# مطالعه فراوانی ژن های کد کننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های سبزیجات و سالاد در استان چهارمحال و بختیاری

**منوچهر مومنی شهرکی[1*]، امیر شاکریان[2]، ابراهیم رحیمی[2]، فرهاد صفرپور دهکردی[3]**

۱. کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Momeniman@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

## چکیده

*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکی از اصلی‌ترین عوامل نوظهور ایجاد کننده مسمومیت‌های غذایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در انسان است. باکتری همچنین توانایی تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت را دارد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی میزان شیوع، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد انجام پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۴۸۵ نمونه سبزیجات و سالاد جمع‌آوری و سریعا به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از کشت میکروبی استفاده و سوش های مقاوم به متی سیلین با استفاده از دیسک های سفوکسیتین و اگزاسیلین تایید شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین به ترتیب با استفاده از روش های انتشار دیسکی و PCR ارزیابی شدند. میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های سبزیجات و سالاد به ترتیب ۷/۲ و ۸/۵۱ درصد بود. سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتی‌راکسون (۱۰۰ درصد) داشتند. شیوع مقاومت برعلیه ایمی‌پنم (۱۰/۵۲ درصد) و کلرامفنیکل (۲۳/۶۸ درصد) کمتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بود. فراوان‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، *SEA* (۶۳/۱۵ درصد) و *SEB* (۵۲/۲۶ درصد) بودند. حضور همزمان چند ژن کد کننده انتروتوکسین و مقاومت چندگانه برعلیه چندین آنتی‌بیوتیک در سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد نشان دهنده بروز یک مشکل بهداشتی عمده در این دسته از مواد غذایی است. جلوگیری از تجویز بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می تواند خطر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انتروتوکسین زا را در سبزیجات و سالاد کاهش دهد.

**کلید واژه ها:** *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، انتروتوکسین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سبزیجات، سالاد.

## مقدمه

امروزه مصرف سبزیجات و سالاد بیش از پیش مورد توجه تمامی اقشار جامعه قرار گرفته است. با این وجود، تماس مستقیم سبزیجات با کودهای حیوانی و انسانی، آب‌های آلوده مورد استفاده برای آبیاری آن‌ها و خاک که بستری از انواع میکروارگانیسم هاست، سبب شده است تا این گروه از مواد غذایی به عنوان یک فاکتور مهم برای ابتلا مصرف کنندگان به انواعی از بیماری‌های غذازاد باشند. سالادهای تولید شده در انواع رستوران ها نیز به دلیل استفاده از مواد اولیه با کیفیت بهداشتی پایین و همچنین عدم رعایت بهداشت فردی در تهیه آن‌ها، می توانند منبع مناسبی برای انتقال میکروارگانیسم های بیماری‌زا به انسان باشند (Kluytmans, 2010).

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و همچنین دلیل بروز اکثر مسمومیت‌های غذایی در جوامع محسوب می شود



www.SID.ir

Archive of SID

(Kluytmans, 2010). *استافیلوکوکوس‌اورئوس* یک باکتری کوکسی شکل، گرم مثبت، هوازی بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و مهم‌ترین گونه از جنس استافیلوکوک است. علاوه بر عفونت‌های پوستی، عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، اندوکاردیت، پنومونی و سندرم شوک‌سمی (Barber et al., 1948)، *استافیلوکوکوس‌اورئوس* عامل بروز مسمومیت غذایی با دوره کمون کوتاه ۲ تا ۴ ساعته و علائم تهوع، استفراغ، دل پیچه و ضعف، می‌باشد، هر چند که اسهال نیز در پاره‌ای از موارد گزارش شده است (Kadariya, 2014). دلیل اصلی دوره کمون کوتاه بیماری، خوردن سم از قبل تولید شده در ماده غذایی است (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). به عبارت دیگر انتروتوکسین‌های باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (شامل انتروتوکسین های A-E، G-R و U) با تاثیر روی گیرنده‌های موجود در روده موجب ایجاد پاسخ استفراغ در فرد می گردند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). در اصل گیرنده‌های تحریک شده توسط انتروتوکسین از طریق اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک موجب تحریک مرکز استفراغ در مغز می شوند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). هنوز مکانیسم اصلی ایجاد اسهال توسط انتروتوکسین‌ها به خوبی شناسایی نشده است اما تحقیقات نشان داده اند که انتروتوکسین‌ها فعالیت آدنیلات سیکلاز را تحریک نمی‌کنند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). بررسی‌های متفاوت نشان می دهند که در موارد شیوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، کمتر از یک میلی گرم سم خالص جهت ایجاد علائم بیماری کفایت می کند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). انتروتوکسین‌ها از پلی پپتیدهای کوچک تک رشته‌ای تشکیل شده‌اند و هر یک از آن‌ها دارای یک حلقه دی سولفیدی نزدیک به مرکز مولکول می‌باشد (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). به دلیل ساختمان فشرده، این انتروتوکسین‌ها نسبت به حرارت و پروتئازهای روده مقاوم هستند و تنها در اثر جوشیدن طولانی مدت غیر فعال می‌شوند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). در نتیجه این امکان وجود دارد که فردی در اثر مصرف مواد غذایی عاری از سلول‌های زنده *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، دچار بیماری شود (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018).

