تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اسید لاکتیک پنیرسنتی تالشی تولید شده از شیر خام

سید حدیثه موسوی[1]، تیوا کفیلی[2*]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

2- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بویین زهرا، دانشگاه آزاد اسلامی، بویین زهرا، ایران

تاریخ دریافت: 95/08/08 تاریخ پذیرش: 96/08/04

چکیده

در این پژوهش مقاومت آنتی بیوتیکی 26 ژنوتیپ از باکتری‌های اسیدلاکتیک شناسایی و جدا شده از یک نوع پنیر سنتی بنام پنیر تالشی بررسی و تعیین گردید. آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی شامل پنی‌سیلین، ریفامپسین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و نئومایسین بود. نتایج حاصله نشان داد، اکثرسویه‌ها به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین در دامنه 0/25 µg/ml -8 حساس بودند. دامنه حساسیت لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم نسبت به پنی‌سیلین بالاتر بود (µg/ml 64- 16). میزان MIC آنتی بیوتیک‌های (جنتامایسین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین) در اکثر گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس در دامنه (2-32 µg/ml) مشاهده شد. لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس ساکئی نسبت به تتراسایکلین و تمامی ژنوتیپ‌های پاراپلانتاروم و پاراکازئی نسبت به کلرامفنیکل مقاومت ذاتی نشان داده در حالی‌که تمامی سویه‌ها نسبت به اریترومایسین حساس تشخیص داده شدند. تمامی گونه‌های مورد آزمایش در غلظت‌های پایین ریفامپسین قادر به رشد نبودند. استرپتوکوکوس گالولیتیکوس، نسبت به کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها بجز استرپتومایسین همچنین انتروکوکوس فکالیس/فیسیوم به کلیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه حساس تشخیص داده شدند. نتایج بدست آمده از تفسیرداده‌ها با نرم افزار MVSP نیز، علاوه بر اثبات تنوع فنوتیپی بالا، کارآیی این روش در تفکیک جنس‌ها و حتی گونه‌ها را نشان داد. بنابراین می‌تواند بعنوان یکی از روش‌های فنوتیپی درکنار سایر روش‌ها برای شناسایی سویه ها پیشنهاد گردد.

واژه های کلیدی: مقاومت به آنتی بیوتیک، باکتری اسیدلاکتیک، پنیرتالشی، MIC، دندروگرم

* مسوول مکاتبات: tivkafil@alumni.ut.ac.ir

1- مقدمه

آنتی بیوتیک ها نقش مهمی در درمان بیماری های عفونی دارند، اما استفاده بیش ازحد آنها منجر به شیوع وگستردگی مقاومت آنتی بیوتیکی در جهان شده است. این مساله امروزه به یکی از مهمترین چالشهای بهداشتی و درمانی مطرح است (19 ،1). زنجیره غذایی می تواند یکی از مهمترین مسیرهای انتقال مقاومت از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک از حیوانات به انسان باشد (23). باکتریهای اسیدلاکتیک بطورکلی جزء مواد GRASS شناخته شده اند، وحتی به بسیاری از آنها خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی نسبت داده می شود. اما انواع گونه های باکتری های اسیدلاکتیک موجود در غذای انسان، غذای دام، دستگاه گوارشی انسان و حیوانات می توانند به عنوان مخزنی از ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک عمل کنند، که قابلیت انتقال افقی به میکروارگانیسم های بیماری زا را دارند (24). محصولات لبنی و گوشتی تخمیری که قبل از مصرف فرآیند حرارتی را متحمل نمی شوند می توانند به عنوان یکی از مهمترین مسیرهای انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی از حیوان به انسان شناخته شوند (18). با اینکه مقاومت آنتی بیوتیکی تاکنون در موردگونه های پاتوژن های انسانی کاملا مطالعه شده و نتایج آن منتشر شده است، تا آنکه تیوبر و همکاران[1] (1999) پیشنهاد نمودند که قابلیت باکتری های غیربیماریزای[2] غذا در انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی به فلورمیکروبی طبیعی انسان بررسی شود (24). بدلیل اینکه امروزه سعی بر این است این باکتریها بطور عمدی وارد رژیم غذایی ما شوند، بنابراین در جداسازی و انتخاب و بکارگیری باکتری ها در تولید مواد غذایی، باید بررسی شود آنها عاری از ژن های قابل انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی باشند. بر این اساس امروزه برای انتخاب سویه هایی از باکتری اسید لاکتیک مناسب برای کشت های آغازگر جدید و کشت های پروبیوتیک، مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان یک ویژگی منفی در بررسی صفات تکنولوژیکی سویه‌ها مورد جستجو قرار می گیرد (26). مطالعات در این زمینه به تازگی آغاز شده است و در دهه اخیر محققان به تعیین خصوصیات مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری-های اسیدلاکتیک پرداخته اند (4). برای این منظور MIC[3] یعنی میزان کمینه غلظت یک آنتی‌بیوتیک که موجب بازدارندگی رشد میکروارگانیسم، مطالعه می‌شود (21). با مقایسه میزان حداقل بازدارندگی آنتی بیوتیکی گونه های متفاوت باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا سازی شده از محیط‌ها و منشاءهای متفاوت امکان تفکیک میان سویه‌های مقاوم و حساس و تفکیک میان سویه‌های مقاوم ذاتی و مقاوم اکتسابی، فراهم می‌شود (5). پنیر تالشی یک پنیر سخت است که به طور سنتی و بدون افزودن آغازگر و با استفاده ازمخلوطی از شیرگوسفند و بز درکوهستان‌های منطقه تالش گیلان تولید شده و از عطر و طعم و کیفیت بالایی برخوردار است. با توجه به روند رو به رشد مطالعه بر روی محصولات سنتی در سطح دنیا، به منظور حفظ آن ها به عنوان منابع با ارزش ذخایر ژنتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک و یا تولید صنعتی آن ها به منظور اطمینان از کیفیت بهداشتی، در این تحقیق بر روی سویه های جدا و شناسایی شده از پنیر تالشی آزمون‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به عمل آمده تا ضمن بررسی آن ها از لحاظ دارا بودن ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی منتقل شونده و مخاطرات احتمالی برای سلامت مصرف کننده، در مطالعات بعدی و طراحی کشت آغازگر برای این پنیر حذف شوند.

