عزل وتشخيص بكتريا *Listeria monocytogenes* من المثلجات اللبنية المتواجدة في اسواق مدينة بغداد
Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* in ice cream Available in Markets of Baghdad City

عادل تركي الموسوي رأفت أحمد أبو المعالي حيدر شنون كريم *
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك / جامعة بغداد
* مختبر الصحة المركزي/ وزارة الصحة
Adil T. Al – Musawi Raafat A. Abu-ALmaaly *Haider S. Kareem
Market Researches and Consumer Protection Center/ Baghdad University
*Central Public Health Labrotory/ Ministry of Heath

E-mail: adel_ali197030@yahoo.com

الملخص

اجريت هذه الدراسة للتحري عن مدى تلوث المثلجات اللبنية المتواجدة في أسواق مدينة بغداد ببكتريا *Listeria monocyogenes* (L.) من خلال فحص 50 عينة منها (محلية ومستوردة) خلال شهري تموز وآب لسنة 2015، شخصت مبدئياً بطريقة التخطيط على وسط آكار PALCAM (Polymyxin Acriflavin Lethium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar) وهو من الأوساط الصباغية الانتقائية التفريقية لبكتريا *L. monocyogenes*. شخصت العزلات لتأكيد عانديتها الى *L. monocyogenes* تحديداً بالاعتماد على الصفات المظهرية والأختبارات الكيموحيوية التقليدية المتضمنة فحص الكاتليز والاوكسيديز وفحص الحركة وفحص تحلل الدم، فضلاً عن إستعمال تقنيات تشخيصية حديثة تمثلت بكل من API Lesteria KIT والمتكون من 10 اختبارات كيميوحيوية وتقنية CLEARVIEW™ التي تعتمد على تفاعل الأضداد في هذه البكتريا وخصوصاً flagella antigen كاحدى الطرائق المتقدمة في الكشف عنها. أظهرت النتائج تواجد بكتريا *L. monocyogenes* بنسبة 6% في المثلجات المحلية المغلفة وغير المغلفة بطرائق العزل والتشخيص التقليدية، في حين بلغت نسبة عانديتها 4 % في نفس المنتجات عند إستعمال تقنيتي API Lesteria KIT و CLEARVIEW™ ، كما خلت هذه البكتريا من المثلجات المستوردة بالطرائق المشار إليها.

الكلمات الدالة: بكتريا *L. monocytogenes*، المثلجات اللبنية، API Lesteria، CLEARVIEW™.

Abstract

This study was conducted to investigate the contamination of dairy ice cream (local and imported) located in the city of Baghdad markets with *Listeria monocyogenes* L. *(monocyogenes*) bacteria by examining 50 samples of them during the months of July and August of 2015. Initial diagnosis was conducted on the agar media PALCAM (Polymyxin Acriflavin Lethium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar) a melanocyte selective differential media. Diagnosed isolates have confirmed their specific ownership to *L. monocyogenes* bacteria based on phenotypic agricultural traits and biochemical conventional methods tests like Catalase, oxidase, Motility and Hemolytic tests in addition to the use of modern diagnostic techniques represented both API Lesteria KIT which consists of 10 biochemical tests and CLEARVIEW™ technique that depend on the bacterial antigen reaction, especially flagella antigen as one of the advanced methods in the disclosure it. The results shown the presence of *L. monocytogenes* bacteria by 6% in the packaged and non- packaged local ice cream by conventional methods of isolation and diagnosis, while its ownership amounted to 4% in the same products when using Listeria KIT API and CLEARVIEW™ techniques, these bacteria did not detected the imported ice cream using the methods referred to above.

Key word: *L. monocytogenes*, ice cream, API Lesteria, CLEARVIEW™.

