

پراکندگی ژن CtpA در لیستریا مونوسیتوژنز

چکیده

زمینه و هدف: لیستریا مونوسیتوژنز، توانایی ایجاد بیماری‌های شدید و مهاجم در انسان و در بیش از ۴۰ گونه از حیوانات را دارد. لیستریا مونوسیتوژنز از طریق پنیر نرم، شیر، گوشت خام، سوسیس و غیره به انسان انتقال می‌یابد. هدف از این مطالعه، یافتن میزان فراوانی لیستریا مونوسیتوژنز در طیور، دام، سوسیس، لبنیات و مشاهده ژن CtpA (ژن انتقال دهنده مس) آن‌ها در الکتروفورز بعد از انجام PCR بوده است.

روش بررسی: ۱۸۰ نمونه از مغز، کبد و مدفوع طیور (مرغ‌های صنعتی) از ۳۶ مرغداری مختلف، ۱۶۶ نمونه از کبد، مغز، مایع آمنیوتیک و مدفوع گاو، گوسفند، اسب و بز، ۸۰ نمونه از سوسیس، ۳۰۰ نمونه از لبنیات جمع‌آوری شده از مغازه‌های شهر کرج مورد بررسی قرار گرفت. لیستریا مونوسیتوژنز به روش غنی‌سازی در سرما و با روش استاندارد استرالیا - نیوزیلند جداسازی شد. DNA کروموزومی پس از استخراج، به منظور تکثیر ژن CtpA به وسیله PCR و برای مشاهده وجود باند CtpA الکتروفورز گردید.

یافته‌ها: لیستریا مونوسیتوژنز از نمونه‌های طیور جدا نشد. این باکتری از مغز و کبد بز و گوسفند (۱۲/۹۳ درصد)، سوسیس (۲/۵٪)، پنیر محلی (۲/۹٪) و شیر (۲/۵٪) به دست آمد. با استفاده از PCR و جداسازی DNA از ۲۵ لیستریا مونوسیتوژنز ایزوله شده، ژن CtpA در ۲۰ درصد از موارد مشاهده گردید. DNA مشابه CtpA در تمام باکتری‌های جدا شده وجود نداشت. نتایج نشان داد که ۲۸/۷۵ درصد از لیستریا مونوسیتوژن‌های جدا شده از پنیر و ۲۰ درصد از باکتری‌های به دست آمده از حیوانات اهلی دارای ژن CtpA بودند.

نتیجه‌گیری: وجود ژن CtpA در ۲۰ درصد از باکتری‌های مورد بررسی نشان دهنده آن است که تمام این باکتری‌ها خاصیت بیماری‌زایی یکسانی ندارند. از طرفی، توالی ژن CtpA تشابه زیادی به پروتئین دو بیماری نقص در متابولیسم مس به نام بیماری منکز (Menkes) و بیماری ویلسون (Wilson) در انسان دارد، احتمال دارد که ارتباطی بین این دو بیماری و ژن CtpA در لیستریا مونوسیتوژنز وجود داشته باشد و شاید در آینده بتوان با تولید پروتئین CtpA موجود در لیستریا (ساخت واکسن) گامی در درمان این دو بیماری برداشت.

کلیدواژه‌ها: ۱ - لیستریا مونوسیتوژنز ۲ - ژن سی.تی.پی.ای ۳ - حیوانات اهلی ۴ - طیور ۵ - پنیر

*دکتر جمیله نوروزی I

دکتر نور امیرمظفری II

حسین مدیرروستا III

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۱، تاریخ پذیرش: ۸۴/۲/۱۰

مقدمه

در تحقیقاتی که به منظور بررسی وجود لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر نرم انجام شد، سال ۱۹۹۱ در نروژ، ۱۱ درصد^(۱)، سال ۱۹۹۴ در انگلستان ۰/۴ درصد^(۲)، سال ۱۹۹۵ در استرالیا ۳/۴ درصد^(۳) لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده است. در مطالعه انجام شده در سال ۱۹۹۸ در فنلاند، لیستریا مونوسیتوژنز از پنیر نرم جدا نگردید.^(۴)

I) استاد و Ph.D. میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران. (*مؤلف مسوول)

