

## بررسی آلودگی سالمونلایی سبزیجات آبیاری شده با آبهای آلوده و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در استان تهران

صدیقه مهرابیان<sup>۱</sup>، سمیرا سادات طهرانی<sup>۲</sup>، محمد حسن شاه حسینی<sup>۳</sup> و احمد علی پوربابایی<sup>۴</sup>

۱. گروه بیولوژی، دانشگاه تربیت معلم، ۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۳. گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قیام دشت (شهر قدس)، ۴. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

### چکیده

سالمونلوزیس یکی از شایعترین بیماریهای مرتبط با مصرف آب و غذاهای آلوده از جمله سبزیجات است. استفاده از آبهای آلوده برای آبیاری مزارع در استان تهران معمول است. در این بررسی ۵۰ نمونه شامل سبزی خوردن، سبزیجاتی با برگهای پیچیده (کلم و کاهو) از مزارع جمع آوری شد و با استفاده از روشهای رایج میکروبیولوژی، کشت در محیطهای غنی کننده - انتخابی، افتراقی سالمونلا جدا سازی و با استفاده از آنتی سرمهای سوماتیک و فلاژله، سروتیپ های مختلف آن شناسایی و به روش دیسک گذاری الگوی مقاومت آنها تعیین شد. تحلیل داده ها با مجذور کای صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۲۸٪ نمونه ها آلوده به سالمونلا بودند و ۱۴ سالمونلای جدا شده متعلق به ۷ سروار مختلف *S. enterica ssp. enterica- S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. weltevreden*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. montevideo*, *S. derby*, *S. typhimurium* بود. سالمونلا انتریتیدیس (۴۳٪) سرو تایپ غالب بود. الگوی مقاومت ایزوله ها متفاوت بود به طوری که بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید و کمترین مقاومت نسبت به آموکسی سیلین، سفوکسیتین و کلرامفنیکل بود ( $P < 0/01$ ). در یک مورد مقاومت به ۱۳ آنتی بیوتیک مختلف مشاهده شد و مقاومت به ۵ آنتی بیوتیک کمترین الگوی مقاومت دیده شده بود. در برخی کشورها مانند هند، مالزی، ایالات متحده، تحقیقات آلودگی سالمونلایی را در سبزیجات نشان می دهد و از آنجا که این مواد معمولاً مصرف می شوند به ویژه در بیمارستانها می تواند از نظر سلامت و بهداشت عمومی مشکلاتی را ایجاد کند.

**واژگان کلیدی:** سالمونلا، سبزی، مقاومت آنتی بیوتیکی، آبیاری، آب آلوده.

### مقدمه

مرتبط با مصرف آب و غذای آلوده در کشورهای در حال توسعه می باشد (۳) و عمدتاً طی مصرف آب و غذاهای آلوده بخصوص، غذاهایی با منشأ حیوانی (گوشت - مرغ - تخم مرغ - شیر) و سایر مواد از جمله میوه ها و سبزیجات ایجاد می گردد. آلودگی محصولات کشاورزی و میوه ها، ممکن است طی مراحل قبل از برداشت یا بعد از برداشت صورت گیرد. از مهمترین عوامل آلوده کننده قبل از برداشت، می توان به کودهای حیوانی - آبهای زراعی - هوا

سالمونلاها باسیل های گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه اند که تا کنون بیش از ۲۴۰۰ سروتیپ آن شناسایی شده است. بیشتر این سروتیپ ها پاتوژنهای بالقوه انسانی بوده ولی تنها تعداد کمی از آنها عامل عفونت های انسانی اند (۱). سالمونلا عامل بیماریهایی مانند: تب تیفوئید و پاراتیفوئید، باکتری می و گاسترو- انتریت است (۲). سالمونلوزیس یکی از شایعترین و معمولترین بیماریهای

لیزین دکربوکسیلاسیون برات - تریپل استفاده شد - SIM-MRVP شوگر ایرون آگار و (شکل ۴) (۱۲). محیط های مورد استفاده در این تحقیق، از محصولات دو شرکت هایمیدیا و مرک بودند. شناسایی سروتیپ های سالمونلا با استفاده از آنتی سرمهای سوماتیک و فلاژله، در موسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی صورت گرفت.

