Archive of SID

JFM

مجله میکروب شناسی مواد غذائی

لیستریاهای جداسازی شده از پنیرهای سنتی منطقه تبریز: فراوانی، تنوع گونه‌ای و ویژگی‌های فنوتیپی

آیدا کلانتری‌پور[1]، شهرام حنیفیان[2*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hanifian@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

چکیده

آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به باکتری‌های بیماری‌زا هم‌چون لیستریا تهدیدی برای مصرف‌کنندگان این نوع محصولات به‌شمار می‌رود. هدف این مطالعه، بررسی فراوانی و تنوع گونه‌ای لیستریا در پنیرهای سنتی منطقه تبریز بود. هم‌چنین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، توانایی تولید بیوفیلم و مقاومت حرارتی جدایه‌ها ارزیابی گردید. برای این منظور تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی به‌صورت تصادفی جمع‌آوری و با استفاده از روش‌های متداول کشت، جداسازی و شناسایی گردید. نتایج نشان داد، از مجموع ۱۰۰ نمونه پنیر، ۱۲ *لیستریا* جداسازی شد که ۵ جدایه *لیستریا مونوسایتوجنز* و ۷ جدایه *لیستریا ایوانووی* بودند. هم‌چنین، از بین ۱۳ آنتی‌بیوتیک مختلف ۱۰۰٪ جدایه‌ها نسبت به اکساسیلین و ۷۵٪ به نالیدکسیک‌اسید مقاوم بودند تمامی جدایه‌ها نسبت به کوتریموکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین و ونکومایسین حساسیت داشتند. نتایج آزمون تولید بیوفیلم نشان داد، تمامی جدایه‌های *لیستریا مونوسایتوجنز* مولدین ضعیف بیوفیلم بودند در حالی‌که در جدایه‌های *لیستریا ایوانووی* درجات متفاوتی (ضعیف، متوسط و قوی) از تولید بیوفیلم دیده شد. طبق یافته‌های ارزیابی مقاومت حرارتی، ترمالیزاسیون بر هیچ‌یک از جدایه‌های لیستریا تأثیر کشندگی معنی‌داری نداشت، اما در مقابل پاستوریزاسیون سریع طی ۵ ثانیه تعداد هر دو گونه لیستریا را به کمتر از حد قابل ردیابی کاهش داد ($P<0.01$). هم‌چنین پاستوریزاسیون کند اثر متفاوتی ($P<0.01$) بر روی دو گونه لیستریا نشان داد. با توجه به این‌که گونه *مونوسایتوجنز* و به‌میزان کمتر گونه *ایونووی* هر دو بیماری‌زای مهم انسانی هستند، لذا می‌توان به این جمع‌بندی رسید که پنیرهای سنتی منطقه تبریز خطر بالقوه از نظر آلودگی با لیستریا می‌باشند.

واژگان کلیدی: گونه‌های *لیستریا*، پنیر سنتی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی، تولید بیوفیلم، مقاومت حرارتی.

مقدمه

جنس *لیستریا* باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، میله‌ای شکل و میکروآیروفیلیک می‌باشد. توانایی تحمل شرایط نامساعد محیطی از جمله تغییرات pH، دما و نمک منجر به گسترش جنس *لیستریا* در محیط‌های متنوع می‌شود. این جنس به دلیل دارا بودن گونه‌های سرماگرا قادر به رشد در دمای ۴ درجه سلسیوس است و از طرفی برخی سویه‌های آن می‌توانند در شرایط پاستوریزاسیون ناکافی زنده بمانند. از این رو خطر عفونت به لیستریا از طریق مصرف غذای آلوده، افزایش می‌یابد (Holt et al., 1994; Rosenow and Marth, 1987; Hitchins et al., 2016). تاکنون ۱۰ گونه مختلف از جنس شناسایی شده است که شاخص‌ترین گونه آن *مونوسایتوجنز*[1] می‌باشد (Mraheil et al., 2013). *لیستریا مونوسایتوجنز* یک ارگانیسم درون‌سلولی اختیاری بیماری‌زا در انسان و حیوانات است (Liu and Busse, 2010). این باکتری عامل عفونت لیستریوزیس[2] در انسان و حیوانات محسوب می‌شود و علایم بیماری در انسان شامل ، سقط جنین، انسفالیت، مننژیت و سپتی‌سمی (به ویژه در افرادی که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند) می‌باشد. اما علایم عفونت در حیوانات به‌صورت