II) دانشیار و Ph.D. میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

III) کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

اطراف پراکنده است، یافته‌های فوق نشان می‌دهد که این ارگانیزم در محیط طبیعی خود با داشتن ATP از CtpA در جابه‌جایی یون مس دخالت کرده و مقدار مس را در سلول ثابت نگاه می‌دارد تا زنده بماند. هدف از این مطالعه، یافتن میزان فراوانی لیستریامونوسیتوژنز در طیور، دام، سوسیس، لبنیات و مشاهده ژن CtpA (ژن انتقال دهنده مس) آن‌ها در الکتروفورز بعد از انجام PCR بوده است. از طرفی، چون توالی ژن CtpA، تشابه زیادی به پروتئین دو بیماری نقص در متابولیسم مس (منکز و ویلسون) در انسان دارد، به نظر می‌رسد ارتباطی بین این دو بیماری و ژن CtpA در لیستریامونوسیتوژنز وجود داشته باشد و شاید بتوان در آینده با تولید پروتئین CtpA موجود در لیستریا (ساخت واکسن) گامی در جهت درمان این دو بیماری برداشت.

روش بررسی

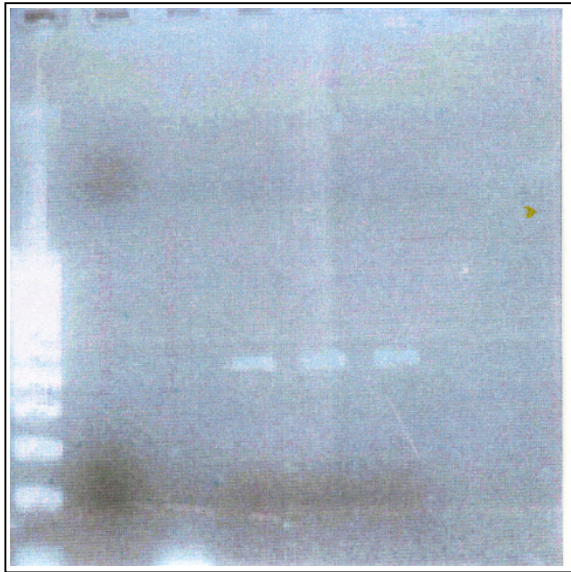
در این بررسی، ۱۸۰ نمونه از مغز، کبد، مدفوع طیور (مرغ‌های صنعتی از ۳۶ مرغداری مختلف) که در مجموع شامل ۵۴۰ نمونه می‌شد، ۱۶۶ نمونه از کبد، مغز، مایع آمنیوتیک و مدفوع گاو، گوسفند، اسب و بز که به کلینیک بیماری‌های موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی آورده می‌شد، ۸۰ نمونه از سوسیس و ۳۰۰ نمونه از لبنیات جمع‌آوری شده از مغازه‌های شهر کرج مورد بررسی قرار گرفت.

لیستریامونوسیتوژنز به روش غنی‌سازی در سرما و با روش استاندارد استرالیا - نیوزیلند جداسازی شد. جهت انجام آزمایش‌ها از محیط کشت پالکام و محیط سلکتیو آگار لیستریا با استفاده از جار شمع‌دار (۵ درصد گاز کربنیک) استفاده شد. کلنی‌های سیاه رنگی که بر روی محیط کشت پالکام و همچنین روی محیط لیستریا سلکتیو آگار رشد کرده بودند با انجام رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، همولیز بر روی بلاد آگار، تست تخمیر قندها، تست تحرک و غیره شناسایی شدند.

