مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۲۵۲-۲۴۶

Original Article

ارزیابی ژن *actA* در *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از لبنیات

جمیله نوروزی[۱]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]، مرضیه شفیعی[۳]*

[۱] استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی،
[۳] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *لیستریا* باکتری گرم مثبت و درون سلولی اختیاری است. یکی از مهم ترین ژن های این باکتری *actA* می باشد که موجب حرکت باکتری در سلول میزبان و در نتیجه بیماری زایی آن می گردد. این مطالعه با هدف ارزیابی حضور ژن *actA* در سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از فرآورده های لبنی انجام شده است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۷۰ نمونه جمع آوری شده از فرآورده های لبنی مختلف در شهرهای تهران و بابلسر از خرداد ماه ۱۳۹۱ تا مرداد ماه ۱۳۹۱ انجام شد. برای جداسازی گونه های *لیستریا* از محیط های BHI آگار و مولر آگار استفاده گردید. به منظور بررسی حضور ژن *actA* در گونه های *لیستریای* جداسازی شده از روش PCR استفاده شد. همچنین برای تعیین ویژگی تهاجمی *لیستریا مونوسیتوژنز* از محیط TSA حاوی ۰/۰۰۱۵٪ رنگ قرمز کنگو استفاده گردید.

یافته ها: در مجموع ۱۰ مورد آلودگی با *لیستریا مونوسیتوژنز*، ۴ مورد *لیستریا اینوکوآ*، ۲ مورد *لیستریا ولشیمری* و ۱ مورد *لیستریا سلیگری* در نمونه های شیر، پنیر معمولی و پنیر نرم شناسایی گردید. همچنین در این مطالعه در هیچ یک از نمونه های ماست و کره آلودگی *لیستریایی* مشاهده نگردید. در تمامی نمونه های مورد بررسی فراوانی ژن *actA* به صورت ۱۰۰٪ مشاهده گردید. تنها در نمونه های کنترل مربوط به سبزیجات حضور ژن ۱۴٪ بود. از مجموع ۱۰ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده، ۱۰۰٪ سویه های کلینیکی، ۷۰٪ سویه های غذایی و ۱۰۰٪ سویه های استاندارد خریداری شده از موسسه رازی دارای فنوتیپ قرمز کنگو مثبت بودند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه پیشنهاد می گردد که بدون نیاز به انجام کشت از روش PCR برای شناسایی ژن *actA* و نیز اثبات وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* در انواع نمونه ها استفاده شود. همچنین به دلیل مصرف گسترده لبنیات توسط جامعه، نظارت دقیق بر مراحل تولید، حمل و نقل و توزیع آن با هدف کاهش آلودگی باکتریایی ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز*، ژن *actA*، فنوتیپ قرمز کنگو، واکنش زنجیره ای پلی مراز .

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: بهمن ۹۱

مقدمه

لیستریا باکتری گرم مثبت، میله ای شکل، بی هوازی و فاقد اسپور می باشد. این جنس دارای شش گونه بوده که از این میان تنها *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) به عنوان پاتوژن عمده انسان شناخته شده است (۱). از آنجایی که گونه های مختلف *لیستریا* قادر به تحمل شرایط سخت مانند pH پایین، درجه حرارت پایین (دمای یخچال) و نمک بالا هستند، می توان آنها را از محیط هایی چون خاک، فاضلاب، علوفه، آب و مواد غذایی جداسازی نمود.

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۶۱۰۷۹۲۶ پست الکترونیک: marziehsh64@yahoo.com

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، باکتری فرصت طلب و پاتوژن درون سلولی است که به دلیل ایجاد عفونت های انسانی ناشی از مواد غذایی (مانند گوشت، مرغ و لبنیات) در سراسر جهان از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (۲). لیستریوزیس بیماری گوارشی است که در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به *لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد می گردد. مطالعات مختلف حضور ژن های بیماری زایی مانند *mpl, hly, plcA, plcB, prfA ,actA* را در *لیستریا مونوسیتوژنز* به اثبات رسانده است (۳). این باکتری به دلیل توانایی در پلی مریزاسیون اکتین، قادر به حرکت درون سلولی و بین سلولی، فرار از فاگولیزوزوم، مقاومت در برابر دفاع ایمنی هومورال و در نهایت تکثیر در سلول میزبان می باشد. پروتئین *actA* نقش مهمی در کنترل فعل و انفعالات رشته های اکتین در سیتوپلاسم محیطی سلول میزبان دارد و موجب تحرک *لیستریا* می گردد (۴). هدف از این پژوهش، ارزیابی حضور ژن *actA* در سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از فرآورده های لبنی بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۷۰ نمونه لبنیات جمع آوری، شامل ۳۰ نمونه شیر (۱۵ نمونه از مغازه های تهران و ۱۵ نمونه از بابلسر)، ۱۵ نمونه پنیر (۱۰ نمونه از بابلسر و ۵ نمونه از تهران)، ۱۵ نمونه پنیر نرم (۱۱ نمونه از بابلسر و ۴ نمونه از تهران)، ۵ نمونه کره (۴ نمونه از بابلسر و ۱ نمونه از تهران)، ۵ نمونه ماست (۳ نمونه از بابلسر و ۲ نمونه از تهران) از خرداد ماه ۱۳۹۱ تا مرداد ماه ۱۳۹۱ انجام شد.

