

بررسی تنوع گونه‌ها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتروکوک‌های جدا شده از سبزی‌های خشک عرضه شده در تهران

مریم عباس پور: کارشناس ارشد گروه میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.

زهرا رجبی: کارشناس مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.

*محمد مهدی سلطان دلال: استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
msoltandallal@gmail.com (**نویسنده مسئول)

اکرم یزدانی: دانشجوی دکتری آمارزیستی، گروه اپیدمیولوژی و آمارزیستی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که به‌صورت فراوان از حیوانات و گیاهان و سبزیجات جدا می‌شوند. این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع سویه‌های انتروکوک و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی انتروکوک‌های جدا شده از ۷ نوع سبزی خشک که به‌صورت تصادفی از فروشگاه‌های تهران جمع‌آوری گردیده، انجام شده است.

روش کار: در یک مطالعه توصیفی، در ۱۳۹۴، تعداد ۱۴۰ نمونه سبزی خشک باز و بسته‌بندی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از نظر وجود انتروکوک با انجام رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز و ایجاد کلنی‌های سیاه‌رنگ روی بایل اسکولین آزید تایید هویت شدند و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تا حد گونه شناسایی شدند. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به شش آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از آزمون کاپا انجام شد.

یافته‌ها: ۱۴۰ نمونه سبزی خشک ۸۴ (۶۰٪) انتروکوک جدا گردید. مهمترین جدایه *E. faecium* با فراوانی ۶۱ (۷۲٪/۱۶) بود. سایر گونه‌ها برترتیب اهمیت عبارت بودند از: ۱۰ جدایه *E. durans*، ۶ جدایه *E. gallinaru*، ۵ جدایه *E. faecalis*، ۱ جدایه *E. avium* و ۱ جدایه *E. casseliflavus*. تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیز نشان داد که: ۹۳٪ مقاوم به جنتامایسین، ۴۸٪ مقاوم به ونکومایسین، ۳۲٪ مقاوم به اریترومایسین، ۱۵٪ مقاوم به تتراسایکلین، ۴٪ مقاوم به کلرامفنیکل و ۴٪ مقاوم به آمپی سیلین بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده آلودگی سبزی‌های خشک جمع‌آوری شده در شهر تهران می‌باشد. با توجه به یافته‌ها، برای جلوگیری از آلودگی میکروبی مواد غذایی، آموزش افراد، رعایت اصول بهداشتی و نظارت در آماده‌سازی، حمل و نقل، ذخیره‌سازی و عرضه مواد غذایی ضروری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: سبزی خشک، انتروکوکوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تهران

مقدمه

سبزیجات وجود دارد که یکی از آن‌ها خشک کردن می‌باشد که به چند دلیل حائز اهمیت می‌باشد: در طولانی‌مدت می‌توان از آن‌ها استفاده نمود، حجم محصولات خشک‌شده کاهش می‌یابد و جابه‌جایی محصولات نیز سریع‌تر صورت می‌پذیرد (۳،۲).

سبزیجات به خاطر اینکه در تماس مستقیم با خاک، حشرات، فضولات پرندگان و جوندگان هستند زود آلوده می‌شوند و اگر خوب شسته و ضدعفونی نشوند و یا پروسه بسته‌بندی و جابه‌جایی در شرایط بهداشتی رعایت نشود، آلوده می‌شوند (۵،۴). خشک کردن می‌تواند به‌صورت

سبزیجات دارای ارزش تغذیه‌ای بوده و از طرف دیگر غذاها، میکروارگانیسم‌ها و انسان‌ها رابطه تنگاتنگی با هم داشته و محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، حضور و دسترسی به آب باعث کلونیزه شدن میکروارگانیسم‌ها در غذاها می‌شود و آلودگی مواد غذایی می‌تواند تعداد زیادی بیماری در انسان ایجاد نماید. سبزیجات و میوه‌ها در رژیم غذایی افراد در بسیاری از کشورها ارزش دارند (۱). نگهداری سبزیجات به مدت طولانی به‌خصوص در فصول گرم سال امکان‌پذیر نمی‌باشد، پس روش‌های متعددی برای نگهداری

عدم احتیاج به شرایط خاص نگهداری، کاربرد مصرفی گوناگونی دارد. این محصولات می‌توانند یک ناقل مناسب برای انتقال باکتری‌ها، انگل‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا به انسان باشند. آلودگی ممکن است در مراحل کاشت، داشت، برداشت، نگهداری، شستشو و توزیع رخ دهد (۱۴). اگر فرآیند خشک کردن و شرایط نگهداری از سبزی خشک مناسب نباشد، میکروارگانیسم‌ها در آن رشد می‌کنند، در صورتی که تجهیزات مورد استفاده در فرآیند خشک کردن، تمیز و بهداشتی نباشد، شمارش نهایی میکروارگانیسم‌ها نیز افزایش می‌یابد (۱۴،۵). از طرف دیگر استفاده از آب‌های آلوده و فاضلاب برای آبیاری مزارع یکی از عوامل مهم دخیل در حضور میکروارگانیسم‌های پاتوژن از جمله انتروکوک در سبزیجات است. در دو دهه اخیر، انتروکوک‌ها مقاومت گسترده‌ای به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها کسب کرده‌اند که این امر سبب پیچیدگی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها گردیده است (۱۵).

