شناسایی مولکولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های باکتری شیگلا جدا شده از شیرهای خام و پنیرهای سنتی

فرزانه حسنی [1]،مجتبی بنیادیان *[2]، حمداله مشتاقی[2]

1.دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

2.گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: boniad@sku.ac,ir

چکیده

شیگلوز یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از اسهال و عوارض آن در سطح جهان است. وجود شیگلا در فراورده‌های لبنی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری از بحران‌های کنونی در دنیا می‌باشد. هدف مطالعه حاضر ارزیابی آلودگی و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های باکتری شیگلا در شیرهای خام و پنیرهای سنتی بود. تعداد ۲۰۰ نمونه شامل ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی از مراکز عرضه در شهرستان‌های مختلف استان چهارمحال و بختیاری به صورت تصادفی اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و آزمون های استاندارد میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی، همچنین آزمون PCR برای جداسازی و شناسایی شیگلا انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک انتشاری ارزیابی شد. نتایج نشان داد از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر و پنیر سنتی، فقط از ۵ نمونه شیرهای خام باکتری مشکوک به شیگلا جدا شد که با انجام آزمون PCR ۳ (۳ درصد) جدایه‌ها شیگلا تشخیص داده شدند. آزمون های تاییدی نشان داد که هر ۳ جدایه *شیگلا فلکسنری* بودند. ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت جدایه‌های شیگلا در برابر سولفامتاکسازول با ۶۶/۶۶ درصد و بیشترین حساسیت نسبت به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین با ۱۰۰ درصد بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، شیرهای خام آلوده به سویه های بیماریزای باکتری شیگلا بوده که نسبت به برخی آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند، لذا ضروری است که از مصرف شیر و فراورده‌های غیر پاستوریزه آن اجتناب شده و جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع با دیگر مواد غذایی آماده مصرف صرفاً از شیرهایی که روند پاستوریزاسیون را گذرانده‌اند استفاده شود.

کلمات کلیدی: شیر خام، پنیر سنتی، شیگلا، تشخیص مولکولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

مقدمه

شیر یک ماده غنی است که از رشد باکتری‌ها حمایت می‌کند. بنابراین پس از آلودگی تعداد باکتری‌ها در محدوده وسیعی از زمان و دما افزایش می‌یابند در نتیجه ماندگاری، کیفیت و ایمنی شیر خام بر اساس بار میکروبی آن تعیین می‌شود. باکتری‌های عامل فساد موجب فعالیت بالای آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز و کاهش محتوای چربی و پروتئین و کاهش کیفیت شیر خام می شوند. این فعالیت‌های آنزیمی اثرات نامطلوب ارگانولپتیک از جمله تلخی، ترشی و طعم بد در شیر ایجاد می‌کنند (Barbano, et al., 2006). باکتری‌های بیماری‌زا مانند باکتری شیگلا *(Shigella spp)* در درجه اول بر ایمنی شیر و سلامت مصرف کننده تأثیر می‌گذارد. منبع شیگلا در شیر می‌تواند دام باشد و حیوانات شیری ممکن است شیگلا را در مدفوع خود دفع کنند که می‌تواند باعث آلودگی پستان و در نتیجه در حین دوشیدن شیر، شیگلا به شیر منتقل شود، همچنین دست افراد و آب‌های آلوده منبع دیگری برای انتقال باکتری به شیر است (Hayes, et al., 2001).

شیگلا یک باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و بدون اسپور می‌باشد. این جنس دارای چهار گونه است که شامل: *شیگلا دیسانتری* (*Sh.dysenteriae*)، *شیگلا فلکسنری* (*Sh. flexneri*)، *شیگلا بویدی* (*Sh..boydii*) و *شیگلا سونی* (*Sh..sonnei*) می‌باشد (O'hara, 2005). دوز عفونی این ارگانیسم بسیار پایین و در حدود ده سلول است و خواستگاه طبیعی این باکتری روده انسان و سایر پستانداران می‌باشد. بیماری شیگلوز از طریق مدفوعی- دهانی انتقال یافته که در وهله اول از طریق دست‌های آلوده افراد و به میزان کمتر از طریق آب و مواد غذای آلوده از قبیل سالادها، سبزی‌های خام، شیر و محصولات لبنی و گوشت منتقل می‌شود (Dutta, et al., 2003).

