

Determination of *Listeria monocytogenes* contamination and investigation of the frequency of virulence and antibiotic resistance genes in ready-to-eat foods

Nematollah Mehdizadeh ghahdarijani¹, Seyed Majid Hashemi^{2*}

1- Graduated in Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2- Assistant Professor, Nutrition and Organic Products Research Center, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Corresponding Author s.hashemi3233@iau.ir

Abstract

Listeria monocytogenes is a dangerous foodborne pathogen that causes listeriosis in immunocompromised individuals, the elderly, and pregnant women, and has become a serious public health issue along with antimicrobial resistance (AMR). The focus of this study is on determining *Listeria monocytogenes* contamination and investigation of the frequency of virulence and antibiotic resistance genes in ready-to-eat foods. In this study, 180 food samples including salad dressing, chicken nuggets, meat nuggets, chicken sandwiches, sausage sandwiches, and chicken schnitzel were randomly sampled from distribution centers in Falavarjan County, Isfahan Province and transported to the laboratory. The results showed that the prevalence of *Listeria monocytogenes* infection was 13 samples (7.22%) and the highest frequency of antibiotic resistance genes was related to the *strA* gene (100%) and *ermA* (84.61%). The prevalence of *ermB*, *tetS*, *tetA* and *ermC* genes in the studied *Listeria monocytogenes* strain was 38.46%, 46.15%, zero and zero, respectively. PCR results showed that out of 13 food samples contaminated with *Listeria monocytogenes*, 2 samples (1.11%) were related to the *inlA* gene. Antibiotic results showed that the highest resistance was related to penicillin and ampicillin with 100% resistance and the lowest resistance was related to chloramphenicol and imipenem with 100% sensitivity. The results showed that RTE foods can carry *Listeria monocytogenes*, which in the event of infections caused by it, the use of antibiotics should be arbitrarily limited.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, antibiotic resistance, antimicrobial resistance, ready-to-eat foods

تعیین آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و بررسی فراوانی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در مواد غذایی آماده مصرف

نعمت‌اله مهدیزاده قه‌دیریجانی^۱، سید مجید هاشمی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

s.hashemi3233@iau.ir

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز یک پاتوژن خطرناک منتقل شونده از طریق مواد غذایی است که باعث ایجاد لیستریوز برای افراد دارای نقص ایمنی، افراد مسن و زنان باردار می‌شود و در کنار مقاومت ضد میکروبی (AMR) به یک مسئله جدی بهداشت عمومی تبدیل شده است. تمرکز این پژوهش روی تعیین آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز و بررسی فراوانی ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی در مواد غذایی آماده است. در این مطالعه تعداد ۱۸۰ نمونه مواد غذایی شامل سالاد اولویه، ناگت مرغ، ناگت گوشت، ساندویچ مرغ، ساندویچ کالباس و شنیسل مرغ به صورت تصادفی از مراکز عرضه در شهرستان فلاورجان استان اصفهان نمونه گیری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نتایج نشان داد میزان شیوع آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز ۱۳ نمونه (۷/۲۲ درصد) بود و بیشترین فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به ژن *strA* ۱۰۰ درصد و *ermA* ۸۴/۶۱ درصد بود. شیوع ژن های *ermB*، *tetS*، *tetA* و *ermC* در سویه لیستریا مونوسیتوژنز مورد مطالعه به ترتیب ۳۸/۴۶ درصد، ۴۶/۱۵ درصد، صفر و صفر بود. نتایج PCR نشان داد از ۱۳ نمونه مواد غذایی آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز ۲ نمونه (۱/۱۱ درصد) مربوط به ژن *inlA* بود. نتایج آنتی بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت مربوط به پنی سیلین و آمپی سیلین با ۱۰۰ درصد مقاومت و کمترین مقاومت مربوط به کلرامفنیکل و ایمپنم با ۱۰۰ درصد حساسیت بود. نتایج نشان داد مواد غذایی RTE می‌توانند حامل لیستریا مونوسیتوژنز باشند که در صورت بروز عفونت های ناشی از آن استفاده از آنتی بیوتیک ها به صورت خودسرانه محدود گردد.

واژه های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت ضد میکروبی، مواد غذایی آماده

مقدمه

غذاهای ایمن و مغذی برای حفظ زندگی و ارتقای سلامت، حیاتی هستند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت ۶۰۰ میلیون نفر در جهان با مصرف غذای آلوده بیمار می‌شوند که سالانه ۴۲۰۰۰۰ نفر جان خود را از دست می‌دهند و ۱۱۰ میلیارد دلار هزینه‌های پزشکی سالانه در کشورهای جهان صرف درمان بیماری‌های ناشی از غذا می‌شود (Zamuz et al., 2021). بروز بیماری‌هایی که از طریق مصرف مواد غذایی آلوده منتقل می‌شوند، یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است. آلودگی گوشت به باکتری‌های بیماری‌زا یکی از نگرانی‌های اصلی بهداشتی و اقتصادی در سرتاسر جهان است، زیرا مصرف گوشت و فرآورده‌های گوشتی و غذاهای آماده مصرف آلوده می‌تواند باعث بیماری‌های جدی ناشی از غذا شود (Abatcha, 2017). تغییر سبک زندگی در سراسر جهان از جمله غذاهای روآوردن به غذاهای راحت مصرف، سبب رخداد طیف گسترده‌ای از مسائل میکروبیولوژیکی در حال ظهور در ایمنی مواد غذایی شده است. در موسسات خدمات غذایی، علاوه بر غذاهای آماده در یخچال (RTE) (Ready to Eat) (مانند ساندویچ‌ها و دسرها) محصولات گرم مانند شیرینی‌ها نیز در اختیار مصرف کنندگان قرار می‌گیرد. غذاهای RTE، به ویژه سالادها و ساندویچ‌ها در شیوع بیماری‌های ناشی از غذا نقش دارند، زیرا این غذاها اغلب با دست تهیه می‌شوند و این تماس مستقیم ممکن است منجر به افزایش میزان آلودگی با عوامل بیماری‌زای بالقوه غذایی شود (Kotzekidou, 2013).