1. *monocytogenes*
2. Listeriosis

www.SID.ir

Archive of SID

ورم‌پستان، اسهال، التهاب معده و روده بروز پیدا می‌کند (McLauchlin et al., 2004; Liu and Busse, 2010). بر اساس گزارش شبکه غذایی[3] مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌های ایالات متحده آمریکا[4]، از سال ۱۹۹۶ تا سال ۲۰۰۵ لیستریوزیس عامل ۳۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در آمریکا بوده و میزان مرگ و میر بالای ۱۶/۹ درصد داشته است (Behravesh et al., 2011). لیستریا *مونوسایتوجنز* می‌تواند شیر را به‌صورت مستقیم از طریق ورم‌پستان، انسفالیت و سقط جنین آلوده کند. در حالت غیرمستقیم آلودگی از طریق شیردوشی در شرایط غیربهداشتی، تماس شیر با خوراک دام، مدفوع و سطح پستان‌ها انتقال می‌یابد (Fedio and Jackson, 1992). بنابراین، افزایش مصرف شیر خام باعث بالا رفتن شیوع لیستریوزیس می‌شود، هم‌چنین فرآورده‌های سنتی شیر مانند پنیر، بستنی و ... که از شیر غیرپاستوریزه تهیه می‌شوند، می‌توانند حامل این باکتری باشند (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Rahimi et al., 2010). اهمیت شیر خام و فرآورده‌های آن به‌عنوان یک حامل برای انتقال بیماری‌های مختلف به‌خصوص در کشورهایی که استانداردهای بهداشتی در آن‌ها رعایت نمی‌شود، به‌خوبی اثبات شده است. چنانچه در سال‌های اخیر در اروپا مواردی از شیوع لیستریوزیس به‌علت مصرف محصولات آلوده شیر گزارش شده است (Liu and Busse, 2010). بررسی‌های متعددی در زمینه شیوع گونه‌های لیستریا در سراسر جهان انجام گرفته است. طی مطالعه‌ای در اسپانیا، *لیستریا مونوسایتوجنز* و *لیستریا اینوکوا*[5] به‌ترتیب در ۳/۶ و ۲/۷ درصد از نمونه‌های شیرخام جدا شدند (Gaya et al.,1998). در مطالعه‌ی دیگری که در آمریکا انجام گرفت ۷/۵ درصد از نمونه‌های شیرخام به گونه‌های لیستریا آلوده بودند (Van Kessel et al., 2004). در بررسی‌های به‌عمل آمده در بخش‌های مختلف ایران فراوانی متفاوتی از گونه‌های مختلف لیستریا جداسازی و گزارش شده است. برای مثال میزان شیوع *لیستریا* در شیر خام و فرآورده‌های آن، در دو کارخانه در نورآباد به‌ترتیب ۱/۷ و ۳/۳ درصد و ۳/۳ و ۶/۷ درصد (Mahmoodi et al., 2010)، در شهرکرد و شیراز ۳۷/۵ درصد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۸)، در اصفهان ۴/۳۹ درصد (شاملو آقاخانی و همکاران، ۱۳۹۱) و در استان لرستان ۹/۷۲ درصد (رحیمیان و همکاران، ۱۳۸۸) گزارش گردید. استان آذربایجان‌شرقی جزو استان‌های عمده کشور از نظر تولید شیر خام می‌باشد و سهم بزرگی از شیر تولیدی صرف تهیه محصولات سنتی متنوع می‌گردد. این محصولات به سبب محبوبیت بالا علاوه بر مصرف در داخل استان، به سایر نقاط کشور نیز ارسال می‌شوند. لذا در صورت حضور میکروب‌های بیماری‌زا نظیر *لیستریا*، می‌تواند موجب بیماری در مصرف‌کنندگان شود. در این مطالعه برای اولین بار میزان آلودگی پنیرهای سنتی منطقه تبریز با گونه‌های مختلف *لیستریا* بررسی و در ادامه ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری، غنی‌سازی و جداسازی

در طی سال ۱۳۹۴ تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی به‌صورت تصادفی از مراکز عرضه فرآورده‌های شیر در سطح شهر تبریز جمع‌آوری شد. نمونه‌ها طی همان روز و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی انتقال یافت. پس از همگن‌سازی کامل، مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه پنیر با ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط‌های غنی‌کننده انتخابی اولیه [6] مخلوط (Scharlau, Spain) و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد.

3. FoodNet
4. CDC
5. *L. innocua*
6. UVM I (University of Vermont I)

www.SID.ir

Archive of SID

سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط غنی‌کننده اولیه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده انتخابی ثانویه[7] (Scharlau, Spain) اضافه شد و مجدداً در ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. لازم به توضیح است برای مراحل غنی‌سازی اولیه و ثانویه از آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی هر مرحله (Scharlau, Spain)، استفاده شد. پس از هر مرحله غنی‌سازی اولیه و ثانویه، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر در محیط جامد انتخابی پالکام آگار[8] حاوی مکمل آنتی‌بیوتیکی (Merck, Germany) کشت سطحی داده شد. متعاقب گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، پرگنه‌های سیاه با هاله سبز-خاکستری با مرکز فرورفته و حاشیه سیاه‌رنگ انتخاب و به‌منظور حصول اطمینان از خالص بودن کشت و هم‌چنین احیای باکتری برای انجام آزمون‌های افتراقی، در محیط عصاره قلب و مغز[9] (Merck, Germany) کشت خطی داده شد (Hitchin and Jinneman, 2013; Ryser and Donnelly, 2001).

شناسایی افتراقی جدایه‌ها

برای شناسایی گونه‌های *لیستریا* از آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی متداول شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، MR-VP، حرکت در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس، احیای نیترات و هیدرولیز اسکولین استفاده شد. برای تشخیص گونه‌های *لیستریا* از آزمون‌های تولید اسید از مانیتول، رامنوز و زایلوز، فعالیت بتاهمولیتیکی و آزمون کمپ[10] (در محیط پایه آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند) استفاده گردید (Hitchin and Jinneman, 2013; Washington et al., 2006; Ryser and Donnelly, 2001; Silvia et al., 1998). برای آزمون CAMP، *استافیلوکوکوس اورئوس* از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (PTCC 1431) و *رودوکوکوس اکویی* (*Rhodococcus equi*) از مجموعه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز (ATCC 6939) تأمین شد.

بررسی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ابتدا باکتری‌ها در محیط BHI broth در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و سپس غلظت نیم مک‌فارلند از کشت‌های باکتریایی تهیه گردید و به‌طور یکنواخت در سطح محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) کشت داده شد. برای بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسکی استفاده شد. برای این‌کار تعداد ۱۳ نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی شامل پنی‌سیلین، کوتری‌موکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین، نالیدکسیک اسید، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، اکساسیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین، سفالکسین و سفتریاکسون انتخاب شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فواصل منظم بر روی دو محیط کشت (۶ دیسک در هر پلیت) قرار گرفت و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. این آزمایش برای هر جدایه ۳ بار تکرار و میانگین قطر هاله عدم رشد بر اساس راهنمای شرکت تولیدکننده دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (پادتن‌طب، ایران)، قرائت و تفسیر گردید.