راههای مختلفی برای کاهش شیگلا در شیر خام وجود دارد که موثرترین آنها درمان حرارتی است. پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون شیر با دمای فوق بالا (UHT) بسیار موثر است (Greig, and Ravel, 2009). پنیر از مهم‌ترین فراوردهای لبنی است که بیشتر به روش سنتی تهیه می‌گردد و به دلیل عدم استفاده از شیر پاستوریزه میزان آلودگی میکروبی آن بالا است (Najafi, et al., 2001). در مورد پنیر وجود باکتری های لاکتیک یک اثر بازدارنده بر رشد شیگلا اعمال می کنند اما در همه موارد ممکن است موجب از بین رفتن این باکتری در پنیر نشود (Greig, and Ravel, 2009).

شیگلوز نسبت به سایر اشکال گاستروانتریت از شدت بالاتری برخوردار بوده و سیر بیماری در بیشتر موارد از روز اول تا سوم پس از مصرف ماده غذایی آلوده است. با این حال دوره نهفتگی بسیار متفاوت است و علائم می‌تواند تا هفت روز پس از مصرف ظاهر شود و علائم ممکن است تا چهار هفته پس از بهبودی ادامه داشته باشند (Salek, et al., 2001; Octavia, et al., 2015). علائم معمول شیگلوز عبارتند از: تب، درد شکمی، بی‌حالی، کسالت، مدفوع خونی و مخاطی که منجر به کم آبی بدن می شود (Bern, et al., 1992).

شدت بیماری فقط به شخص بستگی ندارد بلکه حدت سویه شیگلا نیز در شدت علائم تاثیرگذار است. به دلایل واضح افراد و کودکان دچار نقص ایمنی یا سوءتغذیه مستعد ابتلا به این بیماری هستند و دچار عفونت‌های شدیدتری می‌شوند. بر اساس گونه، *شیگلا دیسانتری و شیگلا فلکسنری* عفونت‌های شدید ایجاد می‌کنند، در حالی که *شیگلا سونی* خوش خیم تر است. عوارض ناشی از سپتی سمی و هیپوگلیسمی به خصوص در کودکان می‌تواند منجر به مرگ شود. در هنگام آلوده شدن به *شیگلا دیسانتری* یک سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) همراه با نارسایی کلیه ایجاد می‌شود. کراتیت ناشی از عفونت شیگلا نیز گزارش شده است و در برخی از بیماران ممکن است دچار اختلالات گوارشی مانند سندرم روده تحریک پذیر شوند (Najafi, et al., 2001; Salek, et al., 2001).

هیچ اطلاعات دقیقی در مورد تعداد کل شیوع اسهال خونی ناشی از شیگلا در هر سال در دسترس نیست و اکثریت آن در کشورهایی رخ می‌دهد که از وضعیت بهداشتی ضعیف، گرسنگی، جنگ یا فجایع رنج می‌برند. در مناطق گرمسیری شیوع آن در فصل بارانی به دلیل سیل بیشتر است در حالی که در مناطق نیمه گرمسیری به دلیل درجه حرارت بالا، شیوع در تابستان بیشتر است و در فصول خشکسالی در بسیاری از

موارد شیوع بیماری پراکنده است و به سبک‌های جدید زندگی و جهانی شدن مربوط می‌شود مثل غذا نخوردن در خانه، سفرهای تفریحی و غیره که حمل نادرست غذا اغلب مسئول این شیوع است (Greig, and Ravel, 2009).

استفاده از داروها برای درمان شیگلوزیس دو هدف دارد: کاهش علائم و طول مدت آن و عوارض تهدید کننده زندگی؛ همچنین کاهش تعداد و مدت دفع باکتری در روده و اجتناب از انتقال باکتری به سایر افراد. درمان مناسب آنتی بیوتیکی شیگلوز شدت، دوره علایم، عوارض و دفع باکتری را کاهش می‌دهد (Woteki, and Kineman, 2003)، اما مقاومت باکتری شیگلا به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج به یک مسئله مهم در درمان عفونت شیگلایی تبدیل شده است (Bennish, et al., 1992).

با توجه به خصوصیات شیر و فراورده‌های لبنی و به منظور نقش مهمی که در برنامه غذایی انسان دارد باید کنترل دقیقی بر کیفیت آن صورت گیرد تا میزان آلودگی این محصولات به باکتری‌های بیماریزا ارزیابی شود. بر این اساس مطالعه حاضر طراحی شده تا میزان آلودگی این محصولات به باکتری شیگلا و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار:

نمونه گیری شیر

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه از شیرهای خام و ۱۰۰ نمونه پنیر عرضه شده در بازارهای سنتی مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری در مدت زمان چهار ماه از خرداد تا شهریور در سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری شد. این تعداد نمونه در روزهای مختلف و همچنین در ساعات اولیه‌ی روز به میزان ۵۰۰ گرم و با استفاده از ظروف نمونه‌برداری استریل جمع-آوری شدند. انتقال نمونه‌های مورد نظر به آزمایشگاه در کنار یخ و در دمایی حدود ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد و در ظروف مخصوص (Coolbox) صورت گرفت.

