مطالعه شیوع، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی فاکتورهای حدت در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت خام و منجمد

منیژه رضالو[1]، عباسعلی مطلبی[1]، زهره مشاک[2]*، سید امیرعلی انوار[1]

۱. گروه بهداشت موادغذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه بهداشت موادغذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

***نویسنده مسئول:** *mashak@kiau.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶

چکیده

سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان عوامل اصلی فساد در مواد غذایی و بعضا بروز بیماری‌های غذازاد، هستند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی فاکتورهای حدت در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت انجام پذیرفت. در کل ۱۲۰ نمونه گوشت خام و منجمد جمع آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از کشت میکروبی از نظر حضور *سودوموناس آئروژینوزا* ارزیابی شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسکی ارزیابی شد. DNA ژنومی از جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* استخراج و فراوانی فاکتورهای حدت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد. یازده نمونه از کل ۱۲۰ نمونه گوشت (۹/۱۶ درصد) آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های گوشت خام و منجمد به ترتیب ۵/۰۰ و ۱۳/۳۳ درصد بود. اختلاف آماری معنی دار برای شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* بین نمونه-های گوشت خام و منجمد مشاهده شد ($P < 0/05$). جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آمپی سیلین (۱۰۰ درصد)، پنی سیلین (۹۰/۹۰ درصد) و تتراسایکلین (۸۱/۸۱ درصد) داشتند. شیوع مقاومت برعلیه آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (۹/۰۹ درصد) و تری متوپریم (۱۸/۱۸ درصد) کمتر از سایر موارد بود. ژن های *exoU* (۵۴/۵۴ درصد) و *exoT* (۱۸/۱۸ درصد) فراوانترین فاکتورهای حدت ردیابی شده بودند. حضور همزمان فاکتورهای حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، لزوم انجام مطالعات تکمیلی برای تایید نقش این باکتری به عنوان یک پاتوژن غذازاد را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فاکتورهای حدت، گوشت خام، گوشت منجمد.

مقدمه

گوشت یکی از منابع مهم پروتئین در جهان است. گوشت قرمز علاوه بر پروتئین(اسید آمینه های ضروری)، منبع غنی آهن، کلسیم و املاح معدنی است. همچنین وجود طیف گسترده‌ای از انواع چربی‌ها در گوشت موجب گردیده تا این ماده غذایی بتواند به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تغذیه‌ای مورد استفاده قرار گیرد (Ahmad et al., 2018). با این وجود، امکان حضور پاتوژن های غذازاد در گوشت خام موجب شده است تا مصرف این ماده غذایی بعضاً به عنوان یک عامل برای بروز بیماری های غذازاد در نظر گرفته شود (Momtaz et al., 2013; Bantawa et al., 2018).

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب شایع بیمارستانی است که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های انسانی شامل عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفس، پوست، بافت نرم، زخم و سوختگی، استخوان و مفاصل، دستگاه گوارش، باکتریمی و انواع عفونت‌های سیستمیک خصوصاً در بیماران با نقص سیستم ایمنی، می‌باشد (Al-Orphaly et al., 2021; Spagnolo et al., 2021). این باکتری جز فلور میکروبی گوشت های تازه، سرد و منجمد محسوب می‌شود. همچنین باکتری جزء فلور انواع زخم‌های عفونی و سوختگی‌های سطحی بدن انسان می‌باشد و به راحتی در اثر دستکاری‌هایی که روی گوشت در کشتارگاه‌ها و قصابی‌ها، اعمال می‌شود، می‌تواند به گوشت منتقل گردد (Gu et al., 2016; Stellato et al., 2017). فعالیت سودوموناس‌ها در انواع مختلف گوشت می‌تواند موجب فساد این دسته از مواد غذایی شود. مصرف گوشت آلوده به سودوموناس‌ها و خصوصاً *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند منجر به ایجاد مسمومیت غذایی شود (Gu et al., 2016; Stellato et al., 2017). *سودوموناس آئروژینوزا* عامل ۷۰-۲۰ درصد از مرگ و میرها در بیمارستان‌ها بر اثر عفونت‌های بیمارستانی است (Montero et al., 2020). بروز اکثر عفونت‌های حاصله از این باکتری در اثر فعالیت یکسری از فاکتورهای حدت می‌باشد. فاکتورهای بیماری‌زا بر اساس نحوه تأثیر روی سلول‌های میزبان تقسیم‌بندی می‌شوند. بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* از طریق چسبندگی یا مواد سمی ترشحی اعمال می‌شود. اپرون‌های فنازین *Phenazin operon* (*phzI* و *phzII*) و ژن‌های *phzH*، *phzM* و *phzS*، پروتئین‌های پیش ساز سه ترکیب فنازین که به صورت فعال توسط *سودوموناس آئروژینوزا* ترشح می‌شود را کد می‌کنند. این سه ترکیب پیوسیانین، ۱- هیدروکسی فنازین و فنازین ۱- کربوکسامید هستند که مسئول افزایش اثرات اکسیداتیو داخل سلولی هستند (Higgins et Al., 2018; Sultan et al., 2021;). از جمله سایر عوامل حدت بیماریزا در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌توان به اگزوآنزیم های T، U و Y (*exoT*، *exoU* و *exoY*) اشاره نمود (Azimi et al., 2016). نقش این فاکتورها اغلب چسبندگی و اتصال، بروز واکنش‌های التهابی و در نهایت تهاجم به سلول میزبان است (van't Wout et al., 2015; Newman et al., 2017).

