

Listeria monocytogenes Contamination in Unpasteurized Traditional Cheese Products in Qazvin, Iran

Hajar Khedmati Morasa¹,
Razzagh Mahmoudi²,
Peyman Ghajarbeygi³,
Shaghayegh Mosavi⁴,
Saeed Shahsavari⁵,
Narges Abbasi¹,
Neda Sarfalah¹

¹ MSc in Food Safety and Health, Department of Food Safety and Health, School of Public Health, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

² Professors, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

³ Associate Professor, Health Products Safety Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁴ PhD Student in Molecular Medicine, Faculty of Medical Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁵ Instructor in Biostatistics, Health Products Safety Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

(Received April 22, 2019 ; Accepted August 25, 2019)

Abstract

Background and purpose: *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen and a potential risk to public health. Listeriosis is one of the most serious infectious diseases in most developed countries. Consumption of raw milk and unpasteurized traditional dairy products such as cheese can be a major reason for listeriosis in humans. This research aimed at investigating *Listeria monocytogenes* contamination in unpasteurized cheese products by using culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) in Qazvin, Iran.

Materials and methods: In this research, 128 samples of traditional cheese products were collected from different traditional shopping centers in Qazvin, between October 2017 and September 2018. They were transported to the laboratory under controlled conditions. All isolates were analysed to biochemical test. *L. monocytogenes* strains were further confirmed by PCR amplification.

Results: Findings showed that 14 samples (10.9%) were contaminated with *L. monocytogenes*. The highest prevalence of *L. monocytogenes* was found in white cheese samples (7%). The highest rate of contamination was reported in spring and winter (3.1%).

Conclusion: *Listeria* contamination in cheese samples studied can pose a serious risk to consumers of non-pasteurized dairy products. Therefore, food safety and health practitioners should apply effective methods and standards.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, unpasteurized cheese, Qazvin, PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (178): 115-126 (Persian).

* Corresponding Author: Razzagh Mahmoudi- Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran (E-mail: r.mahmoudi@yahoo.com)

تعیین آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر های سنتی عرضه شده در شهر قزوین

هاجر خدمتی مرصع^۱
رزاق محمودی^۲
پیمان قجر بیگی^۳
شقایق موسوی^۴
سعید شهبواری^۵
نرگس عباسی^۱
ندا سرفلاح^۱

چکیده

سابقه و هدف: لیستریا مونوسیتوژنز یک میکروارگانیسم پاتوژن ناشی از مواد غذایی و یک تهدید جدی برای سلامت عمومی می باشد. لیستریوزیس یکی از مهم ترین بیماری های عفونی در اروپا و آمریکا محسوب می شود. مصرف شیر خام و محصولات لبنی سنتی مانند پنیرهای سنتی می تواند یکی از دلایل عمده ی لیستریوزیس در افراد باشد. لذا این مطالعه با هدف تعیین آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای سنتی عرضه شده در شهر قزوین با استفاده از روش کشت و تأیید نهایی با روش PCR انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۲۸ نمونه از پنیرهای سنتی عرضه شده، از پاییز ۱۳۹۶ تا تابستان ۱۳۹۷، بطور تصادفی از سطح شهر قزوین، خریداری شد. نمونه ها تحت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه انتقال داده شده و مورد بررسی قرار گرفتند علاوه بر آزمایشات مبتی بر محیط کشت نمونه های مثبت جهت تأیید نهایی به وسیله روش مولکولی PCR جهت شناسایی پاتوژن مذکور مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: طبق نتایج به دست آمده ۱۴ نمونه (۱۰/۹ درصد) از پنیرهای سنتی از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز مثبت گزارش شدند. که بیش ترین آلودگی در پنیرهای سفید (۷ درصد) دیده شد. همچنین بیش ترین آلودگی در فصل تابستان و زمستان (۳/۱ درصد) گزارش گردید.

استنتاج: حضور لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای سنتی در این مطالعه به اثبات رسیده است، که براساس این نتایج افرادی که از پنیرهای سنتی استفاده می کنند در معرض خطر بالقوه قرار دارند. بنابراین متصدیان امور ایمنی مواد غذایی ایران باید استاندارد موثری را برای بررسی حضور لیستریا در مواد غذایی ایجاد کنند.

واژه های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، پنیرهای سنتی، قزوین، PCR

مقدمه

در کشورهای پیشرفته، بسیاری از بیماری هایی که از طریق غذا به انسان منتقل می شوند تحت کنترل درآمده اند. با این حال هنوز خسارات اقتصادی و مشکلات بهداشتی وجود دارد. این مسئله در کشورهای در حال

Email: r.mahmodi@yahoo.com

مؤلف مسئول: رزاق محمودی - قزوین: دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده بهداشت

۱. کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات میکروبیشناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات ایمنی محصولات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۴. دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۵. مربی آمار زیستی، مرکز تحقیقات ایمنی محصولات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۲/۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۶/۳