کشت نمونه‌ها و جداسازی شیگلا

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا ۲۵ گرم نمونه‌های شیر/پنیر بوسیله شیکر با ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط آبگوشت شیگلا (محیط تریپتون سوی براث حاوی ۰/۵ µg/ ml نووبیوسین) استریل مخلوط کرده سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۱/۵ درجهٔ سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. سپس روی محیط سالمونلا _ شیگلا آگار کشت جامد انتخابی به-صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی-های بی رنگ رشد کرده بر روی این محیط برای مرحله‌ی افتراقی انتخاب شدند. برای این منظور از محیط‌های سه قندی آهن‌دار، آگار لیزین حاوی آهن، سیمون سیترات و اوره آگار استفاده شد (Mokhtari, et al., 2012).

محیط سه قندی آهن‌دار: یکی از محیط‌های مهم برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی است. باکتری شیگلا در محیط سه قندی آهن دار به این صورت است که عمق محیط زرد رنگ بوده که نشان دهنده تخمیر قند گلوکز است و در سطح شیب‌دار محیط قرمز یا بدون تغییر می‌ماند که بیانگر عدم استفاده از قندهای لاکتوز و ساکارز است.

محیط آگار لیزین حاوی آهن: رنگ اولیه محیط بنفش می باشد باکتری شیگلا توانایی تولید لیزین دکربوکسیلاز و هیدروژن سولفید ندارد و گونه های شیگلا در این محیط رشد نمی کنند و محیط بدون تغییر یا بنفش رنگ باقی می ماند.

محیط سیمون سیترات آگار: گونه های باکتری شیگلا به دلیل عدم داشتن آنزیم سیتراز یا سیترات پرمیاز قادر به مصرف سیترات نبوده و سیترات محیط را از غشاء عبور نداده و این باکتری آمونیوم دهیدروژن فسفات را به آمونیاک و آمونیوم دهیدروکساید تبدیل نکرده و از نیتروژن آن استفاده نمی کند، بنابراین شیگلا توانایی استفاده از سیترات را نداشته و محیط سبز رنگ باقی می ماند.

محیط اوره آگار: اگر باکتری اوره آز مثبت باشد، آمونیاک آزاد شده از اوره رنگ فنل‌رد را به قرمز یا صورتی تغییر می‌دهد و طی مدت زمان ۲ تا ۴ ساعت عمق به قرمز روشن تغییر می-کند. باکتری شیگلا اوره آز منفی می باشد.

محیط متیل رد و وژس پرسکوئر: محیط هر دو لوله مایع Broth حاوی پپتون، بافر و قند دکستروز یا گلولز می باشد که با آنس از نمونه های مشکوک درون دو لوله کشت داده شد در صورتی که ترکیبات اسیدی پایدار در لوله ها ایجاد

شود که بر بافر محیط چیره گردد و با اضافه کردن متیل رد رنگ محیط قرمز شود نشان دهنده مثبت بودن است. اگر باکتری از مسیر بوتیلن گلیکول استفاده کرده باشد استوئین تولید شده در مجاورت پتاسیم هیدروکساید و معرف VP اکسید شده و دی استیل تولید کرده و رنگ محیط را قرمز می‌کند و نشان دهنده مثبت بودن VP+ است در غیر این صورت رنگ مسی بعد اضافه شدن معرف VP، نشانه VPمنفی بودن آزمون می‌باشد. در نتیجه آزمون وژس پرسکوئر منفی بوده و نتیجه آزمون متیل رد مثبت است. جهت تفریق گونه های شیگلا از یکدیگر آزمون تخمیر قندها روی جدایه انجام شد.

تایید ملکولی

به‌منظور تایید کلنی‌های مشکوک به *شیگلا* از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

استخراج DNA باکتری

ابتدا کلنی‌های مشکوک در محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) کشت داده، پس از کشت باکتری برای استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. در این روش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر را با مقداری از کلنی رشد کرده در آگار، در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط کرده به طوری که کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند (Mc Farland turbidity standard) به‌دست آمد. پس از این مرحله میکروتیوپ به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع بالایی آن جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون PCR