هدف از این پژوهش بررسی تنوع گونه‌ها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتروکوک‌های جدا شده از سبزی‌های خشک فله‌ای و بسته‌بندی شده در تهران بوده است.

روش کار

الف) جمع‌آوری نمونه‌ها: در یک مطالعه توصیفی مقطعی از اردیبهشت تا مهر ۱۳۹۴، تعداد ۱۴۰ نمونه سبزی خشک شامل ۷۰ نمونه به صورت باز و ۷۰ نمونه به صورت بسته‌بندی از سطح شهر تهران جمع‌آوری و به بخش میکروب شناسی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. نمونه‌ها شامل ۱۰ نمونه از هر سبزی باز و بسته‌بندی از انواع مختلف سبزی خشک از قبیل شوید، ترخون، گشنیز، قورمه سبزی، آش، نعناع و جعفری بود. نمونه‌ها بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه کدگذاری شدند و مورد آزمایش قرار گرفتند.

نمونه‌ها از نظر وجود انتروکوک بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۸۵۲ مورد آزمایش قرار گرفتند. بر طبق استاندارد ملی ایران حداکثر

سنتی با نور خورشید و صنعتی با دستگاه یا هوای داغ باشد. چون خشک کردن در نوع سنتی در فضای باز و در مجاورت گردوغبار هوا انجام می‌شود می‌تواند رنج آلودگی را بالا ببرد (۷،۶).

انتروکوک‌ها (*Enterococcus*) کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر اسپوردار، هوازی-بی‌هوازی اختیاری هستند که به صورت جفت (دیلوکوک) یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند. این باکتری‌ها گستره بزرگی از شرایط محیطی را تحمل می‌کنند حضور زیاد آن‌ها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد. جنبه مفید این باکتری‌ها نقش پروبیوتیکی آن‌ها است و جنبه مضرشان نقش آن‌ها در عفونت‌های غذایی است. تراکم بیش از حد مجاز آن‌ها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است (۹،۸).

انتروکوک‌ها دارای توانایی اکتساب فاکتورهای مقاومت دارویی متعددی هستند که مشکلات جدی در کنترل و مراقبت بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوک‌ی ایجاد می‌نمایند. آنتی‌بیوتیک‌های زیادی شامل بتالاکتامها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها برای درمان عفونت‌های انتروکوک‌ی استفاده می‌شوند ولی به دلیل گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، امروزه داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های انتروکوک‌ی مقاوم، ونکومايسين است (۱۰-۱۱). این دارو یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی است که به عنوان خط آخر در درمان عفونت با باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به دارو مصرف می‌شود (۱۲). از طرف دیگر شیوع مقاومت به آمینوپنی‌سیلین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی یعنی ونکومايسين و تیکوپلانیل یکی از نگرانی‌های بهداشتی در سال‌های اخیر بوده است (۱۳).

انتروکوک‌ها اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصاً غذاهای با منشاء حیوانی مانند محصولات لبنی حضور دارند. همچنین ایجاد تغییرات عمده در سبک زندگی مردم موجب افزایش تقاضا برای مواد غذایی بسته‌بندی، آماده مصرف و سایر موادی که فرآیند کمی روی آن‌ها انجام می‌شود، بیشتر گردیده است. با توجه به قابل دسترس بودن سبزی خشک در تمام فصول سال و

مقاومت آنتی بیوتیکی آنتروکوک های جدا شده از سبزی به مقایسه مقاومت هر یک از آنتی بیوتیک ها با مقاومت آنتی بیوتیک ونکوماپسین به عنوان قویترین آنتی بیوتیک می پردازیم برای این منظور از آماره کاپا که همبستگی (توافق) بین این آنتی بیوتیکها را ارزیابی می کند، استفاده شد. این آماره مقادیر بین ۱ و ۱- اختیار می کند و مقدار بالای ۰/۷۵ نشان دهنده توافق خوبی بین مقاومت به ونکوماپسین و مقاومت در سایر آنتی بیوتیک ها است. مقدار مثبت آماره کاپا نشان دهنده جهت مثبت در مقاومت است یعنی اگر در یک نوع سبزی مقاومت به ونکوماپسین بیشتر است مقاومت به آنتی بیوتیک معنی دار دیگر نیز بیشتر است (۱۸).

یافته ها

از مجموع ۱۴۰ نمونه سبزی خشک مورد بررسی در این مطالعه، ۸۴ نمونه (۶۰٪) آلوده به آنتروکوک بودند. ۳۴ نمونه (۴۰٪/۵) آلودگی مربوط به فله و ۵۰ نمونه (۵۹٪/۵) آلودگی مربوط به نمونه های بسته بندی بود.

جدول شماره ۱ فراوانی آنتروکوک های جدا شده از انواع مختلف سبزیجات و مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک های مختلف را نشان می دهد.

بیشترین میزان آلودگی در جعفری و گشنیز ۷۵٪ و کمترین میزان آلودگی در نعناع ۳۰٪ مشاهده گردید. در ضمن اکثر نمونه های جدا شده مقاومت بالایی نسبت به جنتامایسین ۹۳٪ و سپس ونکوماپسین ۴۸٪ نشان دادند و کمترین مقاومت را نسبت به کلرامفنیکل و آمپی سیلین ۴ درصد نشان دادند.

بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت به ونکوماپسین در جعفری و گشنیز به میزان ۶۰ درصد و کمترین میزان مقاومت به ونکوماپسین در شوید ۱۷ درصد مشاهده شد (جدول ۱).

در پژوهش حاضر در مجموع ۶ گونه مختلف به آنتروکوک شناسایی شد که ۶۱ جدایه متعلق به گونه *E. faecium* و ۱۰ جدایه متعلق به گونه *E. durans* و ۶ جدایه مربوط به گونه *gallinarum*

مجاز آنتروکوک در سبزی خشک منفی گزارش شده است (۱۶).

ب) شناسایی باکتری: ابتدا ۱ cc یا ۱ گرم از رقت اولیه را به ۱۰ میلی لیتر برموکرزول پرپل آزاید برات اضافه کرده، سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کرده. در صورت تغییر رنگ محیط کشت به زرد بر روی محیط KF حاوی یک درصد تترازولیوم به صورت خطی کشت داده در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کرده. پس از گذشت زمان مذکور کلنی های قرمز یا صورتی تیره کلنی های مشکوک محسوب شدند. جهت اطمینان از تست های بیوشیمیایی شامل هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا و کاتالاز استفاده شد. سپس برای تعیین گونه آنتروکوک از آزمون های قندی شامل آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، سوربوز، سوکروز و رافینوز در لوله های حاوی محیط پایه قندی به نسبت یک درصد از قند های ذکر شده و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت و همچنین رشد در $NaCl/6/5$ ، رشد در دمای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتی گراد، تست PYR، آرژنین دهیدرولاز (ADH)، تولید رنگدانه (Pigment) در محیط BHI آگار (Brain Heart Infusion agar) و تست حرکت استفاده شد (تمام قندها و محیط های کشت، مصرفی ساخت شرکت آلمان MERCK بودند).

ج) آزمون حساسیت آنتی بیوتیک: با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک تولیدی شرکت مست (MAST Co) ونکوماپسین $30 \mu g$ ، کلرامفنیکل $30 \mu g$ ، تتراسایکلین $30 \mu g$ ، اریتروماپسین $15 \mu g$ ، جنتامایسین $15 \mu g$ ، آمپی سیلین $10 \mu g$ ، تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت و فنوتایپ مقاومت بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید (۱۷). برای کنترل آنتی بیوگرام از سوبه آنتروکوک فکالیس (ATCC 29212) به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه استفاده گردید.

تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۰,۰ انجام شد به منظور بررسی الگوی

جدول ۱- تعداد و درصد انتروکوک های جدا شده و مقاومت آنتی بیوتیکی آنها در انواع مختلف سبزیجات

انواع سبزیجات	تعداد نمونه	تعداد انتروکوک جدا شده	جنتامایسین	ونکومایسین	اریترومایسین	تتراسایکلین	کلرامفنیکل	آمپیسیلین
جعفری	۲۰	۱۵ (۷۵٪)	۱۴ (۹۳٪)	۹ (۶۰٪)	۵ (۳۳٪)	۱ (۷٪)	۰ (۰٪)	۱ (۶٪)
شوید	۲۰	۱۲ (۶۰٪)	۱۱ (۹۲٪)	۲ (۱۷٪)	۸ (۶۷٪)	۵ (۴۲٪)	۲ (۱۶٪)	۰ (۰٪)
ترخون	۲۰	۱۴ (۷۰٪)	۱۴ (۱۰۰٪)	۷ (۵۰٪)	۲ (۱۴٪)	۴ (۲۹٪)	۰ (۰٪)	۲ (۱۴٪)
نعناع	۲۰	۶ (۳۰٪)	۶ (۱۰۰٪)	۳ (۵۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۱۷٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
قورمه سبزی	۲۰	۱۰ (۵۰٪)	۷ (۷۰٪)	۴ (۴۰٪)	۵ (۵۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
آش	۲۰	۱۲ (۶۰٪)	۱۲ (۱۰۰٪)	۷ (۵۸٪)	۷ (۵۸٪)	۱ (۸٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
گشنیز	۲۰	۱۵ (۷۵٪)	۱۴ (۹۳٪)	۹ (۶۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۷٪)	۱ (۷٪)	۰ (۰٪)
کل	۱۴۰	۸۴ (۶۰٪)	۷۸ (۹۳٪)	۴۱ (۴۸٪)	۲۷ (۳۲٪)	۱۳ (۱۵٪)	۳ (۴٪)	۳ (۴٪)

جدول ۲- تعداد و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی بر حسب هر یک از گونه های انتروکوک

