نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر- آبان 1397، ص. 502-495

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p. 495-502

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی انتروباکتریاسه‌های مولد بتالاکتامازهای با طیف وسیع جدا شده از کاهو و اسفناج در شهر گرگان

آنه‌گل خردمند[1]- آنیا آهنی آذری[2*]- احمد دانش[2]

تاریخ دریافت: 1395/12/05
تاریخ پذیرش: 1396/08/11

چکیده

با توجه به این که امروزه استفاده از کودهای حیوانی و آبیاری مزارع با فاضلاب گسترش روزافزون داشته است نگرانی‌ها در خصوص آلودگی محصولات کشاورزی به باکتری‌های بیماری‌زا به‌خصوص انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک افزایش یافته است. در سال‌های اخیر همه‌گیری‌هایی از بیماری‌ها در انسان رخ داده که به مصرف سبزیجات آلوده ارتباط داده شده است و در اکثر موارد اعضای انتروباکتریاسه مسئول این همه‌گیری‌ها بودند هدف از انجام این تحقیق بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی سویه‌های انتروباکتریاسه مولد بتالاکتامازهای با طیف وسیع جدا شده از کاهو و اسفناج عرضه شده در شهر گرگان بود. برای انجام این تحقیق پس از کشت بر روی محیط کشت مک‌کانکی‌آگار، کلنی‌های مشکوک به خانواده انتروباکتریاسه از نظر خصوصیات مورفولوژیک انتخاب شدند. پس از تهیه کشت خالص سویه‌های مقاوم به سفوتاکسیم مشخص شده و در بین آن‌ها سویه‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس ایزوله‌ها از نظر تولید بتالاکتامازهای با طیف وسیع (ESBL) به روش Disk Synergy Test بررسی شده و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به روش کربی‌بائر تعیین گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که انتروباکتریاسه‌های ESBL در سبزیجاتی مثل کاهو و اسفناج وجود دارند. همچنین مشخص شد که همه انتروباکتریاسه‌های ESBL جدا شده از نمونه‌های اسفناج به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، کلرامفنیکل و آموکسی سیلین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم حساس بودند. انتروباکتریاسه‌هایESBL جدا شده از نمونه‌های کاهو به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم و فقط به آمیکاسین و ایمی‌پنم حساس بودند. بنابراین در همه ایزوله‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پاتوژن های بالقوه و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در سبزیجات عرضه شده در شهر گرگان حضور دارند.

واژهای کلیدی: انتروباکتریاسه، بتالاکتامازها، سبزیجات، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده توسط دام و یا طیور به‌عنوان متابولیت فعال بیولوژیکی دفع می‌شوند که می‌تواند سبب گزینش و تقویت رشد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گردند. آنتی‌بیوتیک و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در فضولات حیوانی، آبزیان، پساب، رسوبات رودخانه ، خاک زمین‌های کشاورزی و سبزیجات برگ سبز مشاهده شده‌اند (Bhutani *et al.*,2015) این مشکل ناشی از استفاده از کود حیوانی و همچنین فاضلاب تصفیه نشده حاوی باکتری‌های پاتوژن می‌باشد که منجر به شیوع بیماری‌ها در انسان می‌گردد (Puspanadan *et al.*, 2013). بروز عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه‌های مقاوم در دهه گذشته به سرعت افزایش یافته و به یک همه‌گیری جهانی تبدیل شده است. انتروباکتریاسه‌هایی چون *اشریشیاکلی* که ساکن طبیعی دستگاه گوارش حیوانات هستند مواد غذایی را مستقیما در کشتارگاه‌ها آلوده کرده و یا با حضور در کودی که برای تقویت رشد در کاهو و سبزیجات استفاده می‌شوند سبب آلودگی آن‌ها می‌گردند (Tham *et al.*, 2013).