آزمون PCR با استفاده از پرایمر Ipa H انجام شد (جدول ۱) برای این منظور ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس را با ۲ میکرولیتر پرایمر (۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس) و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۱۰ میکرولیتر آب دیونایز استریل مخلوط کرده (مجموع آن باید ۲۵ میکرولیتر شود) و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سیکل‌های حرارتی برای آزمون PCR به تعداد ۳۰ بار تکرار شدند (جدول۲).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی باکتری شیگلا

هدف	دمای اتصال T(°C)	وزن مولکولی (bp)	توالی 5' → 3'	پرایمر
Shigella sp.	۵۳	۴۲۳	TGGAAAAACTCAGTGCCTCT	IpaH-A forward
			CCGTCCGTAAATTCATTCT	IpaH -A reverse

جدول ۲: برنامه حرارتی جهت واکنش PCR برای پرایمر IpaH

	واسرشت اولیه	چرخه واسرشت	اتصال پرایمر	گسترش	گسترش نهایی
دما	۹۴ درجه‌سانتی‌گراد	۹۴ درجه‌سانتی‌گراد	۵۳ درجه‌سانتی‌گراد	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد	۷۲ درجه‌سانتی‌گراد
زمان	۵ دقیقه	۵۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۴ دقیقه

سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر ترکیب و درون چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد وارد شد. الکتروفورز ژل با ولتاژ ۱۰۰، به مدت ۴۵ تا ۵۰ دقیقه در بافر TBE انجام شد. پس از این مرحله ژل توسط ژل رد رنگ آمیزی و توسط دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت (Ghandian, et al., 2011).

سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های شیگلا

برای این منظور از روش دیسک انتشاری در محیط مولر هینتون آگار ا ستفاده شد. ابتدا جدایه‌های *شیگلا* در محیط نوترینت براث تلقیح و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌های ر شد کرده در محیط نوترینت براث به سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و کدورت آن‌ها با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. سپس با سوآپ استریل به صورت جداگانه در محیط مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar) به صورت چمنی کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (CFM5)، سیپروفلوکساسین (CP5)، تتراسیکلین (TE30)، جنتامایسین (GM10)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (SXT25) و آمپی سیلین (AM10) برای هر نمونه به طور جداگانه مورد روی محیط کشت قرار داده شد (۱۳). پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری توسط کولیس اندازه گیری شد. نتایج با ا ستاندارد تدوین شده CLSI مورد مقایسه و به سه گروه حساس، مقاومت متوسط و مقاوم دسته بندی شدند (Wayne, 2011).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده از آزمون‌ها به روش توصیفی توسط نرم افزار Sigma stat 4 و Exel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در قالب جداول و نمودارها ارایه شدند.

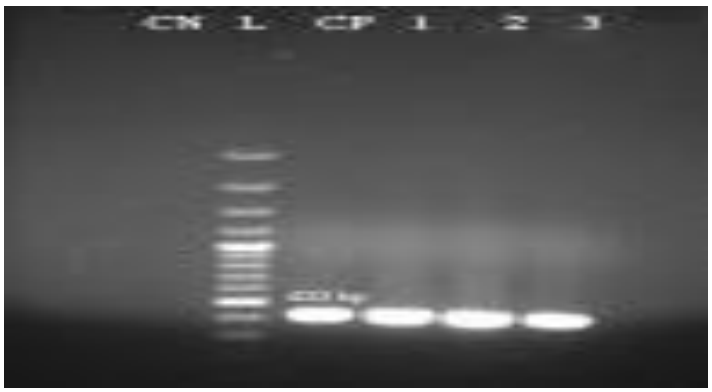
نتایج

نتایج کشت و جداسازی و تایید مولکولی شیگلا

از مجموع ۱۵۰ نمونه شیر و پنیر سنتی، تعداد ۵ جدایه فقط از ۵ نمونه شیر خام با توجه به نتایج آزمایشات میکروبی و بیوشیمیایی مشکوک به شیگلا تشخیص داده شدند. جهت تایید نتایج کشت میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی، روی جدایه‌های مشکوک به *شیگلا* آزمون PCR با جفت پرایمر IpaH انجام شد. از پنج جدایه مشکوک فقط سه جدایه در آزمون PCR شیگلا تشخیص داده شدند، که هر سه جدایه (۳ درصد) متعلق به شیر خام بودند. (جدول ۳)، (شکل ۱) آزمون‌های تکمیلی بیوشیمیایی و تخمیر قندها (عدم تخمیر گلوکز و تخمیر مانیتول) نشان داد که هر سه جدایه شیگلا گونه *شیگلا فلکسنری* بودند.

