Research Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 4 (12-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Typing and Evaluation of the Genetic Relatedness of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Samples by the Multiple-Locus Variable number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Behrooz Sadeghi Kalani[1], Gholamreza Irajian[2], Abbas Bahador[1], Abazar Pournajaf[1], Hassan Dianat Moghadam[4], Mahdieh Neghabi[1], Rahim Solimany Jelodar[4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Depatrment of Medical Biotechnology, School of Medicine Nano Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Virology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/02/14
Accepted:2014/11/21
Available online:2014/11/23

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 1393; 8(4): P 13-19

Corresponding author at:

Dr. Gholamreza Irajian

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
Dr.irajian@gmail.com

Abstract

Background and Aim:*Listeria monocytogenes* cause listeriosis and fatal infections in humans. The aim of this study was typing and evaluation of the genetic relatedness of *L. monocytogenes* strains from food samples using MLVA technique.

Materials and Methods: 317 food samples were collected from 2009 to 2013 in Tehran, Iran. After final diagnosis of *L. monocytogenes* DNA was extracted to perform of MLVA technique, and also PCR products were analyzed by Gene Tools software. The number of tandem repeats was determined by using special equation for each selected locus. Also typing of strains was done.

Results: 24 samples of 317 food samples were positive for *L. monocytogenes* using standard laboratory techniques. A total 13 different types were determined by MLVA technique that type 2 and type 3 were the most abundant types by 6 and 4 strains, respectively.

Conclusions: The results of this study showed the presence of *L. monocytogenes* in dairy products and meat samples, therefore all people, especially pregnant women should observe health tips when using these products. The results of typing showed that *L. monocytogenes* strains from different sources can have the same origin. MLVA technique is easy with high accuracy and this method can be used in typing and evaluation of the genetic relatedness of *L. monocytogenes* for determination the source of contamination.

Key Words: *Listeria monocytogenes*, Dairy and meat samples, MLVA

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Sadeghi kalani B, Irajian G, Bahador A, Pournajaf A, Dianat moghadam H, Neghabi M et al . Typing and Evaluation of the Genetic Relatedness of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Samples by the Multiple-Locus Variable number Tandem Repeat Analysis (MLVA). Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (4) :13-19

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

تعیین تیپ و بررسی ارتباط ژنتیکی سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز* جدا شده از نمونه‌های غذایی به وسیله تجزیه وتحلیل تعداد توالی‌های متغیر تکراری پشت سرهم چند لوکوس (MLVA)

بهروز صادقی کلانی [۱]، غلامرضا ایراجیان [۲]، عباس بهادر [۱]، اباذر پورنجف [۱]، حسن دیانت مقدم [۴]، مهدیه نقابی [۱]، رحیم سلیمانی جلودار [۴]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۳۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۹/۲
موضوع:
میکروب‌شناسی مولکولی
IJMM 1393; 8(4): P 13-19

نویسنده مسئول:
دکتر غلامرضا ایراجیان
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۸۶۴۹

پست الکترونیک:
Dr.irajian@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *لیستریا منوسایتوژنز* عامل مسبب لیستریوزیس و عفونت‌های کشنده در انسان است. هدف از این مطالعه تیپ بندی و بررسی ارتباط ژنتیکی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی به‌وسیله تکنیک MLVA است.

مواد و روش کار: بین سال‌های ۸۹ تا ۹۲ تعداد ۳۱۷ نمونه مواد غذایی از سطح شهر تهران جمع‌آوری و پس از تشخیص نهایی، DNA آن‌ها به‌منظور انجام تکنیک MLVA استخراج شد، سپس عکس‌های حاصل از ژل محصولات PCR به‌وسیله نرم‌افزار Gene Tools آنالیز شد. در نهایت به کمک فرمول، تعداد تکرارهای هر لوکوس محاسبه و سویه‌ها تیپ بندی شدند.

یافته‌ها: از ۳۱۷ نمونه غذایی تعداد ۲٤ نمونه به‌وسیله تکنیک‌های استاندارد آزمایشگاهی برای *لیستریا منوسایتوژنز* مثبت بود و به کمک تکنیک *MLVA* این تعداد سویه در ۱۳ تیپ مختلف قرار گرفتند و تیپ ۲ با ٦ سویه و تیپ ۳ با ٤ سویه به ترتیب فراوان‌ترین تیپ‌ها بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه وجود *لیستریا منوسیتوزنز* را در نمونه‌های غذایی لبنی و گوشتی نشان می‌دهد، لذا توصیه می‌شود افراد مستعد، بخصوص زنان باردار در مصرف این مواد اصول بهداشتی را رعایت کنند. نتایج تیپ بندی نشان داد که سویه‌های جدا شده از منابع مختلف می‌تواند منشأ یکسانی داشته باشند. *MLVA* تکنیکی آسان و با دقت بالا است و می‌تواند برای تیپ بندی و ارزیابی ارتباط ژنتیکی سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز* برای تعیین منشأ آلودگی استفاده شود.