توسعه محسوس تر است. شیر و فراورده‌های آن از جمله پنیر که قسمت وسیعی از احتیاجات غذایی انسان را تامین می‌کند جزء مواد غذایی است که نقش فوق‌العاده با اهمیتی از نظر انتقال بیماری‌ها به انسان را دارد (۲، ۱). در ایران تولید پنیر از گذشته معمول بوده‌است و گرایش زیادی به استفاده از پنیرهای غیرپاستوریزه و محلی وجود دارد. بر اساس آمارهای موجود حدود ۲۰ درصد شیر تولیدی کشور در بخش صنایع شیر، به پنیر تبدیل می‌شود. در این بین سهم تولید پنیر سنتی بیش‌ترین مقدار را شامل می‌شود (۳). بسیاری از بیماری‌های خطرناک مانند بروسلوز، تیفوئید، پاراتیفوئید، منتزیت، منگوانسفالیت، عفونت‌های دوران حاملگی (مثل عفونت ناشی از لیستریامونوسیته‌وزنر) و مرگ و میر کودکان ممکن است ناشی از مصرف پنیرهای آلوده باشند. عامل آن ممکن است باکتری‌هایی نظیر انواع سالمونلا، شرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت و لیستریا منوسیته‌وزنر باشند. وجود باکتری‌های فاسدکننده و بیماری‌زا در پنیر متاثر از باکتری‌های شیر مصرفی است، که بخشی از آن‌ها از پستان حیوان و بخشی دیگر به‌صورت آلودگی ثانویه به شیر منتقل می‌گردد. نظر به این‌که پنیرهای محلی از شیر غیرپاستوریزه تهیه می‌شوند، حضور باکتری‌های بیماری‌زای شیر در پنیر تولیدی نیز قابل توجه است. همچنین در دهه اخیر پاتوژن لیستریا و به ویژه گونه مونوسیته‌وزنر آن در محصولات لبنی به ویژه پنیر بسیار شایع شده‌است (۲). به طوری که اخیراً ارتباط قوی‌تری بین لیستریوز و مصرف فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده‌های غذایی گزارش گردیده‌است و شیر پاستوریزه، شیر غیرپاستوریزه و پنیر به عنوان منبع همه‌گیری مسمومیت غذایی شناخته شده‌اند (۴). بررسی‌های انجام شده در ایران نشان می‌دهد که مواد غذایی با منشأ دامی ناقل گونه‌های لیستریا می‌باشند (۵). باکتری‌های جنس لیستریا گرم مثبت، میکروآئروفیلیک، میله‌ای شکل، بدون اسپور، متحرک و کاتالاز مثبت هستند (۶). طبق جدیدترین مطالعات انجام شده، باکتری

لیستریا شامل ۱۷ گونه می‌باشد، که ۱۱ گونه آن از سال ۲۰۰۹ به بعد توصیف شده‌اند (۷). در این بین تنها لیستریا مونوسیته‌وزنر و لیستریا یوانوی پاتوژن محسوب می‌شوند. لیستریا مونوسیته‌وزنر یکی از عوامل مهم بیماری‌زای منتقل شده از طریق غذا می‌باشد که باعث لیستریوز در انسان و حیوان می‌شود (۸). علائم خفیف لیستریوز عبارتند از اسهال، استفراغ، تب، لرز، تشنج، سردرد، دردهای عضلانی، گاستروانتریت و در موارد تهاجمی سیتی سمی و منتزیت از شایع‌ترین علائم هستند، که می‌تواند به سقط جنین و تولد نوزاد مرده در زنان باردار منجر شود (۹). این بیماری در زنان باردار، نوزادان، افراد مسن (افراد بالای ۶۵ سال)، افراد با نقص سیستم ایمنی بدن بسیار خطرناک می‌باشد (۱۰، ۱۱). به طوری که ۱۷ درصد موارد ابتلا به لیستریوز در زنان باردار گزارش شده‌است (۱۲). لیستریا مونوسیته‌وزنر دارای ۱۳ نوع سروتیپ است که همگی بیماری‌زا می‌باشند. در این میان سروتیپ‌های ۱/۲a، ۱/۲b، ۴b مسئول ۹۸ درصد لیستریوز انسانی هستند. سروتیپ ۱/۲a اساساً از نمونه‌های غذایی جداسازی می‌گردد (۱۳). جنس‌های لیستریا توانایی تحمل شرایط نامساعد محیطی از جمله تغییرات دما و نمک و PH را دارا می‌باشند (۱۴). هم‌چنین مقاومت این باکتری‌ها در برابر سرما، خشکی و پایداری در برابر استرس‌های اسمزی باعث افزایش بقاء و پراکندگی آن‌ها شده‌است، لذا به راحتی می‌تواند در مواد غذایی موجود در یخچال رشد نمایند و حتی در عملیات ناقص پاستوریزاسیون باقی‌مانده و از بین نروند (۱۵). نرخ شیوع گونه‌های لیستریا در کشورهای مختلف متفاوت است (۱۶). در سرتاسر جهان و از جمله مناطق مختلف ایران مطالعاتی در مورد میزان شیوع لیستریا در شیر و فرآورده‌های آن انجام گرفته‌است (۱۷)، اما داده‌های سازمان یافته‌ای در مورد اپیدمیولوژی بیماری لیستریوز در ایران در دست نیست (۱۸). چرا که لیستریوز بیماری قابل گزارش‌ی در سیستم سلامت ایران محسوب نمی‌شود. حداقل تعداد باکتری برای بیماری‌زایی لیستریا مونوسیته‌وزنر، وابسته به

مواد و روش‌ها

۱۲۸ نمونه از پنیرهای سنتی عرضه شده در شهر قزوین (از محل فروش مواد لبنی شامل بازار قزوین، خیابان سعدی، سپه و عبید زاکانی) از پاییز ۹۶ تا تابستان ۹۷ به روش نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک (مضرب ۴) با استفاده از لیستی که از فروشگاه‌های فروشنده پنیر سنتی تهیه شده بود، جمع‌آوری گردید و سپس مطابق راهنمای استاندارد ملی نمونه‌برداری شیر و فرآورده‌های آن به شماره ۳۲۶ عمل شد. نمونه‌ها داخل ظروف استریل و تحت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه برده شد و پس از درج مشخصات هر نمونه (نوع پنیر) تا زمان آزمایش (حداکثر تا ۲۴ ساعت) در داخل یخچال نگهداری شدند. برای جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز، ۲۵ گرم از هر نمونه به ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط برات غنی‌کننده لیستریا مونوسیتوژنز یا LEB (Listeria Enrichment Broth, (Quelab, Canada)) اضافه گردید. هم‌چنین به این محیط ساپلمنت حاوی آنتی‌بیوتیک نیز اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه به خوبی مخلوط شده سپس در انکوباتور ۳۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مدت، ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط LEB به صورت کشت خطی در سطح محیط پالکام آگار (Listeria selective Agar (Palcam Agar), (Quelab, Canada)) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت انکوباسیون شد. کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت اختصاصی جهت تایید لیستریا مونوسیتوژنز مورد آزمون‌های شیمیایی قرار گرفتند (تست حرکت، تخمیر قند، کاتالاز و اکسیداز، MRVP). 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 مونوسیتوژنز: بدین منظور باکتری‌های جدا شده را در محیط BHIB (Brain Heart Infusion Broth) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت

