مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۱ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۶، ۶۵۹-۶۵۰

مقاله پژوهشی

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و عوامل میکروبی جدا شده از نمونه های شیر خام گرفته شده از موارد حاد و تحت حاد ورم پستان در دام ها

مجید صادق پور[۱]، دکتر احسان استبرقی[۲]، دکتر علیرضا مختاری[۳]، سپیده ریحانی[۴]

دریافت مقاله : تیر ۱۳۹۶
پذیرش مقاله : آذر ۱۳۹۶

*نویسنده مسئول :
دکتر احسان استبرقی؛
دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهربابک

Email :
stabraghi_dvm_phd@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: شیر به عنوان محیط کشتی مناسب برای بیشتر میکروارگانیسم ها است. آلودگی در زنجیره ی تولید شیرخام و عمل آوری آن نتیجه ی شرایط بهداشتی نامناسب، حمل و نقل طولانی مدت و نبود امکانات برای ذخیره سازی شیر اتفاق می افتد. هدف تحقیق، شناسایی و اثرات میکروارگانیسم های شایع عفونت های ورم پستانی و نقش آنها در انتقال بیماری ها به همراه شیر به عنوان عامل اصلی در مخازن نگهداری و سرانجام انتقال این پاتوژن های عفونی به انسان، می پردازد.

روش بررسی: در مجموع ۴۵۰ نمونه شیر خام از دامداری های سنتی و صنعتی اطراف شهر تهران جمع آوری شد. به منظور تعیین هویت باکتری های رشد کرده، انتقال آن ها به محیط کشت افتراقی باتوجه به روش های استاندارد میکروب شناسی و بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی(دیسک دیفیوژن) صورت گرفت.

یافته ها: نتایج آزمایش های بیوشیمیایی تعداد ۲۲۵ جدایه حاصل از کشت جهت جداسازی و تشخیص باکتری های موجود در شیر خام و بررسی تست حساسیت آنتی بیوتیکی و انجام آنتی بیوگرام مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI ۲۰۱۰ صورت گرفت. آنتی بیوتیک های تایلوزین و استرپتومایسین با داشتن بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب: ۲۲۱(۹۸/۲٪) و ۲۱۷(۹۶/۵٪) مورد و در مقابل بیشترین حساسیت نسبت به تترادلتا و سیپروفلوکساسین به ترتیب مقاومت: ۰(۱۰۰٪) و ۱۵(۶/۷٪) مورد باکتریایی مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به وضعیت موجود و نتایج به دست آمده میزان آلودگی شیرهای حاصل از دامداری های سنتی و صنعتی بسیار بالاست. درمان های منظم ورم پستان و عفونت های حاصل توسط متخصصان امر صورت می گیرد ولی آلودگی های ناشی از دوشیدن و جمع آوری، زیادتر از مقادیر طبیعی می باشد. استفاده ی مکرر از آنتی بیوتیک ها و ایجاد مقاومت ناشی از آن مشکل بسیار مهم و قابل تاملی را در این زمینه فراهم کرده است.

واژه های کلیدی: شیر خام، دیسک دیفیوژن، ورم پستان، تست حساسیت آنتی بیوتیکی

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[۲] دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهربابک، شهربابک، ایران

[۳] دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه دامپزشکی پاسارگاد، کرج، ایران

[۴] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

مقدمه

شیر منبعی غنی از پروتئین، قند، املاح و ویتامین هاست و می تواند به عنوان عامل مهمی در ایجاد مسمومیت غذایی و ناراحتیهای گوارشی محسوب شود. بسیاری از بیماری های واگیردار از جمله: سل، تب مالت، تیفوئید، عفونت های استرپتو کوکی و ... از طریق شیر منتقل می شوند. درحالت معمول نباید انتظار داشت که جمعیت مشخصی از میکروارگانیسم ها در شیر وجود داشته و یا شیر دارای فلور طبیعی باشد چرا که در شرایط ایده آل شیر باید استریل باشد. شیر به عنوان غذای سنتی با هضم بسیار آسان بوده که از لحاظ ارزش غذایی نسبتا کامل است. از طرف دیگر شیر با توجه به مغذی بودن، محیط بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر انواع میکروارگانیسم ها بوده و بنابراین کنترل و نظارت بر موازین بهداشتی شیر بسیار ضروری است. شدت آلودگی و فساد میکروبی در شیر خام بستگی به چگونگی رعایت بهداشت در مسیر تهیه و جمع آوری ونیز حمل و نگهداری آن دارد(۲و۱).

مصرف سرانه ی شیر در ایران در طی سالهای اخیر رو به افزایش است به طوری که در سال ۱۳۴۵ میزان سرانه ی مصرف شیر از ۸/۵ کیلولیتر در سال به مقدار ۷۳/۵ کیلولیتر شیر در سال ۱۳۷۵ رسیده است. از جمله باکتری های مولد فساد میکروبی می توان به آلکالی ژنز، باسیل های گرم مثبت اسپوردار، برخی کلستریدیوم ها و پاستورلاها اشاره نمود. علاوه بر بیماریهای گوارشی معمول سبب مسمومیت در انسان نیز می شوند که برای مقابله از روش های حرارتی به خصوص پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون شیر استفاده می گردد(۳).

