Archive of SID

تشخیص مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد انتروتوکسین A در شیرینی‌های خامه‌ای در شهرستان کرج در سال ۱۳۹۵

مهسا مکوندی[a]، ناصر هرزندی[b]*

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[b] استادیار میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۸/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

چکیده

مقدمه: انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی متعلق به خانواده‌ای از اگزوتوکسین‌های استافیلوکوکوسی و استرپتوکوکوسی با بیش از بیست عضو هستند که از نظر عملکردی با یکدیگر مرتبط بوده و دارای همسانی و شباهت توالی می‌باشند. این پروتئین‌های باکتریایی، میتوژن بوده و عامل ایجاد بیماری‌های انسانی شاخصی از قبیل مسمومیت‌های غذایی هستند. این مطالعه با هدف جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین A از شیرینی‌های خامه‌ای به انجام رسید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مشاهده ای- توصیفی، نمونه‌گیری از ۵۰ مرکز عرضه شیرینی خامه‌ای در شهرکرج از اواسط مردادماه تا اوایل بهمن ماه ۹۵ صورت گرفت. پس از تهیه رقت‌های متوالی از شیرینی‌ها، بر روی محیط برد پارکر آگار کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌های واجد هاله سیاه رنگ، انتخاب شدند. پس از رشد بر روی محیط بلاد آگار، حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید و حضور ژن‌های *sea, nuc* و *mecA* با استفاده از آزمون PCR بررسی شد.

یافته‌ها: در مجموع، بر اساس نتایج کشت، ۸ نمونه از ۵۰ نمونه (۱۶٪)، دارای آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس بودند*. با استفاده از روش PCR، ژن *nuc*، در۱۴ نمونه (۲۸٪)، ژن *mecA* و ژن *sea* به ترتیب در ۵ نمونه (۱۰٪)، ۳ نمونه (۶٪) شناسایی گردیدند.

نتیجه‌گیری :درصد قابل توجه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد انتروتوکسین A در مواد غذایی، بخصوص در شیرینی خامه‌ای که محیط مغذی جهت رشد باکتری‌ها محسوب می‌شود یک هشدار جدی در ارتباط با بهداشت عمومی جامعه است.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، انتروتوکسین A، ژن nuc، ژن mec، ژن sea، شیرینی خامه ای*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: naser.harzandi@kiau.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس شامل باکتری‌های گرم مثبتی است که پوست و غشاءهای مخاطی انسان و حیوانات را کلنیزه می کنند. با وجود اینکه سویه های استافیلوکوکوس بخشی از فلور طبیعی انسان هستند و به‌عنوان میکروارگانیسم‌های همسفره به شمار می روند، اما به عنوان عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب نیز شناخته می‌شوند که باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها می‌شوند. هر ساله صدها هزار نفر از مردم دچار مسمومیت غذایی می‌شوند که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده آن، *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (Adwan *et al.*, 2006). در میان استافیلوکوکوس‌ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* مهاجم‌ترین گونه است و به‌عنوان عامل عفونت پوست، آبسه‌ها، مسمومیت غذایی، سندرم شوک سمی، سپتی سمی، اندوکاردیت و ذات‌الریه شناخته می‌شود. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی متعلق به خانواده ای از اگزوتوکسین های استافیلوکوکوسی و استرپتوکوکوسی با بیش از بیست عضو هستند که از نظر عملکردی با یک دیگر مرتبط بوده و دارای همسانی و شباهت توالی ژنی مربوطه می‌باشند. این پروتئین‌های باکتریایی، تب زا بوده و عامل ایجاد بیماری‌های انسانی شاخصی از قبیل مسمومیت های غذائی و سندرم شوک سمی هستند (Aydin *et al.*, 2011). این سموم بیش تر توسط گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شوند، البته مشخص شده است که سایر گونه‌های استافیلوکوکوس نیز می‌توانند در تولید آنها نقش داشته باشند (Anvari *et al.*, 2008; Monday *et al.*, 1999). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی سوپرآنتی‌ژن و دارای قابلیت تحریک کلون‌های بسیاری از لنفوسیت‌های T بوده و منجر به تولید سایتوکاین‌ها می‌گردند. سایر توکسین‌های باکتری باعث تجزیه پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها جهت تأمین مواد مورد نیاز، مقاومت در برابر داروها، بقاء و تشدید بیماری‌زایی باکتری می‌گردند. ابهامات زیادی در خصوص مکانیسم مولکولی بیماریزایی *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد، زیرا این باکتری‌ها به طور هم زمان توکسین‌های متعددی از انتروتووکسین‌ها (SE)، توکسین سندروم شوک سمی TSST-1 توکسین فلسی شدن پوست و انواع سیتوتوکسین‌ها را تولید می‌کند. در حال حاضر ۲۰ نوع مختلف انتروتوکسین استافیلوکوکی شناخته شده است که ۵ نوع آن شایع تر هستند و انواع SEA و SEB از جمله آنها می‌باشند (Imani-Fooladi *et al.*, 2010).

