DOI:10.22092/VJ.2023.361744.2056
شماره ۱۴۲ بهار ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک
مقاله کامل

# شناسایی مولکولی و تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های شیر خام، دست کارگران و تجهیزات شیردوشی در شهرکرد

• **زهرا همتی (نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **سید محمدامین نبوی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **عبدالکریم زمانی‌مقدم**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **علی گودرز تله‌جردی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
• **سید سیاوش ساعی‌دهکردی**
گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **مهران رحمانی‌دهکردی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۱۲-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۴-۱۵
تاریخ بازنگری : ۱۴۰۲-۰۴-۱۵ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۰۱-۱۹
Email: z.hemati@sku.ac.ir

## چکیده

**لیستریا مونوسیتوژنز، عامل بیماری لیستریوز، از طریق مصرف موادغذایی آلوده مثل شیر خام، دست یا تجهیزات شیردوشی آلوده به انسان منتقل می‌شود. هدف این پژوهش، شناسایی لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های شیر خام، تجهیزات شیردوشی و دست کارگران گاوداری‌های شهرکرد بود. در این مطالعه ۷۰ نمونه شیر خام و ۴۰ نمونه از تجهیزات شیردوشی و ۴۰ نمونه از دست کارگران جمع‌آوری و بعد از غنی‌سازی اولیه در محیط آبگوشت مغذی بروسلا، بر روی محیط پالکام آگار کشت شدند. پس از تایید بیوشیمیایی، DNA کلنی‌های مشکوک به روش جوشاندن استخراج و با پرایمرهای Prs (جنس لیستریا) و پرایمرهای DG۷۴-DG۶۹ (گونه لیستریا مونوسیتوژنز) به وسیله PCR تکثیر شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تایید شده با روش انتشار از دیسک در برابر پنج آنتی‌بیوتیک ارزیابی شد. از میان ۱۵۰ نمونه، ۱۴ (۹/۳۳ درصد) نمونه با آزمون‌های بیوشیمیای تایید شدند. بر اساس نتایج PCR تعداد ده نمونه شیر خام (۶/۶۷ درصد)، یک نمونه تجهیزات شیردوشی (۰/۶۷درصد) و یک نمونه از دست کارگران (۰/۶۷درصد) از نظر جنس لیستریا و هشت نمونه شیر (۵/۳۳ درصد)، یک نمونه تجهیزات (۰/۶۷درصد) و یک نمونه دست کارگران (۰/۶۷درصد) از نظر گونه لیستریا مونوسیتوژنز مثبت بودند. جدایه‌های تایید شده، بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتی زوکسیم (۹۰٪) و اریترومایسین (۶۰٪) و بیشترین حساسیت را نسبت به آمیکاسین (۹۰٪) و آمپی‌سیلین (۸۰٪) نشان دادند. در نتیجه امکان انتقال لیستریا مونوسیتوژنز از تجهیزات شیردوشی و دست کارگران به شیر و برعکس وجود دارد و خطرات بالقوه لیستریوز مصرف کنندگان شیر خام را تهدید می‌کند.**

**کلمات کلیدی: پالکام آگار، لیستریا، لیستریا مونوسیتوژنز، شیر، PCR**

Veterinary Research & Biological Products No 142 pp: 34-41

**Phenotypic and genotypic characterization and determination of Listeria monocytogenes antibiotic resistance profile isolated from raw milk samples, worker's hands and milking equipment in Shahrekord**

*By: Hemati, Z. (Corresponding Author), Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Nabavi, S.M.A, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Zamani Moghaddam, A.K., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. godarztalejerdi, A., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Bo Ali Sina University, Hamadan, Iran. Saei Dehkordi, S.S., Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. and Rahmani Dehkordi, M., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.*