المقدمة

لفتت جرثومة (*L. monocytogenes*) *Listeria monocyogenes* انتباه الباحثين منذ عام 1911, وعُدت الاصابة بها في ذلك الحين مشكلة ذو أهمية اقتصادية في كل من الحيوانات الداجنة والبرية [1], وأنموذجاً مهماً للدراسة من وجهة نظر العديد من الباحثين والمختصين في مجال علوم الاحياء المجهرية للأغذية لكونها من الجراثيم التي تنتقل بشكل رئيس عن طريق السلسلة الغذائية [2], ولها العديد من الخصائص المهمة ومنها الطريقة التي تستعملها للانتقال داخل خلايا المضيف والانتشار في الجسم, إذ تقوم حال دخولها جسم المضيف بتحليل غشاء المضيف والتكاثر داخله من خلال عوامل الضراوة التي تمتلكها مسببة الأذى أو الضرر للإنسان أو الحيوان [3], وعلى الرغم من وجود عدة انماط تعود لجنس اللستيريا إلا أن النمط *L. monocytogenes* فقط الممرض للإنسان والحيوان على حد سواء [4]. تنتشر هذه الجرثومة بصورة واسعة في البيئات الريفية وبذا تعد من اهم وأخطر ملوثات المواد الغذائية الخام المستعملة في تصنيع الاغذية الجاهزة كالحليب ومشتقاته والمثلجات اللبنية, كما وانها أيضاً من ملوثات الفواكه والخضراوات الطازجة [5]. ويعتمد هذا على مصدر الجرثومة وقابلية الحليب أو المنتج على حفظ الجرثومة وحدوث التلوث بعد المعاملات المختلفة للحليب أو نتيجة التلوث المشترك حيث يكون مصدر الجرثومة الحيوان المنتج للحليب نفسه بصورة مباشرة أو غير مباشرة (البيئة المحيطة والقائمين بالحلب ... الخ من مصادر أخرى). تم عزل البكتريا في الولايات المتحدة الأمريكية من المثلجات اللبنية، وقد عزيت عدة حالات من الولادات الميتة إلى إصابة هذه الأجنة ببكتريا *Listeria monocytogenes* نتيجة

تناول الأمهات للمثلجات اللبنية خلال فترة الحمل، وقد تمت مجموعة من الدراسات في العالم منها عام 2000 إثر انتشار حالات كبيرة في مناطق مختلفة من أوروبا وأمريكا اللاتينية أكدت الدراسات أنها ناتجة عن تناول المثلجات اللبنية ولكن جميعها قد أخفق في متابعة المثلجات كمصدر مباشر للتلوث [7,6]. لقد أوضحت الدراسات ان تواجد هذا النمط يكون بأعداد قليلة جداً في الحليب الخام للأبقار تقدر بأقل من خلية لستيرية واحدة / مليلتر في الحالات الطبيعية نتيجة التلوث من المحيط الخارجي الى أعداد عالية تقدر بـ (2000- 50000) خلية لستيرية / مليلتر في حالات التهاب الضرع اللستيري النادر الحدوث [8], أن وبائية هذه الجرثومة قد انخفض كثيراً نتيجة تقدم الأساليب المتبعة في تشخيصها وبالتالي اتباع طرق للحد منها , فضلاً عن توفر المعلومات حول بيئة واسلوب أنتقال هذه الجرثومة, من ميزات خلاياها أنها عصوية لأهوائية اختيارية Facultative anaerobic, موجبة لصبغة كرام, غير مكونة للأبواغ , يتراوح أبعادها ما بين 1- 1.5 مايكرومتر طولاً, و 0.4 - 0.5 مايكرومتر عرضاً, متحركة ويتوضح ذلك بشكل جيد عند درجة حرارة 25 م [9]. لها القدرة على النمو في وسط ملحي يصل 20% لمدة ثمانية اسابيع على درجة 4 مْ, ولها القابلية على البقاء والنمو والتكاثر عند درجات حرارة تتراوح مابين 2.5 الى 4 م وهذه الميزة تعزز من زيادة اعداد خلاياها في الغذاء الملوث بها خصوصاً أذا حفظ لفترة طويلة عند درجة حرارة الثلاجة, وهنا تكمن المشكلة الحقيقية والخطرة لهذه الجرثومة [10]. ولأجل لفت الانتباه الى أهمية هذه الجرثومة كونها تنتقل عن طريق الغذاء, ولدورها في إحداث إصابات مختلفة لفئات عمرية متباينة ولعلاقتها المباشرة في حالات الاجهاض والولادة المبكرة عند الحوامل والتهاب السحايا عند حديثي الولادة, صممت هذه الدراسة إلى التحري عنها في المثلجات اللبنية المباعة في مدينة بغداد وأطرافها.

