ردیابی و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های لیستریا مونوسایتوژنز جدا شده از کشک و پنیر

راحیل کیانپور برجوئی[۱]، حسن ممتاز*[۱]، لیدا لطف الهی[۱و۲]، زهرا بم زاده[۱و۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۳.گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hamomtaz@yahoo.com*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۲

چکیده

لیستریا مونوسایتوژنز یکی از عوامل بیماری‌زای منتقل شده از غذا و باعث لیستریوزیس در انسان و حیوان می باشد. آلودگی های میکروبی غذاها معمولا منجر به بروز مسمومیت‌های غذایی گسترده به شکل اپیدمی‌های فراگیر در سطح مناطق می شود که از نظر بهداشت عمومی بسیار قابل توجه است و از جمله مسائل مهم و درخور توجه کشورهای درحال توسعه می باشد این مطالعه با هدف تعیین آلودگی *لیستریا مونوسایتوژنز* در لبنیات با استفاده از روش کشت و تایید نهایی با روش PCR می باشد. در این مطالعه ۱۵۰ نمونه لبنی مختلف عرضه شده در بازار به طور تصادفی خریداری، تحت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه انتقال و مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر آزمایشات مبتنی بر محیط کشت نمونه‌های مثبت جهت تایید نهایی و شناسایی پاتوژن مذکور به روش مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۱۴ (۹/۳۳ درصد) نمونه مثبت شامل ۶ نمونه پنیر سفید (۴ درصد)، ۴ نمونه پنیر خامه ای (۲/۶ درصد) و ۳ نمونه کشک (۲ درصد) از نظر آلودگی مثبت گزارش شدند. سنجش حساسیت ضدمیکروبی در مقابل ۱۶ آنتی‌بیوتیک حساسیت بالایی به کلیندامایسین (۴۷/۳۷ درصد) نشان داده شد. قابل توجه است که به چند دارو مقاوم بود. حضور *لیستریا مونوسایتوژنز* در محصولات لبنی (پنیر، پنیرخامه ای وکشک) مورد مطالعه اثبات گردید، بر اساس نتایج به دست آمده افرادی که از لبنیات آلوده استفاده می کنند در معرض خطر بالقوه ابتلا به لیستریوزیس هستند در نتیجه متصدیان امور ایمنی موادغذایی باید استاندارد موثری را برای بررسی حضور لیستریا در موادغذایی ایجاد کنند.

کلید واژه‌ها: *لیستریا مونوسایتوژنز*، پنیر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، PCR.

مقدمه

لیستریا مونوسایتوژنز یک پاتوژن غذایی انسانی و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل بیماری‌های با منشاء غذایی و مسئول لیستریوزیس است، خطرات شدیدی را به خصوص در افراد مسن، زنان باردار، نوزادان تازه متولد شده و افراد با ضعف سیستم ایمنی به وجود می آورد (Mohsenzadeh, et al., 2020; Scallan, et al., 2011). از طیف وسیعی از مواد غذایی، نظیر شیر و محصولات لبنی، مواد غذایی گوشتی و انواع مختلفی از مواد غذایی دریایی جداسازی شده است (Maktabi, et al., 2013; zarei, et al., 2012). در صورت مصرف محصولات آلوده می تواند منجر به لیستریوزیس شود (Jucilene, et al., 2021). باکتری‌های جنس*لیستریا*کوکوباسیل گرم مثبت و میله‌ای شکل با انتهای گرد، هوازی بی‌هوازی اختیاری است (Yehia, et al., 2016).

اخیرا ارتباط قوی‌تری بین لیستریوز و مصرف فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده‌های غذایی گزارش گردیده است. شیر پاستوریزه، شیر غیر پاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه‌گیری مسمومیت غذایی شناخته شده‌اند. *لیستریا مونوسایتوژنز* قادر به رشد در شیر غیر پاستوریزه می‌باشد و احتمال افزایش تعداد ارگانیسم در طول مدت نگهداری در مخازن ذخیره شیر در گاوداری‌ها وجود دارد. (Abdollahzadeh, et al., 2016; Blood, et al., 2000). رشد این باکتری در دماهای پایین، شرایط خشکی، غلظت بالای نمک و شرایط اسیدی و پایداری در برابر استرس‌های اسمزی باعث افزایش بقا و پراکندگی آن شده است، لذا به راحتی می تواند در موادغذایی موجود در یخچال رشد کند و حتی در عملیات ناقص پاستوریزاسیون باقی مانده و از بین نروند. این توانایی باعث گردیده است که توجه زیادی به کنترل این باکتری در مواد غذایی معطوف گردد (Shamloo, et al,. 2014). علائم خفیف لیستریوز عبارتند از اسهال، استفراغ، تب، لرز، تشنج، سر درد، دردهای عضلانی، گاستروانتریت و در موارد تهاجمی علائم بالینی بارز این بیماری در انسان شامل سپتی‌سمی، انسفالیت (التهاب مغز) و مننژیت است. هم‌چنین، این بیماری ممکن است موجب سقط جنین، و تولد نوزاد مرده در زنان باردار و بروز مننژیت یا عفونت خونی در نوزادان شود (Orsi, et al., 2011; Rocourt, et al, 2000; Aygun, et al., 2006). محصولات پنیری برای چندین دهه منبع احتمالی شیوع لیستریوز بوده است (Zanger, et al., 2021). حداقل تعداد باکتری برای بیماری‌زایی، به حساسیت فرد و نوع غذا وابسته است. گزارش شده است که تعداد 10^{3}-10^{4} *لیستریا مونوسایتوژنز* در هر گرم پنیر می تواند ایجاد بیماری کند. در افراد حساس دوز عفونی احتمالا کمتر از ۱۰۰۰ سلول باکتری است (Abdimoghadam, et al., 2015). در کشورهای پیشرفته، بسیاری از بیماری‌هایی که از طریق غذا به انسان منتقل می شوند تحت کنترل در آمده اند. با این حال هنوز خسارات اقتصادی و مشکلات بهداشتی وجود دارد. این مسئله در کشورهای در حال توسعه محسوس‌تر است. شیر و فرآورده‌های آن از جمله پنیر که قسمت وسیعی از احتیاجات غذایی انسان را تامین می کند جزء مواد غذایی است که نقش فوق العاده با اهمیتی از نظر انتقال بیماری‌ها به انسان را دارد (Jamshidi, et al., 2011; Khedmati, et al,. 2019; Vaziri, et al., 2012). بر اساس آمارهای موجود حدود ۲۰ درصد شیر تولیدی کشور در بخش صنایع شیر، تبدیل به پنیر می شود (Najafi, et al., 2011).