یکی از راهکارهای درمانی برای موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌هاست اما متاسفانه تجویز نامناسب و بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی و پزشکی سبب ایجاد سوش‌های مقاوم *استافیلوکوکوس‌اورئوس* شده است (Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019). در سال ۱۹۴۰ بعضی از سوش‌های استافیلوکوک به پنی‌سیلین مقاوم شدند . یک دهه بعد سوش‌های مقاوم چندگانه به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین گزارش شد( Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019). برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد. گزارشات نشان داده است که سویه‌های MRSA از حدت بالاتری برخوردار هستند و معمولا مقاومت بیشتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پنی‌سیلین‌ها، تتراسایکلین‌ها، آمینوگلایکوزیدها، سفالوسپورین‌ها، کوئینولون‌ها و ... دارند (Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019).

با توجه به مصرف بالای سبزیجات و سالاد، تماس مستقیم سبزیجات با خاک آلوده، آب و کودهای حیوانی و بعضا انسانی، اهمیت غذازاد بودن *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، شیوع بالای آن در موارد مسمومیت‌های غذایی و در نهایت با توجه به فقدان مطالعات میکروبیولوژیک، اپیدمیولوژیک و بهداشتی در


www.SID.ir

زمینه *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در سبزیجات و سالاد، بررسی حاضر را به منظور مطالعه میزان شیوع، الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد انجام پذیرفت.

**روش کار**

نمونه‌گیری و انتقال به آزمایشگاه

مطالعه حاضر کاربردی و از نوع توصیفی[1] و مقطعی[2] می‌باشد. در این مطالعه جامعه آماری نمونه‌های سبزیجات جمع‌آوری شده از میوه‌فروشی‌های سطح استان چهارمحال‌و بختیاری و در مورد نمونه‌های سالاد، نمونه‌های سالاد تولید شده در رستوران‌های سطح استان چهارمحال‌و بختیاری بودند. نمونه‌های مطالعه حاضر در بهار سال ۱۳۹۶ در طول ۳ ماه جمع‌آوری شدند.

روش نمونه‌گیری در مطالعه حاضر، نمونه‌گیری تصادفی ساده بود. نمونه های سبزیجات و سالاد از نظر ظاهری و فیزیکی (رنگ و قوام) سالم بودند. نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل (به دور از امکان ایجاد آلودگی متقاطع در زمان نمونه‌گیری) و در روز نمونه‌گیری در مدت ۲ ساعت در یخچال حاوی یخ و در دمای حدود ۴ درجه سلسیوس به مرکز تحقیقات بهداشت موادغذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال داده شدند. تعداد نمونه‌ها با توجه به میانگین شیوع حدود ۳۵ درصدی *استافیوکوکوس‌اورئوس* ذکر شده در مطالعات پیشین در موادغذایی با استفاده از فرمول زیر مجموعا ۴۸۵ نمونه شامل ۲۵۰ نمونه از انواع سبزیجات و ۲۳۵ نمونه سالاد سنتی، بود.

$$n = z^2 \frac{pq}{d^2}$$

$$n = (1.96 \times 1.96) \times \frac{0.35 \times 0.65}{0.043 \times 0.043} = 472.66 = 485$$

جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌ها

به منظور جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* از نمونه‌های سبزیجات و سالاد، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت Tryptic Soy Broth (مرک، آلمان) غنی شده با ۱۰ درصد نمک کشت داده شدند و به مدت ۱۸ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس کلنی‌های رشد یافته در محیط Tryptic Soy Broth به محیط Baird Parker Agar (مرک، آلمان) غنی شده با امولسیون تلوریت-زرده تخم مرغ انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. کلنی های سیاه رنگ با هاله رسوبی در اطراف به عنوان کلنی‌های تیپیک برای باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در نظر گرفته شد و با تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، O/F، اوره آز، فسفاتاز، کوواگولاز، DNase و تخمیز مانیتول مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

برای این منظور تمامی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس-اورئوس* جدا شده از سبزیجات و سالاد از نظر مقاومت نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اگزاسیلین (۱ میکروگرم) (Oxoid, UK) ارزیابی در محیط کشت مولرهینتون آگار (Merck, Germany) ارزیابی شدند و ایزو له‌هایی که به صورت همزمان نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند، به عنوان جدایه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند (Wu et al., 2019).

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه-های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

1_ Description

2_ Cross sectional


www.SID.ir

Archive of SID

سبزیجات و سالاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین (30 µg/disk)، اریترومایسین ( 5 µg/disk)، کلرامفنیکل، کوآموکسی‌کلاو، ایمی‌پنم، کوتریموکسازول، ریفامپین (30 µg/disk)، پنی‌سیلین، سفتی‌راکسون، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، متی-سیلین (10 µg/disk) و آمپی‌سیلین (10 µg/disk) (Oxoid, UK)، از روش دیسک‌گذاری در محیط مولر-هینتون آگار (Merck, Germany) و با توجه به دستورالعمل انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی، استفاده شد ( Clinical and LaboratoryStandards Institute,2012). پس از گرم‌خانه گذاری *هوازی* کلنی‌های جداسازی شده در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به وسیله روش ارائه شده توسط انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی، مورد بررسی قرار گرفت. ( Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) از باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ATCC 10392 به منظور کنترل در بررسی مقاومت آنتی-بیوتیکی استفاده شد.

استخراج DNA و ارزیابی حضور ژن‌های کدکننده انتروتوکسین

به منظور استخراج DNA از کشت یک شبه باکتری در محیط Brain Heart Infusion (مرک، آلمان) استفاده شد. برای این منظور سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت BHI گرم‌خانه‌گذاری شدند. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت مورد نظر، استخراج شد. سپس نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، قرار داده شد.

به منظور ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین از تکنیک PCR استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین جداش ده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد ( Młynarczyk et al., 1998; Jay et al., 2000; Seo and Bohach, 2013; Tong et al., 2015).

| انتروتوکسین | توالی پرایمر ('3-'5) | اندازه محصول (bp) | منابع |
|---|---|---|---|
| *SEA* | F:TTGGAAACGGTTAAAACGAA<br>R:GAACCTTCCCATCAAAAACA | ۱۲۰ | ۴۰ |
| *SEB* | F:TCGCATCAAACTGACAAACG<br>R:GCAGGTACTCTATAAGTGCC | ٤٧٨ | ۴۰ |
| *SEC* | F:GACATAAAAGCTAGGAATTT<br>R:AAATCGGATTAACATTATCC | ۲٥۷ | ۴۰ |
| *SED* | F:CTAGTTTGGTAATATCTCCT<br>R:TAATGCTATATCTTATAGGG | ۳۱۷ | ۴۰ |
| *SEE* | F:AGGTTTTTTCACAGGTCATCC<br>R:CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC | ۲۰۹ | ۴۱ |
| *SEG* | F:AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC<br>R:AGAACCATCAAACTCGTATAGC | ۲۸۷ | ۴۲ |
| *SEH* | F:GTCTATATGGAGGTACAACACT<br>R:GACCTTTACTTATTTCGCTGTC | ۲۱۳ | ۴۲ |
| *SEI* | F:GGTGATATTGGTGTAGGTAAC<br>R:ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG | ٤٥٤ | ۴۲ |
| *SEJ* | F:CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG<br>R:CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC | ۱٤۲ | ۴۳ |

در تمامی واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (اپندورف، آلمان) استفاده شد. فرایند تکثیر ژن در ۲۵ میکرولیتر مخلوط شامل ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲۰۰


www.SID.ir

میکرومول dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر 10x (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱ میکرومول کلرید منگنز (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. جدول ۲ روند تکثیر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌ها را نشان می دهد.