شیر می تواند به عنوان یک محیط کشت مغذی برای بیشتر میکروارگانیسم ها در نظر گرفته شود. فساد و آلودگی در زنجیره ی تولید شیر خام و عمل آوری آن در نتیجه ی شرایط بهداشتی نامناسب، حمل و نقل طولانی مدت و نبود امکانات مناسب برای ذخیره سازی شیر اتفاق می افتد. لاکتوباسیلوس، استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس و میکروکوکوس فلور باکتریایی متداول در شیر تازه هستند. گونه های سودوموناس در آن بسیار دیده می شوند ولی باکتری سودوموناس فلورسنس فراوانتر است. آلودگی شیر به باکتری های گرمادوست بسیار نامطلوب بوده و تعداد زیادی از باسیل های گرمادوست قادر به تولید آنزیم های پروتئاز هستند. این پروتئازها باعث هیدرولیز میسل های کازئین و بتالاکتوگلوبولین به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه می شوند و این ترکیبات در طول مدت پاستوریزاسیون شیر لخته شده و باعث نامناسب شدن شرایط بهداشتی می گردد(۵و۴).

باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را به طور وسیعی دارند که در خانواده انتروباکتریاسه، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس یوبریس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، پاستورولا همولیتیکا و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است. از آنجایی که عوامل مهم عفونت های ورم پستانی در انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی بسیار مهم هستند، با نمونه گیری از شیر گاوهای مبتلا به ماستیتیس باکتری های متعددی جدا سازی شده و میزان مقاومت و حساسیت به انتی بیوتیک های مختلف در این سویه ها بررسی شد. از جمله باکتری های مهم آلوده کننده ی شیر می توان به استافیلوکوکوس اورئوس اشاره نمود که با تولید انتروتوکسین های مقاوم در برابر فرایند پاستوریزاسیون به عنوان عامل اصلی ابتلا و درگیری گاستروانتریت معرفی گردد. حضور کلی فرم های مدفوعی مانند: اشریشیاکلی، پروتئوس، کلبسیلا و غیره دلالت بر آلودگی شیر با مدفوع دارد. بیماری های اسهالی اغلب توسط پاتوتیپ های مختلف اشریشیاکلی ایجاد می گردد. حضور این باکتری در شیر پاستوریزه نشان دهنده ی عدم سلامت و عدم رعایت بهداشت بوده و برای مصرف کنندگان قابل استفاده نمی باشد(۶).

در اصطلاح ورم پستان، عفونت پستان یا ماستیت(mastitis) التهاب و تورم پستان در اثر عفونت حاد، تحت حاد یا مزمن می باشد. واژه ورم پستان به التهاب غده ی پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق می‌شود. در دام‌ها ورم پستان بوسیله تغییرات فیزیکی یا شیمیایی و یا معمولاً میکروبی شیر و همچنین تغییرات حاصل از بیماری در بافت غده ی پستانی دیده می‌شود. شیوع بیماری ورم پستان در اغلب کشورها حدود ۴۰ در صد ولی در بعضی از کشورها آن را تا ۲۵ درصد کاهش داده اند.

با در نظر گرفتن شرایط جغرافیایی منطقه، پراکندگی و گسترش دامداریها و گاوداری های حاشیه شهر تهران و به دنبال افزایش تولید شیر خام، مکانیزه نبودن برخی از گاوداریهای سنتی و ناآگاهی بیشتر کارگران گاوداری ها از نکات لازم شیردوشی و حمل شیر و بررسی آلودگی شیرخام از نظر میکروب های شاخص اهمیت بسزایی دارد. هدف از این پژوهش آن است که میکروارگانیسم های معمول و شایعی که عامل اصلی در عفونت های ورم پستانی بوده و نقش آنها در انتقال بیماریها به همراه جمع آوری شیر و انتقال به مخازن نگهداری، در

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

نهایت سرایت و انتقال پاتوژنهای عفونی به انسان می پردازد.

روش بررسی

نمونه گیری و کشت اولیه: در این پژوهش که به صورت توصیفی– مقطعی از خردادماه تا دی ماه سال ۹۴ صورت گرفت، در مجموع از ۴۵۰ نمونه مختلف شیر خام از دامداری های سنتی و صنعتی اطراف شهر تهران جمع آوری شده و تعداد ۲۲۵ جدایه حاصل از کشت به دست آمد. جهت تهیه نمونه ها از ماشین های شیردوشی، دوشیدن سنتی شیر از دام، از ماشین های حمل شیر در شرایط کاملا استریل و ظروف استریل جمع آوری نمونه استفاده شد. برای جداسازی محیط های کشت مختلفی نظیر: بلاد اگار– مولر هینتون اگار– مک کانکی اگار– مانیتول سالت آگار– TKT اگار یا محیط جدایه سازی استرپتوکوک آگالاکتیه(Streptococcus agalactiae selective agar) – EMB آگار– ستریمید آگار (Pseudomonas selective agar) Cetrimide Agar – سیمون سیترات آگار – TSI –SIM و سایر تست های افتراقی مانند(تست اندول – تست متیل رد – تست حرکت و H_2S) که از شرکت(Merck–Germany) تهیه شده بود استفاده گردید(۷).