میکرواورگانیزم	تعداد	جنتامایسین	ونکومایسین	اریترومایسین	تتراسایکلین	کلرامفنیکل	آمپیسیلین
<i>E. faecium</i>	۶۱ (۷۳٪)	۵۶ (۹۲٪)	۳۳ (۵۴٪)	۱۸ (۲۹٪)	۹ (۱۵٪)	۱ (۲٪)	۲ (۳٪)
<i>E. durans</i>	۱۰ (۱۲٪)	۱۰ (۱۰۰٪)	۳ (۳۰٪)	۷ (۷۰٪)	۱ (۱۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۱۰٪)
<i>E. gallinarum</i>	۶ (۷٪)	۶ (۱۰۰٪)	۲ (۳۳٪)	۱ (۱۷٪)	۱ (۱۷٪)	۱ (۱۷٪)	۰ (۰٪)
<i>E. faecalis</i>	۵ (۶٪)	۵ (۱۰۰٪)	۳ (۶۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۲۰٪)	۰ (۰٪)
<i>E. casseliflavus</i>	۱ (۱٪)	۱ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
<i>E. avium</i>	۱ (۱٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۱۰۰٪)	۱ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
جمع	۸۴ (۱۰۰٪)	۷۸ (۹۳٪)	۴۱ (۴۸٪)	۲۷ (۳۲٪)	۱۳ (۱۵٪)	۳ (۴٪)	۳ (۴٪)

آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین و کمترین میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و ونکومایسین می باشد.

با توجه به نتایج این بررسی مشخص شد که در هر دو نوع سبزی فله ایی و بسته بندی شده بالاترین میزان شیوع مربوط به *E. faecium* و کمترین میزان شیوع نیز مربوط به گونه های *E. avium* و *E. casseliflavus* است. اطلاعات بیشتر در مورد فراوانی گونه های مختلف در سبزی خشک فله ایی و بسته بندی شده در جدول ۴ بیان شده است.

آزمون کاپا در جدول ۵ نشان می دهد که ارتباط معنی داری بین مقاومت به ونکومایسین و

E. faecalis و ۱ و ۵ جدایه مربوط به گونه، *E. faecalis* و ۱ جدایه مربوط به گونه *E. avium* و ۱ جدایه مربوط به گونه *E. casseliflavus* می باشد.

جدول شماره ۲ مقاومت گونه های مختلف انتروکوک را نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف نشان می دهد. فراوان ترین جدایه مربوط به گونه فسیوم ۷۳ درصد و کمترین جدایه مربوط به کاسلی فلاوس و آویوم ۱ درصد است. بیشترین میزان مقاومت به ونکومایسین در گونه فکالیس ۶۰ درصد و سپس در فاسیوم ۵۴ درصد مشاهده شد.

جدول شماره ۳ تعداد و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی را نشان می دهد که نتایج موجود در این جدول نشانگر وجود بیشترین حساسیت نسبت به

جدول ۳- تعداد و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
جنتامایسین	۷۸ (۹۳٪)	۳ (۴٪)	۳ (۴٪)
ونکومایسین	۴۱ (۴۸٪)	۲۰ (۲۴٪)	۲۳ (۲۸٪)
اریترومایسین	۲۷ (۳۲٪)	۳۲ (۳۸٪)	۲۵ (۳۰٪)
تتراسایکلین	۱۳ (۱۵٪)	۱۱ (۱۳٪)	۶۰ (۷۲٪)
کلرامفنیکل	۳ (۴٪)	۹ (۱۱٪)	۷۱ (۸۵٪)
آمپی سیلین	۳ (۴٪)	۷ (۸٪)	۷۴ (۸۸٪)

جدول ۴- توزیع فراوانی گونه های مختلف آنتروکوک در سبزی خشک فله ایی و بسته بندی

تعداد و درصد آلودگی در سبزی خشک بسته بندی	تعداد و درصد آلودگی در سبزی خشک فله	گونه باکتری
۳۷ (۷۴٪)	۲۴ (۷۰٪)	E. faecium
۳ (۶٪)	۲ (۶٪)	E. faecalis
۳ (۶٪)	۳ (۹٪)	E. gallinarum
۵ (۱۰٪)	۵ (۱۵٪)	E. durans
۱ (۲٪)	۰ (۰٪)	E. avium
۱ (۲٪)	۰ (۰٪)	E. casseliflavus
۵۰ (۱۰۰٪)	۳۴ (۱۰۰٪)	جمع

جدول ۵- بررسی آماری مقاومت به ونکومایسین با سایر آنتی بیوتیکها

مقدار احتمال	ونکومایسین	Antimicrobials tested
* < ۰/۰۰۱	۰/۳۶۱	اریترومایسین
* ۰/۰۱۴	۰/۱۳۸	تتراسایکلین
* ۰/۰۲۶	۰/۰۸۸	کلرامفنیکل
۰/۲۹	۰/۰۳۹	آمپی سیلین

* مقدار کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده معنی داری ضریب کاپا است

به عنوان شاخص بهداشتی در مواد غذایی منجمد، همچنین مواد غذایی آماده به مصرف و مواد غذایی فرآوری شده و کنسروی، آنتروکوکها مورد توجه می باشند (۲۱).

مقاومت آنتی بیوتیکی در میان آنتروکوکها در جهان رو به افزایش گذاشته است که علت عمده آن استفاده روزافزون از آنتی بیوتیکها می باشد. این امر باعث ایجاد مقاومت در باکتری های بیماریزا و گسترش آن به سایر باکتریها می گردد. مصرف بی رویه آنتی بیوتیکها همچنین مقاومت دارویی را در باکتری های فلور نرمال افزایش داده و این مقاومت به باکتری هایی که پتانسیل بیماریزایی دارند انتقال می یابد؛ در نتیجه درمان عفونت های ناشی از آنها را مشکل و پیچیده می نماید (۲۲).