جدول ۲- روند تکثیر ژن های کد کننده انتروتوکسین های استافیلوکوکی در آزمون PCR.

| ژن کد کننده انتروتوکسین | فرایند دمایی تکثیر |
|---|---|
| *SEA*<br>*SEB*<br>*SEC* | ۱ سیکل<br>۹۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۳۰ سیکل<br>۹۴ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه<br>۵۵ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۱ سیکل<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۷ دقیقه |
| *SED* | ۱ سیکل<br>۹۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۳۵ سیکل<br>۹۴ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه<br>۵۷ درجه سانتی گراد ۲ دقیقه<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۱ سیکل<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۷ دقیقه |
| *SEE* | ۱ سیکل<br>۹۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۳۰ سیکل<br>۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه<br>۵۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۱ سیکل<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه<br>۱ سیکل<br>۹۵ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۳۰ سیکل<br>۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۶۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه<br>۱ سیکل<br>۷۲ درجه سانتی گراد ۸ دقیقه |
| *SEG*<br>*SEH* | |
| *SEI* | |
| *SEJ* | |

در تمام واکنش‌های PCR، از آب مقطر فاقد DNA به عنوان کنترل منفی و از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 10357 و همچنین نمونه های DNA مثبت از نظر ژن های کد کننده انتروتوکسین ها عنوان کنترل مثبت، استفاده شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز می شوند، سپس ژل‌ها توسط سایبرگرین (فرمنتاز، آلمان) رنگ آمیزی خواهد


www.SID.ir

Archive of SID

شد و نوارهای DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری و توسط نرم افزار SPSS آنالیز شد. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود.

**نتایج**

در کل ۴۸۵ نمونه سبزیجات و سالاد از نظر حضور *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد، مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول ۳ فراوانی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را در نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، میزان شیوع *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری، ۱۴/۰۲ درصد بود. در کل ۴۰ نمونه از ۲۵۰ نمونه سبزیجات (۱۶ درصد) و ۲۸ نمونه از ۲۳۵ نمونه سالاد (۱۱/۹۱ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بودند. اختلاف معنادار آماری برای شیوع *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بین نمونه‌های سالاد و سبزیجات دیده شد ($P< 0.05$). از تعداد ۶۸ ایزوله *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، ۳۸ ایزوله (۵۵/۸۸ درصد) به طور همزمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اگزاسیلین مقاوم بودن و به عنوان سویه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند.

جدول ۳. فراوانی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری.

| نوع نمونه ها | تعداد نمونه جمع آوری شده | فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* (٪) | فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (٪) |
|---|---|---|---|
| سبزیجات | ۲۵۰ | ۴۰ (۱۶) | ۱۸ (۴۵) |
| سالاد | ۲۳۵ | ۲۸ (۱۱/۹۱) | ۲۰ (۷۱/۴۲) |
| کل | ۴۸۵ | ۶۸ (۱۴/۰۲) | ۳۸ (۵۵/۸۸) |

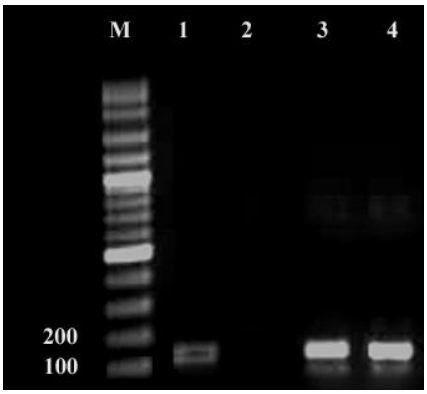
جدول ۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال‌وبختیاری را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، سویه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی-سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتی‌راکسون (۱۰۰ درصد) داشتند. کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه آنتی‌بیوتیک های ایمی‌پنم (۱۰/۵۲ درصد) و کلرامفنیکل (۲۳/۶۸ درصد) داشتند.شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه اریترومایسین، کوتریموکسازول، ریفامپین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به ترتیب ۷۳/۶۸، ۶۰/۵۲، ۴۴/۷۳ و ۷۱/۰۵ درصد بود. در کل سوش های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی-سیلین جدا شده از نمونه‌های سالاد مقاومت آنتی-بیوتیکی بیشتری نسبت به سوش‌های جدا شده از سبزیجات داشتند ($P<0.05$).


