مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۱۰۱، بهمن و اسفند ۱۳۹٤، صفحات ۲٤ تا ۳۵

بررسی وضعیت آلودگی کارکنان، ادوات و مواد غذایی با سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در یک واحد طبخ بیمارستانی

گوهرتاج رسولی[۱]، دکتر مسعود آل بویه[۲]، دکتر بهرام امینی[۳]، دکتر علی رسولی[۴]، دکتر محمد رضا زالی[۵]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا Masoud.alebouyeh@gmail.com

دریافت: ۹۳/۱۲/۱۴ پذیرش: ۹۴/۴/۴

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس به‌ویژه سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از پاتوژن‌های مهم مسوول عفونت‌های بیمارستانی است که می‌تواند باعث ایجاد مسمومیت‌ها و طغیان‌های غذایی شود. این مطالعه به منظور بررسی وضعیت آلودگی کارکنان، ادوات و مواد غذایی بخش طبخ به اجرام فوق به‌عنوان منابع انتشار این سویه‌ها در بیمارستان‌ها انجام گردید.*

روش بررسی: *تعداد ۲۲۰ نمونه از ادوات آشپزی، کارکنان و مواد غذایی تازه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در پلیت‌های بلاد آگار و مانیتول سالت آگار کشت داده شدند و جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نظر مورفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی بررسی و با روش PCR با پرایمرهای femA و nuc تعیین هویت شدند. جهت آنتی بیوگرام از روش استاندارد انتشار از دیسک مطابق الگوی CLSI, 2012 استفاده شد. سویه‌های MRSA، براساس مقاومت جدایه‌ها به سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) در محیط مولر هینتون شناسایی شدند.*

یافته‌ها: *۳۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های کارکنان (۵۰ درصد)، ۲٦ جدایه از ادوات طبخ (٤۸/۱ درصد) و ۲۲ جدایه از مواد غذایی جدا شد (۲۵ درصد). سویه‌های MRSA در ۲۲/۷ درصد جدایه‌های مواد غذایی و ۲۳/۱ درصد ادوات و ۵/۱ درصد کارکنان حضور داشتند. شباهت الگوهای مقاومتی در میان این جدایه‌ها نیز مشاهده شد.*

نتیجه گیری: *این مطالعه حضور سویه‌های MRSA در مواد غذایی، کارکنان و ادوات طبخ بیمارستانی و قرابت الگوهای مقاومت دارویی را در بین جدایه‌ها نشان می‌دهد و لزوم نظارت دقیق برای جلوگیری از انتقال این سویه‌های خطرناک به بیماران را گوشزد می‌کند.*

واژگان کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، غذای بیمارستانی، ادوات طبخ، کارکنان طبخ***

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان.
۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۴- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشیار دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران
۵- فوق تخصص گوارش وکبد، استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، یک کوکسی‌گرم مثبت است که متعلق به خانواده استافیلوکوکاسه بوده و به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب محسوب می‌شود. این باکتری نسبت به سایر باکتری‌های بدون اسپور، به‌دلیل امکان شکل دهی بیوفیلم در برابر شرایط نامساعد محیطی مقاوم‌تر است (۱). برخی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کد کننده‌ی فاکتورهای بیماری زایی متعددی همچون همولیزین، لکوسیدین پانتون والنتین، توکسین اکسفولیاتیو، توکسین ایجاد کننده‌ی سندروم شوک توکسیک و انتروتوکسین می‌باشند که می‌توانند سبب عوارض بالینی مختلف و مرگ گردند (۲). از مهم ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط این اجرام می‌توان به آبسه‌های چرکی، پنومونی، استئومیلیت، آرتریت چرکی، باکتریمی و اندوکاردیت با مرگ و میر بالا اشاره نمود. *استافیلوکوکوس اورئوس* دومین علت شایع عفونت‌های بیمارستانی و مسوول حدود ۸۰ درصد عفونت‌های چرکی و اغلب عفونت‌های پوستی است. علاوه بر این، این باکتری عامل مهمی در عفونت‌های پس از سوختگی است (۳).