استافیلوکوکوس اورئوس در دامنه وسیعی از تغییرات دمایی و pH رشد می کند لذا ممکن است در طیف گسترده ای از مواد غذایی حضور داشته و رشد نماید. همچنین مواد غذایی که با جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین آلوده شده باشند، اگر در شرایط نامناسب سردخانه‌گذاری شوند می‌توانند منبع شیوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی باشند. بنابراین همکاری اپیدمیولوژیست ها، میکروبیولوژیست‌ها، کارشناسان دامپزشکی و بهداشت مواد غذایی با همدیگر به منظور کاهش مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی ناشی از انتروتوکسین‌های این باکتری یک پیش نیاز برای تحقق سلامت عمومی است.

در دهه‌های اخیر شیوع بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده همواره یکی از مشکلات مطرح در سراسر جهان بوده است و هر ساله هزینه‌های زیادی صرف درمان بیماری‌های مربوطه می گردد.

شیرینی‌های‌تر به‌علت مواد تشکیل دهنده و شرایط ساخت و نگهداریشان امکان زیادی برای آلوده شدن به انواع میکروب‌ها را دارند. منشا این آلودگی می‌تواند عوامل مختلف مانند دست کارگران، مواد اولیه مانند شیر یا وسایل کار باشد. دستکاری و آلودگی به‌وسیله استافیلوکوکوس‌های پوستی در مراحل مختلف تهیه، عامل مهم آلودگی به توکسین استافیلوکوکوس در این ماده غذایی است (Carrol *et al.*, 2016; Mirzabeygi *et al.*, 2008).

با توجه به مطالب فوق و همچنین بالا بودن تقاضا برای عرضه شیرینی‌های خامه‌ای و افزایش تعداد قنادی‌ها و سایر مراکز عرضه این محصول غذایی و خطر بالقوه ایجاد مسمومیت‌های غذایی از این طریق و نیز کمبود پیشینه تحقیقاتی منتشر شده در این رابطه هدف از تحقیق حاضر تعیین فراوانی موارد آلودگی به سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و واجد ژن انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در شیرینی‌های خامه‌ای عرضه شده در سطح شهرستان کرج بود.

مواد و روش‌ها

بررسی مشاهده‌ای – توصیفی حاضر در آزمایشگاه تحقیقات مولکولی گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد

www.SID.ir

Archive of SID

اسلامی واحد کرج بر روی شیرینی‌های خامه‌ای تهیه شده از ۵۰ شیرینی فروشی در شهرستان کرج، از اواسط مرداد ماه لغایت ابتدای بهمن ماه سال ۹۵ به انجام رسیده است.

پس از انتقال نمونه‌های شیرینی خامه‌ای به آزمایشگاه (یک نوبت نمونه‌گیری از هر شیرینی فروشی صورت گرفت و نمونه‌ها در اسرع وقت در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند) برای شناسایی گونه‌های استافیلوکوکوس‌ها و تفکیک *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر گونه‌ها از آزمایش‌های بیوشیمیایی و باکتری‌شناسی استفاده شد. پس از تهیه رقت‌های متوالی (یک دهم و یک صدم) شیرینی‌ها، بر روی محیط برد پارکر آگار (میکرومدیا)، کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌های سیاه رنگ واجد هاله انتخاب شدند. پس از رشد بر روی محیط بلاد آگار (داروش)، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد. پس از آزمون کوآگولاز، کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار (داروش)، صورت گرفت (Klevens *et al.*, 2007; Kateete *et al.*, 2010). سپس حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (پادتن طب)، به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید (Broekema *et al.*, 2009; Baddour *et al.*, 2007). DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (DNP^{TM}) و طبق دستور کار شرکت سازنده استخراج و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

واکنش PCR به منظور بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت به متی سیلین، تولید انتروتوکسین A در نمونه‌ها با استفاده از پرایمر های *mec_A, nuc* و *sea* انجام شد (Zhang *et al.*, 2004; Ryffel *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1998).

