ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and Antibacterial Susceptibility Pattern in Staphylococcus aureus strains Isolated from Different Foods

Seyed Mostafa Hosseini[1],
Mohammad Reza Arabestani[2],
Hasan Mahmoodi[1],
Elham Farhangara[1]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Brucellosis Research Centre, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

(Received January 14, 2014 ; Accepted April 21 , 2015)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of foodborne diseases. Enterotoxin produced by the bacterium is one of the very important virulence factors, and pyrogenic toxin super antigens (PTSAgs) that have profound effects on their hosts. This study aimed at evaluating the prevalence of *S.aureus* strains in different foods, examining their antimicrobial susceptibility patterns and detecting the enterotoxin genes (SEs) and *mecA* gene in isolated *S. aureus* strains using PCR.

Materials and methods: A total of 510 food samples was collected in 2013-2014 in Hamadan, Iran. Food samples were analyzed for *S.aureus* identification. The antibiotic susceptibility pattern of all isolated bacterium was determined by disk agar diffusion. After extraction of isolated genomic, enterotoxin genes and mecA gene were detected.

Results: We isolated 49 (9.60%) *S. aureus* strains from 510 food samples. The most frequent resistance was observed to erythromycin and tetracycline in 15 strains (30.61%), followed by gentamicin in 14(28.57%), clindamycin in 13 (26.53%), ciprofloxacin and rifampin in 12 (24.48%), trimethoprim-sulfamethoxazole in 7 (14.28%), and cefoxitin in 3 strains (6.10%). All cefoxitin resistant isolates were positive for *mecA* gene. Prevalence of SEs were 51.2% (n=25). Among the genes that code enterotoxins, *seg* gene were the most frequent that was carried by 36.73% of the isolates, followed by *sei* in 12.24%, and *seh* in 6.12% of the isolates. None of the isolates harbored the *sej* gene. Twenty three isolates carried only one SE gene and the remaining two isolates carried two SE genes.

Conclusion: High prevalence of enterotoxin genes in current study idicates the risk potential of poisoning with foods contaminated by *Staphylococcus aureus*. The increasing prevalence of enterotoxin and emerging its antibiotic resistance in foods is a serious problem for public health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxin genes, Methicillin-resistant, food

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(123): 1-10(Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۳ فروردین سال ۱۳۹۳ (۱۰-۱)

بررسی میزان شیوع ژن های *I,H,G* و *J* انتروتوکسین و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد غذایی مختلف

سید مصطفی حسینی[1]
محمد رضا عربستانی[2]
حسن محمودی[1]
الهام فرهنگ آرا[1]

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین علل مهم بیماری‌های منتقله از غذا در جهان می‌باشد. انتروتوکسین‌های تولید شده توسط این باکتری از دسته فاکتورهای ویرولانس بسیار مهم و جزء سوپر آنتی‌ژن‌های توکسین پیروژنیک (PTSAgs) می‌باشد که تاثیرات عمیقی بر میزبان خود دارند. هدف از این مطالعه بررسی شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در انواع مواد غذایی، بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن ها و شناسایی ژن‌های انتروتوکسین و هم چنین ژن *mecA* با استفاده از روش PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۵۱۰ نمونه مواد غذایی مختلف در طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از سطح شهر همدان جمع‌آوری و از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی همه باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین و پس از استخراج ژنومی سویه‌های جدا شده، ژن‌های انتروتوکسین و ژن *mecA* شناسایی شد.

یافته‌ها: به طور کلی، ۴۹ سویه (۹/۶۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله گردید. سویه‌ها به ترتیب بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به اریترومایسین و تتراسایکلین ۱۵ (۳۰/۶۱ درصد)، جنتامایسین ۱۴ (۲۸/۵۷ درصد)، کلیندامایسین ۱۳ (۲۶/۵۳ درصد)، سیپروفلوکساسین و ریفامپین ۱۲ (۲۴/۴۸ درصد)، تریمتوپریم/سولفامتاکسازول ۷ (۱۴/۲۸ درصد) و سفوکسیتین ۳ (۶/۱۰ درصد) داشتند. همه نمونه‌های مقاوم به سفوکسیتین دارای ژن *mecA* بودند. ۲۵ (۵۱/۰۲ درصد) از سویه‌ها دارای ژن انتروتوکسین بودند، بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن انتروتوکسین G ۱۸ (۳۶/۷۳ درصد) می‌باشد، انتروتوکسین I در ۶ (۱۲/۲۴ درصد) و انتروتوکسین H در ۳ (۶/۱۲ درصد) سویه گزارش گردید. انتروتوکسین J در هیچ نمونه‌ای یافت نشد. ۲۳ سویه فقط دارای یک انتروتوکسین و ۲ سویه دارای دو انتروتوکسین بودند.