در سال‌های اخیر بیماری های فراگیر زیادی در انسان رخ داده که به مصرف سبزیجات آلوده ارتباط داده شده است (Buchholz *et al.*, 2011, Bhutani *et al.*, 2015). نقاط بحرانی آلودگی با پاتوژن‌ها قبل از برداشت در زنجیره تولید سبزیجات استفاده مستقیم از کودهای حیوانی و همچنین آبیاری با آب آلوده و یا رواناب نواحی مجاور با

1- گروه میکروبیولوژی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
2- گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
(*مسئول مکاتبات: Email: ania_783@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.62853

انباشت مدفوع حیوانات است. بنابراین، این که به چه میزان شیوع بیماری‌های انسانی با کاربرد کود حیوانی به‌عنوان کود رایج در تولید سبزیجات آلی مرتبط است مورد توجه قرار گرفته است. کود حیوانی منبع بالقوه پاتوژن‌هایی چون سالمونلا، کمپیلوباکتر، *اشریشیاکلی* تولیدکننده وروتوکسین و سایر تک‌یاختگان است و بسیاری از حیوانات این پاتوژن‌ها را بدون علائم بالینی از طریق مدفوع دفع می‌کنند. وقتی کود دامی تازه برای باروری سبزیجات استفاده می‌شود، پاتوژن‌های موجود به خاک وارد شده که بقای آن‌ها از چند روز تا چند ماه می‌تواند متفاوت باشد. در نتیجه در خاک تقویت شده با کود حیوانی سبزیجات کشت شده از طریق ریشه و یا از طریق پاشیدن بر روی سطح برگ در طی آبیاری و یا بارندگی در معرض پاتوژن‌های پایدار قرار می‌گیرند (Jensen *et al*.,2013).

با توجه به این که یکسری از سبزیجات مثل کاهو و اسفناج معمولا خام مصرف می‌شوند و محتوای میکروبی آن‌ها ممکن است خطری برای سلامت مصرف‌کنندگان باشد سازمان بهداشت جهانی این نوع سبزیجات را یکی از منابع غذایی ناقل پاتوژن معرفی کرده است. این پاتوژن‌ها اغلب عامل بیماری‌های شدید گوارشی هستند که با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به‌خصوص سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم درمان می‌شوند. با این حال، اگر پاتوژن منتقله مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع (ESBL) باشد این گزینه‌های درمانی تاثیر کمتری دارند.

شواهدی وجود دارد که مواد غذایی منبع مهمی در انتقال باکتری‌های حاوی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق مصرف یا آلودگی متقاطع می‌توانند باشند (Njage and Buys, 2014). اخیرا انتقال مقاومت به آمپی‌سیلین کد شده توسط ژن‌های ESBL در باکتری‌های محیطی یافت شده بر روی کاهو و اسفناج گزارش شده است (Bhutani *et al*.,2015). Ruimy و همکاران (2010) در فرانسه گزارش کردند که سبزیجات اغلب با ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آلوده هستند. با این حال، به انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق آب و سبزیجات توجه چندانی نشده است اگرچه شواهد نشان داده است که این روش انتقال در انتقال ژن به سویه‌های پاتوژن و کومنسال حائز اهمیت است.

با توجه به موارد فوق در این تحقیق فراوانی سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای با طیف وسیع جدا شده از سبزیجات خام عرضه شده در سطح شهر گرگان بررسی شد و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مطالعه مقطعی با رویکرد توصیف نتایج بود. از هریک از مراکز عرضه سبزیجات یک کاهوی کامل و چند بوته اسفناج خریداری شده و در کیسه پلاستیکی استریل گذاشته و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در عرض 24 ساعت از زمان خرید از نظر فلور میکروبی بررسی شدند.

کشت و خالص‌سازی

ابتدا 2/5 گرم از هر نمونه را با یک اسکالپل استریل در یک ظرف استریل جدا کرده و در فالکون استریل 50 میلی‌لیتری که حاوی 10 میلی‌لیتر پپتون واتر 0/1 درصد بود قرار داده شد. سپس در دور 150rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول حاصل تا رقت 10^{-4} در پپتون واتر 0/1 درصد رقیق شده و0/1 میلی‌لیتر از آن روی محیط کشت مک‌کانکی‌آگار با لوله L-فرم پخش گردید. پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های تک با مورفولوژی‌های متفاوت مشکوک به جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه از هر پلیت به‌صورت تصادفی انتخاب شده و پس از خالص‌سازی روی محیط کشت نوترینت آگار یخچال‌گذاری شدند (Njage and Buys, 2014).