علاوه بر درمان‌های حمایتی، در اکثر موارد عفونت‌های سودوموناسی با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان می‌شوند (Bassetti et al., 2018). با این وجود در دهه گذشته به علت کسب مقاومت‌های چند دارویی محدودیت‌هایی برای انتخاب آنتی‌بیوتیک در چندین کشور اعمال شده است. در برخی موارد عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو غیر قابل درمان است (Pang et al., 2019). مطالعه‌ای در ایران نشان داد که ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به سفتازیدیم (۸۰ درصد)، کلاولانیک اسید (۷۰ درصد)، تری‌متوپریم (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۱۰۰ درصد)، سفی‌پنم (۵۲ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۰ درصد) آمپی سیلین (۱۰۰ درصد)، کاربنی سیلین (۹۰ درصد)، ایمی پنم (۶۰ درصد)، جنتامایسین (۵۰ درصد) مقاوم هستند (Shahini et al., 2012). شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* از کشورهای دیگر نیز گزارش شده است (Langendonk et al., 2021). طبق اطلاعات ما، مطالعه جامعی در مورد خصوصیات مولکولی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت و فراورده های گوشتی در دسترس نیست. لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی توزیع فاکتورهای حدت و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از نمونه‌های گوشت انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

نمونه گیری

مطالعه حاضر کاربردی[1] و از نوع توصیفی[2] و مقطعی[3] می‌باشد .در این مطالعه جامعه آماری نمونه‌های گوشت تازه و منجمد عرضه شده در پاییز سال ۱۳۹۹ در استان البرز بودند که به صورت تصادفی جمع آوری شدند. در کل ۱۲۰ نمونه شامل گوشت خام (۶۰ نمونه) و گوشت منجمد (۶۰ نمونه) از قصابی ها و مراکز فروش واقع در استان البرز به میزان ۱۰۰ گرم از عضله ران، جمع آوری شد. نمونه‌ها سریعا در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی سودوموناس آئروژینوزا

به منظور جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های گوشت تازه و منجمد، ۲۵ گرم از نمونه‌ها با ۲۲۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع پپتون واتر هموژن شد. در این مرحله باکتری غنی شده در محیط پپتون واتر به صورت متراکم در محیط کشت انتخابی Pseudomonas cetrimide agar (PCA، مرک، آلمان) کشت و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌های مشکوک به سودوموناس (کلنی‌های واجد رنگدانه سبز-آبی با بوی مخصوص انگور فاسد شده) انتخاب و به منظور تایید گونه آئروژینوزا تست‌های بیوشیمیایی نظیر تخمیر قند لاکتوز، مصرف سیترات، اندول، اکسیداز، DNase و همولیز در محیط آگار خون‌دار روی آن‌ها انجام پذیرفت. کلنی‌هایی که واجد باکتری‌های لاکتوز منفی، سیترات مثبت، اندول منفی، اکسیداز مثبت، DNase منفی و همولیتیک بودند به عنوان کلنی *سودوموناس آئروژینوزا* انتخاب و جهت مطالعات بعدی در محیط مایع Brain Heart Infusion (BHI) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (Ullah et al., 2012).

ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، از روش انتشار دیسکی ساده (Kirby Baeur) طبق دستورالعمل CLSI (۲۰۱۲) استفاده شد (CLSI, 2012). ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده به مدت یک شب در محیط مایع BHI کشت داده شدند و پس از تهیه رقتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند از آن‌ها به صورت متراکم در محیط جامد مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم/دیسک)، سولفامتوکسازول (۲۵ میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم/دیسک)، تری متوپریم (۵ میکروگرم/دیسک)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم/دیسک)، کلینداماسین (۲ میکروگرم/دیسک)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم/دیسک) و آزترونام (۳۰ میکروگرم/دیسک) (پادتن طب، ایران) کشت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس با اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد در اطراف هر دیسک مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک مربوطه تعیین و ثبت شد. در این آزمایش از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 10145) به عنوان کنترل مثبت در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مورد مطالعه استفاده شد.

استخراج DNA و ارزیابی فراوانی فاکتور های حدت

به منظور استخراج DNA از کشت یک شبه باکتری در محیط Brain Heart Infusion (مرک، آلمان) استفاده شد. جهت استخراج DNA از باکتری‌های جدا شده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA,

[1] Study
[2] Description
[3] Cross Sectional

USA) ارزیابی شد (Dehkordi et al., 2020). سپس نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، قرار داده شد. جدول ۱ لیست پرایمر های مورد استفاده و شرایط واکنش PCR جهت ردیابی فاکتورهای حدت در ایزوله-های *سودوموناس آئروژینوزا* را نشان می‌دهد. تمام واکنش-های PCR، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد. از سویه‌های استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و به عنوان کنترل مثبت و از PCR-Grade water (Thermofisher Scientific, Germany) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول نهایی واکنش PCR با یک میکرولیتر Loading buffer (Thermofisher Scientific, Germany) مخلوط و به داخل ژل آگارز ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید (Thermofisher Scientific, Germany) تزریق و فرایند الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت. نوارهای DNA تکثیر شده هر ژن در نهایت با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی گردید.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش PCR جهت ردیابی فاکتورهای حدت در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* (Finnan et al., 2004).

بمر (5′-3′)		صول	نش (۵۰ میکرولیتر)	مایی
F: CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG R: CCGAACCGCTTCACCAGGC	*phzM*	۸۷۵	10X PCR buffer: 5 µL $Mgcl_2$: 1.5 mM dNTP: 200 µM Primer F: 0.5 µM Primer R: 0.5 µM Taq DNA polymerase: 1.25 U DNA: 2.5 µL	1 cycle: 5 min: 96 ^{0C} 30 cycles: 30 s: 94 ^{0C} 30 s: 47-63 ^{0C} 1 min: 72 ^{0C} 1 cycle: 3 min: 72 ^{0C}
F: CAATCATCTCAGCAGAACCC R: TGTCGTAGAGGATCTCCTG	*phzS*	۱۷۵۲		
F: GATTCCATCACAGGCTCG R: CTAGCAATGGCACTAATCG	*phzH*	۱۷۵۲		
F: CATCGTCTACGCCATGAG R: AGCAGCACCTCGGAATAG	*exoT*	۱۱۵۹		
F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC R: TGGCGTCGACGAACACCTCG	*exoY*	۱۰۳۵		
F: CTGCGCGGGTCTATGTGCC R: GATGCTGGACGGGTCGAG	*exoU*	۳۳۰۸		

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط نرم افزار SPSS آنالیز می‌شوند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود. در نهایت $P < 0/05$ به عنوان حد معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۲ شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های گوشت جمع آوری شده از استان البرز را نشان می دهد. بر طبق نتایج، ۱۱ نمونه از ۱۲۰ نمونه (۹/۱۶ درصد) از نظر *سودوموناس آئروژینوزا* مثبت بودند. شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های گوشت خام و منجمد به ترتیب ۵/۰۰ و ۱۳/۳۳ درصد بود. اختلاف آماری معنی دار برای شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* بین نمونه‌های خام و منجمد مشاهده شد ($P < 0/05$).

جدول ۲- شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های گوشت جمع آوری شده از استان البرز.

نوع نمونه ها	تعداد جمع آوری شده	تعداد مثبت از نظر *سودوموناس آئروژینوزا* (٪)
گوشت خام	۶۰	۳ (۵/۰۰)
گوشت منجمد	۶۰	۸ (۱۳/۳۳)
کل	۱۲۰	۱۱ (۹/۱۶)

جدول ۳ شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های گوشت خام و منجمد را نشان می دهد. بر طبق نتایج، جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* هیچگونه مقاومتی نسبت به کلرامفنیکل نداشتند. جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (۱۰۰ درصد)، پنی سیلین (۹۰/۹۰ درصد) و تتراسایکلین (۸۱/۸۱ درصد) داشتند. کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمی پنم (۹/۰۹ درصد) و تری متوپریم (۱۸/۱۸ درصد) مشاهده گردید. اختلاف آماری معنی دار بین نوع نمونه‌ها و میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی دیده شد ($P < 0/05$).