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC: 25923، به عنوان کنترل مثبت در واکنش‌های مولکولی و همچنین کشت استفاده شد.

پس از رقیق‌سازی پرایمرها، PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل اجزا زیر به انجام رسید:

در مرحله اول بررسی‌های مولکولی (Single PCR) جهت تشخیص الودگی نمونه‌ها به جنس استافیلوکوکوس PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن *nuc* انجام گردید سپس PCR با استفاده از پرایمرهای ژن های *mec_A* و *sea* بر روی نمونه‌های مثبت با مقادیر مشابه اجزاء(جدول ۲) در شرایط دمایی مندرج در جدول ۳ در ۳۵ چرخه انجام شد (Brakstad *et al.*, 1992; Adwan *et al.*, 2006).

جدول ۱- توالی پرایمرها

Gene	Primer	Oligonucleotides sequence	PCR product	Reference
nuc	*nuc* F	5′ GCGATTGATGGTGATACGGTT 3′	279 bp	Zhang *et al.*, 2004
	nuc R	5′ AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3′		
sea	*sea-3*	5′ CCTTTGGAAACGGTTAAAACG 3′	127 bp	Becker *et al.*, 1998
	sea-4	5′ TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC 3′		
mec_A	*mec*-A*1*	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA 3′ 5′	310 bp	Ryffel *et al.*, 1990
	*mec*_A*2*	5′ GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3′		

جدول ۲- حجم اجزاء مورد نیاز برای PCR

Components	Volume for Each Reaction (µl)
Master Mix (2X)	12.5
Universal Forward Primer	1(10Mmol)
Universal Reverse Primer	1(10Mmol)
DNA	1
dH_2O	9.5

جدول ۳ - پروفایل حرارتی فرایند PCR

Gene	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
nuc	95°C for 5 min	94°C for 40 second	55°C for 30 second	72°C for 30 second	72°C for 5 min
sea	95°C for 5 min	95°C for 40 second	55°C for 50 second	72°C for 50 second	72°C for 5 min
mec_A	94°C for 4 min	94°C for 45 second	50°C for 45 second	72°C for 1 min	72°C for 2 min

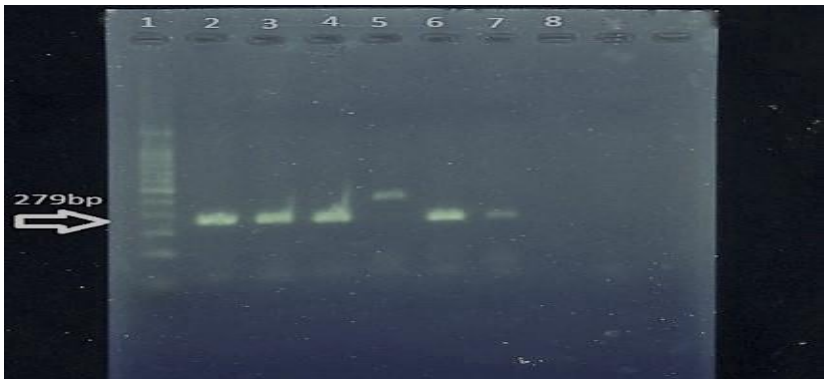
www.SID.ir

Archive of SID

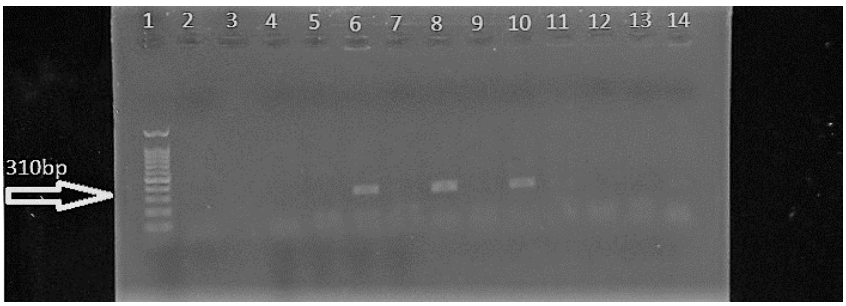
سپس تشکیل قطعه‌های مورد نظر در محصولات PCR در هر مرحله از واکنش‌های مولکولی به روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