بررسی قابلیت تولید بیوفیلم

برای تعیین قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها از روش کمی میکروپلیت (Microtiter Plate Assay) استفاده شد. برای این منظور جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (Merck, Germany) حاوی عصاره مخمر (Merck, Germany) به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه

7. UVM II
8. PALCAM Agar
9. BHI agar
10. CAMP

www.SID.ir

Archive of SID

سلسیوس کشت و سپس تا رسیدن به $OD_{620} = 0.01$ رقیق‌سازی گردیدند. مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲ درصد (وزنی-حجمی) گلوگز به هر گوده میکروپلیت انتقال یافت و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در هر گوده تلقیح شد (Srey et al., 2013). تمامی جدایه‌ها و هم‌چنین شاهد منفی (محیط کشت سترون)، در سه تکرار آزمایش گردیدند. میکروپلیت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مرحله، محتویات میکروپلیت تخلیه و ۳ مرتبه با ۲۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه شستشو شد. برای تثبیت بیوفیلم در داخل گوده‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر گروه اضافه و پس از ۱۵ دقیقه نگه‌داری، تخلیه و خشک گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۲ درصد به هر گوده اضافه و بعد از ۵ دقیقه آب‌کشی شد و در شرایط محیطی خشک گردید. برای حل کردن کریستال‌ویوله باقیمانده، به هر گوده ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد اضافه شد و شدت رنگ با ELISA Reader و در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Srey et al., 2013). نتیجه میزان تولید بیوفیلم با استفاده از الگوی ارایه شده در جدول ۱ تفسیر گردید:

جدول ۱_میزان جذب نوری و نحوه محاسبه مقدار تولید بیوفیلم در جدایه‌های *لیستریا* در پنیرهای سنتی منطقه تبریز

جذب نوری*	تولید بیوفیلم
$OD_X \leq OD_C$	عدم تولید
$OD_C < OD_X \leq 2OD_C$	کم
$2OD_C < OD_X \leq 4OD_C$	متوسط
$OD_X > 4OD_C$	زیاد

* OD_C و OD_X به‌ترتیب شامل جذب نوری شاهد و جذب نوری نمونه‌های مجهول می‌باشد.

بررسی مقاومت حرارتی

برای ارزیابی مقاومت حرارتی، ابتدا هر جدایه *لیستریا* در محیط تریپتیک سوی براث کشت و به‌مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس تعداد ۸ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر از کشت تازه *لیستریا* در لوله‌های باریک شیشه‌ای تزریق گردید. دماهای ۶۳ و ۷۶ درجه سلسیوس به‌مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ ثانیه به‌ترتیب برای اعمال تیمارهای حرارتی «*ترمالیزاسیون*» (Thermalization) و «*پاستوریزاسیون سریع*»[11] و دمای ۶۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه برای اعمال «*پاستوریزاسیون کند*»[12] استفاده شد. برای حرارت‌دهی از بن‌ماری استفاده گردید و حرارت دستگاه با دو دماسنج دیجیتالی و شیشه‌ای مورد پایش قرار گرفت. متعاقب اعمال فرایندهای حرارتی، لوله‌های آزمایش بلافاصله در آب ۳۷ درجه سلسیوس غوطه‌ور شدند و میزان کاهش جمعیت *لیستریا* در پایان هر دوره زمانی با روش استاندارد پلیت کانت در محیط تریپتیک سوی آگار

11. HTST

12. LTLT

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی عصاره مخمر (۰/۵ درصد) تعیین گردید (Bailey et al.,1990).

نتایج

جدایه‌های باسیلی شکل و کوتاه، گرم مثبت، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، MR و VP مثبت، اسکولین مثبت، نیترات منفی، حرکت چتری در ۲۵ درجه سلسیوس و غیرمتحرک در ۳۷ درجه سلسیوس به‌عنوان جنس *لیستریا* انتخاب شدند. بر این اساس ۱۲ جدایه *لیستریا* شناسایی و سپس مورد آزمون‌های افتراقی قرار گرفت.

بر اساس نتایج آزمون‌های افتراقی، از مجموع ۱۲ سویه جداسازی شده در این پژوهش، ۷ مورد (۵۸/۳۳ درصد) از نمونه‌ها گونه *ایوانووی*[13] و ۵ مورد (۴۱/۶۶ درصد) گونه *مونوسایتوجنز* شناسایی شدند (جدول ۲). در مجموع قابلیت همولیز گونه‌های *مونوسایتوجنز* ضعیف (+) و گونه *ایوانووی* متوسط (++) برآورد گردید، در مقابل نتایج آزمون کمپ به‌وضوح این دو گونه *لیستریا* را از هم تفکیک نمود (شکل ۱). در جدول (۳) قطر هاله عدم رشد برای ۵ جدایه *مونوسایتوجنز* و ۷ جدایه *ایوانووی* نسبت به ۱۳ آنتی‌بیوتیک مختلف نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، تمامی ۱۲ سویه جداسازی شده از نمونه-های پنیر سنتی منطقه تبریز، نسبت به ۵ آنتی‌بیوتیک کوتری‌موکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسن، اریترومایسن و ونکومایسن ۱۰۰ درصد حساس بودند. در مقابل تمامی سویه‌ها نسبت به اکساسیلین مقاومت نشان دادند. اما در مورد سایر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این پژوهش، سویه‌های *لیستریا* درجات متفاوتی از حساسیت را نشان دادند (جدول ۴). نتایج تولید بیوفیلم ۱۲ سویه مورد مطالعه در شکل (۲) و نمودار (۱) نشان داده شده است. در نمودار (۱) خط آستانه (Treshold: T)، دو برابر (2T) و چهار برابر آستانه (4T) مشخص گردیده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، تمامی گونه‌های *مونوسایتوجنز* مولدین ضعیف بیوفیلم بودند در حالی که گونه‌های *ایوانووی* درجات ضعیف (C-۳)، متوسط (B-۳) و قوی (A-۲) از تولید بیوفیلم را نشان دادند. طبق یافته‌های مطالعه، فرایند حرارتی ترمالیزاسیون (۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه) تأثیر معنی‌داری ($P>0.05$) بر گونه‌های *مونوسایتوجنز* و *ایوانووی* نداشت (نمودار ۲-الف). در مقابل فرایند پاستوریزاسیون سریع طی ۵ ثانیه جمعیت بیش از ۸ واحد لگاریتمی را به کمتر از حد قابل ردیابی کاهش داد. این میزان کاهش برای هر دو گونه *مونوسایتوجنز* و *ایوانووی* مشابه و معنی‌دار ($P<0.01$) بود (نمودار ۲-ب). در تیمار حرارتی پاستوریزایسون کند تفاوت معنی‌داری ($P<0.01$) بین گونه‌های *مونوسایتوجنز* و *ایوانووی* دیده شد. به‌عبارتی گونه *مونوسایتوجنز* در مرحله اول (دقیقه ۵) به حد غیرقابل ردیابی رسید، در حالی که گونه *ایوانووی* در همین مقطع زمانی کاهش ۴ واحد لگاریتمی داشت. روند کاهش با گذشت زمان ادامه یافت و در ۳۰ دقیقه تعداد آن به کمتر از حد قابل ردیابی رسید (نمودار ۲-ج).

