Research Paper

Evaluation of biofilm production capacity in salmonella isolated from chicken meat in Tehran municipally daily fruit and vegetable markets

Saeid Besharati[1], Parviz Owlia[1,2*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Molecular Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: powlia@gmail.com**

Citation: Besharati S, Owlia P, Ferdoosi Khosroshahi A. Evaluation of biofilm production capacity in salmonella isolated from chicken meat in Tehran municipally daily fruit and vegetable markets. Daneshvar Medicine 2020; 28(1):62-72.

Abstract

Background and Objective: One of the major issues in food hygiene and safety is the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Pathogens as well as biofilm formation can play a role in increasing bacterial resistance. In this study, biofilm formation in Salmonella isolates from chicken, drug resistance and drug resistance pattern were investigated.

Materials and Methods: In this study, 75 samples of chicken infected with Salmonella bacteria were studied. The rate of biofilm formation was assessed by microtiter plate method. Drug resistance and evaluation of drug resistance pattern were also evaluated.

Results: The results showed that in 92% (69/75) of the samples Salmonella biofilm were formed, among which the moderate biofilm with 65.2% had the highest biofilm production. Concurrent resistance to 2 classes of antibiotics (2DR) with 31.8% (22/69) was the most common type of multidrug resistance (MDR) among the biofilm-forming isolates. Resistance to imipenem, ceftriaxone and cefotaxime was observed in only 1 biofilm formation sample.

Conclusion: In this study, high biofilm formation was observed in Salmonella contaminated chicken meat samples. The high rate of antibiotic resistance in biofilm constituents is due to the increasing attention to hygienic aspects of non-transmission of food contamination to humans.

Keywords: Salmonella, Biofilm, Antibiotic resistance, Chicken meat

Received: 23 Dec 2019
Last revised: 14 Apr 2020
Accepted: 22 Apr 2020

مقاله پژوهشی

بررسی توانایی تولید بیوفیلم در سالمونلای جداشده از نمونه‌های گوشت مرغ بازارهای میوه و تره بار شهر تهران

نویسندگان: سعید بشارتی[۱]، پرویز اولیاء[۱،۲*]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: پرویز اولیاء **Email: powlia@shahed.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: یکی از موضوعات مهم در بهداشت و ایمنی مواد غذایی ظهور باکتری های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. در این میان عوامل بیماری‌زا و همچنین تشکیل بیوفیلم می‌توانند در افزایش مقاومت باکتری‌ها نقش داشته باشند. در این مطالعه، شکل‌گیری بیوفیلم در نمونه‌های سالمونلا جدا شده از مرغ، مقاومت دارویی و الگوی مقاومت دارویی در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۷۵ نمونه گوشت مرغ آلوده به باکتری سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت. میزان تشکیل بیوفیلم در آنها با روش میکرتیترپلیت بررسی شد. مقاومت دارویی و بررسی الگوی مقاومت دارویی در آنها نیز ارزیابی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در ۹۲٪ (۶۹/۷۵) از نمونه‌های سالمونلا بیوفیلم تشکیل شد که در میان آن بیوفیلم متوسط با ۶۵٫۲٪ بیشترین میزان تولید بیوفیلم را داشت. مقاومت همزمان به ۲ کلاس آنتی‌بیوتیک‌ها (DR۲) با ۳۱٫۸٪ (۲۲/۶۹) شایع‌ترین نوع مقاومت چند دارویی (MDR) در بین جدایه های تشکیل دهنده بیوفیلم بود. مقاومت به ایمی پنم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم تنها در ۱ نمونه تشکیل دهنده بیوفیلم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه میزان بالایی از تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های گوشت مرغ آلوده به سالمونلا مشاهده شد. میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم رعایت هر چه بیشتر موارد بهداشتی در عدم انتقال آلودگی مواد غذایی به انسان را مورد توجه قرار می دهد.