یافته‌ها

در این تحقیق آلودگی به جنس استافیلو کوکوس با توجه به نتایج کشت برروی محیط برد پارکر آگار در ۴۱ نمونه (۸۲ درصد) مشاهده شد بر اساس نتایج کشت بر روی محیط بلاد آگار، ۱۰ نمونه دارای همولیز بتا بودند. ۱۴ نمونه بر روی محیط مانیتول سالت آگار رشد کردند. تست کاتالاز برای همه نمونه‌های رشد یافته در محیط برد پارکر مثبت و آزمون کوآگولاز برای ۸ نمونه مثبت گزارش شد. در این مطالعه، تمامی *جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد ژن *mec_A* بودند و همخوانی کاملی میان آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در این مورد وجود داشت. در مجموع، بر اساس نتایج کشت، ۸ نمونه از ۵۰ نمونه شیرینی خامه‌ای (۱۶٪)، دارای آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس بودند*. با استفاده از روش PCR، ژن *nuc*، در۱۴ نمونه (۲۸٪)، ژن *mecA* و ژن *sea* به ترتیب در ۵ نمونه (۱۰٪)، ۳ نمونه (۶٪) شناسایی گردیدند.



شکل ۱ – نتیجه الکتروفورز محصولات PCR ژن *nuc*. چاهک۱: مارکر bp ۱۰۰، چاهک۲: کنترل مثبت، چاهک ۳ ، ٤، ٦ و ۷: نمونه های مثبت(تشکیل قطعه ۲۷۹جفت بازی)،چاهک ۸: کنترل منفی



شکل ۲ – نتیجه الکتروفورز محصولات PCR ژن *mec-A*. چاهک۱: مارکر bp ۱۰۰،چاهک ۲ کنترل منفی، چاهکهای ۶،۸،۱۰: نمونه های مثبت (تشکیل قطعه ۳۱۰ جفت بازی)

شکل ۳ – نتیجه الکتروفورز محصولات PCR ژن *sea*. چاهک۱: مارکرbp ۱۰۰، چاهک۲: کنترل مثبت، چاهک۳: کنترل منفی، چاهکهای ۹،۱۳ و ۱٤: نمونه هایِ مثبت (تشکیل ۱۲۷ جفت بازی)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل میکروبی مسمومیت‌های غذایی در بسیاری از کشورها شناخته شده است (Jay *et al.*, 2007). این باکتری دارای توکسین‌های متعددی است که در بین آنها انتروتوکسین‌ها از اهمیت بالاتری برخوردار بوده ومصرف غذاهای آلوده به این توکسین‌ها باعث ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی پروتئین‌های خارج سلولی تک زنجیری با وزن مولکولی پایین (۲۲-۲۹ کیلو دالتون) می‌باشند که از نظر فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده ولی از نظر آنتی‌ژنی با هم تفاوت دارند. این توکسین ها ۲۳ نوع مختلف دارند که باعث ایجاد تهوع، استفراغ، اسهال، دردهای عضلانی و شکمی و گاهی نیز منجر به مرگ می‌شوند. برای شناسایی این سموم، روش‌های مختلفی وجود دارد. به دلیل شباهت‌های آنتی‌ژنیک (واکنش متقاطع) در بین انواع مختلف انتروتوکسین‌ها، روش‌های ایمونولوژیک در بسیاری از موارد، از ویژگی بالایی برخوردار نیستند (Edwin *et al.*, 1986). در مقابل، روش‌های تشخیصی مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک مانند PCR و Real time-PCR، با تشخیص ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین‌ها می‌توانند سویه‌هایی را که میزان تولید سموم آنها پایین بوده و روش‌های ایمونولوژیک قادر به ردیابی آنها نمی‌باشند تشخیص دهند و به همین دلیل از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردارند و می توانند در کنار سایر روش‌ها در تشخیص و پیشگیری از مسمومیت‌ها مؤثر باشند (Cremonesi *et al.*, 2005; Najera-Sanchez *et al.*, 2003).

نکته حائز اهمیت دیگر در ارتباط با تشخیص مولکولی آلودگی به استافیلوکوک‌ها در مواد غذایی این است که نتایج مثبت این روش‌ها در شناسایی خود باکتری به دلیل عدم امکان تفکیک جرم زنده و جرم ازبین رفته در اثر روش‌های مختلف اعمال حرارت در روند تولید و فراوری (پاستوریزاسیون، طبخ و...) فاقد اعتبار دایمی هستند، در حالیکه مقاومت حرارتی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در محدوده ۱۰۰ درجه سیلسیوس به مدت طولانی، نتایج مثبت روش‌های مولکولی را به تنهایی در تشخیص و شناسایی ژن‌های کدکننده و آلودگی به توکسین‌های مذکور در مواد غذایی حرارت دیده ارزشمند و معتبر می‌سازد.

فولادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران، در مطالعه ۱۰۰ نمونه مواد لبنی با روش PCR دریافتند که ۳۲٪ از نمونه‌ها واجد *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و فراوانی ژن *sea* در میان این جدایه‌ها ۱۵/۶٪ بود که در این مطالعه فراوانی ژن *sea* ۶٪ بود (Imani Fooladi *et al.*, 2010).

Holeckova و همکاران در سال ۲۰۰۲ در اسلواکی در بررسی نمونه‌های مواد غذایی و تولیدکنندگان مواد غذایی مختلف توانستند ۲۰ جدایه (۳۹٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد سم را شناسایی نمایند. سه جدایه مولد انتروتوکسین A، ۱۲جدایه مولد انتروتوکسین B و ۵ جدایه نیز مولد هر دو سم بودند با توجه به این مطالعه میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* دو برابر بوده است اما در این مطالعه آلودگی سویه‌های مقاوم به متی سیلین بیشتر است و این نیز خطر جدی محسوب می‌شود.

Anunciacao و همکاران در طی سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۹۰ نیز در برزیل، مسمومیت های غذایی متعددی ناشی از مصرف کیک‌های خامه‌ای در اثر آلودگی *با استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. نتایج بررسی این محققان نشان داد که بیش از۵۰٪ شیرینی های خامه ای که در دمای اتاق نگهداری می شدند با انجام آزمون های بیوشیمیایی، آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (Akineden *et al.*, 2008).

Desai و Kamat در سال ۱۹۹۸ در هند، به دنبال مسمومیت‌های متعدد ناشی از مصرف نان‌های خامه‌ای و سایر مواد غذایی با روش کشت آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را در ۷۳٪ از نمونه‌های مورد آزمایش گزارش نمودند که بیشترین آلودگی مربوط به نان‌های خامه‌ای و غذاهای دریایی بود.

Ertas و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ترکیه، در ۵۷٪ از ۱۵۰ نمونه لبنی مورد بررسی با استفاده از تکنیک Multiplex PCR (mPCR)، الودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش کردند

نتایج بررسی توسط Adwan و همکاران در سال ۲۰۰۶ در شمال فلسطین بر روی ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی لبنی نشان داد ۳۷٪ نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده، با روش PCR دارای ژن‌های انتروتوکسین

www.SID.ir

Archive of SID

هستند، ولی هیچ کدام از آنها بیش از یک ژن نداشتند (Bystronj *et al.*, 2006).

در مطالعه انجام شده توسط Normanno در طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ در ایتالیا بر روی ۱۶۳۴ فرآورده گوشتی و لبنی مختلف از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* با انجام PCR، ۱۲/۸ درصد مواد غذایی آلوده بودند و این میزان در میان مواد لبنی بالاتر (۱۷ درصد) گزارش شده است (Normanno *et al.*, 2007).

در مطالعه Nikniaz و همکاران در سال 2011 در تبریز، بار میکروبی ۱۶۰ شیرینی خامه‌ای عرضه شده در ۸۰ قنادی را با روش کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی بررسی کردند. نتایج نشان داد که آلودگی ۳۸/۸ درصد از نمونه‌ها به کلی فرم‌ها، ۴۸/۸ درصد به اشرشیاکلی، ۳۱/۲ درصد به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲۷/۵ درصد به کپک و ۷۰ درصد به مخمر بیش از استانداردهای تعیین شده بود که در واقع آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای به *استافیلوکوکوس اورئوس* دو برابر مطالعه حاضر بود.

در مطالعه Shadan و همکاران در سال 2007 در زاهدان، میزان آلودگی خامه استفاده شده در تهیه شیرینی‌ها به *استافیلو کوکوس اورئوس* ۵۳/۸۳ درصد بود و نشان داده شده است که اگر خامه مصنوعی در دمای اتاق نگهداری گردد بعد از ۴۸ ساعت میزان کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به 10^6 می‌رسد که این میزان از باکتری می‌تواند منجر به تولید مقدار کافی انتروتوکسین جهت ایجاد مسمومیت گردد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که فراورده‌های حاوی خامه دارای پتانسیل بالایی برای آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند. اگرچه خامه‌های مصنوعی دارای مواد مغذی کافی برای حمایت از رشد باکتری‌ها نمی‌باشند اما با این حال آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به دنبال تماس نان و خامه اتفاق بیفتد. آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به دلیل آلودگی میکروبی مواد اولیه مصرفی از قبیل خامه، عدم رعایت بهداشت فردی توسط کارگران مربوطه و آلودگی میکروبی وسایل و ظروف تهیه و تولید شیرینی باشد.

