نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهارو تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۱۰۱-۹۱

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

جداسازی و تعیین حساسیت ضد میکروبی آرکوباکتر در شیر خام و فراورده های آن به روش کشت و PCR در استان اصفهان

اباذر لامعی[۱] ، ابراهیم رحیمی[۲*] ، امیر شاکریان[۳] ، حسن ممتاز[٤]

۱- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی ، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذائی ، دانشکده دامپزشکی ، واحد شهرکرد ، دانشگاه آزاد اسلامی

۳- استاد مرکز تحقیقات تغذیه و فرآورده های ارگانیک ، واحد شهرکرد ، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد ، ایران

۴-استاد گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد ، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵

چکیده

آرکوباکتر ها عامل بیماری مشترک بین انسان و حیوانات هستند و از طریق آب و مواد غذایی منتقل می شوند تاکنون اطلاعات اندکی در خصوص مکانیسم های بیماری زایی آرکوباکترها منتشر شده است . بررسی حاضر با هدف بررسی دقیق مقاومت دارویی آرکوباکتر و شیوع آن در شیر خام و فراورده های آن در استان اصفهان انجام گرفت.

در این مطالعه تعداد ۳۵۰ نمونه شیر خام از ۵ گونه حیوان شامل گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش و ۴۰۰ نمونه از فراورده های شیر شامل پنیر ، خامه ،کره و بستنی سنتی به طور تصادفی از لبنیاتی های شهر اصفهان و اطراف اصفهان جمع آوری و در شرایط سترون به آزمایشگاه انتقال داده شدند جهت جداسازی باکتری از محیط CAMP (مرک- آلمان)، غنی شده با خون گوسفند دفیبرینه شده استفاده گردید سپس کلنی‌های مشکوک با استفاده از تست بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شدند و از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تأیید آرکوباکترها استفاده شد. همچنین در این مطالعه به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسکی طبق معیار CLSI(۲۰۱۷) استفاده گردید.

یافته ها نشان داد از مجموع ۷۵۰ نمونه بررسی شده ، ۱۸ نمونه (۲/۴٪) به یکی از گونه‌های آرکوباکتر آلوده بودند. که این ۱۸ مورد فقط از شیر خام یافت شد و هیچ کدام از فراورده های شیر به این باکتری آلوده نبودند ، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک نیز مربوط به آمپیسیلین ، آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید ، سفالوتین ، سفوتاکسیم و تتراسایکلین مشاهده گردید .

از این مقاله نتیجه گیری شد بیشترین مقاومت دارویی مربوط به سفالوتین ، آمپیسیلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به جنتامایسین و اریترومایسین می باشد.

واژه های کلیدی: آرکوباکتر ، شیر خام ، مقاومت آنتی بیوتیک- PCR

*نویسنده مسئول : ابراهیم رحیمی

آدرس: گروه دامپزشکی ، واحد شهر کرد ، دانشگاه ازاد اسلامی ،شهرکرد ،ایران

پست الکترونیکی : ebrahimrahimi55@yahoo.com

مقدمه

جنس آرکوباکتر متعلق به خانواده کمپیلیو باکتریاسه است و در حال حاضر شامل بیست و شش گونه از آن یافت شده است. باکتری های متعلق به این جنس در همه جا وجود دارند و حیوانات می توانند گونه های آرکوباکتر را جابه جا و منتقل کنند (Collado et al, 2011; Giacometti et al, 2013). گونه های آرکوباکتر به عنوان یک پاتوژن در حال ظهور مشترک بین انسان و دام و یک خطر جدی برای سلامت انسان شناخته شده اند (Arias et al, 2011; Ramees et al, 2017; ICoMSfF, I.C.M.S.F., 2002)در خط تولید فراورده های لبنی، گونه های آرکوباکتر از منابع مختلفی مانند مدفوع، فیلترهای شیر درون خطی، شیر مخزن فله، پنیرها و سطوح فرآوری جدا شده اند (Giacometti et al, 2013).

آرکوباکترها عمدتا از طریق مواد غذایی آلوده و منابع آبی که ممکن است از طریق فاضلاب آلوده شوند، منتقل می شوند. گزارش های متعددی در مورد وجود آرکوباکتر در آب به عنوان یک منبع موثر عفونت وجود دارد(Teague et al, 2010; Jacob 1993). مصرف مواد غذایی آلوده و آب آلوده عامل انتقال این باکتری به انسان و همچنین حیوانات می باشد. از این رو گونه های آرکوباکتر را به عنوان پاتوژن مشترک بین انسان و حیوان در نظر می گیرند(Wang et al, 2014; Figueras et al, 2008).

