

بررسی آلودگی پنیرهای سنتی ليقوان به استافيلوکوکوس اورئوس

کواگولاز مثبت توزیع شده در شهر تهران

علی صالحی^۱، عماد دهقانی فرد^۲، محمود علی محمدی^{۳*}

۱. گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۳. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۸/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، غیر اسپورزا، فاقد کپسول، غیرمتحرک، هوازی تا بیهوازی اختیاری و قادر به تحمل مقادیر زیاد نمک (تا ۱۵ درصد) می‌باشد. از اینرو مواد غذایی حاوی نمک، محیط مناسبی را برای رشد باکتری مهیا می‌سازد. همچنین این باکتری یکی از مهمترین عوامل بیماریزای منتقله از فرآورده‌های غذایی فساد پذیر بخصوص فرآورده‌های لبنی می‌باشد. پنیر سنتی ليقوان در بسیاری از مناطق کشور ما بخصوص شهرستان تهران مصرف زیادی دارد و اصولاً در ساخت اینگونه پنیرها از شیر پاستوریزه نشده و خام استفاده می‌شود و همچنین وضعیت بهداشتی در حین فرآوری، نگهداری و فروش پایین می‌باشد. لذا با توجه به اهمیت موضوع در انتشار مسمومیت، بررسی میزان آلودگی پنیر سنتی ليقوان به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در سطح توزیع شهرستان تهران مورد نظر قرار گرفت.

روش بررسی: به منظور انجام این مطالعه ۲۵ نمونه پنیر سنتی ليقوان به صورت کاملاً تصادفی از فروشگاههای تهران تهیه شد و طبق استانداردهای ملی و با استفاده از محیط کشت‌های برد پارکر، کوک میت و آزمایش کواگولاز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۲۵ نمونه، ۲۲ نمونه (۸۸٪) به استافیلوکوکوس آلودگی داشتند و ۱۴ نمونه (۶۳/۶٪) بیش از حد استاندارد به استافیلوکوکوس و ۵ نمونه (۲۲/۷٪) به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت آلودگی داشتند. **نتیجه‌گیری:** این امر توجه و رعایت شرایط بهداشتی را در حین تولید و ضرورت استفاده از شیر پاستوریزه را در تهیه پنیر نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: پنیر ليقوان، استافیلوکوکوس اورئوس، کشت، تهران

* گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
ایمیل: alimo2002@gmail.com

مقدمه

یکی از پایه‌های توسعه اقتصادی، تأمین غذای بهداشتی و مناسب برای کلیه آحاد جامعه است و سلامتی نسل آینده بدون تأمین غذای مطلوب میسر نیست. در کشورهای پیشرفته بیماریهای منتقله از غذا تحت کنترل درآمده اند. با این حال هنوز خسارات اقتصادی و مشکلات بهداشتی وجود دارد، این مسئله در کشورهای در حال توسعه محسوس تر است. شیر و فراورده‌های آن از جمله پنیر که قسمت وسیعی از احتیاجات غذایی انسان را تأمین می‌کند از مواد غذایی است که نقش فوق العاده با اهمیتی از نظر انتقال بیماریها به انسان دارد.^۱ امروزه علیرغم توسعه و پیشرفت در تکنیک‌های تولید پنیرهای صنعتی در ایران و سایر کشورها، هنوز چندین نوع پنیر سنتی در قسمت‌های مختلف از کشور تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله این نوع پنیرهای سنتی می‌توان به پنیرهای سنتی ليقوان اشاره کرد که در استان آذربایجان شرقی تولید می‌شوند. پنیر ليقوان به عنوان یک پنیر سفید رسیده در آب نمک (white cheese ripened in brine) و نیمه سخت بوده که در تولید این پنیرها معمولاً از ترکیب شیرگوسفند و بز و یا شیرگاو استفاده می‌گردد و به طور سنتی از شیر خام و بدون مایه کشت پنیر تولید می‌شود.^۲ از آنجایی که در ساخت این گونه پنیرها از شیر پاستوریزه نشده و خام استفاده می‌گردد و اگر شیر حاوی باکتریهای بیماریزا باشد و یا آلودگی ثانویه در هنگام ساخت پنیر بوجود آید؛ این امر منجر به بروز مسمومیت غذایی ناشی از حضور میکروارگانیسم‌ها و یا سموم تولید شده توسط آنها می‌گردد.^۳ استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، غیر اسپورزا، فاقد کپسول، غیر متحرک، هوازی تا بیهوازی اختیاری و قادر به تحمل مقادیر زیاد مک (تا ۱۵ درصد) می‌باشد. از این رو مواد غذایی حاوی نمک نظیر پنیر و کشک محیط مناسبی را برای رشد باکتری مهیا می‌سازد.^۳ برخلاف سایر بیماریهای غذایی که معمولاً دوره کمون طولانی‌تری دارند، مسمومیت استافیلوکوکی دارای دوره کمون کوتاه ۱ تا ۴ ساعت می‌باشد