استنتاج: شیوع بالای ژن‌های انتروتوکسین مشاهده شده در این مطالعه، خطر بالای مسمویت با غذاهای آلوده به این باکتری را نشان می‌دهد. افزایش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی می‌تواند مشکل و نگرانی جدی برای سلامت جامعه باشد.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های انتروتوکسین، مقاومت به متی سیلین، مواد غذایی

مقدمه

جنس *استافیلوکوکوس‌ها* متعلق به خانواده میکروکوکاسیه هستند. این باکتری‌ها گرم مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند(۱). *استافیلوکوکوس‌ها* دارای بیش از ۲۰ گونه

مولف مسئول: محمدرضا عربستانی– همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی Email: mohammad.arabestani@gmail.com
۱. کارشناسی ارشد میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۰/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۱/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۲/۱

می‌باشند که در زیستگاه‌های مختلف پراکنده‌اند. برخی از آن‌ها در پوست، غدد پوستی، غشاهای مخاطی جانوران و انسان وجود دارند و به فراورده‌های حیوانی مثل شیر، پنیر، گوشت و منابع محیطی مثل خاک و شن و گرد و غبار هوا و آب‌های طبیعی منتقل می‌شوند(۲،۱). این باکتری از جمله گونه‌های شاخص است که علاوه بر بیماری‌زایی برای انسان در فساد مواد غذایی نیز نقش دارد و یکی از چهار عامل شایع و مهم در ایجاد مسمویت غذایی می‌باشد. در بسیاری از کشورها *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان شایع‌ترین پاتوژن بعد از *سالمونلا* و در رقابت با *کلستریدیوم پرفرنجنس* در مواد غذایی است. وجود این باکتری در مواد غذایی و لبنیات در اواخر قرن نوزدهم مورد بررسی قرار گرفت. Bennett در سال ۱۹۱۴ با انجام آزمایش‌های مختلف و مصرف شیر آلوده به *استافیلوکوک* علائم و آثار مسمومیت غذایی ناشی از آن را نشان داد(۳).

انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از فاکتورهای ویرولانس مهم این باکتری و از دسته سوپرآنتی‌ژن‌های توکسین پیروژنیک می‌باشند که تأثیرات مهمی بر میزبان خود دارند. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برمبنای خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی به پنج خانواده انتروتوکسین‌های کلاسیک (A,B,C,D,E) و انتروتوکسین‌های جدید (از G تا R،Q و U) تقسیم می‌شوند. ژن‌های انتروتوکسین روی جزایر پاتوژنیسیته هستند و می‌توانند به صورت افقی بین *استافیلوکوکوس اورئوس*ها انتقال یابند، اما بر خلاف پلاسمیدها این جزایر نمی‌توانند به صورت جداگانه و خود به خود تکثیر شوند. این جزایر پاتوژنیسیته می‌توانند توسط فاژهای MU50 و N315 منتقل شوند(۴).

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های اکتسابی از جامعه مطرح می‌باشد و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکی از مشکلات موجود در بیمارستان و جامعه می‌باشد. افزایش بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است ناشی از شیوع ژن‌های قابل انتقال *mec* و حضور اگزوتوکسین‌های بیماری‌زا باشد که هر دوی این عوامل سلامت بشر را تهدید می‌کنند(۶،۵). اولین گزارش مربوط به شیوع MRSAها در جوامع (Community acquired methicillin resistance staphylococcus aureus) مربوط به سال ۱۹۹۹ در ایلات متحده و حدوداً ۷ سال پس از شیوع MRSAهای بیمارستانی (Hospital acquired methicillin resistance staphylococcus aureus) بود(۷). این سویه‌های باکتری به علت مقاومت بالا به شرایط محیطی، قدرت تخریب بالقوه و مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و حضور آن در چرخه مواد غذایی یکی از نگرانی‌های سلامت عمومی به شمار می‌رود(۸،۶،۵).