کلمات کلیدی : *لیستریا منوسایتوژنز*، نمونه لبنی و گوشتی، MLVA

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

لیستریا منوسایتوژنز یک پاتوژن مهم منتقل‌شونده از طریق غذا است که می‌تواند باعث لیستریوزیس و عفونت‌های شدید در افراد با نقص سیستم ایمنی، کودکان، زنان باردار و افراد سالخورده شود (۱). گونه‌های مختلف جنس لیستریا به دلیل مقاومت در برابر شرایط مختلف،pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک، به وفور در محیط اطراف شامل خاک، آب، سبزی‌ها در حال فساد و غذاها به خصوص غذاهای آماده مصرف یافت می‌شوند (۲). وجود گزارش‌های پراکنده از این باکتری در ایران بخصوص در فرآورده‌های لبنی، گوشت، سبزی و غذاهای آماده مصرف و همچنین وجود مواردی از سقط جنین ناشی از این باکتری باعث ایجاد نگرانی شده است (۲–۵). با توجه به اینکه مهم‌ترین مسیر انتقال این باکتری مصرف غذاهای آلوده با این باکتری است، لذا تیپ بندی ایزوله‌های جدا شده از منابع مختلف (بالینی، دامی و غذایی) می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد (۶) تایپینگ یک ابزار

بسیار مهم در تحقیقات اپیدمیولوژی، ردیابی منشأ آلودگی عامل انتقال و تعیین ارتباط تکاملی بین سویه‌های جدا شده از منابع مختلف است (**۷**). سروتایپینگ، ریبوتایپینگ، AFLP (Amplified fragment length polymorphism)، PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) تکنیک‌های رایج برای تیپ بندی *لیستریا منوسایتوژنز* می‌باشند، اگر چه PFGE قدرت تمایز بالایی دارد، اما روشی زمان‌بر و گران است که تفسیر آن نیز مشکل است (**۸**, **۹**). در سال‌های اخیر تیپ بندی به سمت تکنیک‌های مولکولی متمایل شده که منجر به توسعه تکنیک‌های جدید مانند MLST (Multilocus sequence typing) و MLVA(Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) شده است. تکنیک MLST نیز بسیار پرهزینه و زمان بر است و قدرت تمایز کمی برای ایزوله‌های سروتیپ b۴ دارد همچنین چون در این تکنیک فقط از ژن‌های ویرولانس استفاده می‌شود برای بررسی ارتباط تکاملی بین سویه‌ها مناسب نیست (**۱۰**, **۱۱**). تکنیک MLVA بعنوان یک تکنیک جدید برای تیپ بندی پاتوژن هایی مانند *سالمونلا* و *E. coli* توسعه یافته است،MLVA یک روش بر پایه PCR است که برای تمایز سویه‌های مختلف برخی باکتری‌ها امروزه بکار می‌رود و می‌تواند ارتباط ژنتیکی میان آن‌ها را نشان دهد. این تکنیک بر اساس ردیابی تعداد توالی تکراری پشت سرهم (TRs) لوکوس های اختصاصی در ژنوم میکروارگانیسم است، MLVA روشی سریع، ارزان، قابل تکرار و با قدرت تمایز بالایی است (**۱۰**, **۱۲**). از نظر قدرت تمایز برای تعیین تیپ *لیستریا منوسایتوژنز*

MLST <PFGE< Ribotyping<MLVA به ترتیب قدرت تمایز بیشتری دارند (**۱۳**). هدف از این مطالعه تیپ بندی *لیستریا منوسایتوژنز* براساس تکنیک MLVA برای اولین بار در ایران و تعیین ارتباط ژنتیکی سویه‌های جدا شده از نمونه‌های غذایی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری:

در این مطالعه توصیفی – مقطعی که در بین سال‌های ۸۹ تا ۹۲ تعداد ۳۱۷ نمونه از (شامل محصولات لبنی و فراورده‌های گوشتی) سطح شهر تهران جمع‌آوری شد.