المواد وطرائق العمل

أولاً: جمع العينات

أجري البحث بالتعاون مع شعبة الاحياء المجهرية الغذائية في مختبر الصحة العامة المركزي / وزارة الصحة. جُمعت 50 عينة من المثلجات اللبنية خلال شهري تموز وآب لسنة 2015 وبصورة عشوائية من الاسواق المحلية في مدينة بغداد وأطرافها بواقع 20 عينة مثلجات مستوردة مغلفة و 20 عينة مثلجات محلية مغلفة و10 عينة مثلجات محلية مكشوفة تباع في المناطق الشعبية, وضعت كل على حدة في أكياس بلاستيكية معقمة في حاوية مبردة معدة لهذا الغرض لحين الوصول الى المختبر.

ثانياً: تحضير العينات

أتبعت طريقة Pagotto وجماعته في تحضير العينات [11] حيث أذيبت بدرجة حرارة الغرفة وبظروف معقمة, نُقل 25 مللتر من كل عينة وبظروف معقمة الى مغلف جهاز الخلاط Stomacher بعد إضافة كمية مناسبة من الوسط الاغنائي السائل Half Fraser Broth (HFB) المعقم مسبقاً والمجهز من شركة (LAB) والموضوع في قناني زجاجية بمعدل 225 مللتر, ثم مزجت العينة بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين, بعد ذلك أضيف المزيج الى باقي محتويات القنينة المعقمة الحاوية على الوسط الأغنائي ليتم حضنها في الثلاجة على درجة حرارة 6 م ولمدة 30 دقيقة وهذه اهم خطوات عزل الجرثومة (Critical-Step) الهدف من ذلك تضليلها ليتم اخراجها من داخل الخلايا Intracellular إن وجدت في العينة كونها محبة للبرودة , فضلاً عن كونها جراثيم داخل خلوية وبذا لانتكمن من عزلها الا بهذه الطريقة التي أكدتها معظم البحوث والدراسات حول العالم [11- 13], وبعدها حضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة.

ثالثاً: الفحوصات الميكروبيولوجية

بعد انتهاء مدة الحضن نقل جزء من المزروع البكتيري بوساطة ملء عروة الناقل المعقم وزرعت على وسط آكار PALCAM (Polymyxin Acriflavin Lethium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Agar) (BIOMARK, INDIA) والمجهز من شركة بطريقة التخطيط وهو من الأوساط الصباغية الانتقائية التفريقية. حضنت الأطباق بظروف هوائية و درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة، أخذ عدد من المستعمرات النقية بطريقة مستقلة بوساطة ناقل جرثومي ونشر بطريقة التخطيط على الوسط نفسه وكررت هذه العملية أكثر من مرة إمعاناً في التنقية، ولأجل التأكد من أن هذه العزلات تعود الى *L. monocytogenes* تحديداً أجريت عليها مجموعة من الفحوصات والأختبارات اشتملت على الصفات الزرعية التي تضمنت حجم ولون وشكل المستعمرة وحافاتها وارتفاعها ثم الفحوصات المجهرية للخلايا بتصبيغها بصبغة غرام, وأجريت الاختبارات الكيموحيوية حسب ما ورد في طريقة علي [12] والتي تضمنت فحص الكاتاليز Catalase test وفحص الاوكسيديز Oxidase test وفحص الحركة Motility test وفحص تحلل الدم باستعمال الوسط الزرعي Blood Agar base المعقم مسبقاً بالمؤصدة وذلك باضافة 7% دم الأغنام المعقم, وأستكملت باقي الأختبارات الكيميوحيوية بإستعمال نظام API Lesteria KIT لتاكيد نوع الجرثومة وحسب تعليمات الشركة المصنعة (BioMerieux, France) كوسيلة تتسم بسرعتها وقلة كلفتها, وهي عبارة عن شريط يحوي على 10 أخاديد صغيراً يشتمل على عشرة فحوصات كيمائية حيوية [14], وبغية تشخيص العزلات البكتيرية بشكل أدق تم الاستعانة بتقنية CLEARVIEW^{TM} وذلك طبقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Oxoid,UK) وحسب ماذكره Márcia وجماعته [15], والتي تعتمد في عملها على تفاعلات الاضداد flagella antigen في هذه البكتريا كمبدأ اساس لها, وهي عبارة عن عدة تشخيص صغيرة الحجم, ذات نافذتين مكتوب عليها ثلاثة حروف, يمثل S لوضع النموذج, وC السيطرة فيما يمثل T النموذج. علقت مستعمرة بكتيرية معزولة من وسط آكار PALCAM وتم تلقيحها في أنبوبة حاوية على 10 مللتر من الوسط الاغنائي السائل المعقم (HFB) حضنت بحرارة 30 م ولمدة 24 ساعة, ثم نقل منها 2 مللتر الى أنبوبة أخرى, وحضنت في حمام مائي Water Bath بدرجة حرارة 80 م ولمدة زمنية قصيرة 20 دقيقة, وهذه الطريقة تهدف الى قتل الجرثومة واستخلاص flagella antigen , تركت لتبرد ثم وضعت قطرة من السائل الحاوي على الـ antigen بوساطة ماصة النقل Pasteur pipette داخل عدة التشخيص CLEARVIEW^{TM} وتحديداً داخل النافذة S.