جداسازی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم به روش دیسک دیفیوژن

ابتدا سوسپانسیونی از سویه‌های مورد آزمایش با کدورت معادل 0/5 مک فارلند تهیه شد. سپس با استفاده از سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌طور یکنواخت کشت داده شدند. پس از 3 تا 5 دقیقه با پنس استریل دیسک سفوتاکسیم را در سطح محیط کشت گذاشته و پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قطر هالهٔ عدم رشد با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به جدول استاندارد CLSI ایزوله‌های مقاوم به سفوتاکسیم شناسایی شدند (Njage and Buys, 2014).

شناسایی ایزوله‌های مقاوم به سفوتاکسیم

شناسایی باکتری‌های متعلق به جنس های خانوادهٔ انتروباکتریاسه بر اساس روش‌های میکروبیولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مانند TSI، تست ONPG،تست احیای نیترات، IMViC، هیدرولیز اوره، تست مالونات، ذوب ژلاتین، تست آرژنین دهیدرولاز، تست دکربوکسیلاسیون و دامیناسیون اسید آمینه، SIM، کاتالاز و اکسیداز انجام گرفت (Njage and Buys, 2014).

انجام تست تاییدی تولید ESBL به روش DDST

برای تایید تولید ESBL توسط ایزوله های مقاوم به سفوتاکسیم

انتروباکتریاسه از روش DDST (Double Disk Synergy Test) استفاده شد. ابتدا سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر با کدورت 0/5 مک فارلند تهیه کرده سپس با استفاده از سوآپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌طور یکنواخت کشت داده شدند.

سپس با استفاده از پنس استریل دو دیسک سفوتاکسیم و سفوتاکسیم- کلاوولانیک اسید به فاصله 20 میلی‌متر از هم (از مرکز به مرکز) بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار قرار داده شدند. پس از انکوباسیون 24 ساعته در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در صورتی که هاله عدم رشد به‌صورت سینرژی بین دو دیسک مشاهده می‌شد تست بتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته می‌شد. یعنی اگر قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های سفوتاکسیم و سفوتاکسیم- کلاولانیک‌اسید 5 میلی‌متر بیشتر از قطر هالهٔ عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم به تنهایی بود تولید ESBL توسط باکتری مورد نظر مثبت در نظر گرفته می‌شد (Njage and Buys, 2014).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های ESBL

در این مرحله به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌هایESBL، از دیسک های آنتی‌بیوتیکی شامل دیسک‌های ایمی‌پنم (10µg)، کلرامفنیکل (30µg)، آموکسی‌سیلین (30µg)، کوتریموکسازول (25µg)، تتراسیکلین (30µg)، آمیکاسین (10µg) و نالی‌دیکسیک‌اسید (30µg) طبق روش استاندارد توصیه شده در CLSI استفاده گردید. فقط به‌منظور جلوگیری از تداخل هاله‌های عدم رشد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با فاصله 15 میلی‌متر از لبه پلیت و 25 میلی‌متر از مرکز یک دیسک تا مرکز دیسک دیگر قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها را معکوس نموده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از 24 ساعت انکوباسیون ، قطر هاله عدم رشد توسط خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد؛ سپس با کمک جدول شرکت MAST ، نتایج بر اساس حساس (S) یا مقاوم (R) بودن ایزوله گزارش شدند؛ هاله‌های متوسط (I) نیز در این تحقیق حساس در نظر گرفته شدند. این آزمایش با سه بار تکرار برای هر ایزوله انجام شد و میانگین آن برای تعیین حساسیت یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی مد نظر قرار گرفت (Magiorakos *et al*., 2012).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از کشت نمونه‌ها به‌ترتیب 38 و 30 کلنی متمایز از نظر مرفولوژیکی از نمونه‌های اسفناج و کاهو انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفتند. 89 درصد از ایزوله‌های مربوط به نمونه‌های اسفناج به سفوتاکسیم مقاوم بودند که 17/6 درصد از آن‌ها بر اساس نتایج به‌دست آمده از خصوصیات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی متعلق به خانوادهٔ انتروباکتریاسه بودند. در حالی که در مورد کاهو 56 درصد از ایزوله‌ها به سفوتاکسیم مقاوم بودند و 29/4 درصد از آن‌ها به این خانواده تعلق داشتند (جدول 1).