عفونت آرکوباکتر در انسان به طور عمده در بیماران مبتلا به بیماری های مزمن، افراد مسن و کودکان شناسایی شده اند . اسهال مرتبط با آرکوباکتر بوتزلری مداوم تر، آبکی و بدون علامت است اما نسبت به کمپیلوباکتر ژژونی که اسهال حاد تری می دهد ضعیف تر است(Lau et al, 200; Jiang et al, 2010; Kopilović et al, 2008; Hayath Kownhar et al, 2007; Abdelbaqi et al, 2007; Ho et al, 2006).

محصولات غذایی با منشاء حیوانی به عنوان یک مسیر انتقال بالقوه مهم آرکوباکتر می باشند(Forsythe and . Arcobacter 2006; Korolik and Ketley2006; (Arias et al, 2011) مطالعه‌ای در تایلند گزارش داده است که ۱۳ درصد وعده‌های غذایی که در برخی رستوران‌های بانکوک سرو می‌شود، آلوده به آرکوباکتر بوتزلری است (ICoMSfF 2010). مطالعات انجام شده روی غذاها نشان داده است که آرکوباکتر بوتزلری شایع ترین گونه بعد از آرکوباکتر کری ائروفیلوس و آرکوباکتر اسکیرووی است . این امر دلیلی برای درج نام آرکوباکتر بوتزلری در لیست میکروب های با خطر بالا برای سلامت انسان ها است که از سوی کمسیون بین المللی ویژگی های میکروبی مواد غذایی مطرح شده است (Collado González 2010). مطالعه ای بر روی محصولات دریایی نشان داد که ۱۰۰ درصد صدف ها و ۴۱,۱ درصد از سایر نمونه ها دارای شیوع بالا و تنوع گسترده ای از گونه های آرکوباکتر بودند (Collado 2009). اکثر موارد آنتریت و باکتریمی ناشی از آرکوباکتر مانند کمپیلوباکتر، خود محدود شونده به نظر می رسد و نیازی به درمان ضد میکروبی ندارد. اما درمان آنتی بیوتیکی برای بیماران مبتلا به تب بالا، اسهال خونی، نقص سیستم ایمنی و افرادی که علائم شدید دارند توصیه می شود (Liu 2009; Yan 2000).

تست وسترن بالت نشان می دهد که سویه های آرکوباکتر بوتزلری توانایی چسبندگی مولکولی به سلول های گلبول های قرمز انسان و خرگوش و هماگلوتین را دارا هستند. سویه های آرکوباکتر باعث القای یک پاسخ التهابی می شود که به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی در این گونه و همچنین

در گونه های کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر است گونه های آرکوباکتر مانند کمپیلوباکتر و سایر عوامل بیماری زا وارد شده، توانایی چسبیدن به سلول های اپیتلیال روده ای (IPI۲۱) وآغاز پاسخ التهابی به وسیله القای تولید اینترولوکین (IL ۸) را دارا هستند (Ferreira et al, 2016).

با توجه به قدرت بالای بیماری زایی آرکوباکتر بر آن شدیم که میزان شیوع این باکتری و حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک های رایج را در شیر و فراورده های آن بررسی کنیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه برای تشخیص آرکوباکتر، تعداد ۳۵۰ نمونه شیر خام از ۵ گونه حیوان شامل گاو، گوسفند، بز، شتر و گاومیش و ۴۰۰ نمونه از فراورده های شیر شامل پنیر ، خامه ،کره و بستنی سنتی به طور تصادفی از لبنیات های شهر اصفهان و اطراف اصفهان در ظروف سترون نمونه گیری و طی کوتاه ترین زمان به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد انتقال داده شد.

کشت و جداسازی باکتری

ابتدا نمونه ها به لوله های حاوی محیط کشت پریستون انتقال داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر از باکتریهای رشد یافته با کمک لوپ استریل بر روی محیط CAMP (مرک- آلمان)، غنی شده با خون گوسفند دفیبرینه شده که حاوی آنتی بیوتیکهایی مانند ونکومایسین ۲ میلیگرم/میلیلیتر، پلی میکسین ۰۰۵/۰ میلیگرم/میلیلیتر، تری متوپریم۱ میلیگرم/میل لیتر بود، کشت صورت گرفت . سپس محیط های کشت در داخل انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ۷۲-۲۴ ساعت قرارداده شد. پس از دوره زمانی گرمخانه گذاری پلیت ها جهت شناسایی آرکوباکترها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر روی محیط کشت پایه ، کلنی باکتری به شکل محدب، صاف، شفاف، بدون رنگ تا کرم به اندازه ۲-۴ میلیمتر بعنوان کلنی مشکوک به آرکوباکتر در نظر گرفته شد. این کلنی ها جهت شناسایی اولیه آرکوباکترها مورد آزمایشات میکروبی مانند رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قند گلوکز و حرکت قرار گرفتند. با مشاهده باسیل های خمیده گرم منفی، متحرک، اکسیداز مثبت و منفی شدن تست تخمیر قند گلوکز، می توان تا حدود بسیار زیادی به جداسازی و شناسایی جنس آرکوباکتر مطمئن شد سپس در مرحله بعد از تستهای فنوتیپی معرفی شده به وسیله آتابای و کوری(۱۹۹۸)که شامل تستهای تولید اوره آز، رشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط میکروآئروفیلیک و رشد در مک کانگی آگار بود، استفاده گردید (Atabay and Corry 1998).

