بررسی شیوع ژن های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از نمونه های غذایی

محمدرضا صائبی[1]، فهیمه نوربخش[2]*، حسین خدابنده[3]

۱.دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات سم شناسی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول**: *Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com*

چکیده

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (*L.monocytogenes*) گونه‌ای از باکتری‌های بیماری‌زاست که موجب عفونت لیستریوزیس می‌گردد. این باکتری بی‌هوازی اختیاری است و قادر به زنده ماندن، در بود و نبود اکسیژن است و به عنوان عامل ایجاد کننده طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات است. مصرف لبنیات، گوشت و سبزیجات آلوده مهم ترین منبع انتقال آلودگی بحساب می آید. مطالعات محدودی از میزان مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* وجود دارد. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی فراوانی و میزان مقاومت در نمونه های مورد ارزیابی دارد. در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی (شامل شیر، پنیر و...) و ۵۰ نمونه سبزیجات (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بودند. سروتایپینگ سویه های جدا شده با استفاده از آنتی سرم های تجاری O و H لیستریا مونوسیتوژنز و مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده با روش آگلوتیناسیون لامی و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی انجام شد. از روش PCR استاندارد به منظور تشخیص ژن‌های *ermA, ermB, strA, tetS, tetA* و *ermC* در سویه ها استفاده شد. بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H لیستریا مونوسیتوژنز با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیش‌ترین مقاومت دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله‌های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. بیشترین ژن های مورد ارزیابی مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* به ترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود. شیوع سایر ژن های لیستریا مونوسیتوژنز در مورد ارزیابی در این مطالعه شامل *tetA* (۱۷درصد)، *tetS* (۲/۵درصد)، *ermB* (۱۰/۷درصد) و *ermC* (۲/۱درصد) بود.

واژه های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، مواد غذایی، واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون، لیستریوزیس، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

جنس لیستریا باکتری های گرم مثبت هوازی اختیاری می باشد که بعنوان یک انگل درون سلولی در پستانداران عمل می‌کند. تا سال ۱۹۹۲، ۱۰ گونه شناخته شده از لیستریا گزارش شده بود، که هر کدام شامل دو زیرگونه بود (۱, ۲). تا سال ۲۰۲۰، ۲۱ گونه شناسایی شدکه به طور گسترده ای در محیط پخش شده اند. این باکتری ها را می توان از مدفوع حیوانات خاک فاضلاب، پوشش گیاهی و آب جدا کرد. این جنس به افتخار پیشگام بریتانیایی جراحی استریل جوزف لیستر نامگذاری شده است(۳). گونه های لیستریا گرم مثبت، میله ای شکل و به صورت اختیاری بی هوازی هستند و اندوسپور تولید نمی‌کنند. نشان داده شده است که این باکتری ها در روده انسان و حیوانات نیز حضور دارند و در این میان تنها گونه های *لیستریا ایوانوئی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* (*L.monocytogenes*) برای انسان و حیوان بیماری زا هستند. پاتوژن اصلی انسان در جنس لیستریا، گونه ی *لیستریا مونوسیتوژنز*