DNA کروموزومی لیستریا با روش اصلاح شده Flamm^(۱۳) به دست آمد. غلظت DNA با استفاده از

همچنین در مطالعات انجام شده در فنلاند، طی سال ۱۹۹۴، لیستریامونوسیتوژنز در بستنی جدا نشد^(۵) ولی در سال ۱۹۹۹، ۰/۵ درصد از بستنی‌های مورد مطالعه آورده به لیستریامونوسیتوژنز بودند.^(۶) در فنلاند طی سال ۱۹۹۳ از گوشت خام طیور، ۲۷ درصد^(۷) و در سال ۲۰۰۱ به میزان ۶۲ درصد^(۸) لیستریامونوسیتوژنز جدا شده است. در پورتوی پرتغال، در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش Multiplex PCR (Polymerase chain Reaction)، از نمونه طیور، ۲۶ مورد لیستریامونوسیتوژنز (۴۱٪) جدا شد.^(۹) ژن CtpA (Copper transport Protein) در سال ۱۹۹۷ توسط Thomas و Francis شناسایی گردید.^(۱۰) این ژن، پلی‌پپتیدی است که ۶۵۳ اسید آمینه را کد می‌کند و شباهت زیادی به کاتیون انتقال ATP دارد (Genbank Accession. Number: U 15554). این پروتئین به خانواده‌ای از پروتئین‌ها شباهت دارد که مسول انتقال یون مس در ایوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها است. موتانت‌هایی از لیستریامونوسیتوژنز به غلظت کم یون مس در محیط کشت بسیار حساس بوده و در این شرایط، رونوشت‌های این ژن به طور فوق‌العاده‌ای کاهش می‌یابد.

با توجه به پراکندگی لیستریامونوسیتوژنز در محیط اطراف، نقش مهم CtpA در زنده ماندن این ارگانیزم در محیط طبیعی از طریق انتقال یون مس مشخص می‌گردد. توالی اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌های CtpA شباهت زیادی با پروتئین‌های مرتبط با اختلالات متابولیسم مس در سندرم ارثی Menkes^(۱۱) و بیماری Wilson^(۱۲) در انسان دارد. در بیماری منکز، ورود و خروج مس در سلول‌های روده دچار اختلال شده و کمبود شدید مس در بدن حاصل می‌شود. در بیماری ویلسون، ناتوانی در ورود مس از کبد به درون صفرا دیده شده که به مسمومیت ناشی از مس منجر می‌گردد. از طرفی، ATP از در CtpA موجود در لیستریامونوسیتوژنز با پروتئین‌های باکتری که در جابه‌جایی مس دخالت دارند و همچنین با پروتئین‌هایی که در بیماری منکز و ویلسون ساخته می‌شود تشابه زیادی دارد.^(۱۰) با توجه به این که، لیستریامونوسیتوژنز در محیط



تصویر شماره ۱- باندهای ژن CtpA روی ژل آگارز
(مارکر ۱۰۰bp)

بحث

امروزه لیستریامونوسیتوژنز به عنوان پاتوژن مهم منتقل شونده از راه غذا شناخته شده است. بیماری لیستریوز در اثر مصرف فرآورده‌های غذایی آلوده مانند پنیر نرم، شیر، سبزیجات خام و شسته نشده، گوشت خوب پخته نشده و یا از طریق جفت از مادر به فرزند قابل انتقال است. مواردی از اپیدمی در اثر مصرف شیر پاستوریزه نشده، پنیر و سوسیس مشاهده شده است.

لیستریامونوسیتوژنز در زنان باردار موجب سقط جنین، زایمان قبل از موعد یا زایمان نوزاد زنده آلوده با این باکتری می‌شود. علائم کلینیکی لیستریوز تهاجمی معمولاً شدید بوده و به صورت سقط جنین، سپسیس (sepsis) و مننژوانسفالیت بروز می‌کند.^(۱۴) به همین دلیل، بررسی وجود این باکتری در نمونه‌های مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد. در سال ۱۹۹۸ در برزیل از ۱۰۳ نمونه انواع مختلف پنیر، ۱۱ مورد (۱۰/۶۸٪) لیستریامونوسیتوژنز جدا شد. بیشترین وقوع لیستریامونوسیتوژنز به طور عمده در پنیرهایی که در خانه ساخته شده بودند، مشاهده شد (در برزیل پنیر نرم و سفید به طور تازه مصرف می‌شود).^(۱۵) در بررسی حاضر، که از

اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گرفته شد. PCR انجام شده مطابق شرایط معمولی بود که برای انجام آن از بافر PCR (۵۰μl)، کلرور منیزیم (۱/۵ml)، dNTPs (۱μl)، پرایمر R، F (هر کدام ۲/۵μl)، Taq پلی‌مران (۱μl)، DNA مورد نظر (۲ μl) و آب دو بار تقطیر (۳۴/۵μl) استفاده شد و حجم کل محلول به ۵۰μl رسید. عمل الکتروفورز در حرارت اتاق بر روی ژل آگارز در محلول بافر TAE انجام شد. محلول بافر TAE شامل Tris، EDTA و اسیداستیک بود. ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در زیر نور اولتراویولت مشاهده و عکس برداری گردید.