تایید و تشخیص آرکوباکتر به روش PCR

برای انجام PCR ، ابتدا با استفاده از کیت (شرکت کیاژن ساخت ایران) استخراج DNA از کلنی ها طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد سپس به منظور اجرای روند ، پرایمر های فوروارد و ریوارس برای شناسایی ژن ۱۶SrRNAاستفاده گردید که این ناحیه ژنی در تمام گونه های آرکوباکتر وجود دارد (جدول ۱) جهت انجام فرایند پلیمریزاسیون دستگاه ترمال سایکلر به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتیگراد جهت دناتوراسیون اولیه قرار داده شد. سپس ۳۵ سیکل

PCR شامل ۹۴ درجهٔ سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجهٔ سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه انجام شد. در خاتمه به مدت ۱۰ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتیگراد انجام گرفت . روش آزمون و برنامه حرارتی اعمال شده مطابق دستورالعمل Son و همکاران (۲۰۰۷) اعمال و جهت ردیابی محصول مورد نظر از ژل ۱/۵ درصد آگاروز استفاده گردید. به این صورت که پس از قرار دادن ژل در داخل تانک الکتروفورز، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA تکثیر یافته به همراه ۵/۰ میکرولیتر ژل رد داخل هر یک از چاهک های تعبیه شده در ژل آگاروز منتقل گردید. سپس ولتاژ بر روی ۱۰۰ -۱۱۰ ولت تنظیم نموده و ۳۰ الی ۴۰دقیقه زمان در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان فوق، ژل به درون دستگاه UV ترانس لومیناتور منتقل گردید تا باندهای تشکیل شده مشاهده گردد (شکل ۱) (Son et al, 2007).

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیک

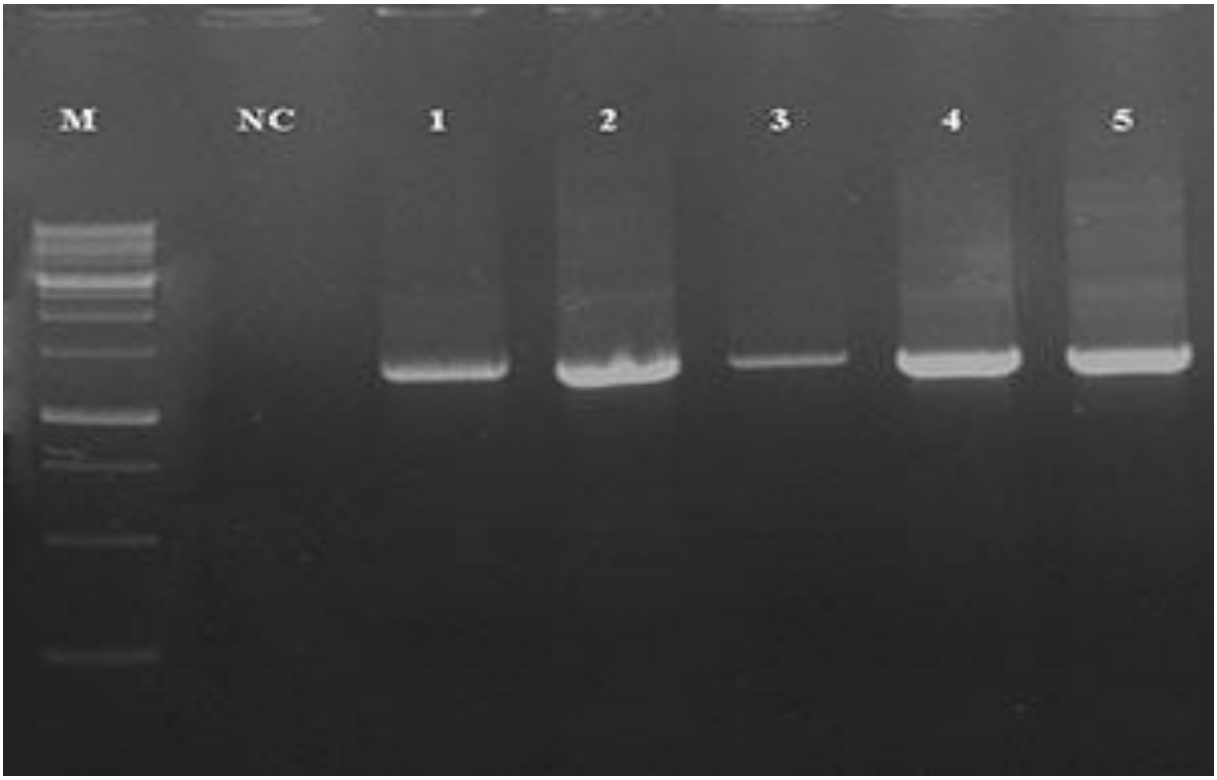
به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسکی طبق معیار CLSI(۲۰۱۷) استفاده شد. ایزوله های جدا شده به روش متراکم درمحیط مولرهینتون آگار واجد ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت ومقاومت آتی بیوتیکی آن ها در حضور دیسک های آنتی بیوتیکی شامل اریترومایسن (۱۵ میکروگرم) ،سیپروفلوکساسین (۵۳میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰میکروگرم)، جنتامایسین(۳۰میکروگرم)، آموکسی سیلین (۲۰/۱۰)، آمپی سیلین(۱۰میلی گرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) ، سفالوتین (۳۰ میکروگرم) ارزیابی گردید. تمام آنتی بیوتیک ها از شرکت پادتن طب (ساخت ایران) تهیه شدند.