است که می‌تواند عامل بیماری لیستریوزیس بعنوان یک بیماری کشنده برای گروه های حساس جامعه مانند خانم های باردار بحساب آید (۴). لیستریوزیس می تواند باعث بیماری جدی در زنان باردار، نوزادان، بزرگسالان با سیستم ایمنی ضعیف و افراد مسن شود و ممکن است باعث ایجاد گاستروانتریت در افراد دیگری شود که به شدت آلوده شده اند. لیستریوز یک بیماری جدی برای انسان است. شکل آشکار این بیماری دارای میزان مرگ و میر در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد است. دو تظاهرات بالینی اصلی سپسیس و مننژیت می باشند. دوره کمون می تواند از سه تا ۷۰ روز متغیر باشد(۵،۶). طیف وسیعی از علائم برای لیستریوزیس وجود دارد. بسته به شدت بیماری، علائم ممکن است از چند روز تا چند هفته طول بکشد. علائم خفیف ممکن است شامل تب، درد عضلانی، حالت تهوع، استفراغ و اسهال باشد (۶, ۷). اگر شکل شدیدتر لیستریوزیس ایجاد شود، علائم ممکن است شامل سردرد، سفتی گردن، گیجی، از دست دادن تعادل و تشنج باشد. افراد آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* ممکن است علائم را در چند ساعت یا تا دو تا سه روز پس از خوردن غذای آلوده مشاهده کنند. شکل‌های شدیدتر لیستریوز ممکن است بین سه روز تا سه ماه طول بکشد. با توجه به دامنه شدت بیماری، افراد در صورت مشکوک بودن به ایجاد علائمی شبیه به عفونت *لیستریا مونوسیتوژنز* باید با ارائه دهنده مراقبت های بهداشتی خود مشورت کنند (۸،۹). گاستروانتریت غیر تهاجمی می تواند در بزرگسالان دارای ایمنی مناسب ظاهر شود و معمولاً باعث مننژیت آتیپیک، سپتی سمی و گاستروانتریت تب دار می شود که با تب و اسهال آبکی به مدت ۲ تا ۳ روز که اغلب با سردرد و کمردرد همراه است مشخص می شود. این علائم معمولاً خود محدود شونده هستند و می توانند در مدت کوتاهی بدون مراجعه به پزشک برطرف شوند و متعاقباً منجر به عدم تشخیص و یا گزارش موردی خواهند شد(۱۰). نشان داده شده است که لیستریا را می توان در خاک یافت که می تواند منجر به آلودگی سبزیجات شود. حیوانات می توانند ناقل باشند. لیستریا در گوشت های نپخته، سبزیجات نپخته، میوه ها از جمله طالبی، سیب، شیر پاستوریزه یا غیرپاستوریزه، غذاهای تهیه شده از شیر، و غذاهای فرآوری شده یافت شده است. پاستوریزاسیون و پخت کافی، لیستریا را از بین می برد (۱۱،۱۲). با این حال، آلودگی ممکن است پس از پخت و پز و قبل از بسته بندی رخ دهد. به عنوان مثال، کارخانه های فرآوری گوشت که غذاهای آماده برای خوردن تولید می‌کنند، مانند هات داگ و گوشت های اغذیه فروشی، باید از سیاست ها و رویه های بهداشتی گسترده ای برای جلوگیری از آلودگی لیستریا پیروی کنند(۱۳،۱۴). *لیستریا مونوسیتوژنز* معمولا در خاک، آب رودخانه، فاضلاب، گیاهان و غذا یافت می شود. لیستریا عامل لیستریوزیس، یک بیماری نادر اما بالقوه کشنده است(۱۵). میزان مرگ و میر در افراد مبتلا به نوع شدید از عفونت لیستریوزیس، ممکن است به ۲۵درصد نزدیک شود که در مقایسه، میزان مرگ و میر سالمونلوزیس کمتر از ۱درصد تخمین زده شده است(۱۶, ۱۷). موارد لیستریوزیس انسانی و تعداد موارد شیوع بالا که منجر به مرگ و میر بسیاری شد در بسیاری از کشورها به طور قابل توجهی افزایش یافته است.این باکتری باعث ایجاد لیستریوزیس با پیامدهای بالینی شدید مانند مننژیت، سپتی سمی و سقط جنین همراه می باشد. این بیماری ممکن است به صورت مننژیت ظاهر شود یا به دلیل توانایی آن در نفوذ به لایه اندوتلیال جفت، نوزادان را مبتلا کند. بنابراین آلودگی مواد غذایی، خطر قابل توجهی برای سلامتی انسان دارد. اطلاعات کمی در مورد آلودگی فراورده های غذایی گونه های مختلف لیستریا در ایران وجود دارد. نشان داده شده است که گونه *لیستریا مونوسیتوژنز* مقاوم بوده و می‌تواند در دمای

ی بیوتیکی

ارزیابی مقاومت آنتی بی۴ درجه سانتی‌گراد (۳۹,۲ درجه فارنهایت) رشد کند (۱۸).

لیستریا مونوسیتوژنز یک پاتوژن مهم غذایی است که ممکن است در شیر و محصولات لبنی وجود داشته باشد. هر چه غذاهای آماده در یخچال آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* مدت بیشتری در یخچال نگهداری شوند، فرصت بیشتری برای رشد این پاتوژن ایجاد خواهد شد.