یافته‌ها

لیستریامونوسیتوژنز از نمونه‌های مورد بررسی از ۳۶ مرغ‌داری مختلف پرورش طیور صنعتی، از هر مرغ‌داری ۵ پرنده (در مجموع ۵۴۰ نمونه) شامل انواع مختلف مرغ (گوشتی، تخم‌گذار، مادر) و بوقلمون به دست نیامد. از ۸۵ دام تلف شده (۱۰ گاو، ۷ گوساله، ۶۰ گوسفند، ۶ بز و ۲ اسب)، در ۱۱ مورد از مغز و ۴ مورد از کبد، لیستریامونوسیتوژنز جدا گردید. لیستریامونوسیتوژنز از ۳۰۰ نمونه لبنیات شامل ۲۴۰ نمونه پنیر، ۱۰ نمونه ماست، ۱۰ نمونه کشک و ۴۰ نمونه شیر خام، در ۷ مورد از پنیر و یک مورد از شیر خام به دست آمد.

پس از آن که DNA هر یک از باکتری‌های به دست آمده جدا شد، وجود یا عدم وجود ژن CtpA با استفاده از پرایمرهای مربوطه با انجام PCR مورد بررسی قرار گرفت که در ۵ مورد بانندی با وزن مولکولی برابر با ژن CtpA (۵۵۸bp) در ژل الکتروفورز مشاهده گردید که در شکل ۱ نشان داده شده است. از ۷ مورد لیستریامونوسیتوژنز جدا شده از پنیر در دو مورد (۲۷/۵۷٪)، از ۱۰ مورد لیستریامونوسیتوژنز به دست آمده از گوسفند در یک مورد مغز (۱۰٪) و از ۵ مورد لیستریامونوسیتوژنز حاصل از بز در دو مورد کبد و مغز (۴۰٪) ژن CtpA جدا شد.

از قسمت‌های مختلف (مغز، کبد، مدفوع و مایع آمنیوتیک) نمونه برداری انجام گرفت که از نمونه‌های گاو، گوساله و اسب، لیستریا جدا نشد. در ۶۰ گوسفند آزمایش شده، لیستریامونوسیتوژنز در ۱۰ مورد (۱۶/۶٪) و در شش بز آزمایش شده در پنج مورد (۸۳/۳٪) لیستریامونوسیتوژنز جدا گردید.

در سال ۱۹۹۲ در ایتالیا از سوسیس تهیه شده از گوشت گاو ۱۴ درصد^(۲۰) و در امریکا در سال ۱۹۹۴، ۷/۵ درصد^(۲۱) لیستریامونوسیتوژنز جدا شده است. ولی در این بررسی از ۸۰ نمونه سوسیس که از کارخانه‌های مختلف جهت جداسازی لیستریا تهیه شده بود، میزان آلودگی به لیستریامونوسیتوژنز بسیار کمتر (۲/۵٪) بود. در این تحقیق از ۲۵ باکتری جدا شده، با استفاده از روش Flamm و همکارانش^(۱۳)، DNA استخراج شد و با استفاده از روش PCR، ژن CtpA تکثیر شد و فرآورده PCR در ژل آگارز، الکتروفورز گردید. در پنج مورد (۲۰٪)، باندی برابر با وزن مولکولی ژن CtpA (۵۵۸bp) مشاهده شد.^(۲۲، ۲۳) این یافته‌ها احتمالاً نشان دهنده آن است که این باکتری‌ها، خاصیت بیماری‌زایی یکسانی ندارند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد که مرغ‌داران در تهیه مواد غذایی مرغ‌های صنعتی بسیار مراقب بوده و یا به علت افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای مرغ‌ها امکان جداسازی لیستریامونوسیتوژنز از مرغ‌های صنعتی وجود نداشت. آلودگی سوسیس، پنیر و شیر با این باکتری‌ها ممکن است در هنگام تهیه آن‌ها رخ داده باشد. چون وجود ژن CtpA در لیستریامونوسیتوژنز برای پایداری و ایجاد بیماری در موش آلوده ضروری است، بنابراین، ژن CtpA در بیماری‌زایی این باکتری اهمیت دارد، به همین دلیل توزیع ژن CtpA در بین لیستریامونوسیتوژن‌های جدا شده از منابع مختلف مورد بررسی قرار گرفت. چون توالی ژن CtpA، تشابه زیادی به پروتئین دو بیماری نقص در متابولیسم مس، بیماری منکز (Menkes) و بیماری ویلسون (Wilson) در انسان دارد،