جدول ۳: نتایج آزمون‌های میکروبی و ملکولی برای شناسایی و تایید شیگلا در شیرخام و پنیرهای سنتی

ماده غذایی	تعداد نمونه	موارد مشکوک	موارد مثبت (PCR)
شیر خام	۱۰۰	۵ (٪۵)	۳ (٪۳)
پنیر سنتی	۵۰	۰	۰
مجموع	۱۵۰	۵ (٪ ۳/۳۳)	۳ (٪ ۲)



شکل ۱: شناسایی باکتری شیگلا به روش PCR

L: مارکر(100bp) ، CP: کنترل مثبت، CN: کنترل منفی، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت

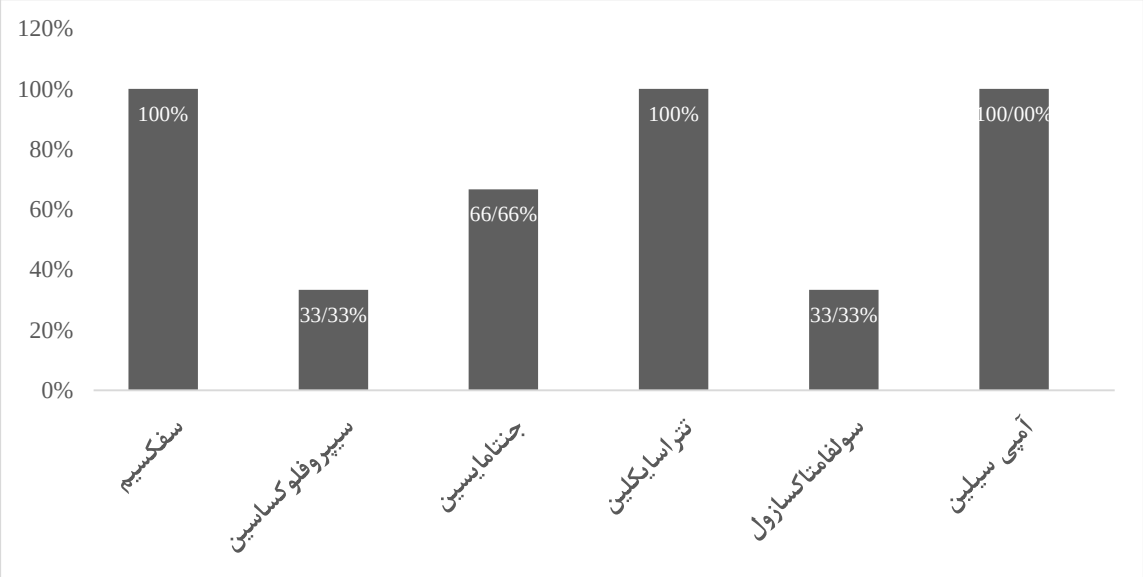
نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام

برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی روی جدایه‌های شیگلا آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک انتشاری انجام شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک استفاده شده عبارت بودند از: جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم) و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم). نتایج به دست آمده از اندازه گیری قطر هاله‌ی عدم رشد با استفاده از جدول CLSI تفسیر شدند.

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که جدایه های شیگلا بیشترین مقاومت در برابر سولفامتاکسازول با ۶۶/۶۶ درصد و بیشترین حساسیت به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین با ۱۰۰ درصد را دارا بودند. (جدول ۴ و شکل ۲)

جدول ۴: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های شیگلا از شیر خام و پنیر سنتی

وضعیت	سفکسیم (CFM)	سیپروفلوکساسین (CP)	جنتامایسین (GM)	تتراسایکلین (TE)	سولفامتاکسازول (SXT)	آمپی‌سیلین (AM)
مقاوم	۰	۰	۰	۰	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۰
نیم حساس	۰	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۰	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۰
حساس	۳ (٪ ۱۰۰)	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	۲ (٪ ۶۶/۶۶)	۳ (٪ ۱۰۰)	۰	۳ (٪ ۱۰۰)



شکل ۲: حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های شیگلا از شیر خام

بحث

شیگلوز یک سندرم بالینی است که در اثر تهاجم گونه‌های شیگلا به اپیتلیوم پوشاننده ایلئوم انتهایی، کولون و رکتوم ایجاد می‌شود. اگرچه عفونت‌ها در سراسر جهان و در افراد در تمام سنین رخ می‌دهد، عفونت‌های بومی در بین کودکان ۱ تا ۴ ساله که در محیط‌های کم درآمد و متوسط درآمد زندگی می‌کنند بیشتر بار بیماری را تشکیل می‌دهد. شیوع این ارگانیسم‌های بسیار مسری از اسهال آبکی حاد تا اسهال خونی برق‌آسا که با مدفوع خونی کم مکرر همراه با تب و گرفتگی شکم مشخص می‌شود، متغیر است. طیف وسیعی از عوارض روده‌ای و خارج روده‌ای غیرمعمول، اما اغلب شدید ممکن است رخ دهد. علیرغم کاهش قابل توجه مرگ و میر در طول سه دهه گذشته، تقریباً ۱۶۴ هزار مرگ و میر سالانه مربوط به شیگلوزیس وجود دارد. انتشار بین قاره‌ای سویه‌های