این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مانند تتراسایکلین و پنی سیلین مقاومت نشان داده است (Jucilene, et al., 2021). اولین *لیستریا مونوسایتوژنز* مقاوم در سال ۱۹۸۸ جدا شد، و از آن زمان، بیش از ۷۰ سویه مقاوم به یک یا چند آنتی-بیوتیک از غذا یا موارد پراکنده لیستریوز جدا شده است (Heidarzadeh S., et al 2021). اطلاعات کمی در مورد وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، یا توزیع ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پنیرهای تجاری تولید شده وجود دارد. این‌ها معیارهای مهمی برای ارزیابی کیفیت و ایمنی هستند (Jinghui Y, et al., 2021). وجود گزارش‌های پراکنده در مواد غذایی مختلف از جمله مواد لبنی از این باکتری و همچنین موارد سقط جنین ناشی از این باکتری باعث ایجاد نگرانی شده است. لذا این مطالعه جهت بررسی آلودگی پنیر و کشک عرضه شده به *لیستریا مونوسایتوژنز* انجام گرفت.

مواد و روش کار

نمونه برداری: نمونه برداری از تعداد ۱۵۰ نمونه مواد غذایی لبنی مختلف شامل پنیر سفید، پنیر خامه ای، کشک تهیه شده بصورت تصادفی از محل فروش مواد لبنی بازار، انجام شد و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لیستریا مونوسایتوژنز: ۲۵ گرم از هر نمونه به ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده *لیستریا مونوسایتوژنز* حاوی ساپلمنت آنتی‌بیوتیک اضافه گردید. به مدت ۲ دقیقه به خوبی مخلوط گردید و در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مدت، به صورت کشت خطی در سطح محیط پالکام آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت انکوباسیون شد.

جهت رشد بهتر از جار حاوی CO_2 استفاده شد به مدت زمان ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند سپس پلیت‌های حاوی کلنی‌های کوچک مورب و کمی محدب با سطح هموار و مات با اطراف سبز روشن متمایل به آبی شفاف جهت تشخیص نگهداری شد. کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت اختصاصی جهت تایید *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد آزمون‌های شیمیایی قرار گرفتند.

از این کلنی‌ها نمونه برداری شد، پس از تهیه گسترش با رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی شد. کلنی‌های حاوی کوکوباسیل‌های گرم مثبت جهت پاساژ دادن در محیط آگار انتخابی کشت و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. جهت تمایز این باکتری از سایر باکتری‌ها تست کاتالاز از نمونه تهیه شده از کلنی خالص انجام شد. باکتری‌های کاتالاز مثبت را به محیط MR -VP انتقال داده و به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و نتیجه تست پس از اضافه کردن معرف بررسی گردید.

جهت تمایز بیشتر، کلنی‌های کاتالاز مثبت را روی محیط-های قندی که *لیستریا* آنها را تخمیر کرده و اسید تولید می کند کشت داده شد. از خصوصیات تحرک *لیستریا* در دمای ۲۲ درجه سلسیوس جهت تشخیص بهتر استفاده شد. جهت بررسی خاصیت همولیتیک *لیستریا مونوسایتونز*، کشت کلنی‌ها در ژلوز خوندار انجام شد.

علاوه بر آزمایشات مبتنی بر محیط کشت، نمونه‌های مثبت جهت تایید نهایی به وسیله روش مولکولی PCR جهت شناسایی پاتوژن مذکور مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA *لیستریا مونوسایتونز*: قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابتدا DNA *لیستریا مونوسایتوژنز* استخراج گردید.

