مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

جداسازی و شناسایی گونه‌های سالمونلای مقاوم به آنتی بیوتیک از پنیرهای محلی کوزه و پوستی

نفیسه دعوتی[1*]، فاطمه چهری [2]

۱-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۴

کلمات کلیدی:

مقاومت آنتی‌بیوتیکی،

پنیر،

سالمونلا

DOI:10.22034/FSCT.21.152.64.

* مسئول مکاتبات:

n.davati@basu.ac.ir

چکیده

امروزه ظهور سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی رو به گسترش است که این امر درمان آنتی‌بیوتیکی مصرف کننده دچار عفونت غذایی را مشکل می‌کند. یکی از منابع غذایی که می‌تواند فرد را دچار عفونت غذایی کند محصولات لبنی تولید شده از شیر خام است و یکی از باکتری‌های مقاوم شده به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها سالمونلا می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی حضور گونه‌های سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پنیرهای کوزه و پوستی، تولید شده از شیر خام در غرب کشور است. به این منظور گونه‌های سالمونلایی محتمل در پنیر کوزه از بوکان و پنیرهای پوستی از لرستان و کرمانشاه جداسازی گردید و پس از شناسایی فنوتیپی اولیه و تست‌های بیوشیمیایی، مورد شناسایی مولکولی توسط تکثیر ژن ناحیه 16S rRNA توسط پرایمرهای U1492R و B27F گردید. سپس جدایه‌ها از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین بررسی شدند. نتایج حضور *سالمونلا اینتریکا* زیرگونه *تایفی موریوم* را در هر سه نوع پنیر در بین ۱۴ جدایه انتروکوکوسی تایید کرد. گونه‌های شناسایی شده از هر سه نوع پنیر به اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و گونه شناسایی شده از پنیر پوستی لرستان به تتراسایکیلین نیز مقاوم بودند. اما گونه‌های شناسایی شده در پنیرهای پوستی کرمانشاه و کوزه بوکان به تتراسایکیلین حساس بودند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پنیرهای محلی پوستی و کوزه در برخی مناطق غرب کشور می‌تواند حامل نژادهای سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشد و در صورت عفونت میکروبی ناشی از مصرف پنیرهای آلوده، درمان آن با آنتی‌بیوتیک ممکن است به سختی انجام شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

۱-مقدمه

سالمونلا باکتری‌های باسیلی شکل و گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که یکی از گونه‌های مهم عامل عفونت مواد غذایی از این جنس، گونه *Salmonella enterica* می‌باشد. *سالمونلا انتریکا* به ٦ زیر گونه I تا VI تقسیم می شود. سویه‌های زیر گونه I اغلب از انسان و جانوران خون گرم جدا شده اند و اکثر سویه‌های بیماری‌زای انسانی در این زیر گونه قرار دارند. *سالمونلا انتریکا* یک باکتری تاژک‌دار و بی‌هوازی اختیاری است. مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها تخمین زده است که باکتری سالمونلا سالانه منجر به تقریبا ۱.۳۵ میلیون مورد عفونت، ۲٦۵۰۰ بستری شدن در بیمارستان و ٤۲۰ مرگ در ایالات متحده می‌شود. غذا عامل انتقال اکثرا گزارشات این بیماری است [۱-۳]. از علل ابتلا به عفونت سالمونلایی می‌توان به مصرف غذا و آب آلوده، غذاهای خام یا نیم پز نظیر تخم مرغ، گوشت مرغ و غذاهای دریایی، لبنیات غیرپاستوریزه، میوه و سبزیجات آبیاری شده با آب فاضلاب، نگهداری غذا در شرایط نامناسب، آلودگی سطوح در تماس غذا طی فراوری و پخت، انتقال باکتری از طریق تماس با حیوانات، ضعف سیستم ایمنی میزبان، اختلالات معده یا روده میزبان، استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها که منجر به کاهش باکتری‌های مفید روده می‌شود، اشاره کرد [۳]. سالمونلوز در انسان معمولاً به شکل یک مسمومیت غذایی با علائم گوارشی (گاستروانتریت) ظاهر می‌شود، اما گاهی اوقات به صورت یک عفونت سیستمیک جدی که نیاز به درمان سریع آنتی بیوتیکی دارد، ظاهر می‌شود. علاوه بر این، سالمونلوز باعث تلفات قابل توجهی در دام می‌شود و یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های جدا شده از منابع غذایی دامی است و مسئول ایجاد عفونت‌های مشترک بین انسان و دام در انسان و سایر گونه‌های جانوری از جمله پرندگان است. در نتیجه کنترل سالمونلا در فرایند مواد غذایی در سراسر جهان همواره مورد توجه بوده است [۱, ۲]. سالمونلوزیس از نظر بالینی از گاستروانتریت رایج سالمونلا (اسهال و کرامپ شکمی) تا تب حصبه که نیاز به درمان سریع آنتی بیوتیکی دارد، متغیر است. میزبان در مواجهه با سالمونلا، دو دفاع غیر اختصاصی و اختصاصی فعال دارد. دفاع غیر اختصاصی شامل استفاده از اسیدیته معده، مخاط روده، تحرک روده کوچک، لاکتوفرین و لیزوزیم است. دفاع های اختصاصی شامل ترشح آنتی بادی‌های مخاطی، سیستمیک و مقاومت ژنتیکی در برابر تهاجم است. البته عوامل مختلفی بر حساسیت به تهاجم این باکتری تأثیر می‌گذارد. چنانچه سالمونلاهای بیماری‌زا که همراه غذا خورده می‌شوند با عبور از سد اسید معده زنده بمانند، خود را به مخاط روده کوچک و بزرگ رسانده و سم تولید می‌کنند. سالمونلا جهت بیماری‌زایی بایستی ویژگی‌های عفونت‌زایی شامل توانایی حمله به سلول‌های روده، آزادسازی لایه لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی خود، توانایی تکثیر درون سلولی و تولید سم را داشته باشد [٤-۱۱]. میکروفلور طبیعی روده، میزبان را تا حدی در برابر سالمونلاها محافظت می‌کند که احتمالاً از طریق تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه توسط بی‌هوازی‌های ساکن روده علیه سالمونلا است. البته بایستی در نظر داشت که تغییر فلور بی‌هوازی روده توسط مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها، میزبان را نسبت به سالمونلوز حساس‌تر می‌کند. از طرفی قابل توجه است که این باکتری از طریق تکامل مکانیسم‌های متعدد بقاء جهت سرکوب سیستم ایمنی میزبان همواره درصدد تامین حفظ و حیات خود است و امروزه باکتری‌های سالمونلا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند که این امر درمان را مشکل می‌کند و هنگامی‌که داروهای اولیه نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها جوابگوی درمان عفونت‌ها نباشند، داروهای گران‌تری بایستی مورد استفاده قرار گیرند که منجر به افزایش هزینه‌های سلامت و بار اقتصادی بیشتر بر دوش خانواده‌ها می‌شود [۱۱-٤]. از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی که گونه‌های مختلف سالمونلا به آن مقاوم شده است فلوروکینولون‌ها می‌باشند. فلوروکینولون‌ها از سال ۱۹۸۰در اروپا و سپس در سال ۱۹۹۵ در ایالات متحده برای درمان سالمونلوز در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