تشخیص فنوتیپی:

نمونه‌ها در محیط TSYEB (tryptone soy yeast extract broth) در یخچال نگهداری و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردید. کلیه نمونه‌ها به مدت حداکثر ۳۰ روز در دمای یخچال نگهداری شد و در فواصل متفاوت بعد از یک هفته، آن‌ها روی محیط کشت اختصاصی مانند پالکام منتقل نموده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در درون جار شمع دار و انکوباتور CO_2 دار ۳۷ °C انکوبه می‌شدند. به منظور شناسایی اولیه *لیستریا منوسایتوژنز*، از روش‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نظیر تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، سیمون سیترات و کمپ استفاده شد (**۱۴**).

استخراج DNA:

DNA ارگانیسم به کمک پروتکل کیت (Roche Co, New York, USA) استخراج شد. DNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر برای تعیین مقدار غلظت و انجام الکتروفورز با استفاده از ژل ۰/۸٪ و اطمینان از مناسب بودن غلظت تا زمان انجام PCR در یخچال $4^{\circ}C$ و برای نگهداری طولانی‌تر در یخزن $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

انجام تکنیک MLVA

در این مطالعه از پنج لوکوس (LM10, LM11, LM23, LM32, LM-TR6) و پرایمر های مربوطه که قبلاً شرح داده‌شده است (**۱۵**) برای انجام تکنیک MLVA جهت تعیین تیپ سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز* استفاده شد. اختصاصیت پرایمر ها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Blast تائید شد. برای تکثیر ۵ لوکوس شرح داده شده در بالا از تکنیک PCR استفاده گردید. واکنش در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد، ترکیب master mix به این شرح بود: بافر PCR×1، ۲ میلی مولار $Mgcl_2$، ۰/۲ میلی مول از هریک ازdNTP ، ۱ میکرومولار (۱۰ پیکومول) از هر پرایمر و ۷۵/. یونیت از DNA polymerase Taq و یک میکرولیتر (نیم میکروگرم) نمونه DNA. دمای واسرشتگی ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، دمای annealing ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای extension، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تعداد سیکل ها ۴۰ بار تعیین شد. در پایان نیز ۴ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای extension نهایی به برنامه اضافه شد.

الکتروفورز در ژل آگاروز:

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با loading buffer (سیناژن) روی ژل آگارز ۳ درصد رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله اتیدیوم بروماید، درون چاهک‌ها ریخته شد و الکتروفورز به مدت ۱۰۰ دقیقه و در ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد، همچنین از Ladder ۵۰bp plus (سیناژن) جهت تأیید قطعات حاصل از PCR استفاده شد، پس از آن تصاویر محصول PCR توسط دستگاه ژل داک تحت تابش نور UV مشاهده و ثبت شد.

محاسبه تعداد تکرارهای هر لوکوس:

برای این منظور از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{تعداد تکرار} = \frac{\text{اندازه محصول PCR} - \left(\text{اندازه ناحیه flanking راست} + \text{اندازه ناحیه flanking چپ}\right)}{\text{اندازه واحد تکراری}}$$

اندازه‌ی نواحی flanking هر لوکوس قبلاً شرح داده شده است (**۱۶, ۱۷**). همچنین برای محاسبه کردن اندازه محصول PCR از روی تصویر به دست آمده از ژل توسط دستگاه ثبت ژل، از نرم‌افزار GeneTools from SynGene نسخه ۸/۳ استفاده شد (تصویر ۱).

جدول ۱: نتایج حاصل از جداسازی باکتری از نمونه‌های مختلف لبنی و گوشتی

نوع نمونه		تعداد (٪) نمونه	تعداد (٪) باکتری جدا شده
لبنی	پنیر	۷۰ (۶۵/۴)	۵ (۷/۱)
	خامه	۲۰ (۱۸/۷)	۳ (۱۵)
	کشک	۱۷ (۱۵/۹)	۳ (۱۷/۶)
	مجموع	۱۰۷	۱۱ (۱۰/۲)
گوشت فرآوری شده	سوسیس	۹۰ (۴۲/۹)	۶ (۶/۶)
	عصاره گوشت	۵۵ (۲۶/۲)	۴ (۷/۲)
	عصاره مرغ	۶۵ (۳۰/۹)	۳ (۴/۶)
	مجموع	۲۱۰	۱۳ (۶/۱)

تعیین تیپ ها:

پس از محاسبه تعداد تکرارهای هر لوکوس در سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز*، سویه‌ها را در تیپ‌های مختلف طبقه‌بندی می‌کنیم، برای این منظور سویه‌هایی که ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ تعداد تکرار یکسان دارند (به عبارتی ۴ نوع یا بیشتر از ۴ نوع تکرار یکسان دارند) را در یک تیپ و سایر سویه‌ها را در تیپ‌های مختلف قرار داده شوند.