واژه های کلیدی: سالمونلا، بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، گوشت مرغ

دریافت: ۹۸/۱۰/۰۲
آخرین اصلاح‌ها: ۹۶/۰۱/۲۶
پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳

مقدمه

سالمونلا یک از عوامل اصلی بیماریهای منتقله از طریق غذا (Foodborne) در سراسر دنیا است. این باکتری در دستگاه گوارش حیوانات بخصوص مرغ مشاهده می‌شود و در بیشتر موارد با مصرف مواد غذایی آلوده به انسان منتقل می گردد. در ایالات متحده آمریکا تخمین زده شده است که سالانه دو تا چهار میلیون سالمونلوز در سال رخ می دهد (۱). این آلودگی در اروپا حدود ۷٪ (۲) و در برزیل ۱۱,۳٪ است (۳).

این باکتری با استفاده از فلاژل و دیگر فاکتورهای ویرولانس خود توانایی آلوده کردن سطح مواد غذایی و ایجاد بیوفیلم را دارد (٤-٦). بیوفیلم از عوامل مهم در طولانی شدن دوره درمان، تشدید علائم بالینی و حتی مرگ بیماران است (۷).

بیوفیلم دارای ساختار پلی ساکاریدی بوده که با تکثیر جمعیت باکتریایی محصور در یک ماتریکس اگزوپلی مری توسط باکتری تشکیل می شود (۸). فیزیولوژی اختصاصی بیوفیلم باعث شده تا آنها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و مکانیسم‌های سیستم ایمنی ذاتی میزبان مثل فاگوسیتوز مقاوم باشند (۹).

در بیوفیلم، عناصر ژنتیکی متحرک (مانند توالی‌های الحاقی، پلاسمیدها، ترنسپوزون ها، اینتگرون ها، جزایر بیماری‌زایی)، بیشترین شانس برای انتقال از یک سلول به سلول دیگر دارند. این افزایش انتقال افقی ژن های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، موجب ایجاد جمعیت‌های مقاوم می‌شود. این مقاومت باکتری تحت شرایط محیطی سخت و نسبت به مواد ضدمیکروبی را می توان مکانیسم باکتری برای زنده ماندن در نظر گرفت (۱۲-۱۰).

سرعت رشد سریع سالمونلا در مواد غذایی باعث شده که در صورت عدم رعایت موارد بهداشتی چه در مراکز تولیدی کوچک و چه در کارخانه‌ها بزرگ و صنعی کشتار مرغ خط تولید آلوده گردد که این امر موجب ایجاد بیوفیلم و انتشار آلودگی به خط تولید می گردد. قدرت بالای بیوفیلم در اتصال به سطوح مختلف نیازمند رعایت پاک‌سازی و آلودگی‌زدایی مناسب ماده غذایی در تمامی سطوح است (١٤-١٣).

گوشت مرغ یکی از وعده‌های غذایی اصلی در کشور ایران محسوب می گردد که آلودگی به آن می تواند از طریق مصرف مستقیم مرغ یا مواد غذایی تهیه شده از آن صورت گیرد (۱۲). بدلیل اطلاعات اندک موجود بررسی بیوفیلم در سالمونلا در ایران، در این مطالعه بیوفیلم در سروتیپ های سالمونلا جدا شده از نمونه مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه‌گیری و جداسازی

در این مطالعه مقطعی، ۱۰۰ نمونه مرغ از مراکز معتبر توزیع مرغ در ۲۲ منطقه تهران جمع‌آوری گردید و در جعبه‌های سرمایشی مناسب (Cool Box) در کمتر از ۵ ساعت به آزمایشگاه برای بررسی ارسال گردید. نمونه‌گیری از تیرماه تا اسفند ۱۳۹۷ صورت گرفت و مناطق ۲۲ گانه در تهران و تاریخ نمونه‌گیری در آنها بصور تصادفی انتخاب شد. تمامی نمونه‌های مرغ که از تاریخ تولید آنها کمتر از ٢٤ ساعت گذشته بود بررسی گردید. با استفاده از روش ISO ٦٥٧٩:٢٠٠٢ غنی‌سازی و جداسازی باکتری صورت گرفت. در ابتدا مرحله‌ی پیش غنی‌سازی ۲۵ گرم نمونه های مرغ برای جداسازی گونه های سالمونلا در ۲۲۵ میلی‌لیتر بافر پپتون واتر (BPW، pH 7، Liofilchem، Teramo، Italy) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت غنی‌سازی شده‌اند. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های غنی شده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط راپاپورت واسیلیادیس سوی براث (RVS) منتقل گشت و برای ٢٤ ساعت در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد و همچنین ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های غنی شده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط تتراتیونات براث (Liofilchem، Teramo، Italy) برای ٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از محیط های کشت تتراتیونات