شیگلای مقاوم، که توسط مسافران و مردانی که با مردان رابطه جنسی دارند تسهیل می‌شود، توصیه‌های جدیدی را برای درمان آنتی بیوتیکی برانگیخته است. آگاهی از بار بیماری و تهدیدهای نوظهور ناشی از شیگلا، علاقه به توسعه واکسن‌های شیگلا را تسریع کرده است، که بسیاری از آنها در آزمایش‌های بالینی در حال آزمایش هستند. در همین راستا مطالعه حاضر نشان داد که در شیر از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام ۳ نمونه به شیگلا آلوده بودند و از مجموع ۵۰ نمونه پنیر سنتی آلودگی به *شیگلا* وجود نداشت. همچنین نتایج آزمون‌های آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به سولفامتاکسازول و بیشترین حساسیت مربوط به سفکسیم، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین بود.

مطالعه Soulieman و همکاران (۲۰۲۰)، در عراق بر روی آلودگی به شیگلا در شیر خام گزارش شد که از مجموع ۷۰ نمونه شیر نمونه‌گیری شده، ۱۵ نمونه (۲۱/۴۲ درصد) به شیگلا آلوده بودند (Soulieman, et al., 2020)، که با نتایج مطالعه حاضر تفاوت زیادی دارد. Elkenany و همکاران (۲۰۲۲) در هندوستان گزارش دادند که از ۱۰۰ نمونه، ۷ نمونه (۷ درصد) به شیگلا آلوده بودند و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) بود که از نظر میزان آلودگی با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت ندارد (Elkenany, et al., 2022)، ولی در ارتباط با میزان مقاومت به آمپی‌سیلین نتایج یکسان است. جنس شیگلا از چهار گونه مختلف تشکیل شده است که بر اساس آنتی ژن سرولوژیکی آنها با یک حروف مشخص می شوند: سروتیپ *Shigella dysenteriae*، سروتیپ *Shigella flexneri*، سروتیپ *Shigella boydii* و سروتیپ *Shigella sonnei*. سه مورد اول در کشورهای در حال توسعه و *S. sonnei* در کشورهای توسعه یافته و ایران رایج است (Farshad, et al., 2006; Shakya, et al., 2016). بر اساس نتایج مطالعه حاضر هر سه جدایه *شیگلا* از شیر *شیگلا فلکسنری* بودند.

در تحقیق مشابه با مطالعه حاضر، Thabet و Elhamed (۲۰۲۰) در مصر گزارش دادند از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر و ۵۰ نمونه پنیر سنتی، باکتری شیگلا از ۳۷ درصد شیرهای خام و ۴۳ درصد پنیرهای سنتی جداسازی شد (Thabet, and Elhamed, 2020). بر اساس نتایج مطالعه حاضر هیچ کدام از نمونه‌های پنیر سنتی به باکتری شیگلا آلوده نبودند. از مهم‌ترین دلایل عدم آلودگی پنیرهای سنتی مورد بررسی در مطالعه حاضر نسبت به سایر پژوهش‌ها، می‌توان به رعایت شرایط بهداشتی در روند تولید و نگهداری این فراورده اشاره کرد. همچنین در اغلب موارد پنیرهای سنتی برای مدتی در آب نمک غلیظ نگهداری می‌شوند و سپس مورد مصرف قرار می‌گیرند و در این شرایط اغلب باکتریهای بیماریزا از جمله شیگلا از بین خواهند رفت.

Demirci و همکاران (۲۰۱۹) در نیجریه میزان آلودگی شیر خام به شیگلا را ۱۶/۵ درصد گزارش کردند (Demirci, et al., 2019). مطالعه Reta و همکاران (۲۰۱۶) در اتیوپی بر روی آلودگی به انتروباکتریاسه در شیر خام نشان داد که از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر خام، ۱۷/۵ درصد نمونه‌ها آلوده به باکتری شیگلا بودند که ۳۰ درصد آنها به آمپی‌سیلین مقاوم بودند (Reta, et al., 2016). مطالعه Hornik و همکاران (۲۰۲۱) در لهستان میزان آلودگی به شیگلا در شیر خام را ۲۴ درصد گزارش دادند (Hornik, et al., 2021).