حساسیت فرد و نوع غذا است. گزارش شده است که پنیر با تعداد 10^3-10^4 لیستریا مونوسیتوژنز در هر گرم می‌تواند ایجاد بیماری نماید. با این حال در افراد حساس، دوز عفونی احتمالاً کم‌تر از ۱۰۰۰ سلول باکتری است (۱۹). وجود گزارش‌های پراکنده از این باکتری در ایران به خصوص در فرآورده‌های لبنی، گوشت، سبزی و غذاهای آماده مصرف و همچنین وجود مواردی از سقط جنین ناشی از این باکتری باعث ایجاد نگرانی شده است (۲۰). به دلیل میزان بالای مرگ و میر ناشی از لیستریوزیس (بین ۲۰ تا حدود ۷۵ درصد در گروه‌های پرخطر) آگاهی دقیق از شیوع این باکتری در فرآورده‌های غذایی مختلف ضروری به نظر می‌رسد (۲۱). علاوه بر آن در سال‌های اخیر گزارشی مبنی بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی لیستریا مونوسیتوژنز در داخل و خارج از کشور ارائه شده است، که نگرانی در مورد حضور این باکتری در مواد غذایی را افزایش می‌دهد (۲۲). در مطالعه اکرمی مهاجری و همکاران (۲۰۱۶)، آلودگی پنیرهای سنتی در یزد به لیستریا مونوسیتوژنز گزارش شده که لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در این مطالعه مقاوم بوده است (۲۳). وجود گونه‌های لیستریا در مواد غذایی مختلف و در کشورهای گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته است، بنابراین ضرورت بررسی وجود آن در مواد غذایی به ویژه در پنیرهای سنتی جهت حصول اطلاعات کافی در ایران نیز، احساس می‌شود. هر چند استاندارد جستجوی لیستریا در مواد غذایی توسط سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تدوین شده است، اما هنوز رعایت استاندارد وجود لیستریا در مواد غذایی اجباری نشده است. با توجه به مصرف بالای پنیرهای سنتی در کشور، اندازه‌گیری و شناسایی آلودگی میکروبی آن به منظور انجام بررسی‌های پایه‌ای جهت بهبود کیفیت و سلامت این محصول امری ضروری خواهد بود. لذا این مطالعه جهت بررسی آلودگی انواع پنیرهای سنتی عرضه شده در قزوین به گونه لیستریا مونوسیتوژنز انجام گرفت.

PCR: جهت بررسی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) باید به دو قسمت تشکیل دهنده آن، یعنی ترکیب شیمیایی و شرایط دمایی آن توجه کرد. در قسمت اجزاء و مواد تشکیل دهنده واکنش PCR و نیز برنامه دمایی و زمانی انجام آن به صورت فهرست‌وار آورده شده است. پرایمرهای این مطالعه بر مبنای سکانس ژن *prfA* که با استفاده از نرم‌افزار Primer-BLAST و بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) طراحی شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. پرایمر طراحی شده برای شناسایی لیستریا مونوسیتوز در جدول شماره ۱ مشخص شده است.

جدول شماره ۱: پرایمر طراحی شده برای شناسایی لیستریا مونوسیتوز

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه
<i>prf</i>	F- GTGGAGACGAAGCAGCTTTA R-CCAGTGGATGCGAATGTATCT	Pb311

بعد از آماده سازی پرایمرهای اختصاصی و تهیه غلظت ۱۰ pmol، واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. جهت انجام واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر پرایمر، ۳ میکرولیتر نمونه DNA استخراج شده و ۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل ABI با سیکل دمایی طبق جدول شماره ۲ در ۳۵ سیکل انجام شد.

جدول شماره ۲: پروسه انجام PCR

ژن	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	Final extension
<i>prfA</i>	۹۵/۵min	۹۵/۳۰sec	۶۰/۳۰sec	۷۲/۲۰min	۷۲/۷ min

الکتروفورز DNA با ژل آگاروز: آنالیز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و بافر TBE انجام شد و در نهایت باندهای اختصاصی با دستگاه ترنس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره ۱).

گرمخانه گذاری شدند، استخراج DNA ژنومی با استفاده از بافر استخراج DNA-Iraizol محصول شرکت زیست فناوری رنا (RNA) انجام شد. طبق دستورالعمل کیت استخراج باکتری، میکروتیوپ حاوی باکتری داخل سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ قرار داده شد، بعد از اتمام سانتریفیوژ، فاز رویی را تخلیه و فقط باکتری چسبیده به انتهای میکروتیوپ نگه داشته شد. سپس از بافر لیزکننده به اندازه ۱ میلی لیتر، داخل میکروتیوپ حاوی باکتری ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ حاوی باکتری اضافه شد. بعد از ۳ دقیقه، میکروتیوپ حاوی باکتری داخل سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه و دور ۱۰۰۰۰ قرار داده شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، دو فاز مشاهده شد. فاز رویی که شفاف است حاوی DNA باکتری بوده و فاز زیر حاوی پروتئین باکتری می باشد. به وسیله سمپلر فاز رویی با دقت برداشته و الکل ۱۰۰ درصد سرد به میکروتیوپ‌های حاوی DNA باکتری اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه میکروتیوپ‌ها داخل فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۲۰۰ داخل سانتریفیوژ قرار داده شد. الکل داخل میکروتیوپ‌ها را خارج کرده و الکل ۷۰ درصد سرد را روی نمونه‌ها ریخته و به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۲۰۰ در سانتریفیوژ قرار داده شد. سپس الکل داخل میکروتیوپ‌ها را خالی کرده و به هر میکروتیوپ ۳۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه کرده و استخراج DNA پایان یافت. جهت بررسی کمی و تعیین غلظت DNA، از محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر دستگاه اسپکتوفتومتر و براساس نانوگرم در میکرولیتر استفاده گردید. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بیانگر عدم وجود آلودگی و خلوص DNA می باشد.