رسم درخت تکاملی:

برای رسم درخت تکاملی سویه‌ها، ابتدا تعداد تکرارهای هر لوکوس را به‌توالی مرتبط آن‌ها تبدیل کرده و به کمک نرم‌افزار MEGA نسخه ۶/۶ نمودار تکاملی سویه‌ها رسم می‌شود.

آنالیز آماری:

پس از جمع‌آوری نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel ۲۰۱۳ و SPSS نسخه ۱۴و با در نظر گرفتن $P<0/5$ تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون پیرسون کای اسکوئر انجام شد.

یافته‌ها

جداسازی سویه‌ها:

در این مطالعه تعداد ۳۱۷ نمونه از محصولات لبنی و گوشتی جمع‌آوری شد که از این تعداد ۲۴ سویه *لیستریا منوسایتوژنز* به دست آمد. از ۱۰۷ نمونه مختلف لبنی تعداد ۱۱ (۲/۱۰٪) سویه *لیستریا منوسایتوژنز* به دست آمد که ۵ عدد (۱/۷٪) در ارتباط با پنیر، ۳ عدد (۱۵٪) در ارتباط با خامه و ۳ عدد (۶/۱۷٪) در ارتباط با کشک بودند. علاوه براین، ۱۳ سویه (۱/۶٪) *لیستریا منوسایتوژنز* از ۲۱۰ نمونه مختلف گوشتی که شامل ۶ سویه (۶/۶٪) از سوسیس، ۴ سویه (۲/۷٪) در ارتباط با عصاره گوشت و ۳ سویه (۶/۴٪) نیز از عصاره مرغ جدا شد (جدول ۱). نتایج آنالیز آماری در این مطالعه معنی‌دار نبود.

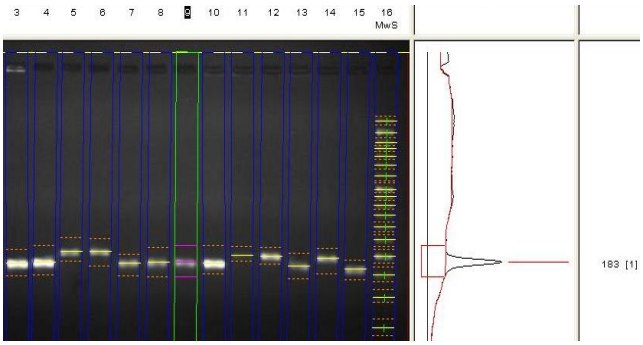
تعیین تیپ سویه‌ها:

پس از آنالیز تصاویر محصول PCR به وسیله نرم‌افزار Gene tools، تعداد تکرارها محاسبه شد (جدول ۳) و به‌وسیله تعداد تکرارهای هر لوکوس جدایه ها تعیین تیپ شدند. نهایتاً ۱۳ تیپ مختلف به دست آمد که تیپ ۲ با ۶ سویه و تیپ ۳ با ۴ سویه به

ترتیب فراوان‌ترین تیپ‌ها بودند (جدول ۲). فراوانی تیپ‌ها برحسب سال جداسازی نمونه‌ها در جدول ۳ نشان داد شده است. تیپ ۲ به‌عنوان تیپ غالب در طول هر ۴ سال از نمونه‌ها جدا شد.

درخت تکاملی:

درخت تکاملی بین سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز* موردمطالعه در نمودار ۱ نشان داده‌شده است.



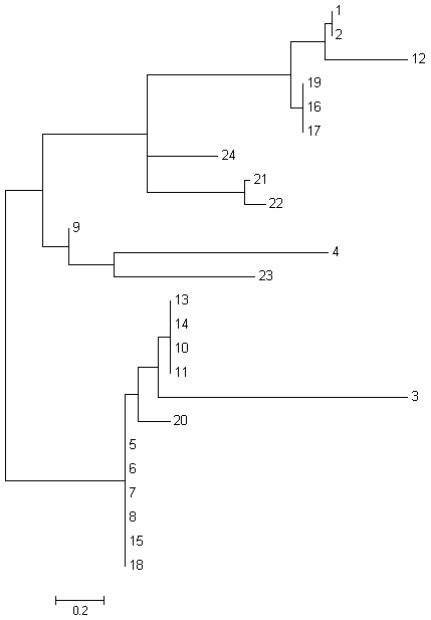
شکل ۱: تصویری از محیط نرم‌افزار Gene tools نسخه ۸/۳ جهت محاسبه وزن مولکولی محصول PCR