جدول1- تعداد کلنی‌های مقاوم به سفوتاکسیم بر اساس نوع نمونه

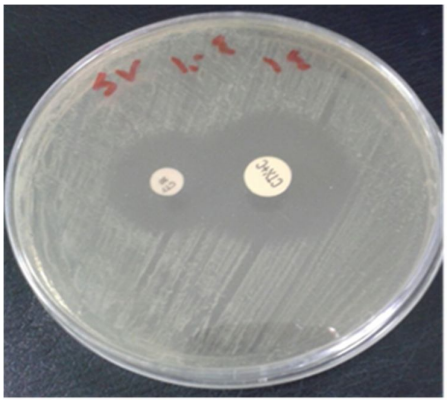
نوع نمونه	تعداد کلنی‌های مورد بررسی	تعداد مقاوم به سفوتاکسیم (درصد)
اسفناج	38	34 (%89)
کاهو	30	17 (%56)
جمع	68	51 (%75)

نتایج به‌دست آمده از تست تاییدی تولید ESBL توسط انتروباکتریاسه‌های مقاوم به سفوتاکسیم نشان داد که به‌ترتیب 83 درصد (5 نمونه از 6 نمونه) و 60 درصد (3 نمونه از 5 نمونه) انتروباکتریاسه‌های مقاوم به سفوتاکسیم جدا شده از نمونه‌های اسفناج و کاهو ESBL مثبت بودند (شکل 1 و جدول 2)

نتایج این تحقیق نشان داد که *انتروباکتریاسه‌های* ESBL در سبزیجات برگ سبز مثل کاهو و اسفناج وجود دارند. همچنین با انجام تست آنتی‌بیوگرام بر روی انتروباکتریاسه‌های ESBL مشخص شد که همه انتروباکتریاسه‌های ESBL جدا شده از نمونه‌های اسفناج به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالی‌دیکسیک‌اسید، تتراسیکلین، کلرامفنیکل و آموکسی‌سیلین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم حساس بودند. انتروباکتریاسه‌هایESBL جدا شده از نمونه‌های کاهو به همه آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم و فقط به آمیکاسین و ایمی‌پنم حساس بودند. بنابراین در همه ایزوله‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه مشاهد شد (جداول 3 و 4)

تحقیقات مشابه این تحقیق در سایر نقاط دنیا توسط بعضی از محققین انجام شده است. Falomir و همکاران (2010) حضور باکتری‌های کلیفرم را در سبزیجات تازه بررسی کرده و حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها را مشخص نمودند. ایزوله‌ها اساسا شامل کلبسیلا، آنتروباکتر،*اشریشیا کلی* و سایر جنس‌ها (سراشیا، سیتروباکتر، هافنیا و ....) بودند و اغلب آن‌ها به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید مقاومت داشتند. Khiyami و همکاران (2010) نیز میزان آلودگی سالاد سبزیجات کمتر فرآوری شده خانگی و عرضه شده در رستوران‌ها را به *اشریشیاکلی*، سالمونلا و شیگلا بررسی کرده و تعداد

کل کلیفرم‌ها را تعیین نمودند. تعداد کل کلیفرم‌ها در سالاد سبزیجات کمتر فرآوری شده عرضه شده در رستوران‌ها 100 برابر بیشتر از انواع خانگی بود. در همه انواع سالادها، به جزء سالاد سزار، *اشریشیا کلی* و *آنتروباکتر ائروژنز* وجود داشت. در حالی که گونه‌های شیگلا و سالمونلا اندک بودند.