2- مواد و روش ها

در این مطالعه میزان حداقل بازدارندگی، 26 سویه دارای ژنوتیپ متفاوت از میان 54 سویه و درمورد ده آنتی بیوتیک رایج در درمان بیماری ها تعیین و مورد بررسی واقع شد. سویه ها با استفاده از روش RAPD-PCR[4] و16S rRNA شناسایی شده اند (1).

1-Teuber

2-Commensal

3-Minimum Inhibitory Concentration

4- Random Amplified Polymorphic DNA

2-1- فعال سازی مجدد جدایه ها

کلنی های منفرد از محیط های کشت MRS وM17 (مرک، آلمان) انتخاب شده و بصورت خطی تا سه بار تجدید کشت شدند. سپس پس از شناسایی با روش 16 S rRNA به محیط های MRS براث و M17 براث حاوی 20% گلیسرول (مرک، آلمان) منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در دمای °C 25- نگهداری شدند. جهت فعال سازی 100µl از هر معلقه بر روی پلیت هایMRS وM17 کشت سطحی شده و سپس یک کلنی انتخاب و بصورت خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت، و بترتیب در دمای30°C و 37°C گرمخانه گذاری شدند.

2-2- روش رقیق سازی

رقت‌های مورد نیازآنتی بیوتیک ها با توجه به غلظت اولیه مندرج توسط شرکت تولیدکننده و با توجه به رابطه زیر تهیه شدند.

$(1000/P)\times V\times C = W$

P: میزان قدرت آنتی‌بیوتیک اعلام شده توسط شرکت سازنده

W: وزن آنتی‌بیوتیکی که در حجم V باید حل شود

V: حجم مورد نیاز

C: غلظت نهایی محلول

جهت تهیه محلول مادر هرآنتی‌بیوتیک با غلظت 50 mg/ml، ابتدا 500 میلی‌گرم پودرآنتی بیوتیک وزن شده و در 10 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس 2 میلی‌لیتر از محلول با غلظت 50 mg/ml به 8 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده تا غلظت 10000 mg/L حاصل شود. جهت بدست آوردن سایر غلظت‌های مورد نیاز بصورت زیر عمل شد:

1000 µl از محلول با غلظت 10.000 mg/L +9ml حلال: 1000 mg/L و100 µl از محلول با غلظت 10000 mg/L+ 9/9 ml حلال: 100 mg/L. برای محاسبه سایر محدوده غلظتی مورد نیاز (0/25-128 mg/L)، 11 لوله آزمایش استریل با اعداد 128 mg/L، 64، 32، 16، 8، 4، 2، 1، 0/5، 0/25 و 0 نامگذاری شدند. از محلول ذخیره 10000 mg/L، 6µ25l وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 128 mg/L، 128µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 64 mg/L. 64 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 32 mg/L، µl 32 وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 16 mg/L. ازمحلول ذخیره 1000 mg/L، 160 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 8 mg/L، 80 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 4 mg/L و40 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده 2 mg/L. ازمحلول ذخیره mg/L 100، 200 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده mg/L 1 و 100 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده mg/L 0/5 و 50 µl وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده mg/L 0/25. به لوله آزمایش برچسب گذاری شده 0 mg/ L هیچ آنتی بیوتیکی اضافه نگردید (22).