براث و راپاپورت واسیلیادیس سوی براث با استفاده از سمپلر برداشته و بر روی محیط زایلوز لیزین دکستروز آگار (XLD) و بیسموت سولفید آگار (Liofilchem, BSA، Teramo، Italy) تلقیح گشت. ویژگی های کلنی هایی سالمونلا با (کلنی هایی با مرکز سیاه در محیط XLD) در محیط نوترینت آگار (Liofilchem، Teramo، Italy) برای انجام آزمایش های بیوشیمیایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴–۱۸ ساعت انکوبه شد. پس از تخلیص نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی بیشتر نگهداری شدند (۱۵).

تعیین سرگروه در جدایه های سالمونلا

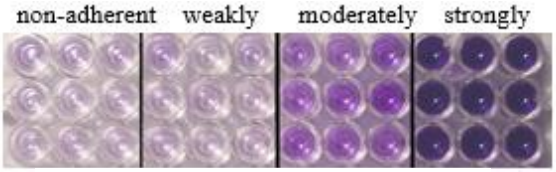
برای مشخص نمودن سرگروه های جدایه های سالمونلا، با روش لاتکس آگلوتیناسیون از آنتی سرم های A تا D مربوط به سرگروه های مختلف باکتری (شرکت بهارافشان، ایران) استفاده شد. در این روش ابتدا یک لوپ کلنی تازه از محیط نوترینت آگار بر روی لامل قرار داده شده سپس یک قطره از آنتی سرم های مربوط به سرگروه های A تا D بر روی آن قرار گرفت و در صورت تشکیل آگلوتیناسیون بعد از ۳۰ ثانیه مثبت در نظر گرفته شد.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل (CLSI 2018 (16 استفاده شد. بعد از کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط نوترینت آگار تعدادی از کلنی ها از محیط کشت به لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی منتقل و برای ایجاد کدورت یکسان ورتکس گردید. در انتها کدورت ایجاد شده در لوله با لوله حاوی نیم مک فارلند استاندارد بررسی و مقایسه گردید. دیسک های آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل موارد زیر است: ایمی پنم (۱۰ μg)، آزیترومایسین (۱۵ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، فوکسیتین (۳۰ μg)، سفتری اکسون (۳۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، تتراسیکلین (۳۰ μg)، جنتامیسین (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg) و تری متوپریم-سولفاموکسازول (۲۵ μg) (Mast Group, UK).

اندازه‌گیری تولید بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

برای اندازه‌گیری میزان تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌ها از روش میکروتیترپلیت استفاده گردید (۱۷). باکتری در محیط مولر هینتون براث (MHB) به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37° c انکوبه گردید. سپس کشت به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط مولر هینتون براث (MHB) تازه رقیق شد تا OD برابر با نیم مک فارلند حاصل آمد. از سوسپانسیون میکروبی حاصل، 200 µl در چاهک میکروپلیت ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در c37° انکوبه شد. از محیط مولر هینتون براث (MHB) تلقیح نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از گذشت زمان مذکور، برای حذف باکتری های متصل نشده، چاهک ۳ مرتبه با (200 µl PBS (pH: 7.4 شسته شده و برای خشک شدن میکروپلیت به صورت وارونه قرار گرفت. بعد از خشک شدن چاهک‌ها در جریان هوا، ابتدا بیوفیلم توسط متانول فیکس و بعد در ادامه در چاهک 150 µl رنگ کریستال ویوله ۱٪ ریخته شد و پس از ۱۰ دقیقه، رنگ با جریان آب شستشو داده شد. بعد از خشک شدن میکروپلیت، رنگ متصل شده به بیوفیلم درون چاهک با افزودن 150 µl استیک اسید ۳۳٪ از جداره میکروپلیت آزاد گردید. جذب نوری چاهک در طول موج 570 nm به وسیله الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. OD بالاتر نشان دهنده بیوفیلم قوی تر بود. درجه بیوفیلم تشکیل شده طبق جدول ۱ مشخص گردید. آزمایش به صورت ۳ بار تکرار انجام شد (۱۸).