شکل1- نتیجه تست تاییدی در انتروباکتریاسه ESBL مثبت

جدول 2– نتایج تست تاییدی تولید ESBL توسط انتروباکتریاسه‌های مقاوم به سفوتاکسیم

نام سویه	نوع نمونه			
	اسفناج		کاهو	
	تعداد نمونه‌ها	تعداد سویه‌های مثبت	تعداد نمونه‌ها	تعداد سویه‌های مثبت
Enterobacter aerogenes	1	1	2	1
Pantoea agglomerans	1	1	-	-
Citrobacter freundii	1	1	-	-
Serratia marcescens	2	1	1	1
Klebsiella oxytoca	-	-	1	-
Klebsiella pneumonia	1	1	1	1
جمع	6	5	5	3

جدول 3- نتیجه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های ESBL مثبت جدا شده از اسفناج

نام سویه	C	TE	SXT	NA	AMX	AN	IMP
Enterobacter aerogenes	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Pantoea agglomerans	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Serratia marcescens	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
Citrobacter freundii	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
Klebsiella pneumonia	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	متوسط	حساس

جدول4- نتیجه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های ESBL مثبت جدا شده از کاهو

نام سویه	C	TE	SXT	NA	AMX	AN	IMP
Enterobacter aerogenes	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Serratia marcescens	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Klebsiella pneumonia	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس

Saeed و همکاران (2013) در کردستان عراق حضور *Escherichia coli* O157 را در سبزیجات بررسی کردند. از 200

نمونه سبزیجات مختلف شامل خیار، کاهو، جعفری، کلم، گوجه‌فرنگی و... جمع‌آوری شده از خرده فروشی‌ها، 39 مورد *اشریشیاکلی* جدا شد که به‌ترتیب بیشترین و کمترین درصد مربوط به نمونه‌های جعفری (90درصد) و گوجه‌فرنگی (10درصد) بود اما *Escherichia coli* O157 از هیچیک از سبزیجات جدا نشد. Mazaheri و همکاران (2014) حضور *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک را در نمونه‌های کاهو بررسی کردند. از 100 نمونه کاهو جمع‌آوری شده در تهران، 4 نمونه از نظر حضور *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک مثبت بودند.

Raphael و همکاران (2011) ساپروفیت‌های گرم منفی را از اسفناج‌های ارگانیک و غیرارگانیک جدا کرده و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن ESBL را در آن‌ها بررسی کردند. Njage و Buys (2014) وجود ژن ESBL/AmpC را در *اشریشیا کلی* های جدا شده از کاهو ، آب آبیاری و نقش آب آبیاری را در انتقال *اشریشیاکلی* مقاوم نشان دادند. در 76 درصد از نمونه‌ها ژن ESBL/AmpC تشخیص داده شد که 90 درصد آن‌ها *اشریشیاکلی* های جدا شده از کاهو بودند که 48 درصد آن‌ها مقاومت چندگانه داشتند. Bhutani و همکاران (2015) طی یک تحقیق از 9 نمونهٔ کاهو 138 کلنی متمایز از نظر مرفولوژیکی را انتخاب کرده و از نظر حساسیت آنتی‌بیوتیکی بررسی کردند. 86 درصد از آن‌ها به سفوتاکسیم مقاوم بودند و اکثرا مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی به‌خصوص در برابر سفوتاکسیم، کلرامفنیکل و تتراسیکلین داشتند. از این نظر نتیجه این تحقیق با تحقیق حاضر مشابهت دارد. اما در این تحقیق فقط سه کلنی از 138 کلنی (21/7 درصد) ESBL تولید می‌کردند.