**Received:2023-03-13** **Revised:2023-07-06** **Accepted: 2023-07-06** **Published: 2024-04-07**

Email: z.hemati@sku.ac.ir

Listeria monocytogenes, the cause of listeriosis, is transmitted to humans from contaminated food such as raw milk, contaminated hands, or contaminated milking equipment. This research was conducted to identify Listeria monocytogenes in the raw milk samples, milking equipment and hands of Shahrekord dairy workers. In this study, 70 raw milk samples, 40 milking equipment and 40 worker hand samples were collected and after an initial enrichment with Brucella nutritional broth, they were grown on Palcom agar. Following biochemical confirmation, the DNA of the suspected colonies was extracted by boiling and amplified by PCR with primers Prs (Listeria genus) and DG69-DG74 (Listeria monocytogenes species). Antibiotic resistance of confirmed isolates was assessed by the disc diffusion method against five antibiotics. Of 150 samples, 14 (9.33%) were confirmed using biochemical assays. Based on the PCR results, ten samples of raw milk (6.67%), one sample of milking equipment (0.67%) and one hand sample of workers (0.67%) were identified as Listeria and eight samples of raw milk (5.33%), one sample of milking equipment (0.67%) and one hand sample of workers (0.67%) gave positive results for Listeria monocytogenes species. Confirmed isolates exhibited the highest resistance to ceftizoxime (90%) and erythromycin (60%) and the highest susceptibility to amikacin (90%) and ampicillin (80%). Therefore, Listeria monocytogenes can be transferred from milking equipment and workers' hands to milk and vice versa and possible risks of listeriosis threaten raw milk consumers.

**Key words:** Palcom agar, Listeria, PCR, Listeria monocytogenes, milk, PCR

## مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یک عامل بیماری‌زای مهم است که باعث ایجاد عفونت با میزان مرگ‌ومیر بالا در افراد مسن، زنان باردار، نوزادان، سالمندان و افراد دارای نقص ایمنی می‌شود (۱۷، ۱۱). اگرچه این بیماری در افراد عادی نیز ممکن است ایجاد شود. تظاهرات بالینی لیستریوز تهاجمی در انسان معمولاً شدید است و شامل سقط جنین، سپتی سمی و مننژوانسفالیت می‌شود. لیستریوز همچنین می‌تواند به‌عنوان سندرم گاستروانتریت همراه با تب ظاهر شود. علاوه بر انسان، لیستریا مونوسیتوژنز بسیاری از گونه‌های مهره‌دار، از جمله پرندگان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۱).

عفونت لیستریا مونوسیتوژنز در گاو عمدتاً با مننگوانسفالیت و سقط همراه است، اما همچنین ممکن است منجر به سپتی سمی نوزاد، ورم پستان و کراتیت شود. عفونت لیستریا ایوانووی با مرگ جنین، مرده‌زایی و زایمان زودرس در نشخوارکنندگان همراه است ولی شیوع کمتری نسبت به لیستریا مونوسیتوژنز دارد. لیستریوزیس پراکنده در گاوها می‌تواند به دلیل شکست باروری و مرگ‌ومیر، ضررهای اقتصادی قابل‌توجهی را ایجاد کند (۱۶).

وجود لیستریا مونوسیتوژنز در همه جای محیط، خطر بالای آلودگی مواد غذایی، طی فرآیندهای تولید مواد غذایی را باعث می‌شود. لیستریا مونوسیتوژنز از محیط‌های طبیعی، مزارع، خاک، آب، سیلو، سبزیجات در حال پوسیدگی، مدفوع و بافت‌های انسان و حیوان، صنایع تبدیلی مواد غذایی و محصولات غذایی فرآوری شده جدا شده است (۱, ۲۰). اگرچه محیط زیست مخزن طبیعی گونه‌های لیستریا است که در آن به‌صورت ساپروفیت زندگی می‌کنند، اما با فعالیت انسان و حیوان، شیوع آن افزایش می‌یابد. محیط‌های مزرعه و حیوانات دارای تنوع ژنتیکی بالایی از گونه‌های لیستریا هستند (۷، ۲). علاوه بر این، سویه‌های پایدار می‌توانند سال‌ها در محیط مزرعه باقی بمانند و کنترل آن را به چالش تبدیل کنند (۹). علاوه بر این، حیوانات مزرعه می‌توانند به‌عنوان ناقلان بی‌علامت لیستریا مونوسیتوژنز عمل کنند که منجر به انتشار پاتوژن توسط مدفوع آن‌ها به محیط، سطوح مزرعه، و تجهیزات (مثلاً تجهیزات شیردوشی) یا مستقیماً از طریق شیر یا گوشت شوند (۱۹، ۱۲، ۶). این مسیرها منجر به ورود لیستریا مونوسیتوژنز به‌عنوان آلاینده به غذاهای مصرفی انسان و حیوان نیز می‌شوند. این باکتری می‌تواند در نتیجه آلودگی متقاطع توسط کارگران (ناقلین انسانی)، حمل و نقل حیوانات

(ریزش مدفوع)، غذای خام (مانند شیر) و مواد حاصل از محصولات، خاک و سیلو به صنایع غذایی وارد شود (۱۵، ۸).