جدول ۱: نتایج محاسبه تعداد تکرارها در هر ۵ لوکوس، منبع نمونه‌ها و شماره تیپ سویه‌ها

شماره تیپ	LM-TR۶	LM۳۲	LM۲۳	LM۱۱	LM۱۰	منبع	ویه
۱	۰	۱۹	۲۸	۴	۳	پنیر	۱
۱	۰	۲۴	۲۸	۴	۳	پنیر	۲
۵	۰	۲۱	۲۸	۰	۴	پنیر	۳
۶	۳	۲۴	۲۸	۳	۴	پنیر	۴
۲	۳	۲۳	۳۰	۳	۵	پنیر	۵
۲	۳	۱۵	۳۰	۳	۵	خامه	۶
۲	۳	۱۵	۳۰	۳	۵	خامه	۷
۲	۳	۱۵	۳۱	۳	۵	خامه	۸
۷	۳	۱۵	۰	۳	۵	کشک	۹
۳	۳	۱۵	۳۱	۳	۴	کشک	۱۰
۳	۳	۲۱	۳۱	۳	۴	کشک	۱۱
۸	۰	۱۶	۳۸	۴	۰	سوسیس	۱۲
۳	۳	۱۶	۳۱	۳	۴	سوسیس	۱۳
۳	۱	۱۶	۳۱	۳	۴	سوسیس	۱۴
۲	۱	۱۶	۳۰	۳	۵	سوسیس	۱۵
۴	۰	۱۹	۳۱	۴	۴	سوسیس	۱۶
۴	۰	۱۹	۳۱	۴	۴	سوسیس	۱۷
۲	۲	۱۵	۳۰	۳	۵	عصاره گوشت	۱۸
۴	۰	۱۹	۳۱	۴	۴	عصاره گوشت	۱۹
۹	۲	۱۳	۳۰	۳	۶	عصاره گوشت	۲۰
۱۰	۲	۲۲	۳۰	۱	۵	عصاره گوشت	۲۱
۱۱	۲	۲۱	۳۰	۱	۶	عصاره مرغ	۲۲
۱۲	۳	۲۲	۳۰	۲	۵	عصاره مرغ	۲۳
۱۳	۳	۲۲	۰	۲	۵	عصاره مرغ	۲۴

جدول ۲ فراوانی کلونال تیپ‌های ۲۴ جدایه *لیستریا منوسیتوزنز* بر حسب سال

سال جداسازی	تعداد نمونه (٪)	نوع نمونه (٪)	تعداد (٪) باکتری جدا شده	کلونال تایپ
۱۳۸۹	۷۶ (۹۲۳)	لبنی ۳۰ (۲۸)	۲ (۱۸،۱۸)	۱و ۲
		گوشت فرآوری شده ۴۶ (۲۱،۹)	۳ (۲۳)	۳ و ۴ و ۱۱
۱۳۹۰	۸۵ (۲۶،۸)	لبنی ۲۵ (۲۳،۳۶)	۳ (۲۷،۲۷)	۵ و ۲ و ۳
		گوشت فرآوری شده ۵۰ (۲۳،۸)	۴ (۳۰)	۸ و ۲ و ۲ و ۴
۱۳۹۱	۸۰ (۲۵،۲۳)	لبنی ۲۵ (۲۳،۳۶)	۳ (۲۷،۲۷)	۶ و ۲ و ۷
		گوشت فرآوری شده ۵۵ (۲۶،۱۹)	۳ (۲۳)	۳ و ۹ و ۱۲
۱۳۹۲	۷۶ (۹۲۳).	لبنی ۲۷ (۲۵،۲۳)	۳ (۲۷،۲۷)	۱ و ۲ و ۳
		گوشت فرآوری شده ۵۹ (۲۸)	۳ (۲۳)	۴ و ۱۰ و ۱۳



نمودار ۱: نمودار تکاملی سویه‌های *لیستریا منوسایتوژنز* جدا شده در این مطالعه، نمودار فوق به‌وسیله نرم‌افزار MEGA۶٫۰۶ طراحی‌شده است