شکل ۱. توانایی ایجاد بیوفیلم توسط *سالمونلا* با روش میکروپلیت

جدول ۱ تفسیر تولید بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت

نتیجه	OD
عدم تولید بیوفیلم	$OD_t \leq OD_c$
بیوفیلم ضعیف	$OD_c < OD_t < 2\times OD_c$
بیوفیلم متوسط	$2\times ODc < OD_t < 4\times OD_c$
بیوفیلم قوی	$OD_t \geq 4\times OD_c$

OD_t: **OD** نمونه مورد آزمایش

OD_c: **OD** شاهد منفی

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات مربوط به نمونه‌های گوشت مرغ و متغیرهای همچون آلودگی با سالمونلا، سرگروه، مقاومت دارویی چندگانه (MDR) توسط کای اسکوایر نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ ارزیابی و معنادار بودن تفاوت با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بررسی شد. برای دقت در اندازه‌گیری بیوفیلم تمامی نمونه‌ها ۳ بار تکرار شدند.

نتایج

فراوانی آلودگی با سالمونلا و تشکیل بیوفیلم

از ۷۵ نمونه گوشت مرغ آلوده به سالمونلا ٦٩ نمونه بیوفیلم تشکیل دادند. ۱۸ نمونه بیوفیلم ضعیف (٪٢٦) ٤٥ نمونه بیوفیلم قوی (٪٦٥,٢) و ٦ نمونه بیوفیلم (٪٨,٧) قوی تشکیل دادند. نتایج نشان داد آلودگی به سالمونلا یا وزن، فصل نمونه‌گیری و منطقه جداسازی سالمونلا ارتباط معناداری وجود نداشت.

تعیین در نمونه های تشکیل دهنده بیوفیلم

از ۷۵ نمونه آلوده به سالمونلا، ٦٩ (٪٩٢، ٧٥/٦٩) نمونه بیوفیلم ضعیف تا قوی تشکیل دادند. ٦١ (٪٨٨,٤) مورد دارای سروگروپ C، 5.7%) 4) مورد سروگروپ D، 2 2.8%)) مورد دارای سروگروپ B و ٢ (٪٢,٨) مورد فاقد سروگروپ بودند. این اختلاف از نظر آماری معنادار (P value= 0.001) بود. از ٦ نمونه با بیوفیلم قوی ٤ نمونه (٤/٦،٪٦٦,٦) دارای سروگروپ D بودند. بیشتر نمونه های سرگروه D دارای وزن ۱,۵۰۰ کیلوگرم بودند. سروگروپ D بیشترین مورد مشاهده شده در بیوفیلم قوی (٤/٦، ٪٦٦,٦) بود. سروگروپ C بیشترین مورد مشاهده شده در بیوفیلم ضعیف (١٦/١٨، ٪٨٨,٨) و متوسط (٤٣/٤٥، ٪٩٥) بود.

مقاومت چندگانه دارویی (MDR) در نمونه های تشکیل دهنده بیوفیلم

از ٦ نمونه تشکیل دهنده بیوفیلم قوی ٢ نمونه دارای مقاومت چند دارویی (DR٢) بودند. ٪٤٨,٨ از نمونه تشکیل دهنده بیوفیلم متوسط (٢٢/٤٥) دارای مقاومت چند دارویی (MDR) بودند. همچنین ٪٦٦,٦ (١٢/١٨) نمونه تشکیل دهنده بیوفیلم ضعیف مقاومت چند دارویی (MDR) داشتند.