باکتری‌های جدا شده را در محیط (brain heart infusion broth) BHIB کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند، استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش Boiling انجام گردید. کنترل نمونه مثبت از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد ATCC7644 تهیه گردید. واکنش PCR: برای انجام واکنش PCR، از پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی *لیستریا مونوسایتوژنز* (جدول۱) استفاده گردید. ابتدا Master Mix به حجم ۱۳/۵ میکرولیتر (PCR بافر ۱۰X، Mgcl2، dNTP،پرایمر، DNA الگو) تهیه و در لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری تقسیم گردید. به این منظور سویه‌ای که از نظر وجود هر دو ژن مورد مطالعه مثبت بود را پس از تعیین توالی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین از *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC7644) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. فرآیند PCR با برنامه دمایی جدول شماره ۲ انجام گردید.

الکتروفورز DNA با ژل آگارز: آنالیز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و بافر(Tris Boric acid Edta) TBE buffer انجام شد و در نهایت باندهای اختصاصی با دستگاه ژل داکت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها: بررسی مقاومت جدایه‌ها در مقابل دیس‌های آنتی بیوتیکی با استفاده از روش کربی بائر(DDA) مطابق پروتکل استاندارد CLSI 2014 انجام گرفت (Lotfollahi, et al., 2017).

از سوش‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 و *لیستریا مونوسیتوژنز* 7644ATCC برای کنترل کیفی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (کانامایسین، استرپتومایسین، پنی سیلین، آمپی سیلین، جنتامایسین، اریترومایسین، ریفامپین، تترا سایکلین، سیپروفلوکساسین و کوتریموکسازول، لووفلوکسین، سولباکتام و آمپی سیلین، کلیندامایسین، ونکومایسین، کلرامفنیکل) استفاده شد. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ثبت گردیدند.

جدول ۱- توالی پرایمر های *prs* و 16srRNA مختص گونه (Lyytikäinen, et al., 2000)

نام ژن هدف	اندازه محصول	توالی پرایمر	پرایمر	نام پرایمر
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (prs)	۳۷۰Bp	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	F	*Prs 01*
		CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	R	*Prs 02*
All Listeria spp.	۹۳۸Bp	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	F	توالی ژن *16srRNA*
		5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	R	

جدول۲- سیکل دمایی مورد استفاده

نام چرخه	دمای مورد استفاده	زمان	تعداد سیکل
Primary Denaturatin	۹۴ درجه سلسیوس	۳ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵ درجه سلسیوس	۴۰ ثانیه،	۳۰ سیکل تکراری
Anneling	۵۸ درجه سلسیوس	۵۵ ثانیه	
Extention	۷۲ درجه سلسیوس	۶۰ ثانیه	
Final Extention	۷۲ درجه سلسیوس	۶ دقیقه	۲

نتایج

در این مطالعه ۱۵۰ نمونه لبنی (۸۶ نمونه پنیر سفید، ۴۴ نمونه پنیر خامه ای، ۲۰ نمونه کشک) عرضه شده در سطح بازار جمع آوری گردید. در بررسی انجام شده پس از انجام مراحل نمونه‌برداری و مراحل جداسازی کلنی خالص شده و سنجش آزمایشگاهی مشخص گردید که از ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده ۶ نمونه (۴ درصد) پنیر سفید و ۴ نمونه (۲/۶ درصد) پنیر خامه ای، ۳ نمونه (۲ درصد) کشک از نظر آلودگی به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مثبت گزارش شدند (جدول ۴). این موارد مثبت که با استفاده از روش‌های شیمیایی به عنوان گونه *لیستریا مونوسایتوژنز* تشخیص داده شده بودند، تحت آزمون PCR قرار گرفته و تایید شدند (جدول شماره ۳) (تصویر ۱).

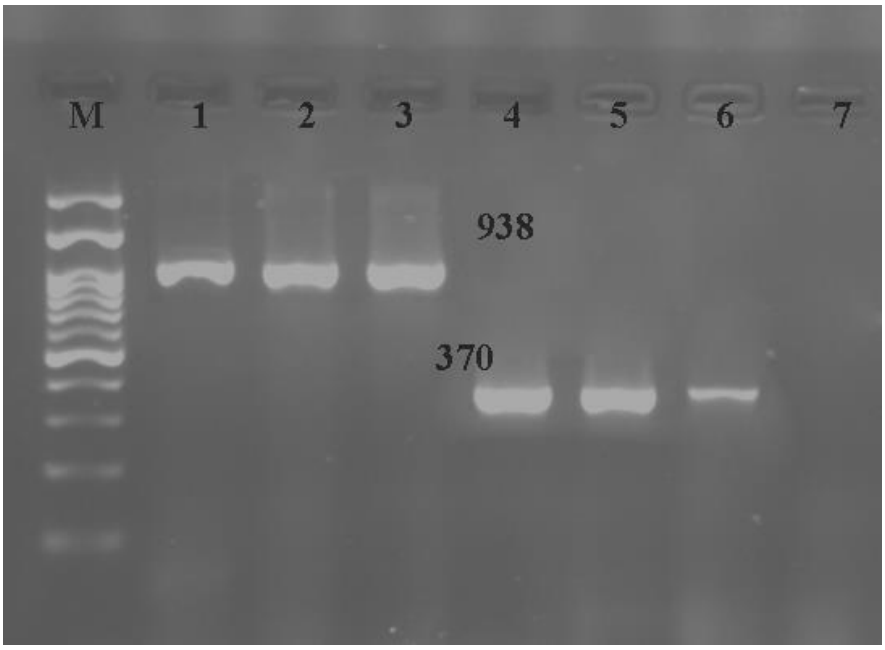
برای ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، لووفلوکسین، سیپروفلوکساسین، سولفامتوکسازول/تری متوپریم، سولباکتام/ آمپی سیلین، اریترومایسین، ریفامپین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، داکسی سیلین، ونکومایسین، کلرامفنیکل، آمپی سیلین، پنی سیلین مورد سنجش قرار گرفت. نتایج مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۳- خصوصیات بیوشیمیایی *لیستریا مونوسایتوژنز*