2-3- تهیه استاندارد نیم مک فارلند، معلقه میکروبی و نحوه کشت و خواندن نتایج

0/5 ml ازکلرور باریم ($BaCl_2$) 0/048 mol/l ($2H_2O$) . $BaCl_2$ 1/175W/V%) را به 99/5 ml اسیدسولفوریک 0/18mol/L (1 V/V%) اضافه کرده و سپس در لوله های 4-6 ml هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. قبل از استفاده نیز سوسپانسیون با استفاده از ورتکس، به کدورت یکنواخت رسانده می‌شد. جهت تهیه معلقه میکروبی نیز چندکلنی مجزا و مشابه، در سرم فیزیولوژی حل شده تا به غلظت برابر با مک فارلند برسد. با وجود روش دقیق‌تر اسپکتروفتومتری این روش چشمی بدلیل سرعت بالا و صحت کافی آن مورد استفاده قرارگرفت. به چاهک‌های طولی میکروپلیت، 75 µl از معلقه میکروارگانیسم (بجز چاهک آخر) و ۷۵ µl از رقت های آنتی بیوتیک (بجز دو چاهک آخر) اضافه شد. جهت همگن کردن، 4 مرتبه پیپت می‌شد. میکرو پلیت با پارافیلم پوشانده شده و لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوکسی‌ها بترتیب در 30°C و 37°C بمدت 24 ساعت نگهداری شدند. میکروپلیت‌ها با توجه به چاهک‌های کنترل منفی و مثبت خوانده شدند.

جدول 1- نحوه کشت دریک میکرو پلیت جهت تعیین حداقل بازدارندگی آنتی بیوتیکی

پنی سیلین	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A کشت جدایه 1	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
B (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C جدایه 2	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
D (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E جدایه 3	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
F (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
G جدایه 4	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
H(کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

سطرهای A، C ،E، G: جدایه های کشت شده در چاهک های محتوی غلظت های مختلف یک آنتی بیوتیک. سطرهای B، D ،F، H: جدایه های کشت شده در چاهک های فاقدآنتی بیوتیک (بعنوان کنترل). چاهک های 1 تا 10: حاوی رقت های 0/25 µl/mg تا 128 یک آنتی بیوتیک مورد آزمایش. چاهک 11: کنترل مثبت، حاوی میکروارگانیسم و فاقد آنتی بیوتیک، جهت بررسی کافی بودن محیط کشت برای حمایت از رشد. چاهک 12: کنترل منفی، حاوی محیط کشت فاقد میکروارگانیسم، جهت بررسی استریلیزه بودن محیط کشت.

2-4- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری، ابتدا ماتریس صفر و یک داده‌ها تشکیل شد (ردیف‌ها: جدایه‌ها وستون‌ها: میزان MIC). سپس با استفاده از نرم افزار MVSP [1] و الگوریتم تجزیه خوشه‌ای UPGMA[2]، دندروگرم مربوطه رسم و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

3- بحث و نتایج

3-1- نتایج مربوط به تعیین میزانMIC با استفاده از روش رقیق سازی در چاهک[3]:

54 سویه از باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از پنیرسنتی تالشی جهت بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد آزمون رقیق سازی در چاهک قرارگرفتند. این باکتری‌ها بترتیب لاکتوباسیلوس پلانتاروم (5 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم (15 سویه، دارای 6 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس کرواتوس[4] (4 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس ساکئی (3 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس پاراکازئی (11 سویه، 5 ژنوتیپ)، استرپتوکوکوس گالولیتیکوس[5](9 سویه، 5 ژنوتیپ)، انتروکوکوس فکالیس/فیسیوم (7 سویه، 4 ژنوتیپ)، بودند که جمعا 26 سویه دارای ژنوتیپ متفاوت انتخاب شده و مورد آزمون آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، ریفامپسین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل،اریترومایسین، تتراسایکلین، نتامایسین،کانامایسین،

1-Multivariate statistical package
2- Unweighted pair group
3-Microdilution
4-Lb. Curvatus
5- St. Gallolyticus

استرپتومایسین، نئومایسین، پنی سیلین[1] (فارابی، ایران)، آمپی سیلین[2](فارابی، ایران)، اریترومایسین[3](فارابی، ایران)، جنتامایسین[4](ابوریحان، ایران)، استرپتومایسین[5](جابر ابن حیان، ایران)، نئومایسین[6](داروپخش، ایران)، تراسایکلین[7](حکیم، ایران)، کلرامفنیکل[8](الحاوی، ایران)، ریفامپسین[9](حکیم، ایران)، کانامایسین[10](عرفان دارو، ایران) قرار گرفتند. در تعیین مقادیر بحرانی[11] نیز به FEEDAP[۱۲] استناد شده است. درجداول 2 و 3، سویه‌هایی که مشکوک به مقاومت تشخیص داده شده‌اند با کادر رنگی نشان داده شده‌اند.