مقاومت DR٥ تنها در ٢ سویه با بیوفیلم متوسط و یک سویه با بیوفیلم ضعیف مشاهده شد. مقاومت به DR5 با ٪٤,٣ (٣/٦٩) و مقاومت DR1 با ٪٨,٦ (٦/٦٩) کمترین میزان مقاومت در جدایه های سالمونلا تشکیل دهنده بیوفیلم را تشکیل دادند. بررسی میزان تشکیل بیوفیلم و

مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی نشان داد که هیچ کدام از موارد سالمونلا جداشده با بیوفیلم قوی مقاومت دارویی چندگانه نداشتند و بجز ۲ مورد که فاقد بیوفیلم بودند تمامی موارد مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی دارای بیوفیلم ضعیف و متوسط بودند که این اختلاف از نظر آماری معنادار (P value= 0.002) بود.

جدول ۲. بررسی تشکیل بیوفیلم و نوع مقاومت دارویی چندگانه در نمونه‌ها

بیوفیلم	MDR type (%)						تعداد نمونه‌ها
	None	1DR	2DR	3DR	4DR	5DR	
قوی	3 (%4)	0	3 (%4)	0	0	0	6 (%8)
متوسط	3 (%4)	4 (%5.3)	16 (%21.3)	12 (%16)	8 (%10.6)	2 (%2.6)	45 (%60)
ضعیف	1 (%1.3)	2 (%2.6)	3 (%4)	9 (%12)	2 (%2.6)	1 (%1.3)	18 (%24)
بدون بیوفیلم	0	0	4 (%5.3)	0	2 (%2.8)	0	6 (%8)
مجموع	7 (%9.3)	6 (%8)	26 (%34.6)	21 (%28)	12 (%16)	3 (%4)	75 (%100)

MDR: Multidrug Resistant, 1DR:1 Drug Resistant, 2DR:2 Drug Resistant, 3DR: 3 Drug Resistant, 4DR: 4 Drug Resistant, 5DR: 5 Drug Resistant

مقاومت به ایمی پنم تنها در یک نمونه که دارای بیوفیلم متوسط بود مشاهده شد. تنها در ۱ نمونه با بیوفیلم متوسط مقاومت به سفتریاکسون را از خود نشان داد. همچنین مقاومت به سفوتاکسیم تنها در ۱ نمونه تشکیل دهنده بیوفیلم ضعیف دیده شد. از ٦ نمونه دارای بیوفیلم قوی ۲ مورد مربوط به تتراسایکلین، ۲ مورد مربوط به تری متوپریم سولفامتوکسازول، ۱ مورد مربوط جنتامایسین و ۱ مورد مربوط به کلرامفنیکل بود.

جدول ۳. فراوانی تشکیل بیوفیلم و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک در نمونه‌ها

شماره نمونه	الگوی مقاومت	سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم				تعداد نمونه‌ها
		قوی	متوسط	ضعیف	بدون بیوفیلم	
۱	ATH/C	0	1	0	1	2
۲	ATH/C/CIP/T	0	1	0	0	1
۳	ATH/C/T	0	2	2	0	4
۴	ATH/C/T/TC	0	0	1	0	1
۵	ATH/C/T/TS	0	3	1	2	6
۶	ATH/C/TS	0	2	0	0	2
۷	ATH/CIP/T/TS	0	1	0	0	1
۸	ATH/CRO/TS	0	1	0	0	1
۹	ATH/FOX	0	0	1	0	1
۱۰	ATH/FOX/C/T/TS	0	1	1	0	2
۱۱	ATH/FOX/T	0	1	0	0	1
۱۲	ATH/FOX/T/TS	0	1	0	0	1
۱۳	ATH/T	0	5	1	0	6
۱۴	ATH/T/TC	0	0	1	0	1
۱۵	ATH/T/TS	0	3	6	0	9
۱۶	ATH/TS	0	2	0	1	3
۱۷	C/CIP/GM/IMI/T	0	1	0	0	1
۱۸	C/CIP/GM/T	0	1	0	0	1
۱۹	C/T	0	2	0	0	2
۲۰	C/T/TS	0	2	0	0	2
۲۱	C/TS	1	0	0	0	1
۲۲	FOX/C/T	0	1	0	0	1
۲۳	FOX/C/T/TS	0	1	0	0	1
۲۴	GM/T	1	0	0	0	1
۲۵	T	0	4	1	0	5
۲۶	T/TS	1	7	1	2	11
۲۷	TS	0	0	1	0	1
28	None	3	2	1	0	6
مجموع (%)		۶(%8)	۴۵(%60)	۱۸(%24)	۶(%8)	۷۵(%100)