جدول ۴ فراوانی فاکتور های حدت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های گوشت خام و منجمد را نشان می دهد. بر طبق نتایج، هیچ نمونه مثبتی برای ژن‌های *phzH* و *exoY* مشاهده نشد. فراوانترین فاکتورهای حدت در بین ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های گوشت خام و منجمد به ترتیب *exoU* (۵۴/۵۴ درصد) و *exoT* (۱۸/۱۸ درصد) بودند. کمترین فراوانی مربوط به فاکتور-های *phzM* (۹/۰۹ درصد) و *phzS* (۹/۰۹ درصد) بود. سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های گوشت منجمد حامل تعداد بیشتری از فاکتورهای حدت بودند ($P < 0/05$).

جدول ۳-شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های گوشت خام و منجمد.

نوع نمونه‌ها (تعداد مثبت از نظر *سودوموناس آئروژینوزا*)	تعداد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک (٪)										
	تتراسایکلین	کلرامفنیکل	سولفامتوکسازول	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین	تری متوپریم	آمپی سیلین	پنی سیلین	سفوکسیتین	کلیندامایسین	ایمی پنم	آزترونام
گوشت خام (۳)	۲ (۶۶/۶۶)	-	۱ (۳۳/۳۳)	۱ (۳۳/۳۳)	۱ (۳۳/۳۳)	۱ (۳۳/۳۳)	۳ (۱۰۰)	۲ (۶۶/۶۶)	۱ (۳۳/۳۳)	۱ (۳۳/۳۳)	-	۱ (۳۳/۳۳)
گوشت منجمد (۸)	۷ (۸۷/۵۰)	-	۲ (۲۵)	۳ (۳۷/۵۰)	۲ (۲۵)	۱ (۱۲/۵۰)	۸ (۱۰۰)	۸ (۱۰۰)	۲ (۲۵)	۲ (۲۵)	۱ (۱۲/۵۰)	۲ (۲۵)
کل (۱۱)	۹ (۸۱/۸۱)	-	۳ (۲۷/۲۷)	۴ (۳۶/۳۶)	۳ (۲۷/۲۷)	۲ (۱۸/۱۸)	۱۱ (۱۰۰)	۱۰ (۹۰/۹۰)	۳ (۲۷/۲۷)	۳ (۲۷/۲۷)	۱ (۹/۰۹)	۳ (۲۷/۲۷)

جدول ۴ - فراوانی فاکتورهای حدت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های گوشت خام و منجمد.

نوع نمونه‌ها (تعداد مثبت از نظر *سودوموناس آئروژینوزا*)	فراوانی سویه های حامل فاکتور حدت (٪)					
	phzM	*phzS*	*phzH*	*exoT*	*exoY*	*exoU*
گوشت خام (۳)	-	-	-	۱ (۳۳/۳۳)	-	۲ (۶۶/۶۶)
گوشت منجمد (۸)	۱ (۱۲/۵۰)	۱ (۱۲/۵۰)	-	۱ (۱۲/۵۰)	-	۴ (۵۰)
کل (۱۱)	۱ (۹/۰۹)	۱ (۹/۰۹)	-	۲ (۱۸/۱۸)	-	۶ (۵۴/۵۴)

بحث

مطالعات در زمینه اهمیت *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یک پاتوژن غذازاد بسیار محدود است. اکثر مطالعات انجام پذیرفته در این زمینه، *سودوموناس آئروژینوزا* را به عنوان عاملی برای فساد مواد غذایی خصوصاً گوشت معرفی نموده‌اند (Raposo et al., 2017). مطالعه پیشین در کشور چین (Wang et al., 2007) نشان داد که *سودوموناس آئروژینوزا* عامل یک مورد همه‌گیری بیماری

