه آلوده به *لیستریا* بودند که ۴ نمونه دارای *لیستریا مونوسیتوژنز* و یک نمونه *لیستریا سیلیگری* بودند. با توجه به بررسی انجام شده به این نتیجه رسیدند که مصرف شیرخام و بستنی سنتی سبب بروز خطرات جدی در سلامت جامعه می‌شود و اجباری شدن استاندارد جست و جوی *لیستریا* در مواد

[1] *L. innocua*
[2] *L. welshimeri*
[3] *L. seeligeri*

غذایی حساس به نظر می‌رسد (۹). *لیستریا مونوسیتوژنز* به طور گسترده در خاک، آب، گیاهان، مواد خوراکی، مدفوع و به خصوص در آب، سیلو، سبزیجات و علوفه‌های کهنه و کپک‌زده وجود دارد و یکی از مهم‌ترین منابع عفونت در حیوانات اهلی و وحشی به شمار می‌آید (۱۰). بیماری لیستریوز سال‌ها است که به عنوان یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی و برخی از پرندگان شناخته شده است. *لیستریا* به ویژه گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* به علت شیوع و میزان مرگ و میر بالا مورد توجه بسیاری از محققین بوده است. این باکتری همچنین مسئول بسیاری از اپیدمی‌های مسمومیت غذایی به ویژه در کشورهای صنعتی است (۱۱). موارد تک‌گیری لیستریوز در سال‌های اخیر در برخی از کشورها شروع به افزایش نمود که اکثر آنها همراه با مصرف غذاهای حاوی *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند. بنابراین امروزه لیستریوز انسانی را بیماری می‌دانند که عمدتاً به وسیله مواد غذایی آلوده منتقل می‌شود (۱۲). شیر پاستوریزه و غیرپاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه‌گیری عمومی شناخته شده است (۱۳). *لیستریا مونوسیتوژنز* قادر به رشد در شیر غیرپاستوریزه می‌باشد و احتمال افزایش ارگانیسم در طول نگهداری در مخازن نگهداری شیر در گاوداری‌ها و سیلوها وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد شروع لیستریوز وابستگی به فصل دارد به طوری که شیوع بیماری در فصل زمستان بیشتر گزارش شده است که ممکن است به دلیل آن باشد که در فصل زمستان دام‌ها بیشتر با غذای سیلو شده تغذیه می‌شوند و نیز آبستنی دام زمینه را برای ابتلا مستعد می‌کند منبع اصلی آلودگی در شیر خام، آلودگی شیر با مدفوع است (۱۴). در مطالعه‌ی نیقتین گاله و همکاران، (۲۰۰۴)، از ۴۰۴ نمونه شیر خام گرفته شده ۵۱ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا گردید (۱۵). طی اولین مطالعه‌ای که در ایران در سال ۱۳۷۸ توسط جلالی و همکاران بر روی *لیستریا* در مواد غذایی مختلف انجام گرفت