دامپزشکی وارد شدند. توسعه مقاومت در سالمونلا توسط جهش کروموزومی و متعاقبا با انتشار اپیدمی سویه جهش یافته گزارش شده است. در سال‌های اخیر، به دلیل ظهور سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون، آزیترومایسین به داروی جایگزین فلوروکینولون‌ها برای درمان تیفوئید تبدیل شدند. به علاوه اخیرا مقاومت چند دارویی در *سالمونلا تیفی موریوم* به کرات گزارش شده است که باعث می‌شود بیماری‌های مرتبط با سالمونلا به راحتی با آنتی بیوتیک‌های رایج قابل درمان نباشند. به عنوان مثال *سالمونلا انتریکا سرواریته تایفی‌موریوم* DT104 مقاومت چند دارویی به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، فلورفنیکول، استرپتومایسین، سولفونامیدها و تتراسایکلین نشان داده است [۱۲-۱۵]. از آنجایی‌که برخی تجویزهای آنتی‌بیوتیکی جهت درمان عفونت‌های غذایی ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده انجام می‌شود و منابع لبنی محلی بخصوص پنیر تهیه شده از شیر خام، بدون اعمال حرارت پاستوریزاسیون، یکی از حامل‌های میکروب‌های عفونی هستند، هدف از این مطالعه بررسی حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در برخی پنیرهای محلی نظیر پوستی و کوزه در غرب کشور بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه پنیرهای محلی

جهت این مطالعه پنیرهای محلی از شهرستان‌های بوکان، کرمانشاه و لرستان به طور تصادفی طبق پرتوکل استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ نمونه‌برداری گردید [۱٦] و توسط ظروف استریل تحت زنجیره سرمایی به آزمایشگاه منتقل شد. جهت تهیه پنیر کوزه طبق یک دستور محلی شهرستان بوکان، از شیر خام بدون اعمال حرارت استفاده شد و پس از طی ٤۰ روز نگهداری پنیر در آب نمک، پنیر خرد گردیده و در کوزه قرار داده شد سپس داخل ظرف گلی مرغوب به مدت ۳ ماه زیر زمین نگهداری گردید تا رسیدگی آن طی شود. جهت تهیه پنیر پوستی طبق دستور متداول در مناطق بومی و محلی لرستان و کرمانشاه، از شیر خام بدون اعمال حرارت استفاده شد که پس از افزودن مایه پنیر و بستن دلمه، آب پنیر آن توسط صافی گرفته شده سپس به قطعات مختلف برش خورده و با شیراز (دوغ حرارت دیده) و گیاه بومادران پوشش داده شد و در ظرف پوستی (شیردان بز) قرار داده شده تا در طی ۳ ماه رسیدگی آن طی شود.

۲-۲- اندازه‌گیری pH

pH نمونه‌های پنیر توسط pH متر (827 pH Lab, Metrohm, Switzerland) اندازه‌گیری شد.