بحث

شیوع واقعی *لیستریا منوسایتوژنز* در ایران ناشناخته است و اطلاعات کمی از آن در دسترس است. این مطالعه با توجه به فراوانی کم و جداسازی سخت باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* در یک بازه زمانی ۴ ساله (۹۲-۸۹) انجام‌شده، این بیماری در سیستم بهداشت کشور گزارش نمی‌شود. در این مطالعه شیوع این باکتری در میان نمونه‌ها ۵/۷٪ بود. فراورده‌های لبنی و گوشتی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع آلودگی به *لیستریا منوسایتوژنز* مطرح هستند و بخصوص اگر به صورت خانگی تهیه شوند به علت عدم رعایت صحیح نکات بهداشتی و مکانیزه نبودن فرآیند تولید آن‌ها، احتمال آلودگی بیشتر است (**۱۸**, **۱۹**). Movarab و همکاران در سال ۲۰۰۹ شیوع *لیستریا منوسایتوژنز* را در نمونه‌های غذایی ۴/۳٪ اعلام کردند (**۲۰**) که نسبت به مطالعه‌ی ما کمتر است که می‌تواند به علت تفاوت در سطح بهداشت و سامانه‌های فراوری بین مناطق مورد مطالعه باشد. در مطالعه‌ای که در بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۴ در برزیل انجام شد *لیستریا منوسایتوژنز* از ۴/۳٪ از نمونه‌های غذایی جدا شد که فراوانی سویه‌ها با مطالعه‌ی پیش رو متفاوت است. دلیل عمده‌ی این تفاوت در دو مطالعه‌ی قبل با این مطالعه، می‌تواند تفاوت در نوع نمونه و پروسه‌ی فرآوری مواد غذایی باشد. Arsalan و همکاران شیوع *لیستریا منوسایتوژنز* را در نمونه‌های پنیر سفید تهیه شده در خانه مشخص کردند که آن‌ها نیز در ۶٫۶٪ نمونه‌ها باکتری رو جدا نمودند که با شیوع مطالعه‌ی حاضر تا حدود زیادی مطابقت دارد (**۲۱**). Jalili در مطالعه بر روی گوشت یخزده و تازه‌ی گاو و گوسفند در مجموع ۴ سویه (۲/۱٪) *لیستریا منوسایتوژنز* جدا کردند (**۵**). در مطالعه‌ی Kargar و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی ۴۲۸ نمونه پنیر تازه جمع‌آوری‌شده از ناحیه مرودشت شیراز ۵۶ سویه *لیستریا منوسایتوژنز* (۱۳٫۱٪) جدا شد که نتایج شیوع آن از مطالعه‌ی ما بیشتر بود که می‌تواند به دلیل پایین‌تر بودن سطح بهداشت در آن منطقه باشد (**۲۲**). Mohammadi در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که روی شیر خام و محصولات لبنی در نورآباد شیراز انجام داد تعداد ۶ باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* (۱/۶٪) جدا نمود که با این مطالعه‌ی همخوانی ندارد، تفاوت در تعداد و نوع نمونه می‌تواند دلیل این تفاوت باشد (**۲۳**). در شمال ایرلند در سال ۲۰۰۳، ۲۰۵ نمونه از گوشت مرغ منجمد شده را بررسی کردند و ۱۴ سویه (۱۸٪) *لیستریا منوسایتوژنز* را جداسازی کردند (**۲**) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

به منظور تیپ بندی *لیستریا منوسایتوژنز* از تکنیک MLVA استفاده شد. ۵ لوکوس (LM10, LM11, LM23, LM32, LM-TR6) جهت تمایز و تعیین تیپ سویه به کار برده شد، این تکنیک با موفقیت انجام شد و توانست به خوبی سیمای ژنتیکی سویه‌ها را از هم متمایز دهد. در سال ۲۰۰۶، ماری Moeohy و همکاران برای اولین بار توانستند ۲۵ نمونه غذایی *لیستریا منوسایتوژنز* را با استفاده از تکنیک MLVA از هم تمایز دهند، آن‌ها از ۶ لوکوس برای این منظور استفاده کردند که نتایج مطالعه‌ی آن‌ها بامطالعه‌ی حاضر تطابق دارد (**۱۶**). در مطالعه‌ی دیگر Chen و همکاران در مجموع ۴۶ سویه *لیستریا منوسایتوژنز* جداشده از نمونه‌های غذایی را به‌وسیله تکنیک‌های PFGE، MLVA و AFLP تیپ بندی کردند و مشاهده کردند که به‌وسیله MLVA، ۳۴ الگوی پروفایل ژنتیکی و به‌وسیله PFGE، ۳۰ الگو و به‌وسیله AFLP، ۳۴ الگو به دست آمد، نتایج حاصل از MLVA در این مطالعه با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد (**۱۰**). Lindstedt و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۷۹ سویه *لیستریا منوسایتوژنز* جدا شده از کشور سوئد را با MLVA به ۲۸ الگوی متفاوت ژنتیکی و ۶۱ سویه جدا شده از اسکاتلند را به ۴۲ الگوی مختلف تقسیم بندی کردند که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو است (**۷**). در سال