که به دنبال مصرف غذای حاوی توکسین باکتری اتفاق می‌افتد و علائم مسمومیت شامل تهوع، استفراغ، حالت تهوع، نبض ضعیف، لرز، ناتوانی، تعریق، شوک، تنفس کم عمق و حرارت بدن پایین تر از حد طبیعی می‌باشد. این نشانه‌ها معمولاً بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت ادامه دارند و میزان مرگ و میر نیز بسیار کم یا صفر است.^۴ با توجه به پیشرفت نسبتاً سریع در ایجاد بیماری و همچنین بهبودی سریع به همان اندازه (برای بیشتر افراد) اکثر منابع بر این باورند که اغلب موارد مسمومیتها گزارش نمی‌شوند.^۵ شایان ذکر است این نوع مسمومیتها طبق گزارش مرکز کنترل بیماریها (CDC) درآلاتنا در بعضی از سالها از نظر آماری در ردیف اول کلیه مسمومیت‌های غذایی قرار می‌گیرند.^۵ با توجه به اینکه پنیرهای ليقوان به صورت سنتی و بدون کنترل صحیح بهداشتی تهیه شده و همچنین به علت عدم وجود فرایند سالم سازی حرارتی در حین فرآوری، اهمیت مسمومیت با استافیلوکوکوس اورئوس نمایان می‌گردد. هدف ما در این مطالعه تعیین میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در پنیرهای سنتی ليقوان و مقایسه این نتایج با استانداردهای ملی ایران و همچنین با مطالعات دیگر محققان می‌باشد تا با توجه به خطرات ناشی از مسمومیتها، با ارزیابی و شمارش مقادیر استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت و ارائه راهکارهای مناسب بتوانیم مصرف کنندگان را از زیانهای احتمالی باز داریم.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۲۵ نمونه از پنیرهای سنتی، بطور کاملاً تصادفی و از هر کدام به مقدار ۲۵۰ گرم از فروشگاه های استان تهران، خریداری شد. نمونه‌ها داخل بسته بندی اصلی خود و تحت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه برده شدند و پس از درج مشخصات هر نمونه (نوع پنیر) تا زمان آزمایش در داخل یخچال نگهداری شدند. روش نمونه برداری و نگهداری نمونه‌ها تا زمان آزمایش مطابق با راهکار پیشنهادی موسسه

در پلیت‌ها را به پرگنه‌هایی که کواگولاز مثبت می‌باشند اضافه کرده و جمع آنها را در فاکتور رقت ضرب کرده و نتایج بر حسب تعداد در هر گرم پنیر، بیان شد^{۱۰،۸،۹}.