خصوصیات	تخمیر قند								بتا-همولیز
	کاتالاز	گالاکتوز	لاکتوز	سوکروز	گزیلوز	گلیکوژن	L-رامنوز	ملیزیتوز	
لیستریا مونوسایتوژنز	+	+/-	+	-	-	-	+	+/-	+

جدول ۴- فرآوانی آلودگی مواد غذایی مختلف جمع آوری شده به *لیستریا*

نمونه	تعدادنمونه	تعداد نمونه های مثبت	فرآوانی آلودگی در هر گروه (درصد)	فرآوانی آلودگی در کل نمونه ها (درصد)
پنیر سفید	۸۶	۶	۶/۹۷	۴
پنیر خامه ای	۴۴	۴	۹/۰۹	۲/۶
کشک	۲۰	۳	۱۵	۲
کل	۱۵۰	۱۲	-	۸



تصویر ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* (قطعه ۹۳۸ جفت بازی در ستون های ۳-۱) و ژن *Prs* (قطعه ۳۷۰ جفت بازی در ستون های ۶-۴)، ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۷= کنترل منفی

جدول ۵- نتایج مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های لبنی

Sample	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Folate pathway inhibitors	β-lactam group	Macrolides	Ansamycins	Lincosamides	Tetracyclines	Glycopeptides	Phenicols	β-Lactam

	Kanamycin (30)	Gentamicin (10)	Streptomycin (10)	Levofloxacin (5)	Ciprofloxacin (5)	Sulfamethoxazole /trimethoprim (23.75/1.25)	Sulbactam/ampicillin (10/10)	Erythromycin (15)	Rifampin (5)	Clindamycin (2)	Tetracycline (30)	Doxycycline (30)	Vancomycin (30)	Chloramphenicol (30)	Ampicillin	penicillin	total
پنیر سفید	۲ (۲۰)	۱ (۱۰)	۰	۰	۱ (۱۰)	۰	۰	۰	۰	٤ (٤٠)	۰	۰	۲(۲۰)	۰	۰	۰	۱۰
پنیر خامه ای	۰	۰	۲ (۳۳/۳۳)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳ (۵۰)	۱ (۱٦/٦۷)	۰	۰	۰	۰	۰	٦
کشک	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱ (۳۳/۳۳)	۰	۲ (٦٦/٦۷)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳
تعداد کل	۲ (۱۰/۵۳)	۱ (۵/۲٦)	۲ (۱۰/۵۳)	۰	۱ (۵/۲٦)	۰	۰	۱ (۵/۲٦)	۰	۹ (٤۷/۳۷)	۱ (۵/۲٦)	۰	۲ (۱۰/۵۳)	۰	۰	۰	۱۹

بحث

لیستریا مونوسایتوژنز به دلیل آلودگی مکرر محصولات غذایی از اهمیت بهداشتی عمومی قابل توجهی برخوردار است (Taha Said Ahmed, et al., 2017). بطور گسترده در خاک، آب، گیاهان، مواد خوراکی، مدفوع و بخصوص آب، سیلوها، سبزیجات و علوفه کهنه کپک زده وجود دارد و یکی از مهم‌ترین منابع عفونت در حیوانات اهلی و وحشی بشمار می رود (Cother, et al 2001).

توانایی رشد *لیستریا مونوسایتوژنز* در یخچال یا شرایط سرد در انواع محصولات غذایی، کنترل پاتوژن را دشوار می کند. تشخیص باکتری در محصولات غذایی در خرده فروشی‌ها نشان دهنده نقص عمده در اقدامات کنترل کیفیت است (El-Demerdash, et al., 2019). اخیرا لیستروزیس به عنوان یک بیماری ناشی از غذا مطرح است و ارتباط قوی‌تری بین لیستریوز و مصرف فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده‌های غذایی گزارش گردیده و شیر پاستوریزه و غیر پاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه‌گیری مسمومیت غذایی شناخته شده است. منبع اصلی *لیستریا مونوسایتوژنز* در شیر آلودگی شیر با مدفوع می باشد.

با توجه به مقاومت بالای آن‌ها به شرایط محیطی، وجود این باکتری در موادغذایی خام و یا حتی فرایند شده نیز امکان پذیر است و به همین دلیل به نظر می رسد ضروری است که از ابتدای چرخه تولید موادغذایی در مزرعه تا مصرف آن اقدامات و نظارت‌های لازم انجام شود (Shamloo, et al., 2012). در این مطالعه با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، از ۱۵۰ نمونه مورد بررسی، ۱۴ مورد (۹/۳۳ درصد) *لیستریا* که ۶ (۴ درصد) مورد از پنیر سفید و ۴ مورد (۲/۶ درصد) از پنیر خامه‌ای و ۴ مورد (۲ درصد) از کشک جدا گردید و مورد تایید مولکولی PCR قرار گرفتند.