3-2- بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتو باسیلوس ها

نتایج مربوطه در جدول 2 نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می شود، نتایج نشان دادند که اکثر سویه های لاکتوباسیلوس به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین µg/ml (25-0/8) و پنی سیلین حساس بوده اما در عین حال میزان حداقل غلظت بازدارندگی پنی سیلین برای لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم از سایرگونه ها بیشتر بوده و حتی از نقطه بحرانی تعیین شده، بالاتر گزارش شد. این نتایج با نتیجه تحقیق کلر و همکاران (2007) وکفیلی و همکاران (2010) مطابقت داشت (14، 13). اما بدلیل احتمال روی دادن جهش گونه های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم در روش رقیق سازی در چاهک نمیتوان بر مقاوم بودن این سویه ها تاکید نمود و بررسی های ژنتیکی مبتنی بر جستجوی ژن مقاومت جهت اطمینان بایستی انجام شود. نتایج مقاومت لاکتوباسیلوس ها به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی موثر بر روی سنتز پروتئین (جنتامایسین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین) نشان داد میزان حداقل بازدارندگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کرواتوس تا حدودی در میان گونه های مختلف لاکتوباسیلوس در محدوده یکنواخت تری قرار داشت (2-32 µg/ml). بسیاری از داده ها نشان دهنده حساسیت سویه ها بود اما برخی سویه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم نسبت به کانامایسین و استرپتومایسین مقاومت نشان دادند.یک ژنوتیپ از لاکتوباسیلوس کرواتوس نسبت به استرپتومایسین، هر دو ژنوتیپ لاکتوباسیلوس ساکئی و دو ژنوتیپ لاکتوباسیلوس پاراکازئی نسبت به کانامایسین و استرپتومایسین مقاومت نشان دادند. همچنین نتایج حاکی از بالاتر بودن میزان MIC استرپتومایسین (16 -64 µg/ml) نسبت به جنتامایسین (2-8 µg/ml) در اکثرگونه ها بود. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقات دانیلسون و ویند (2003) وکورهونن (2008) مطابقت داشت (16، 8). همچنین دانیلسون و ویند (2003) در سویه ای از لاکتوباسیلوس کرواتوس جدا شده از پنیر تولید شده از شیر خام ژن‌های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلوکوزید مانند aacA-aphD را یافتند (8). مقاومت لاکتوباسیلوس ها نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی قبلا نیز بارها توسط محققان گزارش شده بود (13، 8، 7، 27). هایز و همکاران (2008)، 65 سویه لاکتوباسیلوس کازئی و پاراکازئی را با روش رقیق سازی در چاهک و محیط کشت مولر هینتون بررسی نمودند، این سویه‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و کلیندامایسین حساسیت نشان داده اما در برابر استرپتومایسین و جنتامایسین مقاومت نشان دادند (12). این مقاومت قبلا نیز گزارش شده بود و بدلیل نبود سیستم سیتوکرومی انتقال الکترون است که دریافت آنتی‌بیوتیک را مختل می‌سازد (21). نتایج بدست آمده احتمال ذاتی بودن مقاومت را تقویت می‌کند. نتایج مربوط به بررسی مقاومت چندگونه لاکتوباسیلوس نسبت به آنتی بیوتیک‌های

1-Penicillin
2 -Ampicillin
3 -Erythromycin
4- Gentamycin
5 -Streptomycin
6 -Neomycin
7- Tetracyclin
8 -Chloramphenicol
9 -Rifampicin
10-Kanamycin
11-Break point
12- Panel on Additives and products or substances used in Animal Feed

موثر بر روی سنتز پروتئین تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین نشان داد لاکتوباسیلوس‌های پاراپلانتاروم و ساکئی نسبت به تتراسایکلین، همچنین تمامی ژنوتیپ‌های پاراپلانتاروم و پاراکازئی نسبت به کلرامفنیکل مقاومت نشان دادند درحالی‌که تمامی سویه ها نسبت به اریترومایسین حساس تشخیص داده شدند. این نتایج قبلا نیز گزارش شده بود برای مثال، هایز و همکاران (2008) در سه سویه لاکتوباسیلوس پاراکازئی مقاومت اکتسابی به تتراسایکلین (MIC ≥ 32 mg/ml)، اریترومایسین (MIC ≥16 mg/ml) کشف نموده و دلیل آن را اکتساب بترتیب ژن‌های tet (M) یا tet (W) و ژن erm (B) اعلام کردند (12).

جدول 2- بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوباسیلوس ها Lb: لاکتوباسیلوس pp: پاراپلانتاروم p: پلانتاروم c: کرواتوس pc: پاراکازئی

نام سویه	Km	Rif	Cm	Tc	Nm	Sm	Gm	Em	Am	Pc
Lb.pp1	32	16	8	32	2	64	2	1	0/25	16
Lb.pp2	64	1	8	32	8	32	2	1	8	32
Lb.pp3	32	1	8	32	2	32	4	0/5	4	64
Lb.pp4	64	1	16	32	8	64	8	0/12	2	32
Lb.pp5	32	32	8	64	16	32	2	0/5	1	64
Lb.pp6	128	16	32	32	8	64	4	0/5	1	32
Lb.p1	16	0/5	4	2	4	16	4	1	0/25	1
Lb.p2	32	1	8	0/12	2	16	4	0/25	1	1
Lb.s1	128	0/5	1	16	16	16	8	0/12	2	2
Lb.s2	256	0/25	4	32	16	64	8	0/25	2	1
Lb.c1	16	0/25	0/25	2	4	32	4	0/12	0/5	0/25
Lb.c2	8	0/25	0/12	2	4	16	8	0/12	0/25	0/25
Lb.pc1	16	0/5	8	1	2	16	1	0/5	0/25	0/5
Lb.pc2	16	0/5	8	2	2	16	2	1	0/25	1
Lb.pc3	32	0/5	8	2	4	16	2	1	0/25	1
Lb.pc4	32	1	8	1	4	32	4	2	1	1
Lb.pc5	64	1	8	2	4	32	4	2	4	1