برای کند کردن یا جلوگیری از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* یخچال را روی ۴۰ درجه فارنهایت (۴ درجه سانتیگراد) و فریزر را روی ۰ درجه فارنهایت (۱۸- درجه سانتیگراد) قرار دهید. کنترل رشد باکتری با روش‌های مختلف حاصل می‌شود. این روش‌ها شامل فرمول‌بندی جدید فرآورده‌ها به‌نحوی که یک یا بیشتر از عوامل موثر رشد باکتری (مانند pH : فعالیت آبی، وجود ترکیبات بازدارنده) تغییر داده شود به گونه‌ای که امکان رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* در مواد غذایی وجود نداشته باشد (۱۹). برای حصول اطمینان از اینکه پیش از مصرف فرآورده هیچگونه رشد قابل‌توجه وجود نداشته است، کنترل دقیق دما به‌گونه‌ای که دمای مواد غذایی آماده خوردن هرگز از ۶ درجه سانتی‌گراد بیشتر نشود (ترجیحاً ۴-۲ درجه) و یا کاهش مدت نگهداری مجاز در دمای یخچال و یا سردخانه ضروری است (۲۰،۲۱). تعداد زیادی از مواد غذایی آماده ی خوردنی که با لیستریوز ارتباط داده می‌شوند، در فرآیند تولید، دارای یک مرحله ازبین برنده لیستریا (*Listericidal*) هستند. اکثر باکتری های لیستریا قبل از اینکه قادر به ایجاد عفونت باشند توسط سیستم ایمنی مورد حمله قرار می گیرند. با این حال، آنهایی که از پاسخ اولیه سیستم ایمنی فرار می کنند، از طریق مکانیسم های درون سلولی پخش می شوند، که این مکانیسم ها باکتری را از عوامل ایمنی در گردش (AMI) محافظت می کند. لیستریا برای تهاجم، جذب فاگوسیتی ماکروفاژها را با بیان D-گالاکتوز در اسیدهای تیکوئیک خود که در نهایت به پلی ساکاریدهای ماکروفاژ متصل می شود، القا می‌کند (۲۴-۲۲). نشان داده شده است که *لیستریا مونوسیتوژنز* از پروتئین های مختلف میزبان از جمله برخی از اینترنالین ها برای چسبیدن و حمله به سلول های میزبان استفاده می کند. در میزبان های آلوده *لیستریا مونوسیتوژنز* توانایی القای ورود خود را به سلول های میزبان افزایش می دهد. هنگامی که این باکتری در واکوئل فاگوسیتیک داخل سلولی قرار گرفت، لیستریولیزین ها و فسفولیپازهای مختلفی ترشح می کند که به باکتری اجازه می دهد غشای واکوئولی را لیز کرده و از مرگ سلولی جلوگیری کند (۱۴). متعاقبا، سلول های مجاور از طریق برآمدگی های غشای پلاسمایی مورد تهاجم قرار گرفته اند و در نتیجه گسترش سلول به سلول رخ می دهد. از طریق این چرخه، *لیستریا مونوسیتوژنز* می تواند از یک سلول میزبان به سلول دیگر، بدون قرار گرفتن در محیط خارج سلولی حرکت کند. بنابراین به سیستم ایمنی سلول T انسان می‌گریزد (۸،۲۵). سلول های مورد حمله می-توانند از سد اپیتلیوم روده و همچنین سایر بافت ها و اندام ها مانند کبد عبور کنند (۲۶). اکثر باکتری ها می توانند در کبد به دام بیفتند و پس از آن برخی از باکتری ها به سرعت وارد سیستم خونی شده و می توانند به غدد لنفاوی مزانتریک حمله کنند. اگر عفونت در مرحله ای که باکتری در کبد است کنترل نشود، به عنوان مثال، به دلیل ضعف شدید سیستم ایمنی، یک باکتریمی ثانویه ایجاد می شود. اتصال دهنده های مهم دیگر، اینترنالین ها هستند. لیستریا از اینترنالین A و B برای اتصال به گیرنده های سلولی استفاده می کند. اینترنالین A به E-cadherin متصل می شود، در حالی که اینترنالین B به گیرنده های Met سلول متصل می شود. اگر هر دوی این گیرنده‌ها تمایل کافی به اینترنالین A و B لیستریا داشته و می‌توانند از طریق مکانیسم غیرمستقیم به سلول حمله کنند. لیستریا در خارج از بدن دارای تحرک به وسیله تاژک دار است که گاهی اوقات به عنوان "حرکت غلتشی" توصیف می شود، این در حالی است که دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رشد تاژک را متوقف می‌کند (۱۵،۲۷).

در دهه های گذشته چندین مورد شیوع لیستریوزیس از سراسر جهان چون ،کانادا، انگلستان ایالات متحده آمریکا، فرانسه و دیگر کشورها گزارش شده است. براساس مطالعات اخیر، راه انتقال اصلی *لیستریا مونوسیتوژنز* به انسان از طریق ناخالصی محیطی موجود در مواد غذایی آماده مصرف است. استفاده از داروهای ضد میکروبی درمان اصلی لیستریوزیس است در حال حاضر ترکیبی از آنتی بیوتیک های آمپی سیلین یا پنی سیلین G در کنار آمینوگلیکوزید به عنوان درمان لیستریوزیس توصیه می شود. به طور کلی اغلب آنتی بیوتیک ها به جز فسفومایسین و سفالوسپورین ها بر

گونه های لیستریا موثر هستند (۲۸،۲۹). در حال حاضر ترکیبی از آنتی بیوتیک های آمپی سیلین یا پنی سیلین G در کنار آمینوگلیکوزید به عنوان درمان بیماران مبتلا به لیستریوزیس توصیه می شود. درمان های خوراکی در موارد با شدت کمتر ممکن است شامل آموکسی سیلین یا اریترومایسین باشد. با این وجود مطالعات متعددی جهت ارزیابی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در *لیستریا مونوسیتوژنز* از محیط زیست و مواد غذایی گزارش شده است. نشان داده شده است که تجویز بیش از حد آنتی بیوتیک در خوراک دام می تواند به مقاومت ضد میکروبی این گونه باکتریایی کمک کند (۳۰،۳۱).