مطالعات دیگر نشان داده است که میزان آلودگی شیر خام به باکتری شیگلا همانند مطالعه حاضر کم است. Younis و همکاران (۲۰۱۸) در هندوستان بر روی آلودگی لبنیات به سالمونلا و شیگلا گزارش دادند که از مجموع ۲۵۰ نمونه شیر خام، ۳/۲ درصد به *شیگلا* آلودگی داشتند (Younis, et al., 2018). همچنین پاک‌بین و همکاران (۲۰۲۱)، در قزوین بر آلودگی شیر خام به شیگلا را ۴/۴۴ درصد گزارش کردند (Pakbin, et al., 2021). در مطالعه ای که توسط Vicar و همکاران (۲۰۱۹) در غنا انجام شد، گزارش دادند که از مجموع ۲۱۰ نمونه شیر خام، ۷ نمونه (۳/۳۳ درصد) به شیگلا آلودگی داشت و بیشترین میزان حساسیت به تتراسایکیلین (۱۰۰ درصدی) را داشت (Vicar, et al., 2019). نتایج مطالعه Mokhtari و همکاران (۲۰۱۲) در تونس نشان داد که شیگلا از نمونه‌های شیر خام و لبنیات جداسازی نشد (Mokhtari, et al., 2012). بررسی نمونه‌های غذایی و

بالینی در ایران نشان داده است که جدایه‌های شیگلا نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفپیم، آمی‌کاسین و جنتامیسین کاملاً حساس بودند (Karimi yazdani, et al., 2020).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، شیرهای خام به سویه های بیماریزای باکتری شیگلا آلوده بوده که نسبت به برخی آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند، لذا ضروری است که از مصرف شیر و فراورده‌های غیر پاستوریزه آن اجتناب شده و جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع با دیگر مواد غذایی آماده مصرف صرفاً از شیرهایی که روند پاستوریزاسیون را گذرانده‌اند استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، صمیمانه از حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد و جناب آقای مهندس یداله خسروی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

تعارض در منافع: وجود ندارد

حمایت مالی: ندارد

منابع

1. Barbano DM., Ma Y. and Santos MVd. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J Dairy Sci. 89(3): 15-24.
2. Bennish ML., Salam MA., Hossain MA., Myaux J., Khan EH. and Chakraborty J. 1992. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nalidixic acid. Clin Infect Dis. 14(5): 1055-1060.
3. Bern C., Martines J., De Zoysa I. and Glass R. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. Bulletin WHO. 70(6): 705-715.
4. Demirci M., Yiğin A., Altun S., Uysal H., Saribaş S. and Kocazeybek B. 2019. *Salmonella Spp*. and *Shigella Spp*. detection via multiplex real-time PCR and discrimination via Maldi-tof ms in different animal raw milk samples. Nigerian J Clin Prac. 22(8): 1083-1090.
5. Dutta S., Ghosh A., Ghosh K., Dutta D., Bhattacharya SK. and Nair GB. 2003. Newly emerged multiple-antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains in and around Kolkata, India, are clonal. J Clin Microbiol. 41(12): 5833-44.
6. Elkenany R., Eltaysh R., Elsayed M., Abdel-Daim M. and Shata R. 2022. Characterization of multi-resistant *Shigella* species isolated from raw cow milk and milk products. J Vet Med Sci. 84(7): 890-897.
7. Farshad S., Sheikhi R., Japoni A., Basiri E. and Alborzi A. 2006. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol. 44(8): 2879-2883.
8. Ghandian Sh., Satari M. and Nikbin V. 2011. Examining the pattern of antibiotic sensitivity and determining the *ipaH* gene in *Shigella* strains isolated from selected provinces of the country. Modares J Med Sci: Biopathol. 14(1): 81-88.
9. Greig J. and Ravel A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int J Food Microbiol. 130(2): 77-87.
10. Hayes M., Ralyea R., Murphy S., Carey N., Scarlett J. and Boor K. 2001. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. J Dairy Sci. 84(1): 292-298.
11. Hornik B., Czarny J., Staninska-Pięta J., Wolko Ł., Cyplik P. and Piotrowska-Cyplik A. 2021. The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characteristics by NGS analysis method. Molecules. 26(16): 5029-5042.
12. Karimi-Yazdi M., Ghalavand Z., Shabani M., Houri H., Sadredinamin M. And Taheri M. 2020. High rates of antimicrobial resistance and virulence gene distribution among *Shigella spp*. isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. Infec Drug Res. 48(4): 101-112.
13. Mokhtari W., Nsaibia S., Majouri D., Ben Hassen A., Gharbi A. and Aouni M. 2012. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. J Appl Microbiol. 113(1): 209-222.
14. Najafi A., Ziabakhsh DM., Karimian H., Abednia AR. and Hosseininezhad M. 2011. Microbiological changes of pousti cheese during ripening. J Food Tech Nutr. 30(2): 741-752.
15. Octavia S. and Lan R. 2015. *Shigella* and *Shigellosis*: genetics, epidemiology and pathogenesis. Molecul Med Microbiol. 2: 1147-1168.
16. O'hara CM. 2005. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. Clin Microbiol Rev. 18(1): 147-62.
17. Pakbin B., Amani Z., Allahyari S., Mousavi S., Mahmoudi R. and Brück WM.