غذاهای آماده (RTE) شامل انواع مختلفی از محصولات غذایی است که می‌توان آنها را به روش‌های مختلف دسته‌بندی کرد. طبق تعریف ارائه شده توسط کمیسیون Codex Alimentarius، غذاهای RTE شامل هر ماده غذایی (از جمله نوشیدنی) است که به طور معمول به صورتی که نیاز به پروسه حرارتی نداشته باشد، مصرف می‌شود، تعریف شده است. غذاهای RTE در کشورهای مختلف با توجه به عادات غذایی محلی، در دسترس بودن، و یکپارچگی زنجیره سرما و مقررات متفاوت است. تقاضا برای غذاهای RTE منجر به افزایش مقدار و انتخاب محصولات در دسترس برای مصرف کنندگان شده است (Almualla et al., 2010). اخیراً افزایش قابل توجهی در عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی در سراسر جهان مشاهده شده است و یکی از عوامل باکتریایی دخیل، لیستریا مونوسیتوزنر است. سازمان ایمنی غذای اروپا (EFSA) گزارش داده است که لیستریا مونوسیتوزنر رتبه پنجم را در میان شیوع بیماری‌های ناشی از غذا دارد (EFSA, 2015).

لیستریا مونوسیتوزنر یک پاتوژن درون سلولی اختیاری است و نکته کلیدی در عبور از سد روده و ایجاد لیستریوز، تهاجم فعال باکتری‌ها به سلول‌های میزبان است که فاکتورهای حدت InlA و InlB مسئول تهاجم فعال لیستریا مونوسیتوزنر در سلول‌های غیر فاگوسیتیک پستانداران، یعنی سلول‌های اپیتلیال، اندوتلیال و پارانشیمی هستند (Povolyaeva et al., 2020). لیستریا مونوسیتوزنر دوفسفولیپاز ترشح می‌کند، PlcA یک فسفاتیدیلینوزیتول فسفولیپاز C است و PlcB یک فسفاتیدیل کولین فسفولیپاز C است که به ترتیب توسط PlcA و PlcB کدگذاری می‌شود (Pizarro-Cerda and Cossart, 2018). آنتی‌بیوتیک‌ها از مهم‌ترین روش‌های درمان عفونت‌های ناشی از لیستریا مونوسیتوزنر هستند. آمینوپنی‌سیلین‌ها را می‌توان با کوتریموکسازول، فلوروکینولون‌ها، ریفامپیسین یا لینزولید نیز جایگزین کرد (Baquero et al., 2020). اما مقاومت لیستریا مونوسیتوزنر به عوامل ضد میکروبی امروزه به یکی از چالش‌های مهم علوم پزشکی بدل شده است که پایش آلودگی به لیستریا مونوسیتوزنر در مواد غذایی را بیش از پیش ضروری می‌کند (Zhang et al., 2024). در همین راستا هدف از پژوهش حاضر بررسی شیوع ضد میکروبی لیستریا مونوسیتوزنر در غذاهای آماده مصرف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش تعداد ۱۸۰ نمونه مواد غذایی شامل سالاد اولویه ۳۰ نمونه، ناگت مرغ ۳۰ نمونه، ناگت گوشت ۳۰ نمونه، ساندویچ مرغ ۳۰ نمونه، ساندویچ کالباس ۳۰ نمونه و شنیسل مرغ ۳۰ نمونه به صورت تصادفی از مراکز عرضه این محصول در شهرستان فلاورجان استان اصفهان در مدت زمان ۶ ماه نمونه‌گیری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها در فلاسک یخ و جهت جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه راهی آزمایشگاه شدند.

روش جستجوی لیستریا مونوسیتوژنز

نمونه‌ها در هر کدام از محیط‌های مغذی نوترینت آگار (Nutrient agar (Merck, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. به منظور رشد پرگنه‌های لیستریا، باکتری‌ها از محیط مغذی ثانویه به محیط آگار انتخابی لیستریا Palcam agar (Merck, Germany) انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرم خانه‌گذاری شدند. پرگنه‌های رشد کرده در هر پلیت از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. پرگنه‌های مشکوک به لیستریا را مورد آزمون رنگ‌آمیزی گرم قرار داده تا گرم مثبت یا منفی بودن آنها تشخیص داده شود. سپس روی پرگنه‌های گرم مثبت، آزمایش کاتالاز انجام شد. آزمایش حرکت در ۲۵ درجه سلسیوس روی نمونه‌هایی که کاتالاز مثبت بودند انجام گرفت و نمونه‌های مثبت مشخص شد (Rahimi et al., 2023).