نمونه های انتقال داده شده به آزمایشگاه در زیر هود و کنار شعله با رعایت اصول استریل بودن، در محیط کشت باکتریایی(مرک آلمان) کشت داده شد. پس از کشت مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شدند. به منظور تعیین هویت باکتری های رشد کرده، انتقال آن ها به محیط کشت افتراقی با توجه به روش های استاندارد میکروب شناسی صورت گرفت. از موارد تکنیک های شناسایی رنگ آمیزی گرم جهت بررسی استفاده شد. جهت تشخیص و افتراق بین باکتری های موجود از خصوصیات بیوشیمیایی و مشاهده ی رنگ و ظاهر کلنی های حاصل برای تایید نهایی استفاده گردید(جدول ۱).

نمونه های شیر خام به دو صورت بررسی شدند که در ابتدا با کشت مستقیم از نمونه ی باکتری جداسازی و مشاهده نشد ولی پس از سانتریفیوژ کردن آنها و کشت از رسوب شیر رشد قابل ملاحظه ی باکتری مشاهده گردید. شیر خام نمونه برداری شده واجد باکتری به میکروتیوب های ۲ میلی لیتری منتقل شد و با سانتریفیوژ(۹۰۰۰–۶۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۵–۱۰ دقیقه قرار داده تا رسوب باکتری از مایع رویی در شیرخام جدا گردید و برای انجام کشت و سایر موارد تشخیصی استفاده شود. از نمونه شیر خام مورد نظر به طور جداگانه با سرسمپلر استریل به میزان ۱۵–۱۰ میکرولیتر به داخل پلیت منتقل شد. سپس با لوپ میکروبی بر روی پلیت ها به صورت کشت خطی(Streak Plate Method) کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴–۱۸ ساعت قرار گرفت(۷). پس از اتمام دوره گرمخانه گذاری از کلنی ها لام میکروبی تهیه و پس از رنگ آمیزی گرم(Gram stain) شکل و نوع باکتری ها معین گردید. در زمان کشت باید کنار شعله و در محیط کاملا استریل فعالیت نمود و دقت شود تا آلودگی ثانویه وارد نمونه ها نشود.

تعیین میزان حساسیت با دیسک های آنتی بیوتیک تجاری: تست انتشار دیسک(دیسک دیفیوژن) متداول ترین تست مورد استفاده جهت بررسی مقاومت آنتی بیوتیک ها بر روی آگار می باشد که در سال ۱۹۶۶ توسط Bouer و همکاران معرفی شد. استفاده از آنتی بیوتیکها جهت درمان دامهای مبتلا به ورم پستان بسیار معمول است. این ترکیبات آنتی بیوتیکی در اشکال پماد پستانی به همراه سایر داروها به کار می روند. وجود تنوع و گستردگی عوامل ضد باکتریایی سبب شد تا اکثریت موارد کاربردی در زمینه ی کنترل عفونت را جمع آوری نموده و از دیسک های آنتی بیوتیکی زیر که از شرکت تجاری پادتن طب و های مدیای هند جهت بررسی در این مطالعه تهیه گردد. این دیسک ها شامل: انروفلوکساسین(۱۰µg) – سولتریم(۲۵µg)، لینکواسپکتین(۲µg)، آموکسی سیلین(۱۰µg)، تایلوزین(۱۵µg)، لینکومایسین(۱۵µg)، جنتامایسین(۵µg)، پنی سیلین(۱۰µg)، ترادلتا(۱۰µg تهیه شده به صورت آزمایشگاهی)، استرپتومایسین(۱۰µg)، سفتی فور(اکسنل)(۱۰µg)، تراسایکلین(۳۰µg)، آمپی سیلین(۲۵µg)، سیپروفلوکساسین(۵µg) است که با استفاده از آنها تست آنتی بیوگرام انجام شد. از استاندارد نیم مک فارلند برای مطابقت قرار دادن سوسپانسیون های میکروبی استفاده شد تا سوسپانسیون ضدمیکروبی با تراکم مناسب تهیه گردد. از کلنی باکتری تازه کشت شده(۱۶ تا ۲۴ ساعته) برداشت کرده و در سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. پس از تهیه محلول هموژن، با سواب استریل آن را به محیط کشت مولرهینتون آگار انتقال داده و به طور کامل به وسیله سواب روی محیط فوق یکنواخت کشت گردید. بعد از کشت، دیسک های آنتی بیوتیکی بالا را در فواصل معین روی محیط مولرهینتون آگار قرار دادند(در هر پلیت ۷ دیسک و برای هر میکروب از ۲ پلیت استفاده شد). پلیت ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و بعد از ۲۴–۱۸ ساعت زیر نور چراغ بررسی نموده تا قطر هاله ی عدم رشد را بتوان با خط کش اندازه گیری نمود. با توجه

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

به جدول همراه دیسک ها، گزارش تست آنتی بیوگرام برای هریک از آنتی بیوتیک ها به صورت حساس، مقاوم و یا نیمه حساس بیان شد. قبل از استفاده دیسک های آنتی-بیوتیکی خریداری شده باید از کیفیت آن ها اطمینان حاصل شود که توسط سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ ارزیابی و تایید گردید(۷).