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های پس از جداسازی به محیط کشت غنی کننده TSB منتقل شدند. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی (شامل شیر، پنیر و...) و ۵۰ نمونه سبزیجات (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بودند. انتقال نمونه ها بدون آسیب به ظرف حاوی نمونه در اسرع وقت جهت اقدامات لازم جداسازی و ارزیابی نمونه لیستریا در آزمایشگاه میکروبیولوژی انجام شد.

غنی سازی، کشت و شناسایی مورفولوژیک

جداسازی و شناسایی گونه های لیستریا با استفاده از روش استاندارد شرح داده شده در BAM-FDA Food and Drug Administration-(Bacteriological Analytical Manual) انجام شد. در این روش ۲۵ گرم از هر نمونه غذایی به ۲۲۵ میلی لیتر از محیط براث غنی کننده (Buffered *Listeria* Enrichment Broth) BLEB اضافه شد. نمونه ها به مدت ۴ ساعت در محیط غنی کننده لیستریا در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گذاری شدند. عوامل انتخابی شامل (آمفوتریسین و نالیدیکسیک اسید به محیط های غنی کننده مد نظر اضافه شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مجددا انکوبه گردید. یک لوپ از نمونه مد نظر در محیط غنی BLEB در محیط های پالکام، آکسفورد و *Listeria* CHROMagar (ساخت Merck، آلمان) به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. کلنی های سبز متمایل به سیاه در محیط پالکام آگار به عنوان کلنی های مشکوک *لیستریا مونوسیتوژنز* در نظر گرفته شدند. کلنی های مشکوک با استفاده از تست ها ی بیوشیمیایی (رنگ آمیز زی گرم، آزمایش کاتالازو اکسیداز، آزمایش تحرک و تخمیر گلوکز، گزیلوز، رامنوز، مانیتول، آلفا-متیلD- مانوپیرانوزید، همولیز و CAMP تایید شدند.

سروتایپینگ جدایه های *لیستریا مونوسیتوژنز*

سروتایپینگ سویه های جدا شده با استفاده از آنتی سرم های تجار ی O و H لیستریا مونوسیتوژنز و مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده با روش آگلوتیناسیون لامی انجام شد. برای انجام تست سرولوژی ابتدا یک قطره از آنتی سرم برروی لام گذاشته شد و چند کلنی خالص شده از کشت ۱۸ ساعته باکتری لیستریا در آنتی سرم مخلوط شد. در صورت آگلوتینه شدن قطره آنتی سرم پس از یک دقیقه، سروتایپ باکتری مورد نظر مورد شناسایی قرار می‌گرفت.

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی

به منظور انجام این آزمایش از روش استاندارد Disk-diffusion (1966) Kirby-Bauer و طبق پروتوکل استاندارد CLSI(۲۰۱۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش تعداد ۳-۲ عدد کلنی از هر کشت خالص در ۲ میلی لیتر محیط مولرهینتون براث تلقیح شد و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. سپس کدورت آنها با لوله ۰،۵ مک فارلند مقایسه شد برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (µg ۱۰)، اریترومایسین (۱۵µg)، پنی سیلین (۱۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، تری متوپریم (۵µg)، سولفامتوکسازول (۲۵µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، استرپتومایسین (۱۰µg) و کوتریماکسازول (µg

۳۸SMX ۱۰ µg TMP (UK ,Co MAST) مورد استفاده قرار گرفتند. پلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. از *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC۱۵۳۱۳ و *استافیلوکوکوس اورئوس*ATCC۲۹۲۱۳ به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

شناسایی ژن های مقاومت از طریق PCR

از روش PCR استاندارد به منظور تشخیص ژنهای *ermA*, *ermB*, *strA*, *tetS*, *tetA* و *ermC* در سویه ها استفاده شد. از کیت استخراج Roche Co, New DNA (York, USA) برای استخراج محتوای ژنتیکی سویه ها استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از طریق ND-1000 NanoDrop اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE USA) مورد بررسی قرار گرفت.

توالی و اندازه پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر در PCR در جدول ۱ آمده است.

در مراحل مختلف PCR مخلوط واکنش (در حجم کلی ۲۵ µl) شامل ۱ µl DNA استخراج شده با غلظت ۱۰ µg/ml، ۱۳,۳ µl آب مقطر استریل ۰,۷ µl هر پرایمر با غلظت ۱۰ pmol/µL و ۱۰ µL مسترمیکس1x (Ampliqon Co Denmark) مورد استفاده قرا گرفت.