جستجوی ژن‌های حدت لیستریا مونوسیتوژنز

مطابق دستورالعمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران، DNA ژنومی از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت به صورت مستقیم، تخلیص شدند. کیفیت DNA استخراج شده، پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و تابش نور ماورای بنفش بررسی شدند. در تمامی مراحل انجام این تحقیق از سویه استاندارد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC 1298) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی ژن 16SrRNA استفاده شد. توالی پرایمرها بصورت زیر است (Farhoumand et al., 2020):

F: 3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5'

R: 3'-ACGGTACCTTGTTACGACTT-5'

در تمامی واکنش‌های PCR از دستگاه چرخه حرارتی (اپندورف، آلمان) استفاده شد. فرایند تکثیر ژن در ۲۵ میکرولیتر مخلوط شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (یکتاتجهیز آزما، ایران) حاوی (۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر ۱۰x، ۱ میکرومول کلرید منیزیم) ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای یک ژن بصورت جداگانه، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب فوق خالص عاری از نوکلئاز (یکتاتجهیز آزما، ایران) انجام شد (Mureddu et al., 2014).

جدول ۱- لیست توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت و ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی لیستریا

مونوسیتوژنز

نام ژن	توالی پرایمر 5'-3'	اندازه محصول PCR (bp)	دمای اتصال پرایمر °C	شرایط PCR
<i>inlA</i>	F: CTCAGGCGGATAGATTAGG R: GATATAGGCACATTGGCGAG	552	60	94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)

94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)	58	232	F: TTCGCAAGTGAGCTTACGTC R: CTACCGCCATCGCTAATAGT	<i>inlB</i>
94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min (35 cycles)	60	1484	F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC R: CATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	<i>plcA</i>
94°C for 1 min, 59°C for 1 min, 72°C for 1 min (35 cycles)	59	795	F: GCAAGTGTCTAGTCTTTCCGG R: TCACAGCAAACCTTTGGCAGGT	<i>plcB</i>
94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, 72°C for 30 sec (35 cycles)	57	139	F: TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT R: CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	<i>ermA</i>
94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min (35 cycles)	55	639	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	<i>ermB</i>
94°C for 30 sec, 59°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)	59	572	F: CTTGGTGATAACGGCAATTC R: CCAATCGCAGATAGAAGGC	<i>strA</i>
94°C for 30 sec, 61°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)	61	420	F: TCCTTTGGGTAGTGGCATTTC R: AAGCATTCGGAATCTGCTG	<i>tetS</i>
94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)	58	546	F: GGCCTCAATTTCTGACG R: AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	<i>tetA</i>
94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min (35 cycles)	60	641	F: CAAAACATAATATAGAT R: CTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	<i>ermC</i>

ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تست آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک (Disk Diffusion) انجام شد. ابتدا، یک سوسپانسیون میکروبی از جدایه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* تهیه گردید. تراکم باکتری‌ها در سوسپانسیون با استاندارد نیم مک‌فارلند (0.5 McFarland) تنظیم شد تا تراکم یکنواختی از باکتری‌ها به دست آید. سپس، سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر-هینتون آگار (Italy, Liofilchem) به طور یکنواخت با سوسپانسیون باکتری پوشش داده شد. پس از آماده‌سازی سطح پلیت، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام که شامل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بودند، به دقت بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پس از قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌ها شامل آمپی‌سیلین (AMP)، ایمی‌پنم (IMP)، سیپروفلوکساسین (CIP)، نالیدیکسیک اسید (NA)، پنی‌سیلین (PEN)، کلرامفنیکل (CP)، استرپتومایسین (STM) و تتراسایکلین (TE) روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند تا امکان انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد هاله‌های عدم رشد فراهم شود. پس از اتمام دوره انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر دیسک با دقت اندازه‌گیری شد. بر اساس اندازه هاله‌ها، میزان حساسیت یا مقاومت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد. این اندازه‌ها با جداول استاندارد CLSI مقایسه گردید تا وضعیت مقاومت یا حساسیت مشخص شود (Heidarzadi et al., 2021).

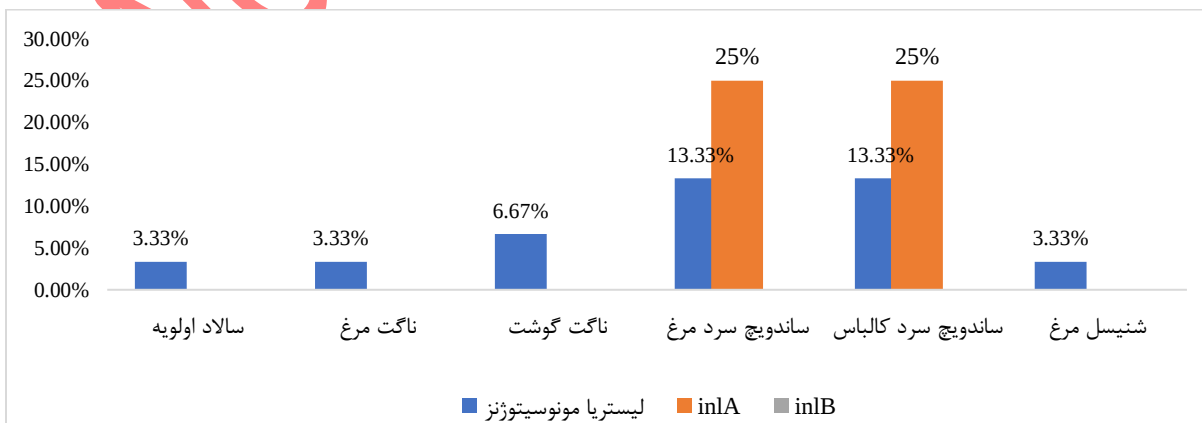
تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود.