خالص سازی و شناسایی باکتری های شیر با تست های بیوشیمیایی: با توجه به جدول ۱ و به کار بردن تست های مختلف و متعدد مطابق با استانداردهای CLSI ۲۰۱۰ به شناسایی و جداسازی باکتری های موجود در شیر اقدام گردید(۸).

یافته ها

نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت جداسازی و تشخیص باکتری ها در شیرخام انجام شد که در ادامه قابل مشاهده است.

جدول ۱: تعیین روایی محتوایی با استفاده از تکنیک دلفی کمی به تفکیک سؤالات ابزار اولیه

ردیف	باکتری	نوع باکتری	تست کاتالاز	تست کواگولاز	تست DNase	رشد در مانیتول سالت آگار
۱	**استافیلوکوکوس اورئوس**	گرم مثبت	+	+	+	+
		نوع باکتری	تست کاتالاز	تست اکسیداز	تست اسکوالین	تست CAMP	رشد در مک کانکی
۲	**استرپتوکوکوس یوبریس**	گرم مثبت	–	–	+	–	–
		نوع باکتری	تست کاتالاز	تست اکسیداز	تست CAMP	همولیز	رشد در مک کانکی
۳	**استرپتوکوکوس آگالاکتیه**	گرم مثبت	–	–	+	+	–
		نوع باکتری	تست کاتالاز	تست اکسیداز	همولیز	سیترات	رشد در مک کانکی
٤	**کلبسیلا پنومونیه**	گرم منفی	+	–	–	+	+
		نوع باکتری	اندول	تست متیل رد	تست ONPG	تست لاکتوز	تست مالتوز	تست سوربیتول
۵	**اشریشیا کلی**	گرم منفی	+	+	+	+	+	+
		نوع باکتری	تست متیل رد	تست اوره آز	تست لاکتوز	تست سیترات	رشد در مک کانکی
٦	**پروتئوس میرابیلیس**	گرم منفی	+	+	–	–	+
		نوع باکتری	تست کاتالاز	تست اکسیداز	هیدرولیز ژلاتین	رشد در مک کانکی و بلاد آگار
۷	**سودوموناس آئروژینوزا**	گرم منفی	+	+	+	+
		نوع باکتری	تست کاتالاز	تست اکسیداز	تست اندول	گلوکز	رشد در مک کانکی
۸	**پاستورلا همولیتیکا**	گرم منفی	+	+	+	+	–
	نام قارچ	نوع گرم	جرم تیوب	رشد در ۳۷و۴۲و۴۵	تست اوره	تست نیترات	رشد در EMB آگار
۹	**کاندیدا آلبیکنس**	گرم مثبت کاذب	+	+	–	–	+

نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت جداسازی و تشخیص باکتری ها در شیرخام انجام شد و در جدول ۱ قابل مشاهده است.

بررسی تست حساسیت آنتی بیوتیکی و انجام آنتی بیوگرام مطابق با دستورالعمل استاندارد CLSI ۲۰۱۰ صورت گرفت(۸).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

جدول ۲: آنالیز نتایج آنتی بیوگرام شیر خام در ۲۲۵ جدایه

ردیف	نوع آنتی بیوتیک ها	غلظت دیسک ها	مقاوم (۱)	نیمه حساس (۲)	حساس (۳)	جمع کل
۱	انروفلوکساسین	۱۰µg	۱۵ (٪۶/۷)	۹ (٪۴)	۲۰۱ (٪۸۹/۳)	۲۲۵
۲	سولتریم	۲۵µg	۲۰۶ (٪۹۱/۶)	۹ (٪۴)	۱۰ (٪۴/۴)	۲۲۵
۳	لینکواسپکتین	۲µg	۲۰۱ (٪۸۹/۳)	۲۱ (٪۹/۴)	۳ (٪۱/۳)	۲۲۵
٤	تایلوزین	۱۵µg	۲۲۱ (٪۹۸/۲)	۲ (٪۰/۹)	۲ (٪۰/۹)	۲۲۵
۵	لینکومایسین	۱۵µg	۱۹۵ (٪۸۶/۷)	۱۸ (٪۸)	۱۲ (٪۵/۳)	۲۲۵
٦	جنتامایسین	۵µg	۱۵۲ (٪۶۷/۶)	۳۹ (٪۱۷/۳)	۳۴ (٪۱۵/۱)	۲۲۵
۷	پنی سیلین	۱۰µg	۲۱۵ (٪۹۵/۵)	۴ (٪۱/۸)	۶ (٪۲/۷)	۲۲۵
۸	تترادلتا	۱۰µg	–	۴ (٪۱/۸)	۲۲۱ (٪۹۸/۲)	۲۲۵
۹	استرپتومایسین	۱۰µg	۲۱۷ (٪۹۶/۵)	۸ (٪۳/۵)	–	۲۲۵
۱۰	اکسنل	۱۰µg	۷ (٪۳/۱)	–	۲۱۸ (٪۹۶/۹)	۲۲۵
۱۱	تتراسایکلین	۳۰µg	۲۰۹ (٪۹۲/۸)	۱۶ (٪۷/۲)	–	۲۲۵
۱۲	آمپی سیلین	۲۵µg	۱۰۲ (٪۴۵/۳)	۲۰ (٪۹)	۱۰۳ (٪۴۵/۷)	۲۲۵
۱۳	سیپروفلوکساسین	۵µg	۱۵ (٪۶/۷)	۲ (٪۰/۹)	۲۰۸ (٪۹۲/۴)	۲۲۵
١٤	آموکسی سیلین	۱۰µg	۱۷۴ (٪۷۷/۳)	۳۰ (٪۱۳/۳)	۲۱ (٪۹/۴)	۲۲۵