۲-۳- کشت میکروبی و جداسازی سویه‌های مشکوک به سالمونلا

جهت شناسایی و شمارش سالمونلا از استاندارد ملی ایران ۱۸۱۰-۱ (٤٤۱۳ سابق) استفاده گردید [۱۷]. ابتدا ۲۵ گرم از نمونه را **به** ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط پیش غنی کننده (آب پپتون دار بافره) (مرک، آلمان) اضافه گردید و پس از مخلوط کردن در دمای ٤۵ °C به مدت ۳ دقیقه، سوسپانسیون در دمای ۳۷ °C به مدت ۱٦ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از محیط کشت سلنایت سیستئین براث (مرک، آلمان) جهت غنی‌سازی باکتری‌های گرم منفی از جمله سالمونلا استفاده گردید، بدین صورت که ۱۰ از میلی‌لیتر محیط پیش غنی کننده به ۹۰ میلی لیتر سلنایت سیستئین براث اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت داخل اینکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید. در صورت وجود کدورت و تغییر رنگ از این محیط روی سالمونلا شیگلا آگار(مرک، آلمان)، مک کانگی آگار (مرک، آلمان) و بیسموت سولفیت آگار (مرک، آلمان) کشت گردید و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند. وجود کلنی‌های قهوه‌ای یا سیاه با جلای فلزی در محیط بیسموت سولفیت آگار و کلنی‌های شفاف یا بی رنگ با یا بدون مرکز سیاه در محیط سالمونلا-شیگلا آگار و کلنی زرد رنگ در محیط مک کانگی آگار نشانه بر وجود احتمالی سالمونلا داشت. کلنی‌های مشکوک توسط محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۲٤ ساعت خالص‌سازی شدند. از تک کلنی‌های حاصل لام تهیه و مورد رنگ آمیزی گرم قرار گرفتند. سپس مورفولوژی باکتری توسط مشاهده میکروسکوپی بررسی گردید. جهت تایید ماهیت تک کلنی‌های خالص، از محیط‌های تشخیصی تریپل شوگر آیرون آگار (مرک، آلمان) و لیزین آهن دار (مرک، آلمان) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۲٤ ساعت در لوله اسلنت (حاوی محیط کشت شیب دار) استفاده شد. تغییرات رنگی ایجاد شده (قرمز در لایه‌های سطحی و زرد در لایه‌های عمقی) در محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI) و تغییر تمام لوله به رنگ ارغوانی در محیط لیزین آهن‌دار و همچنین وجود حفرات ناشی از تولید میکروبی گاز CO_2 و ذرات سیاه رنگ ناشی از تولید میکروبی H_2S در هر دو لوله نشان از وجود سالمونلا داشت.

۲-٤- تست‌های تشخیصی جهت تایید سالمونلا

از هر لوله مرحله قبل که مشکوک به سالمونلا بود کشت خطی بر محیط نوترینت آگار انجام شد و از تک کلنی حاصل جهت انجام تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید که شامل تست کاتالاز، توانایی حرکت، تولید اندول و سولفید هیدروژن توسط محیط SIM (مرک، آلمان)، سیترات تست توسط محیط سیمون سیترات آگار (مرک، آلمان)، اوره آز توسط محیط اوره براث (مرک، آلمان)، متیل رد (MR) تست و VP تست توسط محیط MRVP (مرک، آلمان) بود [۱۸-۲۰].

۲-۵- شناسایی مولکولی جدایه‌های سالمونلا

جهت استخراج DNA، ابتدا تک کلنی از هر جدایه در ۱۰۰ میکرولیتر آب استریل عاری از Dnase حل شد و ۱۰۰ میکرولیتر از الکل ایزوآمیل/کلروفرم (۲٤/۱) اضافه و ورتکس شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱٦۰۰۰g سانتریفوژ گردید. از سوپ بالایی به عنوان منبع DNA استفاده شد [۲۱]. جهت تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای زیر (بایونیر، کره) استفاده شد.

B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′), U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′)

مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها با غلظت 10picomole/µl، ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناکلون، ایران) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونایز بود. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر (پدیده نوژن، ایران) تحت شرایط زیر انجام شد:

°C ۹٤ به مدت ۵ دقیقه جهت دناتوراسیون اولیه و سپس انجام ٤۰ سیکل با شرایط ۹٤°C به مدت ۱ دقیقه، ۵٦°C به مدت ۱ دقیقه و °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه. در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه دمای °C ۷۲ جهت توسعه نهایی اعمال شد و در ٤°C سرد گردید [۲۲, ۲۳]. پس از تایید انجام واکنش PCR توسط رویت باند با عمل ژل الکتروفورسیز، نمونه‌ها جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند و جهت شناسایی گونه‌ها، نتایج توالی‌یابی در NCBI بلاست گردید.

۲-٦- بررسی مقاوت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

جدایه‌ها در محیط مولر هینتون براث MHB (مرک، آلمان) فعال‌سازی شدند. بعد از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند، جدایه‌ها در محیط MHB agar توسط سوآپ استریل به صورت سطحی کشت گردیدند. سپس دیسکی از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین بر سطح محیط‌های کشت جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتکی جدایه‌ها قرار گرفت و در دمای °C ۳۷ به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. عدم رشد و توانایی رشد جدایه‌ها اطراف دیسک‌ها به ترتیب نشان‌دهنده حساسیت و مقاومت باکتری‌ها به آن آنتی‌بیوتیک بود [۲٤, ۲۵].