آزمایش کواگولاز مثبت

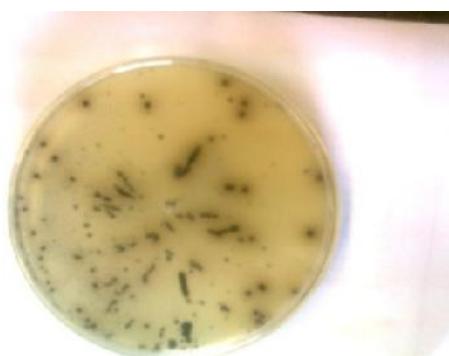
از محیط برد- پارکر، با استفاده از یک حلقه کشت، چند پرگنه انتخاب شده را برداشته و به لوله حاوی محیط کشت آبگوشت مغز و قلب انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۰/۵ میلی‌لیتر از این کشت مایع استافیلوکوکی در لوله آزمایش ریخته شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از پلاسما سیتراته خرگوش که چهار بار رقیق شده، به آن اضافه گردید و کاملاً با هم مخلوط کرده و به هم زده شد. در لوله دیگر، به عنوان شاهد منفی برای هر سری ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسما سیتراته، به ۰/۵ میلی‌لیتر آبگوشت غذایی فاقد باکتری اضافه گردید. لوله‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه قرار گرفته و در فواصل معین تا ۶ ساعت از نظر تشکیل لخته مورد بررسی قرار گرفت. در هر لوله که پلاسما منعقد شده و واکنش مثبت بود به عنوان کواگولاز مثبت گزارش شد، در حالی که نشانه‌ای از لخته در پلاسما شاهد دیده نشد^{۸،۹}.

نتایج

در این مطالعه ۲۵ نمونه پنیر سنتی لیقوان مورد مصرف در تهران به منظور بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت مورد مطالعه قرار گرفت. از مجموع ۲۵ نمونه پنیر ۳ نمونه (۱۲٪) در محیط برد پارکر آگار از نظر رشد باکتری منفی بود و ۲۲ نمونه (۸۸٪) از نظر رشد در محیط برد پارکر مثبت بود که پرگنه‌های سیاه در محیط کشت ظاهر شد (شکل ۱) و از نمونه‌های آلوده ۱۴ نمونه (۶۳/۶٪) تعداد بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی را نشان داد (جدول ۱). همچنین میزان آلودگی به استافیلوکوکوس

استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، شماره ۳۲۶، شیر و فراورده‌های آن- راهنمای نمونه‌برداری، می‌باشد.^۶ روش آزمایش به اینگونه بود که ابتدا پنیر را از یخچال خارج کرده و نمونه‌ها در یک ظرف که دارای اندازه و شکل مناسب است قرار داده شد تا تحت فشار قرار نگیرد و خرد نگردد. سپس توسط قاشق‌های فلزی سترون، از عمق پنیر نمونه را برداشته و به دقت حدود ۲۵ گرم را به وسیله ترازوی دیجیتالی توزین کرده و به هاون چینی سترون انتقال داده شد. از محلول رقیق کننده سیترات سدیم، برای تهیه اولین رقت استفاده شد که برای تهیه این محلول، ۲ گرم سیترات سدیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، محلول به دست آمده حاوی ۲٪ سیترات سدیم می‌باشد. سپس در ظروف مناسب به حجم‌های مورد نظر تقسیم نموده و در اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه سترون شد. مقدار ۲۵ گرم پنیر توزین شده با ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم ۲٪ هموزن شد. سوسپانسیون حاصله رقت ۱۰ داشته که از آن رقت‌های بعدی (۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴} و ...) را بدست آوردیم.^۷ به منظور جستجو و شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس، از نمونه آماده شده، به کمک یک پیپت یک میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر را برداشت کرده و به محیط کشت غنی‌کننده cook meat broth برده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه نگهداری شد سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه را توسط پیپت سترون برداشت کرده و به سه پلیت حاوی محیط برد- پارکر برده شد و در هر پلیت به طور مساوی تقسیم شد (مقادیر ۰/۴، ۰/۳ و ۰/۳). و با استفاده از یک میله شیشه‌ای خمیده سترون در روی سطح محیط کشت بخوبی پخش شد. درب پلیت‌ها را بسته تا کاملاً نمونه جذب محیط گردد و سطح آنها کمی خشک شود و سپس آنها را وارونه به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. پس از ۴۸ ساعت، پلیت‌های برد پارکر را از گرمخانه بیرون آورده و پرگنه‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها به وسیله پرگنه شمار شمارش گردید. تعداد پرگنه‌های ظاهر شده

بررسی آلودگی پنیرهای سنتی ليقوان به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت توزیع شده در شهر تهران



اورئوس کواگولاز مثبت ۵ نمونه (۲۲/۷٪) بود (نمودار ۱).
 قضاوت در مورد آلودگی بر اساس ویژگی‌های میکروبی
 سازمان استاندارد ملی ایران انجام گرفت.