میزان آلودگی لبنیات ۱/۳ درصد بوده است (۱۶). همچنین، در مطالعه‌ی مشتاقی و محمدپور در سال ۱۳۷۸ که در شهرکرد بر روی ۵۰۰ نمونه شیر خام صورت گرفت، شیوع *لیستریا* ۲/۲ درصد بود که ۱/۶ درصد از آن‌ها مربوط به *لیستریا مونوسیتوژنز* و ۰/۶ درصد آن‌ها *لیستریا اینوکوا* بوده است (۱۷). در تحقیقی دیگری که توسط رحیمی و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی فراوانی گونه‌های *لیستریا* در شیرخام، پنیر و بستنی سنتی عرضه شده در شهرکرد و شیراز انجام شد از ۱۷۸ نمونه که شامل شیرخام گاو (۴۵ نمونه)، شیر خام گوسفند (۳۲ نمونه)، پنیر سنتی (۴۱ نمونه) و بستنی سنتی (۶۹ نمونه) به طور تصادفی جمع‌آوری شد از مجموع ۱۷۸ نمونه ۲۴ نمونه از نظر آلودگی به لیستریا مثبت شناخته شدند. شیوع *لیستریا* در شیر خام گاو و شیر خام گوسفند، پنیر سنتی و بستنی سنتی به ترتیب ۱۱/۱٪، ۳/۱٪، ۲۴/۴٪ و ۱۳/۳٪ بود. در این پژوهش بیشترین گونه جداسازی شده *لیستریا اینوکوا* (۶۲/۵٪) و در بقیه موارد *لیستریا مونوسیتوژنز* (۳۷/۵٪) شناسایی گردید. نتایج حاصل از این بررسی مشخص نمود که خطر بالقوه مسمومیّت ناشی از مصرف شیر خام و فرآورده‌های لبنی غیرپاستوریزه به *لیستریا* وجود دارد (۱۸). با در نظرگرفتن این موضوع که شیوع *لیستریا* در مناطقی که آب و هوایی سرد دارند و از سیلو استفاده می‌کنند، بیشتر از مناطق گرم و خشک است و با توجه به اقلیم سرد این منطقه و استفاده از سیلو در دامداری‌های این منطقه و حجم بالای نمونه نسبت به جامعه آماری تحقیق انجام شده نتیجه به دست آمده در این تحقیق دور از انتظار نیست. در مطالعه دیگری نیز که رحیمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در چهار محال بختیاری بر روی ۲۹۰ نمونه مواد غذایی شامل پنیر، بستنی، کره و کشک انجام دادند شیوع *لیستریا* به ترتیب ۱۵٪، ۱۶/۷٪، ۷/۵٪ و ۲/۲٪ بوده است (۱۹). تفاوت در شرایط جوی منطقه کرمان به دلیل آب و هوای گرم و خشک و احتمالاً نحوه تغذیه دام‌ها سبب ایجاد اختلاف در این دو بررسی می‌باشد. در مطالعه‌ی محمودی در سال ۱۳۸۹ که در نورآباد انجام شد شیوع *لیستریا مونوسیتوژنز* در شیر خام و پنیر سفید در دو کارخانه مورد بررسی قرار گرفت که در کارخانه اول به ترتیب ۱/۷ و ۳/۳ درصد و در کارخانه دوم ۳/۳ و ۶/۷ درصد به دست آمد (۲۰). اما در هیچ یک از نمونه‌ها ماست و *دوغ لیستریا مونوسیتوژنز* یافت نشد که ممکن است به علت pH پایین این محصولات باشد. میزان شیوع در دو