عفونت‌های ناشی از این باکتری به‌واسطه‌ی ظهور مقاومت دارویی از مهم ترین معضلات به ویژه در بیمارستان‌ها محسوب می‌گردند. مقاومت چند دارویی در *استافیلوکوکوس اورئوس* عملا یک هشدار در درمان محسوب می‌شود (۱). توانایی مقاومت سریع به داروهای جدید، درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در سراسر جهان دچار مشکل ساخته است. بروز طغیان‌های متعدد بیمارستانی توسط سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) توسط کارکنان بیمارستانی و ادوات پزشکی آلوده، امروزه به‌عنوان یک معضل درمانی محسوب می‌گردد. این سویه‌ها اغلب دارای مقاومت‌های چند دارویی هستند و به اغلب داروهای بتالاکتام مقاوم می‌باشند. به‌طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از MRSA، از آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین یا لینزولید *استفاده* می‌شود (٤). سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بیشتر در بیمارستان‌ها دیده می‌شوند. به این نوع از سویه‌ها، HA-MRSA یا به اصطلاح *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان می‌گویند. در حال حاضر، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) نیز در حال گسترش می‌باشند. وجود مقاومت دارویی چندگانه Multi-Drug Resistance (MDR) در این جدایه‌ها می‌تواند از نظر درمانی حایز اهمیت باشد. کارکنان، ادوات پزشکی و مواد غذایی از مهم‌ترین عوامل گسترش سویه‌های MRSA در بیمارستان‌ها محسوب می‌گردند (۵). در حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از اشخاص سالم، ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاری قدامی بینی هستند (٦). مواد غذایی آلوده‌ی بیمارستانی می‌توانند طی ورود به بیمارستان سویه‌های بیماریزای *استافیلوکوکوس اورئوس* را به این فضاها وارد نمایند و بیماران می‌توانند حین مصرف این مواد با آن‌ها آلوده گردند. با در نظر گرفتن این که در بیمارستان‌ها انواع رژیم‌های غذایی و گاه تغذیه از طریق لوله (Tube Feeding) تهیه وتدارک داده می‌شود لذا بعضی از گروه‌ها آسیب‌پذیرتر از گروه‌های دیگر قلمداد می‌شوند (۷). غذای آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند منجر به گاستروآنتریت شود. آلودگی دست کارکنان بیمارستانی به این مواد می‌تواند سبب گسترش آن‌ها به ادوات پزشکی و محیط بیمارستان گردد که بروز عفونت‌های بیمارستانی را در پی خواهد داشت (۸). از آن جا که در اغلب بیمارستان‌های کشور از غذاهای بیمارستانی جهت تغذیه‌ی بیماران استفاده می‌شود، ریسک آلودگی آن‌ها با سویه‌های مقاوم باید مورد توجه قرار داده شود. با عنایت به نکات فوق، بررسی و کنترل کیفی مواد غذایی بیمارستانی از نظر حضور سویه‌های دارای مقاومت‌های

چند دارویی پرخطر و توکسیژنیک به‌منظور پیشگیری از مسمومیت غذایی باید به عنوان یک اولویت در مجموعه فعالیت‌های بیمارستانی تلقی شود. هدف از این مطالعه شناسایی نقش غذاهای بیمارستانی و کارکنان و ادوات طبخ مرتبط با تولید این غذاها در انتقال سویه‌های توکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به دارو به عنوان یکی از منابع احتمالی بروز عفونت‌های بیمارستانی در فضاهای بیمارستانی است.

روش بررسی

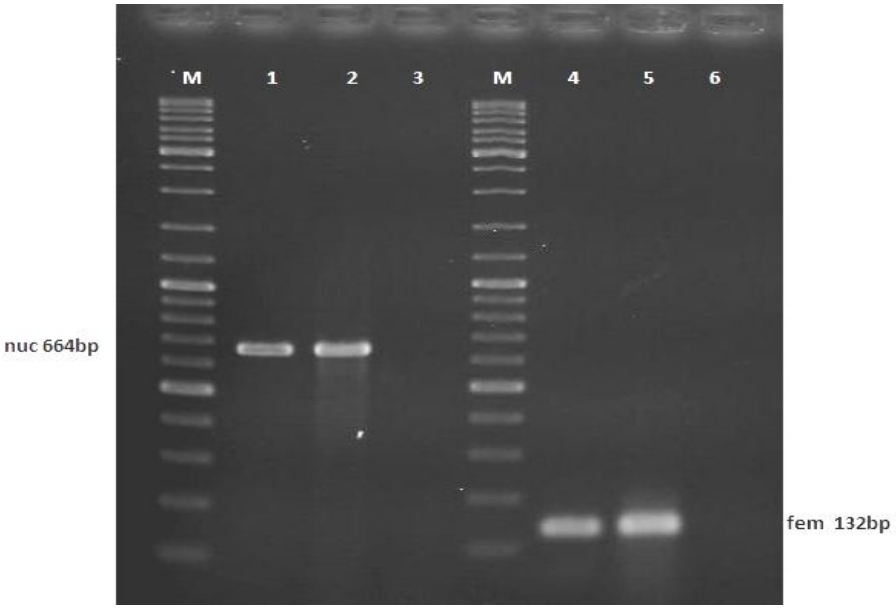
نمونه‌گیری و کشت: جهت ارزیابی آلودگی مواد غذایی بیمارستانی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و نقش کارکنان و ادوات طبخ در انتقال این آلودگی، حجم نمونه در هر گروه بر اساس فراوانی این باکتری در مطالعات پایلوت و با کمک فرمول عمومی $n = P \times (100 - P) \times z^2/d^2$ محاسبه شد. در مجموع ۲۲۰ نمونه طی زمستان ۱۳۹۲ و بهار و تابستان ۱۳۹۳ در سه دوره‌ی زمانی از کارکنان طبخ (۷۸ نمونه)، ادوات آشپزی (۵۴ نمونه) و مواد غذایی (۸۸ نمونه) نمونه‌گیری گردید. نمونه‌های ادوات آشپزی و کارکنان طبخ با روش سوآب مرطوب بر اساس الگوی استاندارد سوآب زنی انجام گرفت (۹). در رابطه با مواد غذایی، مقدار مشخصی از نمونه‌های مواد غذایی تازه تهیه شده در محلول فسفات بافر سالین توسط دستگاه استومیکر هموژن گردیدند و ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط هموژناسیون در پلیت‌های بلاد آگار و مانیتول سالت آگار تحت شرایط هوازی برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس کلنی‌های دارای ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده و برای تعیین هویت مرفولوژی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی تحت بررسی قرار داده شدند. تعیین هویت اولیه این جدایه‌ها بر اساس نتایج رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، همولیز، کوآگولاز، و DNase صورت گرفت (۱۰). در نهایت تمامی جدایه‌های دارای ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع‌آوری و در محیط تریپتیکیس سوی براث (TSB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول استریل در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای بررسی‌های تاییدی مولکولی نگهداری شدند (۱).