کنترل نمونه مثبت از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد IBRC-M 10671 انجام گرفت.

جدول شماره ۳: درصد آلودگی در انواع پنیرهای سنتی

آلودگی	نوع پنیر				کل تعداد (درصد)
	کوزه‌ای گوسفندی	کوزه‌ای گاوی	پنیر سفید	لیقوان	
منفی	۲۷ (۲۱/۱)	۲۳ (۱۸/۰)	۵۵ (۴۳/۰)	۹ (۷/۰)	۱۱۴ (۸۹/۱)
مثبت	۱ (۰/۸)	۱ (۰/۸)	۹ (۷/۰)	۳ (۲/۳)	۱۴ (۱۰/۹)
کل نمونه	۲۸ (۲۱/۹)	۲۴ (۱۸/۸)	۶۴ (۵۰/۰)	۱۲ (۹/۴)	۱۲۸ (۱۰۰)

جدول شماره ۴: درصد آلودگی در فصول مختلف

آلودگی	فصل				کل تعداد (درصد)
	بهار	تابستان	پاییز	زمستان	
منفی	۲۹ (۲۲/۷)	۲۸ (۲۱/۹)	۲۹ (۲۲/۷)	۲۸ (۲۱/۹)	۱۱۴ (۸۹/۱)
مثبت	۳ (۲/۳)	۴ (۳/۱)	۳ (۲/۳)	۴ (۳/۱)	۱۴ (۱۰/۹)
کل نمونه	۳۲ (۲۵/۰)	۳۲ (۲۵/۰)	۳۲ (۲۵/۰)	۳۲ (۲۵/۰)	۱۲۸ (۱۰۰)

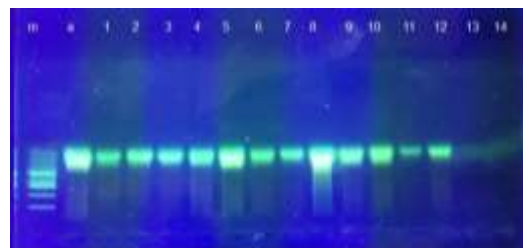
جدول شماره ۵: درصد آلودگی نمونه‌ها برحسب محل جمع‌آوری نمونه‌ها

آلودگی	محل جمع‌آوری				کل تعداد (درصد)
	بازار	عبادزاکانی	سپه	سعدی	
منفی	۴۸ (۳۷/۵)	۲۲ (۱۷/۲)	۳۳ (۲۵/۸)	۱۱ (۸/۶)	۱۱۴ (۸۹/۱)
مثبت	۸ (۶/۳)	۲ (۱/۶)	۳ (۲/۳)	۱ (۰/۸)	۱۴ (۱۰/۹)
کل نمونه	۵۶ (۴۳/۸)	۲۴ (۱۸/۸)	۳۶ (۲۸/۱)	۱۲ (۹/۴)	۱۲۸ (۱۰۰)

بحث

امروزه لیستریوزیس به عنوان یک بیماری ناشی از غذا شناخته می‌شود که با توجه به مقاومت بالای آن‌ها به شرایط محیطی، وجود این باکتری در مواد غذایی خام و یا حتی پروسس شده نیز امکان پذیراست و به همین دلیل ضروری به نظر می‌رسد از ابتدای چرخه تولید مواد غذایی در مزرعه تا مصرف آن، اقدامات و نظارت‌های لازم انجام شود (۲۴).

در مطالعه حاضر آلودگی به لیستریا مونوسیترنوز در نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۰/۹ درصد گزارش شده است. هم‌چنین در این مطالعه بیش‌ترین میزان آلودگی، در پنیرهای سفید با ۷ درصد آلودگی دیده می‌شود، که از علل آن می‌توان به درصد رطوبت بالای این پنیرها نسبت به پنیرهای کوزه‌ای اشاره کرد. پنیرهای نرم محصولی با PH ۴/۵-۶/۵ بوده و درصد نمک نهایی این پنیرها ۳/۵-۲/۳ درصد می‌باشد (۲۵). با توجه به این که لیستریا مونوسیترنوز قادر به تحمل درصد نمک بالا و محدوده PH گسترده‌تری است احتمال حضور آن در



تصویر شماره ۱: تصویر ژل الکتروفورز ژن aprfA: نمونه کنترل مثبت.