Bezanson و همکاران (2008) طی تحقیقی احتمال مخزن بودن سبزیجات سالادی تازه را برای مقاومت آنتی‌بیوتیکی مصرف‌کنندگان بررسی کردند. در این تحقیق باکتری‌های هوازی را از کاهو پیچ، اسفناج و یونجه جدا کردند و حساسیت آن‌ها را به 10 آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار دادند. از 140 جدایه مقاوم در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک، 93/5 و 90 درصد مقاوم به آمپی‌سیلین و سفالوتین بودند. 35/7 درصد به کلرآمفنیکل، 10 درصد به استرپتومایسین, 4/2 درصد به نالی‌دیکسیک‌اسید، 4/2 درصد نسبت به کانامایسین و 2/8 درصد به جنتامایسین مقاوم بودند. Jensen و همکاران (2013) حضور *اشریشیا کلی* را در کاهوهای رشد یافته در خاک‌های تقویت شد با دوغاب حیوانی را بررسی کردند. در 36 تا 54 درصد کاهوها *اشریشیاکلی* وجود داشت که 10 تا 18 درصد آن‌ها به استرپتومایسین و صفر تا 2 درصد آن‌ها به آمپی‌سیلین مقاومت داشتند.

Hassan و همکاران (2011) مطالعه‌ای را برای توصیف بار باکتریایی و بروز برخی از باکتری‌های روده‌ای بیماری‌زا در سبزیجات خام عرضه شده در بازارهای عربستان انجام دادند. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولید بتالاکتامازهای با طیف وسیع و وجود پلاسمید را نیز در جمعیت باکتری سبزیجات خام بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که هیچ یک از آن‌ها با باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* آلودگی نداشتند. با این حال، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا* در 11/8درصد و 4/4 درصد از نمونه‌ها به‌ترتیب حضور داشتند.

Rasheed و همکاران (2014) طی تحقیقی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اشریشیاکلی*‌های جدا شده از انواع مختلف مواد غذایی که به‌صورت تصادفی از محلات دوازده حیدرآباد، هند جمع‌آوری شده بودند را بررسی کردند. از مجموع 150 نمونه شامل سالاد سبزیجات خام، سطح تخم‌مرغ ، شیر پاستوریزه نشده و گوشت و مرغ خام بالاترین درصد مقاومت دارویی در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* از مرغ خام (23/3%) سالاد سبزیجات (20 درصد) و گوشت خام (13/3%) و سطح تخم‌مرغ خام (10%) و شیر پاستوریزه نشده (6/7%) بود. شیوع کلی *اشریشیا کلی* مقاوم 14/7 درصد بود. 4 درصد آن‌ها ESBL تولید می‌کردند که از سالاد سبزیجات، مرغ و گوشت خام ، سطح تخم‌مرغ جدا شده بودند.

Boehme و همکاران (2004) وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را در محصولات کشاورزی بررسی کردند. 20 نمونه از سبزیجات از نظر *کلیفرم ها* و *آنتروکوک*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی شدند. از *کلی‌فورم*‌های جدا شده تعداد اندکی مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند. از بین 92 ایزوله، 25 گونه آنتروباکتر(19 تا *آنتروباکتر کلوآکه*)، 22 گونه سیتروباکتر (8 تا *سیتروباکتر فروندی*) و 21 گونهٔ کلبسیلا (9 تا *کلبسیلا پنومونیه*) بودند که 43 درصد آن‌ها به تتراسیکلین، 37 درصد آن‌ها به استرپتومایسین، 26 درصد آن‌ها به کانامایسین، 29 درصد آن‌ها به کلرامفنیکل، 9 درصد آن‌ها به کوتریموکسازول و 4 درصد آن‌ها به جنتامایسین مقاومت داشتند. Holvoet و همکاران (2013) نیز مطالعه‌ای را در مورد نمونه‌های کاهو و محیط تولید آن‌ها (شامل آب آبیاری و خاک) برای تعیین مخزن *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک انجام دادند. از 738 نمونه شامل نهال کاهو، خاک، آب آبیاری و برگ کاهو، 473 سویه *اشریشیا کلی* جدا شد و مقاومت آن‌ها به 14 آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود. Reuland و همکاران (2014) طی تحقیقی در هلند فراوانی انتروباکتریاسه‌های ESBL را در سبزیجات خام آمستردام مورد بررسی قرار دادند. 119 سویه از 15 نوع مختلف سبزیجات جدا شدند و پس از انجام آزمایشات مشخص گردید که فقط 4 ایزوله مولد ESBL هستند.