تعیین هویت مولکولی: تایید نهایی گونه‌ی جدایه‌های به‌دست آمده *استافیلوکوکوس* توسط روش مولکولی انجام شد. بدین‌منظور تخلیص DNA ژنومی برای هر جدایه براساس روش Boiling انجام گرفت (۱۱). سپس حضور یا عدم حضور ژن‌های اختصاصی گونه (*femA* و *nuc*) با استفاده از پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد. بدین‌منظور برای تهیه‌ی Master Mix واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از مقادیر ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۳ میکرولیتر از dNTP (۱۰ میلی‌متر)، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌متر)، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای آغازگر و پرایمر معکوس (۲۰ پیکومول)، و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA پلیمراز (۵ واحد بر میلی‌لیتر) استفاده گردید. مقدار ۳ میکرولیتر DNA الگو برای هر واکنش استفاده شد. برنامه‌های اجرایی در دستگاه (AG 22331; Eppendorf, Hamburg, Germany) با چرخه‌های PCR تحت شرایط زمان واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و واکنش تکثیر تحت شرایط واسرشت سازی و بسط در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه صورت گرفت. دمای الحاق پرایمرهای مورد استفاده برای ژنهای *femA* و *nuc* به ترتیب ۴۷ و۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد بود (جدول ۱). هر واکنش در ۳۰ سیکل تکرار و واکنش بسط نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه انجام گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی استفاده شده درتعیین هویت مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

Primer	Oligonucleotide sequence (5′–3′)	Size/bp	Reference
nuc	F:CTGGCATATGTATGGCAATTGTT R:TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT	۶۶۴	۲۵و۲۶
femA	F: AAAAAAGCACATAACAAGCG R: GATAAAGAAGAAACCAGCAG	۱۳۲	۲و۲۵

محصول‌های PCR توسط ژل آگارز ۱/۲ درصد با قـرار دادن ۸ میکرولیتر از هر کدام از محصول‌ها در دسـتگاه الکتروفـورز قرار داده شد و سپس ژل جهت تصویر برداری در داخل رنگ محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: تعیین هویت مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس توسط حضور و عدم حضور ژن‌های femA و nuc.

- ستون شماره ۱: حضور ژن *nuc* (664 bp) در سویه کنترل
- ستون شماره ۲: حضور ژن *nuc* (664 bp) در جدایه‌ی آشپزخانه بیمارستان
- ستون شماره ۴: حضور ژن *femA* (132 bp) در سویه کنترل
- ستون شماره ۵: حضور ژن *femA* (132 bp) در جدایه‌ی آشپزخانه بیمارستان
- ستون‌های شماره ۳ و ۶ کنترل منفی
- M. مارکر 10 kb شرکت ترموساینتیفیک (آمریکا).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، کشت‌های تازه از هر یک از جدایه‌ها بر روی بلاد آگار تهیه گردید. سوسپانسیون ۰/۵ نیم مک فارلند با حل کردن چند کلنی در ۳ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل تهیه شد. برای استاندارد کردن سوسپانسیون‌ها از اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر استفاده گردید و جذب معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱ قرائت شد (۱۲). جهت آنتی بیوگرام از محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Merck، آلمان) و روش استاندارد انتشار از دیسک مطابق الگوی CLSI, 2012 استفاده شد (۱۳). بدین منظور از دیسک‌های آمپی سیلین ۱۰ میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، کلرآمفنیکل ۳۰ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول ۱/۲۵±۲۳/۷ میکروگرم، اریترومایسین ۱۵ میکروگرم، تتراسیکلین ۳۰ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم، لینزولید ۳۰ میکروگرم، سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم و سفپیم ۳۰ میکروگرم (شرکت ROSCO، دانمارک) استفاده گردید. همچنین برای شناسایی سویه‌های MRSA، مقاومت سویه‌ها به سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم بر روی محیط مولر هینتون آگار غنی شده با (1%) NaCl (w/v) طی انکوباسیون در ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲٤ ساعت تعیین گردید (١٤). سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت به حداقل سه خانواده مختلف آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان سویه‌های دارای مقاومت چندگانه (MDR) شناسایی گردیدند (۴). از سویه‌ی استاندارد *S. aureus* ATCC 25923 به عنوان سویه‌ی کنترل در تمامی آزمون‌ها استفاده گردید.