این باکتری به عنوان یک باکتری کلونیزه شونده روی پوست و مخاط انسان و حیوانات به عنوان مخازن اولیه باکتری حضور دارد. بنابراین به راحتی طی پروسه تهیه، آماده‌سازی، خرد کردن، بسته بندی و ذخیره غذاهایی که نیازمند فرایندهای دستکاری هستند وارد آن ها می‌شوند. معمولاً این غذاها به علت عدم نیازمندی این باکتری به شرایط خاص و مورد نیاز برای رشد از تنوع بالایی برخوردار هستند و عمده آن‌ها عبارتند از گوشت و فراورده‌های گوشتی، شیر و فراوردهای لبنی، جوجه، ماهی، غذاهای نمکی و تخمیری و غیره به طوری که حتی غذاهای پخته مسئول ۲۴ درصد همه این موارد هستند(۹).

با توجه به اهمیت تشخیص، کنترل و گزارش سویه‌های تولیدکننده انتروتوکسین و مقاوم به متی‌سیلین از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO) و هم‌چنین خطر شیوع بیش از پیش عفونت‌های ناشی از سویه‌های توکسین‌زا و مقاوم به متی سیلین و انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ناشی از آن درجامعه(۱۰)، بررسی سویه‌های فوق‌الذکر به‌منظور تعیین سطح آلودگی و مقاومت‌های متعاقب آن برای تدوین برنامه‌های پیشگیرانه در سطح

جامعه امری ضروری به‌نظر می‌رسد. در نتیجه مطالعه حاضر با هدف جداسازی، تشخیص و گزارش این سویه‌ها از مواد غذایی مورد مصرف در جامعه مانند شیر و محصولات مرتبط و گوشت خام و به‌منظور طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی/آزمایشگاهی، ۵۱۰ نمونه مواد غذایی در مدت ۸ ماه از نقاط مختلف استان همدان در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲به طور تصادفی جمع‌آوری شد. هر یک از نمونه‌ها با استفاده از ظروف استریل در پیچ‌دار و حفظ شرایط سرمایی در حداقل زمان به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم‌پزشکی همدان منتقل شدند.

جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*: بعد از یکنواخت سازی نمونه‌ها در شرایط استریل با استفاده از سرم فیزیولوژی و آب پپتونه، نمونه‌ها به کمک محیط ژیولتی کانتونی براث (تهیه شده از شرکت QUELAB کانادا) حاوی ۳/۵ درصد تلوریت پتاسیم در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت وارد مرحله غنی‌سازی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند. سپس نمونه‌ها در محیط کشت برد پارکر آگار (Merk) حاوی ۵ درصد زرده تخم مرغ و تلوریت پتاسیم کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. کلنی‌های با ظاهر سیاه و دارای هاله روشن مثبت در نظر گرفته شد و در محیط کشت بلاد آگار (QUELAB) کشت مجدد داده شدند و برای کلیه سویه‌ها علاوه بر رنگ آمیزی گرم، مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۹۴ تست‌های کاتالاز، کواکولاز، تست DNase به‌کمک محیط کشت DNase (QUELAB)، تخمیر مانیتول با استفاده از محیط کشت مانیتول سالت آگار (QUELAB) و تست VP انجام شد(۱۱). در تمام مراحل از *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25423 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی: نمونه‌ها به روش انتشار دیسک کربی-بائر، آنتی بیوگرام شدند. از ارگانیسم مورد آزمایش، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم واحد مک فارلند تهیه و به محیط مولر هینتون آگار (Merk) منتقل شدند و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، تریمتوپریم-سولفامتوکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم)، (تهیه شده از شرکت MAST انگلستان) را بر روی پلیت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله مهار رشد اندازه‌گیری شد. قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌ها برای هر آنتی‌بیوتیک طبق دستورالعمل CLSI به صورت حساس، نیمه حساس یا مقاوم تقسیم‌بندی گردیدند(۱۲).