۲-۷- آنالیز آماری

pH و قطر هاله اطراف کلنی جدایه‌ها ناشی از حساسیت به آنتی‌بیوتیک در ۳ تکرار اندازه‌گیری و به صورت میانگین

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

با انحراف معیار گزارش شد. مقادیر pH نمونه‌ها مورد آنالیز واریانس یکطرفه قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- pH نمونه‌های پنیر

pH نمونه‌های پنیر کوزه بوکان، پوستی کرمانشاه و پوستی لرستان در جدول ۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان‌دهنده اسیدی بودن بافت پنیر در نمونه‌های پوستی نسبت به پنیر کوزه می‌باشد. این pH پایین برای پنیر پوستی نیز در مطالعه همتیان و همکاران (۲۰۱۵) بعد از ۳ ماه رسیدگی البته حدود pH=۵.۲۲ گزارش شد [۲٦]. آن‌ها pH پایین پنیر را به تولید اسیدهای آلی ناشی از تخمیر لاکتوز و آزاد شدن گروه های امینه ناشی از تخریب پروتئین توسط میکروارگانیسم‌های شیر خام و پوست گوسفند نسبت دادند. مشاک و روشنی (۲۰۱۹) میانگین پنیرهای کوزه سقز، بانه و سنندج را pH=۵.۵۹ گزارش کردند [۲۷]. pH نمونه‌های پنیر مورد مطالعه ما کمی اسیدی‌تر از مطالعات مشابه است که می‌تواند به شرایط تولید و تخمیر شدیدتر آن نسبت داده شود.

Table 1. pH of cheese samples

Sample	pH
Koozeh cheese from Bukan	5.05±0.2[a]
Poosti cheese from Kermanshah	4.7±0.1[b]
Poosti cheese from Lorestan	4.9±0.1[c]

۳-۲- شناسایی مقدماتی فنوتیپی جدایه‌ها

مشاهدات میکروسکوپی باکتری حضور سلول‌های میله‌ای گرم منفی را تایید کرد و مشاهده ماکروسکوپی کلنی‌های باکتری در محیط کشت‌های افتراقی سالمونلا شیگلا آگار، مک کانگی آگار و بیسموت سولفیت آگار و کشت‌های تاییدی احتمال حضور سالمونلا را تایید کرد (شکل ۱). بطورکلی ١٤ جدایه از نمونه‌های پنیر جداسازی شد که ۳ جدایه، از هر پنیر یک جدایه، مشکوک به سالمونلا بود (جدول ۲).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

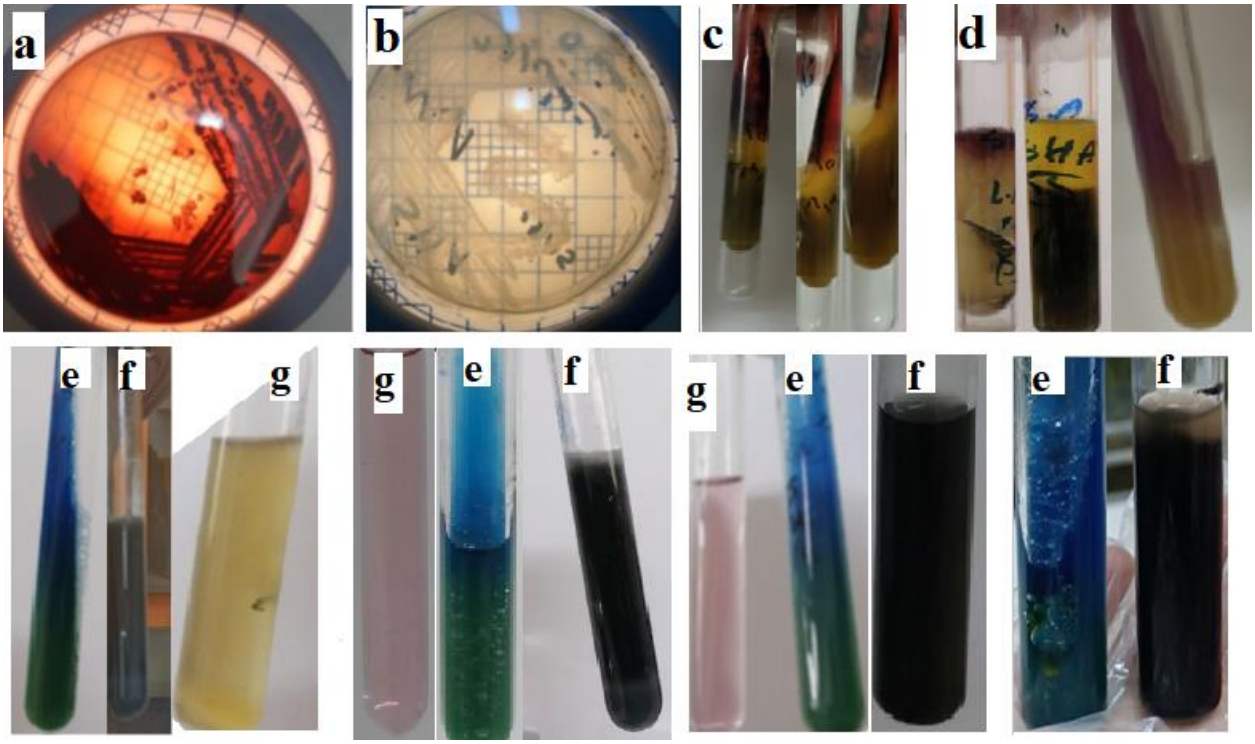

Figure 1. Growth of *Salmonella* isolates cultured on the differential mediums of Bismuth sulfite agar (**a**), Salmonella-Shigella agar (**b**) and Diagnostic tests: Triple Sugar Iron Agar (**c**), Iron Lysine agar (**d**), Simmons Citrate Agar (**e**), SIM (**f**) and Urea broth (**g**).