تعیین قرابت فنوتیپیک بین سویه‌ای: به‌منظور بررسی اولیه‌ی قرابت سویه‌های به‌دست آمده، شباهت تمامی جدایه‌ها بر اساس مقایسه‌ی الگوهای مقاومت دارویی توسط نرم‌افزار NTSYSpc بررسی گردید. بدین‌منظور الگوهای مقاومتی حساس و مقاوم به ماتریکس عددی ۰ و ۱ تبدیل و دندروگرام قرابت فنتیک بر اساس الگوریتم UPGMA (گروه جفت‌های مرتب نشده با میانگین حسابی) ترسیم شد.

آنالیر آماری: ارتباط الگوهای مقاومتی میان جدایه‌های کارکنان، ادوات طبخ و مواد غذایی توسط آزمون فیشر و با کمک نرم افزار SPSS بررسی گردید.

یافته ها

از میان ۲۲۰ نمونه از سه گروه کارکنان، ادوات آشپزی و مواد غذایی بخش طبخ بیمارستان، ۸۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمد (۳۹ سویه از کارکنان (۵۰ درصد)، ۲۶ سویه از ادوات طبخ (۴۸/۱ درصد) و ۲۲ سویه از مواد غذایی (۲۵ درصد). نتایج PCR هویت مولکولی تمامی جدایه‌های فوق را تایید نمود (شکل ۱). الگوی مقاومت جدایه‌ها به ۱۳ نوع آنتی‌بیوتیک ذکر شده به تفکیک نمونه‌های مطالعه شده به‌طور کامل در جدول ۲ آمده است. فراوانی الگوی مقاومتی MRSA در این نمونه‌ها به‌ترتیب، ۵/۱ درصد (۲/۳۹)، ۲۳/۱ درصد (۶/۲۶) و ۲۲/۷ درصد (۵/۲۲) بود، الگوی مقاومتی MDR-MRSA در ۱ مورد از جدایه‌های مواد غذایی (۴/۵۴ درصد)، ۳ مورد از جدایه‌های ادوات طبخ غذا (۱۱/۵۴ درصد) و ۲ مورد از جدایه‌های کارکنان (۵/۱۳ درصد) دیده شد. بالاترین میزان مقاومت به‌ترتیب مربوط به آمپی‌سیلین، ۳۵ مورد (۴۰/۲۳ درصد)، تتراسایکلین، ۳۴ مورد (۳۹/۱۰ درصد)، سفتازیدیم ۳۰ مورد (۳۴/۵۰ درصد)، سفوکسیتین ۱۳ مورد (۱۴/۹۴ درصد)، اریترومایسین ۸ مورد (۹/۱۹ درصد)، و تری‌متوپریم + سولفامتاکسازول ۳ مورد (۳/۴۵ درصد) بود. تمامی سویه‌های مورد مطالعه نسبت به ایمی‌پنم، لینزولید و جنتامایسین حساسیت نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی مطلق و نسبی (درصد) مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از نمونه های مختلف مواد غذایی (۸۸ نمونه)، ادوات (۵۴ نمونه) و کارکنان (۷۸ نمونه) جمع‌آوری شده از واحد طبخ بیمارستان [a].