استخراج DNA: استخراج DNA تمامی سویه‌ها به کمک لیزوزیم و کیت مناسب (ساخت ژاپن Bioflux) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. به منظور تایید DNA استخراج شده از نمونه‌ها، DNA ژنومی هر سویه بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

آزمایش PCR: جهت شناسایی ژن *nuc* (ژن تاییدی *استافیلوکوکوس اورئوس*) و ژن *mecA* (ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین) واکنش PCR تکی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. برای شناسایی انتروتوکسین‌های *j,I,h,g* از روش multiplex PCR استفاده شد، هر واکنش مولتی پلکس PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر 2x Taq premix Mastermix (Parstous Biotech Co., Iran)، یک میکرولیتر از هر پرایمر F، یک میکرولیتر از هر پرایمر R، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۱/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر می‌باشد. برنامه چرخه حرارتی واکنش مولتی‌پلکس PCR برای ژن‌ها به صورت واسرشته سازی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس در ادامه ۳۵ چرخه PCR به ترتیب واسرشته‌سازی اولیه ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال

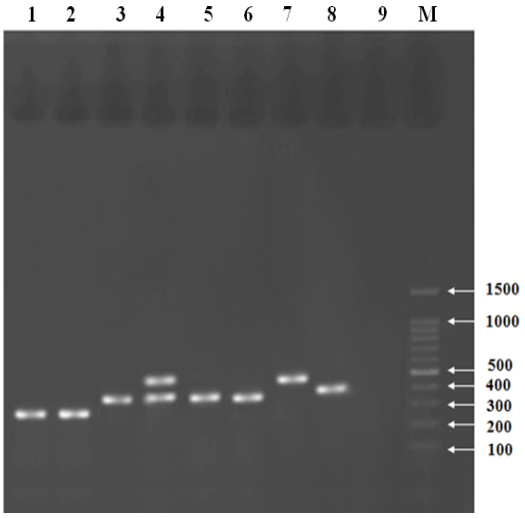
پرایمر (Primer Annealing) طویل سازی (Extension) ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد(۱۳). توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است.

توالی یابی (Sequencing): یک نمونه از هر محصول PCR مربوط به انتروتوکسین‌ها و همین‌طور محصول PCR مربوط به *mecA* و *nuc* با همکاری شرکت تکاپوزیست توسط شرکت Bioneer کره جنوبی توالی‌یابی شد. اطلاعات مربوط به توالی‌یابی توسط نرم افزار Chromas تجزیه و تحلیل گردید. در این تحقیق با استفاده از آزمون chi-sqare (χ^2) مقایسه میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* بین نمونه‌های گوشت و محصولات لبنی و هم‌چنین مقایسه بین الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین دو گروه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حساس به متی‌سیلین انجام پذیرفت. سپس ارتباط بین نوع نمونه غذایی و انتروتوکسین‌ها تجزیه و تحلیل گردید. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار spss (نسخه ۲۰) استفاده شد (کلیه آزمون‌ها در سطح معنی‌داری p=۰/۰۵ انجام پذیرفت).

یافته ها

در این مطالعه ۵۱۰ نوع ماده غذایی از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۴۹ سویه (۹/۶۰ درصد) *استافیلوکوکس اورئوس* جدا گردید. نمونه‌ها به وسیله PCR و با استفاده از ژن *nuc* مورد تایید قرار گردیدند (تصویر شماره ۱).

میزان آلودگی در زیرگروه مواد لبنی ۹/۲۳ درصد و در زیرگروه مواد گوشتی ۱۰/۲۷ درصد بوده است (جدول شماره ۲). بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب مربوط به اریترومایسین و تتراسایکلین ۱۵ سویه



تصویر شماره ۱: ژل الکتروفورز برای محصول PCR

ستون۱: ژن *nuc* سویه ATCC 22423 (کنترل مثبت)،
ستون ۲: ژن *nuc*
ستون ۳: ژن *mecA* (۳۱۰–bp)،
ستون ۴: ژن *seg, i* (به ترتیب ۳۲۳–bp و ۴۶۱–bp)
ستون ۵: ژن *seg* (۳۲۳–bp)،
ستون ۶: *seg* (۳۲۳–bp)،
ستون ۷: ژن *sei* (۴۶۱ –bp) ستون
۸: ژن *seh* (۳۷۶–bp)، ستون
۹: کنترل منفی (نمونه بدون DNA)،
ستون M: DNA سایز مارکر ۱۰۰–bp