در مطالعه ای مشابه از ۴۰۰ نمونه شیر خام گرفته شده، ۵۱ مورد (۲۱/۶ درصد) *لیستریا مونوسایتوژنز* جدا گردید (Nightingaleet, al., 2004). در مطالعه ای دیگر در کردستان، از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه ۶ مورد (۶ درصد) باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در شیر خام و ۱ مورد (۱ درصد) در شیر پاستوریزه جدا شد (Rahimian, et al., 2009). در مصر از محصولات مختلف غذایی ۶/۸ درصد میزان شیوع *لیستریا* گزارش گردید (Eman, et al., 2021). در مطالعه ای که در چین

صورت گرفت از ۳۷۴۶ نمونه از هفت نوع غذا در نمونه-های شیر پاستوریزه ۰/۵۲ درصد و در شیر خام ۰/۷۲ درصد لیستریا جدا کردند (Mansfield, et al., 2003). در مناطق مختلف آنکارا در ترکیه از ۲۱۱ نمونه شیر خام جمع آوری شده ۲ مورد (۰/۹۴ درصد) *لیستریا* جداسازی گردید (Uraz, et al., 1999). در مطالعه ای که توسط نوروزی و همکاران انجام گردید، از ۷۰ نمونه فرآورده لبنی در مجموع، ۱۷ مورد آلودگی با *لیستریا مونوسایتوژنز*، در نمونه‌های شیر، پنیر معمولی و پنیر نرم شناسایی گردید. از ۱۵ نمونه پنیر معمولی ۲ مورد (۱۳/۳ درصد) و از ۱۵ نمونه پنیر نرم ۶ مورد (۴۰ درصد) آلوده به *لیستریا مونوسایتوژنز* بوده اند (Norowzi, et al., 2013). در مطالعه‌ای که با عنوان بررسی شیوع گونه‌های *لیستریا* در شیر خام و محصولات لبنی سنتی در اصفهان انجام دادند، مشخص شد که از ۲۹۲ نمونه، ۲۱ مورد (۷/۱۴ درصد) از نظر *لیستریا* مثبت بوده که ۴ مورد (۱/۴۷ درصد آن *لیستریا مونوسایتوژنز* بوده است که موارد مثبت با روش PCR تایید شده اند. همچنین *لیستریا* در شیر خام، بستنی، خامه و فرنی شناسایی شد ولی در ماست، کره و کشک و پنیر از نظر آلودگی منفی گزارش شدند (Shamloo, et al., 2014). که این نتیجه با مطالعه ما از نظر آلودگی در پنیر مطابقت ندارد. در پژوهشی که ۳۵۰ نمونه پنیر از بازار محلی در اردن جمع آوری شده بود، با کمک تکنیک PCR شیوع کلی لیستریا در نمونه‌ها ۲۷/۱ درصد بوده که ۱۱/۱ درصد از آلودگی مربوط به *لیستریا مونوسایتوژنز* بوده است (Osaili, et al., 2012). در مطالعه‌ای که در منطقه باسک اسپانیا انجام گرفت، ۵۱ نمونه پنیر از ۱۰ خرده فروشی جمع آوری گردید. از این تعداد ۹/۸ درصد آلوده به گونه‌های مختلف *لیستریا مونوسایتوژنز* بودند اما هیچ نمونه‌ای آلوده به *لیستریا مونوسایتوژنز* نبوده است (Arrese, et al., 2012). نتایج این مطالعه نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد. گرچه نتایج این تحقیق با نتایج محققین دیگر در خارج و داخل کشور همخوانی دارد اما تفاوت در میزان شیوع گونه های *لیستریا* وجود دارد. عواملی از جمله تعداد گاوداری های صنعتی و میزان استفاده از سیلو بعنوان یکی از غذاهای اصلی دامدارای، تفاوت در زمان انجام مطالعه و میزان آلودگی ثانویه شیر خام در حین دوشش، حمل و نقل و سایر عوامل محیطی را می توان در میزان رشد *لیستریامونوسایتوژنز* و همچنین میزان آلودگی موثر دانست. اگرچه پاستوریزاسیون شیر خام می تواند در جهت جلوگیری از شیوع *لیستریا* موثر باشد اما گزارش‌هایی از موارد بروز لیستریوزیس در اثر مصرف مواد لبنی پاستوریزه شده نیز وجود دارد (Lyytikäinen, et al., 2000; Abdimoghadam, et al., 2015). مشخصات آنتی-بیوگرام ۱۴ *لیستریا مونوسایتوژنز* در برابر ۱۶ آنتی‌بیوتیک سنجیده شد، حساسیت به کانامایسین (۱۰/۸۳ درصد)، جنتامایسین (۵/۲۶درصد)، استرپتومایسین (۱۰/۵۳ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵/۲۶ درصد)، اریترومایسین (۲۶/ ۵ درصد)، تتراسایکلین (۵/۲۶ درصد)، وانکومایسین (۱۰/۵۳ درصد) نشان داد در حالی که بالاترین حساسیت مربوط به کلیندامایسین (۴۷/۳۷ درصد) مشاهده شد. در برابر آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکسین، سولفامتوکسازول/تری متوپریم، سولباکتام/آمپیسیلین، ریفامپین، دئوکسی ساکلین، کلرامفنیکل، آمپی سیلین، پنی سیلین حساسیتی مشاهده نشد. پروفایل ضدمیکروبی *لیستریا مونوسایتوژنز* جدا شده از سه منبع مختلف لبنی شامل پنیر سفید، پنیر خامه‌ای و کشک تقریبا مشابه بودند. علاوه بر این تمام ۱۴ *لیستریا مونوسایتوژنز* ایزوله شده به چند دارو مقاوم بودند.