غـذازاد در ۱۶ نفـر در مدرسـه بـوده اسـت. همچنـین *سودوموناس آئروژینوزا* از طیف گسترده‌ای از مواد غذایی از جملـه گوشـت (Bantawa et al., 2018)، مـاهی (Algammal et al., 2020)، شیر و فـراورده هـای لبنـی (Quintieri etg al., 2019) و سـبزیجات (Allydice-Francis and Brown, 2012)، جداسازی شده است کـه می‌تواند دلیلی برای حضـور بـاکتری در طیـف وسـیعی از مواد غذایی باشد. مطالعه حاضر برای اولـین بـار اقـدام بـه ارزیابی شیوع، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی فاکتورهـای حدت در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینـوزا* جـدا شـده از گوشت خـام و منجمـد جمـع آوری شـده از اسـتان البـرز پرداخت. نتـایج ایـن تحقیـق نشـان دهنـده شـیوع ۹/۱۶ درصدی *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های گوشت بـود. شیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه های گوشت خـام و منجمد به ترتیب ۵/۰۰ و ۱۳/۳۳ درصد بـود. دلیـل بـالاتر بودن میزان شیوع *سـودوموناس آئروژینـوزا* در نمونـه‌هـای گوشت منجمد نسبت بـه گوشـت خـام، احتمـالاً ماهیـت سرمادوست بودن باکتری است. Sheir و همکاران (Sheir et al., 2020) میـزان شـیوع *سـودوموناس آئروژینـوزا* در نمونه‌های همبرگر منجمد را ۴/۰۰ درصد گزارش نمودنـد. در این مطالعه، دلیل اصلی آلـودگی نمونـه‌هـای همبرگـر، دستکاری‌های غیرضروری، کیفیت بهداشتی نامناسب مواد خام به ویژه ادویه جات به کار رفته در نمونه های همبرگر و اقـدامات غیربهداشـتی انجـام شـده در طـول تولیـد و نگهداری، گزارش شد. در مطالعات پیشـین، میـزان شـیوع *سـودوموناس آئروژینـوزا* در نمونـه‌هـای گوشـت مـرغ (Mahato et al., 2020)، گوشت شتر (Osman et al., 2019)، گوشت قرمز جمع آوری شده از خرده فروشـی‌هـا (Odoi et al., 2021)، گوشت منجمد وارداتی (Ibrahim et al., 2016) و سوسـیس (Sofy et al., 2017) بـه ترتیـب ۴۶/۷۰، ۸۰/۰۰، ۳/۰۰، ۶/۶۷ و ۸/۳۳ درصـد گزارش شده است. شیوع بالای *سودوموناس آئروژینـوزا* در نمونه های بررسی شده ممکن است به دلیل سازگاری زیاد باکتری با محیط هـای مختلـف، دمـای محـیط (۴ تـا ۴۲ درجه سلسیوس) و فعالیت آبی کم (۷۲-۹۷ درصد) باشـد (Gu et al., 2016). در نتیجـه بـه نظـر مـی رسـد کـه *سودوموناس آئروژینوزا* بایسـتی بـه شـکل جـدی‌تـری بـه عنوان یک پاتوژن غذازاد در نظر گرفته شود.

جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت بالایی نیست به آنتی‌بیوتیک‌هـای مختلـف خصوصاً آمپـی سـیلین، پنـی سیلین و تتراسـایکلین داشـتند. همچنـین میـزان شـیوع مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی برعلیـه آنتـی بیوتیـک‌هـای سولفامتوکسـازول، جنتامایسـین، سیپروفلوکساسـین، سفوکسیتین، کلیندامایسین و آزترونام زیـاد بـود. احتمـالاً استفاده بیش از حد و بدون رعایـت اصـول تجـویز آنتـی-بیوتیک خصوصاً در مزارع پـرورش دام، دلیـل اصـلی بـروز مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی اسـت. شـیوع بـالای مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی برعلیـه آنتـی بیوتیـک‌هـای ذکـر شـده در مطالعـات دیگـر از کشـور هـای چـین (Meng et al., 2020)، استرالیا (Khan et al., 2020)، آلمان (Yayan et al., 2015) و عربستان (Khan and Faiz 2016) نیـز گزارش شـده اسـت. Benie و همکـاران در سـال ۲۰۱۷ (Renie et al., 2017) اقدام به مطالعه شـیوع و مقاومـت آنتی بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شـده از گوشـت گاو، گوشت تازه ماهی و گوشت مـاهی دودی جمـع آوری شده از غرب آفریقا نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که ۲۰۴ نمونـه از کـل ۵۰۰ نمونـه (۴۱ درصـد) جمـع آوری شده، آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* بودند که در مقایسـه بـا نتـایج مطالعـه حاضـر بـه مراتـب بـالاتر بـود. شـیوع *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های گوشـت گـاو، گوشـت تازه ماهی و گوشت ماهی دودی شـده بـه ترتیـب ۵۹/۵۱ درصد، ۲۳/۹۰ درصـد و ۱۶/۰۹ درصـد بـود. جدایـه‌هـای *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین میزان شیوع مقاومت را بر علیـه آنتـی بیوتیـک هـای آزترونـام (۹۸/۴۰ درصـد)، تیکارسیلین+کلاولانیک اسید (۵۱/۴۰ درصد)، تیکارسیلین (۵۰/۴۰ درصـد)، پیپراسـیلین (۳۱/۴۰ درصـد)، سیپروفلوکسازین (۳۳/۶۰ درصد)، سفپیم (۱۷/۰۰ درصد)، سـفتازیدیم (۶/۹۰ درصـد)، ایمـی پـنم (۷/۲۰ درصـد)،