نتایج

در مجموع ۷۵۰ نمونه شیر خام و فراورده های شیر شامل تعداد ۱۲۰ نمونه مربوط به شیر خام گاو، ۶۰ نمونه شیر خام گوسفند ، ۱۰۰ نمونه شیر خام بز ، ۳۲ نمونه مربوط به شیر خام گاومیش ، ۳۸ نمونه مربوط به شیر خام شتر، ۴۰۰ نمونه از فراورده های خام دامی شامل پنیر سنتی ، کره سنتی، بستنی سنتی و خامه (۱۰۰ نمونه از هر کدام) جمع آوری گردید . طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه هیچ یک از فراورده های شیر به آرکوباکتر ها آلوده نبودند. همچنین تمام نمونه های شیر خام بجز شیر شتر به آرکوباکتر آلوده بودند، در این مطالعه از ۱۸ نمونه درگیر به آرکوباکتر ۱۵ نمونه مربوط به گونه آرکوباکتر بوتزلری و ۳ نمونه مربوط به گونه آرکوباکترکری ائروفیلوس شناسایی شد . شیر خام گاو دارای بیشترین آلودگی به آرکوباکتر نسبت به بقیه نمونه ها بود در ادامه نتایج این تحقیق نشان داده شد که آرکوباکتر بوتزلری در همه نمونه های شیر خام آلوده وجود داشت ولی آرکوباکتر کری ائروفیلوس فقط در شیر خام گاو و گوسفند یافت شد .(جدول ۲) نتایج حاصل از بررسی میزان حساسیت با آنتی بیوتیک های استفاده شده نشان داد که تمام آرکوباکتر بوتزلری جدا شده از شیر به آمپیسیلین و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند و حداقل یک ایزوله از شیر خام گاو به هر آنتی بیوتیک آزمایش شده مقاوم بود. همچنین آنالیز نتایج نشان داد که تمام جدایه های آرکوباکتر بوتزلری از شیر خام گوسفند و بز به آنتی بیوتیک سفالوتین مقاوم بودند.

جدول ۱: توالی ها

TTCGCTTGCGCTGCATCAT	Arcobacter 1
AGCGTTCTATTCAGCGTAGAAGATGT	A.butzleri 2
ACCGAAGCTTTAGATTCGAATTTATTCA	A.cryaerophilus 3



شکل ۱: تصویر الکتروفورز برای ردیابی آرکوباکتر روی ژل آگارز۱/۵ درصد
M خط کش مولکولی ، ۱،۲،۳،٤،٥ نمونه های آرکوباکتر جداشده ، Cکنترل منفی

جدول ۲ : نتایج مربوط به شیوع آرکوباکتر در شیر و فراورده های آن

نوع نمونه	تعداد نمونه	نمونه مثبت	آرکوباکتر بوتزلری	آرکوباکتر کری ائروفیلوس
شیر خام گاو	120	16%)/11(9	9(81/8%)	2(18/18%)
شیر خام بز	100	2(2%)	2(100%)	0
شیر خام گوسفند	60	3(5%)	2(66/6%)	1(33/3%)
شیر خام گاومیش	32	2(6/2%)	2(100%)	0
شیر خام شتر	38	0	0	0
جمع	350	18(2/4%)	15(83/3%)	3(16/6%)