پنیرهای محلی و پنیر پاستوریزه نشده از فروشگاه‌ها و روستاهای اطراف کرج استفاده شد، میزان آلودگی بسیار کمتر و از ۲۴۰ نمونه، در هفت مورد (۲/۹۲٪) لیستریامونوسیتوژنز جدا شد.

در تحقیقاتی که برای بررسی وجود لیستریامونوسیتوژنز در شیر خام به عمل آمده است در سال ۱۹۹۰ در فنلاند، ۱/۷ درصد^(۱۶) و در بریتانیا در سال ۱۹۹۱، ۳/۶ درصد^(۱۷) با لیستریامونوسیتوژنز آلودگی داشته‌اند. در صورتی که در این بررسی از ۴۰ نمونه شیر پاستوریزه نشده، در یک مورد (۲/۵٪) باکتری جدا شد. در مطالعه حاضر از ۱۰ نمونه ماست و ۱۰ نمونه کشک هیچ گونه‌ای از لیستریا جدا نشد که می‌تواند بیانگر این باشد که روش پاستوریزاسیون و با حرارت دادن شیر در کاهش آلودگی با این باکتری موثر است. همچنین در ایرلند شمالی، در سال ۲۰۰۳ از ۲۰۵ نمونه گوشت طیور بسته‌بندی شده که از دو مرکز بزرگ فروش تهیه شده بود، در سه مورد سالمونلا جدا شد و از ۸۰ نمونه که برای بررسی لیستریا مورد استفاده قرار گرفت در ۳۸ مورد انواع گونه‌های مختلف لیستریا جدا گردید که ۱۴ مورد از آن لیستریامونوسیتوژنز (۱۸٪) بود. این امر نشان داد که روش‌های جلوگیری از آلودگی سالمونلا که در صنایع به کار می‌رود در مورد حذف لیستریا چندان موثر نبوده است.^(۱۸) در این تحقیق از ۱۸۰ نمونه مغز، کبد و مدفوع طیور تلف شده که به کلینیک بیماری‌های طیور موسسه رازی جهت تشخیص بیماری آورده شده بودند شامل مرغ گوشتی، مرغ تخم‌گذار، مرغ مادر و بوقلمون که سنی بین دو هفته تا دو سال داشتند جهت جداسازی لیستریا استفاده گردید. در این موارد هیچ یک از گونه‌های لیستریا جدا نشد. این امر احتمالاً به علت مراقبت کافی طیور در ایران (یا مصرف آنتی‌بیوتیک) بوده است. از گوشت خام گاو در سال ۱۹۹۴ در بریتانیا ۲۵ درصد^(۲)، در سال ۲۰۰۱ در مکزیک ۱۶ درصد^(۱۷)، و در سوئیس در همان سال ۶/۳ درصد^(۱۹) لیستریامونوسیتوژنز جدا شده است. طی بررسی حاضر، آزمایش مشابهی بر روی ۸۵ رأس دام تلف شده شامل ۱۰ گاو، هفت گوساله، ۶۰ گوسفند، شش بز و دو اسب انجام شد و بر حسب نوع نمونه

and evidence that it encodes a copper transporting Atpase. *Nature* ene; 1993. 5: 7-13.

12- Bull PC, Thomas GR, Rummenes JM, Forbes JR, Cox DW. The wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the menkes gene. *Nature Gene*; 1993. 5: 327-337.