Table 2. Biochemical tests of microbial isolates from cheese samples

Isolate code	Sample	Citrate test	Indole	H_{2S} production (TSI, SIM)	Motility	MR	Urease	Catalase	VP	
1	**B**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*
2	**B**	+	-	+	+	+	-	+	-	Salmonella
3	**B**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*
4	**B**	-	+	-	-	+	-	+	-	Shigella
5	**B**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*
6	**B**	-	+	-	-	+	-	+	-	Shigella
7	**K**	+	-	+	+	+	-	+	-	Salmonella
8	**K**	-	+	-	-	+	-	+	-	Shigella
9	**K**	-	+	-	-	+	-	+	-	Shigella
10	**L**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*
11	**L**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*
12	**L**	-	+	-	-	+	-	+	-	Shigella
13	**L**	+	-	+	+	+	-	+	-	Salmonella
14	**L**	-	+	+	+	+	-	+	-	*E. coli*

B: Bukan, **K:** Kermanshah, **L**: Lorestan

۳-۳- شناسایی مولکولی جدایه‌ها

تشخیص مولکولی جدایه‌ها به دنبال تشخیص فنوتیپی، حضور گونه *سالمونلا اینتریکا* زیرگونه *تایفی موریوم* را در هر سه پنیر محلی تایید کرد. فجا و همکاران (۲۰۲۳) حضور گونه *سالمونلا اینتریکا* را در پنیرهای محلی عراق

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

تایید کردند [۲۸] و ال-باز و همکاران (۲۰۱۷) حضور *سالمونلا تایفی موریوم* و *سالمونلا اینترتیدیس* را در پنیر محلی گزارش کردند [۲۹]. برخلاف نتایج مطالعه جاری، مشاک و روشنی (۲۰۱۹) در بررسی آلودگی پنیر کوزه استان کردستان هیچگونه آلودگی به سالمونلا را مشاهده نکردند، اما سایر آلودگی‌های مدفوعی نظیر کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* را گزارش کردند [۲۷]. و همچنین همتیان و همکاران (۲۰۱۵) حضور کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* را در پنیر کوزه گزارش کردند [۲٦]. بقای سالمونلا بسته به نوع پنیر متفاوت است [۳۰]. آلودگی‌های مدفوعی در پنیرهای محلی نظیر پوستی و کوزه که از شیر خام تهیه می‌شوند می‌تواند به دلیل عدم سالم‌سازی حرارتی شیر خام و تماس مواد اولیه با منابع آلاینده در طی تولید نظیر دست، ظروف بخصوص پوست، افزودنی‌ها و محیط دور از انتظار نباشد. به علاوه عدم رعایت شرایط بهداشتی در طی انتقال شیر و تهیه پنیر در مناطق روستایی نیز می‌تواند عامل آن باشد [۳۱]. آلودگی پنیرهای محلی به سالمونلا به کرات گزارش شده است [۲۹, ۳۲-۳٤]. در غذاهای با رطوبت پایین نظیر پنیر، بقا سالمونلا می‌تواند حتی با تعداد کمی از سلول‌های باکتریایی به دلیل افزایش تحمل آن‌ها به فشار اسمزی تحت کشنده رخ دهد. و زمانی‌که سلول‌ها در معرض فشار اسمزی نزدیک به کشندگی قرار می‌گیرند، سازگاری سلول باعث بروز شدت بیماریزایی و بقاء سلولی با فعالیت متابولیکی پایین می‌گردد [۳۵-۳۸].