نتایج

نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر نشان داد میزان شیوع آلودگی به لیستریا مونوسیژنر در مواد غذایی نمونه‌گیری شده، ۱۳ نمونه (۷/۲۲ درصد) بود. به این ترتیب نتایج نشان داد میزان آلودگی در سالاد اولویه ۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)، ناگت مرغ ۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)، ناگت گوشت ۲ نمونه (۶/۶۷ درصد)، ساندویچ سرد مرغ ۴ نمونه (۱۳/۳۳ درصد)، ساندویچ سرد کالباس ۴ نمونه (۱۳/۳۳ درصد)، شنپسل مرغ ۱ نمونه (۳/۳۳ درصد) بود. نتایج PCR نشان داد از ۱۳ نمونه مواد غذایی آلوده به لیستریا مونوسیژنر ۲ نمونه (۱/۱۱ درصد) مربوط به ژن *inlA* در جدایه‌های ساندویچ سرد مرغ و ساندویچ سرد کالباس بود و سایر نمونه‌های آلوده فاقد ژن‌های حدت *inlB*، *plcA* و *plcB* بودند. (جدول ۲ و نمودار ۱).

جدول ۲. نتایج شیوع ژن‌های حدت در مواد غذایی آلوده به لیستریا مونوسیژنر

ماده غذایی	تعداد	لیستریا مونوسیژنر (درصد)	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>
سالاد اولویه	۳۰	۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)	–	–	–	–
ناگت مرغ	۳۰	۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)	–	–	–	–
ناگت گوشت	۳۰	۲ نمونه (۶/۶۷ درصد)	–	–	–	–
ساندویچ سرد مرغ	۳۰	۴ ^a نمونه (۱۳/۳۳ درصد)	۱ نمونه (۲۵ درصد)	–	–	–
ساندویچ سرد کالباس	۳۰	۴ ^a نمونه (۱۳/۳۳ درصد)	۱ نمونه (۲۵ درصد)	–	–	–
شنپسل مرغ	۳۰	۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)	–	–	–	–
مجموع نمونه	۱۸۰	۱۳ نمونه (۷/۲۲ درصد)	۲ نمونه (۱/۱۱ درصد)	–	–	–



نمودار ۱، نتایج شیوع آلودگی به لیستریا مونوسیژنر در مواد غذایی نمونه‌گیری شده

نتایج نشان داد، بیشترین مقاومت مربوط به جدایه‌های پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین ۱۰۰ درصد و بیشترین حساسیت مربوط به ایمی‌پنم و کلرامفنیکل ۱۰۰ درصد بود (جدول ۳).

جدول ۳، وضعیت تعداد جدایه‌های لیستریا مونوسیژنر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (درصد)

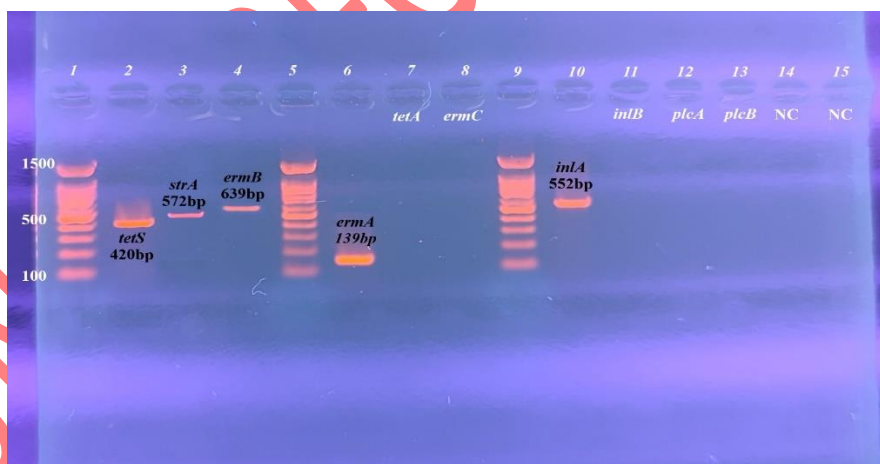
آنتی‌بیوتیک	حساس	نیم‌حساس	مقاوم
پنی‌سیلین (PEN)	–	–	۱۳ (۱۰۰)
آمپی‌سیلین (AMP)	–	–	۱۳ (۱۰۰)
نالیدیکسیک اسید (NA)	۲ (۱۵)	۲ (۱۵)	۱۱ (۸۵)
سیپروفلوکساسین (CIP)	۲ (۱۵)	۱۰ (۷۷)	۱ (۸)
کلرامفنیکل (CP)	۱۳ (۱۰۰)	–	–
تتراسایکلین (TE)	۱۱ (۸۵)	۲ (۱۵)	–
استرپتوماپسین (STM)	۳ (۲۳)	۱۰ (۷۷)	–
ایمی‌پنم (IMP)	۱۳ (۱۰۰)	–	–

بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی در این مطالعه مربوط به ژن *strA* با ۱۰۰ درصد (۱۳/۱۳) و *ermA* با ۸۴/۶۱ درصد (۱۱/۱۳) بود. شیوع ژن‌های *ermB*، *tetS*، *tetA* و *ermC* در سویه لیستریا مونوسیژنر مورد مطالعه به ترتیب ۳۸/۴۶ درصد (۵/۱۳)، ۴۶/۱۵ درصد (۶/۱۳)، صفر (۰/۱۳) و صفر (۰/۱۳) بود.