جدول ۳ : نتایج مربوط به مقاومت دارویی در سویه آرکوباکتر بوتزلری

	جنتامایسین	استرپتومایسین	آمپیسیلین	آموکسیسیلین	سفالوتین	سفوتاکسیم	اسید نالیدیکسیک	تتراسایکلین	اریترومایسین	سیپروفلوکساسین
شیر خام گاو (9)	1(11%)	2(22%)	9(100%)	8(8/8%)	7(7/77%)	7(7/77%)	6(6/66%)	9(100%)	1(11%)	1(11%)
شیر خام بز(2)	-	1(50%)	2(100%)	1(50%)	2(100%)	-	2(100%)	2(100%)	1(50%)	1(50%)
شیر خام گوسفند(2)	-	-	2(100%)	1(50%)	2(100%)	-	1(50%)	2(100%)	-	1(50%)
شیر خام گاومیش(2)	-	-	2(100%)	-	1(50%)	-	-	2(100%)	-	-

جدول ٤ : نتایج مربوط به مقاومت دارویی در سویه آرکوباکتر کری ائروفیلوس

	جنتامایسین	استرپتومایسین	آمپیسیلین	آموکسیسیلین	سفالوتین	سفوتاکسیم	اسید نالیدیکسیک	تتراسایکلین	اریترومایسین	سیپروفلوکساسین
شیر خام گاو (2)	-	-	1	2	2	2	1	2	-	-
شیر خام گوسفند(1)	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-

مطابق جدول ۴ آنالیز نتایج نشان داد که باکتری کری ائروفیلوس شیر به جنتامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین حساس می باشد همچنین نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که تمام جدایه

های شیر خام گاو به آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید، سفالوتین، سفوتاکسیم و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند . نتایج آزمون حساسیت و مقاومت در جدایه شیر خام گوسفند نیز نشان داد که آرکوباکتر کری ائروفیلوس به آمپی سیلین، سفالوتین، نالیدیکسیک اسید و تتراسایکلین مقاومت بوده و آنتی بیوتیک های فوق فاقد کارایی لازم می باشند .

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل بیماریزا با منشأ مواد غذایی می توانند در هر زمان وارد زنجیرهٔ غذایی شوند سالانه میلیونها نفر در سراسر جهان از بیماریهای ناشی از مواد غذایی رنج می برند و این موضوع در کشورهای درحال توسعه باعث ایجاد فشار اجتماعی و اقتصادی شده است حتی در کشورهای پیشرفته مانند ایالات متحده، سالانه حدود ۴۸ میلیون مورد بیماری ناشی از غذا گزارش می شود این امر منجربه تلاش های علمی و سیاسی بسیاری برای حل این مشکل شده است یکی از عوامل بیماری زای این نگرانی متعلق به آرکوباکتر بوتزلری می باشد (Ferreira et al, 2016; Giacometti et al, 2013). آرکو باکترها باکتری گرم منفی و فاقد اسپور هستند و اولین بار در سال ۱۹۷۷ از جنین سقط شده گاو با استفاده از محیط کشت لپتوسپیرا جدا گردیدند گونه مهم این جنس شامل : آرکوباکتر بوتزلری ، آرکو باکترکری ائروفیلوس ، آرکو باکتر اسکیرووی و آرکو باکتر نیترو فیژیلس می باشد گونه معروف و بیماری زای آن در انسان آرکو باکتر بوتزلری می باشد که به عنوان خطرناک ترین گونه برای سلامت انسان از سوی کمیسیون شاخص های میکروبیولوژی مواد غذایی(ICMSF) و اخیرا به عنوان پاتوژن مهم زئونوتیک شناسایی و معرفی شده است تاکنون اطلاعات اندکی در خصوص مکانیسم های بیماری زایی آرکوباکتر ها منتشر شده است این باکتریها همچنین بصورت فرصت طلب در افراد با ضعف ایمنی می توانند بیماریهای شدید به وجود آورند (Wilson et al 2000; Greisen et al 1994). مطالعه که توسط Lehner و همکارانش در سال (۲۰۰۵) در مورد مواد غذایی انجام شد نشان داد که آرکوباکتر بوتزلری شایع ترین گونه بعد از آرکوباکترکری ائروفیلوس و آرکوباکتر اسکیرووی است این موضوع دلیلی برای اضافه کردن نام آرکوباکتر بوتزلری در لیست میکروب های با خطر بالا برای سلامت انسان است که توسط کمسیون بین المللی ویژگی های میکروبی مواد غذایی مطرح شده است . در مطالعه دیگری که توسط Houf و همکاران در سال (۲۰۰۴) انجام شد نشان داده شد که آرکوباکتر می تواند در آب و غذاهایی مانند گوشت مرغ، ماهی و سبزیجات تازه یافت شود. همچنین، آنها نشان دادند که برخی از سویه‌های آرکوباکتر می‌توانند مقاومت در برابرضدعفونی کننده های معمولی را داشته باشند و در محیط به زندگی ادامه دهند (Houf et al, 2004). در مطالعه دیگری که توسط Rahimi و همکاران در سال (۲۰۱۱) در ایران انجام شد نشان داده شد که در شیر و فراورده های شیر میزان آلودگی آرکوباکتر بین۲/۵ تا ۲۵ ٪ بود . در یک مطالعه دیگر در ایتالیا که توسط Shah و همکاران در سال (۲۰۱۱) انجام شد نشان داده شد که میزان آلودگی آرکوباکتر در شیر و فراورده های آن به ترتیب ۱۷/۴ و ۹/۳ ٪ بود. در مطالعه دیگری که توسط Lenzen و همکاران در سال (۲۰۱۶) انجام گرفت نشان داده شد که بیشترین شیوع آرکوباکتر در محصولات لبنی مربوط به شیر گاو و گوسفند است که با مطالعات ما همخانی و مطابقت