13. *ivanovii*

www.SID.ir

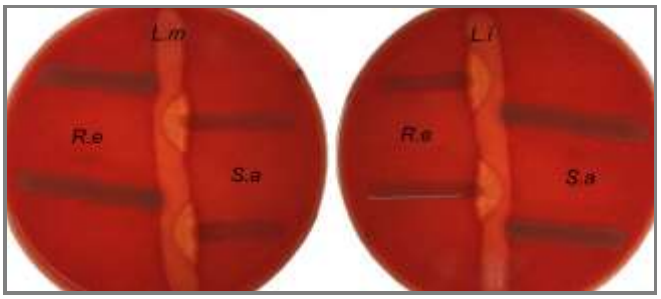
Archive of SID

جدول ۲- نتایج آزمون‌های افتراقی گونه‌های *لیستریای* جداسازی شده از پنیرهای سنتی منطقه تبریز

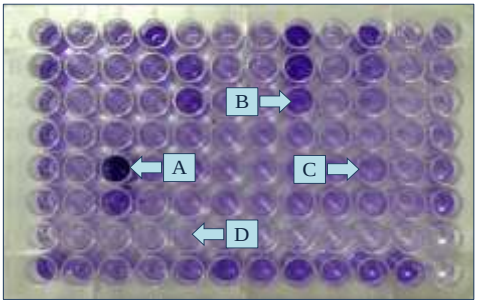
ردیف	شماره نمونه	مصرف قند			CAMP*		همولیز**	تفسیر نتیجه
		مانیتول	رامنوز	زایلوز	*S.a*	*R.e*		
۱	۱	–	–	+	–	+	++	لیستریا ایوانووی
۲	۵	–	+	–	+	–	+	*لیستریا منوسیتوژنز*
۳	۱۳	–	–	+	–	+	++	*لیستریا ایوانووی*
۴	۱۸	–	–	+	–	+	++	*لیستریا ایوانووی*
۵	۲۳	–	–	+	–	+	++	*لیستریا ایوانووی*
۶	۳۵	–	+	–	+	–	+	*لیستریا منوسیتوژنز*
۷	۳۸	–	+	–	+	–	+	*لیستریا منوسیتوژنز*
۸	۴۴	–	–	+	–	+	++	*لیستریا ایوانووی*
۹	۵۰	–	+	–	+	–	++	*لیستریا منوسیتوژنز*
۱۰	۶۹	–	–	+	–	+	+	*لیستریا ایوانووی*
۱۱	۷۰	–	–	+	–	+	+	*لیستریا ایوانووی*
۱۲	۸۰	–	+	–	+	–	++	*لیستریا منوسیتوژنز*

* *S.a* و *R.e*: به‌ترتیب نشان‌دهنده *استافیلوکوکوس اورئوس* و *رودوکوکوس اکویی* می‌باشد.

** (+) و (++) به‌ترتیب بیانگر همولیز ضعیف و متوسط است.



شکل ۱- واکنش مثبت CAMP گونه *مونوسایتوجنز* (*L.m*) با *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S.a*) و واکنش منفی با *رودوکوکوس اکویی* (*R.e*) (چپ)؛ حالت عکس واکنش فوق در گونه *ایوانووی* (*L.i*) (راست).



شکل (۲)- شدت رنگ (میزان تولید بیوفیلم) در جدایه‌های مختلف *لیستریا*؛ A، B، C و D به‌ترتیب نشانگر میزان زیاد، متوسط، کم و عدم تولید بیوفیلم می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف برای جدایه‌های *لیستریا* در پنیرهای سنتی منطقه تبریز

گونه *لیستریا**	نام دیسک** P10	SXT	TE30	GM10	E15	C30	CC2	OX1	AM10	V30	NA30	CF30	CRO30
L.i	۰	۲۴	۲۲	۲۶	۲۸	۱۷	۱۳	۰	۱۹	۲۳	۲۶	۰	۲۴
	۱۸	۱۷	۲۰	۲۴	۲۶	۲۶	۱۲	۰	۳۸	۲۶	۰	۲۰	۰
	۰	۲۳	۲۰	۲۳	۲۶	۳۰	۱۶	۰	۴۰	۲۴	۰	۱۹	۰
	۰	۲۴	۲۲	۲۸	۳۲	۲۴	۱۷	۰	۰	۲۶	۰	۲۱	۰
	۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۸	۲۸	۱۶	۰	۳۸	۲۴	۰	۲۱	۰
	۳۲	۲۴	۲۴	۲۴	۳۰	۱۸	۱۸	۰	۳۶	۲۳	۰	۱۸	۰
	۳۲	۳۲	۲۸	۲۰	۳۴	۲۲	۱۲	۰	۳۸	۲۸	۳۴	۰	۲۸
L.m	۲۸	۲۴	۱۹	۲۳	۲۶	۱۸	۲۲	۰	۳۲	۲۱	۰	۲۸	۱۶
	۳۰	۳۲	۲۱	۲۳	۳۰	۲۴	۲۰	۰	۳۰	۲۲	۳۰	۰	۲۰
	۳۰	۳۶	۲۶	۲۴	۲۴	۲۰	۱۶	۰	۳۰	۲۰	۰	۲۴	۱۷
	۲۲	۳۴	۲۰	۲۸	۳۰	۲۶	۲۰	۰	۲۴	۱۹	۰	۲۴	۱۷
	۲۶	۲۸	۲۱	۲۵	۲۷	۱۲	۲۰	۰	۳۲	۲۰	۰	۲۵	۱۷

* *L.i* و *L.m* به‌ترتیب بیانگر *لیستریا ایوانووی* و *لیستریا مونوسایتوجنز* می‌باشد.