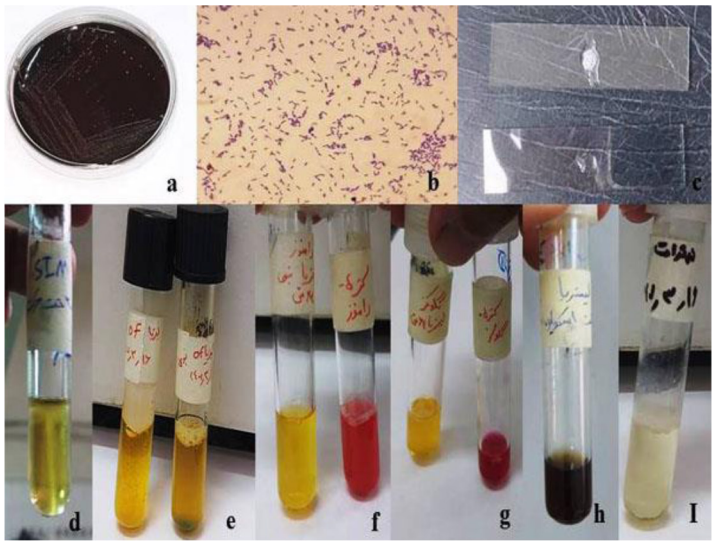
از آنجا که لیستریا مونوسیتوژنز یک عامل مهم عفونت غذازاد است و امکان ورود آلودگی از دام آلوده به شیر وجود دارد و با توجه به این مسئله که شیر و محصولات لبنی که به شیوه ی سنتی تهیه شده‌اند طرفداران زیادی در کشور ایران دارد. امکان نادیده گرفته شدن اصول پاستوریزه‌سازی شیر در شیوه سنتی وجود دارد و با توجه به احتمال ایجاد بیماری در انسان، در این مطالعه، تصمیم گرفته شد که فراوانی آلودگی شیر خام، تجهیزات جمع‌آوری شیر و دست کارگران را به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در گاوداری های شهرکرد بررسی شود.

## روش کار

به‌منظور نمونه‌برداری از شیر به گاوداری‌های اطراف شهرکرد مراجعه شد. از هر سر پستانک مقداری شیر در لوله ی فالکون ۵۰ جمع‌آوری شد. در نهایت تعداد ۷۰ نمونه شیر جمع‌آوری گردید. به‌منظور نمونه‌برداری از تجهیزات جمع‌آوری شیر و دست کارگران از محیط براث آبگوشت مغذی بروسلا استفاده شد. نمونه‌برداری به‌وسیله ی سواپ از سطح تجهیزات جمع‌آوری شیر موجود در دامداری‌ها و دست کارگران انجام شد و سواپ به درون لوله‌های حاوی محیط کشت منتقل شد. نمونه‌های به درون یونیلت منتقل شدند و جهت حفظ دمای مناسب نگهداری نمونه، از کیسه‌های حاوی پودر یخ استفاده گردید و در نهایت یونولیت‌ها در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. پس از انتقال نمونه‌های شیر به آزمایشگاه، فالکون‌های ۵۰ حاوی نمونه شیر به درون سانتریفیوژ منتقل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ نمونه شیر سه‌لایه در فالکون تشکیل شد که بالاترین و اولین لایه چربی، لایه میانی سرم شیر و لایه‌ی پایین مربوط به رسوب شیر است که باکتری موردنظر در این لایه قرار گرفته است. جهت غنی‌سازی از لایه‌ی رسوب یک لوپ گرفته شد و به محیط آبگوشت مغذی بروسلا منتقل شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد باکتری‌های از این محیط جهت کشت، رنگ‌آمیزی، تست‌های بیوشیمیایی و استخراج DNA مورداستفاده قرار گرفت.

نمونه‌های تجهیزات جمع‌آوری و نمونه‌های دست کارگران جهت غنی‌سازی اولیه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت تا باکتری‌ها زمان کافی جهت رشد داشته باشند و پس از این مدت از این محیط جهت انجام کشت روی محیط کشت، رنگ‌آمیزی، تست‌های بیوشیمیایی و استخراج DNA استفاده شد. محیط کشت انتخابی جهت شناسایی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز محیط پالکام لیستریا سلکتیو آگار (Palcam Listeria Selective Agar) همراه با ساپلیمت بود که پس از آماده‌سازی محیط پیش از سفت شدن ساپلیمت به محیط افزوده شد و پس سفت شدن محیط کشت به‌وسیله‌ی لوپ استریل از محیط‌های براث نمونه‌های شیر، تجهیزات جمع‌آوری شیر و دست کارگران بر روی محیط کشت پالکام کشت چهارمنطقه‌ای انجام شد.