۱ تا ۱۴: نمونه پنیرهای مثبت

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۲۸ نمونه پنیر سنتی (۲۸ نمونه پنیر کوزه‌ای گوسفندی، ۲۴ نمونه پنیر کوزه‌ای گاوی، ۶۴ نمونه پنیر سفید و ۱۲ نمونه پنیر لیقوان) عرضه شده در سطح شهر قزوین جمع‌آوری گردید. در بررسی انجام شده، ۱۴ نمونه (۱۰/۹ درصد) (شامل کوزه‌ای گاوی ۱ نمونه (۰/۸ درصد)، کوزه‌ای گوسفندی ۱ نمونه (۰/۸ درصد)، پنیر سفید ۹ نمونه (۷/۰ درصد) و پنیر لیقوان ۳ نمونه (۲/۳ درصد) از نظر آلودگی به باکتری لیستریا مونوسیترنوز مثبت گزارش شدند. این موارد مثبت که با استفاده از روش‌های شیمیایی به عنوان گونه لیستریا مونوسیترنوز تشخیص داده شده بودند، تحت آزمون PCR قرار گرفته و تأیید شدند (جدول شماره ۳). بر اساس نتایج این مطالعه میزان آلودگی پنیرهای سنتی به باکتری لیستریا مونوسیترنوز در فصول بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۲/۳، ۳/۱، ۲/۳ و ۳/۱ درصد می‌باشد (جدول شماره ۴). طبق این نتایج آلودگی در فصل تابستان و زمستان بیش‌تر از دو فصل دیگر بوده است. در این مطالعه میزان آلودگی نمونه‌ها از نظر محل جمع‌آوری نیز مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس آن نمونه‌های جمع‌آوری شده از بازار (۶/۳ درصد) بیش‌ترین آلودگی و نمونه‌های جمع‌آوری شده از خیابان سپه (۰/۸ درصد) کم‌ترین آلودگی را داشتند (جدول شماره ۵). هم‌چنین نتایج آزمون دقیق فشار نشان‌دهنده این بود که رابطه معنی‌داری بین نوع آلودگی و نوع پنیر ($P=0/119$) نوع آلودگی و فصل ($P=0/956$) و نوع آلودگی و محل جمع‌آوری ($P=0/777$) وجود ندارد.

پنیرهای نرم وجود دارد. معمولاً پنیرهای سفید و نرم به صورت تازه مصرف می‌شوند و دوره رسیدن طولانی را طی نمی‌کنند، در نتیجه شرایط از نظر رطوبت، aw (فعالیت آبی) و اسیدیته مناسب برای زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها از جمله لیستریا مونوسیتوژنز فراهم می‌باشد. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که لیستریا مونوسیتوژنز می‌تواند در محلول‌های نمکی پنیرها، به مدت ۷ الی ۲۵۹ روز زنده بماند (۲۶).

مطالعه‌ای که توسط جلی و همکاران در سال ۱۳۹۱ انجام یافت، نشان داد که ۹ درصد از پنیرهای تازه محلی بالیستریا مونوسیتوژنز آلوده بوده‌اند (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۲ توسط نوروزی و همکاران انجام شد، از ۷۰ نمونه فرآورده لبنی در مجموع، ۱۷ مورد آلودگی بالیستریا مونوسیتوژنز، 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 مونوسیتوژنز بوده‌اند (۲۸). بهاروند در پژوهش خود که در سال ۱۳۹۴ انجام داد، از ۲۱۲ نمونه غذایی مورد بررسی، ۴۱ مورد (۱۹/۳۳ درصد)، آلودگی به گونه‌های لیستریا را گزارش داد، که در این بین ۴۰ درصد از پنیرهای نرم، آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بوده‌اند (۲۹). در بررسی بهادر و همکاران در سال ۱۳۹۴ میزان شیوع لیستریا مونوسیتوژنز ۷/۵ درصد گزارش شده‌است. در این مطالعه که ۳۱۷ نمونه در آن مورد بررسی قرار گرفته و با روش مولکولی PCR تایید شده‌است، از ۷۰ نمونه پنیر ۵ نمونه مثبت (۴/۶۵ درصد) و از ۲۰ نمونه خامه، ۳ مورد (۱۵ درصد) مثبت گزارش شده‌است (۳۰). در مطالعه‌ای که شامل و همکاران در سال ۱۳۹۴ با عنوان بررسی شیوع گونه‌های لیستریا در شیرخام 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 مونوسیتوژنز بوده است که موارد مثبت با روش PCR تایید شده‌اند. همچنین لیستریا در شیرخام، بستنی، خامه و فرنی شناسایی شد ولی

ماست و کره و کشک و پنیر از نظر آلودگی منفی گزارش شدند (۱۵) که این نتیجه با مطالعه ما از نظر آلودگی در پنیر مطابقت ندارد. در مطالعه عباسی‌نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۴ با عنوان میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای کوزه‌ای مصرفی شهرستان ارومیه بیان داشتند که از ۱۰۰ نمونه پنیر تهیه شده از فروشگاه‌های شهرستان، ۳ نمونه آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بوده‌است (۳۱).

در مطالعه حاضر کم‌ترین آلودگی در پنیرهای کوزه‌ای (۰/۸ درصد) در مقایسه با پنیرهای سفید دیده می‌شود. همچنین در این مطالعه تفاوتی در میزان آلودگی پنیر کوزه‌ای گاوی و پنیر کوزه‌ای گوسفندی دیده نمی‌شود. پایین بودن میزان آلودگی این نوع از پنیرها می‌تواند ناشی از رطوبت پایین و نیز اسیدیته بالای این پنیرها باشد. در طول دوره رسیدن پنیرهای کوزه‌ای که یکی از مراحل تولید پنیر است، بر اثر تخمیر باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک، مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آلی نظیر اسیدلاکتیک و نیز مقادیر زیادی از باکتریوسین‌ها تولید می‌شوند که اثرات مهارری روی رشد و بقای لیستریا مونوسیتوژنز دارند (۳۱).

در مطالعه‌ای که رحیمی و همکاران در شهرکرد و شیراز جهت بررسی فراوانی گونه‌های لیستریا در شیرخام، پنیر سنتی و بستنی سنتی عرضه شده انجام دادند، از مجموع ۱۷۸ نمونه مورد بررسی، ۲۴ نمونه (۱۳/۵ درصد) از نظر آلودگی به گونه‌های لیستریا مثبت بوده، که آلودگی پنیر سنتی ۲۴/۴ درصد گزارش شده است. در این پژوهش آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز ۳۷/۵ درصد گزارش گردید (۳۲).

در مطالعه دیگری که در اصفهان توسط شهبازی و همکاران انجام یافت، از ۷۰ نمونه پنیر سنتی، ۵ نمونه (۷/۱۴ درصد) آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بوده است (۳۳).