در این پژوهش ۸۴ نمونه (۶۰٪) آلوده به آنتروکوک بودند. E. faecium فراوان ترین جدایه از نمونه سبزی خشک بوده است و بیشترین مقاومت نسبت به جنتامایسین ۹۳٪ و ونکومایسین ۴۸٪ و کمترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین و کلرامفنیکل ۴٪ مشاهده شد.

نتایج ما مشابه مطالعه صورت گرفته توسط Torre و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایتالیا بر روی حساسیت آنتی بیوتیکی آنتروکوکها در سبزیجات تازه می باشد. در این مطالعه صورت گرفته از مجموع ۱۵۰ نمونه ۱۰۵ نمونه (۷۰٪) آنتروکوک

اریترومایسین ($p < 0.0001$, $k = 0.361$) و تتراسایکلین ($p = 0.014$, $k = 0.138$) و کلرامفنیکل ($p = 0.026$, $k = 0.088$) در سطح معنی داری ۰/۰۵ وجود دارد.

بحث و نتیجه گیری

برخلاف تلاش های صورت گرفته برای بالا بردن کیفیت غذاها، طغیان های مواد غذایی هنوز مشکلات بزرگی برای کشورها به وجود می آورند. این امر ناشی از این حقیقت می شود که میکروبها می توانند در زنجیره غذایی در مراحل مختلف وارد شوند و توانایی فائق شدن نسبت به عوامل محیطی را دارند (۱۹).

در میان مواد غذایی، سبزیها، فراورده هایی هستند که به دلیل بی توجهی و عدم رعایت کامل اصول بهداشت فردی کارکنان و عدم شستشوی صحیح و همچنین مصرف خام آنها، در اکثر موارد می توانند منبع آلودگی به باکتریها و کلیفرم های روده ای باشند. آلودگی زیاد مواد غذایی به آنتروکوک می تواند بیانگر آلودگی مدفوعی باشد و به همین دلیل شمارش آنتروکوکها در غذا می تواند راهنمای خوبی جهت بررسی کیفیت بهداشتی محصولات و شرایط بهداشتی کارخانجات مواد غذایی باشد (۲۰). با توجه به مقاومت برخی گونه های آنتروکوک به انجماد و برخی به گرما

ترتیب ۵/۴ و ۳/۶، log cfu/g در جعفری-۵/۸ و ۲/۱ بود (۲۵).

در مطالعه صورت گرفته توسط Falomir و همکاران بر روی سبزی های تازه در اسپانیا در ۵۰٪ سبزی های مورد مطالعه آلودگی مشاهده نمودند، بیشترین میزان مقاومت به آموکسی سیلین و آمپی سیلین مشاهده گردید و هیچ مقاومتی نسبت به جنتامایسین و کلرامفنیکل مشاهده نگردید (۲۶).

در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۰ در گرجستان ۴۷/۷٪ آلودگی به انتروکوکوسی در سبزیجات و میوه جات مشاهده شد و فراوان ترین جدایه از سبزیجات E.casseliflavus بود و هیچ مقاومتی نسبت به ونکوملیسین مشاهده نشد که با نتایج به دست آمده در این مطالعات مغایرت داشت (۲۷).

Johnston and Jaykus از مجموعه ۳۰۰ نمونه سبزی تازه جنوب غربی ایالات متحده بیش از ۱۸۵ جدایه انتروکوک جدا کردند که بیشترین جدایه E. faecium ۵۲٪ و E. faecalis ۲۱٪ بودند (۲۸).

در مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۰۶ در آمریکا بر روی میوه و سبزیجات ۴۷/۷٪ انتروکوک جدا شدند که جدایه غالب E.casseliflavus بوده است و هیچ یک از جدایه ها مقاومت به ونکومایسین نشان ندادند (۲۹).

در مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۱۵ در کشور تونس ۷۲/۲٪ انتروکوک از سبزیجات جدا شد که ۵۲/۳٪ E. faecium و ۶/۱۵٪ E. faecalis بودند؛ که ۶۰٪ به سیپروفلوکساسین، ۱۸/۴٪ به اریترومایسین، ۱۵/۴٪ به تتراسایکلین ۷/۷٪ به کلرامفنیکل و ۶/۱۵٪ به ونکومایسین مقاومت نشان دادند و هیچ مقاومتی نسبت به آمپی سیلین مشاهده نشد (۳۰).

در مطالعه صورت گرفته توسط Hamilton و همکاران بر روی حساسیت آنتی بیوتیکی انتروکوک های جدا شده از سالاد و سبزیجات میزان بالایی از مقاومت به آمپی سیلین مشاهده شده است که با نتایج به دست آمده در این مطالعه مغایر می باشد (۳۱).

جدا شد که بیشترین جدایه E. faecium (۶۲٪) و بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جنتامایسین ۸۵/۷٪ و تناسها ۴/۵٪ جدایه ها مقاومت به آمپی سیلین را نشان دادند (۱۸). در این مطالعه آزمون کاپا نشان داد که ارتباط معنی دار مثبت بین مقاومت به ونکومایسین و مقاومت به اریترومایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل در سطح ۰/۰۵ وجود دارد. به این معنی که اگر در یک گونه مقاومت در ونکومایسین بالاتر است مقاومت به اریترومایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل نیز بالاتر است. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه Ida Torre می باشد (۱۸).