محیط‌های کشت پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری از نظر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفته و کلنی‌های مشکوک به لیستریا (کلنی‌های خاکستری و محدب با هاله مشکی) به‌منظور تهیه‌ی محیط خالص به پلیت جدید منتقل گردیدند (شکل ۱). تایید بیشتر نمونه‌های مشکوک تحت آزمایشات بیوشیمیایی شامل آزمون رنگ‌آمیزي گرم، آزمون کاتالاز، حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تولید اسید از گلوکز، مانیتول،MR/VP، رامنوز، گزیلوز، احیاي نیترات و هیدرولیز




شکل ۱- نتایج تست بیوشیمیایی a: کلنی های باکتری در محیط پالکام b: رنگ آمیزی گرم c: تست کاتالاز d: تست حرکت e:محیط of توانایی تولید اسید در شرایط هوازی و بی هوازی f: توانایی مصرف رامنوز g: توانایی مصرف گلوکز h: تست هیدرولیز اسکولین I:تست نیترات.

اسکولین و همچنین تست CAMP با استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد (شکل ۱). پس از استخراج DNA با روش جوشاندن، به منظور تایید نهایی آزمون PCR با کمک دو جفت پرایمر انجام شد. مقدار دقیق ترکیبات مورداستفاده جهت تهیه مسترمیکس PCR در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

سپس جهت تکثیر ژن هدف به‌وسیله‌ی پرایمر ژن Prs برای شناسایی جنس لیستریا و پرایمرهای DG۷۴-DG۶۹ جهت شناسایی گونه‌ی لیستریا مونوسیتوژنز مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی مطابق با جدول شماره ۳ انجام گرفت. توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ آماده است. در نهایت از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد جهت بررسی نتایج مولکولی استفاده شد. نمونه‌های دارای قطعه ژنی با اندازه ۱۰۱ bp به عنوان نمونه‌های آلوده به جنس لیستریا، و نمونه‌های دارای قطعه ژنی با اندازه ۶۳۶ bp به عنوان نمونه‌های آلوده به گونه لیستریا مونوسیتوژنز تایید شدند.

## نتایج

از میان ۱۵۰ نمونه گرفته شده از شیر خام گاو، تجهیزات جمع‌آوری شیر و دست کارگران تعداد ۱۸نمونه از نظر ریخت‌شناسی کلنی روی محیط کشت پالکام سلکتیو اگار (کلنی‌های خاکستری و محدب با هاله مشکی) مثبت بودند (شکل ۱، بخش a). از این ۱۸ نمونه تعداد ۱۶ نمونه مربوط به نمونه‌های شیر خام، ۱ نمونه مربوط به تجهیزات جداسازی شیر و ۱ مورد مثبت از دست کارگران جداسازی شده بود. بر اساس تست‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی نمونه‌های مشکوک به لیستریا مونوسیتوژنز که در کشت نمونه‌ها مشخص شده بود تعداد ۱۴ نمونه ویژگی‌های بیوشیمیایی لیستریا مونوسیتوژنز را نشان دادند. از این تعداد ۱۲ نمونه مربوط به شیر خام و ۱ نمونه مربوط به تجهیزات جمع‌آوری شیر و ۱ نمونه مربوط به دست کارگران بود.

به منظور تایید نهایی جدایه‌ها، تست PCR بر روی هر ۱۸ نمونه مشکوک که در روش کشت جداسازی شده بودند، انجام شد. ابتدا از پرایمر Prs به منظور شناسایی جنس لیستریا استفاده شد که از میان ۱۸ نمونه تعداد ۱۰ نمونه شیر و ۱ نمونه دست و ۱ نمونه تجهیزات از نظر جنس لیستریا مثبت شدند (شکل ۲).

نتایج آزمون PCR به وسیله ی پرایمر DG۷۴-DG۶۹ مربوط به گونه لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد، ۸ نمونه مربوط به شیر خام و یک نمونه دست و یک نمونه تجهیزات از نظر وجود لیستریا مونوسیتوژنز مثبت بودند که معادل ۵/۳۳ درصد کل نمونه ها و ۱۱/۴۳ درصد نمونه‌های شیر

**جدول ۱- ترکیبات مستر میکس مورد استفاده در آزمون مولکولی.**

| نام ترکیب | مقدار (میکرولیتر) |
|---|---|
| پرایمر پیشرو | ۰,۶ |
| پرایمر معکوس | ۰,۶ |
| ۱۰x PCR buffer | ۳ |
| DNTPs | ۲,۵ |
| آب مقطر | ۱۳,۷ |
| Taq DNA polymerase | ۰,۶ |
| Total | ۲۱ |

**جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR.**

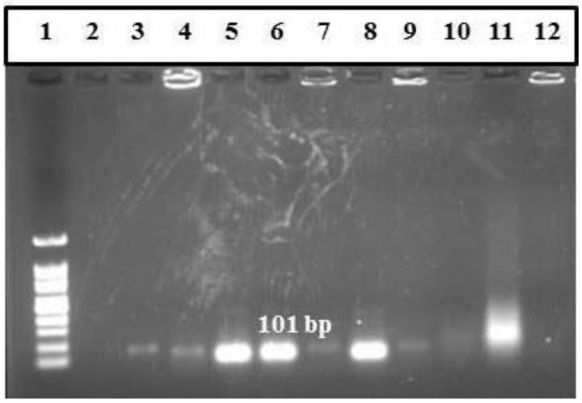
| نام پرایمر | توالی پرایمر | اندازه قطعه |
|---|---|---|
| Prs (all Listeria species) | Forward ۵'-ACGCATGTTGTTCGCAC ۳-<br>Reverse ۵'-TGGAAGAGCGATGGAGTT۳- | ۱۰۱ bp |
| DG-۶۹DG۷۴ (Listeria monocytogenes) | Forward ۵'-GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA۳-<br>Reverse ۵'-CGCCACACTTGAGATAT۳-' | ۶۳۶ bp |

خام است (شکل ۳). درصد شیوع کلی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از گاوداری‌های شهرستان شهرکرد، با روش‌های کشت و مولکولی در جدول ۴ نشان داده شده است.

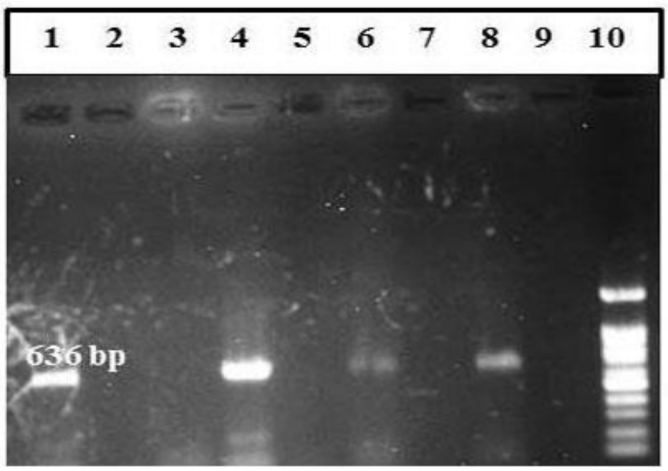
در این مطالعه بیشترین مقاومت جدایه‌های تایید شده، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتی زوکسیم (۹۰٪) و اریترومایسن (۶۰٪) و بیشترین حساسیت نسبت به آمیکاسین (۹۰٪) و آمپی‌سیلین (۸۰٪) بود. همچنین در رابطه با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بیش از نیمی از جدایه‌ها (۶۰٪) از خود مقاومت نشان دادند (جدول ۵ و شکل ۴).

## بحث

بیماری لیستریوز توسط باکتری گرم مثبت لیستریا مونوسیتوژنز که همه‌جا یافت می‌شود، ایجاد می‌شود و قادر است در مواد غذایی با رطوبت نسبتاً کم و غلظت نمک بالا رشد کنند. مهم‌تر از همه، این باکتری در دماهای پایین رشد می‌کند. همچنین می‌تواند گیاهان را آلوده کند، توسط حیوانات گیاهخوار بلعیده شود، به مجرای روده آن‌ها برسد، با میکروبیوتای روده آن‌ها رقابت کند و بدون علامت از طریق مدفوع در محیط دفع شود. تعداد زیادی از پستانداران و پرندگان لیستریا مونوسیتوژنز را در مدفوع خود حمل می‌کنند. گاوهای شیری می‌توانند به عفونت تهاجمی سیستم عصبی مرکزی و عفونت جنینی - جفتی مبتلا شوند که به ترتیب منجر به بیماری چرخش و سقط جنین می‌شود (۱۴، ۳). ویژگی‌های بالینی لیستریوز در حیوانات شامل سپتی سمی، انسفالیت و سقط جنین، به‌ویژه در نشخوارکنندگان اهلی (گوسفند، بز، و گاو) است (۲۱). انسفالیت در نشخوارکنندگان بالغ شایع‌ترین شکل شناخته شده است. انسفالیت لیستریا در نشخوارکنندگان عمدتاً یک عفونت موضعی ساقه مغز است




شکل ۲- نتیجه PCR به وسیله ی پرایمر ژن prs جنس لیستریا: چاهک ۱: مارکر (۱۰۰ bp)، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۶: کنترل مثبت، چاهک های ۵-۲، ۹-۷، ۱۱: نمونه های مثبت، چاهک های ۱۰، ۱۲: نمونه های منفی.