در پژوهش کلانتری‌پور و همکاران در تبریز در سال ۱۳۹۶ نتایج حاکی از آلودگی ۵ نمونه (۴۱/۶۶)

درصد) پنیر سنتی از ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی جمع آوری شده می باشد (۱۷). میزان آلودگی پنیرهای لیقوان در مطالعه حاضر ۲/۳ درصد می باشد. با توجه به این واقعیت که این پنیر از شیر خام تولید می شود و هیچ فرایند گرمایی بر روی آن انجام نمی شود، احتمال آلودگی پنیر تولیدی از شیر خام وجود دارد. اگرچه ممکن است ذخیره سازی پنیر لیقوان در آب نمک غلیظ (۱۲ درصد) و نگهداری طولانی مدت (۳-۴ ماه) این پنیر قبل از عرضه به مصرف کنندگان، تا حدی این نقص را پوشش دهد و بر بقای پاتوژن تأثیر بگذارد، اما در این زمینه هیچ مطالعه ای انجام نشده است (۳۴).

Osaili و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پژوهش خود که با کمک تکنیک PCR مورد تایید قرار گرفته، بیان کردند که از ۳۵۰ نمونه پنیر جمع آوری شده از بازار محلی در اردن شیوع کلی لیستریا در نمونه ها ۲۷/۱ درصد بوده که ۱۱/۱ درصد از آلودگی مربوط به لیستریا مونوسیتوژنز بوده است (۳۵). در مطالعه Arrese و همکاران در سال ۲۰۱۲ 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 گونه های مختلف لیستریا بودند اما هیچ نمونه ای آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز نبوده است (۳۶).

نتایج این مطالعه نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد. در مطالعه Almeida و همکاران در سال ۲۰۱۳ با عنوان شناسایی آلودگی پنیرهای مختلف به لیستریا مونوسیتوژنز در پرتغال، ۱۳/۶ درصد پنیرهای نیمه سخت آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بوده اند (۳۷). Acciari و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه ای که به دنبال ثبت گزارشی از لیستریوزیس در آمریکا، ناشی از مصرف پنیرهای سنتی ایتالیایی وارداتی، در ایتالیا انجام دادند بیان داشتند که از ۷۵۸ نمونه پنیر، ۱۷۹ پنیر سنتی تولید شده (۲۳/۶ درصد) از نظر آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز مثبت بوده است (۳۸).

در مطالعه ای که Şanlıbaba و همکاران در آنکارا

در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، بیان کردند که از ۳۰ نمونه پنیر سفید ۰ درصد آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز و از ۳۰ نمونه پنیر خانگی ۶/۶۷ درصد آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز بوده اند. نتایج این مطالعه از نظر آلودگی پنیرهای سفید مغایر با نتایج مطالعه حاضر می باشد (۱۳). Gelblcova و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه خود با عنوان (بررسی شیوع و منابع لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای تهیه شده از بازار خرده فروشی در جمهوری چک) نشان دادند که از ۳۸۷ نمونه پنیر با بسته بندی مختلف، ۲۰ نمونه (۵/۶ درصد) از نظر لیستریا مونوسیتوژنز مثبت می باشند که بیش ترین آلودگی در پنیر آبی شناسایی گردید (۲۸ درصد) (۳۹). در اکثر مطالعات نتایج حاکی از آلودگی بالای پنیرهای سنتی به لیستریا مونوسیتوژنز است، که خود نشان از شرایط غیر بهداشتی تولید و نگهداری و عرضه این محصولات می باشد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج اکثر مطالعات دیگر از نظر وجود آلودگی در پنیرهای سنتی همخوانی دارد، اما تفاوت در میزان شیوع گونه های لیستریا وجود دارد. از دلایل آن می توان به تفاوت در زمان انجام مطالعه و میزان آلودگی ثانویه شیر خام در حین دوشش، حمل و نقل و دیگر عوامل محیطی موثر بر روی رشد لیستریا مونوسیتوژنز اشاره کرد. اگرچه پاستوریزاسیون شیر خام می تواند در جهت جلوگیری از شیوع لیستریا موثر باشد اما گزارش هایی از موارد بروز لیستریوزیس در اثر مصرف مواد لبنی پاستوریزه شده نیز وجود دارد (۴۱، ۴۰). مطالعات بیانگر این است که وقوع لیستریوزیس به فصل بستگی دارد، به طوری که در فصل زمستان شیوع بیماری بیش تر گزارش شده که ممکن است به دلیل آن باشد که در زمستان، دام ها بیش تر از غذای سیلو شده تغذیه می شوند، که در نتیجه ی آن شیر تولیدی آلوده خواهد بود. لیستریا مونوسیتوژنز بر روی گیاهان پوسیده نسبت به گیاهان سرسبز یا گیاهانی که از بین رفته اند بهتر زیست می کند. این میکروارگانیسم در علوفه تخمیر شده که به صورت سیلو نگهداری می شود و PH

مواد غذایی و همچنین ارائه‌ی آموزش‌های لازم در رابطه با ایمنی مواد غذایی، توانسته‌اند میزان لیستریوزیس را کاهش دهند. از آن‌جا که تولید فراورده‌های لبنی سنتی در ایران در کارگاه‌های کوچک و فاقد مجوز بهداشتی می‌باشد و در این کارگاه‌ها از شیر خام یا پاستوریزه نشده استفاده می‌شود، اجباری شدن استاندارد جستجوی لیستریا در مواد غذایی ضروری به نظر می‌رسد. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان‌دهنده این واقعیت است که تولید و عرضه پنیر سنتی در شهر قزوین بایستی در شرایط مناسب از نظر بهداشتی صورت گیرد. هم‌چنین توصیه می‌شود تمهیدات لازم برای استفاده از روش‌هایی با دقت و حساسیت بالا جهت شناسایی عوامل میکروبی چون لیستریا مونوسیتوژنز به کار گرفته شود.