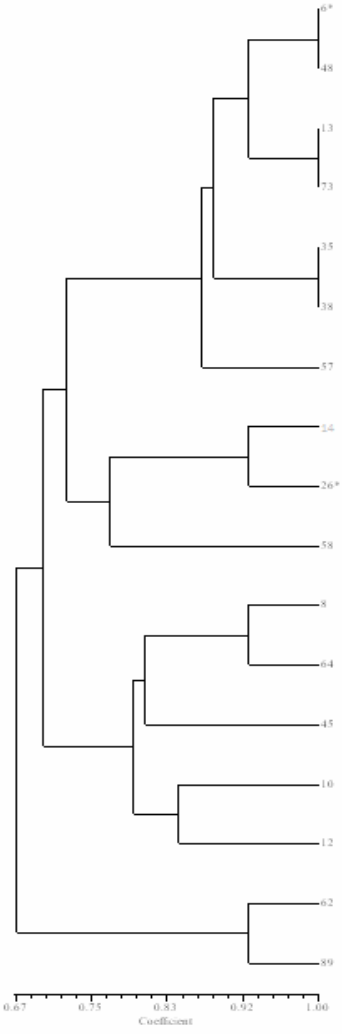
منبع نمونه	فراوانی جدایه ها n (%)	CFO n (%)	GEN n (%)	Amp n (%)	Ery n (%)	CTX n (%)	LINEZ n (%)	CIPR n (%)	IMI n (%)	CAZ n (%)	FEP n (%)	SXT n (%)	CLR n (%)	TET n (%)
مواد غذایی (در کل)	22 (25)	5 (22)	0	8 (36)	2 (9.1)	1 (4.5)	0	0	0	8 (36)	0	0	0	6 (27)
غذای گاواژ	10 (45)	2 (20)	0	3 (30)	1 (10)	0	0	0	0	2 (20)	0	0	0	2 (20)
کتلت	1 (4.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
کدو	1 (4.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	1 (100)
گوجه	3 (14)	1 (33)	0	1 (33)	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0	0	0
خیار	2 (9.1)	1 (50)	0	2(100)	0	1 (50)	0	0	0	1 (50)	0	0	0	1 (50)
ماهی	1 (4.5)	0	0	1(100)	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0
خمیر کباب	2 (9.1)	0	0	0	1 (50)	0	0	0	0	2 (100)	0	0	0	2 (100)
پیاز	1 (4.5)	1(100)	0	1(100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ادوات طبخ (در کل)	26 (48)	6 (23)	1(3.8)	3 (11)	4 (15)	1 (3.8)	0	1(3.8)	0	14 (54)	0	0	0	11 (42)
میز کار	6 (23)	0	0	0	1 (17)	0	0	0	0	1(17)	0	0	0	2 (33)
چرخ گوشت	3 (12)	1 (33)	0	1(33)	1 (33)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (33)
میز تقسیم غذا	3 (12)	2 (67)	0	0	1 (33)	0	0	0	0	3 (100)	0	0	0	1 (33)
مخلوط کن	1 (3.8)	1(100)	0	0	0	1(100)	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0
ظرف شویی	5 (19)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	0	0	1 (20)	0	3 (60)	0	0	0	3 (60)
پیاز خرد کن	1 (3.8)	0	0	1 (100	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	0	0
سیخ کباب 1,2,3,4[b]	4 (15)	1 (25)	0	0	0	0	0	0	0	2 (50)	0	0	0	3 (75)
چاقو1,2,3[b]	3 (12)	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (100)	0	0	0	1 (33)
کارکنان بخش طبخ	39 (50)	2 (5.1)	0	22(56)	1 (2.6)	0	0	0	0	7 (18)	1 (2.6)	7 (18)	1 (2.6)	17 (44)
دست	27 (69)	2 (7.4)	0	12(44)	0	0	0	0	0	6 (22)	1 (3.7)	6 (22)	1 (3.7)	12 (44)
بینی	7 (25)	0	0	6 (21)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (7.1)
موبایل	4 (33)	0	0	4(100)	1(25)	0	0	0	0	1 (25)	0	1 (25)	0	3 (75)

[a] *CFO: سفوکسیتین، Gen: جنتامیسین، AMP: آمپی‌سیلین، ERY: اریترومایسین، CXT: سفوتاکسیم، LINEZ: لینزولید، CIPR: سیپروفلوکساسین، IMI: ایمی پنم، CAZ: سفتازیدیم، FEP: سفپیم، SXT: سولفامتوکسازول - تریمتوپریم، CLR: کلرامفنیکل، TET: تتراسایکلین.*

[b] *اعداد مختلف نشانگر نمونه‌های جداگانه در نمونه‌گیری از ادوات طبخ می‌باشد.*

از میان ۸۷ جدایه به‌دست آمده، مقاومت به یک یا دو دارو در ۶۰/۹ درصد سویه‌ها، مقاومت به سه دارو در ۱۰/۳۵ درصد سویه‌ها، و مقاومت به چهار و پنج دارو به‌ترتیب در ۳/۴ درصد و ۱/۱ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. در حالی که الگوهای مقاومتی چندگانه در کارکنان بسیار شایع‌تر از مواد غذایی و ادوات طبخ بود، ولی این نتایج حضور مقاومت به پنج خانواده آنتی‌بیوتیکی را تنها در یک ماده غذایی با الگوی AMP, CTX, CAZ, TET, CFO تایید نمود. حضور سویه‌های MDR در مواد غذایی و ادوات طبخ اختلاف چندانی نشان نداد. همانگونه که در شکل ۲ نمایش داده شده است مقایسه الگوهای مقاومت دارویی در میان این جدایه‌ها بیانگر وجود سویه‌های همسان در نمونه‌های کارکنان، مواد غذایی و ادوات طبخ بود. این سویه‌ها به مجموع آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده الگوهای مقاومتی یکسانی نشان دادند و بر همین اساس در یک دسته‌ی فنوتیپیک مقاومتی طبقه بندی گردیدند.

شکل ۲: نتایج اولیه بررسی قرابت فنوتیپیک الگوهای مقاومت دارویی در سویه‌های به‌دست آمده توسط نرم افزار NTSYS.