النتائج والمناقشة

الصفات المظهرية الزرعية

ظهر نمو بكتريا *L. monocytogenes* المزروعة على وسط آكار PALCAM بشكل مستعمرات خضراء- رمادية زيتية ملساء دائرية الشكل ذو مركز غائر بقطر يتراوح بين 3-1 ملمتر محاطة بهالة سوداء، وبإطالة مدة الحضن الى 5 أيام, تغير لون المستعمرات من بني غامق مائل الى الاسود واصبحت بارزة تشبه الكرة أو عين السمكة وبقطر 5-3 ملمتر وتحول لون الوسط الزرعي الى الاحمر الداكن أو الكرزي, وهذه الصفات المظهرية الزرعية لبكتريا *L. monocytogenes* من أهم ما يميزها عن باقي أجناس بكتريا اللستريا، وقد ظهرت تحت المجهر على

شكل بكتريا عصوية موجبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات، أكد هذه النتائج [12] من خلال عزله للبكتريا من المثلجات اللبنية في أسواق مدينة بغداد وكذلك [16] في نماذج المثلجات في أسواق البرازيل.

الفحوصات الكيموحيوية التقليدية

يوضح جدول (1) نتائج الفحوصات لعينات المثلجات اللبنية في إسواق مدينة بغداد، والتي اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية وجود بكتريا *L. monocytogenes* بنسبة عزل 6% في العينات (عينتان من المثلجات المحلية غير المغلفة وعينة واحدة من المثلجات المحلية المغلفة) وخلو المثلجات المستوردة من تلك البكتريا، حيث أعطت العزلات من تلك العينات نتائج موجبة لاختبار الكتاليز من خلال ظهور الفقاعات نتيجة هذا الاختبار، بينما أظهرت العزلات نتائج سالبة لاختبار الاوكسيديز، وكانت موجبة لفحص الحركة بتكوينها شكل المظلة Umbrella shape، وأعطت β-haemolysis في اختبار تحلل الدم. كانت هذه النتائج مقاربة جداً لما وجده [12] حيث قام بعزل بكتريا *L. monocytogenes* من المثلجات المحلية في مدينة بغداد بنسبة 4% بينما لم يتم عزلها من المثلجات المستوردة. لقد أشارت الكثير من الدراسات الى أهمية الفحوصات الكيموحيوية في عزل وتشخيص بكتريا اللستريا بصورة عامة وفي تشخيص بكتريا *L. monocytogenes* عن باقي أنواع اللستريا [13,2, 17].

جدول (1): نتائج الفحوصات لعينات المثلجات اللبنية في اسواق مدينة بغداد

	مثلجات مستوردة مغلفة	مثلجات محلية مغلفة	مثلجات محلية غير مغلفة	المجموع الكلي	النسبة المئوية
عدد العينات	20	20	10	50	100%
	عدد العزلات الموجبة للفحوصات				
الفحوصات الكيموحيوية التقليدية	خالية	1	2	3	6%
API Lesteria KIT	خالية	1	1	2	4%
CLEARVIEW^{TM}	خالية	1	1	2	4%