یافته‌های ما مطالعه اکرمی-مهاجری و همکارانش (Akrami, et al., 2016) را تایید می کند که مقاومت بالای *لیستریا* را نشان می دهد. حساسیت *بالای لیستریا مونوسایتوژنز* به چندین آنتی‌بیوتیک از جمله آموکسی سیلین، سفالوتین، کلوگزاسین و سولفامتوکسازول و همچنین مقاومت بالا در برابر پنی سیلین، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین و کلرامفنیکل نیز در ایزوله‌های چندین فرآورده غذایی آماده با منشاء شیر، گوشت و ماهی یافت شد (Garedew, et al., 2015). در مطالعه‌ای دیگر نیز مشخصات آنتی‌بیوگرام

۱۷ *لیستریامونوسیتوژنز* ایزوله‌شده را در برابر هفده آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت بالایی به نورفلوکساسین (۸۲/۳ درصد)، آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید (۷۶/۴ درصد)، سفوتاکسیم (۷۰/۵ درصد)، اریترومایسین (۶۴/۶ درصد)، آموکسی سیلین (۶۴/۶ درصد)، جنتامایسین (۵۸ درصد) و ونکومایسین (۵۸/۷ درصد)، اکسی تتراسایکلین (۷۶/۴ درصد) و تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۷۶/۴ درصد)، کلرامفنیکل (۷۰/۵ درصد)، داکسی سایکلین (۶۴/۶ درصد)، لو-افلوکساسین (۴۱/۲ درصد) و آزیترومایسین (۴۱/۲ درصد) نشان داده شد. سویه‌های *لیستریا مونوسایتوینز* از چهار منبع مختلف مانند شیرخام، فیله ماهی، سوسیس و گوشت چرخ‌کرده تقریباً مشابه بودند. علاوه بر این، تمامی ۱۷ *لیستریا مونوسیتوژنز* ایزوله‌شده به چند دارو مقاوم بودند (Eman, et al., 2021). مطالعه دیگری همچنین مقاومت ضدمیکروبی را به ۲ یا چند آنتی‌بیوتیک گزارش کرد. *لیستریا مونوسایتوژنز* از شیر خام نشان‌دهنده یک تهدید سلامت عمومی برای مصرف کنندگان می باشد (Girma., 2018). بر خلاف این مشاهدات، در یک مطالعه حساسیت ۱۰۰ درصدی *لیستریا مونوسایتوژنز* به بسیاری از آنتی بیوتیک‌های آزمایش شده نشان داده شد و نیاز به نظارت مستمر الگوی حساسیت ضدمیکروبی و اثرات آن‌ها بر سلامت عمومی تاکید داشت (Oliveira, et al., 2018).

نتیجه گیری کلی

وجود ۸ درصد آلودگی *لیستریا* در محصولات لبنی از دید بهداشت عمومی و طب انسانی اهمیت ویژه دارد. بیماری های آنسفالیت، سقط جنین، سپتی سمی، آندوکاردیت، بیماری‌های جلدی، گوارشی و نوزادان می توانند از جمله بیماری‌های خطر آفرین در صورت کم‌توجهی به این امر باشند. این مطالعه نشان می دهد که *لیستریا مونوسایتوژنز* به عنوان یک آلاینده اصلی محصولات غذایی مختلف می باشد و نیاز به توجه بیشتر با آگاهی و اقدامات بهداشتی در صنایع غذایی است. بسیاری از *لیستریا مونوسایتوژنز*های جدا شده از محصولات غذایی به چند دارو مقاوم بودند که بار بیشتری بر مشکلات مقاومت ضدمیکروبی موجود در جهان اضافه کردند.

در هر صورت به‌کار گیری تکنولوژی مناسب و بهداشتی و توجه به انجام اصول صحیح فرآیندهای پاستوریزاسیون و مراحل پس از پاستوریزاسیون در رابطه با تولید شیر، پنیر و محصولات لبنی و عدم مصرف شیر خام و مواد لبنی غیر پاستوریزه و شیرهای تاریخ مصرف گذشته و نحوه صحیح نگهداری شیرهای پاستوریزه، افزایش نظارت‌های بهداشتی بر مراکز تولید و عرضه می توانند نقش بسزایی در کاهش آلودگی *لیستریایی* داشته باشند. بنابراین توصیه و آموزش مداوم برای کارگران به ویژه در صنایع غذایی برای جلوگیری از آلودگی موادغذایی و پیدایش سویه‌های مقاوم ضروری است.