ATH, Azithromycin; T, tetracycline; TC, Ticarcillin; TS, Trimethoprim/sulfamethoxazole; GM, gentamicin; FOX, Cefoxitin; C, Chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; IMP, imipenem; CRO, Ceftriaxone, **بیوفیلم ضعیف**:OD <250 µg\ml, **بیوفیلم متوسط**:250-400 µg\ml, **بیوفیلم قوی**: >400 µg\ml

بحث

امروزه با توجه به استفاده نادرست و بیش از حد آنتی‌بیوتیک در صنایع دامپروری بویژه در مرغداری ها مقاومت به آنتی‌بیوتیک در طیف وسیعی از نمونه‌های حیوانی مشاهده می‌شود. این مسئله موجب پدیدار شدن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها و در برخی موارد ایجاد مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک (MDR) شده است (۱۹).

با توجه به این که مرغ از وعده های غذایی مهم ما ایرانیان محسوب می گردد، آلودگی با آن می تواند از زنجیره غذایی به ما منتقل و باعث بروز مشکلات متعدد از جمله مشکلات گوارشی گردد (۲۰).

در این مطالعه نمونه‌های مرغی در تشکیل بیوفیلم و ایجاد مقاومت دارویی بررسی گردید. از ۷۵ نمونه مرغ مورد بررسی ۹۲٪ (۶۹/۷۵) بیوفیلم تشکیل دادند که این موضوع نشان دهنده توانایی بالای سالمونلا در تشکیل بیوفیلم است.

در مطالعه انجام شده توسط قاسم مهدی (Ghasemmahdi) و همکارانش در سال ۲۰۱۵ الگوی مقاومت دارویی و تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آنها نشان داد بیشتر نمونه‌ها (۶۰,۵۲٪) قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند این درحالیست که نتایج حاصل از مطالعه ما میزان بالاتری از تشکیل بیوفیلم ۹۲٪ (۶۹/۷۵) را نشان داد. این موضوع احتمال افزایش تشکیل بیوفیلم در سالهای اخیر را بیشتر می‌کند (۲۱).

در مطالعه انجام شده توسط ژیمیانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در چین نمونه‌های مواد غذایی از نظر آلودگی با میکروارگانیسم ها و تشکیل بیوفیلم در آنها مورد بررسی قرار گرفتند که در ۱۳ میکروارگانیسم مختلف از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس و غیره را جدا گردید اما هیچ کدام از آنها به سالمونلا آلوده نبود که این نتایج بر خلاف مطالعه ما آلودگی پائین با سالمونلا را نشان داد (۲۲).

در مطالعه انجام شده توسط یوانیدیس (Ioannidis) و همکارانش در سال ۲۰۱۳ میزان تولید بیوفیلم در نمونه‌های سالمونلا با تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که افزایش بیوفیلم مرتبط با افزایش مقاومت در باکتری است که این نتایج مطابق با تحقیقات انجام شده در مطالعه ما بود. ۱٤٤ نمونه از ۱۹۹ نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه یوانیدیس آلودگی با سالمونلا انتریتیدیس را نشان دادند که دارای سروگروپ D بودند، این در حالیست که در مطالعه ما سروگروپ C در تشکیل بیوفیلم غالب بود اما ٦٦,٦٪ از نمونه‌ها با بیوفیلم قوی سرگروه D را از خود نشان دادند (۲۳).

در مطالعه انجام شده توسط کیم (Kim) و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کره جنوبی از میان ٤٧ ایزوله سالمونلا جداشده از گوشت مرغ ۸۷/۲٪ از ایزوله‌ها مقاوم به ۳ یا تعداد بیشتری آنتی‌بیوتیک را از خود نشان دادند. این میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک بیشتر از مطالعه ما (٤٥/۳٪، ۳٤/۷٥) است که می تواند نشان دهنده مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک در مراکز تولید مرغ باشد که تشکیل بیوفیلم در آنها نیز این مشکل را بیش از پیش گسترده می کند. در نتیجه مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک در سئول (کره جنوبی) نسبت به تهران (ایران) باشد (٢٤).