شکل ۳- نتایج PCR به وسیله ی پرایمر DG۷۴-DG۶۹ مربوط به گونه لیستریا مونوسیتوژنز: چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک های ۴، ۶، ۸: نمونه های مثبت، چاهک های ۳، ۵، ۷، ۹: نمونه های منفی، چاهک ۱۰: مارکر (۱۰۰ bp).

که با صعود این باکتری به عصب سه‌قلو ایجاد می‌شود و منجر به فلج یک‌طرفه عصب جمجمه، سندرم بیماری چرخشی، افسردگی و بی‌اشتهایی می‌شود. منژیت منتشر یا منژوانسفالیت فقط در موارد استثنایی در این‌گونه ها گزارش شده است (۱۰، ۶). در نشخوارکنندگان، سقط معمولاً دیررس است، و اگرچه کمتر گزارش شده است، ورم پستان با عفونت لیستریا مونوسیتوژنز همراه است (۴).

ورم پستان یک بیماری چندگونه‌ای است که باعث خسارات سنگین اقتصادی برای صنایع لبنی در سراسر جهان می‌شود. ورم پستان لیستریایی که درمان آن از مشکل‌ترین درمان‌ها است، منجر به ازبین‌بردن حیوانات آلوده از گله می‌شود. عامل عفونت می‌تواند در شیر دام باقی‌مانده و به دلیل نداشتن تکنیک‌های مناسب، موردتوجه قرار نگرفته یا تشخیص داده نشود (۲۰، ۲) در بررسی که Seyoum و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در شیر خام گاو و فرآورده‌های آن در ارتفاعات مرکزی اتیوپی داشتند، تعداد ۴۴۳ نمونه شیر جمع‌آوری شد، سپس نمونه‌ها به کمک مشاهدهٔ میکروسکوپی و ویژگی‌های ظاهری کلنی روی محیط آکسفورد آگار از نظر وجود گونه‌های لیستریا بررسی شدند. تأیید با استفاده از نتایج بیوشیمیایی (کاتالاز، زایلوس، مانیتول و تخمیر رامنوز و آزمایش CAMP با استفاده از Staphylococcus aureus ATCC ۲۵۹۲۳) انجام شد. شیوع کلی گونه‌های لیستریا ۲۸,۴٪ و به طور خاص لیستریا مونوسیتوژنز ۵,۶٪ بود، آلودگی در پنیر ۶۰ درصد بود، آلودگی نمونه‌های شیر پاستوریزه (۴۰ درصد)، شیر خام (۱۸/۹ درصد) و ماست (۵ درصد) گزارش گردید (۱۸). در این مطالعه تایید نهایی جداسازی لیستریا بر اساس تست های بیوشیمیایی بوده است و احتمال خطا در نتایج وجود دارد.

Tahouna و همکاران در سال ۲۰۱۷ به‌منظور جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز از شیر خام تجهیزات و کارگران دامداری‌ها در کشور مصر، تعداد ۳۰۰ نمونه از چهار دامداری جمع‌آوری کردند، نمونه‌های مثبت از نظر لیستریا بعدتر به منظور تأیید توسط PCR مورد آزمایش قرار گرفتند که از میان ۳۰۰ نمونه، تعداد ۷۹ نمونه از نظر وجود لیستریا مثبت بودند، که از این تعداد ۲۹ مورد مربوط به شیر خام، ۳۲ مورد مربوط به تجهیزات و ۱۸ مورد مربوط به نمونه‌های سواپ دست کارگران بود. ۸۷/۳٪ جدایه ها مربوط به لیستریا مونوسیتوژنز شایع‌ترین گونه جداسازی شده بود و ۱۲/۷٪ مربوط به گونه‌ی اوکوا بود. جدایه های لیستریا مونوسیتوژنز بیشترین مقاومت را نسبت به تتراسایکلین و کلیندامایسین

**جدول ۳- برنامه‌ی دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR.**

| دما (سانتی‌گراد) | زمان (دقیقه -) | تعداد سیکل | مرحله |
|---|---|---|---|
| ۹۴ | ۴ | ۱ | Inihal hold |
| ۹۴ | ۰/۳۰ | ۳۷ | Denaturation |
| ۵۴ | ۰/۳۰ | ۳۷ | Annealing |
| ۷۲ | ۱ | ۳۷ | Extension |
| ۷۲ | ۱۰ | ۱ | Final |
| ۱۵ | ۵ | ۱ | Hold |