الگوی مقاومت سالمونلاهای جدا شده نسبت به ۲۰ آنتی بیوتیک مختلف به روش دیسک گذاری در محیط کشت مولر هینتون آگار تعیین شد:

آمی سیلین (10μ / A) - آموکسی سیلین (20μ / Am)  
استرپتومایسین (10μ / S) - اریترومایسین (10μ / E) -  
تتراسایکلین (30μ / T) - تری متوپریم / سولفامتوکسازول  
(25μ / SXT) - جنتامایسین (10μ / G) - سفالکسین  
(30μ / CP) - سفالوتین (30μ / CH) - سفتریازگون  
(30μ / CI) - سفپیم (30μ / CPM) - سفوتاکسیم /  
(30μ / CN) - سفوفلوکسازین - سیپروفلوکسازین  
(5μ / CF) - کلرامفنیکل (30μ / C) - نالیدیکسیک  
اسید (30μ / NA) - نورفلوکسازین (10μ / NF) -  
نئومایسین (30μ / N) - نیتروفورانئوتین (30μ / NX)  
تری متوپریم (5μ / TR) (10).

تحلیل داده ها با مجذور کای صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ۱۴ مورد از ۵۰ نمونه سبزی جمع آوری شده (۲۸٪)، آلوده به سالمونلا بودند. از این ۱۴ نمونه جدا شده، ۴ مورد آلودگی، مربوط به سبزی خوردن، ۵ مورد مربوط به کلم و ۵ مورد مربوط به کاهو بود (جدول ۱). نتایج نشان داد بین میزان آلودگی ( $P > 0/05$ ) که تفاوت معنی داری سالمونلایی در سبزیجات مختلف وجود ندارد و در واقع سبزیجات مختلف به یک نسبت آلوده شده اند.

آزمایشات سرولوژیکی نشان داد که ۱۴ سالمونلای جدا شده، به ۷ واریته سرولوژیکی سالمونلا انتریکا سروتیپهای:

*S. dublin* - *S. derby* - *S. enteritidis* - *S. infantis* - *S. montevideo* - *S. typhimurium* - *S. weltevreden*

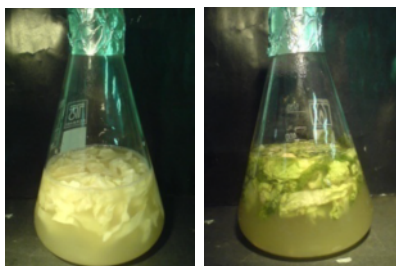
متعلق بودند (جدول ۲). این سروتیپها به ۴ گروه تعلق داشتند. بر اساس B, C (C1), D, E (E1) نتایج حاصله، فراوانی نسبی سروتیپهای جدا شده در مشابه و

و خاک - دامها و حیوانات وحشی و حشرات، و از عوامل آلوده کننده بعد از برداشت، می توان به کارگران و مصرف کنندگان - تجهیزات برداشت و حمل و نقل - تجهیزات نگهداری، بسته بندی و پردازش - آب و یخ و ... اشاره کرد (۴). طی سه دهه اخیر، استفاده از فاضلاب به منظور کشاورزی در نواحی خشک کشورهای در حال توسعه، به دلیل هزینه بالای تصفیه آن و کمبود سایر منابع آبی، افزایش چشمگیری یافته است (۵-۸).

حضور میکروارگانیسمهای پاتوژن از جمله باکتریها - ویروسها - پروتوزوئرها و انگلها در این آبها از مهمترین عوامل ایجاد عفونت های ناشی از آن بوده و این مشکل زمانی پیچیده تر می شود، که باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک نیز در بین آنها حضور داشته باشند (۷). مصرف خام سبزیجات، اهمیت بالایی از نظر سلامت و بهداشت عمومی انسان دارد (۹). امروزه گزارشات متعددی مبنی بر وجود ارتباط نزدیک، بین سالمونلاهای جدا شده از آبهای زراعی و سبزیجات آبیاری شده با آنها، منتشر شده است (۱۱-۱۰).