www.SID.ir

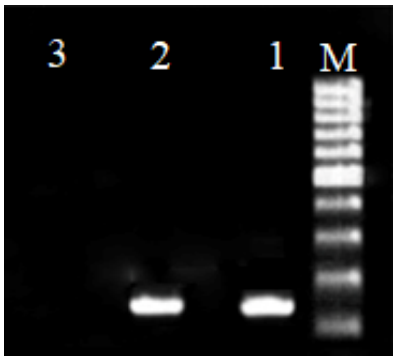
جدول ۴. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال‌وبختیاری.

| نوع نمونه ها (تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین) | شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی (٪) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | تتراسیکلین | اریترومایسین | پنی سیلین | کلرامفنیکل | کوآموکسی کلاو | ایمی پنم | کوتریموکسازول | ریفامپین | سفتی راکسون | تری متوپریم- سولفامتوکسازول | آمپی سیلین |
| سبزیجات (۱۸) | ۱۵ (۸۳/۳۳) | ۱۳ (۷۲/۲۲) | ۱۸ (۱۰۰) | ۴ (۲۲/۲۲) | ۱۸ (۱۰۰) | ۱ (۵/۵۵) | ۱۰ (۵۵/۵۵) | ۷ (۳۸/۸۸) | ۱۸ (۱۰۰) | ۱۲ (۶۶/۶۶) | ۱۸ (۱۰۰) |
| سالاد (۲۰) | ۱۷ (۸۵) | ۱۵ (۷۵) | ۲۰ (۱۰۰) | ۵ (۲۵) | ۲۰ (۱۰۰) | ۳ (۱۵) | ۱۳ (۶۵) | ۱۰ (۵۰) | ۲۰ (۱۰۰) | ۱۵ (۷۵) | ۲۰ (۱۰۰) |
| کل (۳۸) | ۳۲ (۸۴/۲۱) | ۲۸ (۷۳/۶۸) | ۳۸ (۱۰۰) | ۹ (۲۳/۶۸) | ۳۸ (۱۰۰) | ۴ (۱۰/۵۲) | ۲۳ (۶۰/۵۲) | ۱۷ (۴۴/۷۳) | ۳۸ (۱۰۰) | ۲۷ (۷۱/۰۵) | ۳۸ (۱۰۰) |

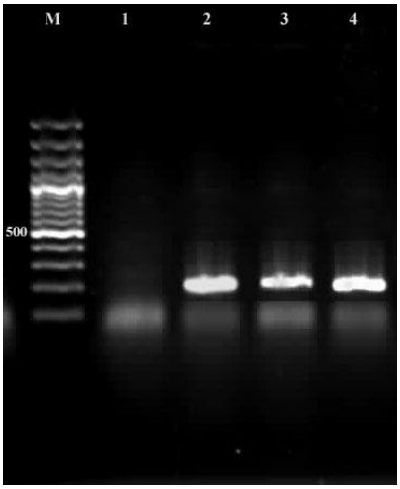
اشکال ۱ تا ۹ تصاویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن های کد کننده انتروتوکسین ها را نشان می دهد.



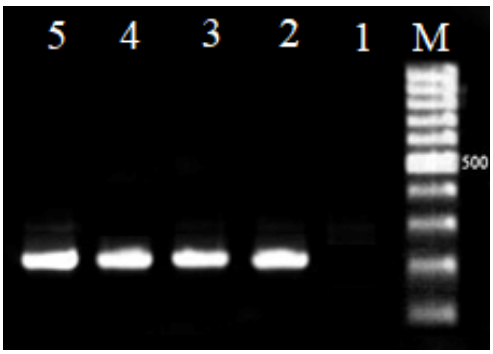

شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEA. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل مثبت، ۲: نمونه کنترل منفی، ۳ و ۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEA (۱۲۰ جفت باز).




شکل ۲. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل مثبت، ۲: نمونه مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ (۱۴۰ جفت باز) و ۳: نمونه کنترل منفی.




شکل ۳. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEE. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲: نمونه کنترل مثبت و ۳ و۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEE (۲۰۹ جفت باز).