بنابراین نتایج سایر محققین نیز بیانگر آلودگی سبزیجات به باکتری‌های پاتوژن و مقاوم به دارو می‌باشد هر چند که میزان آلودگی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تحقیقات مختلف متفاوت است. البته باید متذکر شد نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نیز به جهت انجام نمونه‌برداری تصادفی از مراکز عرضه سبزیجات قابل تعمیم به تمام

سبزیجات عرضه شده در سطح شهرستان گرگان نمی‌باشد اما نتـایج این تحقیق نشان داد که اسـتفاده از کودهـای حیـوانی خطـر انتشـار باکتری‌های مقاوم به دارو را در سبزیجات و نهایتا انسان و حیوان به دنبال دارد که نیازمند بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تر می‌باشد. به علاوه این باکتری‌ها با انتقـال ژن‌هـای مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی بـه سـایر باکتری‌ها سبب انتشار این ژن‌ها در محیط می‌گردد. بنابراین در آینده شاید طراحی مطالعات با درنظر گـرفتن نحـوه نمونـه‌بـرداری، زمـان کاشت و برداشت، تعداد دفعات کوددهی، نحوهٔ آبیاری و سایر عوامـل تأثیرگذار بیشتر بتواند اهمیت موضوع را مشخص نماید.

منابع

Ali Yahya Saeed, Hayfaa Mazin, AwazArshad Saadi, Solin Omar Hussein (2013). Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS) e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372.Volume 6, Issue 2 (Nov. – Dec). PP 16-18.

Bezanson, G.S., MacInnis, R., Potter, G. and Hughes, T (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. International Journal of Food Microbiology vol. 127, no. 1-2, pp. 37–42.

Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, MM., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Höhle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Luber, P., Rosner, B., Stark, K., Kühne, M (2011). German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. New England Journal of Medicine 365(19):1763–1770.

Falomir, M.P., Gozalbo, D. and Rico, H (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. Current Research, Technology and education topics In Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 1175-1181.

Jensen, AN., Storm, C., Forslund, A., Baggesen, DL., Dalsgaard, A (2013). *Escherichia coli* Contamination of Lettuce Grown in Soils Amended with Animal Slurry. Journal of Food Protection Vol. 76, No. 7, Pages 1137–1144.

Johan Tham, Mats Walder, Eva Melander, and Inga Odenholt (2012). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. Infection and Drug Resistance 5 143–147.

Kevin Holvoet, Imca Sampers, Benedicte Callens, Jeroen Dewulf, Mieke Uyttendaele (2013). Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. Journal of Applied & Environmental Microbiology 79: 6677–6683.

Magiorakos, AP., Srinivasan, A., Carey, RB., Carmeli, Y., Falagas, ME., Giske, CG., Harbarth, S., Hindler, JF., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, DL., Rice, LB., Stelling J, Struelens, MJ., Vatopoulos, A., Weber, JT., Monnet, DL (2012).Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection Mar*; 18(3):268-81.

Mohammad Khiyami, Noura AL-Faris, Basel Busaeed and Hassan Sher (2011). Food borne pathogen contamination in minimally processed vegetable salads in Riyadh, Saudi Arabia .*Journal of Medicinal Plants Research* 4 February, Vol. 5(3), pp. 444-451.

Mohammed Uddin Rasheed, Nooruddin Thajuddin, Parveez Ahamed P, Zelalem Teklemariam & Kaiser Jamil (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. *Sao Paulo* 56 (4):341-346.

Natasha Bhutani, Chithra Muraleedharan, Deepa Talreja,, Sonia Walia Rana, Sandeep Walia, Ashok Kumar, and Satish K.Walia1 (2015). Occurrence of Multidrug Resistant Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria on Iceberg Lettuce Retailed for Human Consumption BioMed Research International Volume 2015, Article ID 547547, 10 pages.

Patrick M. K. Njage and Elna M. Buys (2014). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β-lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology* 462-473.