پیشنهادهای: بکارگیری تکنولوژی مناسب و بهداشتی در رابطه با تولید شیر و پنیر، عدم استفاده از محصولات لبنی غیر پاستوریزه، افزایش نظارت‌های بهداشتی بر مراکز تولید و عرضه، انجام طرح مشابه جهت شناسایی کپک و مخمر و کلی فرم و اشرشیا کلی و سالمونلا در پنیرهای سنتی قزوین.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1396.348 می‌باشد. بدین وسیله از شورای پژوهشی و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین و از شرکت کنندگان طرح سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Jamshidi A, Khanzadi S. The presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples in Mashhad, Iran. Iran J Veter Res 2011; 11(4): 363-367 (Persian)
2. Vaziri S, Norowzi M. Investigation of the contamination of local cheeses of Lighvan of

بالا تر از ۴/۵ دارد، مشاهده می‌شود (۴). علاوه بر این لیستریا مونوسیتوژنز قادر به رشد در دماهای پایین می‌باشد (۴۵ تا ۱ درجه سانتی گراد) (۴۲). بر اساس مطالعه حاضر نیز میزان آلودگی در تابستان و زمستان بیش‌تر بوده‌است. نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهد در فصل تابستان بار میکروبی شیرهای خام بالاتر از فصول دیگر است (۴۳). این آلودگی می‌تواند بر کیفیت پنیر تولیدی تاثیر بگذارد. در مطالعه حاضر نیز آلودگی پنیرهای سنتی در تابستان بیش‌تر است. در فرآیند تولید برخی از پنیرهای سنتی، استفاده از آب نمک با غلظت بالا برای جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها ضروری است. آب نمک خود می‌تواند، مخزنی برای پاتوژن‌های مقاوم به نمک باشد (۴۴). در نتیجه در صورت استفاده از آب نمک غلیظ در فصول گرم، یکی از دلایل آلودگی بالای پنیر در تابستان در مطالعه حاضر را می‌توان، تحمل نمک تا غلظت ۱۰ الی ۱۴ درصدی لیستریا مونوسیتوژنز عنوان کرد (۴۵، ۲۳). با این که استاندارد جستجوی لیستریا در مواد غذایی توسط سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تدوین شده، اما رعایت این استاندارد اجباری نشده است (۴۶). به علت مصرف شیر خام و مصرف فراورده‌های آن به ویژه پنیرهای سنتی در کشور و مصرف مواد غذایی آماده، احتمال بروز لیستریوزیس وجود دارد. گزارشاتی حاکی از کاهش شیوع لیستریوزیس در کشورهای پیشرفته دیده می‌شود. کاهش لیستریوزیس در کشورهای صنعتی حاکی از استفاده از روش‌های کنترل میکروبی در تولید مواد غذایی در آن کشورها است. در این کشورها با استفاده از سیستم‌های کنترلی چون HACCP و کنترل نقاط بحرانی در تولید

- Tabriz to coliforms and *Escherichia coli* in Maragheh. Iran J Microbiol 2012; 5(4): 23-28 (Persian).
3. Najafi AH, Ziaabakhsh Deylami M, Karimian H, Abedinia AR, Hosseini Nejjad M. Microbiological Changes of Pousti Cheese

- During Ripening. J Food Technol Nutrition 2011; 8(2): 85-91 (Persian).
4. Gholami M, Zargar M, Aghaee S. Identification of *Listeria monocytogenes* from raw milk by cell culture and PCR methods of the actA gene. J Appl Biol 2016; 7(1): 39-47 (Persian).
 5. Rahimi E, Safarpourdehkordi F, Yahaghi E, Khodaverdi E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from smoked and salted fish. Iran J Med Microbiol 2014; 8(3): 31-37 (Persian).
 6. Williams SK, Roof S, Boyle EA, Burson D, Thippareddi H, Geornaras I, et al. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. J Food Prot 2011; 74(1): 63-77.
 7. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Appl Microbiol Biotechnol 2016; 100(12): 5273-5287.
 8. Khan JA, Rathore RS, Khan S, Ahmad I. In vitro detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* from food sources by conventional, molecular and cell culture method. Braz J Microbiol 2014; 44(3): 751-758.
 9. Aygun O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control 2006; 17(8): 676-679.
 10. Phraephaisarn C, Khumthong R, Takahashi H, Ohshima C, Kodama K, Techaruvichit P, et al. A novel biomarker for detection of *Listeria* species in food processing factory. Food Control 2017; 73: 1032-1038.
 11. Yehia HM, Ibraheim SM, Hassanein WA. Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification. Trop J Pharm Res 2016; 15(5): 1047-5102.
 12. Zhu Q, Gooneratne R, Hussain MA. *Listeria monocytogenes* in fresh produce: Outbreaks, prevalence and contamination levels. Foods 2017; 6(3): E21.
 13. Şanlıbaba P, Tezel BU, Çakmak GA. Detection of *listeria* spp. In raw milk and dairy products retailed in ankara. J Food 2018; 43(2): 273-282.
 14. Hitchins AD, Jinneman K, Chen Y. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10, Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. U S Food and drug; 2017.
 15. Shamloo E, Jalali M, Mirlohi M, Madani G, Metcalf D, Merasi MR. Prevalence of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. Int J Environ Health Engineer 2014; 3(3): 1-5.
 16. Zamani-Zadeh M, Sheikh-Zeinoddin M, Soleimani-Zad S. Prevalence and characterization of *Listeria* species in domestic and industrial cheeses of Isfahan region. Iran J Public Health 2011; 40(3): 98-104.
 17. Kalantaripour a, hanifian s. *Listeria* isolated from traditional cheeses of tabriz area: Occurrence, diversity and phenotypic characteristics. J Food Microbiol 2017; 4(2): 83-96 (Persian).
 18. Zahedi Bialvaei A, Sheikhalizadeh V, Mojtahedi A, Irajian G. Epidemiological burden of *Listeria monocytogenes* in Iran. Iran J Basic Med Sci 2018; 21(8): 770-780.
 19. Abdimoghadam Z, Shamloo E, Atefi M. Frequency of *Listeria* Species in Raw Milk and Traditional Dairy Products in Isfahan, Iran. Iran J Nutrition Sci Food Technol 2015; 10(3): 98-104 (Persian).
 20. Rahimi E, Yazdi F, Farzinezhadizadeh H. Prevalence and antimicrobial resistance of