PC: پنی سیلین، Am: آمپی‌سیلین، Rif: ریفامپسین، Cm: کلرامفنیکل، Em: اریترومایسین، Tc: تتراسایکلین، Gm: جنتامایسین، Km: کانامایسین، St: استرپتومایسین، Nm: نئومایسین

ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین مانند tet (M) نیز در بسیاری ازگونه‌های لاکتوباسیلوس گزارش شده است (6 ،3). مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها همچنین در استرپتوکوکسی‌ها و انتروکوکسی‌ها نیز دیده شده است که نشان دهنده اینست که هیچ مانع و سدی بین لاکتوباسیلوس‌ها وگونه‌های پاتوژن نیست (24) تمامی گونه‌های موردآزمایش درغلظت‌های پایین ریفامپسین قادر به رشد نبودند. این نتایج قبلا نیز گزارش شده بود (14).

3-3- بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی لاکتوکوکسی‌ها

نتایج مربوط به بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی لاکتوکوکسی‌ها در جدول 3 نشان داده شده است. استرپتوکوکوس گوآلیتیکوس که یکی از اعضای گروه استرپتوکوکوس بویس شناخته می شود، علاوه بر پنیر تالشی قبلا نیز در نمونه‌های لبنی جداسازی و شناسایی شده است. نتایج نشان داد میزان حداقل بازدارندگی برای کلیه آنتی‌بیوتیک ها بجز استرپتومایسین در این جنس در حد حساس تشخیص داده شدند. این نتایج با برخی نتایج بدست آمده تطابق داشته اما برخی محققان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی را برای تتراسایکلین، اریترومایسین وکانامایسین در سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های بیمارستانی گزارش نموده اند (11 ،4). یکی از دلایل احتمالا تفاوت منشاء جداسازی این سویه‌هاست. با توجه به این که تاکنون تحقیقی درمورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های این باکتری که از منشاء لبنی جداسازی شده باشند انجام نشده است، امکان مقایسه و نتیجه‌گیری دقیق‌تر فراهم نیست.

جدول 3- بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و انتروکوکوس های فکالیس/فیسسوم

نام سویه	Km	Rif	Cm	Tc	Nm	Sm	Gm	Em	Am	Pc
St. g1	16	1	4	0/12	8	16	1	0/12	0/12	0/25
St. g2	16	2	2	0/12	8	16	2	0/25	0/12	0/25
St. g3	16	2	2	0/12	16	16	4	0/25	0/12	0/25
St. g4	16	2	2	0/5	16	8	4	0/5	0/5	0/25
St. g5	32	2	4	0/5	16	16	4	0/5	0/5	0/25
E. f1	8	8	4	1	2	4	1	1	0/25	8
E. f2	8	8	4	1	2	16	1	1	0/5	8
E. f3	8	8	4	1	4	32	4	4	1	4
E. f4	16	16	8	1	4	32	4	8	0/25	8

PC: پنی سیلین، Am: آمپی‌سیلین، Rif: ریفامپسین، Cm: کلرامفنیکل، Em: اریترومایسین، Tc: تتراسایکلین، Gm: جنتامایسین، Km: کانامایسین، St:استرپتومایسین، Nm: نئومایسین