تورانتاس در سال ۲۰۰۲ نسبت به ارزیابی مقایسه ای آلودگی به کلیفرم های مدفوعی و نیز انتروکوک ها در بستنی و سبزیجات منجمد اقدام نمود. بر اساس نتایج حاصل، به ترتیب ۵۱ و ۷۸ درصد بستنی ها و سبزیجات منجمد، آلوده به انتروکوک بودند. این در حالی بود که میزان آلودگی محصولات مورد اشاره به کلیفرم مدفوعی به ترتیب ۴ و ۲۴ درصد بود. نتایج حاکی از آن بود که هیچگونه ارتباط مستقیمی بین میزان آلودگی به کلیفرم مدفوعی و انتروکوک ها وجود ندارد. بنابراین، با توجه به مقاومت انتروکوک در برابر سرما، به نظر می رسد در محصولات غذایی منجمد، انتروکوک به عنوان شاخص بهداشتی مطرح است (۲۳).

سلطان دلال و همکاران در یک بررسی بر روی ۱۰۰ نمونه از ۱۰ نوع سبزی تازه بسته بندی شده و غیر بسته بندی شده بر اساس روش های ارائه شده در استاندارد های ملی ایران مورد آزمون قرار دادند. شمارش انتروکوکوس با کشت پورپلیت در محیط KF آگار انجام شد. تمامی ۱۰۰٪ نمونه های سبزی خوردن، اسفناج، جوانه گندم و جوانه ماش غیر قابل مصرف بودند (۲۴).

در مطالعه دیگری در آمریکا بر روی سبزی ها، از مزرعه تا بسته بندی، توسط Johnston و همکاران شمارش میکروارگانیسم های هوازی در گشنیز ۶/۱ log cfu/g و میزان انتروکوکوس آن ۱/۹ log cfu/g به دست آمد. همین مقادیر در شوید به

استفاده از کود های حیوانی تصفیه نشده در مزارع کشاورزی و آبیاری سبزیجات با فاضلاب های تصفیه نشده است که باعث انتقال آلودگی مدفوعی به سبزیجات می شود که متأسفانه به علت عدم شستشوی کافی و عدم گندزدایی، این آلودگی ها برطرف نشده و سبزیجات مورد استفاده در تهیه سالاد را غیر قابل مصرف می نماید.

پیشنهادات

آموزش استفاده از مواد شوینده و مواد گندزدایی مناسب برای انگل زدایی و گندزدایی سبزیجات مورد استفاده، رعایت نکات بهداشت فردی متصدیانی که با تهیه و توزیع مواد غذایی سروکار دارند، الزامی بودن آگاه سازی دست اندرکاران تهیه و توزیع مواد غذایی به عوامل آلوده کننده مواد غذایی، آموزش به متصدیان تهیه و توزیع مواد غذایی در خصوص بهداشت لوازم کار، نگهداری سبزیجات و صیفی جات مورد استفاده در مکان های مناسب مانند یخچال، نظارت دقیق تر مسئولین بر اجرای قوانین بهداشتی موجود در کشور، برنامه ریزی منسجم از طریق نظارت بر مراحل کاشت و برداشت سبزیجات و صیفی جات، نمونه برداری منظم و همچنین کنترل کیفیت باکتریولوژیکی سبزی های خشک عرضه شده.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۹۳۴۶ می باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که از نظر مالی حامی این طرح تحقیقاتی بوده اند، کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Vinas I. Microbiological quality of fresh, minimally processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Food Microbiology*, 2008.123: 121-129.
2. Artes F, Gomez P, Aguayo E, Escalona V,

از سوی دیگر گونه های آنتروکوکسی توانایی انتقال ژن مقاومت آنتی بیوتیک داخل گونه ای، به باکتری های بیماری زای دیگر به طور مثال استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوزنز و باکتری های غیر بیماری زا در دستگاه گوارش انسان و حیوان و حتی در مواد غذایی و محیط را دارا می باشند (۳۲). در حقیقت باکتری های گونه آنتروکوکسی به عنوان الگویی از افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در سرتاسر جهان به خصوص در عفونت های بیمارستانی مطرح هستند (۳۳).

به علاوه حضور آنتروکوکسی در محصولات غذایی، مقاومت های چندگانه به آنتی بیوتیک ها و ژن های تعیین کننده ویروالانس باعث محدود شدن انتخاب درمانی شده است بنابراین حضور آن ها در غذا و منابع آبی حائز اهمیت می باشد (۳۴-۳۵).

همچنین در بسیاری از کشورها، فاضلاب های شهری برای آبیاری مزارع کشاورزی استفاده می شود که این امر سبب ورود عوامل بیماری زا، در خاک و محصولات و همچنین مشکلات بهداشتی برای انسان ایجاد می کنند (۳۶). کود یکی دیگر از عوامل آلوده کننده ی مزارع به باکتری هایی از قبیل آنتروکوک است که می تواند هفته ها و ماه ها در خاک باقی مانده و باعث آلودگی محصول گردد (۳۷). هرچند شستن پس از برداشت محصول تازه، روش مهمی برای کاهش پاتوژن ها می باشد ولی برخی عوامل از جمله وجود پاتوژن در داخل بافت گیاه، تشکیل بیوفیلم توسط باکتری و نیز آبریزی سطح گیاه اثربخشی آن را محدود می کنند (۳۸). جلوگیری از آلودگی سبزی ها با میکروارگانسیم ها، به عهده ی تمام افراد دخیل در فعالیت های قبل از برداشت، حین برداشت و پس از برداشت محصول است و در این زمینه آموزش افراد به ویژه آموزش کشاورزان در استفاده از آب و کود مناسب ضروری است (۳۹).