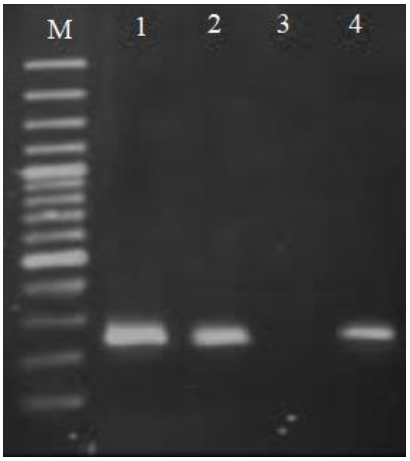



شکل ۴. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEH. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲-۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد

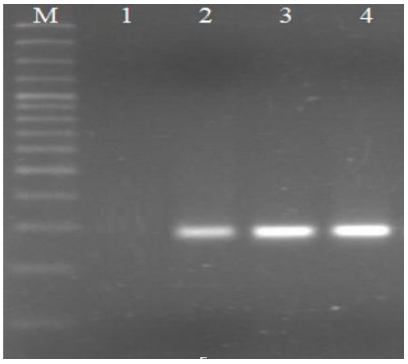

www.SID.ir

Archive of SID

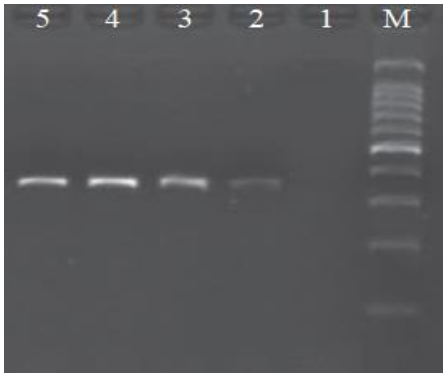
کننده انتروتوکسین SEH (۲۱۳ جفت باز) و ۵: نمونه کنترل مثبت.



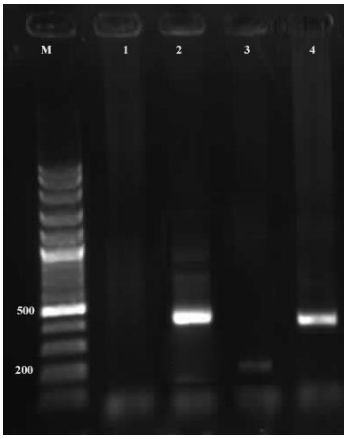

شکل ۵. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEC. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱ و ۲: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEC (۲۵۷ جفت باز)، ۳: نمونه کنترل منفی و ۴: نمونه کنترل مثبت.



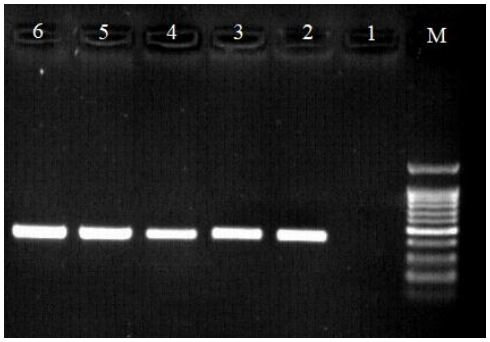

شکل ۶. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEG. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEG (۲۸۷ جفت باز)، ۴: نمونه کنترل مثبت.




شکل ۷. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SED. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲-۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SED (۳۱۷ جفت باز)، ۵: نمونه کنترل مثبت.




شکل ۸. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEI. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲: نمونه مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEI (۴۵۴ جفت باز)، ۳: نمونه منفی از نظر حضور ژن و ۴: نمونه کنترل مثبت.




شکل ۹. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEB. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، 5-2: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEB (۴۷۸ جفت باز)، 6: نمونه کنترل مثبت.

جدول ۵ فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال‌وبختیاری را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های *SEA* (۶۳/۱۵ درصد) و *SEB* (۵۲/۲۶ درصد) بیشترین فراوانی را در سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال-وبختیاری داشتند. کمترین فراوانی ژن‌های کدکننده


www.SID.ir

انتروتوکسینی در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال‌وبختیاری مربوط به *SEI* (۲/۶۳ درصد) و*SEJ* (۲/۶۳ درصد)، بود. در کل شیوع ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های کلاسیک در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سالاد بیشتر از سبزیجات بود ($P< 0.05$).