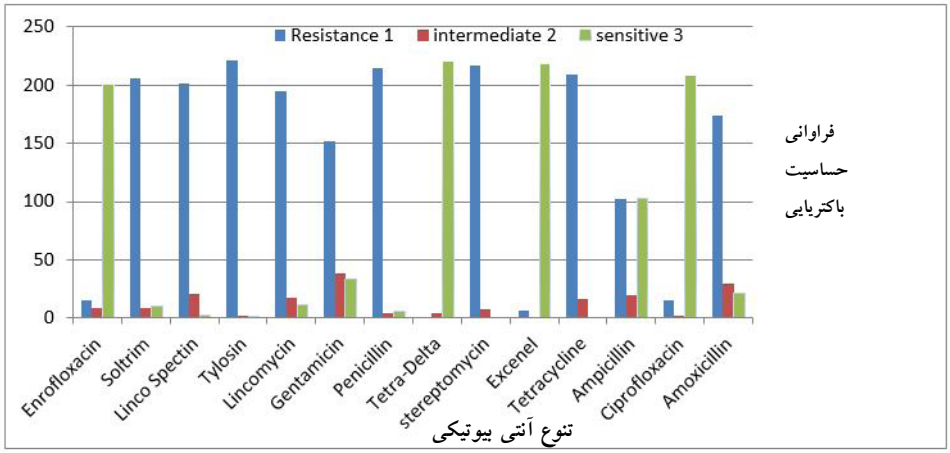
در جدول ۲ فراوانی و درصد حساسیت باکتری های موجود نسبت به آنتی بیوتیک مصرفی نشان داده شده است.

جدول ۳: تعداد باکتری های جداسازی شده بر اساس نوع میکروب

ردیف	نوع باکتری	تعداد
۱	استافیلوکوکوس اورئوس	۴۷
۲	استرپتوکوکوس یوبریس	۴۱
۳	استرپتوکوکوس آگالاکتیه	۳۸
٤	کلبسیلا پنومونیه	۳۶
۵	اشریشیا کلی	۳۴
٦	پروتئوس میرابیلیس	۱۳
۷	کاندیدا آلبیکنس	۱۳
۸	سودوموناس آئروژینوزا	۲
۹	پاستورلا همولیتیکا	۱
	جمع کل	۲۲۵

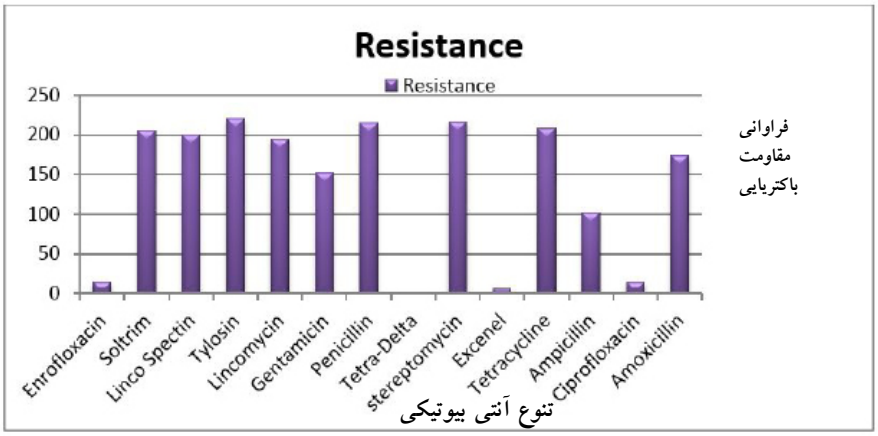
در جدول ۳ به تفکیک نام و تعداد باکتری استخراج شده مشاهده می شود.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020



نمودار ۱: توزیع فراوانی بر حسب حساسیت و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده در مطالعه ی حاضر

نمودار ۱ توزیع فراوانی برحسب حساسیت و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداشده در مطالعه ی حاضر را نشان می دهد.