نتایج مطالعه Soltan Dallal و همکاران در سال 2010 در تهران، بر روی ۱۲۱ نمونه شیرینی تر از مراکز عرضه و توزیع شیرینی در جنوب تهران با کشت و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که ۷۳ درصد از نمونه‌های مورد بررسی دارای آلودگی میکروبی و غیر قابل مصرف بودند، که ۱۲٪ از نمونه‌های شیرینی، به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند که در این مطالعه با توجه به نتایج کشت آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۶ درصد بود

Hosseini Jazani و Zartosht در سال 2012 در ارومیه میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرینی‌های خامه‌ای و خشک را مقایسه و گزارش کردند، بر اساس نتایج کشت و آزمون‌های میکروبی ۱۱ درصد نمونه‌ها به این باکتری آلوده بودند و درصد الودگی در شیرینی‌های خامه ای به طور قابل ملاحظه بود. به طورکلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که مصرف شیرینی‌های خامه‌ای، احتمال انتقال آلودگی به استافیلوکوکوس‌های انتروتوکسیژنیک را نسبت به شیرینی‌های خشک افزایش می‌دهند چرا که خامه به‌دلیل ایجاد شرایط مغذی و رطوبت مناسب، محیط مناسبی برای رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها بخصوص در فصل گرم است.

Rosec و Gigaud در سال ۲۰۰۱ در فرانسه، مطالعه‌ای را با هدف شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی (SEA، SEB، SEC، SED و SEE) و انتروتوکسین‌های SEJ، SHE، SEG و SEI روی ۱۵۹ نمونه مواد غذایی مختلف از جمله پنیر، گوشت خام و پخته شده خوک، شیرینی، گوشت چرخ کرده، بستنی و سمولینای ذرت انجام دادند. از کل نمونه‌های بررسی شده، ۳۳۲ جدایه استافیلوکوکی جداسازی و به لحاظ وجود ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی مورد آزمایش قرار دادند. آنها نشان دادند که ۵۷٪ از سویه‌ها دارای ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی بودند که غالبا از نوع انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی بوده است.

در توجیه اختلاف در فراوانی موارد آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرینی‌های خامه‌ای در تحقیقات پیشین و بررسی حاضر علاوه بر میزان رعایت اصول بهداشت فردی و نیز استانداردهای مربوط به مراحل طبخ، شرایط نگهداری شیرینی‌های آماده، نوع، نسبت و بار میکروبی اولیه خامه مورد استفاده می‌توان به تفاوت در روش‌های بررسی و حساسیت آنها اشاره کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

نکته دیگر اینکه با وجود کاهش نسبی درصد آلودگی به استافیلوکوک‌ها در سالیان اخیر در مقایسه با نتایج تحقیقات به عمل آمده در دهه‌های گذشته که به دلایل مختلف از جمله افزایش سطح رعایت موازین بهداشتی و استانداردهای تدوین شده در مراکز تهیه و توزیع شیرینی‌های خامه‌ای بوده، افزایش درصد سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) حتی در جدایه‌های با منشاء جامعه (Community Acquired) آلودگی به استافیلوکوک‌ها به ویژه *استافیوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در مواد غذایی را حتی با فراوانی کمتر در مقایسه با گذشته، به عنوان تهدیدی قابل توجه مطرح می‌سازد. در تحقیق حاضر نیز بیش از ۳۰ درصد جدایه‌های استافیلوکوکوس بر اساس نتایج کشت و روش مولکولی مقاوم به متی‌سیلین تشخیص داده شدند.