پس از انجام واکنش، محصولات PCR در ژل آگاروز ۱,۵٪ با توان ۱۰۰V الکتروفورز شدند. محصولات حاصل از الکتروفورز با استفاده از دستگاه PCR products Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصولات PCR در مقایسه با مارکر لدر 100 bp USA به عنوان مارکر رفرنس اندازه DNA مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده تشخیص ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیستریا مونوسیتوژنز

ژن	توالی پرایمر(3′→5′)	اندازه محصول) جفت بازا
ermA)	F: TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT R: CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	139
ermB	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R:AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639
strA	F:CTTGGTGATAACGGCAATTC R: CCAATCGCAGATAGAAGGC	572
tetS	F:TCCTTTGGGTAGTGGCATTC R: AAGCATTCGGAAATCTGCTG	420
tetA	F: GGCCTCAATTTCCTGACG R: AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	546
ermC	F: CAAAACATAATATAGAT R: CTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	641

نتایج

بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H لیستریا مونوسیتوژنز با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. تمام جدایه های با بالاترین مقاومت دارویی مربوط به سرواره های 1/2a و همه نمونه های جداسازی شده از گوشت متعلق به سروتیپ 1/2a بودند.

میزان مقاومت آنت وتیکی با استفاده از روش استاندارد Disk-diffusion(1966)Kirby-Bauer و طبق پروتوکل استاندارد CLSI و کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیشترین مقاومت

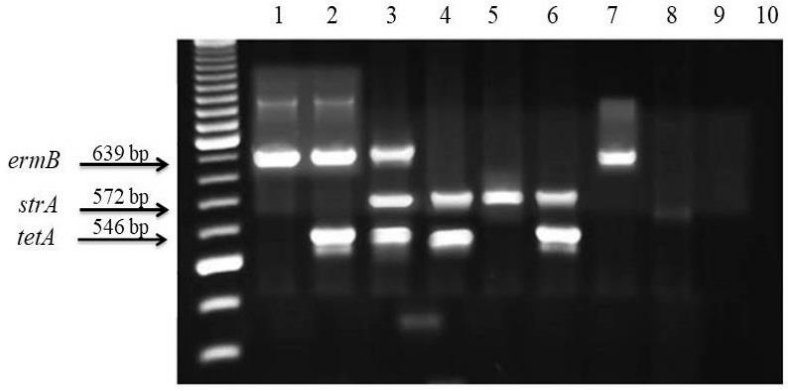
دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. نتایج آزمایشات میکروبی در آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که بیشترین میزان آلودگی و مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به نمونه های لبنی (۶۷درصد) و کمترین آن مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود. نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیتریا مونوسیتوژنز در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های لیستریا مونوسیتوژنز

آنتی بیوتیک	٪ مقاوم	٪ نیمه حساس	٪ حساس
استرپتومایسین	۸۹	۳	**۸**
کوتریماکسازول	۸۳	۱۱	**۶**
تتراسیکلین	۶۲	۴	**۳۴**
اریترومایسین	۴۵	۲	**۵۳**
پنی سیلین G	۲۳	۱۲	**۶۵**
آمپی سیلین	۱۴	۷	**۷۹**
تری متوپریم	۳۹	۱۵	**۴۶**
سولفامتوکسازول	۳۸	۱۶	**۴۶**
سیپروفلوکساسین	۲۶	۴۳	**۳۱**
جنتامایسین	۱۹	۳۵	**۴۶**
کلرامفنیکل	۱۳	۲۹	**۵۸**

نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون PCR

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین ژن های مورد ارزیابی مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* بترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود. شیوع سایر ژن های لیتریا مونوسیتوژنز در مورد ارزیابی در این مطالعه شامل *tetA* (۱۷درصد)، *tetS* (۲/۵درصد)، *ermB* (۱۰/۷درصد) و *ermC* (۲/۱ درصد) بود. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل۱- شیوع ژن های *ermB*، *strA*، *tetA* در بین سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز*

بحث

لیستریا به ویژه *لیستریا مونوسیتوژنز*، به عنوان یک باکتری بیماری زا از طریق غذا، به عنوان عامل اصلی و زمینه ساز بیماری های جدی در نظر گرفته می شود. لیستریوزیس در انسان و دام قابل تشخیص و جداسازی است که می‌تواند منجر به عفونت های تهدید کننده زندگی در شخص آلوده شود. تشخیص سریع و دقیق در شیر و محصولات لبنی، سبزیجات، گوشت، مرغ و محصولات غذاهای دریایی برای جلوگیری از انتشار آن از طریق زنجیره غذایی مورد نیاز است. در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۵۰ نمونه مختلف به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان جمع آوری شد. نمونه های پس از جداسازی به محیط کشت غنی کننده TSB منتقل شدند. نمونه ها شامل ۶۰ نمونه گوشت، ۴۰ نمونه از فراورده های لبنی و ۵۰ نمونه سبزیجات بودند. انتقال نمونه ها بدون آسیب به ظرف حاوی نمونه در اسرع وقت جهت اقدامات لازم جداسازی و ارزیابی نمونه لیستریا در آزمایشگاه میکروبیولوژی انجام شد. بر اساس واکنش سرولوژیکی، آنتی ژن های سوماتیک O و فلاژلی H *لیستریا مونوسیتوژنز* با آنتی سرم های متناظر، اغلب گونه های لیستریا (۷۰درصد) متعلق به سروتیپ 1/2a و مابقی از سروتیپ 1/2b (۱۹درصد) و 4b (۱۱درصد) بودند. تمام جدایه های با بالاترین مقاومت دارویی مربوط به سرواره های 1/2a و همه نمونه های جداسازی شده از گوشت متعلق به سروتیپ 1/2a بودند. نتایج حاصل از بررسی میکروبی نشان داد که بیش‌ترین مقاومت دارویی مربوط به استرپتومایسین (۸۹درصد) و کمترین میزان مقاومت دارویی در ایزوله های مورد ارزیابی مرتبط با آمپی سیلین (۱۴درصد) و کلرامفنیکل (۱۳درصد) بود. نتایج آزمایشات میکروبی در آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که بیشترین میزان آلودگی و مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به نمونه های لبنی (۶۷درصد) و کمترین آن مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود که بیشترین ژن های مورد ارزیابی مقاومت مربوط به ژن *strA* و ژن *ermA* بترتیب با فراوانی ۷۹/۸درصد و ۶۵/۴درصد بود.