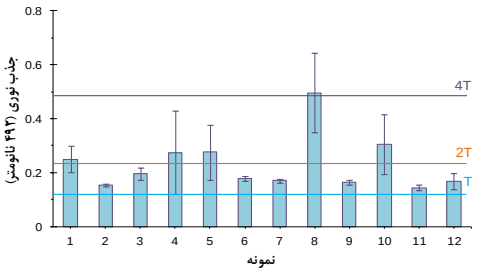
** P10، SXT، TE30، GM10، E15، C30، CC2، OX1، AM10، V30، NA30، CF30 و CRO30 به‌ترتیب نشاندهنده پنی‌سیلین، کوتری‌موکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسن، اریترومایسن، کلرامفنیکل، کلیندامایسن، اکساسیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسن، نالسیدیک اسید، سفالکسین و سفتریاکسون است.

جدول (۴)- مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *لیستریای* جداسازی شده از پنیرهای سنتی منطقه تبریز

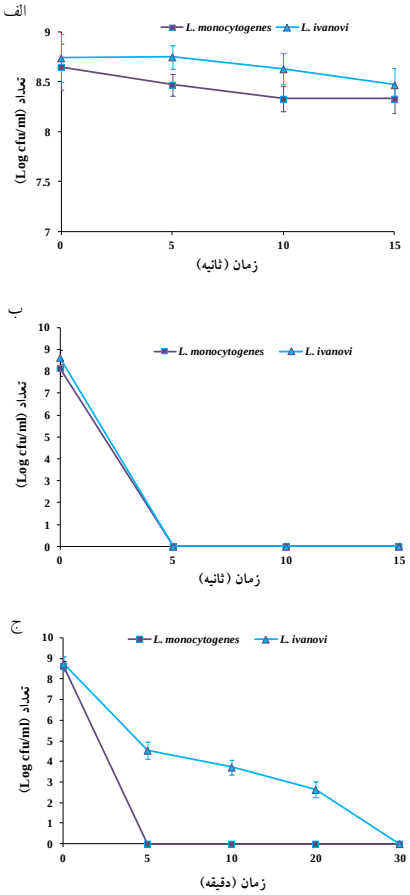
نام آنتی‌بیوتیک	درصد مقاومت و حساسیت جدایه‌ها		
	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
پنی‌سیلین G	۶۶/۶۶	۰	۳۳/۳۳
کوتری‌موکسازول	۰	۰	۱۰۰
تتراسایکلین	۰	۰	۱۰۰
جنتامایسین	۰	۰	۱۰۰
اریترومایسین	۰	۰	۱۰۰
کلرامفنیکل	۸/۳۳	۸/۳۳	۸۳/۳۳
کلیندامایسین	۲۵	۶۶/۶۶	۸/۳۳
اکساسیلین	۱۰۰	۰	۰
آمپی‌سیلین	۸/۳۳	۰	۹۱/۶۶
ونکومایسین	۰	۰	۱۰۰
نالیدکسیک اسید	۷۵	۰	۲۵
سفالکسین	۲۵	۰	۷۵
سفتریاکسون	۲۵	۳۳/۳۳	۴۱/۶۶

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار (۱)- میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌های مختلف؛ T، 2T و 4T به‌ترتیب نشانگر حد آستانه (Treshold)، دو برابر و چهار برابر حد آستانه می‌باشد.



نمودار (۲)- تغییرات جمعیت گونه‌های *لیستریای* جداسازی شده از پنیرهای سنتی منطقه تبریز در اثر اعمال تیمارهای ترمالیزاسیون (الف)، پاستوریزاسیون سریع (ب) و پاستوریزاسیون کند (ج)

بحث

از جمله مسایل و ملاحظات مهم کشورهای در حال توسعه، آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی می‌باشد که منجر به بیماری‌های غذازاد و ایجاد مخاطرات در سطح بهداشت عمومی می‌شود. برای پیشگیری و کنترل این بیماری‌ها ضروریست میزان شیوع عوامل میکروبی در مناطق مختلف شناسایی و سطح مخاطره مزبور برآورد گردد. در همین راستا، تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی منطقه تبریز با هدف بررسی میزان آلودگی این فرآورده با گونه‌های لیستریا مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، تعداد ۱۲ نمونه به جنس لیستریا آلودگی داشتند که از این بین ۷ مورد مربوط به لیستریا ایوانووی و ۵ مورد مربوط به لیستریا منوسایتوجنز بودند. لازم به توضیح است تمامی جدایه‌های لیستریا در مرحله غنی‌سازی ثانویه