کارخانه متفاوت بود که می‌تواند به این دلیل باشد که شیرهای جمع‌آوری شده از مراکز مختلف بوده است از طرفی آب و هوا و شرایط نگهداری در گسترش این آلودگی بسیار موثر است به طوری که در یک منطقه میزان شیوع به علت شرایط نگهداری متفاوت دام‌ها باعث ایجاد این تفاوت شده و مشاهده گردید که میزان آلودگی در شیر خام نسبت به پنیر کمتر است. طی تحقیقی که توسط جلالی و عابدی در سال ۱۳۸۷ در اصفهان بر روی ۶۱۷ نمونه اخذ شده از مواد غذایی مختلف انجام گرفت ۴/۶ درصد نمونه‌ها آلوده به *لیستریا* بودند، که در بین این ۴/۶ درصد نمونه‌های آلوده ۱/۲ درصد آنها *لیستریا مونوسیتوژنز* یافت شد. که میزان آلودگی در سبزیجات، گوشت و لبنیات به ترتیب ۱/۳، ۶/۷ و ۱/۲ درصد بوده است (۱۶). رحیمیان ظریف در سال ۱۳۸۸ در مطالعه‌ای به جستجوی *لیستریا مونوسیتوژنز* در شیر خام و پاستوریزه استان کردستان پرداخته بود که 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 (۲۱). در مطالعه‌ی مشابه که در سال ۱۳۹۴ توسط عبدی و همکاران بر روی ۲۹۱ نمونه فرآورده‌های لبنی سنتی و شیر خام عرضه شده در سطح شهرستان اصفهان انجام شد ۲۱ نمونه (۱۹/۷٪) به گونه‌های مختلف *لیستریا* آلوده بودند. که در بین آنها بیشترین میزان آلودگی مربوط به بستنی با میزان ۱۹/۴٪ بوده است مابقی نمونه‌های آلوده به ترتیب: خامه۱۱/۱٪، شیرخام ۵/۴۹٪ و فرنی۴/۱۲٪ بوده است (۲۲). در این مطالعه هیچ کدام از نمونه‌های کشک، ماست و دوغ آلوده به *لیستریا* نبودند. *لیستریا اینوکوا* با ۵/۴۴٪ متداول‌ترین گونه *لیستریا* جدا شده بود و پس از آن *لیستریا مونوسیتوژنز* با میزان ۱/۳۶٪ و *لیستریا سیلیگری* با میزان ۰/۳٪ آلوده بودند. وجود دامداری‌های صنعتی، شرایط آب و هوایی و استفاده از سیلو در مناطق مختلف از عوامل مؤثر در فراهم آوردن شرایط لازم برای رشد باکتری *لیستریا* بوده است. شرایط مشابه در نگهداری و نحوه تغذیه دام‌ها و آب و هوا در مطالعات انجام شده با شهرستان کرمان باعث نزدیک بودن نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات انجام شده توسط شاملو و همکاران، (۱۳۹۴)، عبدی و همکاران، (۱۳۹۴) و جلالی و عابدی، (۱۳۸۸) شده است که این خود نشان‌دهنده تاثیر اقلیم و تغذیه در شیوع این باکتری می‌باشد (۱۶، ۲۲ و ۲۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آلودگی شیرهای غیرپاستوریزه که از مراکز فروش جمع‌آوری شد، بسیار زیاد بوده است به‌طوری که از ۵۰ نمونه شیر غیرپاستوریزه ۳۰ نمونه به روش کشت مثبت شدند و ۲۷ نمونه شیر، با آزمایش پی‌سی‌آر به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* آلودگی نشان دادند. به این معنی که در ۳۰ مورد کشت *لیستریا* مثبت شده ولی تنها در ۲۷ نمونه روش پی‌سی‌آر مثبت گردید. در هر حال مثبت شدن تست‌ها، نشان‌دهنده عدم رعایت موازین بهداشتی در مراکز فروش، حمل و نقل و یا هنگام دوشیدن شیر باشد. همچنین نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که دقت و حساسیت پی‌سی‌آر برای بررسی و تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* بیشتر از روش کشت میکروبی است و روش پی‌سی‌آر مدت زمان کمتری (حدود ۲۴ ساعت) در مقابل ۴ الی ۶ روز برای کشت میکروبی و در نهایت تشخیص لازم دارد. بنابراین کشت میکروب‌ها که جهت تشخیص شناسایی باکتری‌ها در اکثر آزمایشگاه‌ها به کار می‌رود زمان‌بر بوده و ثانیاً باعث افزایش تعداد میکروب‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد. لذا امروزه در برخی آزمایشگاه‌ها روش پی‌سی‌آر جایگزین روش‌های کشت شده است، به این معنی که قطعه‌ای از ژن مربوط مورد شناسایی قرار گرفته و پرایمرهای مربوطه تولید می‌شوند، با استفاده از این پرایمرها می‌توان باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز را* در شیر را شناسایی نمود. با توجه به نتایج حاصل و وجود مراکز فروش فراورده‌های لبنی در سطح شهر کرمان، جهت کاهش بار میکروبی شیر و در نتیجه حفظ سلامت جامعه و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با این نوع از آلودگی پیشنهاد می‌شود که ضمن نظارت بیشتر و تخصصی بر مراکز تهیه و فروش فرآورده‌های لبنی، آموزش‌های لازم جهت رعایت اصول بهداشتی به کلیه افرادی که در زمینه تهیه، حمل و نقل و فروش شیر در حال فعالیت هستند، ارائه شود. همچنین با توجه به انتقال آلودگی از دام به انسان، نظارت بر مراکز