با توجه به شیوع بالای نمونه های آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز، و اهمیت این باکتری مطالعات مختلفی به ارزیابی سویه های مقاوم به این باکتری پرداخته اند. ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی و الگوی ژن های مقاومت به کنترل آلودگی های ناشی از آن کمک می‌کند. در مطالعه مشابه توسط Tau و همکاران در سال ۲۰۱۴، جدایه ها به پنج سروتیپ تعلق داشتند که بیشترین فراوانی مربوط به سروتیپ 1/2a از لیستریامونوسیتوژنز بود. در این مطالعه نتایج، تنوع ژنتیکی پایینی را در بین جدایه ها، صرف نظر از منابع آنها، نشان داد که نشان می‌دهد کلون های غالب در محصولات غذایی مختلف گسترده هستند. در نتایج متفاوتی با مطالعه حاضر مقاومت به سفوتاکسیم (۳۰/۵درصد) و سیپروفلوکساسین (۱۳/۵درصد) غالب بود، در حالی که مقاومت به تتراسایکلین، تری متوپریم / سولفامتوکسازول و اریترومایسین کمتر مشاهده شد(۳۲). مطالعه مشابه دیگری به بررسی نمونه های آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز پرداخته است. در این مطالعه، لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از گوشت های آماده، مرغ خام و محصولات تازه با شناسایی سروگروه با استفاده از PCR ، ژنوتیپینگ با استفاده از الکتروفورز ژل میدان پالسی (PFGE) و تست حساسیت ضد میکروبی مشخص شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه پنج سروگروپ از لیستریا مونوسیتوژنز شناسایی شد. از ۱۶۷ جدایه، ۶۸ (۴۱درصد) به سروگروه 1/2b و 3b تعلق داشتند و ۵۳ نمونه (۳۲درصد) به سروگروه 4b و 4d متعلق بودند(۳۳). این درحالی است که بیشترین سروتایپ از نمونه های آلوده *لیستریا مونوسیتوژنز* مطالعه حاضر مربوط به سرواره های 1/2a بود. سروتایپینگ از بهترین روش های کلاسیک برای مطالعات اپیدمیلوژیک و گزارش های اسپورادیک به ویژه در نمونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* بحساب می آید. در مطالعه Mammina بیش‌ترین سروتایپ جدا شده از نمونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* مربوط به سروگروه 1/2a (۴۶/۳درصد) و کمترین میزان مربوط به سروتایپ 1/2b گزارش شده است. این میزان فراوانی با گزارش سروتایپ های مطالعه حاضر یکسان

است(۳۴). گزارش سروگروه های لیستریامونوسیتوژنز در مطالعه Guerini و همکاران با مطالعه حاضر متفاوت بوده و شایع ترین میزان سروتایپ را از گروه 1/2b گزارش کردند(۳۵). در مطالعه انجام شده توسط جلالی و همکاران در ایران، آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه های گوشت یخ زده گزارش شده است. نتایج این مطالعه در راستای مطالعه حاضر در راستای احتمال آلودگی نمونه های گوشت به لیستریا مونوسیتوژنز است (۳۶). مطالعه مشابهی توسط Lambertz گزارشی از آلودگی ۴درصد نمونه های پنیر و ۱۲درصد نمونه های ماهی دارد که در مقایسه با نتایج حاصل از مقاله حاضر میزان کمتری از آلودگی را گزارش می کند (۳۷). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از ۵۰ نمونه جداسازی شده از سبزیجات کمترین میزان مقاومت مربوط به نمونه سبزیجات (۳۵درصد) (شامل تره، شاهی، تربچه و ریحان) بود. که در راستای نتایج حاصل از مطالعه سلطان دلان و همکارن است که نشان دهنده افزایش آلودگی نمونه های سبزی خوردن، اسفناج و کلم بروکلی به *لیستریا مونوسیتوژنز* بخصوص در مناطق مختلف شمال تهران است. نتایج حاصل از این مطالعات بیانگر اهمیت گونه های مختلف باکتریایی به ویژه در فراورده های لبنی، گوشتی و سبزیجات است. از این رو رعایت بهداشت فردی و محیطی نقش موثری در کاهش آلودگی های اپیدمیولوژیکی ناشی از *لیستریا مونوسیتوژنز* دارد (۳۸). نتایج حاصل از پژوهش حاضر به مقاومت آنتی بیوتیکی حداقل در یک یا دو آنتی بیوتیک اشاره دارد. این میزان مقاومت به روش فنوتیپی با فراوانی ژن های حاصل از مقاومت به ویژه ژن *strA* و ژن *ermA* به روش PCR ارتباط مستقیمی دارد.