جدول ۴، نتایج شیوع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی آلوده به لیستریا مونوسیژنر

ماده غذایی	تعداد	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>strA</i>	<i>tetS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermC</i>
سالاد اولویه	۱	۱ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	–	–
ناگت مرغ	۱	۱ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	–	–	–
ناگت گوشت	۲	۲ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	۲ ۱۰۰٪	۱ ۱۰۰٪	–	–

ساندویچ سرد مرغ	۴	۳	۱	۴	۲	-	-
		۷۵٪	۲۵٪	۱۰۰٪	۵۰٪		
ساندویچ سرد کالباس	۴	۳	۱	۴	۱	-	-
		۷۵٪	۲۵٪	۱۰۰٪	۲۵٪		
شنیسل مرغ	۱	۱	-	۱	۱	-	-
		۱۰۰٪		۱۰۰٪	۱۰۰٪		
مجموع نمونه	۱۳	۱۱	۵	۱۳	۶	-	-
		۸۴٫۶۱٪	۳۸٫۴۶٪	۱۰۰٪	۴۶٫۱۵٪		



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR. چاهک های ۱، ۵ و ۹: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ چاهک های ۲-۴، ۶ و ۱۰ نشان دهنده حضور ژن های *tetS* (420bp)، *strA* (572bp)، *ermB* (639bp)، *ermA* (139bp) و *inlA* (552bp) می باشند؛ چاهک های ۷، ۸ و ۱۱-۱۳ نشان دهنده عدم حضور ژن های *tetA* (546bp)، *ermC* (641bp)، *inlB* (232bp) و *plcA* (1484bp) و *plcB* (795bp) می باشند؛ (ژن های حاضر با رنگ مشکی و ژن های غایب با رنگ سفید مشخص شدند) چاهک های ۱۴ و ۱۵ کنترل منفی هستند.

بحث

لیستریا مونوسیٹوزنر به دلیل تحمل شرایط مختلف فیزیکی و شیمیایی و توانایی آن برای رشد در دمای پایین، به عنوان یک خطر میکروبی عمده برای مدیریت ایمنی مواد غذایی از مزرعه تا مصرف، به ویژه در غذاهای آماده در یخچال در نظر گرفته می‌شود. در این چارچوب، مقررات اروپا الزامات عمومی ایمنی مواد غذایی را تعیین می‌کند که بر اساس آن مواد غذایی در صورت ناامن بودن نباید در بازار عرضه شوند (Bonanno et al., 2024). مطابق تخمین CDC تقریباً ۴۸ میلیون مورد بیماری ناشی از غذا در سال در ایالات متحده وجود دارد. لیستریوز اگرچه جزو بیماری‌های شایع در ایالات متحده نیست، اما یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از بیماری‌های ناشی از غذا است. در ایالات متحده، تقریباً ۱۶۰۰ عفونت در سال وجود دارد که منجر به مرگ حدود ۲۶۰ نفر می‌شود که مربوط به نرخ بستری شدن در بیمارستان ۹۴ درصد و نرخ مرگ و میر ۱۶ درصد است (Hanes and Huang, 2022). تمرکز این مطالعه روی بررسی ژنوتیپی لیستریا مونوسیٹوزنر در ساندویچ‌ها بود که مشخص شد، ۱۳ درصد نمونه‌ها به لیستریا مونوسیٹوزنر آلودگی دارند. همچنین بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب مربوط به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و ایمپنم و کلرامفنیکل با ۱۰۰ درصد بود.