نمودار ۲: تعداد باکتری های مقاوم جداشده از ۲۲۵ نمونه شیر خام به تفکیک آنتی بیوتیک ها

نمودار ۲ تعداد باکتری های مقاوم جدا شده از ۲۲۵ نمونه شیرخام را به تفکیک آنتی بیوتیک ها نمایش می دهد.

بحث

منشا وجود میکروارگانیسم ها در شیر به دو دسته ی کلی طبقه بندی می شوند که اولا از طریق بافت های بدن دام شامل: دام مبتلا به بیماری سیستمیک باشد که در این حالت میکروب در همه ی ترشحات بدن یافت می شود. ثانیا دام مشکل عمومی ندارد و تنها دچار ماستیتیس mastitis(ورم پستان) است که در این موقع میکروارگانیسم ها از طریق شیر منتقل می شوند. آلودگی در حین مراحل شیردوشی و پس از آن نیز رخ می دهد که همیشه حضور و فعالیت میکروارگانیسم ها در شیر ناخواسته نیست، حضور و فعالیت کنترل شده ی میکروارگانیسم ها در شیر، راه عمده ی تولید فراورده های لبنی در شرایط مناسب کنترل است.

بالا بودن شمارش کلی میکروبی نمونه های مورد پژوهش می تواند به دلیل آلودگی و یا عفونت حاد و تحت حاد پستانی باشد. رعایت نکردن شرایط غیر بهداشتی و عدم ذخیره سازی صحیح شیر عامل مهمی در افزایش بار میکروبی شیر است. فرایند شیردوشی به خصوص وسایلی که در تماس مستقیم با شیرخام بوده نقش بسیاری در آلودگی شیر دارد در اکثر موارد آلودگی های لبنی و بیماری های ناشی از آن منشا باکتریایی داشته و این بیماری های مرتبط با عواملی نظیر: لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کمپیلوباکتر، یرسینیا، اشریشیاکلی بیماریزا و کلستریدیوم بوتولینوم و غیره می شود. میکروارگانیسم های مهمی باعث ورم پستان هستند شامل: استافیلوکوک ها، استرپتوکوک ها، کلیفرم ها و حتی قارچ ها و غیره. تشخیص های مختلف و درمان مراحل متفاوت ورم پستان حاد و تحت حاد با آنتی بیوتیک های گوناگون صورت می گیرد(۹).

در یافته های Mack وJudkins در سال ۱۹۵۵ پارامترهای

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

فیزیکی وسیعی از کیفیت شیر در نمونه های شیرخام جمع آوری شده از گاوداری ها مورد مطالعه قرار گرفت. اکثریت نمونه ها در pH محدوده ۶/۷ تا ۶/۹ بودند(۱۰).

در بررسی که توسط Ombui و همکاران در سال ۱۹۹۴ بر روی ۲۴۶ نمونه شیر پاستوریزه انجام گردید، کلی فرم ها در ۲۶٪ از نمونه ها شناسایی شدند. در ایتالیا ۸۰ نمونه شیر خام و پاستوریزه از نظر آلودگی میکروبی بررسی شد. تمامی نمونه ها آلوده به باکتری اشریسیاکلی بودند، اما در شیر پاستوریزه این آلودگی در حد مجاز گزارش گردید(۱۱).

به گفته ی Jannat و همکاران در سال ۲۰۰۷ سلامت گله شیری، شرایط دوشش شیر و شرایط پیش ذخیره سازی، تعیین کننده های پایه ی کیفیت شیر هستند. به منظور کاهش دادن آلودگی شیر خام باید تمامی وسایل و افرادی که با آن در تماس هستند با مواد شوینده به خوبی شسته شده و ضد عفونی گردند. ضمن شستشوی وسایل، ضد عفونی پستان گاوهای شیرده نیز ضروری بوده و آب با کیفیت بهداشتی مناسب در این مورد برای تمیز نمودن تمامی ابزارها در زمان شیردوشی منجر به کاهش میکروارگانیسم های پاتوژن و غیره می گردد(۱۲).

در مطالعه ی سال ۲۰۰۰ توسط محققان بیان شد که بروز لیستریا در شیر خام به دست آمده از مزارع در مناطق مختلف مالزی پایین تر از موارد گزارش شده ی شیوع آن در سایر کشورهاست. این موضوع می تواند به دلیل آب و هوای متفاوت منطقه و در پس زمینه ی آن میکروفلور باکتریایی و شرایط خنک نگهداشتن شیر و سایر امکانات موجود در مزرعه باشد. هر چند که محدودیت میکروبیولوژیکی در شیر خام وجود ندارد ولی به دنبال انجام تستهای شناسایی پاتوژنهای شیر قبل از مصرف لازم و ضروری است. تعداد میکروبی بالا و حضور عوامل پاتوژن به احتمال زیاد بر کیفیت نگهداری و ایمنی و سلامت شیر خام و همچنین محصولات مشتق شده از آن تاثیر گذار است(۱۳).