نظر به اینکه در این تحقیق نمونه‌های شیرینی خامه‌ای از مناطق مختلف کل شهرستان کرج به صورت تصادفی جمع‌آوری گردیدند و با توجه به درصد قابل توجه الودگی و نیز مقاومت به متی‌سیلین و حضور ژن *sea* در نمونه‌ها میتوان مصرف نان‌های خامه‌ای الوده را با خطر بالقوه ایجاد مسمومیت‌های استافیلوکوکی همراه دانست. نکته مهم دیگر در ارتباط با نتایج این تحقیق فرضیه حضور بیشتر ژن *sea* در سویه‌های مقاوم به متی سیلین می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بطورکلی از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی به سویه‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرینی‌های تر به عنوان یک هشدار جدی در رابطه با بهداشت عمومی مطرح است لذا می‌بایست با بکارگیری تمهیدات مناسب میزان آلودگی را دراین ماده غذایی به حداقل کاهش داد. اگر چه در ایران مطالعات متعدد دیگر در خصوص شناسایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین و همچنین ردیابی ژن‌های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های مختلف مواد غذایی صورت گرفته است. ولی با این وجود استانداردهای مطرح و راه کارهای ارائه شده برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و بروز مسمومیت چندان مورد توجه نبوده است. بنابراین پیشنهاد می‌گردد رعایت بهداشت فردی در هنگام آماده‌سازی شیرینی در تمام مراحل و نیز اصول بهداشتی در برداشت، چینش و بسته بندی شیرینی های تر به ویژه نان خامه‌ای همچنین تولید حمل و نگهداری جعبه‌های مورد استفاده در عرضه شیرینی، مدنظر باشد. همچنین ارتقاء سطح آگاهی بهداشتی افراد دخیل در توزیع این فراورده‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پاستوریزه کردن و نگهداری مواد لبنی در یخچال، کنترل میکروبی مداوم شیرینیجات و غربالگری موارد آلودگی کارکنان تهیه کننده‌ی آنها، همچنین نمونه‌برداری از خامه‌های مورد استفاده در تهیه این شیرینی‌ها، کنترل بار میکروبی انها و نیز توجه به شرایط حمل و نگهداری انها میتواند خطر ایجاد مسمومیت‌های استافیلوکوکی از این طریق را به حداقل برساند.

سپاسگزاری

از همکاری خانم صبوری کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و خانم اسدی کارشناس آزمایشگاه تحقیقات مولکولی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج قدردانی می‌شود.

منابع

Adwan, GH., Abu-Shanab, B. & Adwan, K. (2006). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestine. Turkish Journal of Biology, 29, 229-232.

Akineden, O., Hassan, AA., Schneider, E. & Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 124 (2), 211-6.

Anvari, SH., Sattari, M., Forozandeh Moghadam, M., Najarpeerayeh, SH. & Fouladi, I. (2008). Detection of *staphylococcus aureus* entrotoxin A to E from Clinical sample by PCR. Research Journal of Biological Sciences, 3, 826-829.

Aydin, A., Sudagidan, M. & Muratoglu, K. (2011). Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International Journal of Food Microbiology, 148 (2), 99-106.

Baddour, M., AbuElKheir, M. & Fatani, G. (2007). Comparison of mecA polymerase

www.SID.ir

Archive of SID

chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. Current Microbiology, 55 (6), 473-479.

Becker, K., Roth, R. & Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene Journal of Clinical Microbiology, 36, 2548–2553.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K. & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology, 30, 1654-1660.

Broekema, N., Van, T., Monson, T., Marshall, S. & Warshauer, D. (2009). Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of mecA-mediated resistance in *staphylococcus aureus* in a large-scale study Journal of Clinical Microbiology, 47 (1), 217-219.

Bystronj Bania, J., Zarczynska, A., Korzekwa, K., Molenda, J. & Kosek-paszkowska, K. (2006). Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Strains Using a Commercial ELISA and Multiplex-PCR. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 50(50), 329-333.

Carrol, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. & Detrick, B. (2016). Jawetz-Melnick, & Adelberg, s Medical Microbiology. New York, McGraw Hill.

Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R. & Vimercati, C. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products: Molecular and Cellular Probes, 19(5), 299-305.

Desai, B. & Kamat, M. Y. (1998). Recovery and characterization of entrotoxigenic strains of staphylococci and microbiological quality of processed Indian foods. Journal of Food Science Technology, 35, 461-465.

Edwin, C., Tatini, S. R. & Maheswaran, S. K. (1986). Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C1, D, and E. Applied and Environmental Microbiology, 52(6), 1253-7.

Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y. & Kum, E. (2010). Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins in Sheep Cheese and Dairy Desserts by Multiplex PCR Technique. International Journal of Food Microbiology, 15, 142(1-2):74-77.

Holeckova, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalinacova, V., Gondol, J. & Grolmus, J. (2002). Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 9, 179-182.

Hosseini Jazani, N. & Zartosht, M. (2012). Determination of the Rate of methicillin resistant and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in different kinds of creamy pastries sold in pastry shops in Urmia. Proceedings of the 13th Iranian and 2nd International Congress of Microbiology, 14-16. [In Persian].