دارد نتایج مطالعه ما نشان داد که آرکوباکتر در تمام نمونه های شیر خام به جز شیر شتر یافت شد . بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه های شیر خام گاو بود و حدود ۱۶,۹درصد را شامل می شد . همچنین، شیر خام شتر به دلیل حضور لاکتوفرین، لیزوزیم و پراکسید، دارای خواص ضد باکتریایی و ضد ویروسی بالایی است این ترکیبات می توانند باکتری های گرم مثبت و منفی را سرکوب کنند. علاوه بر این، محتویات ترکیبات ضد باکتریال در شیر شتر بیشتر از شیر گاو است که می‌تواند یکی از دلایل یافت نشدن آرکوباکتر در شیر شتر باشد. مطابق مطالعه ما Goojani و همکاران در سال (۲۰۲۲) نیز هیچ گونه آرکوباکتر را در شیر شتر پیدا نکردند . بر اساس مطالعه ما ، آرکوباکتر کری آئروفیلوس نیز در شیر خام گاو و گوسفند جداسازی شد و این نشان می‌دهد که ممکن است بعد از آرکوباکتر بوتزلری، آرکوباکتر کری ائروفیلوس رایج ترین گونه آرکوباکتر در شیر باشد (Goojani et al, 2022). در مطالعه دیگری که توسط Serraino و Giacometti در سال (۲۰۱۳) و (۲۰۱۴) انجام شد نشان داده شد که آرکوباکتر بوتزلری و به دنبال آن آرکوباکتر کری ائروفیلوس رایج ترین گونه های موجود در شیر و محصولات لبنی هستند . انتخاب یک آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان عفونت آرکوباکتر نقش مهمی در کنترل این باکتری ایفا می کند .در مطالعه که توسط Hoof و همکاران در سال (۲۰۰۴) انجام شد نشان داده شد که تعیین الگوهای مقاومت ضد میکروبی برای انتخاب بهتر آنتی بیوتیک به عنوان درمان اولیه عفونت آرکوباکتر حیاتی است. استفاده صحیح و مناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری های عفونی در دام ها بسیار حائز اهمیت است؛ در عوض، استفاده نادرست و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها می تواند منجر به افزایش تعداد باکتری های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آنها از دام به انسان و بقایای دارویی در شیر شود هر چند در مورد آرکوباکتر ها اطلاعات اندکی در مورد مقاومت دارویی وجود دارد با توجه به مطالعه ما ، می توان از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و اریترومایسین به عنوان خط اول درمان برای عفونت های ناشی از آرکوباکتر بوتزلری و کری آئروفیلوس استفاده کرد . همچنین مطالعه ما نشان داد که آرکوباکتر بوتزلری موجود در شیر گاو ۱۰۰٪ مقاومت نسبت به آمپی سیلین و تتراسایکلین دارد. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده تنها از این دو آنتی‌بیوتیک برای کنترل بیماری کافی نیست . و استفاده مناسب و صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنجیره غذایی بسیار اهمیت دارد تا جلوی افزایش مقاومت در باکتری ها گرفته شود این مورد با مطالعه Elmali در سال (۲۰۱۷) که تتراسایکلین را به عنوان آنتی بیوتیک موثرتر تشخیص دادند، مطابقت ندارد. تحقیقات انجام شده توسط Rahimi و همکاران در سال (۲۰۱۱) نیز نشان داد که تفاوت ها در الگوهای حساسیت می تواند به دلیل فراوانی داروها در حیوانات برای درمان و یا پیشگیری و عدم استانداردسازی تست های حساسیت ضد میکروبی آرکوباکتر باشد. مطابق مطالعه ما Collado و همکاران در سال (۲۰۱۱) نشان دادند که آرکوباکتر در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها حساسیت نشان می‌دهد، اما مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تتراسایکلین، کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین نیز مشاهده شده است . مطالعه دیگری که توسط Vidall و همکاران در سال (۲۰۲۱) انجام شد نشان داد که تمام سویه های آرکوباکتر به چهار آنتی بیوتیک ارزیابی شده از جمله اریترومایسین و سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و جنتامایسین حساس بودند (Vidal-

Veuthey et al, 2021). به طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آرکوباکتر ها می‌تواند وجود داشته باشد و استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنجیره غذایی می‌تواند منجر به افزایش مقاومت در این باکتری‌ها شود. بنابراین، ضرورت استفاده متناسب و صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنجیره غذایی بسیار مهم است تا جلوی افزایش مقاومت در باکتری‌ها گرفته شود و کنترل بیماری‌ها حفظ شود. در نهایت، با توجه به اینکه مصرف شیر به عنوان یک ماده غذایی حیاتی برای بدن انسان است، استفاده از شیر غیر پاستوریزه و یا آنتی‌بیوتیک‌هایی که به آرکوباکتر مقاومت نشان داده اند، باید با احتیاط مصرف گردد.