### مواد و روش ها

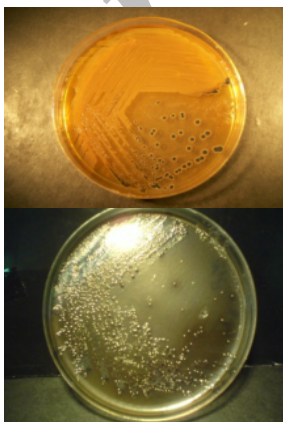
۵۰ نمونه، شامل سبزی خوردن و سبزیجاتی با برگهای پیچیده ( کلم و کاهو )، از دی ماه ۱۳۸۵ الی شهریور ۱۳۸۶ از برخی مزارع استان تهران جمع آوری شد. به منظور پیش غنی سازی، ۲۵ گرم از هر نمونه، به ۲۲۵ میلی لیتر محیط لاکتوز برات تلقیح و برای ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (شکل ۱). برای غنی سازی، به صورت مجزا ۱۱ میلی لیتر از این محیط، به ۱۰ میلی لیتر محیط تترابرات تلقیح و برای ۲۴ F تیونات برات و سلنیت ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد (شکل ۲). برای جدا سازی و شناسایی سالمونلاها از این دو محیط غنی کننده، بر روی محیط های سالمونلا شیگلا آگار و بیسموت سولفیت آگار کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون صورت گرفت (شکل ۳). به منظور بدست آوردن سوش های خالص از هر یک از پلیت های حاوی محیط انتخابی، ۳ کلنی انتخاب و روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و به منظور تأیید، از تستهای بیوشیمیایی و کشت در محیطهای تشخیص افتراقی اوره آگار - سیمون سیترات -



شکل ۱. پیش غنی سازی نمونه ههای کلم قرمز - کلم سفید (بالا از سمت راست به چپ) - کاهو و سبزی خوردن (پائین از سمت راست به چپ)



شکل ۲. غنی سازی در محیط مایع انتخابی تتراتیونات برات (از سمت راست به چپ) F برات و سلنیت



شکل ۳. کلنی های مشکوک به سالمونلا در محیط جامد انتخابی سالمونلا شیگلا آگار بیسموت سولفیت آگار (از بالا به پائین)

برابر با  $E_3C/14/29$  گروههای آنتی ژنی بود در حالی که فراوانی نسبی سروتیپهای جدا شده در  $D/21/42$ ،  $50\%$  و گروه آنتی ژنی B گروه آنتی ژنی  $3\%$  بوده است (جدول شماره ۳).

گرچه سالمونلا تیپی موریوم بیشترین سروتیپ جدا شده از نمونه های سبزی بود ( $42/85\%$ )، ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری بین سروتیپهای آلوده کننده، وجود نداشت در واقع میزان آلودگی سبزیجات مختلف، با سروتیپهای متفاوت، یکسان بوده است ( $P>0/05$ ). چهار سروتیپ مختلف سالمونلا، هر کدام تنها از یک نوع نمونه سبزی جدا شدند که عبارتند از:

*S. dublin* - *S. derby* - *S. infantis* - *S. montevideo*

بررسی تستهای حساسیت به آنتی بیوتیکها نشان داد که، گرچه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها متفاوت بود، به طوری که بیشترین مقاومت نسبت به اریترومايسين - تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید ( $100\%$ ) و کمترین مقاومت نسبت به کلرامفنیکل و سفوکسیتین ( $28/5\%$ ) و آموکسی سیلین ( $35/7\%$ ) دیده شده است ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود ندارد ( $P>0/05$ ) (نمودار شماره ۱).

هیچ مقاومتی نسبت به آنتی بیوتیکهای سفوتاکسیم نئومايسين - سفتریازون - جنتامایسین - نورفلوکسازین سیپروفلوکسازین و سفپیم مشاهده نشد. بیشترین مقاومت جدا شده از کلم دیده شد که *S. dublin* در یک سویه دارای الگوی مقاومت سیزده گانه بوده وهم زمان به آنتی بیوتیکهای اریترومايسين - تتراسایکلین - آمپی سیلین - نالیدیکسیک اسید - استرپتومايسين - تری متوپریم - نیتروفورانئوتین - سفالوتین - سفالکسین - تری متوپریم / سولفامتوکسازول - سفوکسیتین - کلرامفنیکل و آموکسی سیلین مقاومت نشان داد و حساس جدا شده از کاهو بود که *S. enteritidis*، ترین سویه تنها به آنتی بیوتیک های استرپتومايسين - تتراسایکلین - نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانئوتین مقاوم بود (جدول شماره ۴).  $42/9\%$  سویه ها مقاومت ده گانه به آنتی بیوتیکها داشته که بیشترین فراوانی را در بر دارد، سپس مقاومت دوازده گانه و هشت گانه به ترتیب با فراوانی  $21/5\%$  و  $14/3\%$ ، در مرتبه بعدی قرار داشتند (نمودار ۲).