Li ۲۰۱۳ و همکاران ۹ لوکوس مناسب (LMV6, LMV1, LMV2, LM11, LM10, LMV7, LM32, LM-TR6, LM23) برای استفاده از تکنیک MLVA جهت تیپ بندی لیستریا *منوسایتوژنز* معرفی کردند که ۵ لوکوس مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر LM-TR6 LM10, LM11, LM23, LM32 نیز شامل آن‌ها می‌شود.(**۱۵**) در مطالعه پیش رو، ۱۳ تیپ مختلف از این باکتری بدست آمد که نشان‌دهنده ی قدرت تمایز بالای تکنیک MLVA در تفکیک سویه‌ها و تفاوت در منشأ اولیه این تیپ‌ها می‌باشد، بعضی از سویه‌های جدا شده از پنیر، خامه و سوسیس در یک تیپ قرار گرفتند (تیپ ۱)، همچنین بعضی از سویه‌های جدا شده از گوشت و عصاره گوشت در یک تیپ قرار گرفتند (تیپ ۴). این یافته‌ها نشان می‌دهد که منبع آلودگی می‌تواند یکسان باشد و سویه‌هایی که در یک تیپ قرار گرفتند احتمال دارد از یک کلون منشأ گرفته باشند، علاوه بر این، سویه‌های جدا شده از عصاره‌ی مرغ در تیپ‌های مختلفی قرار گرفتند که این نشان می‌دهد منشأ آلودگی منابع مختلف بوده است. در این مطالعه تیپ ۲ با ۶ سویه و تیپ ۳ با ۴ سویه به ترتیب فراوان‌ترین تیپ‌ها بودند که نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی بیشتر بین این سویه‌ها با توجه به اینکه از منابع مختلف جداسازی شده‌اند، می‌باشد. همچنین وجود تیپ ۲ در میان سویه‌های جداشده در طی هر ۴ سال نمونه‌گیری می‌تواند نشان‌دهنده ی اهمیت این تیپ در آلوده کردن مواد غذایی به خصوص مواد لبنی باشد. لازم به ذکر است خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی مقاومت سویه‌های این مطالعه به پادزیست‌ها در حال بررسی می‌باشد و طی مقاله بعدی گزارش می‌شود.

نتایج این مطالعه وجود *لیستریا منوسایتوژنز* را در نمونه‌های غذایی لبنی و گوشتی نشان می‌دهد و این نشان‌دهنده‌ی عدم کارایی مناسب سامانه‌های فرآوری لبنی و گوشتی در حذف این باکتری پاتوژن است و لذا توصیه می‌شود افراد سالخورده، کودکان و کسانی که ضعف سیستم ایمنی دارند و بخصوص زنان باردار در مصرف این مواد اصول بهداشتی را رعایت کنند و در مراحل فرآوری این نمونه‌های غذایی اقداماتی مانند افزایش سطح بهداشت کارکنان، کنترل دقیق محیط و تجهیزات و دقت بالا در نمونه‌گیری و انجام آزمایش‌ها جهت شناسایی آلودگی احتمالی با حضور کارشناس میکروب‌شناسی مجرب، لحاظ شود. همچنین با توجه به نیاز مبرم به یک سیستم قوی، سریع و ارزان جهت تیپ بندی و تمایز ژنتیکی سویه‌های لیستریا *منوسایتوژنز* استفاده از تکنیک MLVA توصیه می‌شود. یکی از مزایای متعدد این تکنیک عدم نیاز به ابزارهای پیشرفته و گران قیمت است و در هر آزمایشگاهی با امکانات معمولی نیز قابل اجرا است. یافته‌های این مطالعه این امکان را مطرح می‌کند که ممکن است بین آلودگی مواد لبنی و فراورده‌های گوشتی ارتباط وجود داشته باشد و بخصوص سویه‌های تیپ ۲ به‌عنوان تیپ غالب که در طی هر ۴ سال از نمونه‌ها جدا شد و ممکن است منشأ آلودگی یکسان باشد لذا ردیابی منشأ آلودگی برای حذف نهایی *لیستریا منوسایتوژنز* می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های بعدی، از نمونه‌های بالینی نیز استفاده شود تا ارتباط آن با نمونه‌های جداشده از منابع مختلف غذایی و در صورت امکان نمونه‌های دامی بررسی شود،