جدول ۵. فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری.

| نوع نمونه ها (تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین) | شیوع ژن‌های کد کننده انتروتوکسین (٪) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *SEA* | *SEB* | *SEC* | *SED* | *SEE* | *SEG* | *SEH* | *SEI* | *SEJ* |
| سبزیجات (۱۸) | ۱۱ (۶۱/۱۱) | ۹ (۵۰) | ۷ (۳۸/۸۸) | ۸ (۴۴/۴۴) | ۲ (۱۱/۱۱) | ۱ (۵/۵۵) | ۱ (۵/۵۵) | - | - |
| سالاد (۲۰) | ۱۳ (۶۵) | ۱۲ (۶۰) | ۹ (۴۵) | ۹ (۴۵) | ۳ (۱۵) | ۱ (۵) | ۲ (۱۰) | ۱ (۵) | ۱ (۵) |
| کل (۳۸) | ۲۴ (۶۳/۱۵) | ۲۱ (۵۲/۲۶) | ۱۶ (۴۲/۱۰) | ۱۷ (۴۴/۷۳) | ۵ (۱۳/۱۵) | ۲ (۵/۲۶) | ۳ (۷/۸۹) | ۱ (۲/۶۳) | ۱ (۲/۶۳) |

## بحث

اخیرا *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود. (Lee et al., 2018). همچنین حضور *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در طیف گسترده‌ای از موادغذایی خصوصا گوشت، شیر و سبزیجات نیز، گزارش شده است (Riva et al., 2015; Ribeiro et al., 2018; Wu et al., 2019). در مطالعه حاضر نیز که به منظور ارزیابی میزان شیوع، الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام شد، شیوع باکتری در نمونه‌های سبزیجات و سالاد به ترتیب ۷/۲ درصد (۱۸ نمونه از ۲۵۰ نمونه) و ۸/۵۱ درصد (۲۰ نمونه از ۲۳۵ نمونه) بود که بسیار قابل توجه است. دلیل حضور بالای باکتری در سبزیجات احتمالا تماس مستقیم آن‌ها با خاک، آب‌های آلوده مورد استفاده برای آبیاری و انواع کودهای حیوانی وحتی انسانی است. دلیل حضور باکتری در سالادهای سنتی احتمالا حضور باکتری در نمونه‌های خام اولیه مورد استفاده برای تهیه سالاد و همچنین انتقال سوش‌های باکتریایی در زمان تهیه سالاد از ابزار آلات آشپزخانه و ظروف و همچنین دست و ریز قطرات تنفسی کارکنان، می‌باشد. در این ارتباط، Goudarzi و همکاران (۲۰۱۷) اقدام به مطالعه آلودگی میکروبی سالادهای شهر بندرعباس نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که تنها ۴۰ درصد از نمونه‌های سالاد ماکارونی، آلوده به *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بودند. Tajbakhsh و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به مطالعه آلودگی میکروبی سالادهای الویه سنتی و صنعتی شهرستان شهرکرد نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های سالاد الویه سنتی و صنعتی به ترتیب ۳۴/۸ و ۶۵/۲۰ درصد بود. این محققان دلیل آلودگی بالا در سالادهای صنعتی را دخالت دست در بخش عمده ای از مراحل تهیه و تولید سالاد الویه و همچنین عدم قرارگیری مواد اولیه سالاد در دمای مناسب دانستند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیش از نیمی از جدایه‌های


www.SID.ir

Archive of SID

*استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاوم به متی‌سیلین بودند که با یافته های مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، مقاومت بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های ارزیابی شده و خصوصا پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتی-راکسون (۱۰۰ درصد) داشتند. دلیل بروز مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی، ماهیت سوش‌های *استافیلوکوکوس-اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین می باشد که به شکل همزمان نسبت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند. دلیل بالاتر بودن شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین جدا شده از سالاد نسبت به سبزیجات احتمالا انتقال سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های انسانی از کارکنان آلوده آشپزخانه رستوران‌ها سطح استان چهارمحال‌وبختیاری به نمونه‌های سالاد می‌باشد.