جدول ۲. فراوانی سروتیپهای مختلف سالمونلاهای جدا شده

از سبزیجات مختلف

سروتیپ	نوع سبزی			جمع
	کاهو	کلم	سبزی خوردن	
<i>S. dublin</i>	-	1	-	1
<i>S. derby</i>	-	1	-	1
<i>S. enteritidis</i>	1	1	-	2
<i>S. infantis</i>	1	-	-	1
<i>S. montevideo</i>	1	-	-	1
<i>S. typhimurium</i>	2	2	2	6
<i>S. weltevreden</i>	-	-	2	2
جمع	5	5	4	14



شکل ۴. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی یک نمونه مشکوک به سالمونلا

جدول ۳. فراوانی سروتیپهای مختلف سالمونلاهای جدا شده

از سبزیجات

سروتیپ	تعداد	گروه	درصد
<i>S. dublin</i>	1	D	21/42%
<i>S. enteritidis</i>	2	D	
<i>S. infantis</i>	1	C1	14/28%
<i>S. montevideo</i>	1	C1	
<i>S. typhimurium</i>	6	B	50%
<i>S. derby</i>	1	B	
<i>S. weltevreden</i>	2	E1	14/28%
جمع	14	-	100%

جدول ۱. توزیع فراوانی آلودگی سبزیجات مختلف، به سالمونلا

منبع	نمونه های مثبت	درصد
سبزی خوردن	4	28/58%
کلم	5	35/71%
کاهو	5	35/71%
جمع	14	100%

جدول ۴. الگوی مقاومت سالمونلاهای جدا شده از سبزیجات

منبع غذایی	سروتیپ	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی
سبزی خوردن	<i>S. weltevreden</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/C/NF/CH/AM/CN/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. weltevreden</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/S/TR
کاهو	<i>S. infantis</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/AM/S/CN/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. montevideo</i>	E/CP/SXT/T/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/SXT/T/A/NA/C/CH/AM/S/TR
	<i>S. enteritidis</i>	E/T/NA/NF/S
کلم	<i>S. dublin</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/C/NF/CH/AM/S/CN/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/C/CH/AM/S/CN/TR
	<i>S. derby</i>	E/CP/T/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. enteritidis</i>	E/CP/SXT/T/A/NA/NF/CH/S/TR
	<i>S. typhimurium</i>	E/CP/T/A/NA/NF/CH/S



مقاومت های چند دارویی نیز در آنها شایع است (نمودار ۲ و ۱). از علتهای افزایش مقاومتها، مصرف بی رویه و کنترل نشده آنتی بیوتیک ها در پزشکی و دامپزشکی است که باعث از بین رفتن باکتریهای حساس و انتخاب سویه های مقاوم می شود. این سویه ها مستقیما یا از طریق غذا انسان را آلوده کرده و می توانند ژنهای مقاومت را به فلورای اندوژن انسان انتقال دهند (۲۳). مهمترین نقطه کنترل آلودگی میوه ها و سبزیجات، کنترل پسابها - فاضلابها و زباله هاست و یکی از راههای جلوگیری از آلودگی، شستشوی مناسب این محصولات است که باعث پاک شدن سطح آنها از میکروارگانیسم ها و جلوگیری از آلودگی سایر مواد از طریق تماس با آنها می شود، استفاده از ترکیبات واجد کلر - دی اکسید کلر و اسید های آلی در شستشو، می تواند مفید باشد (۲۳).

#### منابع:

- 1- Baggsen, D.L., Sandvang, D., Aarestrup F M, (2000). Characterization of salmonella enterica serovar typhmurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the united sates. *clinMicrobiol*; **38**: 1581-6.
- 2- Phan, T, T., Khai. L. T. L. & Loc, C. B. (2003). Isolation of Salmonella strains from the aqua environment and comparison with those of animal origin in Tan Phu Thanh Village, Mekong Delta, and Vietnam. *JARQ*, **37**, NO. 4.
- 3- Bell, C., and Kyriakids A, (2002). Salmonella, a practical approach to the organism and its control in foods. practical food microbiology series. Blackwell SciencLtd., oxford, united kingdom.
- 4- Beuchat, L, R, Ryu, J H, (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging Infection Diseases*. **3**(4): 16-32.
- 5- Mara, D. D. & Carncross, S, (1989). Guidlines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. Geneva: World Heath Organization & United Nation Environment Program. ISBN **92** (4): 15428 -9.