منابع

1. Abdollahzadeh E., Ojagh S.M., Hosseini H., Irajian G. and Ghaemi E.A. 2016. Prevalence and molecular characterization of Listeria spp. and Listeria monocytogenes isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. LWT .73(1):205–211.
2. AkramiMohajeri F., Derakhshan Z., Ferrante M., Hamidiyan N., Soleymani M., Conti G.O. and Tafti R.D. 2018. The prevalence andantimicrobial resistance of Listeriaspp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, Central Iran (2016). FCT. 114:141–144.
3. Abdimoghadam Z., Shamloo E. and Atefi M. 2015. Frequency of Listeria Species in RawMilk and Traditional Dairy Products in Isfahan, Iran.JFST. 10(3):98-104 (In Persian).
4. Arrese E. and Arroyo-Izaga M. 2012. Prevalence of Listeria monocytogenes in Idiazabal cheese.Nutr Hosp. 27(6):2139-2141.
5. Aygun O. and Pehlivanlar S. 2006. Listeria spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey.Food Control. 17(8):676-679.

6. Blood D.C. 2000. Veterinary medicine. 9 th edition. PP. 660-665.
7. Cother P.D. and Reilly K. 2001. Role of the glutamatedecarboxylase acid resistance system in the survival of Listeria Monocytogenes LO28 in low pH foods.j food prot .64(9):1362-8.
8. Campos C.A., Castro M.P. and Gliemmo M.F. 2011. Schelegueda L. I. Use of natural antimicrobials for the control of Listeria monocytogenes in foods. Ed. 1112-23.
9. El- Demerdash A.S. and Raslan M.T. 2019. Molecular characterization of Listeria monocytogenesisolated from different animal-origin food items from urban and rural areas.Adv. Anim. Vet. Sci. 7:51.
10. Eman E., AbdeenWalid S. Mousa Ola.H. HarbGehad A. Fath- Elbab.Nooruzzaman M. Ahmed Gaber. Walaa F. Alsanie. and Abdeen A. 2021. PrevalenceAntibiogram and Genetic Characterization ofListeria monocytogenesfrom Food Products in Egypt. foods. 10(1381):1-13.
11. Girma Y. and Abebe B. 2018. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of Listeria Species from Raw Bovine Milk in Debre-Birhan Town, Ethiopia.J Zoonotic Dis Public Health. 2:4.
12. Garedew L., Taddese A., Biru T., Nigatu S., Kebede E., Ejo M., Fikru A. and Birhanu T. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibilityprofile ofListeriaspecies from ready-to-eat foods of animal origin in Gondar Town, Ethiopia.BMC Microbiol. 15:100.
13. Jamshidi A. Khanzadi S. 2011. The presence of Listeria monocytogenes in raw milk samples in Mashhad, Iran. Iran J Veter Res. 11(4):363-367 (InPersian)
14. Jucilene S.D.S., Barbara B. Luciana R.D.S. 2021. Listeria monocytogenes: health risk and a challenge for food processing establishments. Archive of Microbiol. 203:5907-5919.
15. Jinghui Y., Jing G., Hengan W., En Zh., Yingzheng L., Zhifei Ch., Shuqing L. and Tao S. 2021. Characterization of bacteria and antibiotic resistance in commercially-produced cheeses sold in China. J Food port.
16. Heidarzadeh S., Pourmand m.R., Hasanvand S., Pirjani R., Afshar D., Noori M. and Soltan Dallal M.M. 2021. Antimicrobial Susceptibility, Serotyping, and Molecular Charac-terization of Antibiotic Resistance Genes in Listeria monocyto-genes Isolated from Pregnant Women with a History of Abortion Iran J Public Health, 1(50):170-179.
17. KhedmatiMorasa H., Mahmoudi R., Ghajarbeygi P., Mosavi S., Shahsavari S., Abbasi N. and Sarfalah N. 2019. Listeria monocytogenes Contamination in Unpasteurized Traditional Cheese Products in Qazvin. Iran. J MazandaranUniv Med Sci. 29(178):115-126. (In Persian).
18. Lotfollahi L., Chaharbalesh A., AhangarzadehRezaee M. and Hasani A. 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of Listeria monocytogenes isolated from humans, foods and livestock in Iran. MicrobPathog. 107:425–9.
19. Lyytikäinen O., Autio T., Maijala R., Ruutu P., Honkanen-Buzalski T. and Miettinen M. 2000.An outbreak of Listeria monocytogenes serotype 3a infections from butter in Finland. IJID.181(5):1838-41.
20. Mohsenzadeh M., Varnan M. and Salari A. 2020. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology. Antimicrobial Effects of Lactobacillus Plantarumand Pediococcus Acidilactici Bioprotective Starters against Food borne Pathogens in Fermented Chicken Meats.Iranian J NutrSci Food Technol. 14(4):66-55.
21. Maktabi S., Jamnejad A. and Faramarzian K. 2013. Contamination of householl refrigerators by Listeria species in Ahvaz. Iran. Jundishapur J Microbiol. 6(3):301-305.
22. Mansfield B.E. and Freitag N.E. 2003. Listeria monocytogenes pathogenesis: Exploration of alternative hosts. Abstracts of