ب) شناسایی باکتری ها: ۲۵ گرم از هر یک از نمونه های پنیر، کره، ماست و ۲۵ میلی لیتر از نمونه شیر در محیط های BHI Broth، *Listeria* Enrichment Broth و مولر آگار کشت و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز، باکتری های احتمالی به دفعات بر روی محیط های BHI Agar، مولر هینتون و *Listeria* Enrichment Agar کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. در ادامه جنس و گونه باکتری های رشد یافته، با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی مانند تست حرکت، کاتالاز، اکسیداز، بایل- اسکولین، MR-VP و آزمون های قندی گلوکز، مالتوز، مانیتول، رامنوز، گزیلوز شناسایی گردید. پس از جداسازی و خالص سازی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و دیگر گونه های *لیستریا* از جمله *لیستریا ولشیمری (L.welshimeri)*، *لیستریا اینوکوآ (L.innocua)* و *لیستریا سیلگری (L.seeligeri)*، کلنی ها به محیط نگهدارنده پپتون گلیسرول منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

ج) تعیین فنوتیپ تهاجمی لیستریا مونوسیتوژنز: کشت خطی نمونه های *لیستریا مونوسیتوژنز* بر روی محیط TSA حاوی ۰/۰۰۱۵٪ رنگ قرمز کنگو انجام گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلنی های قرمز رنگ نشان دهنده سویه های تهاجمی و کلنی های شفاف یا سفید رنگ به عنوان سویه های غیرتهاجمی گزارش گردیدند.

د) استخراج DNA: برای این منظور، ابتدا سویه های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط LB کشت داده شدند. سپس DNA باکتری با استفاده از کیت (Molecular Biological, Iran System Transfer) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.

ه) انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR): به منظور بررسی حضور ژن *actA*، در ابتدا پرایمرهای اختصاصی مربوط به تکثیر این ژن در سایت NCBI، طراحی و با شماره دسترسی NC_002973.6 ثبت گردیدند. در این مطالعه به منظور تکثیر ژن *actA* در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از پرایمرهای actA-F: ۵'-ACCGCCTCCAACAGAAGATG-۳' و actA-R: ۵'-GGATTACTGGTAGGCTCGGC-۳' استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۳ پیکومول)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۱۰۰

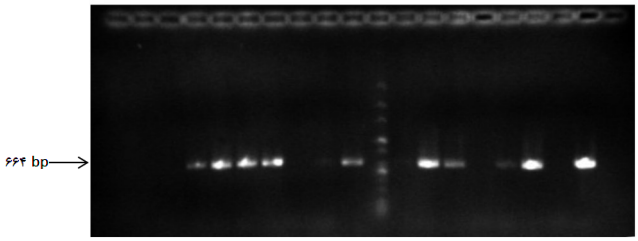
نانوگرم) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵/۲-۱ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوربت) با شرایط دمایی ۳۰ ثانیه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