شکل ۱: پرگنه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر

جدول ۱: نتایج نهایی نمونه‌های پنیر مورد بررسی از نظر رشد باکتری در ۲۵ نمونه مورد مطالعه

موارد مثبت		موارد منفی	
۲۲		۳	
بیشتر از حداکثر مجاز (10^2)		کمتر از حداکثر مجاز (10^2)	
۱۴		۸	
کواگولاز مثبت	کواگولاز منفی	کواگولاز مثبت	کواگولاز منفی
۵	۹	۰	۸



نمودار ۱: میزان آلودگی پنیر سنتی ليقوان عرضه شده در فروشگاه‌های تهران به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت

بر این اساس حد مجاز استافیلوکوکوس اورئوس در یک گرم پنیر رسیده در آب نمک حداکثر ۱۰۰ باکتری می‌باشد و

استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در یک گرم پنیر رسیده در آب نمک باید منفی باشد.^{۱۱و۹}

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس قادر است از راه‌های مختلفی از جمله غدد پستانی دام، مدفوع و ترشحات دام آلوده، ظروف و وسایل آلوده و همچنین تماس افراد آلوده به طور مستقیم و غیرمستقیم باعث آلودگی شیر گردد. چون در تهیه پنیر ليقوان از شیر خام استفاده می‌شود، انتظار می‌رود آلودگی از این طریق انجام گیرد. در مطالعه ای مرحمتی زاده و همکاران (۱۳۸۶) ضمن بررسی آلودگی ۵۰ نمونه پنیر سنتی در شهرستان کازرون مشاهده کردند که ۲۳ نمونه (۴۶٪) به استافیلوکوکوس آلودگی داشته و ۱۳ مورد (۲۶٪) آلوده به نوع کواگولاز مثبت بودند.^۴ در تحقیقی که در شهر موصل عراق توسط Abbar و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد، از ۲۳ نوع پنیر مختلف جمع آوری شده، ۳۱ درصد آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند.^{۱۴} در مطالعه ای که توسط علی محمدی ثانی در شهرستان مشهد و قوچان (۲۰۰۹) انجام شد، از ۱۴۸ نمونه پنیر سنتی، ۳/۴ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند.^{۱۲} همچنین شادان و همکاران با مطالعه بر روی ۱۲۰ نمونه پنیر سنتی شهرستان زاهدان به این نتیجه رسیدند که ۲۵ درصد نمونه‌ها بیش از حد استاندارد ایران به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند. و آلودگی به استافیلوکوکوس را به عدم رعایت

نکات بهداشتی در هنگام شیر دوشی و حین فرایند تهیه پنیر نسبت داده‌اند.^۱ در مجموع می‌توان گفت روش تولید پنیر سنتی در مناطق مختلف کشور ما متفاوت بوده و حتی فلور میکروبی آنها نیز یکی نیست. به همین علت میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد. همچنین علاوه بر موارد ذکر شده در میزان انتقال پاتوژن به پنیر، زمان، مسافت و تجهیزات حمل و نقل پنیر از شهرستان تبریز به شهرستان تهران نیز می‌تواند دخیل باشد. در این مطالعه نتایج آلودگی را می‌توان به موارد ذکر شده (دام آلوده، وسایل آلوده، تماس افراد آلوده، وسایل و مسافت حمل و نقل و...) نسبت داد. این امر توجه و رعایت شرایط بهداشتی را در حین تولید، ضرورت استفاده از شیر پاستوریزه و آموزش بهداشت به کارکنان را در تهیه پنیر نشان می‌دهد. همچنین پیشنهاد می‌شود جهت تکمیل این تحقیق در مطالعات بعدی آلودگی به پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس را در پنیرهای ليقوان واقع در روستای ليقوان را با پنیرهای ليقوان توزیع شده در شهرستان تهران با همدیگر مقایسه شده تا میزان تاثیر زمان، مسافت و تجهیزات حمل و نقل بیشتر مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