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل تأمین بودجه و گروه میکروب‌شناسی به دلیل تأمین فضای پژوهشی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Zajkowska J, Moniuszko A, Czupryna P, Kusmierczyk J, Pancewicz SA. [Encephalomeningitis caused by Listeria monocytogenes in patient infected by TBE virus-case report]. Przegl Epidemiol. 2008;62 Suppl 1:158-62.
2. Farber JM, Peterkin PI. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991;55(3):476-511.
3. Rahimi E, Yazdi F, Farzinezhadizadeh H. Prevalence and antimicrobial resistance of listeria species isolated from different types of raw meat in Iran. J Food Prot. 2012;75(12):2223-7.
4. Jamshidi M, Jahromi AS, Davoodian P, Amirian M, Zangeneh M, Jadcareh F. Seropositivity for Listeria monocytogenes in women with spontaneous abortion: a case-control study in Iran. Taiwanese J Obstet. 2009;48(1):46-8.
5. Jalali M, Abedi D. Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. Int J Food Microbiol. 2008 20;122(3):336-40.

6. Jadhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes. J Microbiol Meth. 2012;88(3):327-41.

7. Lindstedt BA, Tham W, Danielsson-Tham ML, Vardund T, Helmersson S, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of Listeria monocytogenes using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. J Microbiol Meth. 2008;72(2):141-8.

8. Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, et al. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for Listeria monocytogenes serotype 4b strains. Iny J Food microbiol. 2008 10;124(3):239-49.

9. Fugett EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched Listeria monocytogenes isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. J Clin Microbiol. 2007;45(3):865-73.

10. Chen S, Li J, Saleh-Lakha S, Allen V, Odumeru J. Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Listeria monocytogenes directly in food samples. Int J Food Microbiol. 2011 15;148(1):8-14.

11. Jadhav S1 BM, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes. J Microbiol Meth. 2012;88(3):327-41.

12. Saleh-Lakha S, Allen VG, Li J, Pagotto F, Odumeru J, Taboada E, et al. Subtyping of a large collection of historical Listeria monocytogenes strains from Ontario, Canada, by an improved multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). Appl. Environ. Microbiol. 2013;79(20):6472-80.

13. Jadhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes. J Microbiol Meth. 2012;88(3):327-41.

14. Morello JA. Clinical Microbiology Reviews: genesis of a journal. Clin Microbiol Rev. 1999 Apr;12(2):183-6.

15. Li X, Huang B, Eglezos S, Graham T, Blair B, Bates J. Identification of an optimized panel of variable number tandem-repeat (VNTR) loci for Listeria monocytogenes typing. Diagn Micr Infec Dis. 2013; 75(2):203-6

16. Murphy M, Corcoran D, Buckley JF, O'Mahony M, Whyte P, Fanning S. Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of Listeria monocytogenes. Int J Food Microbiol. 2007 10;115(2):187-94.

17. Sperry KE, Kathariou S, Edwards JS, Wolf LA. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping Listeria monocytogenes strains. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1435-50.

18. Meldrum RJ, Ellis PW, Mannion PT, Halstead D, Garside J, Welsh Food Microbiological F. Prevalence of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods sampled from the point of sale in Wales, United Kingdom. J Food Prot. 2010;73(8):1515-8.

19. Roche SM, Kerouanton A, Minet J, Le Monnier A, Brisabois A, Velge P. Prevalence of low-virulence Listeria monocytogenes strains from different foods and environments. Int J Food Microbiol. 2009 31;130(2):151-5.

20. Morobe IC. Prevalence, antimicrobial profiles, molecular serotyping and toxigenicity of" listeria monocytogenes" isolated from food in Gabarone, Botswana. 2009.

21. Arslan S. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria spp. in homemade white cheese Food Control. 2008;19(4):360–3.

22. Kargar M, Ghasemi A. Role of Listeria monocytogenes hlyA gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. *Arch* Clin Infect Dis. 2009;4(4):214-8.

23. Mahmoodi MM. Occurrence of Listeria monocytogenes in raw milk and dairy products in Noorabad, Iran. J ANIM VET ADV. 2010;9(1):19-9.