إستعمال نظام API Lesteria KIT في تشخيص بكتريا *L. monocytogenes*

تم إستعمال نظام API Lesteria KIT للتأكد من ان الجرثومة تعود للنوع *L. monocytogenes* حيث يوضح شكل (1) نتيجة فحص عينة مثلجات لبنية بإستعمال نظام API Lesteria وهو من الطرائق الحديثة للفحوصات الكيموحيوية يتسم بسرعته حيث يعطي النتائج خلال 24 ساعة ودقيق في النتائج مقارنة بالفحوصات الكيموحيوية التقليدية التي تستغرق عدة أيام 5-7 وجهد كبير واحتمال الخطأ فيها أعلى من نظام API Lesteria ، وقد بينت النتائج كما موضح في جدول (1) بانه تم عزل البكتريا باستعمال هذه التقنية بنسبة 4 % من المثلجات اللبنية (في عينة واحدة من المثلجات المحلية المغلفة وعينتين من المثلجات المحلية المكشوفة) ، وقد تقاربت هذه النتائج مع ماوجده Jeyaletchumi وجماعته [9]عند فحصهم لبعض منتجات الأغذية المتوافرة في اسواق ماليزيا ومن ضمنها المثلجات اللبنية حيث أشاروا الى عزل بكتريا *L. monocytogenes* بنسبة 5.75 % باستعمال نظام API Lesteria KIT ، وباستعمال هذه التقنية سجلت نسبة عزل البكتريا 7% في المثلجات السورية في فصل الربيع ونسبة 10.5% في الصيف وخاصة في المناطق الريفية [18], وقام Mena وجماعته [19] بعزلها من الآيس كريم المصنوع من الحليب الخام في المناطق الريفية في البرتغال بنسبة 4.5% باستعمال نفس التقنية.

شكل(1): نتيجة فحص عينة مثلجات لبنية باستخدام نظام API Lesteria

استخدام تقنية CLEARVIEW^{TM} في تشخيص بكتريا *L. monocytogenes*

بعد نقل المستخلص الحاوي على المستضد السوطي flagella antigen الى العدة التي تحتوي على الاجسام المضادة ووضعه في الشباك S فإن تكون الحزمه الزرقاء يعني النتيجة موجبة حيث تقرأ في الشباك T دلالة على وجود flagella antigen شكل (2). لقد بينت النتائج باستخدام هذه التقنية ان بكتريا *L. monocytogenes* تم عزلها من عينات المثلجات اللبنية العراقية بنسبة 4% (في عينة واحدة من المثلجات المحلية المغلفة وعينتين من المثلجات المحلية المكشوفة) ولم تعزل من المثلجات المستوردة جدول (1). لقد أشارت بعض الدراسات الى عزل البكتريا من الحليب ومنتجاته باستخدام تقنية CLEARVIEW^{TM} فقد أشار [13] الى عزلها من عينات الاجبان المستوردة المتوافرة في الاسواق المحلية بنسبة 5% في الاجبان التركية البيضاء وبنسبة 10% في الاجبان المصرية، أما في دراسة اجريت للتحري عن بكتريا *L. monocytogenes* المتواجدة في بعض الأغذية الحيوانية في الأسواق التركية منها الحليب ومنتجاته باستخدام عدة طرائق منها تقنية Clear view وتقنية PCR فقد تم عزل البكتريا بنسبة 7% بإستعمال Clearview^{TM} و 8.2% بإستعمال تقنية PCR [20]. إن سبب تواجد بكتريا *Listeria spp.* في المثلجات اللبنية يعود بالدرجة الأساس الى كون هذه الاحياء المجهرية محبة للبرودة ولها القابلية على النمو بدرجات حرارة واطئة جداً وأهم انواعها هي *L. monocytogenes* التي تشكل خطراً على الصحة العامة [21].

شكل (2): عدة فحص تقنية CLEARVIEW™

A: العدة قبل الاستعمال **B**: نتيجة سالبة **C**: نتيجة موجبة

الاستنتاج

بينت نتائج هذه الدراسة عن عزل وتشخيص بكتريا *L. monocytogenes* في المثلجات اللبنية المحلية، وقد أتسمت الطرائق الحديثة المستعملة للتحري عنها بالسرعة والدقة, مقارنة بالطرائق التقليدية.

وبناءً على حصيلة الدراسة, ولاهمية هذه البكتريا في في إحداث إصابات مختلفة من فئات عمرية متباينة ولعلاقتها المباشرة في حالات الاجهاض والولادة المبكرة عند الحوامل والتهاب السحايا عند حديثي الولادة, إتساع الرقعة الجغرافية للتحري عنها في جميع المحافظات وأطرافها, فضلاً عن تكثيف فرق الرقابة الصحية الجوالة خصوصاً اثناء موسم ازياد الطلب على المثلجات اللبنية.