نتیجه گیری نهایی

مصرف مستقیم شیر خام ممکن است انسان را در معرض عوامل خطرناک مشترک بین انسان و دام مانند گونه های آرکوباکتر قرار دهد. پاستوریزه و استریل کردن شیر قبل از تبدیل به محصولات لبنی می تواند تا حدود زیادی از گسترش این باکتری در این محصولات بکاهد مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان شیوع مربوط به شیر خام گاو (۹/۱۶٪) و گوسفند (۵٪) بود در مجموع، بیشترین مقاومت دارویی مربوط به سفالوتین ، آمپیسیلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به جنتامایسین و اریترومایسین می باشد. تست حساسیت ضد میکروبی در این مطالعه نشان داد که مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های خط اول مورد استفاده در بالینی و دامپزشکی افزایش یافته است بنابراین، هنگام کنترل آلودگی آرکوباکتر و همچنین درمان عفونت های ناشی از گونه های آرکوباکتر در حیوانات و انسان، باید به این نتایج توجه کرد. همچنین توصیه می شود این مطالعه در سایر نقاط کشور اجرا تا میزان آلودگی در کشور تخمین زده شود.

منابع

1. Abdelbaqi, K., Buissonniere, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F. and Ménard, A., 2007. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect Arcobacter species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), pp.3015-3021.
2. Arias M.L., Cid A. and Fernández H., 2011. Arcobacter butzleri: first isolation report from chicken carcasses in Costa Rica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:703-706.
3. Atabay, H.I. and Corry, J.E.L., 1998. Diversity and prevalence of Arcobacter spp. in broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), pp.1007-1016.
4. Collado González, L.R., 2010. Taxonomy and epidemiology.
5. Collado, L. and Figueras, M.J., 2011. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus Arcobacter. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), pp.174-192.
6. Collado L. Guarro J. and Figueras M.J., 2009. Prevalence of Arcobacter in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*, 72(5), pp.1102-1106.
7. Elmali, M. and Can, H.Y., 2017. Occurrence and antimicrobial resistance of Arcobacter species in food and slaughterhouse samples. *Food Science and Technology (Campinas)*, 37(2), pp.280-285.
8. Ferreira, S., Queiroz, J.A., Oleastro, M. and Domingues, F.C., 2016. Insights in the pathogenesis and resistance of Arcobacter: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), pp.364-383.

9. Figueras, M.J., Collado, L. and Guarro, J., 2008. A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of Arcobacter. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(1), pp.11-15.
10. Forsythe, S.J., 2006. Arcobacter, pp.181–221 in Emerging foodborne pathogens. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
11. Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R.G. and Serraino, A., 2013. Occurrence and genetic diversity of Arcobacter butzleri in an artisanal dairy plant in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), pp.6665-6669.
12. Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D., Bonfante, E., Zanoni, R.G. and Rosmini, R., 2013. Isolation of Arcobacter butzleri in environmental and food samples in an industrial and an artisanal dairy plant. *Italian Journal of Food Safety*, 2(3), pp.121-123.
13. Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E. and Rosmini, R., 2014. Behavior of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cow's milk under different temperature conditions. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(1), pp.15-20.
14. Goojani, R.N., Rahimi, E. and Shakerian, A., 2022. Prevalence, virulence genes and antimicrobial resistance of Arcobacter isolates from animal meat in Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 25(3).
15. Greisen, K., Loeffelholz, M.J., Purohit, A., and Leong, D., 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(2), pp.335-351.
16. Hayath Kownhar, H.K., Shankar, E.M., Ramachandran Rajan, R.R., Appasamy Vengatesan, A.V. and Rao, U.A., 2007. Prevalence of Campylobacter jejuni and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in southern India.
17. Ho, H.T., Lipman, L.J.A. and Gaastra, W., 2006. Arcobacter: what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, 115(1-3), pp.1-3.
18. Houf, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.P., Hoof, J.V. and Vandamme, P., 2004. Antimicrobial susceptibility patterns of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus strains isolated from humans and broilers. *Microbial Drug Resistance*, 10(3), pp.243-247.
19. ICoMSfF ; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICoMSfF), 2002. *Microorganisms in Foods 7– Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic Plenum, New York, NY.
20. Jacob, J.E., Lior, H.E. and Feuerpfeil, I.R., 1993. Isolation of Arcobacter butzleri from a drinking water reservoir in eastern Germany. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, 193(6), pp.557-562.
21. Jiang, Z.D., DuPont, H.L., Brown, E.L., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S. and Chen, J.J., 2010. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic Bacteroides fragilis and Arcobacter species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), pp.1417-1419.