جدول شماره ۱: پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

Targe t gen	Sequences	Gene accession no.	Product (bp)	Annealing temperature (°C)	References
Nuc	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	DQ399678	۲۷۹	۵۰	(۱۴)
mecA	F: GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	X52593	۳۱۰	۵۵	(۱۴)
Sei	F: GTACCGTTGAAAATTCAG R: AGGCAGTCCATCTCCTG	AAW3643/ AF285760	۴۶۱	۵۵	(۱۳)
Seg	F:TCTCCACCTGTTGAAGG R: AAGTGATTGTCTATTGTCG	AF285760	۳۲۳	۵۵	(۱۳)
Seh	F: CAATCACATCATATGCGAAAGCAG R: CATCTACCCAAACATTAGCACC	U11702	۳۷۶	۵۵	(۱۳)
Sej	F: TCAGAACTGTTGTTCCGCTAG R: GAATTTTACCAYCAAAGGTAC	AF053140	۱۳۸	۵۵	(۱۳)

(۳۰/۶۱ درصد) و کم‌ترین مقاومت به سفوکسیتین ۳ سویه (۶/۱۰ درصد) مشاهده شد (جدول شماره ۳). از سه نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (سفوکسیتین)، یک نمونه مربوط به پنیر و دو نمونه مربوط به شیر خام بودند. این نمونه‌ها با استفاده از *ژن mecA* تایید گردیدند (تصویر شماره ۱). به طور کلی ۲۵ سویه (۵۱/۰۲ درصد) از ۴۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد غذایی دارای ژن انتروتوکسین بودند. از این تعداد ۱۵ سویه (۶۰ درصد) در نمونه‌های مواد لبنی و ۱۰سویه (۴۰ درصد) در نمونه‌های مواد گوشتی مشاهده گردیدند. بیش‌ترین فراوانی انتروتوکسین‌ها به ترتیب درپنیر وگوشت گزارش گردید و هیچ انتروتوکسینی در نمونه دوغ و شیر وجود نداشت. از میان انتروتوکسین‌ها بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن انتروتوکسین *G* ۱۸ (۳۶/۷۳ درصد) می‌باشد، انتروتوکسین I در ۶ (۱۲/۲۴ درصد) و انتروتوکسین *H* در ۳ (۶/۱۲ درصد) سویه گزارش گردید، انتروتوکسین *J* در هیچ سویه‌ای یافت نشد. ۲۳ سویه فقط دارای یک انتروتوکسین و ۲ سویه دارای دو انتروتوکسین بودند (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۱).

بحث

یکی از مشکلات اساسی سلامت و بهداشت عمومی بیماری‌های منتقل شونده از راه غذا (food borne diseases) می باشد که سالانه با صرف هزینه‌های زیاد، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شود. مسمومیت غذایی با استافیلوکوکوس اورئوس به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذا و هضم آن ایجاد می‌شود و موجب خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای می گردد(۱۳). این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فراورده‌های لبنی، گوشت و فراورده‌های گوشتی و به خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است(۱۱).

هدف از این مطالعه بررسی و تعیین فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *I,H,G* و *J* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی سیلین جدا شده از محصولات لبنی و گوشت ماکیان بود. شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در این مطالعه ۹/۶ درصد می‌باشد که با مطالعه اشراقی و همکارانش در شهر تهران مشابهت دارد،که شیوعی برابر با ۹/۵ درصد را گزارش کرده‌اند، این می‌تواند به علت تشابه سطح بهداشتی و هم‌چنین نحوه تولید و توزیع مواد غذایی در داخل کشور باشد(۱۱). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ توسط Aydin و همکارانش در ترکیه انجام‌گرفت که شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مواد غذایی ۱۳/۸ درصد گزارش کرده‌اند(۱۵). در مطالعه مشابهی توسط Crago و همکارانش در کشور کانادا از سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۰ انجام گرفته است و میزان شیوع ۱۰/۵۳ درصد گزارش شد(۱۶).