در مطالعه انجام شده توسط قاسم مهدی (Ghasemmahdi) و همکارانش ارتباط کمی میان مقاومت به آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم نشان داده شد (۵۲٪)، این در حالی است که در مطالعه ما ۹۲٪ نمونه‌ها بیوفیلم تشکیل دادند. نتایج حاصل از این مطالعه گستردگی مقاومت آنتی بوتیکی در جدایه های دارای مقاومت چندگانه را نشان داد که این نتایج هم‌راستا با مطالعه ما ۵۲,۱۷٪(۳٦/٦۹) بود (۲۱).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) در ارگانیسم‌های بیماری‌زای روده‌ای از جمله سالمونلا می تواند موجب شکست روند درمان در عفونت‌های تهاجمی این باکتری شود. این در شرایطی است که تشکیل بیوفیلم با مقاومت

باکتری مرتبط بوده و از ٦ نمونه سالمونلای تشکیل دهنده بیوفیلم قوی ۳ مورد دارای مقاومت به ۲ گروه از آنتی‌بیوتیک (DR۲) بودند.

در مطالعه حاضر فنوتیپ MDR در ۵۲,۱٪ (۳٦/٦۹) جدایه های گوشت مرغ تشکیل دهنده بیوفیلم مشاهده شد. مقاومت همزمان به ۲ کلاس آنتی‌بیوتیک ها (DR۲) با ۳۷,٦٪ (۲٦/٦۹) شایع‌ترین نوع مقاومت دارویی و بعد از آن مقاومت همزمان به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیک (DR۳) با ۳۰,٤٪ (۲۱/٦۹) شایعترین نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم بود. الگوی مقاومتی T/TS با ۱۱ مورد (۱۵,۹٪) و پس از آن الگوی مقاومتی ATH/T/TS با ۹ مورد (۱۳٪) بیشترین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک مشاهده شده در نمونه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم بودند.

در مطالعه انجام شده توسط مهدوی (Mahdavi) و همکارانش سالمونلا انتریتیدیس توانایی بالایی در اتصال به سطوح مواد غذایی و تشکیل بیوفیلم را داشتت که کاملاً هم راستا با مطالعات ما بود. این موضوع بیانگر لزوم ضدعفونی مناسب مراکز تولیدی گوشت مرغ دارد و همچنین نشان می دهد که پایش مداوم از نظر تشکیل بیوفیلم امری ضروری به نظر می رسد (۲۵).

در مطالعه انجام شده توسط سیردانی و همکارانش از ۸ نمونه آلوده به سالمونلا تنها ۲ (۲۵٪) نمونه بیوفیلم تشکیل دادند که با نتایج حاصل از مطالعه ما که میزان تشکیل بیوفیلم از ۷۵ نمونه ٦۹ (۹۲٪) مورد بود تناقض داشت (۲٦).

در مطالعه انجام شده توسط بن عبدال... (Abdallah) و همکارانش نشان داده شد که سالمونلا قادر به تشکیل بیوفیلم در سطوح صنعتی مختلف از جمله آبگریز و آبگریز را دارد که این موضوع برای ایمنی مواد غذایی و بهداشت عمومی بسیار خطرناک است که توانایی بالای سالمونلا در تشکیل بیوفیلم و آلوده کردن مواد غذایی در مطالعه ما نیز نشان داده شده و همراستا با آن است (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که تولید بیوفیلم در نمونه‌های گوشت مرغ آلوده با سالمونلا در حال افزایش است و می‌تواند باعث بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی گردد. رعایت نکات بهداشتی برای کاهش شیوع آلودگی و پایش مداوم محصولات غذایی همچون مرغ به دلیل استفاده از آن به عنوان یک وعده غذایی مهم در زنجیره غذایی، امری ضروری است. علاوه بر این، افزایش مقاومت دارویی در مرغ و انتقال آن به انسان می تواند هشداری باشد تا نسبت به نوع و دوز آنتی‌بیوتیک‌های در حال تجویز حساسیت بیشتری انجام گیرد.