در پایان از زحمات مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Shadan M, Khooshabi F. The studies of microbial infection such as coliform, e. coli, staphylococcus aureus and salmonella in traditional cheese. *Tabib-e-Shargh* 2002;4 (1): 33-41 [In Persian].
2. Mirzaei H. Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5:1609-1614.
3. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetic Molecular Research* 2003; 2(1):63-76.
4. Marhamati zadeh MH, Karim G, Nikafrooz N, Peikar J. Survey on the white traditional cheese by Staphylococcus aureus in Kazeroun. 16th National congress of food science and Technology 2006. [In Persian]
5. James MJ, et al. *Modern Food Microbiology*. Translated by: Mortazavi A, Ziaolhagh H. Ferdowsi University of Mashhad Publications. Fourth Edition. 2005: 2(146).
6. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products – Guidance on sampling 2008; 3(326). [In Persian]
7. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination, Part 1: General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions. 2007; 1(8923-1). [In Persian]
8. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (staphylococcus aureus and other species) – Test method, Part 1 :Technique using baird – parker agar medium. 2005; 1:6806-1. [In Persian]
9. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Microbiology of milk and milk products- Specifications. 2:2406.
10. Karim G. Microbiological Examination of Foods. Tehran University Publications. 2008; 5 :128-136, 417-419. [In Persian]
11. Karim G. Analysis of Milk and Milk Products. Tehran University Publications. 2011; 2 :291. [In Persian]
12. Mohamadi Sani A. Evaluation of Presence and Occurrence of Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli in Cheese on Retail Stores. 12th Conference of Environmental Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, School of Health, 2009.
13. Mirzaei H, Barzgar A. Isolation and molecular study of potentially probiotic lactobacilli in traditional white cheese of Tabriz in Iran. *Annals of Biological Research*. 2012; 3(5):2213-2216.
14. Abbar FM, Tahir Mohammed M. Identification of some enterotoxigenic strains of staphylococci from locally processed cheese. *Food Microbiology* 2001; 3: 33-36.
15. Alergo LCA, Konta EM, Suzuki K, Silva GM, Junior FA, Rall R, Rall VLM. Occurrence of coagulase-positive Staphylococcus in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control*. 2007;18:630–634.

Evaluation of Coagulase-Positive Staphylococcus Aureus Contamination in Lighvan Cheese on Retail Stores

Ali Salehi¹, Emad Dehghanifard², Mahmood Alimohammadi³

1. Department of Food Health and Safety, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
3. Department of Environmental Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: alimo2002@gmail.com

Received: 4 Nov 2013 ; Accepted: 10 Mar 2014

ABSTRACT

Background: Staphylococcus aureus is a Gram-positive, non-sporulated, lack of capsule, immovable, aerobic and anaerobic and able to tolerate high levels of salt (up to 15 percent). Therefore, foods containing salt provides an ideal environment for bacterial growth. It is also one of the most important bacterial born of spoilable food products, especially in dairy products. Lighvan traditional cheese is consumed in many regions of Iran, especially consumption of these cheeses is very high in Tehran which in the manufacture of such cheeses, the unpasteurized and raw milk is used and the sanitary conditions during processing and subsequent storage are low. So, considering the importance of this issue in the release of poisoning, the coagulase-positive Staphylococcus aureus contamination in Lighvan cheese on Retail Stores was evaluated.

Materials and Methods: In order to perform this study, 22 samples of traditional Lighvan cheese were collected randomly from Tehran stores and according to Iran national standards and by using of bird-parker, Cook Meat cultures and coagulase test were evaluated.

Results: Total of 22 samples, 14 samples (63/6%) were contaminated by S. aureus over standard and 5 (22/7%) were contaminated with Staphylococcus aureus coagulase positive.

Conclusion: This study demonstrated that sanitary conditions should be observed during the production and Use of pasteurized milk in cheese production.

Keywords: Lighvan cheese, S.aureus, Culture medium, Tehran