در همین راستا پژوهشی توسط Kawacka و Olejnik (۲۰۲۴) در لهستان با هدف تعیین آلودگی به لیستریا مونوسیٹوزنر در فرآورده‌های گوشتی انجام گرفت که مشخص شد ۸/۳ درصد نمونه‌ها به لیستریا مونوسیٹوزنر آلوده بودند (Kawacka and Olejnik-Schmidt, 2024). Koskar و همکاران در سال ۲۰۱۹ شیوع لیستریا مونوسیٹوزنر در دسته‌های مختلف محصولات غذایی آماده (RTE) که از خرده‌فروشی‌ها و صنایع غذایی در یک دوره ۵ ساله تهیه شده‌اند، را انجام دادند. در مجموع ۳۰۱۶ نمونه غذای RTE برای شیوع لیستریا مونوسیٹوزنر مورد بررسی قرار گرفت و ۳/۶ درصد مثبت بود. بیشترین آلودگی در محصولات RTE غذایی با ۷/۹ درصد بود (Koskar et al., 2019). در پاکستان Nosheena و همکاران (۲۰۲۲) پژوهشی با هدف شیوع گونه‌های لیستریا گزارش دادند از مجموع ۲۰۰ نمونه سالاد نمونه‌گیری شده در بازارهای محلی، ۸/۱ درصد به لیستریا مونوسیٹوزنر آلوده بودند. نتایج آن‌ها نشان داد بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به پنی‌سیلین و کمترین میزان مقاومت مربوط به ایمپنم بود (Nosheena et al., 2022). مطالعه Flores و همکاران (۲۰۲۲) روی آلودگی به لیستریا مونوسیٹوزنر در مواد غذایی RTE، گزارش دادند از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۱۰ نمونه (۱۰ درصد) آلوده به لیستریا مونوسیٹوزنر یافت شد (Parra-Flores et al., 2022). Bustamante و همکاران (۲۰۲۰) روی آلودگی به مواد غذایی به لیستریا گزارش دادند که ۴۰۰ نمونه غذای RTE به صورت تصادفی نمونه‌گیری کردند که ۹/۶ درصد به لیستریا مونوسیٹوزنر آلوده بود. از این تعداد هفت سویه سروتیپ 1/2a و یک سویه 4b بود (Bustamante et al., 2020). در پژوهشی توسط Şanlıbaba و همکاران (۲۰۱۸) روی آلودگی به غذاهای آماده مصرف به لیستریا مونوسیٹوزنر گزارش دادند از مجموع ۲۰۱ غذای RTE، ۸/۵ درصد به لیستریا مونوسیٹوزنر آلوده بودند. همه سویه‌ها به وانکومایسین، ایمپنم، تری متوپریم و کلرامفنیکل حساس بودند (Şanlıbaba et al., 2018). پژوهشی توسط seza & Fatma (۲۰۲۰)، با هدف ارزیابی حضور گونه لیستریا در غذاهای RTE و شناسایی جدایه‌های لیستریا مونوسیٹوزنر با استفاده از شناسایی نشانگرهای حدت، سروتیپ‌ها و ارتباط ژنتیکی انجام شد. از ۳۰۰ نمونه غذای RTE، ۵۹ (۱۹/۷ درصد) برای گونه لیستریا مثبت بودند که به ترتیب شامل لیستریا اینوکوا ۱۳/۳ درصد، لیستریا مونوسیٹوزنر ۶ درصد، لیستریا ولشیمیری ۲/۳ درصد لیستریا مورائی ۱/۳ درصد و لیستریا گرائی و/یا نوئی ۱ درصد آلوده بودند. تمام جدایه‌های لیستریا مونوسیٹوزنر شناسایی شده برای ژن‌های حدت (۳۳/۳ درصد) actA، (۲۶/۷ درصد)iap، (۲۶/۷ درصد)anlA، (۶/۷ درصد)anlB، (۶/۷ درصد)anlC، (۳۳/۳ درصد)plcA و (۶/۷ درصد)prfA و بیوفیلیم مثبت بودند (Arslan and Özdemir, 2020). که مطالعات یادشده با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. میزان آلودگی به لیستریا مونوسیٹوزنر در پژوهش حاضر، ۷/۲۲ درصد بود و فراوانی ژن inlA نیز ۱/۱ درصد بود.

لیستریا مونوسیٹوزنر به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های فعال در برابر باکتری‌های گرم مثبت حساس است، به جز سفالوسپورین‌ها و فسفومایسین، که مقاومت ذاتی در برابر آنها دارند. رایج‌ترین درمان لیستریوز، آمپی‌سیلین است که به تنهایی یا همراه با جنتامایسین استفاده می‌شود (Hanes and Huang, 2022)، این در حالی است که در پژوهش حاضر، آمپی‌سیلین ۱۰۰ درصد مقاومت به لیستریا مونوسیٹوزنر نشان داد. در سال ۲۰۰۱ مقاومت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین به ترتیب در جدایه‌های لیستریا مونوسیٹوزنر ۳/۷۳ و ۱/۹۸ درصد از ۱۰۰۱ جدایه مشاهده شد

(Walsh et al., 2001). AST از ۳۱۷ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز جمع‌آوری شده از غذا، انسان و محیط در ایتالیا بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۹، مقاومت به آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، جنتامایسین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول را در ۱۰۰ درصد جدایه‌ها نشان داد (Caruso et al., 2020). در پژوهشی مروری که در سال ۲۰۲۱ منتشر شد و بر روی پاتوژن‌های غذایی جدا شده از گاوهای شیری و کود مرغی در شمال شرقی اوهایو متمرکز شد، لیستریا مونوسیتوژنز دومین پاتوژن بود که در جدایه‌ها یافت شد. تمام ایزوله‌ها حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده مقاوم بودند. به طور قابل توجهی، ۸۹/۵ درصد از ۶۷ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز دارای مقاومت آمپی‌سیلین و ۴۷ درصد دارای مقاومت به پنی‌سیلین بودند (Hailu et al., 2021). پژوهشی توسط عابدی‌فر و همکاران (۲۰۲۰)، روی آلودگی شیر خام گزارش دادند میزان شیوع به لیستریا مونوسیتوژنز ۳ درصد بود (Ebadifar et al., 2022).