نتایج بدست آمده از این تحقیق غیر بهداشتی بودن سبزی های خشک عرضه شده در شهر تهران را نشان می دهد و لزوم اقدام اساسی را در این زمینه نشان می دهد. اصلی ترین علت آلودگی سبزی های خشک عرضه شده در شهر تهران

1996;59: 204-216.

15. Mukherjee A, Speh D, Jones AT, Buesing K M, Diez-Gonzalez F. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midves. *J Food Protect.* 2006; 69: 1928-1936.

16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI Number 5852. Packaging Dried Vegetables, Specifications. 1st. Revision. 2000. 1-10.

17. National committee for clinical Laboratory standard. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. Approved standard. (January 2012). M07-A9; 32(2):1-63.

18. Torre I, Pennino F, Diana MV, De Marco G, Trotta AM, Borriello T, et al. Antimicrobial susceptibility and glycopeptide-resistance of enterococci in vegetables. *Italian J Public Health (HJPH).* 2010;7(1):47-53.

19. Havelaar AH, Bräunig J, Christiansen K, Cornu M, Hald T, et al. Towards an integrated approach in supporting microbiological food safety decisions. *Zoonoses and Public Health,* 2007;54, 103–117.

20. Hurlbert RE. Microbiology Laboratory Manual. 2nd ed. USA; Washington State University. 1998;11-15.

21. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. USA; American Public Health Association. 2008; 613-621.

22. Murray BE. Problems and dilemmas of antimicrobial resistance. *Pharmacotherapy* 1992; 12(6 Pt 2): 86–93.

23. Turantas F. Incidence of faecal streptococci as an indicator of sanitation in ice-cream and frozen vegetables. *Int J Food Sci Technol* 2002; 37(3):239-243.

24. Soltan Dallal MM, Shojaei Zinjanab M. A Survey of Escherichia Coli, Enterococcus and Total Microbial Count of Packaged and Non-Packaged Fresh Vegetables in Tehran. *PAYAVARD SALAMAT J.* 2017;220-9.

25. Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Martinez MC, Anciso J, Mora B, et al. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J Food Protec* 2005; 68(9): 1840-7.

26. Falomir MP, Rico H, Gozalbo D. Enterobacter and klebsiella species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease* 2013; 10(12):1002-7.

27. McGowan LL, Jackson CR, Barrett JB. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Fruits, Vegetables, and Meatst. *J Food Protection.* 2006;69(12):2976-82.

Artez-hernandez F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Post harvest Biol Tech,* 2009.51: 287-296.

3. Sapers GM. 2003. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruits and vegetables. In Novak JS, GM Sapers, and VK Juneja. (Eds). *Microbial Safety of Minimally Processed Foods.* Boca Raton, FL: CRC Press: 221-253. 2003.

4. FDA (Food and Drug Administration, USA), 2008. Guidance for industry. Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. URL: < <http://www.fda.gov/food/guidance-compliance-regulatory-in-formation/guidance-documents/>> (accessed 06.02. 2009).

5. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbio* 2012; 32(1): 1-19.

6. Warriner K, Huber A, Namvar A, Fan W, Dunfield K. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv Food Nutr Res.* 2009;57:155-208.

7. Zhang G Ma L, Beuchat LR, Erickson MC, Phelan VH, Doyle MP. Evaluation of treatments for elimination of foodborne pathogens on the surface of leaves and roots of lettuce (*Lactuca sativa* L). *J Food Prot.* 2009 Feb;72(2):228-34.

8. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology.* 2009;155(6):1749-57.

9. Gordon S, Swenson J, Hill B, Pigott N, Facklam R, Cooksey RC, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2373-2378.

10. Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R. Characterization of glycopeptid-resistant enterococci from a Swiss hospital. *J Clin Microbiol* 1993; 36(7): 1853-8.

11. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Eng J Med* 2000; 342(10): 710-21.

12. Schentag JJ. Antimicrobial management strategies for gram-positive bacterial resistance in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2001; 29(4): 100–7.

13. Kuriyama T, Williams DW, Patel M, Lewis MA, Jenkins LE, Hill DW, et al. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from a teaching hospital in Wales. *J Med Microbiol* 2003; 52(9): 821-7.