جدول شماره ۲: نمونه های جمع آوری شده و نتایج PCR

نوع نمونه	تعداد نمونه	میزان آلودگی (درصد)	تعداد نمونه های دارای ژن *mecA*	انتروتوکسین G	انترونوکسین H	انتروتوکسین I	انتروتوکسین J	انتروتوکسین G و I
خامه	۳۲	۶/۲۵	۰	۱	۰	۰	۰	۰
ماست	۲۱	۴/۷۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰
شیر خام	۱۳۱	۱۰/۶۸	۲	۴	۱	۱	۰	۱
گوشت قرمز	۱۱۹	۱۰/۰۸	۰	۳	۱	۱	۰	۱
گوشت مرغ	۶۶	۱۰/۶۰	۰	۲	۰	۱	۰	۰
سرشیر	۲۲	۴/۵۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰
پنیر	۸۴	۱۰/۵۸	۱	۴	۰	۱	۰	۰
کره	۳۵	۸/۵۷	۰	۲	۱	۰	۰	۰
جمع	۵۱۰	۴۹/۵۱۰	۳/۴۹	۱۸/۴۹	۳/۴۹	۶/۴۹	۰	۲/۴۹
(درصد)	(۱۰۰)	(۹/۶۰)	(۶/۱)	(۳۶/۷۳)	(۶/۱۲)	(۱۲/۲۴)	(۰)	(۴/۰۸)

جدول شماره ۳: نتایج آنتی بیوگرام

آنتی بیوتیک ها	نتایج روش انتشار دیسک		
	مقاوم تعداد (درصد)	حدواسط تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
سفوکسیتین	۳ (۶/۱)	-	۴۶ (۹۳/۹)
اریترومایسین	۱۵ (۳۰/۶۱)	۲ (۴/۱)	۳۲ (۶۵/۳)
تتراسایکلین	۱۵ (۳۰/۶۱)	۱ (۲)	۳۳ (۶۷/۳۴)
جنتامایسین	۱۴ (۲۸/۵۷)	-	۳۵ (۷۱/۴)
کلیندامایسین	۱۴ (۲۶/۵۳)	۱ (۲)	۳۵ (۷۱/۴)
سیپروفلوکساسین	۱۲ (۲۴/۴۸)	-	۳۷ (۷۵/۵۱)
ریفامپین	۱۲ (۲۴/۴۸)	۴/۲۱	۳۵ (۷۱/۴)
تریمتوپریم/سولفامتوکسازول	۷ (۱۴/۲۸)	۱ (۲)	۴۱ (۸۳/۶۷)

در این مطالعه میزان آلودگی بین محصولات لبنی و گوشتی به ترتیب با میزان آلودگی ۳۰ (۹/۲۳ درصد) و ۱۹ (۱۰/۲۷ درصد) تفاوت چشمگیری از لحاظ فراوانی باکتریایی ندارند (p>۰/۰۵). این در حالی است که در مطالعه اشراقی و همکارانش اختلاف محسوسی بین فراوانی باکتری‌های جدا شده از محصولات لبنی (۱۷ درصد) و محصولات گوشتی (۳/۵ درصد) وجود دارد، که این مغایرت بین دو مطالعه به دلیل نمونه گیری از محصولات گوشتی بسته‌بندی شده صنعتی در تحقیق سلطان دلال و همکارانش در شهر تهران می‌باشد(۱۱). در مطالعه‌ای که در ایتالیا توسط Bianchi و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام گرفته، شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر و محصولات لبنی ۳۹ درصد گزارش گردید که بیش‌تر از نتایج مطالعه ما می‌باشد(۱۷). در تحقیقی دیگر در ترکیه به وسیله Ertas در سال ۲۰۱۰ انجام شد، شیوع را ۵۷ درصد گزارش کردند(۱۸). دلیل بالا بودن میزان آلودگی شیر خام می‌تواند به علت دریافت شیر از گاوها یا گوسفندانی باشد که دارای بیماری ورم پستان می‌باشند. از دیگر عوامل آلودگی تجهیزات آلوده و همین‌طور کارکنان می‌باشد. به علاوه، پنیر تولیدی از شیر خام و غیر پاستوریزه (پنیر محلی) عامل نگران کننده مهمی برای ایجاد و گسترش مسمومیت غذایی می‌باشد.