**جدول ۴- مقایسه توصیفی نتایج مثبت در روش کشت با روش مولکولی.**

| Samples | Positives - n (٪) | | |
|---|---|---|---|
| | Culture | PCR | |
| | | All Listeria species | Listeria monocytogenes |
| Milk (۷۰) | (٪۱۰,۶۷)(٪۲۲,۸۶)۱۶ | (٪ ۶,۶۷)(٪۱۴,۲۹)۱۰ | (٪ ۵,۳۳)(٪۱۱,۴۳) ۸ |
| Equipment (۴۰) | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ |
| Hand (۴۰) | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ | (٪۰,۶۷)(٪۲,۵)۱ |
| Total (۱۵۰) | (٪۱۲) ۱۸ | (٪ ۸) ۱۲ | (٪ ۶,۶۷) ۱۰ |

*درصد ها به ترتیب از چپ به راست نسبت به خود دسته و کل نمونه ها می باشد.

(۸۱٪، هرکدام) و ریفامپیسین (۷۱/۴٪) داشتند، درحالی‌که حساسیت به آمپی‌سیلین، لووفلوکساسین، موکسیفلوکساسین، لینزولید و تیگسیکلین (۱۰۰٪، هریک) مشاهده شد. علاوه بر این، ۸۸٪ از جدایه های لیستریا مونوسیتوژنز مقاومت چند دارویی نشان داد (۱۰). در این مطالعه تمامی ۳۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از چهار دامداری می باشد و علت شیوع بالای باکتری لیستریا می تواند نمونه‌برداری محدود از این محل‌ها باشد همچنین این مطالعه مقاومت بالا نسبت به تتراسایکلین را نشان می‌دهد.

در مطالعه صورت‌گرفته توسط Kwarteng و همکاران، شیوع و ویژگی‌های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از شیر خام، شیر گرم شده و نونو (ماست محلی) در سال ۲۰۱۸ در غنا بررسی شد. در مجموع ۲۵۴ نمونه، شامل ۱۱۴ شیر خام گاو، ۵۶ شیر حرارت دیده و ۸۴ نونو از مزارع لبنی و فروشندگان بازار برای تشخیص جمع‌آوری شد. نمونه‌ها توسط تکنیک‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی از نظر وجود لیستریا مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت وجود لیستریا مونوسیتوژنز توسط تست PCR تأیید شد که تمامی مراحل بیان شده مشابه با کارهای صورت گرفته در این مطالعه می‌باشد. در مجموع ۱۴ نمونه معادل ۵،۵٪ نمونه‌ها به لیستریا مونوسیتونز آلوده بودند که از این میزان ۱۰ نمونه مربوط به شیر خام و ۴ نمونه مربوط به نونو بودند. از شیر حرارت دیده لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی نشد. بر اساس تست MIC مورداستفاده در این مطالعه، جدایه‌های لیستریا مونوسیتوژنز عموماً به آموکسی‌سیلین ۱۰۰٪، آمپی‌سیلین ۱۰۰٪، اریترومایسین ۱۰۰٪، جنتامایسین ۱۰۰٪، پنی‌سیلین ۱۰۰٪، ریفامپیسین ۱۰۰٪ و ونکومایسین ۱۰۰٪ حساس بودند

بااین‌حال، مقاومت فنوتیپی در برابر نئومایسین ۶۱/۳٪ و تتراسایکلین ۲۴/۲٪ مشاهده شد، درحالی‌که حساسیت‌های متوسط برای کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، داکسی سایکلین، کانامایسین، نئومایسین، استرپتومایسین و تتراسایکلین مشاهده گردید (۱۴). بررسی نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطالعه فوق نشان‌دهنده افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های جداسازی شده در این مطالعه می‌باشد.

**جدول ۵- پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های تایید شده لیستریا مونوسیتوژنز.**

| Status | Susceptible | | Intermediate | | Resistant | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antimicrobial | No | ٪ | No | ٪ | No | ٪ |
| Oxytetracycline | ۶ | ۶۰ | ۲ | ۲۰ | ۲ | ۲۰ |
| Ampicillin | ۸ | ۸۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۲۰ |
| Ceftizoxime | ۲ | ۲۰ | ۰ | ۰ | ۸ | ۸۰ |
| Erythromycin | ۴ | ۴۰ | ۰ | ۰ | ۶ | ۶۰ |
| Amikacin | ۹ | ۹۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۱۰ |

**شکل ۴- نتیجه تست آنتی بیوگرام در محیط مولر هیتون آگار.**

## نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلودگی به این باکتری در شیر خام وجود دارد و در صورت عدم رعایت موارد بهداشتی در مراحل تولید، توزیع و نگهداری شیر، این محصول می‌تواند سبب انتقال عامل این بیماری زئونوز به محیط شده و به زنجیره غذایی انسان راه یابد.