همچنین در این مطالعه ۷ نمونه اهدایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از سبزیجات خریداری شده از استان تهران، ۷ نمونه اهدایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از گوشت و فرآورده های گوشتی خریداری شده از استان های تهران و لرستان، یک نمونه استاندارد خریداری شده از موسسه رازی و ۴ نمونه اهدایی جداسازی شده از جنین سقط شده انسان، از نظر وجود ژن *actA*، به کمک روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی، باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به صورت کوکوباسیل گرم مثبت، کاتالاز مثبت، متحرک در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، بایل اسکولین مثبت، MR–VP مثبت و همولیز مثبت مشاهده گردید. از مجموع ۷۰ نمونه لبنیات مورد بررسی، ۱۰ مورد آلودگی با *لیستریا مونوسیتوژنز* گزارش شد. از ۳۰ نمونه شیر، ۲ مورد لیستریا مونوسیتوژنز (۶/۶٪)، ۱ مورد *لیستریا اینوکوآ* (۳/۳٪) جداسازی گردید. از ۱۵ نمونه پنیر، ۲ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۳/۳٪)، ۱ مورد *لیستریا اینوکوآ* (۶/۶٪) و ۱ مورد *لیستریا ولشیمری* (۶/۶٪) جداسازی شد. از ۱۵ نمونه پنیر نرم، ۶ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* (۴۰٪)، ۲ مورد *لیستریا اینوکوآ* (۱۳/۳٪)، ۱ مورد *لیستریا ولشیمری* (۶/۶٪) و ۱ مورد *لیستریا سلیگری* (۶/۶٪) گزارش گردید. در این مطالعه در هیچ یک از نمونه های ماست و کره آلودگی *لیستریایی* مشاهده نگردید.

در مطالعه حاضر در تمامی نمونه های مورد بررسی (شامل: باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از لبنیات، *لیستریا مونوسیتوژنز* اهدایی جدا شده از محصولات گوشتی، نمونه های کلینیکی و سایر گونه های *لیستریا* و نمونه استاندارد IRTCC 1293) فراوانی ژن *actA* به صورت ۱۰۰٪ مشاهده گردید. به جز نمونه های مربوط به سبزیجات که حضور ژن ۱۴٪ گزارش شد (شکل ۱). از مجموع ۱۰ مورد *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده، ۱۰۰٪ سویه های کلینیکی، ۷۰٪ سویه غذایی و ۱۰۰٪ سویه استاندارد خریداری شده از موسسه رازی دارای فنوتیپ قرمز کنگومثبت را داشتند. این امر نشان دهنده بیماری زا بودن سویه های جداسازی شده می باشد.



شکل ۱: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *actA* (۶۶۴ bp) با روش PCR. ستون وسط DNA ladder (mi-8201) که ۳۰۰۰bp است. اولین باند از سمت چپ کنترل مثبت است.

بحث

لبنیات از جمله مواد غذایی است که به دلیل دارا بودن انواع مواد مغذی، توسط همه اقشار جامعه مصرف می شود. *لیستریا مونوسیتوژنز* از جمله باکتری هایی است که می تواند موجب آلودگی لبنیات گردد. بنابراین به دلیل گستردگی مصرف این مواد در جوامع مختلف، آلودگی مواد غذایی به این باکتری می تواند به عنوان خطری جدی در سلامت عمومی انسان ها محسوب گردد. در بیشتر مطالعات انجام شده در ایران به منظور جداسازی گونه های مختلف *لیستریا* از روش غنی

سازی در سرما و نگهداری نمونه به مدت یک ماه یا بیشتر در یخچال، استفاده شده است (۷-۵). اما در این پژوهش به دلیل فراهم نبودن محیط کشت اختصاصی *لیستریا* از محیط های BHI آگار و مولر آگار استفاده گردید. در بررسی حاضر، بیشترین آلودگی *لیستریا مونوسیتوژنز* با فراوانی ۴۰٪ در پنیر نرم مشاهده شد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه نوروزی (Nowroozi) و همکاران در سال ۲۰۰۳ مبنی بر شیوع ۴۲/۵٪ *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه های پنیر نرم مطابقت دارد (۸). همچنین جانسون (Johnson) و همکاران در سال ۲۰۰۰ با بررسی آلودگی انواع پنیر به ویژه پنیر نرم، موفق به جداسازی انواع گونه های *لیستریا* شدند (۹).

در پژوهش حاضر هیچ گونه آلودگی *لیستریایی* در نمونه های کره گزارش نگردید که این یافته با نتایج نوروزی (Nowroozi) و همکاران در سال ۲۰۰۳ هم خوانی دارد (۸). در ابتدا تصور می شد که ممکن است رابطه مستقیمی بین میزان چربی محصول و کاهش تعداد باکتری ها وجود داشته باشد، اما نتایج به دست آمده در مطالعه لیتیک جانینن (Lyytikjaninen) و همکاران در سال ۱۹۹۹ در فنلاند این فرضیه را رد نمود. زیرا این محققان دلیل بیماری لیستریوزیس را به مصرف کره حیوانی آلوده نسبت دادند (۱۰). در پژوهش حاضر تمامی نمونه های ماست مورد بررسی، فاقد آلودگی بودند که با یافته های نوروزی (Nowroozi) و همکاران مبنی بر شیوع ۲۵٪ *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه های ماست مغایرت دارد (۸). داسیلوا (Da Silva) و همکاران در سال ۱۹۹۹ در برزیل، از ۱۰۳ نمونه پنیر مورد ارزیابی موفق به شناسایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۱۰/۶٪ از نمونه ها گردیدند (۱۱). این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