المصادر

1. الطائي, ميادة أحمد إبراهيم مصطفى. (2004). بعض الجوانب الفسلجية والاملاضية لجرثومة *Listeria monocytogenes* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الموصل. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة الموصل.
2. الشمري, علي حسن أحمد, ونجم, نجم هادي. (2009). التحري عن جرثومة *Listeria monocytogenes* في الحليب الخام والمستورد في مدينة بغداد. المجلة الطبية البيطرية العراقية. 33 (2): 91- 97.
3. الرماحي, انغام جاسم محمد علي وعيسى، حقي عبد العباس و عبد العباس، ميسون خضير. (2011). اختبار فعالية *Lactobacillus acidophilus* المحلية في تثبيط نمو بكتريا *Listeria monocytogenes*. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. 3 (2): 1-7.
4. الكناني, انتصار رحيم و الجبوري, اقبال علي و شريف, عقيل محمد. (2008). دراسة مرضية تجريبية لذيفان اللستيريولايسين-O المستخلص من جرثومة الليستيريا مونوسايتوجينيز *Listeria monocytogenes* المعزولة من لحوم الدواجن. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري, 7 (1): 8-13.
5. Robinson, R.K. (2002). Handbook of Dairy Microbiology. 3rd ed., Wiley Interscience Comp., USA.
6. Hassan, L., Mohammed, Ho., McDomough, P.L. and Gonzalez, R. N. (2000). Across sectional Study on the Prevalaence of *Listeria monocytogenes* and Salmonella in New – York Dairy Herds. J. Dairy Sci. 83(11):2441-2447.
7. Marth, E.H. and Ryser, E.T. (2007). *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd edition. Boca Raton, New York.
8. Radostits, O.M., Henderson, J.A., Blood, D.C., Arundel, J.T. and Gay, C.C. (2007). Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses. 11th ed., Bailliere, Tindall Comp. UK.
9. Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, R., 1Farinazleen, M. G. and Cheah, Y. K. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. International Food Research Journal. 17: 1-11.
10. Alsheikh, A. D. I., Mohammed, G. E. and Abdalla, M.A. (2012). First Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Fresh Raw Dressed Broiler Chicken in Sudan. Research Journal of Microbiology. 7(6): 319-326.
11. Pagotto, F., Daley, E., Farber, J., and Warburton, D. (2001). Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. MFHPB-30, Health products and food branch, HPB Method, Ottawa, Canada.
12. Ali, H. A. (2010). Prevalence of *Listeria* in ice creams in Baghdad province. Iraqi J. Vet. Med. 34 (2): 39-44.
13. مطلك, خميس حبيب وجعفر, محمد موسى و فوزي, عمار وعباس, عبد الخالق. (2013). استخدام طريقة حديثة في الكشف عن بكتريا التسمم الغذائي *Listeria monocytogenes* . مجلة جامعة النهرين , 16 (4) : 43 – 46.
14. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.N., Caniaux, D., Monget, I., and Rocourt, J. (1992). API Listeria, a New and Promising One-Day System To Identify Listeria Isolates. Applied and Enviromental Microbiology. 58(6): 1857 – 1860.

15. Márcia, R. P., Sandra, D.C. M, Alastair, Sutherl, D. and Cleide, R.V. Batista. (2001). Detection of *Listeria* Species in Refrigerated Chicken Carcasses Using Clearview™ and A modified Conventional Culture Method. Braz. J. Microbiol. 32 (2). http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000200008.

16. AbrahaoI, W.M., BrahaoII, P.A., MonteiroII, C.L. and PontaroloI, R. (2008). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 44 (2) : 210-218.

17. Jalali, M. and D. Abedi. (2007). Prevalence of *Listeria* Species in Food Products in Isfahan, Iran. Int. J. Food Microbiol. 122: 336-340.

18. أبو يونس، عهد وسليق، سمير وأبو غرة، صياح. (2005). التحري عن وجود بكتريا *Listeria* في الحليب الخام وبعض منتجاته. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.21 (1): 477 – 487.

19. Mena, C.G., Almeidda, L., Carneiro, P., Teixeira, T., Hogg, P. and Gibbs, A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiol. 21: 213- 216.

20. Atil, E., Ertas, H.B. and Ozbey, G. (2011). Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples. Veterinarni Medicina. 56, (8): 386–394.

21. Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P. and Rocourt, J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in Listeria monocytogenes of human and food origin. Applied and Environmental Microbiology 68: 616–622.