نتیجه گیری کلی

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به حضور سروگروه های مختل به ویژه سروتیپ 1/2a همخوانی دارد. وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های مختلف، گستردگی ژنی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع می تواند پتانسیل ایجاد خطر و شیوع لیستریوزیس را افزایش دهد. با توجه به مطالب گفته شده و میزان آلودگی به لیستریا، اجباری شدن استاندارد جستجوی لیستریا در مواد غذایی در ایران ضروری به نظر می رسد. همچنین تمهیدات لازم با دقت و حساسیت بالا جهت شناسایی و ارزیابی آلودگی *لیستریامونوسیتوژنز* به کار گرفته شود.

منابع

1. Kathariou, S., *Listeria monocytogenes virulence and pathogenicity, a food safety perspective*. Journal of food protection, 2002. 65(11): p. 1811-1829.

2. Jordan, K. and O. McAuliffe, *Listeria monocytogenes in foods.* Advances in food and nutrition research, 2018. 86: p. 181-213.

3. Gombas, D.E., et al., *Survey of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.* Journal of food protection, 2003. 66(4): p. 559-569.

4. Wiedmann, M., *Molecular subtyping methods for Listeria monocytogenes.* Journal of AOAC International, 2002. 85(2): p. 524-532.

5. Graves, L.M., B. Swaminathan, and S.B. Hunter, *Subtyping listeria monocytogenes*. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 2007. **161**: p. 283.

6. Ooi, S.T. and B. Lorber, *Gastroenteritis due to Listeria monocytogenes.* Clinical infectious diseases, 2005. 40(9): p. 1327-1332.

7. Pagliano, P., et al., *Listeria monocytogenes meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings.* Infez Med, 2016. **24**(2): p. 105-111.

8. Ramaswamy, V., et al ,*Listeria-review of epidemiology and pathogenesis.* Journal of Microbiology Immunology and Infection, 2007. 40(1): p. 4.

9. Siegman-Igra, Y., et al., *Listeria monocytogenes infection in Israel and review of cases worldwide.* Emerging infectious diseases, 20 :(۳)۸ .۰۲p. 305.

., تشخیص عفونت‌های باکتریایی؛ روش et al ۱۰.دره‌کردی, های سنتی و مولکولی: یک مرور سنتی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان, ۲۰۱۸. ۱۷(۹): p. 865-880.

11. Wing, E.J. and S.H. Gregory, *Listeria monocytogenes: clinical and experimental update.* The Journal of infectious diseases, 2002. 185(Supplement_1): p. S18-S24.

12. Fenlon, D., J. Wilson, and W. Donachie, *The incidence and level of Listeria monocytogenes contamination of food sources at primary production and initial processing.* Journal of Applied Microbiology, 1996. 81(6): p. 641-650.

13. Rouquette, C. and P. Berche, *The pathogenesis of infection by Listeria monocytogenes.* Microbiologia (Madrid, Spain), 1996. **12**(2): p. 245-258.

14. Letchumanan, V., et al., *A review on the characteristics, taxanomy and prevalence of Listeria monocytogenes.* Progress In Microbes & Molecular Biology, 2018. **1**(1.(

15. Low, J. and W. Donachie, *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis.* The Veterinary Journal, 1997. 153(1): p. 9-29.

۱۶.شیوایی, et al., بررسی شیوع ژن‌های مقاومت در لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از نمونه‌های غذایی و بالینی. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران, ۲۰۱۹. ۲۹(۴): p. 322-328.

۱۷.آقاخانی, ش., et al., شیوع گونه‌های لیستریا در شیر خام عرضه شده در سطح شهر اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان, ۲۰۱۲. ۳۰(۲۰۴).

۱۸.نسرین, ش.ف. ج. احمد, لیستریوزیس (معرفی ۲ and مورد از بیمارستان حضرت رسول اکرم).

19. Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart, *Listeria monocytogenes: a multifaceted model.* Nature Reviews Microbiology, 2006. 4(6): p.۴۳۴-۴۲۳ .

20. Walsh, D., et al., *Antibiotic resistance among Listeria, including Listeria monocytogenes, in retail foods.* Journal of Applied Microbiology, 2001. 90(4): p. 517-522.