در مطالعه ی Crump و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی ۲۱۶ نمونه شیر انجام گرفته بیان شد که باکتری اشریشیاکلی در ۲۸ مورد(۱۳٪) جدا سازی گردید(۱۴).

در مطالعه ی سال ۲۰۱۰ توسط Mubarack و همکاران تجزیه و تحلیل نمونه های شیر خام از نظر خصوصیات میکروبی فلور غالب را به این صورت بیان داشته که: اشریشیاکلی > میکروکوکوس > گونه های لاکتوباسیلوس > گونه های سالمونلا > استافیلوکوکوس اورئوس > گونه های کلبسیلا از این بین جدا شدند. تسلط کارگران در امور جمع آوری شیر و رعایت نکات میکروبیولوژیکی نقش بسزایی دارد(۱۵).

گروهی از محققان در سال ۲۰۱۱ اظهار کردند که در جدایه های حاصل جهت تست حساسیت آنتی بیوتیکی، باکتری ها عملکرد متفاوتی دارند؛ یعنی در مقاومت به پنی سیلین باکتری هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا، کلبسیلا مقاوم بوده ولی در مقاومت به اریترومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین باکتری کلبسیلا مقاوم است. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از نمونه های شیر خام مشکل با اهمیت و ارزشمندی است که بر اثر کار با گارگران ناآشنا و بدون آموزش صورت گرفته است. این میکروارگانیسم های مقاوم به عنوان تهدید مهمی برای حیات انسان ها به شمار می روند(۱۶).

Kaskatepe و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که می توان با استفاده از اسانس های گیاهی به عنوان منابع جایگزین آنتی بیوتیکی موثر، نیز بهره مند شد. این در حالی است که در سال های اخیر به علت افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها از استقبال و رویکرد چشمگیری در جهت افزایش کاربرد گیاهان دارویی می باشد(۱۷).

نتیجه گیری

با توجه به وضعیت موجود و نتایج به دست آمده هنوز میزان آلودگی شیرهای به دست آمده از دامداری های سنتی و صنعتی بسیار بالاست. بالا بردن دمای پاستوریزاسیون همان گونه که در کشور ما بسیار معمول است گرچه تاحدی می تواند در کاهش این آلودگی موثر باشد ولی تاثیری بر اشکال مقاوم باکتری ها یعنی اسپورها نخواهد داشت. در این تحقیق طیف وسیعی از باکتریها از شیر دامهای مشکوک به ورم پستان(حاد و تحت حاد) جدا شد و این جدایه ها درجه های مختلفی از مقاومت به آنتی بیوتیکهای پمادپستانی را نشان دادند. درصد بالایی از جدایه های موجود به تایلوزین و پنی سیلین مقاوم بودند. استفاده ی مکرر از آنتی بیوتیک ها و ایجاد مقاومت باکتری ها ناشی از آن مشکل بسیار مهم و قابل تاملی را در این زمینه فراهم کرده است. صنعت شیر باید از بهبود شرایط بهداشتی و آموزش نیروی انسانی در طول مدت فرایند تولید اطمینان حاصل کرده و به

طور منظم مرحله ی تولید کنترل شود تا خطاهای موجود در نقاط و مراحل بحرانی نظیر مشکلات کاربرد وسایل و یا پاستوریزاسیون ناکافی به حداقل رسیده و یا حذف گردد. برقراری یک سیستم پایش و اطلاع رسان از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در هر منطقه ی جغرافیایی و انجام آنتی بیوگرام قبل از درمان و مصرف صحیح آنتی بیوتیک ها سبب کاهش خطرات پیش رو می گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله اقتباس قسمتی از پایان نامه ی دوره دکتری تخصصی میکروبیولوژی با کد ثبتی ۱۹۸۷۴۳۴ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می باشد. بدین‌وسیله از کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی واحد و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می گردد.

منابع

1. Beauman C, Cannon G, Elmadfa I, Glasauer P, Hoffmann I, Keller M, et al. The principles, definition and dimensions of the new nutrition science. Public Health Nutrition 2005; 8(6): 695-8.

2. Leslie WS, Lean ME, Woodward M, Wallace FA & Hankey CR. Unidentified under-nutrition: Dietary intake and anthropometric indices in a residential care home population. Journal of Human Nutrition and Dietetics 2006; 19(5): 343-7.

3. Duffey KJ, Gordon-Larsen P, Steffen LM, Jacobs DR & Popkin BM. Drinking caloric beverages increases the risk of adverse cardiometabolic outcomes in the coronary artery risk development in young adults (cardia) study. The American Journal of Clinical Nutrition 2010; 92(4): 954-9.

4. Hetzel M, Bonfoh B, Farah Z, Traoré M, Simbé CF, Alfaroukh IO, et al. Diarrhoea, vomiting and the role of milk consumption: Perceived and identified risk in Bamako (mali). Tropical Medicine & International Health 2004; 9(10): 1132-8.