منابع

1. Da Silva N, Taniwaki MH, Junqueira VC, Silveira N, Okazaki MM, Gomes RA. Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. The Chemical Rubber Company Press 2018.
2. Temelli S, Eyigor A, Carli KT. Salmonella serogroup detection in poultry meat samples by examining multiple colonies from selective plates of two standard culture methods. Foodborne Pathogens And Disease 2010;17(10):1229-34.
3. Chiu Lh, Chiu Ch, Horn Ym, Chiou Cs, Lee Cy, Yeh Cm, Yu Cy, Wu Cp, Chang CC, Chu C. Characterization of 13 multi-drug resistant Salmonella serovars from different broiler chickens associated with those of human isolates. Microbiology 2010;10(1):86.
4. Jones K, Bradshaw SB. Biofilm formation by the Enterobacteriaceae:

a comparison between Salmonella enteritidis, Escherichia coli and a nitrogen-fixing strain of Klebsiella pneumoniae. Journal of Applied Bacteriology 1996;80(4):458-64.

5. Dhir VK, Dodd CE. Susceptibility of suspended and surface-attached Salmonella enteritidis to biocides and elevated temperatures. Applied and Environmental Microbiology 1995;1;61(5):1731-8.

6. Austin JW, Sanders G, Kay WW, Collinson SK. Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation. FEMS Microbiology Letters 1998;162(2):295-301.

7. Palmer RJ, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. Trends in Microbiology 1997;1;5(11):435-40.

8. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. BioMed Research International 2012.

9. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In Bacterial Biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg 2008.

10. Kim SH, Wei CI. Biofilm formation by multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. Journal of Food Protection 2007;70(1):22-9.

11. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials 2012; 33(26):5967-82.

12. Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control 2013; 31(2):572-85.

13. Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2007; 34(9):577-88.

14. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. Archives of Microbiology 2016; 1;198(1):1-5.

15. Mikoleit M. Laboratory protocol: biochemical identification of Salmonella and Shigella using an abbreviated panel of tests. Geneva, Switzerland: WHO Global Foodborne Infections Network 2010.

16. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute 28th ed 2018.

17. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. The New Microbiology 2010; 33(2):137-45.

18. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing

conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology 2007; 115(8):891-9.

19. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential Public Health Implications. Molecules 2018; 23(4):795.

20. Besharati S, Owlia P, Sadeghi A, Ahmadi F, Fani F, Puladfar G, Alebouyeh M. Frequency, antibiotic resistance, and serogroups of Salmonella among chicken meat specimens in Tehran, Iran. Daneshvar Medicine 2019; 10;27(143):1-0.

21. Ghasemmahdi H, Tajik H, Moradi M, Mardani K, Modaresi R, Badali A, Dilmaghani M. Antibiotic resistance pattern and biofilm formation ability of clinically isolates of Salmonella enterica serotype typhimurium. International Journal of Enteric Pathogens 2015; 3(2):4-27372.

22. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology 2009; 1;20(9):407-13.

23. Ioannidis A, Papavasileiou K, Papavasileiou E, Bersimis S, Chatzipanagiotou S. Distribution of six effector protein virulence genes among Salmonellaenterica enterica serovars isolated from children and their correlation with biofilm formation and antimicrobial resistance. Molecular Diagnosis & Therapy 2013; 1;17(5):311-7.

24. Kim MS, Lim TH, Jang JH, Lee DH, Kim BY, Kwon JH, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea. Poultry Science 2012; 91(9):2370-5.

25. Mahdavi MA, Kasra Kermanshahi R, Jalali MO. Biofilm formation of Salmonella enteritidis on surfaces in the food industry. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 2008; 3(2):81-4.

26. Sirdani A, Soltan Dallal MM. Investigating the Ability of Producing Biofilm by Isolated Salmonella from Food. Alborz University Medical Journal 2018;10;7(4):309-14.

27. Abdallah FB, Lagha R, Khaled SA, Kallel H, Gharbi J. Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbirae genes in Salmonella isolated from tunisian clinical and poultry meat. Iranian Journal of Public Health 2014; 43(4):423.