21. Yan, H., et al., *Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007.* International journal of food microbiology, 2010. 144(2): p. 310-316.

22. Drevets, D.A. and M.S. Bronze, *Listeria monocytogenes: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion.* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008. **53**(2): p. 151-165.

23. Sleator, R.D., C.G. Gahan, and C. Hill, *A postgenomic appraisal of osmotolerance in Listeria monocytogenes.* Applied and Environmental Microbiology, 2 ۰۰۳p. ۶۹(۱): 1-9.

24. Han, Y., Z. Sun, and W. Chen, *Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against Listeria monocytogenes.* Molecules, 2019. 25(1): p. 33.

25. Edelson, B.T. and E.R. Unanue, *Immunity to Listeria infection.* Current opinion in immunology, 2000. **12**(4): p. 425-431.

26. Pamer, E.G., *Immune responses to Listeria monocytogenes.* Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(10): p. 812-823.

27. Gasanov, U., D. Hughes, and P.M. Hansbro, *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review.* FEMS microbiology reviews, 2005. 29(5): p. 851-875.

28. Milillo, S.R., et al., *A review of the ecology, genomics, and stress response of Listeria innocua and Listeria monocytogenes.* Critical reviews in food science and nutrition, 2012. 52(8): p. 712-725.

29. Embarek, P.K.B., *Presence, detection and growth of Listeria monocytogenes in seafoods: a review.* International Journal of Food Microbiology, 1994. **23**(1): p. 17-34.

30. Nightingale, K., et al ,*Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment.* Applied and environmental microbiology, 2004. 70(8): p. 4458-4467.

31. Baquero, F., et al., *Ecogenetics of antibiotic resistance in Listeria monocytogenes* .Molecular microbiology, 2020. 113(3): p. 570-579.

32. Yu, T. and X. Jiang, *Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail food in Henan, China.* Food Control, 2014. **37**: p. 228-231.

33. Zhang, Y., et al., *Characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail foods.* International Journal of Food Microbiology, 2007. 113(1): p. 47-53.

34. Mammina, C., et al., *Characterization of Listeria monocytogenes isolates from human listeriosis cases in Italy.* Journal of Clinical Microbiology, 2009. 47(9): p. 2925-2930.

35. Guerini, M.N., et al., *Listeria prevalence and Listeria monocytogenes serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States.* Journal of Food Protection, 2007. **70**(11): p. 2578-2582.

36. Jalali, M. and D. Abedi, *Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran.* International journal of food microbiology, 2008. 122(3): p. 336-340.

37. Lambertz, S.T., et al., *Prevalence and level of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Sweden 2010.* International Journal of Food Microbiology, 2012. 160(1): p. 24-31.

38. Dallal, M., M. Zinjanab, and H. Rad, *Identification and frequency of Listeria monocytogenes in vegetables and ready to eat salads of Tehran, Iran.* Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2015. 20(2).

Investigating the prevalence of resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from food samples

[3] [2*], Hossein Khodabandeh [1], Fahimeh Nourbakhsh Mohammad Reza Saebi

1. PhD student of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. Research Center of toxicology, Vice Chancellor of Food and Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.

*** Corresponding author Email:** *Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com*

Abstract

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) is a type of pathogenic bacteria that causes listeriosis infection. This facultative anaerobic bacterium is able to survive in the presence and absence of oxygen and is the cause of a wide range of diseases in humans and animals. Consumption of contaminated dairy products, meat and vegetables is the most important source of contamination. There are limited studies of the antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* species. Therefore, this study aims to evaluate the frequency and level of resistance in the evaluated samples. In this descriptive cross-sectional study, 150 different samples were randomly collected from different regions of Isfahan province. The samples included 60 samples of meat, 40 samples of dairy products (including milk, cheese, etc.) and 50 samples of vegetables (including leek, watercress, radish and basil). The serotyping of the isolated strains was done using the commercial O and H antisera of *Listeria monocytogenes* and according to the manufacturer's instructions, using slide agglutination method and antibiotic resistance evaluation. Standard PCR method was used to detect *ermA*, *ermB*, *strA*, *tetS*, *tetA* and *ermC* genes in the strains. Based on the serological reaction, somatic antigens O and flagella H of *Listeria monocytogenes* with the corresponding antisera, most Listeria species (70%) belong to serotype 1.2a and the rest from serotype 1.2b (19%) and 4b (11 %) They were. The results of the microbial investigation showed that the highest drug resistance was related to streptomycin (89%) and the lowest drug resistance in the evaluated isolates was related to ampicillin (14%) and chloramphenicol (13%). The most evaluated genes were related to *strA* gene and *ermA* gene, with frequencies of 79.8% and 65.4%, respectively. The prevalence of other *Listeria monocytogenes* genes evaluated in this study included *tetA* (17%), *tetS* (2.5%), *ermB* (10.7%) and *ermC* (2.1%).

Key words: *Listeria monocytogenes*, food, polymerization chain reaction, listeriosis, antibiotic resistance.