5. Itsaranuwat P, Al-Haddad KS & Robinson RK. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting'fermented dairy products: A brief update. International Journal of Dairy Technology 2003; 56(4): 203-10.

6. Argudín MÁ, Mendoza MC & Rodicio MR. Food poisoning and staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins 2010; 2(7): 1751-73.

7. Mahon CR, Lehman DC & Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. USA: Elsevier Health Sciences; 2014: 762-96.

8. Hsueh PR, Ko WC, Wu JJ, Lu JJ, Wang FD, Wu HY, et al. Consensus statement on the adherence to clinical and laboratory standards institute (clsi) antimicrobial susceptibility testing guidelines (clsi-2010 and clsi-2010-update) for enterobacteriaceae in clinical microbiology laboratories in Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection 2010; 43(5): 452-5.

9. Chye FY, Abdullah A & Ayob MK. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiology 2004; 21(5): 535-41.

10. Mack MJ & Judkins HF. Principles of dairying testing and manufacturers. 3rd ed. London: John Wiley & Sons Inc; 1955: 423-68.

11. Ombui JN, Kaburia HF, Macharia JK & Nduhiu G. Coliform counts and escherichia coli in raw commercial milk from dairy farmers in Kiambu district, Kenya. East African Medical Journal 1994; 71(10): 635-9.

12. Jannat B, Oveisi MR, Sadeghi N & Hajimahmoodi M. Human health and trenbolone residue in bovine meat. Journal of Environmental Health Science & Engineering 2007; 4(4): 203-6.

13. Hassan L, Mohammed HO, Mcdonough PL & Gonzalez RN. A cross-sectional study on the prevalence of listeria monocytogenes and salmonella in New York dairy herds. Journal of Dairy Science 2000; 83(11): 2441-7.

14. Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielly AS, Gage R, et al. An outbreak of escherichia coli o157: H7 infections among visitors to a dairy farm. The New England Journal of Medicine 2002; 347(8): 555-60.

15. Mubarack HM, Doss A, Dhanabalan R & Balachander S. Microbial quality of raw milk samples collected from different villages of Coimbatore district, Tamilnadu, South India. Indian Journal of Science and Technology 2010; 3(1): 61-3.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

16. Beena AK, Ranjini AR & Riya TG. Isolation of psychrotrophic multiple drug resistant pseudomonas from pasteurised milk. Veterinary World 2011; 4(8): 89-97.

17. Kaskatepe B, Kiymaci ME, Suzuk S, Erdem SA, Cesur S & Yildiz S. Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa isolates. Industrial Crops and Products 2016; 81(1): 191-4.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

An Antibiotic Resistance Pattern and Microbial Agents Isolated from Raw Milk Samples from Acute and Sub-Acute Cases of Mastitis in Livestock

Sadeghpour Majid[1] (M.S.) - Estabraghi Ehsan[2] (D.V.M.) - Mokhtari Alireza[3] (Ph.D.) - Reihani Sepideh[4] (M.S.)

1 Master of Science in Microbiology, Biology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2 Ph.D. in Microbiology, Veterinary Medicine Department, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahr-e-Babak Branch, Shahrbabak, Iran

3 Ph.D. in Microbiology, Microbiology Department, Pasargadae Veterinary Laboratory, Karaj, Iran

4 Master of Science in Microbiology, Biology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 10:37 IRST on Friday October 30th 2020

Abstract

Received: Jun 2017

Accepted: Nov 2017

Background and Aim: Milk is a suitable environment for most microorganisms. Pollution in the suckling production chain and its implementation result in unsatisfactory sanitation, long-term transportation, and the lack of facilities for storing milk. The purpose of the study was to identify and control the effects of common microorganisms of mast infections and their role in the transmission of diseases with milk as a major contribution to storage and, finally, the transmission of these pathogenic infections to humans.

Materials and Methods: A total of 450 raw milk samples from traditional and industrial plants were collected around the city of Tehran. In order to determine the identity of the bacteria, their transmission to a differential culture, was used standard microbiological methods and antimicrobial susceptibility testing (Disc diffusion).

Results: The results of biochemical experiments were conducted on 225 isolates from isolation and diagnosis of bacteria in raw milk, antibiotic susceptibility test in accordance with CLSI 2010 standard guidelines. Antibiotics of tylosin and streptomycin with the highest antibiotic resistance were 221 (98.2%) and 217 (96.5%), respectively, which were most susceptible to the tetra delta and ciprofloxacin respectively (0%, 100%) and 15 (6.7%) bacterial resistance cases were observed.

Conclusion: According to the present situation and the results obtained, the level of contamination obtained from traditional and industrial livestock is still high. Although regular mastitis and infections are commonly found by specialists, but the contamination caused by milking and collecting is higher than normal values. The frequent use of antibiotics and the resulting resistance has provided a very important and controversial problem.

Keywords: Raw Milk, Disc Diffusion, Mastitis, Antibiotic Sensitivity Test

*** Corresponding Author:**
Estabraghi E
Email:
stabraghi_dvm_phd@yahoo.com