در این مطالعه از ۴۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش، ۳ نمونه (۶/۱ درصد) دارای ژن *mecA* می باشد. هر نمونه دارای ژن *mecA* مشخص کننده مقاومت به سفوکسیتین (متی‌سلین) CA.MRSA می‌باشد. همه CA.MRSA از محصولات لبنی جدا شده‌اند که بر اساس تحلیل آماری معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵). میزان CA.MRSA در مطالعات مشابه به صورت ۶/۴ درصد در کانادا، ۳/۸ درصد در ایتالیا، ۲/۵ درصد درهلند، ۱/۶درصد در اسپانیا و۲/۴ درصد در کره گزارش شده است(۱۲،۲۱-۱۸). طبق بعضی مطالعات علت اصلی به وجود آمدن باکتری‌هایی با مقاومت بالا تجویز نابجای آنتی بیوتیک در دامداری‌ها برای درمان یا افزایش رشد می‌باشد(۱۶). در این مطالعه اختلاف محسوسی از لحاظ الگوی مقاومت بین نمونه‌های گوشت و نمونه‌های محصولات لبنی وجود نداشت (p >۰/۰۵).

با مقایسه میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک های دیگر بین سویه‌هایی CA.MRSA با سویه‌های MSSA و بررسی‌های آماری مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سلین و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله اریترومایسن، تتراسایکلین، جنتامایسن و ریفامپین وجود دارد (p <۰/۰۵). این یافته با مطالعه Wu و همکارانش مطابقت دارد(۱۳). با این که مقاومت به سیپروفلوکساسین و تریمتوپریم/ سولفامتاکسازول در سویه‌های CA.MRSA بالاتر از MSSA می‌باشد، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p > ۰/۰۵).

یکی از اهداف ما در این مطالعه شناسایی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های *I,H,G* و *J* از سویه‌های جدا شده از مواد غذایی بود. ۲۵ سویه (۵۱/۰۲ درصد)، یک یا دو ژن انتروتوکسین را حمل می کردند. مطالعه Pu و همکارانش که سال ۲۰۱۱ در کشور امریکا انجام گرفت، ۸۴/۹ درصد از سویه‌ها ژن انتروتوکسین را حمل می‌کردند که مشابه با مطالعه حاضر می‌باشد(۲۲). در پرتغال Pereira شیوع سویه‌های انتروتوکسین‌زا را ۶۸/۲ درصد گزارش نمود(۲۳). در دیگر مطالعه مشابه در ایتالیا Normanno و همکارانش سال ۲۰۰۷ شیوع انتروتوکسین در سویه‌های جدا شده از مواد غذایی را ۵۹/۸ درصد

گزارش کردند(۲۴). در مطالعه Katsuda و همکارانش در ژاپن ۱۸۳ (۶۸/۸ درصد) از سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس دارای ژن انتروتوکسین بودند(۲۵).

در این مطالعه انتروتوکسین G بیش‌ترین فراوانی را داشت (۳۶/۷۳ درصد)، این یافته با مطالعه Alibayov و همکارانش هم‌خوانی دارد(۲۶). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Rall و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در کشور برزیل انجام گرفته، میزان شیوع انتروتوکسین‌های G و I را به ترتیب ۲۸/۲ درصد و ۲۱ درصد گزارش کرده‌اند(۲۷). انتروتوکسین G و I معمولاً با هم یافت می‌شوند و در مطالعه حاضر هم دو نمونه دارای این دو ژن به طور هم‌زمان بودند. به طورکلی هیچ ارتباط معنی‌داری بین باکتری جدا شده از مواد غذایی و وجود ژن انتروتوکسین یافت نشد ($p>۰/۰۵$). به علاوه اختلاف چشمگیر و محسوسی بین *استافیلوکوکوس*های جدا شده از مواد غذایی لبنی و گوشتی برای حضور انتروتوکسین وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به این که *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی بالا در مواد غذایی وجود دارد، نبایستی نقش این میکروارگانیسم به عنوان یکی از عوامل مسمویت نادیده گرفته شود. از آن‌جایی که انتروتوکسین‌های این باکتری مقاوم به حرارت و پروتئاز هستند و در پروسه گرم کردن و پختن از بین نمی‌روند، میزان بالای شیوع ژن‌های انتروتوکسین در این مطالعه، نقش بالقوه این باکتری برای ایجاد مسمویت غذایی را مشخص کرد. افزایش شیوع CA.MRSA و مقاومت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های جدا شده از مواد غذایی می‌تواند یک مشکل جدی برای سلامت جامعه باشد. بنابراین باید تصمیمات جدی برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و افزایش سطح بهداشتی اتخاذ گردد.