14. Beuchat LR. Pathogenic microorganism associated with fresh product. *J Food Protec,*

43. Lyons FH, Benora D. "Total rewards strategy: The best foundation of pay for performance". *Comp Ben Rev.* 2002;34(2):34-40.
44. Milkovich GT, Stevens J. "From pay to rewards: 100 years of change". *ACA J.* 2000;9(1):6-18.
45. Lee KW, Lev B, Yeo GH. Executive pay dispersion, corporate governance, and firm performance. *Rev Quant Fin Account.* 2008 Apr 1;30(3):315-38.
46. Aghababaei Dehaghani Z, Memarzadeh Tehran G, Nikjoo AE. Organizational Factors Affecting the Compensation of Services of Specialist Physicians Working in State-run Hospitals in Tehran. 2015; 27(1):133-157.
47. DeVaro J. Strategic promotion tournaments and worker performance. *Strat Manag J.* 2006 Aug 1;27(8):721-40.
48. Iran-nejade parizi M, Sasan-gohar P. Management and Organization from Theory to Practice. 9th ed. Tehran: Iranian Banking High Institute Publications; 2007. [Persian]
49. Baker G, Carter B. The evolution of pay for performance models for rewarding providers. Introduction to: Case Studies in Health Plan Pay-for-Performance. Washington, DC: Atlantic Information Services; 2004.
50. Adams D, Meredith B. Rosenthal. Pay for Performance: A Decision Guide for Purchasers. AHRQ Publication 2006; April (06).
51. Mirzasadeghi AR, Vatankhah S, Fatemi R. Performance based Management. 2nd ed. Tehran: Medical Education, Treatment and Hygiene Ministry Publications; 2003. [Persian]
52. Steiger, B. Poll finds physicians very wary of pay-for-performance programs. *The Physician Executive* 2005; November/ December: 6-11.
53. Eichler E, Auxila P, Antoine U, Bernateau D. Performed Based Incentives Health: Six Years of Results from Supply – Side Programs in Haiti. CGO working paper 2007; April 6.
54. Lindenauer PK, Remus D, Roman Sh, Rothberg MB, Benjamin EM, Ma A, et al. Public Reporting and Pay for Performance in Hospital Quality Improvement. *N Engl J Med* 2007;356: 5.
28. Johnston LM, Jaykus LA. Antimicrobial Resistance of Enterococcus species isolated from produce. *Appl Environ Microbiol* 2004; 3133-7.
29. McGowan LL, Jackson CR, Barrett JB, Hiott LM, Fedorka-Cray PJ. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot.* 2006; 69(12):2976-82.
30. Ben Said L, Klibi N, Dziri R, Borgo F, Boudabous A, Ben Slama K, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of Enterococcus spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. *J Sci Food Agric.* 2016;96(5):1627-33.
31. Hamilton-Miller JM, Shah S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(1): 81-3.
32. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 24 (Suppl. 1), S80-S84.
33. Morrison, D, Woodford N, Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Suppl.* 1997; 83: 89-99.
34. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 2002 Jun;26(2):163-71.
35. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapel WH. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Interjl food microbiol.* 2003;88(2):105-22.
36. Ibenyassine K, Mhand RA, Kranoko Y, Anajjar B, Chouibani MM, Ennaji M. Bacterial pathogens recovered from vegetables irrigated by wastewater in Morocco. *J Environmental Health* 2007; 69(10): 47-51.
37. Ceuppens S, Hessel CT, de Quadros Rodrigues R, Bartz S, Tondo EC, Uyttendaele M. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International J Food Microbiol;* 2014; 181(1): 67-76.
38. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol;* 2012; 32(1): 1-19.
39. Aycicek H, Oguz U, Karci K. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *Inter J Hygiene EnvironHealth.* 2006; 209(2): 197-201.
40. Fredrickson J, Davis-Blake A, Sanders W. "Sharing the wealth: Social comparisons and pay dispersion in the CEO's top team". *Strat Manag J.* 2010;31:1031-1053.
41. Ebadi A, Hadad M, Sirati M, Karimi A. The Study of The Effect Fee for service on Nurses Performance. *Manag Med info Sci.* 2004; 6(14):53-61. [Persian]
42. Mondello M, Maxcy J. "The impact of salary dispersion and performance bonuses in NFL organizations". *Manag Dec.* 2009;47:110-123.

Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococci* species isolated from packed and unpacked dried vegetables distributed in Tehran

Maryam Abbaspour, Department of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Zahra Rajabi, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Mohammad Mahdi Soltan Dallal**, Professor of Microbiology, Food Microbiology Research Center, Division of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). msoltandallal@gmail.com

Akram Yazdani, PhD student, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background: *Enterococci* are gram-positive cocci that have frequently been isolated from animal and vegetable foods. The aim of this study was to identify the prevalence and antibiotic susceptibility of enterococci isolated from seven types of vegetables randomly selected from grocery stores in Tehran.

Methods: In this cross-sectional study, 140 samples were collected from April to October 2015. Enterococci were detected in samples using the Gram stain and biochemical tests such as catalase reaction, and hydrolyze bile esculin and identified at the species level by the common biochemical tests. Antibiotic susceptibility test of isolates with six antibiotics was also done using the disc diffusion method.

Results: Eighty-four out of 140 (60%) samples showed enterococci. Of these, 72.6% belonged to the species *Enterococcus faecium*. The results showed that 10, 6, 5, 1 and 1 isolates were *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. avium* and *E. casseliflavus* respectively. Low percentages of microorganisms were resistant to tetracycline (15%), ampicillin (4%), and chloramphenicol (4%). A high percentage of microorganisms were resistant to gentamicin (93%), vancomycin (48%), and erythromycin (32%).

Conclusion: The results revealed contamination of dried vegetables in Tehran. According to the findings, we conclude that training of dealers and food suppliers are necessary and healthy principals should be followed. Also, supervision on food packing and storage should be considered to prevent food microbial contamination.

Keywords: Vegetables, Enterococcus, Antibiotic resistance, Tehran