۳-٤- مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک

باکتری‌های بیماری‌زا مکانیسم‌هایی برای مواجهه با تهدیدهای محیطی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. این مکانیسم‌ها عبارتند از پمپ‌های جریان، که داروها را از سلول‌های باکتریایی به بیرون می‌رانند و با کاهش غلظت آن‌ها به سطوح غیرسمی، اثربخشی دارو از دست می‌رود، غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک توسط آنزیم‌های باکتریایی با تغییر ساختار آنتی‌بیوتیکی، تغییر مکان هدف داروها از طریق جهش خود به خودی، که معمولاً در پوشش سلولی باکتری با تغییر ساختار شیمیایی اهداف مولکولی داروها رخ می‌دهد و همچنین جلوگیری از ورود دارو از طریق اصلاح فرکانس، اندازه و گزینش‌پذیری کانالهای پورین که در پوشش باکتری یافت می‌شود. در حقیقت دیواره سلولی باکتری یک ساختار چند لایه دارای پروتئین‌های پیچیده و پمپ‌های جریان است و با جلوگیری از ورود آنتی بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات سمی به سلول باکتری، نقش عمده‌ای در مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های بیماری زا ایفا می‌کند. یکی از ویژگی‌های اصلی پمپ‌های جریان، جلوگیری از تجمع درون سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول های باکتریایی است. علاوه بر این، پمپ‌های جریان از رسیدن این مواد به مکان اثر خود در داخل سلول باکتری جلوگیری می‌کنند. البته این پمپ‌ها مکانیسم‌های دفاعی غیراختصاصی باکتری محسوب می‌شوند. در حقیقت داروها از طریق غشای خارجی از طریق کانال‌های پورین یا لیپوپلی ساکاریدی وارد سلول باکتری شده و به سیتوپلاسم می‌رسند سپس پمپ خروجی مواد شیمیایی مضر را از پری پلاسم به محیط بیرونی اخراج می‌کند. جهش‌های چندگانه ژنی در سالمونلا تا حد زیادی به مقاومت دارویی چندگانه این باکتری با فعال سازی پمپ‌های جریان کمک می‌کند. ژن‌های کدکننده متعددی مرتبط با پمپ خروجی در سالمونلا شناسایی شده است که در DNA کروموزومی یا پلاسمید شناسایی قرار گرفته‌اند [۱۵-۱۲]. نتایج (شکل ۲ و جدول ۳) نشان داد که گونه‌های سالمونلای جدا شده از پنیرهای کوزه بوکان و پوستی کرمانشاه به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین حساس هستند اما به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم هستند. هلبا و همکاران (۲۰۱۱) حضور گونه‌های سالمونلا مقاوم به تتراسایکلین و آمپی‌سیلین را در پنیرهای محلی اسلوواکی گزارش کردند [۳۹]. تسفا و همکاران (۲۰۱۳) آلودگی پنیر و سایر محصولات لبنی آدیسابابا و اتیوپی را به سالمونلاهای مقاوم به کلرامفنیکل، آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین گزارش کردند [٤۰]. همچنین الریکابی و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که گونه‌هایی از

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

سالمونلا، علاوه بر استافیلوکوکوس و *اشرشیاکلی* در نوعی پنیر سفید عراقی به نام Thi- Qar وجود دارد که مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها شامل آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و اریترومایسین هستند [٤١]. بنابراین مطالعات گذشته هم حضور گونه‌های سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را در پنیر تایید می‌کند که مشابه مطالعه ما مقاومت به آمپی‌سیلین مشاهده می‌شود. اما برخلاف گزارشات پیشین برخی جدایه‌های سالمونلا در مطالعه جاری به تتراسایکلین حساس هستند که می‌تواند به عدم سازگاری سویه‌های سالمونلای بومی این مناطق به این آنتی‌بیوتیک نسبت داد. نتایج نشان می‌دهد پنیرهای محلی پوستی و کوزه مناطق غربی بخصوص پنیر پوستی لرستان حامل نژادهای سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین هستند که علاوه بر انتقال ژنوم مقاوم به آنتی‌بیوتیک و گسترش آن در طبیعت، می‌تواند برای مصرف کنندگان آن مخاطراتی داشته باشد که می‌توان به عدم پاسخ مناسب به تجویز پزشکی این آنتی‌بیوتیک‌ها به هنگام درمان عفونت سالمونلایی محتمل برای مصرف کننده اشاره کرد. بطور مشابه در یک مطالعه، دعوتی (۲۰۲۲) حضور ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را در فلور میکروبی انتروکوکوسی یک پنیر محلی در ایران گزارش کرده بود [۲۵].

Table 3. Antibiotic sensitivity test of *Salmonella* spp.

Sample	Zone Diameter (mm)			
	Tetracycline	Penicillin	Oxacillin	**Ampicillin**
Koozeh cheese from Bukan	7±0.1	-	-	-
Poosti cheese from Kermanshah	5±0.3	-	-	-
Poosti cheese from Lorestan	-	-	-	-