Resistance phenotype

Amp, CAZ, Tet, CFO, MRSA, MDR

Amp, CAZ, Tet, CFO, MRSA, MDR

Amp, CAZ, Tet, CTX (I), MDR

Amp, CAZ, Tet, CTX (I), MDR

Amp, CAZ, Tet, MDR

Amp, CAZ, Tet, MDR

Amp, CAZ, Tet, CTX, CFO, MRSA, MDR

Amp, SXT, CFO, MRSA, MDR

Amp, SXT, CAZ, CFO, MRSA, MDR

Amp, CFO, CAZ (I), TET (I), MRSA

CAZ, CFO, CTX (I), MRSA

CAZ, CFO, ERY, CTX (I), MRSA, MDR

CAZ, CFO, CTX, FEP (I), MRSA, MDR

CAZ, CFO, CIP (I), MRSA

CFO, MRSA

CAZ, ERY, TET, CIP, MDR

CAZ, ERY, TET, MDR

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر در مجموع حضور آلودگی مواد غذایی بیمارستانی به سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه، جدایه‌های استافیلوکوکوس *اورئوس* از ۵۰ درصد نمونه‌های اخذ شده از کارکنان آشپزخانه بیمارستان جدا گردید که حد واسط درصد آلودگی گزارش شده توسط سایر محققین در موارد مشابه می‌باشد. آیسیسک و همکاران در سال ۲۰۰٤ میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در دست کارکنان آشپزخانه بیمارستان را ۷۰ درصد گزارش کردند (۱۵). در مطالعه‌ی سوارس و همکاران در سال ۱۹۹۷ در برزیل، آلودگی بینی و دست کارکنان آشپزخانه‌های بیمارستانی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ٤۹/۵ درصد گزارش گردید. در این مطالعه درصد آلودگی به این باکتری در بینی کارکنان به مراتب بالاتر از دستان آن‌ها بود (۱٦). در مطالعه‌ی غلام مصطفایی و همکاران در سال ۲۰۱۳، در نمونه‌های کارکنان یک بیمارستان در تهران میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰/۸۷ گزارش شد (۱۷). همچنین در مطالعه‌ی آکوا و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان آلودگی بینی کارکنان بخش طبخ بیمارستان به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۰ درصد گزارش گردید (۱۸). با عنایت به اینکه ۱۰تا۵۰ درصد جمعیت‌های انسانی، ناقلین سالم *استافیلوکوکوس اورئوس* به شمار می‌روند (۱٦)، میزان بالای آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در کارکنان آشپزخانه‌ی بیمارستان تحت مطالعه، به دلیل اینکه ممکن است . این سویه‌های پاتوژن در طی مراحل آماده سازی و تهیه غذا، فرآوری، توزیع و جابجایی آن ها وارد غذای بیماران شوند، لزوم توجه جدی به بهداشت این افراد را مطرح می‌نماید. این افراد نقش مهمی را در سلامت غذا در بیمارستان ایفا می‌نمایند و می‌توانند در انتقال سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد مسمومیت غذایی و عفونت‌های بیمارستانی دخیل باشند (۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر، ادوات طبخ میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را در نمونه‌های اخذ شده ٤۸/۱ درصد نشان دادند که نشانگر شرایط بهداشتی ضعیف و نظارت ناکافی در تمیز کردن وسایل و تجهیزات آشپزی و یا عدم تعویض وسایل فرسوده است. این اداوات می‌توانند مخزن اجرام میکروبی و انتقال آن‌ها به مواد غذایی شوند. دراین راستا نتایج یک مطالعه توسط دارود و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پورتوریکو نشانگر وجود همبستگی بین آلودگی بینی و آلودگی مواد غذایی و تخته ی برش گوشت و دست کارکنان آشپزخانه به *استافیلوکوکوس اورئوس* بود (۱۹). در مطالعه دیگری از سوی اردوغرول و اربیلیر که در سال ۲۰۰۳ در ترکیه بر روی آلودگی اسفنج‌های ظرف شویی و پارچه‌های خشک کردن ظروف صورت گرفت، نشان داد که ۲۰ درصد اسفنج‌ها و ۱۹ درصد پارچه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۲۰). در ایران نیز در یک مطالعه توسط غلام مصطفایی و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان آلودگی ادوات طبخ به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱٦/۹ درصد نشان داده شده بود (۱۷). نتایج بالای میزان آلودگی مواد غذایی بیمارستانی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در این مطالعه، توسط جلالی و همکاران در سال ۲۰۰۹ که بر روی نمونه‌های