the general meeting of the American society for microbiology. 103:B-186.
23. Norowzi J., MoradiDidhendy S. and Shafiee M. 2013. Detection of acta gene in Listeria monocytogenes isolated from dairy products. J Microbial World. 6(3):246-22 (In Persian).
24. Najafi A.H., ZiabakhshDeylami M., Karimian H., Abedinia A.R and HosseinianNejadd M. 2011. Microbiological Changes of Pousti CheeseDuring Ripening. J Food Technol Nutrition. 8(2):85-91 (In Persian).
25. Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L. and Wiedmann M. 2004. Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment, American society for microbiology.Appl Environ Microbiol. 70(8):4458-4467.
26. Oliveira T.S., Varjão L.M., da Silva L.N.N., de Castro Lisboa Pereira R., Hofer E., Vallim D.C., de Castro Almeida R.C. 2018. Listeriamonocytogenes at chicken slaughter house: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobialsusceptibility.Food Control. 88:131–138
27. Orsi R.H., Bakker H.C.D. and Wiedmann M. 2011. Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Food Microbiol. 301(2):79-96.
28. Osaili T.M., AlNabulsi A.A., Taha M.H., AlHoly M.A., Alaboudi A.R. and AlRousan W.M. 2012. Occurrence and antimicrobial susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from brined white cheese in Jordan. J Food Sci. 77(9):528-532
29. Rocourt J., Jacquet C. and Reilly A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods.Int J Food Microbiol. 62:197-209.
30. RahimianZarif B. 2009. Search of Listeria monocytogenes in raw milk and pasteurization of Kurdistan province. J Veterinary Clinical Pathology. 9(3):17-76.
31. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L. and Griffin P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. Emerg Infect Dis. 17(1):7-15.
32. Shamloo E., Jalali ., Mirlohi M., Madani G., Metcalf D. and Merasi M.R. 2014. Prevalence of Listeria species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran.Int J Env Health Eng. 3(3):1-5.
33. ShamlooAghakhani E., Jalali M., Mirlohi M., AbdiMoghadam Z,. ShamlooAghakhani E. and Reza Maracy M. 2012. Prevalence of Listeria Species in Raw Milk in Isfahan. Iran. J Isfahan Med School. 30(204):1355-1363 (In Persian).
34. Taha Said Ahme. S.S. and Ahmed Tayeb B. 2017. Isolation and molecular detection ofListeria monocytogenesin minced meat, frozenchicken and cheese in Duhok Province, Kurdistan region of Iraq.J. Food Microbiol. Saf.Hyg. 2(1):1-4.
35. Uraz G. and Yucel N. 1999. The isolation certain pathogen microorganism from caw milk.centEur J public health. 7(3):145-8.
36. Vaziri S. and Norowzi M. 2012. Investigation of the contamination of local cheeses of Lighvan ofTabriz to coliforms and Escherichia coli in Maragheh.Iran J Microbiol. 5(4):23-28. (In Persian)
37. Yehia H.M. Ibraheim S.M. Hassanein. W. A. 2016. Prevalence of Listeria species in some foods and their rapid identification.Trop J Pharm Res. 15(5):1047-1052.
38. ZareiM.Maktabi S. and Ghorbanpour M. 2012. Prevalance of listeria monocytogenes,Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, and Salmonella spp. In seafood products using multiplex polymerase chain reaction. Foodborne Pathog Dis. 9(2):108-112.
39. Zangerl P., Scholder D., Eliskases-lechner F., Zagana A., Frohner E., Stessl B. and Wagner M. 2021. Monitoring by a Sensitive Liquid-Based Sampling Strategy Reveals a Considerable Reduction of Listeria monocytogenes in Smeared Cheese

Production over 10 Years of Testing in Austria. Foods. 10(9):2-11.

Detection and antibiotic resistance pattern of *Listeria monocytogenes* strains isolated from curd and cheese

Kiyanpour Berjoee R[1], Momtaz H[*1], Lotfollahi L[1,2], Bamzadeh Z[1,3]

1. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
3- Department of Microbiology, Shahre-Qods Branch, Islamic Azad University Tehran, Iran.

[*]**Corresponding author:** *hamomtaz@yahoo.com*

Received: 15 November 2021 Accepted: 23 December 2021

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that causes listeriosis in humans and animals. Microbial contamination of food usually leads to widespread food poisoning in the form of widespread epidemics in the region, which is very significant in terms of public health and is one of the most important issues in developing countries. The aim of this study was to determine the contamination of *Listeria monocytogenes* in dairy products using culture method and final confirmation by PCR method. In this study, 150 different dairy samples offered in the market were purchased randomly. The samples were transferred to the laboratory under hygienic conditions and examined. In addition to culture medium experiments, positive samples were evaluated for final confirmation and identification of the pathogen by molecular PCR.14 (9.33%) positive samples including 6 samples of white cheese (4%), 4 samples of cream cheese (2.6%), and 3 samples of curd (2%) were positive for contamination. Antimicrobial susceptibility to 16 antibiotics was highly sensitive to clindamycin (47.37%). It is noteworthy that it was resistant to several drugs.The presence of *Listeria monocytogenes* in dairy products (cheese, cream cheese, and whey) was proven. Based on the results, people who consume contaminated dairy products are at potential risk of listeriosis. As a result, food safety authorities must establish an effective standard for examining the presence of *Listeria* in food.

Keywords*:* *Listeria monocytogenes*, cheese, antibiotic resistance, PCR.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.