باتوجه به اینکه برای درمان بیماری های احتمالی از عفونت ناشی از این میکروارگانیسم از ترکیب پنی‌سیلین و یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی استفاده می‌گردد خوشبختانه تاکنون گزارشی از مقاومت پنی‌سیلینی این باکتری منتشر نشده است. مقاومت نسبتا بالا نسبت به استرپتومایسین که در سویه-های مورد مطالعه دیده شد، با روش رقیق سازی در چاهک قبلا نیز گزارش شده بود اما پس از انجام آزمون‌های مبتنی بر PCR این مقاومت ناشی از جهش کروموزومی و نه مقاومت اکتسابی اعلام شد (17). انتروکوکوس های فکالیس/فیسیوم که منشاء آنها دستگاه گوارش است، از مهمترین پاتوژن‌ها هستند.این جنس بعنوان باکتری اسیدلاکتیک از اهمیت کمتری برخوردار است. ازآنجا که این جنس توسط محققان بسیاری در نمونه‌های پنیرگزارش شده است، نقش این باکتری بعنوان عامل مثبت در رساندن پنیر و تولید ترکیبات سودمند وحتی پری‌بیوتیک و یا یک عامل تهدید کننده سلامتی بدلیل تولید آمین‌های بیوژنیک هنوز مورد مناقشه محققان است (17). یکی دیگر از مهمترین دلایل نگرانی محققین نسبت به این میکروارگانیسم بدلیل مقاومت آن نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های متداول مانند آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، پنی‌سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک ها است. یکی از موارد مطرح نمودن انتروکوکوس‌ها بعنوان پاتوژن‌ها اسحتصال مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و نیز پتانسیل آنها برای مبادله اطلاعات ژنتیکی بوسیله مکانیسم الحاق[22]مطرح شده است (20). معمولا در عفونت‌های انتروکوکوسی ازآمپی‌سیلین استفاده می شود. چنانچه دیده می‌شود میزان MIC آمپی‌سیلین در سویه‌های جداسازی شده از پنیر سنتی تالشی در حد پایین و در محدوده (0/25-1 μg/mL) تعیین شده است. دلیل مقاومت پایین انتروکوک‌ها نسبت به آمپی‌سیلین، وجود پروتئین‌های با تمایل کم نسبت به اتصال با پنی‌سیلین (PBP[۲۳]) می باشد (9). با این حال این نتایج با نتایج موری و همکاران (1990) که میزان MIC سویه های انتروکوکوس فکالیس از نمونه‌های کلینیکی را از 0/5 -4 μg/ml و برای برخی سویه‌ها حتی مقادیر 4-8 μg/ml گزارش کردند، مغایرت دارد (20). از دلایل این تفاوت، احتمالا منشاء جداسازی متفاوت آنها (پنیر و نمونه‌های بیمارستانی) باشد. محققان گسترش مقاومت آمپی‌سیلین-پنی‌سیلینی را درگونه‌های انتروکوکی به تولید آنزیم بتالاکتاماز و یا تغییرات در ساختمان پروتئین PBP نسبت داده اند (9،24). این آنزیم در انتروکوکوس‌ها برخلاف استافیلوکوکوس اورئوس (که به این آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است) بمیزان کمی تولید می شود که دلیل مقاومت نسبی برخی انتروکوکوس‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها به این دلیل می‌باشد. همچنین سایر نتایج مربوط به مقاومت در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که میزان حداقل غلظت بازدارندگی برای آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین، کانامایسین، نئومایسین و اریترومایسین) پایین و کاملا حساس تشخیص داده شد. این نتایج با نتیجه منتشر شده سایر محققین که آزمایشات مشابهی را بر روی سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های غذایی انجام داده بودند، مطابقت نشان داد. نادتسون و هارتمن (1993) برسویه‌های جدا شده از گوشت خام، و فرانز و همکاران (2001) و تیوبر و همکاران (1999)، بترتیب با آزمایش بر سویه‌های جدا شده از شیر تخمیری و محصولات گوشتی مقاومت پایین آنتی بیوتیکی را در گونه‌های انتروکوکوس فکالیس/فیسیوم گزارش نمودند (10،15،24). همگی سویه ها با 4 ژنوتیپ مختلف نسبت به ریفامپسین حساسیت نشان دادند اما با این حال اعلام شده است، با اینکه این آنتی‌بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی کاملا رشد انتروکوک‌ها را مهار می‌کند اما در شرایط بیولوژیکی این باکتری بسرعت نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت کسب می‌کند (11،24). این مساله استفاده از این آنتی‌بیوتیک را در