Imani-Fooladi, A. A., Riazipour, M. & Sattari, M. (2010). Molecular and serological detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. Journal Shahrekord University of Medical Sciences, 11(4), 19-27. [In Persian].

Imani Fooladi, A. A., Tavakoli, H. R. & Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2, 135-40. [In Persian].

Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2007). Modern food microbiology. 7 ed: Springer Science & Business Media.

Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S. & Nanteza, A. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 9(1):23.

Klevens, R., Morisson, M., Nadle, J. & Petit, S. (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. Journal of the American Medical Association, 298, 15-20.

Mirzabeygi, P. F., Rahbar, M., Arasteh, H., Faramarzi, T., Razavi Afzal, A. & Ahmadi, A. (2008). Study of *Staphylococcus auraus* contamination in dairy and confectionery products from west of tehran., 9th Iranian congress of microbiology. [In Persian].

Monday, S. R., Bohach, G. S. & Clin, J. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin

www.SID.ir

Archive of SID

genes in Staohylococcal isolates, Journal of Clinical Microbiology, 37(10), 3411.

Najera-Sanchez, G., Maldonado-Rodriguez, R., Ruiz Olvera, P. & Garza, LM. (2003). Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods: Journal of Food Protection, 66(6), 1055-62.

Nikniaz, Z., Mahdavi, R., Jalilzadeh, H. & Vahed Jabbari, M. (2011). Evaluation of microbial contamination in cream filled pastries distributed in Tabriz confectionaries. Journal of Nutrition and Food Technology, 8(1), 66-71. [In Persian].

Normanno, G. La., Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M. & Parisi, A. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115(3), 290-296.

Rosec, J. & Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. International Journal of Food Microbiology, 77, 61-70.

Ryffel, C., Tesch, W., Birch-Machin, I., Reynolds, P. E., Barberis-Maino, L. & Kayser, F. H. (1990). Sequence comparison of mecA genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Gene, 94(1), 137-138.

Shadan, M., Khoshabi, F., Shahraki, M. & Safari, F. (2007). The evaluation of microbial quality of cream filled pastries in Zahedan confectioneries. Jundishapur Journal of Public Health, 1, 84-87.

Soltan Dallal, MM., Fazelifard, P., Tabatabaei Bafroei, A., Rashidi, S. & Zarrin, M. (2010). Determination the rate of microbial contamination of cream pastry from confectionaries in south of Tehran. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2(6), 7-11.

Zhang, K., Sparling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z. & Church, D. L. (2004). New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Microbiology, 42(11), 4947-4955.

www.SID.ir

Archive of SID

Food Technology & Nutrition / Summer 2019 / Vol. 16 / No. 3

Molecular Detection of Methicillin Resistant Enterotoxin a Producing *Staphylococcus aureus* in Profiteroles in Karaj in 2016

M. Makvandi [a], N. Harzandi [b*]

[a] M. Sc. Student of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

[b] Assistant Professor of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received: 17 November 2017 Accepted: 14 February 2018

Abstract

Introduction: Staphylococcal enterotoxins are members of a family of more than 20 different staphylococcal and streptococcal exotoxins that are functionally related and share corresponding gene sequence homology. These bacterial proteins are known to be mitogen and are responsible for significant human diseases including food poisoning. The aim of this study was to detect the enterotoxin A producing *Staphylococcus aureus* in profiteroles.

Materials and Methods: Sampling was carried out from 50 confectionaries in Karaj from mid-August 2016 to February 2017. Serial dilutions from each sample were prepared and cultured on Baird parker agar. After 48 hours incubation at 37ºC, black colonies were selected. Following transfer to blood agar, susceptibility of isolates to oxacillin was determined using disc diffusion method and presence of *nuc*, *mecA* and *sea* genes was checked using PCR.

Results: In total, based on culture results 8 out of 50 samples (16%) had *Staphylococcus aureus* contamination. PCR method results showed the presence of *nuc* gene in 14 (28%) of the samples, *mecA* gene and *sea* gene in 5 (10%), 3 (6%) of the samples respectively.

Conclusion: Remarkable frequency of enterotoxin A producing MRSA isolates in different foods and specially profiteroles as an enrichment medium for growth and toxin production of bacteria, is a warning for public health.

***Keywords**: Enterotoxin A, MRSA, Mec gene, Nuc gene, Profilteroles, Sea gene.*

* Corresponding Author: naser.harzandi@kiau.ac,ir

علوم غذایی و تغذیه/ تابستان ۱۳۹۸/ سال شانزدهم / شماره ۳

www.SID.ir