کلیسیتین (۴/۵۰ درصد) و فسفومایسین (۱/۲۰ درصد) داشتند. Allydice-Francis و Brown (۲۰۱۲) (Brown and Allydice-Francis, 2012) نشان دادند که سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از سبزیجات، بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم (۱۰۰ درصد)، جنتامایسین (۹۷/۰۰ درصد)، سیپروفلوکسازین (۹۳/۰۰ درصد) و سفتازیدیم (۷۹/۰۰ درصد) داشتند. Odumosu و همکاران (Odumosu et al., 2016) شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از اغذیه آماده مصرف را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربنیسیلین (۶۰/۰۰ درصد)، آمیکایسین (۱/۹۰ درصد) و سفتازیدیم (۸۳/۳۰ درصد) بیشتر از سایر آنتی بیوتیک ها گزارش نمودند. دلیل تفاوت در الگو و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعات مختلف احتمالاً تفاوت در نحوه تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک ها و در دسترس بودن یا نبودن انواع خاصی از آنتی بیوتیک‌ها در کشورهای مختلف است.

نتایج این تحقیق همچنین نشان دهنده حضور فاکتورهای حدت خصوصاً *exoU*، *exoT*، *phzM* و *phzS* در جدایه-های *سودوموناس آئروژینوزا* بود. نقش اصلی این فاکتورها چسبندگی به باکتری به سلول‌های میزبان و حمله به بافت‌های اپیتلیومی است. بنابراین احتمالاً مصرف مواد غذایی آلوده به سویه‌های حدت دار *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند موجب بروز بیماری غذازاد شود. با این وجود تا کنون مطالعات بسیار محدودی به منظور ارزیابی فراوانی فاکتورهای حدت در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از مواد غذایی انجام پذیرفته است. فاکتورهای حدت *toxA*، *aprA*، *plcH* و *las* در مطالعه پیشین، فراوانترین فاکتورهای حدت در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت شتر بودند (Osman et al., 2019). Benie و همکاران (Benie et al., 2017) ژن های *exoU*، *pilB*، *plcH*، *algD*، *exoS* و *lasB* را فراوانترین فاکتورهای حدت ردیابی شده در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت و ماهی، گزارش نمودند.

نتیجه گیری

شیوع بالای *سودوموناس آئروژینوزا* حامل فاکتورهای حدت و مقاوم به آنتی بیوتیک در نمونه‌های گوشت خام و منجمد نشان دهنده ی مشکل جدی در زمینه مصرف این دسته از مواد غذایی خصوصاً به شکل خام یا نیم پز است. نقش گوشت خام و خصوصاً گوشت منجمد به عنوان مخازن سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی شد. شیوع بالای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، پنی‌سیلین، تتراسایکلین، سولفامتوکسازول، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین، کلیندامایسین و آزترونام می‌تواند نشان‌دهنده عدم کفایت این آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان موارد ابتلا به *سودوموناس آئروژینوزا* باشد با توجه به حضور توام فاکتورهای حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از گوشت، به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری بایستی به منظور تایید نقش این باکتری به عنوان یک پاتوژن غذازاد، انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، کمال تشکر و قدردانی را از گروه بهداشت مواد غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، دارند.

منابع

1.Ahmad, R. S., Imran, A., Hussain, M. B. 2018. Nutritional composition of meat. Meat Sci Nutr. 61: 61-77.

2.Algammal, A.M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F. M., Atwa, M.H., El-Kholy, A.W., Hetta, H.F., Hozzein, W.N. 2020. Emerging MDR-Pseudomonas aeruginosa in fish commonly harbor opr L and tox A virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. Sci Reports. 10: 1-12.