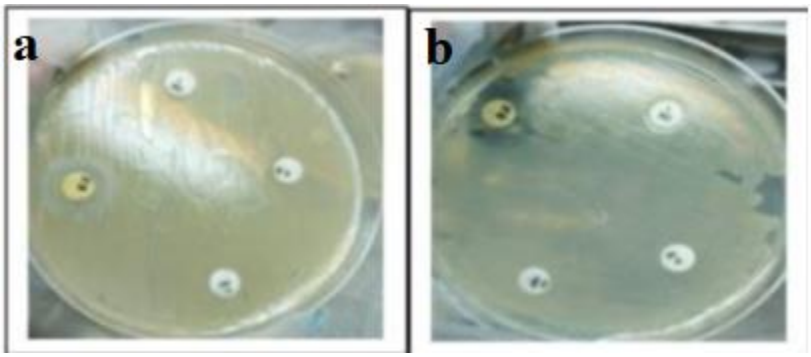

Figure 2. Antibiotic sensitivity test of *salmonella spp.*

a: Poosti cheese from Kermanshah; b: Koozeh cheese from Bukan

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

٤- نتیجه‌گیری کلی

مقاومت آنتی بیوتیکی در سالمونلا در حال افزایش است که می تواند گزینه های درمانی را برای افراد مبتلا به عفونت های شدید به این باکتری محدود کند. مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به افزایش هزینه های سلامت، طولانی شدن مدت بستری بیماران در مراکز درمانی و افزایش مرگ و میر می‌شود. به طور کلی مقاومت ضد میکروبی زمانی اتفاق می‌افتد که میکروب‌ها توانایی شکست دادن داروهای طراحی شده برای کشتن آن‌ها را پیدا کنند و میکروب‌ها از بین نرفته و به رشد خود ادامه می‌دهند. از آنجایی‌که برخی تجویزهای آنتی‌بیوتیکی جهت درمان عفونت‌های غذایی ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده انجام می‌شود و منابع لبنی محلی بخصوص پنیر تهیه شده از شیر خام، بدون اعمال حرارت پاستوریزاسیون، یکی از حامل‌های میکروب‌های عفونی هستند، هدف از این مطالعه تایید حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در برخی پنیرهای محلی در غرب کشور بود. نتایج این مطالعه نشان داد پنیرهای پوستی و کوزه تولید شده در برخی مناطق لرستان، کرمانشاه و بوکان می‌توانند حامل نژادهای سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها بخصوص اگزاکسیلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین باشند. بنابراین به دلیل عدم پاستوریزاسیون شیر و تولید پنیر در شرایط گاها غیربهداشتی، ممکن است این پنیرها منبعی از نژادهای سالمونلا مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشند که در صورت عفونت محتمل مصرف کننده امکان درمان آنتی‌بیوتیکی را سخت می‌کند.

۷-منابع

[1] Brenner, F., et al., *Salmonella nomenclature.* Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(7): p. 2465-2467.

[2] Gillespie, S.H. and P.M. Hawkey, *Principles and practice of clinical bacteriology*. 2006: John Wiley & Sons.

[3] Mishu, B., et al., *Outbreaks of Salmonella enteritidis infections in the United States, 1985-1991.* Journal of Infectious Diseases, 1994. **169**(3): p. 547-552.

[4] Stephen, J., et al. *Salmonellosis: in retrospect and prospect*. in *Ciba Foundation Symposium 112-Microbial Toxins and Diarrhoeal Disease*. 1985. Wiley Online Library.

[5] Chopra, A.K., et al., *Molecular characterization of an enterotoxin from Salmonella typhimurium.* Microbial pathogenesis, 1994. **16**(2): p. 85-98.

[6] Finlay, B.B., F. Heffron, and S. Falkow, *Epithelial cell surfaces induce Salmonella proteins required for bacterial adherence and invasion.* Science, 1989. **243**(4893): p. 940-943.

[7] Finlay, B., et al., *Salmonella interactions with the epithelial cell: A model to study the biology of intracellular parasitism.* ASM American Society for Microbiology News, 1992. **58**(9): p. 486-489.

[8] Giannella, R.A., *Importance of the intestinal inflammatory reaction in Salmonella-mediated intestinal secretion.* Infection and immunity, 1979. **23**(1): p. 140-145.

[9] Giannella, R.A., S.A. BROITMAN ,and N. ZAMCHECK, *Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections: a perspective.* Annals of internal medicine, 1973. **78**(2): p. 271-276.

[10] Giannella, R., et al., *Pathogenesis of salmonellosis studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum.* The Journal of clinical investigation, 1973. **52**(2): p. 441-453.

[11] Giannella, R., et al., *Pathogenesis of Salmonella-mediated intestinal fluid secretion: activation of adenylate cyclase and inhibition by indomethacin.* Gastroenterology, 1975. **69**(6): p. 1238-1245.

[12] Li, L., et al., *RNA-seq-based analysis of drug-resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium selected in vivo and in vitro.* PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0175234.

[13] Wu, S., et al., *Combined metabolomics and transcriptomics analysis reveals the mechanism of antibiotic resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium after acidic stress.* Food Microbiology, 2023. **115**: p. 104328.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

[14] Zhai, Y.-J., et al., *Analysis of Regulatory Mechanism of AcrB and CpxR on Colistin Susceptibility Based on Transcriptome and Metabolome of Salmonella Typhimurium.* Microbiology Spectrum, 2023: p. e00530-23.

[15] Shariati, A., et al., *The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. Front Public Health. 2022; 10: 1025633*.

[16] ISIRI, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*. 2016, Iranian National Standardization Organization.

[17] ISIRI, *Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella-Part 1:Detection of Salmonella spp.* 2019, Iranian National Standardization Organization.

[18] Rahman, M.A., et al ,.*Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of Salmonella spp. from locally isolated egg samples.* Am. J. Pure Appl. Sci, 2019. **1**(1): p. 1-11.

[19] Cappuccino, J.G. and N. Sherman, *Microbiology: A Laboratory Manual*. 1992: Benjamin/Cummings Publishing Company.

[20] Saima, A.S., et al., *27. Isolation & identification of Shigella species from food and water samples of Quetta, Pakistan.* Pure and Applied Biology (PAB), 2018. **7**(1): p. 227-235.

[21] Ruiz-Barba, J.L., A. Maldonado-Barragán, and R. Jiménez Díaz, *Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications.* 2005.

[22] Davati, N., et al., *Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties.* Jundishapur journal of microbiology, 2015. **8**.(٥)

[23] Bulut, Ç., *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese*. 2003: Izmir Institute of Technology (Turkey).

[24] Mousavi, S. and T. Kafili, *Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Raw Milk Taleshi Cheese.* Journal of Innovation in Food Science and Technology, 2020. **11**(4): p. 103-114.

[25] Davati, N., *Evaluation of antimicrobial and antibiotic resistance properties of microbial community in a traditional cheese.* Food Processing and Preservation Journal, 2022. **14** (2): p. 131-146.

[26] Hemmatian, M., M. Aminifar, and F. Attar, *Characterization of Poosti cheese, a traditional raw sheep cheese during ripening: physicochemical, microbial and micro-structural aspects.* 2015.