13- Flamm RK, Hinrichs DJ, Thomshow MF. Introduction of pAmβ1 into listeria monocytogenes by conjugation and homology between native listeria monocytogenes plasmids. *Infect. Immun*; 1984. 44: 157-61.

14- Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*; 2001. 4(3): 584-640.

15- Da Silva MCD, Hofer E, Tibana A. Incidence of listeria monocytogenes in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Protection*; 1998. 61: 354-356.

16- Hitbold EM, Safley SA, Ziegler HK. The presentation of class I and class II epitopes of listeriolysin O is regulated by intracellular localization and by intercellular spread of listeria monocytogenes. *J. Immunol*; 1996. 157: 1163-1175.

17- Heredia N, Garcia S, Rojas G, Salazar L. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J. Food Prot*; 2001. 64: 1249-51.

18- Soutos N, Koidis P, Madden RH. Presence of listeria and salmonella spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Lett. Appl. Microbiol*; 2003. 37(5): 421-23.

19- Faber JM, Sanders GW, Johnston MA. A survey of various food for the presence of listeria monocytogenes. *Journal of food protection*; 1989. 52: 456-58.

20- Comi G, Frigerio R, Cantoni C. Listeria monocytogenes serotypes in italian meat products. *Lett. Appl. Microbiol*; 1992. 15: 168-71.

21- Wang C, Muriana P. Incidence of listeria monocytogenes in packages of retail franks. *J Food Prot*; 1994. 57: 382-6.

22- Jones P. "Gel Electrophoresis: Nucleic Acid, Essential Techniques" 1st ed. Newyork: Johan Wiley & Sons Ltd; 1995. P: 149-153.

23- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JS, Smith JA, et al. "Short Protocols in Molecular Biology". 1st ed. Newyork: Johan wiley & sons Ltd; 2002. p: 1-35.

احتمال دارد که ارتباطی بین این دو بیماری و ژن CtpA در لیستریامونوسییتوزنز وجود داشته باشد و شاید بتوان در آینده با تولید پروتئین CtpA موجود در لیستریا(ساخت واکسن) گام مهمی در درمان این دو بیماری برداشت.

منابع

1- Rorvik LM, Yndestad M. Listeria monocytogenes in foods in Norway. *Int. J. Food microbiol*; 1991. 13: 97-104.

2- MacGowan AP, Bowker K, McLauchlin J, Bennett PM, Reeves DS. The occurrence and seasonal changes in the isolation of Listeria spp in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food microbiol*; 1994. 21: 325-34.

3- Arnold GJ, Coble J. Incidence of listeria species in foods in NSW. *Food Australia*; 1995. 47: 71-5.

4- Pirhonen T. The microbiological quality of fresh cheese and soft cheese in retail trade. *National Food Administration. Helsinki. Research notes*; 1998. 14: 7.

5- Fieandt E, Makela P. An investigation of the basic microbiological quality of foods: I. ice creams, II. Processed foods. *National Food Administration. Helsinki. Research notes*; 1994. 9: 37.

6- Miettinen MK, Bjrkroth KJ, Korkeala HJ. Characterization of listeria monocytogenes from an ice-cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol*; 1999. 46: 187-92.

7- Fieandt E. Investigation of the microbiological quality of meat and meat products offered for sale during 1992-1993. *National Food Administration. Helsinki. Research notes*; 1993. 14: 41.

8- Melchers K, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhilber W, Sach G, Schafer KP. Cloning and membrane topology of a P type Atpase from helicobacter pylori. *Biological Chemistry*; 1996. 271: 445-57.

9- Antunes P, Reu C, Sousa JC, Pestana N, Peixe L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of Listeria Spp. and Listeria monocytogenes isolated from poultry carcasses in Porto Portugal. *J. Fod Port*; 2002. 65(12): 1888-93.

10- Francis MS, Thomas CJ. The listeria monocytogenes gene CtpA encodes a putative p-type ATPase involved in copper transport. *Mol. Gen. Genet*; 1997. 235: 484-491.

11- Vulpe C, Levinson B, Witney S, Packman S, Gitscheir J. Isolation of candidate gene for menkes disease