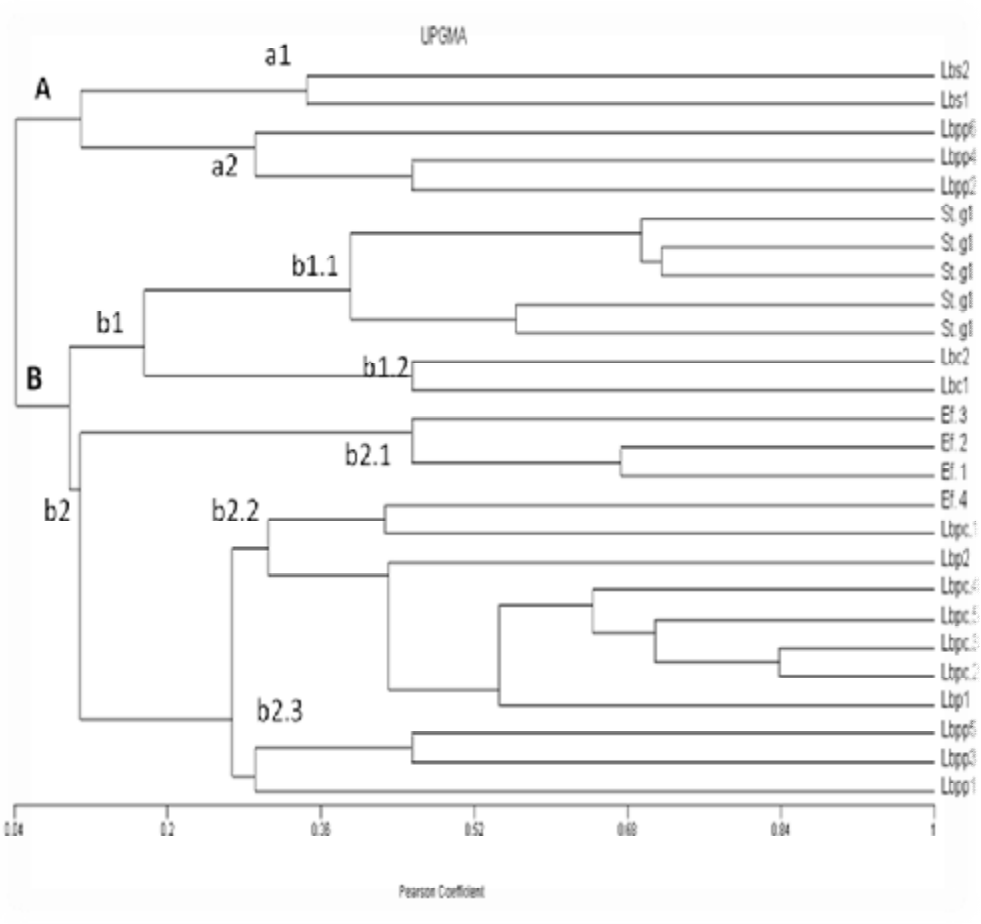
22-Conjugation

23-penicillin-binding protein

موارد درمانی بیماری های ناشی از این باکتری با تردید مواجه می‌سازد. این نتایج این نظریه راکه با وجود بودن برخی گونه-های پاتوژن و فرصت طلب در جنس انتروکوکوس و با توجه به عدم تشخیص هیچگونه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های جداسازی شده از نمونه‌های غذایی، آنها می‌توانند بعنوان گونه‌های پروبیوتیک مطرح شوند را قوت می بخشد (2).

3-4- دندروگرم حاصل از داده‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی

آنالیز UPGMA الگوی فنوتیپی مربوط به سویه های انتخاب شده بعنوان نماینده هر ژنوتیپ با استفاده از ضریب پیرسون، منجر به تولید دندروگرم نشان داده شده در شکل 1 شده است. این دندروگرم، 26 ژنوتیپ حاصله را در 26 فنوتیپ متفاوت خوشه بندی کرده است که نشان دهنده تنوع فنوتیپی بالایی است. دو خوشه فنوتیپی اصلی (A و B) دراین دندروگرم دیده می شودکه هرکدام دارای زیر خوشه‌های a1 و a2 و (b1.1, b1.2) و (b2.1, b2.2, b2.3) هستند. در خوشه A لاکتوباسیلوس‌های ساکئی و پاراپلانتاروم و در خوشه B طیف متنوع‌تری شامل انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و لاکتوباسیلوس‌های کرواتوس و پاراپلانتاروم گروه‌بندی شده اند. همچنین دراین مطالعه برای اولین بار ایده استفاده از رسم دندروگرم بر اساس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت روشی برای تفکیک جنس‌ها وگونه‌های مختلف اسیدلاکتیک مورد بررسی قرار داده شد. چنانچه دیده می شود، با استفاده از این روش، تا حدود زیادی می توان جنس‌ها و حتی برخی گونه‌ها را از یکدیگر تفکیک نمود. برای مثال جنس‌های استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در زیر خوشهb1.1 و انتروکوکوس فکالیس در زیر خوشه b2.1 و گونه لاکتوباسیلوس ساکئی در زیرخوشه a1 تفکیک شده اند. اما این تکنیک قادر به تمایز همه گونه-های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و پلانتاروم و پاراکازئی نبوده و بنابراین نیاز به سایر آزمایشات تکمیلی است. با اینحال عدم تفکیک پذیری این گونه‌ها بدلیل شباهت فنوتیپی و ژنتیکی بالا با تکنیک‌های فنوتیپی وحتی روشrRNA16 قبلا نیز گزارش شده بود (25).



شکل 1- دندروگرم رسم شده بر اساس آنالیز UPGMA و ضریب پیرسون، Lbpp: لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، Lbs: لاکتوباسیوس ساکئی، Stg: استرپتوکوکوس گوآلیتیکوس، Ef: انتروکوکوس فکالیس، Lbpc: لاکتوباسیلوس پاراکازئی، Lbp : لاکتوباسیوس پلانتاروم، Lbc : لاکتوباسیلوس کرواتوس