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی شدند که این موضوع نشان‌دهنده تعداد کم این باکتری در نمونه‌های پنیر سنتی می‌باشد. به‌علاوه، درمحیط کشت اختصاصی مورد استفاده برای جداسازی لیستریا آلودگی با باکتری‌های همراه بسیار محدود بود که حاکی از اثربخشی محیط پالکام در مهار باکتری‌های همراه است. در سرتاسر جهان و از جمله مناطق مختلف ایران مطالعات مشابهی در مورد میزان شیوع لیستریا در شیر و فرآورده‌های آن انجام گرفته است. در این بررسی‌ها میزان شیوع از صفر درصد (Jalali et al., 2008) تا ۳۳/۱ درصد (Arsalan and Özdemir, 2008) متفاوتی برآورد شده است و میزان شیوع به‌دست آمده در مطالعه اخیر (۱۲ درصد) تقریباً حد متوسطی از مطالعات مشابه می‌باشد. به‌نظر می‌رسد عوامل جغرافیایی، سیستم دامپروری، فصل نمونه‌برداری، و روش جداسازی و شناسایی لیستریا موجب این تفاوت شده است. در مطالعه حاضر، نتایج ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که از بین ۱۳ نوع آنتی‌بیوتیک، همه جدایه‌های لیستریا (۱۰۰٪) به کوتری‌موکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومایسین و ونکومایسین حساس و اکثراً به کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، و سفالکسین حساس بودند. هم‌چنین بیشترین میزان مقاومت پس از اکساسیلین (۱۰۰٪)، نالیدکسیک‌اسید (۷۵٪) و به‌دنبال آن پنی‌سیلین جی (۶۶/۶۶٪) و کمترین میزان مقاومت به کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین (۸/۳۳٪)مشاهده شد. آنتی‌بیوتیک کلینداماسین اکثراً در حالت نیمه‌حساس (بینابینی) قرار داشت. مطالعات انجام یافته بر روی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه-های لیستریای جداسازی شده از شیرخام و سایر محصولات لبنی سنتی شیر در ایران نشان می‌دهد، همه گونه‌ها به ونکومایسین، ریفامپین و کوتری-موکسازول، غالباً به جنتامایسین، کانامایسین، کلینداماسین و استرپتومایسین و اکثراً به آمپی‌سیلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و کوآموکسی‌کلاو حساس بودند. از این نظر نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات هم‌خوانی زیادی داشت. هم‌چنین بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب در نالیدیکسیک‌اسید، پنی‌سیلین، تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین مشاهده شد (مجتهدی و همکاران ۱۳۸۳؛ Jamali et al., 2015; Rahimi et al., 2010; Rahimi et al., 2012). برخلاف این نتایج، در تحقیق حاضر لیستریا به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین حساس بوده و بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک اکساسیلین دیده شد. در مطالعه‌ای دیگر سویه‌های لیستریا مونوسایتوجنز به‌دست آمده از شیر گاو بیشترین میزان مقاومت را به‌ترتیب به تتراسایکلین، پنی‌سیلین و اریترومایسین و بیشترین میزان حساسیت را به‌ترتیب به تری‌متوپریم، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین از خود نشان دادند. تقریباً نصف جدایه‌ها به جنتامایسین، سولفامتوکسازول و آمپی‌سیلین حساس و نصف دیگر مقاوم بودند (Safarpoor Dehkordi et al., 2013). در مطالعه حاضر، بر خلاف پژوهش صورت گرفته در ایران که تمامی سویه‌های مورد آزمون را حساس به آنتی‌بیوتیک کلینداماسین گزارش کردند (Jamali et al., 2015)، صرفاً ۸/۳۳ درصد به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند. بررسی‌های صورت گرفته بر روی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی لیستریا مونوسایتوجنز در کشورهای خارجی نتایج متفاوتی داشته است. در این راستا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های لیستریای جداسازی شده از شیرخام و پنیر خانگی نشان داد تمامی گونه‌های لیستریا به ونکومایسین و کوآموکسی-کلاو، و غالباً به آمپی‌سیلین، کوتری‌موکسازول، ریفامپین، جنتامایسین و پنی‌سیلین و سیپروفلوکساسین حساس بودند. هم‌چنین در بین جدایه‌ها بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب به پنی-سیلین و کلرامفنیکل اختصاص داشت و مقاومت به تتراسایکلین در حالت بینابینی بود (Harakeh et al.,

www.SID.ir

Archive of SID

2009; Soni et al., 2013; Aureli et al., 2003; Arslan & Ozdemir 2008; Korsak et al., 2012; DeNes et al., 2010; AL-Ashmawy 2014; Srinivasan et al., 2005). تشکیل بیوفیلم لیستریا بر سطوح مختلف نظیر تجهیزات پزشکی و غذایی امکان انتقال این باکتری را افزایش داده و از نظر بهداشتی و انتقال بیماری حائز اهمیت می‌باشد. پاکسازی و ضدعفونی موثر مکان‌های مستعد رشد باکتری در خط تولید، عامل مهم در حذف بیوفیلم‌های باکتریایی از سطوح تماس می‌باشد. مشکل دیگر در ارتباط بیوفیلم در صنعت غذا، تشکیل آن‌ها در مکان‌هایی مانند صفحات تبادل حرارتی است که موجب کاهش راندمان انتقال حرارت می‌شود. علاوه بر این، برخی از میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم، واکنش‌های شیمیایی و بیولوژیکی را که منجر به خوردگی سطوح فلز می‌شوند، کاتالیز می‌کنند. موثرترین روش حذف بیوفیلم، پاکسازی طولانی‌مدت با پاک‌کننده‌های قلیایی حاوی ترکیبات شلاته‌کننده (chelator) می‌باشد (Mafu et al., 1990). اگرچه لیستریا مونوسایتوجنز از بسیاری محل‌های تشکیل بیوفیلم در تجهیزات مواد غذایی جداسازی شده است، اما مدرک مستقیمی مبنی بر ارتباط حضور بیوفیلم‌های حاوی عوامل بیماری‌زای میکروبی با شیوع بیماری وجود ندارد (Griffiths, 2004). در مطالعه اخیر ۱۲ جدایه لیستریا مقادیر متفاوتی از تولید بیوفیلم را نشان دادند. این اختلاف می‌تواند در نتیجه تفاوت سویه‌های مورد آزمایش باشد. در مطالعه‌ای مشخص گردید که لیستریا قادر به تولید بیوفیلم نیست اما به‌راحتی می‌تواند به سطوح متصل شود (Kalmokoff, 2001). در همین راستا توانایی اتصال بیش از ۱۰۰ سویه لیستریا به سطوح گزارش گردیده است (Norwood,1999). در مطالعه‌ای که برروی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌های لیستریا مونوسایتوجنز با استفاده از روش میکروپلیت انجام گرفت، اختلاف معنی‌داری بین میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های این باکتری مشاهده شد که از این حیث با یافته‌های مطالعه اخیر مطابقت دارد (Borucki et al., 2003; Harvey et al., 2006). فرایندهای حرارتی یکی از رایج‌ترین و متداول‌ترین راهکارها برای کنترل عوامل بیماری‌زای میکروبی در مواد غذایی است. با توجه به تحقیقات انجام یافته، مقاومت حرارتی لیستریا مونوسایتوجنز در مواد غذایی بسیار متفاوت است و به عواملی نظیر سن کشت (فاز رشد)، شرایط نگهداری و ترکیب ماده غذایی بستگی دارد. در این میان پخت مواد غذایی با دمای داخلی ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه برای اطمینان از نابودی لیستریا مونوسایتوجنز کافی است. پاستوریزاسیون متداول شیر، لیستریا مونوسایتوجنز را غیرفعال می‌کند اما استفاده از دماهای بالاتر طی مدت زمان کوتاه‌تر، روش قابل اطمینان‌تری محسوب می‌شود (Jayamanne et al., 2010). طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، پاستوریزاسیون شیرخام در ۷۱/۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه جمعیت لیستریا مونوسایتوجنز را به‌حدی که برای سلامت انسان خطرزا نیست، کاهش می‌دهد (Doyle et al. 1987). در مطالعه حاضر نتایج آزمون مقاومت حرارتی نشان داد که پاستوریزاسیون سریع و کند در مدت زمان‌های تعریف شده برای هر فرایند قادر به از بین بردن لیستریا می‌باشند. با این توضیح که در پاستوریزاسیون کند گونه ایوانووی مقاومت بیشتری نشان داد. با این حال، جمعیت بیشتر از ۸ واحد لگاریتمی گونه‌های مونوسایتوجنز و ایوانووی به کمتر از حد قابل ردیابی رسد. این جمعیت از لیستریا بسیار بیشتر از جمعیت معمول آن در نمونه‌هایی نظیر شیر خام و پنیر می‌باشد، بنابراین این فرایندهای حرارتی می‌توانند به‌طور موثری در سالم‌سازی مواد غذایی از نظر آلودگی با لیستریا مورد استفاده قرار گیرند. در مقابل، نتایج فرایند ترمالیزاسیون حاکی از عدم تأثیرگذاری این