سپاسگزاری

هزینه مطالعه این پایان نامه از محل اعتبارات طرح شماره ۹۲۰۶۲۶۱۹۳۰ دانشگاه علوم پزشکی همدان پرداخت شده است. بدین‌وسیله از معاونت آموزشی و تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36(4): 815-36.
2. Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schällibaum M, Blum JW. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. J Dairy Sci 2006; 89(3): 989-997.
3. Bennett RW, Yeterian M, Smith W, Coles C, Sassaman M, McClure F. Staphylococcus aureus identification characteristics and enterotoxigenicity. J Food Sci 1986; 51(5): 1337-1339.
4. Bania J, Dabrowska A, Bystron J, Korzekwa K, Chrzanowska J, Molenda J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus from food. Int J Food Microbiol 2006; 108(1): 36-41.
5. Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA, et al. Origins of community strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis 2004; 39(1): 47-54.
6. Imani Fouladi A, Choupani A, Fallah Mehrabadi J. Study of prevalence of Enterotoxin type B gene in Meticillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from wound. Kowsar Med J 2011; 16(1): 21-25.

7. Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK, et al. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Minnesota, 1996-1998. Clin Infect Dis 2001; 33(7): 990-996.
8. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003; 9(8): 978-984.
9. Oh SK, Lee N ,Cho YS, Shin D-B, Choi SY, Koo M. Occurrence of toxigenic Staphylococcus aureus in ready-to-eat food in Korea. J Food Prot 2007; 70(5): 1153-1158.
10. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11(8): 595-603.
11. Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Bakhtyari R ,Mardani N, Amiri S, et al. Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in staphylococcus aureus strains isolated from different foods. Tehran Univ Med Sci 2009; 67(7): 1145-1152.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012; 32(3).
13. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. J Med Microb 2011; 60(pt 1): 35-45.
14. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of Staphylococcus aureus from Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 4947-455.
15. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int J Food Microbi 2011; 148(2): 99-106.
16. Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiol 2012; 32(7): 202-205.
17. Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. Lett Appl Microbiol 2013; 58(5): 190-196.
18. Weese J, Avery B, Reid Smith R. Detection and quantification of methicillin□resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clones in retail meat products. Letters in Applied Microbiology 2010; 51(3): 338-342.
19. Van Loo IH, Diederen B, Savelkoul P, Woudenberg J, Roosendaal R, Van Belkum A, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands. Emerging Infectious Diseases 2007; 13(11): 1753-1760.

20. Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in food samples of animal origin in Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009; 64(6): 1325-1326.
21. Rhee CH, Woo GJ. Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Korea. Journal of Food Protection 2010; 73(12): 2285-2290.
22. Pu S, Wang F, Ge B. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. Foodborne Pathog Dis 2011; 8(2): 299-306.
23. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol 2009; 26(3): 278-282.
24. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol 2007; 115(3): 290-296.
25. Katsuda K, Hata E, Kobayashi H, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. Vet Microbiol 2005; 105(3-4): 301-305.
26. Alibayov B, Zdeňková K, Purkrtová S, Demnerová K, Karpíšková R. Detection of some phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food itemsi n the Czech Republic. Ann Microbiol 2014; 149(4): 1587-1596.
27. Rall VL, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A Jr, Candeias JM, et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus aureus strains isolated from raw and pasteurized milk. Vet Microbiol 2008; 132(3-4): 408-413.