- Listeria species isolated from different types of raw meat in Iran. *J Food Prot* 2012; 75(12): 2223-2227.
21. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 2007; 9(10): 1236-1243.
22. Doménech E, Jimenez-Belenguer A, Amoros JA, Ferrus MA, Escriche I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Ccontrol* 2015; 47: 120-125.
23. Akrami-Mohajeri F, Derakhshan Z, Ferrante M, Hamidiyan N, Soleymani M, Conti GO, et al. The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food Chem Toxicol* 2018; 114: 141-144.
24. Shamloo Aghakhani E, Jalali M, Mirlohi M, Abdi Moghadam Z, Shamloo Aghakhani E, Reza Maracy M, et al. Prevalence of *Listeria* Species in Raw Milk in Isfahan, Iran. *J Isfahan Med School* 2012; 30(204): 1-4 (Persian).
25. Pintado C, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MA. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol* 2005; 22(1):79-85.
26. Barancelli GV, Camargo TM, Gagliardi NG, Porto E, Souza RA, Campioni F, et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 2014; 173: 21-29.
27. Ahmadi Jebelli M, Nowroozi J, Jalil Vand Y, Moakhar RK. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from local cheese and evaluation of bacteria growth and proliferation in Hela cell culture. *African J Microbiol Res* 2012; 6(13): 3297-3300.
28. Norowzi J, Moradi Didhendy S, Shafiee M. Detection of *acta* gene in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products. *J Microbial World* 2013; 6(3): 246-252 (Persian).
29. Baharvand R. Prf A gene in *Listeria monocytogenes* isolated from food. *J Qazvin Univ Med Sci* 2015; 19(1): 24-31 (Persian).
30. Bahador A, Sadeghi Kalani S, Valian F, Irajian G, Lotfollahi L. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated From Dairy and Meat Products. *Avicenna J Clin Microbiol Infect* 2015; 2(3). (Persian).
31. Abbasinejad, Neyriz-Nagadehi M, Taher Talatappeh N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Koozeh cheeses of Urmia retails. *J Food Hygiene* 2015; 5(1): 27-34 (Persian).
32. Rahimi E, Behzadnia A, Shakerian A, Momtaz H. Frequency of *Listeria* species from raw milk, traditional cheese and ice-cream in Shahrekord and Shiraz. *J Microbial World* 2010; 2(4): 243-248 (Persian).
33. Shahbazi AM, Rashedi M, Sohrabi R. Comparative contamination of *Listeria monocytogenes* in traditional dairy products in Esfahan Province, Iran. *African J Microbiol Res* 2013; 1(2): 024-027.
34. Moosavy MH, Esmaili S, Mostafavi E, Amiri F. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milks used for Iranian traditional cheese in Lighvan cheese factories. *Ann Agric Environ Med* 2014; 21(4): 728-729.
35. Osaili TM, Al Nabulsi AA, Taha MH, Al Holy MA, Alaboudi AR, Al Rousan WM, et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from brined white cheese in Jordan. *J Food Sci* 2012; 77(9): M528-M532.

36. Arrese E, Arroyo-Izaga M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Idiazabal cheese. *Nutr Hosp* 2012; 27(6): 2139-2141.
37. Almeida G, Magalhães R, Carneiro L, Santos I, Silva J, Ferreira V, et al. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *Int J Food Microbiol* 2013; 167(3): 303-309.
38. Acciari VA, Iannetti L, Gattuso A, Sonnessa M, Scavia G, Montagna C, et al. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. *Epidemiol Infect* 2016; 144(13): 2719-2727.
39. Gelbířčová T, Tomášřtková Z, Kolářřková I, karpíšřková R. A survey on prevalence and sources of *Listeria monocytogenes* in ripened and steamed cheeses from the retail market in the Czech Republic. *J Food Nutr Res* 2017; 56(1): 42-47.
40. Lyytikäinen O, Autio T, Maijala R, Ruutu P, Honkanen-Buzalski T, Miettinen M, et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J Infect Dis* 2000; 181(5): 1838-1841.
41. Abdimoghdam Z, Shamloo E, Mortazavian AM, Atefi M. Frequency of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2015; 10(3): 101-107 (Persian).
42. Lianou A, Koutsoumanis KP. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: a review. *Int J Food Microbiol* 2013; 167(3): 310-321.
43. Hooshmand Z, Teymouri P, Safari M, Soleimani Z. Survey of the microbiological count of the milk collected from livestock ancient city of Garmsar, Semnan Province, Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2019.
44. Durmaz H, Aygun O, Ardic M. The effect of cheese brine concentrations on survival of *Listeria monocytogenes*. *J food Agric Environ* 2009; 7(3&4): 11-13.
45. Panfil-Kuncewicz H, Łaniewska-Trokenheim Ł, Kuncewicz A. Survival of *Listeria monocytogenes* in Tvorog packaged with the use of different methods. *Milchwissenschaft.* 2009; 64(1): 64-67.
46. Hamidiyan N, Soleimani M, Salehi AA, Fallahzadeh H, Akrami Mohajeri F. Prevalence of *Listeria Monocytogenes* in Traditional ice Cream, Yazd, IRAN (2015) and Compared to Other Studies in Different Parts of Iran. *Toloo E-Behdasht* 2017; 16(2): 31-45 (Persian).