www.SID.ir

Archive of SID

فرایند حرارتی بر بقای گونه‌های مونوسایتوجنز و ایوانووی می‌باشد؛ به‌نحوی که بعد از اعمال دمای ۶۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه، به‌طور میانگین ۰/۳ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر جمعیت گونه‌های لیستریا کاهش یافت. مطالعه‌ای مشابه نشان داد که پاستوریزاسیون متداول شیر در دمای ۶۲/۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و ۷۱/۷ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه جمعیت میکروبی شیر را به‌میزان ۲ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر کاهش می‌دهد، اما در شیرهای با جمعیت ۷ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر کاهشی مشاهده نشد (Jayamanne et al., 2010) که از این نظر با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت ندارد. دلیل این اختلاف یافته‌ها می‌تواند در تفاوت سویه‌های لیستریا و یا تفاوت در نحوه اعمال تیمارهای حرارتی باشد.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن یافته‌های تحقیق می‌توان به این جمع‌بندی رسید که درصد بالایی از پنیرهای سنتی منطقه تبریز آلوده به گونه‌های *لیستریا* هستند. با توجه به این‌که گونه‌های جداسازی شده و به‌ویژه گونه *مونوسایتوجنز* قابلیت بیماری‌زایی در انسان را دارند، لذا از این نظر خطر بالقوه برای مصرف‌کنندگان این قبیل پنیرها محسوب می‌شود و لزوم اعمال کنترل‌های بهداشتی برای دام‌ها، هنگام شیردوشی و تولید و فرآوری محصولات شیر را می‌طلبد. از طرفی، مقاومت اکثر جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون، نشانگر الگوی نامناسب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دامی در منطقه تبریز می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای جدایه‌ها به همراه قابلیت تولید بیوفیلم به میزان مخاطره مزبور می‌افزاید.

سپاس‌گزاری

این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام گرفت.

منابع

۱. رحیمیان ظریف، بهاره (۱۳۸۸). جستجوی *لیستریا مونوسایتوجنز* در شیرخام و پاستوریزه استان کردستان. پژوهش‌های بالینی دام‌های بزرگ (دامپزشکی)، شماره ۹، سال سوم. دوره ۳، شماره ۹، صفحه ۷۶-۷۱.

۲. رحیمی، ابراهیم؛ بهزادنیا، اسما؛ شاکریان، امیر؛ ممتاز، حسن (۱۳۸۸). فراوانی گونه‌های *لیستریا* در شیرخام، پنیر و بستنی سنتی عرضه شده در شهرکرد و شیراز. دنیای میکروب‌ها، دوره ۲، شماره ۴، پیاپی ۵، صفحه ۲۴۸–۲۴۳.

۳. شاملو آقاخانی، احسان؛ جلالی، محمد؛ میرلوحی، مریم؛ عبدی مقدم، زهره؛ شاملو آقاخانی، الهام؛ مراثی، محمدرضا؛ یاران، مجید (۱۳۹۱). شیوع گونه‌های *لیستریا* در شیر خام عرضه شده در سطح شهر اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان، دوره ۳۰، شماره ۲۰۴، صفحه ۱۳۶۳-۱۳۵۵.

4. Al-Ashmawy, M.A., Gwida, M.M. and Abdelgali, K.H. 2014. Prevelence detection methods and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and soft chesses and its zoonotic importance. World Appl Sci J. 29(7): 869–878.
5. Arsalan, S. and Ozdemir, F. 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria spp*. in homemade white cheese. Food Contr. 19, 360–363.
6. Aureli, P., Ferrini, A.M., Hodzic, S., Weergaard, C.W. and Olivia, B. 2003. Suseptibilites of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. Int J Food Microbiol. 83: 325–330.
7. Bailey, J.S., Fletcher, D.L. and Cox, N.A. 1990. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria*

www.SID.ir

Archive of SID

Listeria monocytogenes in Foods. Available at: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm

17. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition. Baltimore, Williams &Wilkins, p. 787.
18. Jalali, M. and Abedi, D. (2008). Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. Int J Food Microbiol. 122: 336–340.
19. Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C.Y., Wong, W.F., Radmehr, B. and Abedini, A. 2015. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. BMC Microbiol. 15: 144–150.
20. Jamali, H., Chai, L.C. and Thong, K.L. 2013. Detection and isolation of Listeria spp. and *Listeria monocytogenes* inready-to-eat foods with various selective culture media. Food Contr, 32: 19–24.
21. Jayamanne, V.S. and Samarajeewa, U. 2010. Evaluation of the heat resistance of pathogenic *Listeria monocytogenes* in milk and milk products in Sri Lanka. Trop Agri Res Ext. 13, 73–80.
22. Kalmokoff, M.L., Austin, J.W., Wan, X.D., Sanders, G., Banerjee, S. and Farber, J.M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. J Appl Microbiol; 91:725–34.
23. Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., and Pappelbaum, K. 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. Int J Food Microbiol. 158: 203–208.
24. Liu, D. and Busse, H.J. 2010. *Listeria monocytogenes*. In: Liu, D. (ed.), Molecular Detection of Foodborne Pathogens. CRC Press, New South Wales, pp. 207–220.

monocytogenes. J Food Protect. 53(6), 473-477.