## منابع مورد استفاده


1. Allerberger, F., Wagner, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical Microbiology and Infection 16(1):16-23.
2. Castro, H., Jaakkonen, A., Hakkinen, M., Korkeala, H., Lindström, M. 2018. Occurrence, persistence, and contamination routes of Listeria monocytogenes genotypes on three Finnish dairy cattle farms: a longitudinal study. Applied and environmental microbiology 84(4):e02000-17.
3. de Noordhout, CM., Devleesschauwer, B., Angulo, FJ., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., et al. 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases. 14(11):1073-82.
4. Drevets, DA., Leenen, PJ., Greenfield, RA. 2004. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. Clinical microbiology reviews 17(2):323-47.
5. Drevets, DA. 1999. Dissemination of Listeria monocytogenes by infected phagocytes. Infection and immunity 67(7):3512-7.
6. Farber, JM., Pagotto, F., Scherf, C. 2007. Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in meat products. Listeria, listeriosis, and food safety 521-88.
7. Gómez-Laguna, J., Cardoso-Toset, F., Meza-Torres, J., Pizarro-Cerdá, J., Quereda, JJ. 2020. Virulence potential of Listeria monocytogenes strains recovered from pigs in Spain. Veterinary Record 187(11):e101-e101.
8. Grif , K., Patscheider, G., Dierich, M., Allerberger, F. 2003. Incidence of fecal carriage of Listeria monocytogenes in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 22(1):16-20.
9. Haley, BJ., Sonnier, J., Schukken, YH., Karns, JS., Van Kessel, J. 2015. Diversity of Listeria monocytogenes within a US dairy herd, 2004–2010. Foodborne Pathogens and Disease 12(10):844-50.
10. Jones, GS., Bussell, KM., Myers-Morales, T., Fieldhouse, AM., Bou Ghanem, EN., D'Orazio, SE. 2015. Intracellular Listeria monocytogenes comprises a minimal but vital fraction of the intestinal burden following foodborne infection. Infection and immunity 83(8):3146-56.
11. Khademi, F., Sahebkar, A. 2019. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of antibiotic-resistant Listeria species in food, animal and human specimens in Iran. Journal of food science and technology 56(12):5167-83.
12. Kim, SW., Haendiges, J, Keller, EN., Myers, R., Kim, A., Lombard, JE., et al. 2018. Genetic diversity and virulence profiles of Listeria monocytogenes recovered from bulk tank milk, milk filters, and milking equipment from dairies in the United States (2002 to 2014). PLoS One 13(5):e0197053.
13. Lecuit, M. 2020. Listeria monocytogenes, a model in infection biology. Cellular Microbiology. 22(4):e13186.
14. Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F., Jespersen, L. 2018. Prevalence and characteristics of Listeria monocytogenes isolates in raw milk, heated milk and nunu, a spontaneously fermented milk beverage, in Ghana. Beverages 4(2):40.
15. Quereda, JJ., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., García-del Portillo, F., Pucciarelli, MG., et al. 2021. Pathogenicity and virulence of Listeria monocytogenes: A trip from environmental to medical microbiology. Virulence 12(1):2509-45.
16. Rocha, CE., Mol, JP., Garcia, LN., Costa, LF., Santos, RL., Paixão, TA. 2017. Comparative experimental infection of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii in bovine trophoblasts. PLoS One 12(5):e0176911.
17. Ryser, ET. Listeria. Foodborne Infections and Intoxications: Elsevier. p. 201-20.
18. Seyoum, ET., Woldetsadik, DA., Mekonen, TK., Gezahegn, HA., Gebreyes, WA. 2015. Prevalence of Listeria monocytogenes in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. The Journal of Infection in Developing Countries 9(11):1204-9.
19. Tahoun, AB., Abou Elez, RM., Abdelfatah, EN., Elsohaby, I., El-Gedawy, AA., Elmoslemany, AM. 2017. Listeria monocytogenes in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. Journal of global antimicrobial resistance 10:264-70.
20. Tang, J. 2013. Risk Assessment of Listeria monocytogenes in Ready-to-eat Meat from Plants to Consumption: Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University.
21. Vázquez-Boland, JA., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., et al. 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical microbiology reviews 14(3):584-640.