در یک بررسی توسط Mclauchlin و همکاران (۲۰۲۲) با هدف تعیین میزان آلودگی باکتریایی در مواد غذایی آماده مصرف در بازار لندن انجام شد، شیوع لیستریا مونوسیتوژنز از ۲۰۰ نمونه غذایی، ۱۸ درصد تعیین شد (Mclauchlin et al., 2022). در یک مطالعه مروری توسط حیدرلو و همکاران (۲۰۲۱) فراوانی ایزوله‌های لیستریا مونوسیتوژنز جمع‌آوری شده از مجموع ۱۱۵۰ نمونه شامل ۳۰۰ نمونه غذایی و ۵۰ نمونه دامی و ۸۰۰ نمونه انسانی طی سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. الگوهای مقاومت ضد میکروبی، فاکتورهای حدت و ویژگی‌های مولکولی این جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک، تعیین توالی و سروتپ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل ۴۴ جدایه لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد که ۷۲/۷ درصد (۳۲ از ۴۴) از کل جدایه‌ها متعلق به سروتپ 1/2c و ۱۵/۹ درصد (۷ از ۴۴) به سروتپ 3c تعلق داشتند. تمام ۴۴ ایزوله به یک یا چند عامل ضد میکروبی با بیشترین مقاومت به پنی‌سیلین (۷۵ درصد) و تتراسایکلین (۴۷/۷ درصد) مقاوم بودند. از ۴۴ سویه لیستریا مونوسیتوژنز، ۱۰۰، ۶۹/۲ و ۶۲/۵ درصد از سویه‌های دام، انسان و غذا به ترتیب به پنی‌سیلین مقاوم بودند (Heidarlo et al., 2021). پژوهش Wong و همکاران (۲۰۱۲) روی آلودگی به لیستریا در مواد غذایی آماده گزارش دادند که در مجموع ۱۱۲ گوشت (۳۵ برگر گوشت گاو، ۳۹ برگر مرغ و ۳۸ همبرگر ماهی) برای حضور و تعداد لیستریا مونوسیتوژنز بررسی شدند. لیستریا مونوسیتوژنز در ۳۳/۳ درصد از نان‌های همبرگر مرغ، ۲۲/۹ درصد از برگر گوشت گاو و ۱۰/۵ درصد از نمونه‌های برگر ماهی شناسایی شد. نتایج نشان داد که اگر پ برگر آلوده بدون پخت و پز کافی مصرف شود، برگر به عنوان منبع بالقوه لیستریوز عمل می‌کند (Wong et al., 2012). پژوهشی توسط Osaily و همکاران (۲۰۱۱)، روی آلودگی مواد غذایی RTE به لیستریا انجام گرفت. نتایج روش مرسوم نشان داد که از مجموع ۲۸۰ نمونه، ۱۴۱ نمونه (۵۰ درصد) آلوده به گونه‌های لیستریا بودند. ۱۸/۲ درصد به لیستریا مونوسیتوژنز آلوده بودند؛ از بین ده آنتی‌بیوتیک آزمایش شده، پنج جدایه *L. monocytogenes* به دو آنتی‌بیوتیک (tetracycline و tilimicosin) مقاوم بودند (Osaily et al., 2011). که همگی پژوهش‌های یادشده میزان آلودگی فراتر از مطالعه حاضر را داشتند.

نتیجه‌گیری

شیوع بالای لیستریا مونوسیتوژنز حامل ژن‌های حدت به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر ممکن است نشان‌دهنده بیماری‌زایی بالقوه بالای سویه‌های مورد تجزیه و تحلیل باشد و نشان دهد که ایزوله‌های مشتق‌شده از مواد غذایی ممکن است یک خطر واقعی برای سلامت عمومی باشد. این مطالعه نشان داد که لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از مواد غذایی نمونه‌گیری شده، عمدتاً متعلق به سروتپ *inla* است که به عنوان یکی از سه سروتپ با بالاترین پتانسیل بیماری‌زایی تعریف شده است؛ بنابراین، نظارت بر حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز به دلیل افزایش تعداد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از مواد غذایی و صنایع اهمیت پیدا می‌کند. بنا به نتایج پژوهش حاضر، لازم و ضروری است که مصرف مواد غذایی RTE محدود گردد و در صورت بروز عفونت و مسمومیت ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با نظر پزشک متخصص مصرف شود و در نهایت برای مسئولان ذیربط لازم و ضروری است که قوانین سختگیرانه‌ای در حوزه‌ی بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی علی‌الخصوص مواد غذایی آماده مصرف که عمده مصرف‌کنندگان کودکان و نوجوانان هستند؛ لحاظ نمایند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی برای اعلام ندارند.

مشارکت‌های نویسندگان

نمونه گیری، انجام آزمایش‌ها و گردآوری دیتاها با نویسنده‌ی اول، انالیز آماری و نگارش مقاله با همکاری استاد راهنما انجام شد.

منابع مالی

پژوهش حاضر با استفاده از هزینه‌ی شخصی دانشجوی انجام شد.