3.Allydice-Francis, K., Brown, P.D. 2012. Diversity of antimicrobial resistance and

virulence determinants in Pseudomonas aeruginosa associated with fresh vegetables. Int J Microbiol. 2012: 1-7.
4.Al-Orphaly, M., Hadi, H.A., Eltayeb, F.K., Al-Hail, H., Samuel, B.G., Sultan, A.A., Skariah, S. 2021. Epidemiology of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa in the Middle East and North Africa Region. Msphere. 6: e00202-21.
5.Azimi, S., Kafil, H.S., Baghi, H.B., Shokrian, S., Najaf, K., Asgharzadeh, M., Yousefi, M., Shahrivar, F., Aghazadeh, M. 2016. Presence of exoY, exoS, exoU and exoT genes, antibiotic resistance and biofilm production among Pseudomonas aeruginosa isolates in Northwest Iran. GMS Hygiene Infect Control. 11: 1-6.
6.Bantawa, K., Rai, K., Limbu, D.S., Khanal, H. 2018. Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. BMC Res Notes. 11: 1-5.
7.Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., Guery, B. 2018. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs Context. 7: 212527.
8.Benie, C., Nathalie, G., Adjéhi, D., Solange, A., Fernique, K., Desire, K.N., Bourahima, B., Marcellin, D.K., Mireille, D. 2017. Prevalence and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from bovine meat, fresh fish and smoked fish. Arch Clin Microbiol. 8: 3.
9.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd informational supplement. M100–S2 2012.2. Wayne (PA).
10.Dehkordi, F.S., Tavakoli-Far, B., Jafariaskari, S., Momtaz, H., Esmaeilzadeh, S., Ranjbar, R., Rabiei, M. 2020. Uropathogenic Escherichia coli in the high vaginal swab samples of fertile and infertile women: virulence factors, O-serogroups, and phenotyping and genotyping characterization of antibiotic resistance. New Microb New Infect. 38: 100824.
11.Finnan, S., Morrissey, J.P., O'gara, F., Boyd, E.F. 2004. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J Clin Microbiol. 42: 5783-5792.
12.Gu, X., Sun, Y., Tu, K., Dong, Q., Pan, L. 2016. Predicting the growth situation of Pseudomonas aeruginosa on agar plates and meat stuffs using gas sensors. Sci Reports. 6: 1-12.
13.Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M.P., Williams, P., Cámara, M. 2018. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa PAO1-N. Front Cell Infect Microbiol. 8: 252.
14.Ibrahim, H.M., Bou El-Roos, N.A., Abd Elsalam, M.2016. Prevalence and molecular characterization of Pseudomonas species in frozen imported meat. Benha Vet Med J. 31: 220-224.
15.Khan, M., Stapleton, F., Summers, S., Rice, S.A., Willcox, M.D. 2020. Antibiotic resistance characteristics of Pseudomonas aeruginosa isolated from keratitis in Australia and India. Antibiotics. 9: 600.
16.Khan, M.A., Faiz, A. 2016. Antimicrobial resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in tertiary care hospitals of Makkah and Jeddah. Ann Saudi Med. 36: 23-28.
17.Langendonk, R.F., Neill, D.R., Fothergill, J.L. 2021. The building blocks of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: Implications for current resistance-breaking therapies. Front Cell Infect Microbiol. 11: 307.
18.Mahato, A., Mahato, S., Dhakal., K, Dhakal, A. 2020. Investigating the diversity of spoilage and food intoxicating bacteria from chicken meat of Biratnagar, Nepal. J Bacteriol Mycol. 7: 1141.
19.Meng, L., Liu, H., Lan, T., Dong, L., Hu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Zheng, N., Wang, J. 2020. Antibiotic resistance patterns of Pseudomonas spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. Front Microbiol. 11: 1005.