4- نتیجه گیری

بطورکلی می‌توان نتیجه گیری نمود که اغلب سویه های جداسازی شده که عمدتا از جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و استرپتوکوکوس بوده دارای میزان حداقل بازدارندگی کمتر از نقطه شکست (بحرانی) بودند. با این حال در برخی سویه‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده شد که با توجه به نتایج و مطالعات محققان پیشین می توان آن را، مقاومت ذاتی و یا اکتسابی غیر قابل انتقال دانست. مقاومت لاکتوباسیلوس های پاراپلانتاروم نسبت به پنی‌سیلین نیز، به احتمال روی دادن جهش در روش رقیق سازی با چاهک نسبت داده می‌شود. با وجود عدم تشخیص گونه‌های مقاوم در گزارش، سالم شناختن و بعنوان پروبیوتیک مطرح کردن گونه‌های باکتری اسیدلاکتیک که تاکنون کاملا بی خطر بنظر می‌رسیدند، از لحاظ عدم حمل ژن‌های قابل انتقال نیاز به مطالعات تکمیلی‌تر دارد. در این تحقیق همچنین با استفاده از داده‌های متنوع بدست آمده از تعیین میزان کمینه غلظت بازدارنده سویه‌های مختلف با روش رقیق سازی در چاهک و با رسم دندروگرم مربوط، قابلیت این روش در تفکیک جنس‌ها وگونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان از کارآیی نسبتا بالای این روش بعنوان روشی تاییدی در تفکیک و شناسایی باکتریهای اسیدلاکتیک داد.

5-منابع

1.همین نویسنده. 1394. شناسایی سویه های باکتری اسید لاکتیک پنیرسنتی تالشی با استفاده از روش‌های S 16rRNA وRAPD-PCR، دومین همایش ملی تازه های سلولی مولکولی، واحدپرند، تهران.

2. Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., et al. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. International Journal of Food Microbiology, 123: 38-49.

3. Ammor, M.S., Belén Florez, A. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 24 (6): 559-570.

4. Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G. andGardini, F. 2009. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. Journal of food protection, 72: 2162-2169.

5. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species. Journal of food protection, 61: 1636-1643.

6. Chopra, I. and Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology molecular biology review, 65: 232-260.

7. Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Salzano, G. and Sorrentino, E. 2005. Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Le lait, 85: 193-204.

8. Danielsen, M. and Wind, A. 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Internationaljournal of food microbiology, 82: 1-11.

9. Fontana, R., Cerini, R., Longoni, P., Grossato, A. and Canepari, P. 1983. Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. Journal of Bacteriology, 155: 1343-50.

10. Franz, C. M., Hummel, A. and Holzapfel, W. H. 2005. Problems related to the safety assessment of lactic acid bacteria starter cultures and probiotics. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 96: 39-65.

11. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. EMS Microbiology Reviews, 26(2): 163-171.

12. Huys, G., D'Haene, K., Danielsen, M., Mättö, J., Egervärn, M. and Vandamme, P. 2008. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in Lactobacillus paracasei strains of food origin. Journal of food protection, 71 (2): 339-344.

13. Kafili, T. and Mayo, B. 2010. Antibiotic resistance-susceptibility profiles of Lactobacillus strains from Lighvan, a traditional Iranian raw milk cheese", Milchwissenschaft, 65(1): 59-62.

14. Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, B., Kettlitz, C., Borgmann, S., Schulte, B., et al. 2005. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant Enterococcus faecium of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. European journal clinical microbiology infection disases, 24: 815-825.

15. Knudtson, L.M. and Hartman, P. A. 1993. Antibiotic resistance among Enterococcal isolates from environmental and clinical sources. Journal of Food Protection, 56: 489-492.

16. Korhonen, J. M., Danielsen, M., Mayo, B., Egervarn, H., Axelsson, L., Huys, G., et al. 2008. Antimicrobial susceptibility and proposed microbiological cut-off values of lactobacilli by phenotypic determination. International Journal of probiotics and prebiotics, 3: 257-268.

17. Leclercq, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clinical Infective Disease, 15: 482–492.

18. Lukaova, J. and Sustackova, A. 2003. Review article. Enterococci and antibiotic resistance. Acta veterinariabrno, 72: 315-323.

19. Mazel, D. and Davies, J. 1999. Antibiotic resistance in microbes.Cell molecular life science, 56 (9): 742-54.

20. Murray, B. And Clewell, D. B. 1988. Plasmid and pheromone response of the betalactamase producer Streptococcus (Enterococcus) faecalis HH22. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32: 547-551.

21. Piddock, L.J.V. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Journal of applied bacteriology, 68: 307-318.
22. Shrestha, A. 2011. Antibiotic susceptibility and determination of MIC of potent antibiotics used against Staphylococcus spp. isolated from raw milk. Journal for young scientists, 21: 58-65.
23. Singer, R. S., Finch, R., Wegener, H. C., Walters, J. and Lipstich, M. 2003. Antibiotic resistance- The inter play between antibiotic use in animals and human beings. Lancet infectious diseases, 3:47-51.
24. Teueber, M., Meile L. and Schwarz, F. 1999.Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van leeuwenhoek, 76: 115-137.
25. Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F. 2001. Differentiation of Lactobacillus plantarum, Lb. pentosus, and Lb. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. Appl Environmental Microbiology, 67: 3450-3454.
26. Von Wright, A. 2005. Regulating the safety of probiotics. The european approach current pharmaceutical design, 11: 17-23.
27. Zhou, J.S., Shu, Q., Rutherfurd, K.J., Prasad, J. and Gill, H.S. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains Lactobacillus rhamnosus HN001, Lb. acidophilus HN017, and Bifidobacterium lactis HN019 in BALB/c mice. International journal of food microbiology, 56 (1):87-96.