تهیه توسط افراد متخصص و آشنا با آلودگی‌های میکروبی و بیماری‌های دام صورت پذیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان کمال تشکر و امتنان را دارند.

حمایت مالی

تحقیق حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی بوده و از طرف دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

References

1-Zucali M, Bava L, Colombini S, Brasca M, Decimo M, Morandi S, Tamburini A, Crovetto GM. Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore- forming bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2015;95(6):302-1294.

2-Komora N, Maciel C, Pinto CA, Ferreira V, Brandão TR, Saraiva JM, Castro SM, Teixeira P. Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure, pediocin PA-1 and bacteriophage P100. Food microbiology. 2020;86: 103315.

3-Huang HW, HMlung YH, change Y, Ang BB, and Wang CY. Inactivation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in Raw Milk by High Hydrostatic pressure. Foodborne pathogens and disease. 2015;12: 139-144.

4-Wiesmayr S, Tabarelli W, Stelzmueller I, Nachbaur D, Boesmueller C, Wykypiel H, Pfausler B, Margreiter R, Allerberger F, Bonatti H. *Listeria meningitis* in transplant recipients. Wiener Klinische Wochenschrift. 2005;117(5):33-229.

5-Vanegas MC, Vásquez E, Martinez AJ, Rueda AM. Detection of *Listeria monocytegenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by Real-time PCR. Food Control. 2009;20(4):2-430.

6-Allerberger F. Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2003;35(3):9-183.

7-Jamali H, Chai LC, Thong KL. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. Food control. 2013;32(1):19-24.

8-Narrows J, Moradi Bidhendy S, Shafiee M. Detection of *actA* gene in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products. Journal of Microbial World. 2013; 6(3):5-46.

9-Shamloo Aghakhani E, Jalali M, Mirlohi M, Abdi Moghadam Z, Shamloo Aghakhani E, Maracy MR, Yaran M. Prevalence of *Listeria* species in raw milk supplied in Isfahan. Journal of Isfahan Medical School. 2012;204:36-1355. [In Persian]

10-Vivant AL, Garmyn D, Piveteau P. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2013;28(3):87.

11-Canham LJ, Manara A, Fawcett J, Rolinski M, Mortimer A, Inglis KE, Cottrell DA. Mortality from *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis following escalation to Alemtuzumab therapy for relapsing-remitting Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis and related disorders. 2018;24:38-41.

12-Conly JM, Johnston BL. *Listeria*: a persistent food-borne pathogen. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2008;19(5):8-327.

13-Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy-Massachusetts, 2007. MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 2008;57(40):100-1097.

14-Reda WW, Abdel-Moein K, Hegazi A, Mohamed Y, Abdel-Razik K. *Listeria monocytogenes*: An emerging food-borne pathogen and its public health implications. The Journal of Infection in Developing Countries. 2016;10(02):54-149.

15-Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Applied and environmental microbiology. 2004;70(8):67-4458.

16-Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. International Journal of Food Microbiology. 2008;122(3):40-336. [In Persian]

17-Moshtaghi H, Mohamadpour AA. Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. Foodborne pathogens and disease. 2007;4(1):10-107. [In Persian]

18-Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. Food Control. 2010;21(11):52-1448.

19-Rahimi E, Momtaz H, Sharifzadeh A, Behzadnia A, Ashtari M, Esfahani S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from traditional dairy products in Chahar Mahal & Bakhtiyari, Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2012;15(2):22-115.

20-Mahmoodi MM. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk and Dairy Products in Noorabad, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2010; 9(1):9-16. [In Persian]

21-Rahimian Zarif B. Search for *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized milk of Kurdistan province, clinical studies of large animals (veterinary). Journal of Large Animal Clinical Science Research (Journal of Veterinary Medicine). 2009;9:71-76.

22-Abdi Moghadam Z, Shamloo E, Mortazavian AM, Atefi M. Prevalence of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Industries. 2015;9:74-82.

23-Shamloo E, Jalali M, Mirlohi M, Madani G, Metcalf D, Merasi MR. Prevalence of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. International Journal of Environmental Health Engineering. 2015;4(1):1.

Detection of *Listeria Monocytogenes* in non-Pasteurized Milk in Kerman City by Phenotypic and Molecular Techniques

Somayeh Farahbakhsh[1], Ashraf Kariminik[*2]
1-M.S, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
* Corresponding Author: a.kariminik@iauk.ac.ir
Received: 18/6/2021, Accepted: 16/9/2021

Abstract
Listeria monocytogenes is a gram-positive bacterium that causes listeriosis in humans and animals and is present in most foods including dairy and milk. *Listeria monocytogenes* can cause abortion and mastitis in cattle. In humans, as well as infections in pregnant women, fetuses, and a newborn baby are seen as meningitis septicemia. Despite these microorganisms in milk can be considered as a health indicator. In this study, 50 samples of raw and unpasteurized milk in the city of Kerman were collected and transferred to the laboratory by observing the cold chain. The culture was performed on a *Listeria*-specific culture medium and phenotypic identification was performed. For molecular identification, the DNA of bacteria identified by the phenotypic method was extracted using a commercial kit. *Listeria monocytogenes* was detected by using a special IGF kit to identify this bacterium from the Iranian Gene Fanavaran Company. The PCR product was electrophoresed with 1% gel and specific bands were observed. The results showed that 30 and 27 samples of unpasteurized milk showed contamination against Listeria monocytogenes based on the methods performed, culture, and PCR, respectively. This shows the attention and observance of hygienic conditions during the production and preparation of milk and the necessity of using pasteurized milk.

Keywords: Polymerase Chain Reaction (PCR), Culture, Milk, *Listeria Monocytogenes*