8. Behravesh, C.B., Jones, T.F., Vugia, D.J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K.E., Henao, O.L. and Scallan, E. (2011). Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005. J Infect Dis. 204, 263–267.
9. Borucki K.P., White, D., Loge, D.F. and Call, R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. J Appl Environ Microbiol, 12: 7336–7342.
10. DeNes, F., Riboldi, G.P., Frazzon, A.P.G., Azevedo P.A. and Frazzon, J. 2010. Antimicrobial resistance and investigation of molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. Rev Soc Bras Med Trop. 43(4): 382–385.
11. Fedio, W.M. and Jackson, H. (1992). On the origin Of *Listeria monocytogenes* in raw bulk-tank milk. Int Dairy J. 2, 197–208.
12. Gaya, P., Sanchez, J., Medina, M. and Nunez, M. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other Listeria species in raw milk produced in Spain. Food Microbiol. 15, 551–555.
13. Griffiths, M.W. 2004. *Listeria* properties and occurrence, detection, listeriosis. In: Caballero, B., Trugo, L. and Finglas, P. (eds), Encylopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, pp.3562–3587.
14. Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E. and Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. Sci Total Environ. 407, 4022–4027.
15. Harvey, J., Keenan, K.P. and Gilmour, A. 2006. Assesing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. J Food Microbiol. 24, 380–392.
16. Hitchins, A.D., Jinneman, K. and Chen, Y. 2016. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10, Detection and Enumeration of

www.SID.ir

Archive of SID

traditional dairy product in Chaharmahal & Bakhtiari, Iran. Bul J Vet Med.15, 115–122.

31. Rosenow, E.M. and Marth, E.H. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35 °C. J Food Protect. 50, 452–459.
32. Ryser, E.T. and Donnelly, C.W. 2001. *Listeria*. In: Pouch Downes, F. and Ito, K. (eds), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3rd Edition, American Public Health Association, Washington DC. pp. 343-353.
33. Silvia, D., Delgado, M.C. and Anita, T. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Produced in Rio de Janeiro, Braz J Food Protec. 61, 3, 354–356.
34. Srinivasan, V., Nam, H.M., Nguyen, L.T., Tamilselvam, B., Murinda, S.E., and Oliver, S.P., 2005. Prevelence of antimicrobial resistance gene in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. Foodborne Pathog Dis. 2, 201–211.
35. Van Kessel, J., Karns, J., Gorski, L., McCluskey, B. and Perdue, L. 2004. Prevalence of Salmonella, *Listeria monocytognes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on dairies. J Dairy Sci, 87, 2822–2830.
25. Mafu, A.A., Roy, D., Savoie, L. and Roy, R. 1990. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. J Dairy Sci. 73: 3428-3432.
26. Mahmoodi, M. 2010. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products in Noorabad, Iran. J Anim Vet Adv. 9, 16–19.
27. McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. and Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. Int J Food Microbiol. 92, 15–33.
28. Norwood, D.E. and Gilmour, A. 1999. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. J Appl Microbiol. 86: 576–82.
29. Rahimi, E., Ameri, M. and Momtaz, H. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. Food Contr, 21, 1448–1452.
30. Rahimi, E., Momtaz, H., Sharifzadeh, A., Behzadnia, A., Ashtari, M.S., Zandi Esfahani, S., Riahi, M. and Momeni, M. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species isolated from

www.SID.ir

Archive of SID

Listeria isolated from traditional cheeses of Tabriz area: Occurrence, diversity and phenotypic characteristics

Kalantaripour A[1], Hanifian S[2*]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

[*]**Corresponding Author:** *hanifian@iaut.ac.ir*

Received: 20 April 2017 Accepted: 22 June 2017

Abstract

Contamination of milk and its products with pathogenic organisms such as *Listeria* could be considered as a health threat for the consumers. The aim of this study was to investigate the occurrence and diversity of Listeia spp. in traditional cheeses of Tabriz area and to assess antibiotic resistance, biofilm formation and thermal-resistance of the isolates. A total number of 100 traditional cheese was collected randomly. *Listeria* spp. were isolated and identified using conventional culture methods. According to the results, 12 out of 100 cheese samples were found positive for *Listeria* spp. Amongst, 5 and 7 isolates were identified as *monocytogens* and *ivanovii*, respectively. The highest rate of resistance was observed for oxacillin (100%) and nalidixic acid (75%), and the highest rate (100%) of sensitivity was related to cotrimoxazole, tetracycline, gentamicin, erythromycin and vancomycin. Results of biofilm assay reveled that all 5 strains of *L. monocytogens* produced low amount of biofilm, meanwhile strains of *L. ivanovii* produced a range (weak, moderate and high) of biofilm level. Based on thermal-resistance outcomes, thermalisation process had insignificant impact on *Listeria* strains; whereas application of "rapid pasteurization" process for 5 sec, reduced the populations of both Listeia specis to below the detectable limit ($P < 0.01$). In the case of batch pasteurization, two Listeria species demonstrated significant ($P < 0.01$) degree of resitsnce. Since *L. monocytogenes*, and in a lesser extent *L. ivanivi* are human pathogens of concern, it was concluded that traditional cheeses of Tabriz area could pose a health hazard dealing with Listeria.

Keywords: *Listeria* spp., Traditional cheese, Antibiotic sensitivity, Biofilm, Heat resistance.

www.SID.ir