محققین بسیاری نشان دادند که آبهای زراعی و سبزیجات با سروتیپ های مشابهی از سالمونلا آلوده شده اند (۲۲-۲۰ و ۸) در این بررسی، ۲۸٪ نمونه های سبزی، آلوده به سالمونلا بودند و میزان آلودگی انواع مختلف آنها، به یک میزان بوده است که نشان می دهد این سبزیجات به نسبت یکسانی تحت تاثیر عامل یا عوامل آلوده کننده قرار گرفته اند. با انجام آزمایشات سرولوژیکی مشخص شد که یکی *S. typhimurium* یکی از بیشترین سروتیپ جدا شده بوده است (۴۲/۸۵) (جدول شماره ۲) که یکی از سه سروتیپی است که شیوع جهانی دارد. نوع سروتیپ های جدا شده در نواحی و یا کشورهای مختلف، متفاوت است که بستگی به نوع مخزن آن و پراکندگی عفونتهای سالمونلایی دارد (۳).

این بررسی نشان می دهد که سالمونلاهای جدا شده غالبا مقاومت های بالایی به آنتی بیوتیک ها داشتند و

- 6- Mead P.S. Slutsker L, Dietz V, McGaig L.F, Bresee J. S, Shapiro C, Griffin P.M and Tauxe R. V, (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerf. Infect. Dis*. **5**:607-625.
- 7- Melloul A, Hassani A, (1999). Antibiotic resistance of Salmonella strains isolated from children living in the waste water spreading field of Marrakech city. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **15**, 91-96.
- 8- Melloul A, Hassani A, and Rafouk L, (2001). Salmonella contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, **17**, 207-209.
- 9- Shoval H.I, Yekutieli P & Fattal B, (1984). Epidemiological evidence for helminth and cholera transmission by vegetables irrigated with wastewater: *Water science and technology*. **17**, 442-443.
- 10- Ruiz G.V.B, (1987). A comparitative study of strains of salmonella isolated from irrigation waters, vegetables and human infections. *Epidemiology and Infection* **98**, 271-274.
- 11- Villanova Ruiz B, Cueto Espinar A, Bolaños Carmona MJ, (1987). A comparative study of strains of salmonella isolated from irrigation

- waters, vegetables and human infections. *Epidemiol Infect.* **98**(3):271-6.
- ۱۲- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، آبان ماه (۱۳۸۱). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی.
- 13- Drug- resistant Salmonella. Report of a WHO Meeting Geneva , Switzerland, 15-18 March 2005.
- 14- Sagoo SK, Little CL, Ward L, Gillespie IA, Mitchell RT, (2003). Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *J Food Prot.*; **66**(3): 403-9.
- 15- Singh BR, Singh M, Singh P, Babu N, Chandra M, Agarwal RK, (2006). Prevalence of multidrug-resistant Salmonella on ready-to-eat betel leaves (Paan) and in water used for soaking betel leaves in North Indian cities. *J Food Prot.* **69**(2):288-92.
- 16- Singh BR, Agrawal S, Teotia U, (2007). Prevalence of multidrug resistant Salmonella in Coriander, Mint, Carrot and Radish in Bareilly and Kanpur, Northern India. *Foodborne Pathogens and Disease*, **4**(2):233-240.
- 17- Viswanathan P, Kaur R, (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* **203**(3): 205-213.
- 18- Bean NH, Goulding JS, Danels M.T and Angulo F.J, (1997). Surveillance for food borne disease outbreaks: United States 1988-1992. *J. Food Prot.* **60**, 1265-1286.
- 19- Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR, (2003). Recent trend's in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2003.
- 20- Berthranou A, Llop A & Vazquez Avilla AJ, (1987). Water use and reuse management in arid zones: the case of Mendoza. Argentina. *Water International* **8**, 2-12.
- 21- Blak RE, Cisneros L, Levine MM, Banfi A, Lobos H and Rodriguez H, (1985). Case control study to identify risk factors for pediatric endemic typhoid fever in Santiago, Chile. *Bulletin of world health organization* **63**, 899-904.
- 22- Thong KL, Goh YL, Radu S, (2002). Genetic diversity of clinical strains of Salmonella entrica serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *Clinical Microbiology* **40**(7): 2498-2503.
- 23- Shea KM, (2004). Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics*, **114**(3):862-868.

Archive of SID