همچنین ارسلان (Arsalan) و اوزدمیر (Ozdemir) در سال ۲۰۰۸ در ترکیه شیوع باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را در نمونه های پنیر سفید خانگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده شیوع ۳۳/۱٪ گونه های مختلف *لیستریا* در این نمونه ها بوده است (۱۲). شاید به توان دلیل این شیوع بالاتر را به صرفاً خانگی بودن پنیرها و عدم استفاده از پوشش مناسب هنگام نگهداری پنیر در منزل نسبت داد.

بانیا (Bania) و همکاران در سال ۲۰۰۹، فعالیت *actA* را به عنوان مارکری در ساب تایپینگ *لیستریا مونوسیتوژنز* و نیز افتراق سویه های بیماری زا از غیر بیماری زا گزارش نمودند. در مطالعه آنها در مجموع از ۱۴۴ نمونه مواد غذایی و نمونه بالینی، *لیستریا مونوسیتوژنز* در ۴۹ مورد (۳۴٪) جداسازی گردید. از این میان ۲۲/۹٪ سویه ها دارای ژن *actA* و قدرت تهاجمی و ۱۱/۱۱٪ فاقد ژن *actA* و غیر تهاجمی بودند (۱۳). ژو (Zhou) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در چین در مطالعه ای علاوه بر مواد غذایی، نمونه های فاضلاب را نیز برای حضور باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار دادند (۱۴). از ۴۰ مورد باکتری جداسازی شده ۳۵٪ دارای ژن *actA* بودند. شاید یکی از دلایل شیوع پایین تر ژن *actA* نسبت به پژوهش حاضر را بتوان استفاده از منبع فاضلاب عنوان کرد.

ویدمن (Wiedmanm) و همکاران در سال ۱۹۹۷، به منظور کشف ارتباط بین سویه های بیماری زای *لیستریا*، حضور ژن های *actA ,hlyA, inlA* را مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار دادند. آنها از روش PCR پلی مورفیسم به منظور تعیین طول قطعات ژن ها و نیز الگوی ریبوتایپینگ *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده نمودند. در مطالعه آنها سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز* به سه گروه مجزا از هم تقسیم گردیدند. از این سه گروه فیلوژنتیک، ۲۲ توالی مربوط به ژن *actA* گزارش شد. همچنین تمام گروه های بیماری زا با فراوانی ۱۰۰٪ دارای ژن *actA* بودند (۱۵). این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر از نظر شیوع ژن *actA* هم خوانی دارد.

در پژوهش حاضر از میان ۱۰ سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده، ۱۰۰٪ نمونه های کلینیکی و نمونه استاندارد و نیز ۷۰٪ از نمونه های لبنیات دارای فنوتیپ قرمز کنگو مثبت بودند. این میزان با نتایج به دست آمده در مطالعه داسیلوا (Da Silva) و همکاران در سال ۱۹۹۹ در برزیل مطابقت ندارد. زیرا در مطالعه یاد شده ۸/۷۹٪ از سویه های قرمز کنگو مثبت سروتایپ ۱/۲a، ۱/۷۳٪ سروتایپ ۴b و ۱/۴۹٪ سروتایپ ۱/۲b

را داشتند (۱۱). همچنین نانس (Nunes) و هافر (Hofer) در مطالعه ای ۵۱٪ از سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز* را به صورت فنوتیپ قرمز کنگو مثبت معرفی نمودند (۱۶).

نتیجه گیری

در این مطالعه با استفاده از آزمون های باکتریولوژیک و روش PCR مشخص گردید که مواد غذایی از جمله لبنیات، فرآورده های لبنیاتی، گوشت، فرآورده های گوشتی، سبزیجات و نمونه های کلینیکی آلوده به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده اند. از طرفی درصد بالایی از این باکتری های آلوده کننده دارای ژن *actA* بودند. همچنین استفاده از رنگ قرمز کنگو نشان داد که سویه های *لیستریا مونوسیتوژنز* جداسازی شده از هر دو منشأ کلینیکی و غذایی می توانند مهاجم و بیماری زا باشند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه پیشنهاد می گردد که بدون نیاز به انجام کشت از روش PCR برای شناسایی ژن *actA* و نیز اثبات وجود *لیستریا مونوسیتوژنز* در انواع نمونه ها استفاده شود.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از دکتر لیدا لطف الهی، سرکار خانم بهاروند و جناب آقای کریمی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Perrin M, Bremer M, Delamare C. Fatal cases of *Listeria innocua* bacteremia. J Clin Microbiol. 2003; 41: 5308-5309.