2021. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella spp*. isolates from food products. Food Sci Nut. 9(11): 6362-6371.
18. Reta MA., Bereda TW. and Alemu AN. 2016. Bacterial contaminations of raw cow's milk consumed at Jigjiga City of Somali Regional State, Eastern Ethiopia. Int J Food Conta. 3(1): 1-9.
19. Salek MA., Forouhesh TH., Ansari H., Ravadgar B., Noorian VA. and Ghassemi M. 2001. A Survey on Bacterial Contamination on One-Hundred Unpasteurized Cheese Samples and Pasteurized Cheese as Control and Stability of Commonly Contaminating Bacteria to Different Salt Concentration. Razi J Med Sci. 15(2): 70-82.
20. Shakya G., Acharya J., Adhikari S. and Rijal N. 2016. *Shigellosis* in Nepal: 13 years review of nationwide surveillance. J Heal Popul Nutr. 35(1): 1-9.
21. Soulieman N., Al-Mariri A. and Al-Atrash F. 2020. Detection of *Shigella* in raw bovine milk by polymerase chain reaction. Iraqi J Vet Sci. 34(1): 9-16.
22. Thabet H. and Mabd Z. 2020. Occurrence of *Shigella* species in raw milk and Kareish cheese with special reference to its virulence genes. Assi Vet Med J. 12(1): 44-54.

23. Vicar EK., Feglo PK., Acquah SE., Williams W., Saba CK. and Mensah GI. 2019. Antibiotic-resistant bacteria in raw cow milk and milk products retailed in the northern region of Ghana; a food safety challenge. J Food Safe Hyg. 5(4): 206-213.
24. Wayne P. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8(3): 79-90.

25. Woteki C. and Kineman BD. 2003. Challenges and approaches to reducing foodborne illness. Ann Rev Nutr. 23(1): 315-344.

26. Younis GA., Elkenany RM. and Abd-Elmoati WS. 2018. Advanced studies on virulence genes of *Salmonella* and *Shigella* species isolated from milk and dairy products. Ann Res Rev Biol. 29(3): 1-11.

Molecular detection and antibiotic resistance pattern of Shigella sp. Isolated from raw milk and traditional cheeses

Hassani F[1] , Bonyadian M[2*], Moshtagi H[2]

1. Graduated in Msc of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Vet.Med, Shahrekord University, Iran

*(Corresponding Author) Email: boniadian@sku.ac.ir

Abstract

Shigellosis is one of the main causes of death due to diarrhea and its complications worldwide. The prevalence of Shigella in dairy products and the antibiotic resistance of this bacterium are among the current crises in the world. This study aimed to evaluate the prevalence and antibiotic resistance pattern of Shigella species isolated from raw milk and traditional cheeses. Totally 200 samples including 100 samples of raw milk and 100 samples of traditional cheese from the supply centers in different cities of Chaharmahal and Bakhtiari province were randomly collected and transported to the food hygiene laboratory in Coolbox. Shigella was detected using standard microbiological and biochemical tests. The PCR test was performed to verify the isolates. Antibiotic resistance was also evaluated using the disk diffusion method and CLSI standard. The results of this study showed that out of a total of 150 samples of traditional milk and cheese, from 5 samples of raw milk *Shigella* suspected colonies were isolated. The PCR revealed that only 3(3%) isolates were confirmed as *Shigella flexnerii*. Also, among Shigella isolates, there was the highest resistance to sulfamethoxazole at 66.66% and the highest sensitivity to cefixime, tetracycline, and ampicillin at 100%. According to the results, raw milk is contaminated with Shigella pathogenic strains that are resistant to some antibiotics, so it is necessary to avoid the consumption of milk and its non-pasteurized products and prevent Cross-contamination with other ready-to-eat foods, use only milk that has passed the pasteurization process.

Keywords: Raw milk, Traditional cheese, *Shigella*, Molecular detection, Antibiotic resistance