Puspanadan, S., Afsah-Hejri, L., John, Y. H. T., Rukayadi, Y., Loo, Y. Y., Nillian, E., Kuan, C. H., Goh, S. G., W. S. Chang, Lye, Y. L., Mohd Shahril, N., N. Yoshitsugu, M. Nishibuchi, Son, R (2013).Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producers in *Klebsiella pneumoniae* by genotypic and phenotypic method. *International Food Research Journal* 20(3): 1479-1483.

Raphael, E., Wong, LK. Riley, LW (2011). Extended-spectrum betalactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 77(5):1601–1607.

Raul Jesu´ s Mesa, Vanessa Blanc, Anicet R. Blanch, Pilar Corte´s, Juan Jose´ Gonza´ lez, Susana Lavilla, Elisenda Miro´, Maite Muniesa, Montserrat Saco, MaTeresa To´ rtola, Beatriz Mirelis, Pere Coll, Montserrat Llagostera,

Guillem Prats and Ferran Navarro (2006). Extended-Spectrum-blactamse-producing Enterobacteriaceae in different environments (human, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:211–215.

Reuland, E.A., Naiemi, N. al., Raadsen, S. A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E (2014). Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 33:1843–1846.

Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., Momcilovic, S., Elbaz, S., Moury, F., Vibet, MA., Courvalin, P., Guillemot, D., Andremont, A (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environmental Microbiology* 12(3):608– 615.

Sabry A. Hassan, Abdullah D. Altalhi, Youssuf A. Gherbawy, and Bahig A. El-Deeb (2011). "Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia". *Foodborne Pathogens and Disease* Volume 8, Number 9, 1011-1018.

Somayeh Mazaheri, Siavosh Salmanzadeh-Ahrabi, Tahereh Falsafi, Mohammad-Mehdi Aslani (2014). Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* from lettuce samples in Tehran. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench 7(1):38-42.

Sybille Boehme, Guido Werner, Ingo Klare, Rolf Reissbrodt and Wolfgang Witte (2004).Occurrence of antibiotic resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition & Food Research* 48:522–531.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p. 495-502

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر- آبان 1397، ص. 502-495

Antibiotic resistance pattern and frequency of ESBL producing Enterobacteriaceae isolated from lettuce and spinach in Gorgan

A. Kheradmand[1], A. Ahani Azari[1], A. Danesh[2]

Received: 2016.02.23
Accepted: 2017.11.02

Introduction: In recent years, there have been many epidemic outbreaks caused by consumption of contaminated vegetables. In most cases, Enterobacteriaceae were responsible for these epidemics. The purpose of this study was to investigate antibiotic resistance pattern and frequency of strains producing broad-spectrum beta-lactamase (ESBL) isolated from lettuce and spinach produced in Gorgan, Iran.

Material and Methods: After culturing the isolates on MacConkey medium, colonies with specific morphological characteristics were selected. After preparation of pure culture, strains resistant to cefotaxime were identified and strains belonging to the Enterobacteriaceae family were isolated. The isolates were then studied for broad-spectrum beta-lactamases (ESBL) and their antibiotic resistance patterns were determined.

Results & Discussion: The results of this study showed that ESBL Enterobacteriaceae is present in vegetables such as lettuce and spinach. It was also found that all isolated ESBL Enterobacteriaceae from spinach samples were resistant to Cotrimoxazole, Nalidixic Acid, Tetracycline, Chloramphenicol, and Amoxicillin, and sensitive to Imipenem. Isolated ESBL Enterobacteriaceae from lettuce samples was sensitive to Amikacin and Imipenem. Multiple antibiotic resistance was observed in all isolates. Therefore, it can be concluded that use of animal fertilizers increases the risk of antibiotic-resistant bacteria in vegetables and ultimately in humanand animals.

Key Words: Enterobacteriaceae, broad-spectrum beta-lactamases, vegetables, antibiotic resistance

1. Department of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azade University, Gorgan, Iran
2. Department of Health and Social Medicine, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences
(*Corresponding Author Email: ania_783@yahoo.com)