2. Liu D. Identification subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes* an important foodborn pathogen. J Med Microbiol. 2006; 55: 645-659.

3. Sleator RD, Gahan CG, Mand Hill C. Postgenomic of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 1-9.

4. Sanger JM, Sanger JW, Southwick F S. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. Infect Immun.1993; 60: 3609-3619.

5. Kargar M, Ghasemi A. Role of *Listeria monocytogenes hlyA* gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht. Iran J Clin Infect Dis. 2009; 4(4): 214-218. [In Persian]

6. Sattari M, Forouzandeh M. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in vaginal samples by polymerase chain reaction. Modarres J Med Sci: Pathobiol. 2009; 12(1): 51-58. [In Persian]

7. Jami S. The presence of *Listeria*.spp in raw milk samples in Mashhad, Iran. World Appl Sci J. 2010; 10 (2): 249-253.

8. Nowroozi J, Jafari Nejad A, Shahidi S. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in dairy meat and view plasmids electrophoresis. Iran J Clin Infect Dis Trop Med. 2003; 8(21):10-24. [In Persian]

9. Johnson T, Ahola H, Pirhonen T, Taimisto A, Salkinoja M. Improved detection of *L. monocytogenes* in soft mould- ripened cheese. J Appl Microbiol. 2000; 88(5): 870-876.

10. Lyytikjaninen O, Autio T, Maijala R, Ruutu P, Siitonen. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. Interscience conference on antimicrobial agent and chemotherapy. Food Microbiol. 1999; 20(8): 20-28.

11. Da Silva MC, Hofer E, Tibana A. Incidence of *L. monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. J Food Prot. 1998; 61(3): 354-536.

12. Arsalan S. Ozdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. Food Control. 2008; 19(4): 360-363.

13. Bania J, Zarczynska A, Molend J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolated by *actA* gene sequencing PCR-Fingerprinting, and cell-ivasion assay. J Med Microbiol. 2009; 54(1): 17-24.

14. Zhou X, Xinan J, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system strain characterization through partial *actA* sequencing and tissue-culture pathogenicity assay. J Med Microbiol. 2005; 54: 217-224.

15. Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect Immun. 1997; 65(7): 2707-2716.

16. Nunes Z, Hofer E. Evaluation of phenotypic markers associated with pathogenicity in the genus *Listeria*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1994, 36(4): 293-299.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Detection of *actA* gene in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products

Jamileh Norowzi[1], Soheila Moradi Bidhendy[2], Marzieh Shafiee[3]

[1] Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] MS.c., Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Listeria* is a gram-positive facultative intracellular bacteria. The *actA* is one of the most important genes in this bacterium, which involves in bacterial movement in the host cell and so in its pathogenesis. The purpose of this study is to evaluate the *actA* gene in *Listeria monocytogenes* strains isolated from dairy products.

Materials and Methods: This cross sectional study was performed on 70 samples of dairy products collected from Tehran and Babolsar, Iran from June to August 1391. The samples were grown onto BHI agar and Mueller agar. A PCR approach was used to detect the presence of the *actA* gene in the isolated *Listeria* species. Also, the isolated were grown into TSA containing 0.0015% Congo red in order to determine the invasive properties of *L. monocytogenes*.

Results: This study showed contamination of the milk, cheese and soft cheese samples with *L. monocytogenes* (10 cases), *L. innocua* (4 cases), *L. welshimeri* (2 cases) and *L. seeligeri* (1 case). Furthermore, no yogurt and butter samples were contaminated with *Listeria*. Although all of these isolates contained *actA* gene in their genome, only 14% of the strains isolated from vegetables were positive for this gene. A total of 10 cases of isolated *L. monocytogenes*, 100% of the clinical strains, 70% of the strain food and 100% of standard strains purchased from Razi Institute were positive for Congo red phenotype.

Conclusion: According to the results obtained in this study, detection of *actA* gene based on PCR can be used as an alternative approach for identification of pathogenic *L. monocytogenes* in samples without culture method. Also, due to the widespread use of dairy by individuals, it seems necessary to reduce bacterial contamination monitoring the production process, transport and distribute this material.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *actA* gene, Congo red phenotype, PCR.

Correspondence to: Marzieh Shafiee

Tel: +989126107926

E-mail: marziehsh64@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 246-252.