غذای بیماران واحدهای مراقبت ویژه بیمارستان‌های دانشگاهی (تغذیه با گاواژ Tub-Feeding) انجام شده بود (٤۵ - ۹۰ درصد) نیز تایید شده است (۲۱). در مطالعه‌ی غلام مصطفایی و همکاران میزان آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ٤/۵٤ درصد گزارش گردید (۱۷). در یک مطالعه‌ی دیگر در اسپانیا که توسط پرز و همکاران در سال ۲۰۱۱ در خصوص شرایط بهداشتی و وضعیت میکروبی فرآورده‌های غذایی سرد آماده مصرف روی ۱۵۰ نمونه انجام شده بود، میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت در ۵٤ درصد نمونه‌ها گزارش گردید (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر حدود یک چهارم جدایه‌های حاصل از مواد غذایی(۲۲/۷ درصد) و ادوات طبخ (۲۳/۱ درصد) و ۵/۱ درصد جدایه‌های کارکنان را سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) تشکیل می‌دادند. این میزان آلودگی یک زنگ خطر و هشدار مهم به شمار می‌رود به ویژه اینکه معمولا این سویه‌ها علاوه بر مقاومت به متیسیلین، مقاومت دارویی چندگانه (MDR-MRSA) را نیز نشان می‌دهند و از مهم ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. در مطالعه‌ی پیشین، حضور سویه‌های MRSA دارای مقاومت چند گانه در نمونه‌های آشپزخانه‌ی بیمارستانی، در مواد غذایی ۱۶/۶ درصد، در ادوات طبخ ۵۰ درصد و در کارکنان ۱۸/۵ درصد بود (۱۷). این یافته‌ها توسط سایر مطالعات در رابطه با نقش کارکنان و گوشت مرغ و احشام در انتقال سویه‌های MRSA به بیمارستان از طریق مواد غذایی آلوده حمایت می‌شوند. قرابت الگوهای مقاومت دارویی تعیین شده در میان جدایه‌های دست و بینی کارکنان، ادوات طبخ و مواد غذایی به‌ویژه در رابطه با سویه‌های MRSA پیشنهاد کننده‌ی رخداد آلودگی متقاطع در میان آن‌هاست. پیش از این کلویتمانس و همکاران (سال ۱۹۹۵) بروز یک طغیان سپتی سمی بیمارستانی را که به واسطه‌ی غذای آلوده شده با MRSA ایجاد شده بود، در میان ۲۷ بیمار اثبات نمودند (۲۳). این محققان انتقال متقاطع آلودگی را بین یک کارمند بخش تهیه‌ی غذا و غذای بیماران به اثبات رساندند. تمامی این سویه‌ها الگوهای مقاومت دارویی و تیپ مولکولی مشابهی را نشان می‌دادند. حضور سویه‌های MRSA در کارکنان طبخ بیمارستان در یک مطالعه در برزیل نیز نشان داده شده بود (۱۶). این محققان نشان دادند که کلون یکسانی از این سویه‌ها در نزد کارکنان آشپزخانه حضور دارد. در یک مطالعه‌ی دیگر حضور سویه‌های MRSA در ۲۳ درصد مواد غذایی گوشتی خام بیمارستانی و ۹/۵ درصد مواد غذایی طبخ شده گزارش گردید که به طور مشابهی ضرورت رعایت بهداشت در آشپزخانه‌ی بیمارستان مذکور را پیشنهاد می‌نمود (۲۴).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر حضور سویه‌های MRSA را در مواد غذایی، کارکنان و ادوات طبخ و همچنین ریسک انتقال سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* MDR-MRSA را از طریق مواد غذایی به فضاهای بیمارستانی و بیماران نشان می‌دهد. بررسی نتایج قرابت الگوهای مقاومت دارویی موید احتمال رخداد انتقال متقاطع این آلودگی از طریق کارکنان و ادوات طبخ به مواد غذایی بود که اهمیت انجام بررسی‌های بهداشتی و اقدامات کنترلی را در بیمارستان تحت مطالعه مورد تاکید قرار می‌دهد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات همکاران مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذای پژوهشکده‌ی گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در انجام این طرح کمک شایانی نمودند و همچنین از همکاران دانشگاه علوم پزشکی زنجان تشکر می‌گردد. نویسندگان این مقاله همچنین از آقای دکتر عباس ایمانی فولادی که در فراهم سازی سویه‌ی کنترل همکاری داشتند کمال تشکر را می‌نمایند. لازم به ذکر است این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی دانشجویی مصوب دانشگاه علوم پزشکی زنجان و طرح مصوب مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش ناشی از آب و غذا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