[27] Mashak, Z. and J. Rooshani, *The survey of chemical and microbial characteristics of traditional Koozeh-Cheese (Koopeh) in Kurdistan province.* New Findings in Veterinary Microbiology, 2019. **2**(1): p. 67-80.

[28] Faja, O.M., et al., *Molecular genotyping of Salmonella spp. isolated from cheese samples of local stores in Al-Diwaniyah city, Iraq.* Open Veterinary Journal, 2023. **13**(10): p. 1277–1282-1277–1282.

[29] El-Baz, A.H., et al., *Prevalence and molecular characterization of Salmonella serovars in milk and cheese in Mansoura city, Egypt.* Journal of Advanced Veterinary & Animal Research, 2017. **4**.(١)

[30] El-Gazzar, F.E. and E.H. Marth, *Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review.* Journal of dairy science, 1992. **75**(9): p. 2327-2343.

[31] Karshima, N., et al., *Isolation of Salmonella species from milk and locally processed milk products traded for human consumption and associated risk factors in Kanam, Plateau State, Nigeria.* Journal of Animal Production Advances, 2013. **3**(3): p. 69-74.

[32] Falegan, C. and G. Akere, *Isolation of salmonella spp in 'wara'(local cheese) from three different locations in ado-ekiti, ekiti state, Nigeria.* The experiment, 2014. **23**(4): p. 1628-1634.

[33] Pastore, R., et al., *Outbreak of Salmonella serovar Stanley infections in Switzerland linked to locally produced soft cheese, September 2006–February 2007.* Eurosurveillance, 2008. **13**(37): p. 18979.

[34] Nazal, K.K., *SALMONELLA SEROTYPES ISOLATED AND IDENTIFIED FROM LOCALLY WHITE SOFT CHEESE.* Basrah

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

Journal of Veterinary Research, 2013. **12**.(۲)

[35] Mattick, K., et al., *Survival and filamentation of Salmonella enterica serovar Enteritidis PT4 and Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 at low water activity.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66** :(٤) p. 1274-1279.

[36] Kurtz, J.R., J.A. Goggins, and J.B. McLachlan, *Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system.* Immunology letters, 2017. **190**: p. 42-50.

[37] Wesche, A.M., et al., *Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens.* Journal of food protection, 2009. **72**(5): p. 1121-1138.

[38] Davati, N., et al., *Gene Networks Analysis of Salmonella Typhimurium Reveals New Insights on Key Genes Involved in Response to Low Water Activity.* Iranian Journal of Biotechnology, 2023. **21**(4): p. 71-82.

[39] Hleba, L., et al., *Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae genera and Salmonella spp., Salmonella enterica ser. typhimurium and enteritidis isolated from milk, cheese and other dairy products from conventional farm in Slovakia.* Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, 2011. **1**(1): p. 1-20.

[40] Tesfaw, L., et al., *Prevalence and antimicrobial resistance profile of Salmonella isolates from dairy products in Addis Ababa, Ethiopia.* African Journal of Microbiology Research, 2013. **7**(43): p. 5046-5050.

[41] ALRIKABY, A.O.H.N.A., N.A.B. AL ASADI, and K.A. HUSSIEN, *Occurrence and Antibiotic Resistance of Salmonella spp. Escherichia coli and Staphylococcus aureus Isolated from soft white cheese from Thi Qar, Iraq.* International Journal of Pharmaceutical Research, 2018. **10**.(٤)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Isolation and identification of antibiotic-resistant Salmonella spp. from local Koozeh and Poosti cheeses

Nafiseh Davati [1*], Fatemeh Chehri[2]

1-Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, 65178-38695, Iran.

2 -MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, 65178-38695, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2023/12/21
Accepted:2024/4/23

Keywords:

Antibiotic-resistant,

Cheese,

Salmonella

DOI: **10.22034/FSCT.21.152.64.**

*Corresponding Author E-Mail:
n.davati@basu.ac.ir

ABSTRACT

Nowadays, the occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains in food is increasing, which makes the antibiotic treatment of infected food more difficult. One of the food sources that can cause foodborne infections is dairy products made from raw milk and one of the bacteria resistant to various antibiotics is Salmonella. The aim of this study was to investigate the presence of antibiotic-resistant Salmonella species in Poosti and Koozeh cheeses produced from raw milk in western Iran. For this purpose, the probable Salmonella species were isolated in Koozeh cheese from Bukan and Poosti cheese from Lorestan and Kermanshah. After initial phenotypic identification and biochemical testing, molecular identification was performed by amplification of the 16S rRNA gene with primers U1492R and B27F. The isolates were tested for resistance to tetracycline, oxacillin, penicillin and ampicillin. The results confirmed the presence of *Salmonella enterica subspecies Typhimurium* in all three cheeses among 14 Enterococcus isolates. The species in all three cheeses were resistant to oxacillin, penicillin and ampicillin and the identified species in Lorestan Poosti cheese was resistant to tetracycline. But the identified species in Kermanshah Poosti cheese and Bukan Koozeh cheese were sensitive to tetracycline. The results of this study indicate that local Poosti and Koozeh cheeses in some western parts of the country may be carriers of antibiotic-resistant Salmonella strains and that in case of microbial infection caused by contaminated cheese, treatment with antibiotics may be difficult.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-14]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.152.64]