منابع

- Abatcha, M. (2017). Salmonella and Listeria monocytogenes: A review of prevalence and antibiotic resistance in chickens and their processing environments. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 5, 395-403.
- Almualla, N. A., Laleye, L. C., Abushelaibi, A. A., Al-Qassem, R. A., Wasesa, A. A., Baboucarr, J. (2010). Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *Journal of food protection*, 73, 1328-1331.
- Ardlan, S. & Özdemir, F. (2020). Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species and molecular characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail ready-to-eat foods. *FEMS Microbiology Letters*, 367, fnaa006.
- Baquero, F., F. Lanza, V., Duval, M., Coque, T. M. (2020). Ecogenetics of antibiotic resistance in Listeria monocytogenes. *Molecular microbiology*, 113, 570-579.
- Bonanno, L., Bergis, H., Gnanou-Besse, N., Asséré, A., Danan, C. (2024). Which domestic refrigerator temperatures in Europe? Focus on shelf-life studies regarding Listeria monocytogenes (Lm) in ready-to-eat (RTE) foods. *Food Microbiology*, 123, 104595.
- Bustamante, F., Maury-Sintjago, E., Leal, F. C., Acuña, S., Aguirre, J., Troncoso, M., Parra-Flores, J. (2020). Presence of Listeria monocytogenes in ready-to-eat artisanal Chilean foods. *Microorganisms*, 8, 1669.
- Caruso, M., Fraccalvieri, R., Pasquali, F., Santagada, G., Latorre, L. M., Difato, L. M., Parisi, A. (2020). Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of Listeria monocytogenes isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy. *Foodborne pathogens and disease*, 17, 284-294.
- Ebadifar, A. M., Jaydari, A., Shams, N., Rahimi, H. (2022). Prevalence of Listeria monocytogenes in raw milk of the healthy cattle in Lorestan Province (Iran) by PCR. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*.
- ESFA 2015. The European Union Summary Report. Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agent and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14.
- Farhoumand, P., Hassanzadazar, H., Soltanpour, M. S., Aminzare, M., & Abbasi, Z. (2020). Prevalence, genotyping and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes and Escherichia coli in fresh beef and chicken meats marketed in Zanjan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(6), 537.

- Hailu, W., Helmy, Y. A., Carney-Knisely, G., Kauffman, M., Fraga, D., Rajashekara, G. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of foodborne pathogens isolated from dairy cattle and poultry manure amended farms in northeastern Ohio ,the United States. *Antibiotics*, 10, 1450.
- Hanes, R. M. Huang, Z. (2022). Investigation of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* from 2010 through to 2021. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 5506.
- Heidarlo, M. N., Lotfollahi, L., Yousefi, S., Lohrasbi, V., Irajian, G., Talebi, M. (2021). Analysis of virulence genes and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolates from human, food, and livestock from 2008 to 2016 in Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 53, 1-9.
- Heidarzadi, M., Rahnema, M., Alipoureskandani, M., Saadati, D. Afsharimoqadam, A. (2021). *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene*, 11, 42.
- Kawacka, I. Olejnik-Schmidt, A. (2024). High Prevalence of Virulence-Associated Genes and Length Polymorphism in *actA* and *inlB* Genes Identified in *Listeria monocytogenes* Isolates from Meat Products and Meat-Processing Environments in Poland. *Pathogens*, 13, 444.
- Koskar, J., Kramarenko, T., Meremäe, K., Kuningas, M., Sogel, J., Mäesaar, M., Roasto, M. (2019). Prevalence and numbers of *Listeria monocytogenes* in various ready-to-eat foods over a 5-year period in Estonia. *Journal of food protection*, 82, 597-604.
- Kotzekidou, P. (2013). Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiology*, 34, 337-343.
- McLauchlin, J., Aird, H., Amar, C. F. L., Jenkins, C., Jørgensen, F., Lai, S., Willis, C. (2022). Microbiological Quality of Ready-to-Eat Salad Products Collected from Retail and Catering Settings in England during 2020 to 2021. *Journal of Food Protection*, 85, 1680-1689.
- Mureddu, A., Mazza, R., Fois, F., Meloni, D., Bacciu, R., Piras, F., Mazzette, R. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in ready-to-eat sausages and in processing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 3.
- Nosheena, A. S., Naeem, M., Jamil, H., Farooq, P., Sadiq, M. B., Tariq, H., & Akbar, A. (2022). Presence of *Listeria* species in fresh salad products collected from quetta pakistan.
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., Nesiar, E. A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food control*, 22, 586-590.
- Parra-Flores, J., Holý, O., Bustamante, F., Lepuschitz, S., Pietzka, A., Contreras-Fernández, A., Ruppitsch, W. (2022). Virulence and antibiotic resistance genes in *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat foods in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 12, 796040.
- Pizarro J. Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiology spectrum*, 6, 10.1128/microbiolspec. gpp3-0013-2018.
- Povolyaeva, O., Chalenko, Y., Kalinin, E., Kolbasova, O., Pivova, E., Kolbasov, D., Ermolaeva, S. (2020). *Listeria monocytogenes* infection of bat *Pipistrellus nathusii* epithelial cells depends on the invasion factors *InlA* and *InlB*. *Pathogens*, 9, 867.
- Rahimi, E., Heidarzadi, M. Vahed, N. (2023). Investigation of the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fish, shrimp and eggs presented in Shahrekord city, Iran. *Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12, 145-156.
- Şanlıbaba, P., Tezel, B. U., Çakmak, G. A. (2018). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Turkey. *Journal of Food Quality*, 2018, 7693782.
- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J. J., Blair, I. S., McDowell, D. A. (2001). Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 517-522.
- Wong, W. C., Pui, C. F., Tunung, R., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Son, R. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in frozen burger patties in Malaysia. *International Food Research Journal*, 19.

- Z amuz, S., Munekata, P. E., Dzuvor, C. K., Zhang, W., Sant'Ana, A. S., & Lorenzo, J. M. (2021). The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 385-392.
- Zhang, P., Ji, L., Wu, X., Chen, L., Yan, W., & Dong, F. (2024). Prevalence, Genotypic Characteristics, and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Huzhou, China. *Journal of Food Protection*, 87, 100307.

UNCORRECTED PROOF