1- Vitko NP, Richardson AR. Laboratory maintenance of methicillin- resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Protoc Microb*. 2013; 28: 9C. 2. 1-14.

2- Mehrotra M, Wang G, Johnson, WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microb*. 2000; 38: 1032-35.

3- Makgotlho PE. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. msc discertation, dept. medical microbiology, faculty of health sci, University of Pretoria, South Africa, 2009.

4- Hosainzadegan H, Menati S. The prevalence of methicillin and vancomycin resistant *staphylococcus aureus* nasal carriage in large teaching hospital personnel. *African J Microb Res.* 2011; 5: 3716-19.

5- Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus spp* isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Brazilian J Microb.* 2010; 41: 59-65.

6- Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Review food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins.* 2010; 2: 1751-73.

7- Sullivan MM, Sorreda-Esguerray P, Santosz EE, et al. Bacterial contamination of blenderized whole food and commercial enteral tube feedings in the Philippines. *J Hospital Infect.* 2001; 49: 268-73.

8- Cunha MLRS, Calsolari RAO. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and coagulase- negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microb Insights*. 2008; 1: 13-24.

9- Al-Zahrani SHM. Detection of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* among male carriers in Jeddah Sites. *Nature and Science.* 2012; 10: 1-7.

10- Madahi H, Rostami F, Rahimi E, Safarpoor-Dehkordi F. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from chicken nugget in iran. *Jundishapur J Microb.* 2014; 7: e10237.

11- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clinl Microb*. 2001; 39: 2151-56.

12- Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Jenny Schelin P, Schelin J, Rådström P. Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. *Appl Environ Microb.* 2012; 78: 4942-48.

13- Anonymus. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second information supplement. CLSI 2012; M100-S22; 32.

14- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microb Infect.* 2012; 18:

268-81.

15- Aycicek H, Aydoğan H, Küçükkaraaslan A, Baysallar M, BaşustaoğluAC. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control*. 2004; 15: 253-59.

16- Soares MJS, Tokumaru-Miyazaki NH, Noleto ALS, Figueiredo AMS. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and determination of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. *J Med Microb*, 1997; 46: 214-21.

17- Gholammostafaei FS, Alebouyeh M, Jabari F, Asadzadehaghdaei H, Zali MR. Prevalence of antibiotic resistant bacteria isolated from foodstuff in kitchen of a hospital in tehran. *Sci J Ilam Univ Med Sci*. 2013; 22: 1-9.

18- Accoa M, Ferreirab FS, Henriquesa JAP, Tondob EC. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food microb*. 2003; 20: 489-93.

19- Dharod JM, Paciello S, Bermudez-Millan A, Venkitanarayanan K, Damio G, Perez-Escamilla R. Bacterial contamination of hands increases risk of cross-contamination among low-income Puerto Rican meal preparers. *J Nutr Educ Behav*. 2009; 41: 389-97.

20- Erdogrul O, Erbilir F. Microorganisms in kitchen sponges. *Intl J Food Safety*. 2005; 6: 17-22.

21- Jalali M, Sabzghabaee AM, Badri SS, Soltani HA, Maracy MR. Bacterial contamination of hospital-prepared enteral tube feeding formulas in Isfahan, Iran. *JRMS*. 2009; 14: 149-56.

22- Rodriguez M, Valero A, Carrasco E, Perez-Rodriguez F, Posada GD, Zurera G. Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in southern Spanish hospitals. *Food Control*. 2011; 22: 874-82.

23- Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, et al. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J Clin Microb*. 1995; 33: 1121-28.

24- Costa WL, Ferreira Jdos S, Carvalho JS, Cerqueira ES, Oliveira LC, Almeida RC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meats and prepared foods in public hospitals in salvador, Bahia, Brazil. *J Food Sci*. 2015; 80: M147-50.

25- Chikkala R, George NO, Ratnakar KS, Iyer RN, Sritharan V. Heterogeneity in *femA* in the indianisolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. *Adv Infect Dis*. 2012; 2: 82-88

26- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microb*. 1992; 30: 1654-60.

Contamination Status of Food Handlers, Utensils and Foodstuffs with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in a Hospital Kitchen

Rassouli G[1], Alebouyeh M[2], Amini B[1], Rassouli A[3], Zali MR[4]

[1]Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[2]Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Dept of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

[4]Gasteroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Alebouyeh M, Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: Masoud.alebouyeh@gmail.com

Received: 9 Apr 2015 **Accepted:** 12 Jul 2015

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), particularly methicillin- resistant strain (MRSA), is one of the most important pathogens in nosocomial infections that is capable of producing food poisoning and food-borne outbreaks. This study aimed to focus on the contamination status of food handlers, utensils and foodstuffs with this agent in a hospital kitchen as sources of distribution of these strains into hospitals.

Materials and Methods: A total of 220 samples were collected from freshly prepared foods, kitchen utensils and food handlers. The samples were cultured in Blood agar and Mannitol salt agar media and the isolates were evaluated both morphologically and biochemically using specialized tests and consequently were identified via polymerase chain reaction (PCR) using *femA* and *nuc* primers. For antibiogram, the standard disk diffusion test was used in accordance with CLSI, 2012 guidelines. To detect MRSA strains, resistance of the *S. aureus* isolates to cefoxitin (30 µg) in Mueller-Hinton agar was evaluated.

Results: Thirty- nine S. aureus isolates from food handlers (50%), 26 from kitchen utensils (48.1%), and 22 from food samples (25%) were detected. MRSA strains were found in 22.7% of the S. aureus isolates of foodstuffs, 23.1% in utensils and 5.1% in food handler samples. Homology of the resistance patterns among these isolates was also observed.

Conclusion: This study showed the presence of MRSA strains and homology of resistance patterns among the isolates of the foodstuffs, kitchen utensils and food handlers; all of which call for a careful monitoring to prevent their distribution among hospitalized patients.

Keywords: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Hospital food, Utensils, Food handlers