20.Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Ezadi, H., Arab, R. 2013. Incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups in ruminant's meat. Meat Sci. 95: 381-388.
21.Montero, M.M., Lopez Montesinos, I., Knobel, H., Molas, E., Sorlí, L., Siverio-Parés, A., Prim, N., Segura, C., Duran-Jordà, X., Grau, S., Horcajada, J.P. 2020. Risk Factors for Mortality among Patients with Pseudomonas aeruginosa Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes?. J Clin Med. 9: 514.
22.Newman, J.W., Floyd, R.V., Fothergill, J.L. 2017. The contribution of Pseudomonas aeruginosa virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. FEMS Microbiol Let. 364: 1-11.
23.Odoi, J.O., Takayanagi, S., Sugiyama, M., Usui, M., Tamura, Y., Asai, T. 2021. Prevalence of colistin-resistant bacteria among retail meats in Japan. Food Safety. 9: 48-56.
24.Odumosu, B.T., Ajetunmobi, O., Dada-Adegbola, H., Odutayo, I.2016. Antibiotic susceptibility pattern and analysis of plasmid profiles of Pseudomonas aeruginosa from human, animal and plant sources. Springer Plus. 5: 1-7.
25.Osman, K., Orabi, A., Elbehiry, A., Hanafy, M.H., Ali, A.M. 2019. Pseudomonas species isolated from camel meat: quorum sensing-dependent virulence, biofilm formation and antibiotic resistance. Future Microbiol. 14: 609-622.
26.Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 37: 177-192.
27.Quintieri, L., Fanelli, F., Caputo, L. 2019. Antibiotic resistant Pseudomonas spp. spoilers in fresh dairy products: an underestimated risk and the control strategies. Foods. 8: 372.
28.Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C.T., Ferrús, M.A., Carrascosa, C. 2017. Food spoilage by pseudomonas spp.—an overview. Foodborne Pathog Antibiotic Res. 3: 41-58.
29.Shahini, N., Shahini, N., & Ala, S. 2012. Determining of resistance and sensitivity of Pseudomonas aeruginosa in Iran in 2010-2011. Res Pharml Sci. 7: 884.
30.Sheir, S.H., Ibrahim, H.M., Hassan, M.A., Shawky, N.A. 2020. Incidance of Psychotropic bacteria in frozen chicken meat products with special reference to Pseudomonas species. Benha Vet Med J. 39: 165-168.
31.Sofy, A.R., Sharaf, A. E.M.A., Al Karim, A.G., Hmed, A.A., Moharam, K.M. 2017. Prevalence of the harmful Gram-negative bacteria in ready-to-eat foods in Egypt. Food Publ Health. 7: 59-68.
32.Spagnolo, A.M., Sartini, M., Cristina, M.L. 2021. Pseudomonas aeruginosa in the healthcare facility setting. Rev Med Microbiol. 32: 169-175.
33.Stellato, G., Utter, D.R., Voorhis, A., De Angelis, M., Eren, A.M., Ercolini, D. 2017. A few Pseudomonas oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. Front Microbiol. 8: 264.
34.Sultan, M., Arya, R., Kim, K.K. 2021. Roles of two-component systems in Pseudomonas aeruginosa virulence. Int J Mol Sci. 22: 12152.
35.Ullah, A., Durrani, R., Ali, G., Ahmed, S. 2012. Prevalence of antimicrobial resistant Pseudomonas aeruginosa in fresh water spring contaminated with domestic sewage. J Biol Food Sci Res. 1: 19-22.
36.van‘t Wout, E.F., van Schadewijk, A., van Boxtel, R., Dalton, L.E., Clarke, H. J., Tommassen, J., Marciniak, S.J., Hiemstra, P.S. 2015. Virulence factors of Pseudomonas aeruginosa induce both the unfolded protein and integrated stress responses in airway epithelial cells. Plos Pathog. 11: e1004946.
37.Wang, S., Duan, H., Zhang, W., Li, J.W. 2007. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005. FEMS Immunol Med Microbiol. 51: 8-13.

38.Yayan, J., Ghebremedhin, B., Rasche, K. 2015. Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. Plos One. 10: e0139836.

Prevalence, antibiotic resistance and frequency of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from raw and frozen meat

Rezaloo M[1], Motalebi A[1]. Mashak Z[2*], Anvar SA[1]

1. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

[*]**Corresponding author**: *mashak@kiau.ac.ir*

Received: 03 December 2021 Accepted: 15 February 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa strains are considered to be the main causes of food spoilage and sometimes foodborne diseases. The present study was performed to evaluate the pattern of antibiotic resistance and frequency of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from meat. A total of 120 samples of raw and frozen meat were collected. Samples were evaluated for the presence of *Pseudomonas aeruginosa* using microbial culture. The pattern of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates was evaluated using the disk diffusion method. Genomic DNA was extracted from *Pseudomonas aeruginosa* isolates and the frequency of virulence factors was assessed using the polymerase chain reaction. Eleven out of 120 meat samples (9.16%) were contaminated with *Pseudomonas aeruginosa*. The prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in raw and curled meat samples was 5.00 and 13.33%, respectively. There was a statistically significant difference in the prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* between raw and frozen meat samples (P <0.05). *Pseudomonas aeruginosa* isolates had the highest rate of antibiotic resistance against ampicillin (100%), penicillin (90.90%) and tetracycline (81.81%). The prevalence of resistance to imipenem (9.09%) and trimethoprim (18.18%) antibiotics was lower than other cases. *ExoU* (54.54%) and *exoT* (18.18%) genes were the most frequent virulence factors detected. The simultaneous presence of virulence factors and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from raw and frozen meat increases the need for further studies to confirm the role of this bacterium as a food-borne pathogen.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Virulence factors, Raw meat, Frozen meat.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.