of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(4), pp.451-455.
30. Teague, N.S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J. and Mason, C.J., 2010. Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand. *Journal of Travel Medicine*, 17(2), pp.118-123.
31. Vidal-Veuthey, B., Jara, R., Santander K., Mella, A., Ruiz, S. and Collado, L., 2021. Antimicrobial resistance and virulence genes profiles of Arcobacter butzleri strains isolated from backyard chickens and retail poultry meat in Chile. *Letters in Applied Microbiology*, 72(2), pp.126-132.
32. Wang, X., Seo, D.J., Lee, M.H. and Choi, C., 2014. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of Arcobacter species. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2), pp.557-563.
33. Wilson, D.L., Abner, S.R., Newman, T.C., Mansfield, L.S. and Linz, J.E., 2000. Identification of ciprofloxacin-resistant Campylobacter jejuni by use of a fluorogenic PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), pp.3971-3978.
34. Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chen, H.M., Jin, Y.T. and Wu, J.J., 2000. Arcobacter butzleri bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *Journal of the Formosan Medical Association*, 99(2), pp.166-169.
22. Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M. and Kraigher, A., 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Eurosurveillance*, 13(34), p.18957.
23. Korolik, V. and Ketley, J., 2006. Campylobacter chemotaxis.
24. Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Leung, K.W. and Yuen, K.Y., 2002. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of Arcobacter butzleri bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Molecular Pathology*, 55(3), pp.182-185.
25. Liu D., 2009. *Molecular detection of foodborne pathogens*. CRC Press.
26. Rahimi, E., 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of Arcobacter species isolated from poultry meat in Iran. *British Poultry Science*, 55(2), pp.174-180.
27. Ramees, T.P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R.S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y.S. and Singh, R.K., 2017. Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1), pp.136-161.
28. Shah, A.H., Saleha, A.A., Zunita, Z. and Murugaiyah, M., 2011. Arcobacter–An emerging threat to animls and animal origin food products? *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), pp.225-236.
29. Son, I., Englen, M.D., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, P.J. and Harrison, M.A., 2007. Antimicrobial resistance

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

Investigation of the prevalence and antibiotic resistance of Arcobacter in raw milk and its products in Isfahan province

Abazar Lameei [1] ، Ebrahim Rahimi [2] * ، Amir Shakerian [3] ،Hasan Momtaz [4]

1. Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2.professor Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3.professor Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4. professor Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Received: 8 May2023 *Accepted: 6 September2023*

Abstract

Arcobacteria are the cause of common diseases between humans and animals and are transmitted through water and food. So far, little information has been published about the pathogenic mechanisms of Arcobacteria. These bacteria can also opportunistically infect people with weak immunity. cause severe diseases. The present study was conducted with the aim of investigating drug resistance of Arcobacter and identifying virulence and resistance genes in raw milk in Isfahan province.

In this study, to detect Arcobacter, 350 samples of raw milk from 5 species of animals, including cows, sheep, goats, camels, and buffaloes, and 400 samples of milk products, including cheese, cream, butter, and traditional ice cream, were randomly selected. Samples were taken from the dairies of Isfahan city and around Isfahan and were transferred to the microbiology laboratory of Kurd University in the shortest possible time. Then, bacteria grown in Preston medium with the help of a sterile loop on CAMP medium (Merck-Germany), enriched with defibrinated sheep blood containing antibiotics such as vancomycin 2 mg/ml, polymyxin 0.005 mg/ml, tri Methoprim was 1 mg/ml, linear culture was done. Also, in order to evaluate the phenotypic antibiotic resistance, the simple disk diffusion method was used according to CLSI (2017) criteria

Results showed that out of a total of 350 samples of raw milk and 400 samples of milk products examined, 18 samples were infected with at least one species of Arcobacter. These 18 cases were only isolated from raw milk and none of the milk products were infected with this bacterium. Also, out of 18 samples infected with Arcobacter species, 15 samples were infected with Arcobacter botzeleri and 3 samples were infected with Arcobacter cari aerophilus.

It was concluded that the highest antibiotic resistance was also evaluated for ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cephalothin, cefotaxime and tetracycline.

Keywords: Arcobacter, raw milk, antibiotic resistance

**Corresponding author: Ebrahim rahimi*

Address: Department of Veterinary, shahrekord Branch, Islamic Azad University,shahrekord, Iran

E. mail: ebrahimrahimi55@yahoo.com