Soltan Dallal و همکاران (۲۰۰۸) اقدام به مطالعه آلودگی موادغذایی رستورانی شهر تهران به *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه-ها نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سیپروفلوکسازین، سفتریاکسون، کلیندامایسین، اگزاسیلین، متی‌سیلین، اریترومایسین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به تتیب ۲۶، ۳، ۴، ۳، ۳، ۳، ۲ و ۱ درصد بود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Momtaz و همکاران روی ۳۶۰ نمونه گوشت مرغ در استان اصفهان انجام پذیرفت، ۸۲/۹۲ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند در حالی که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ماکرولیدها تنها ۳۴/۱۴ درصد بود. میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، سولفامتوکسازول، تری‌متوپریم، استرپتومایسین، جنتامایسین، انروفلوکسازین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و سفالوتین به ترتیب ۷۵/۶، ۳۱/۷، ۳۱/۷، ۳۱/۷، ۲۹/۲۶، ۲۸/۰۴، ۲۶/۸۲، ۲۰/۷۳ و ۱۷/۰۷ درصد بود. در مطالعه Rodriguez-Lazaro و همکاران (۲۰۱۵) ۱۱۷ نمونه گوشت، ۷۵ نمونه شیر و ۳ نمونه تخم مرغ از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در کل ۶۶ نمونه (۳۳/۹ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. از بین سوش‌های مورد بررسی، ۹/۱ درصد آنها مقاوم به متی‌سیلین و در بین سوش‌های حساس به متی‌سیلین، میزان شیوع مقاومت بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۴۴/۱ درصد، تتراسیکلین ۱۰/۲ درصد و آمینوگلیکوزیدها شامل آمیکاسین و توبرامایسین ۸/۵ درصد، بود. مقاومت نسبت به پنی‌سیلین، کوآموکسی‌کلاو، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و سفتی‌راکسون در تمام جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یافت شد. دلیل اختلاف در میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در مطالعات مختلف گزارش شده است احتمالا تفاوت در نوع نمونه‌ها، در دسترس بودن آنتی‌بویتیک و نظر پزشکان و دامپزشکان مناطق مختلف در نوع و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک و قدرت خرید مردم می باشد. با این وجود دلیل اصلی شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تمام گزارشات، مصرف بی‌رویه و غیر اصولی آنتی-بیوتیک می‌باشد.

توانایی تولید انتروتوکسین در سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از ویژگی‌های اصلی متمایز کننده بعضی از سوش‌های حدت‌دار و بیماری‌زا از سایر سوش‌هاست. تولید انتروتوکسین‌ها معمولا به وسیله حضور یکسری از ژن‌های کد کننده انتروتوکسین، انجام می‌شود. یکی از اصلی‌ترین انتروتوکسین‌های اختصاصی طیور، *SED* است (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018) که در مطالعه حاضر از شیوع قابل توجهی در سوش‌های جداسازی شده از سبزیجات و سالاد برخوردار بود. دلیل


www.SID.ir

این یافته احتمالا استفاده از کودهای مرغی برای تقویت رشد سبزیجات بوده است. همچنین ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های *SEA* (۶۳/۱۵ درصد) *SEB* (۵۲/۲۶درصد) و *SEC* (۴۲/۱۰ درصد) نیز شیوع بالایی در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری داشتند. انتروتوکسین-های *SEA* و *SEB* انتروتوکسین‌های اصلی ردیابی شده در انواع موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی هستند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). با وجود این که فراوانی انتروتوکسین‌های نو ظهور *SEG*، *SEH*، *SEI* و *SEJ* در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری به ترتیب ۵/۲۶٪، ۷/۸۹، ۲/۶۳ و ۲/۶۳ درصد بود اما انتروتوکسین‌های نو ظهور (SEJ-SEG) مقاومت حرارتی و همچنین مقاومت پروتئولیتیکی (نسبت به آنزیم‌های پپسین و تریپسین دستگاه گوارش) بیشتری نسبت به انواع کلاسیک دارند که سبب افزایش اهمیت آنها می‌شود (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018).

Al-Bahry و دیگران در سال ۲۰۱۴ (Al-Bahry et al., 2014) نشان دادند که رول‌های ساندویچی تولید شده در کشور عمان، حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۴۸/۴ درصد)، *SEB* (۳۶/۱ درصد)، *SEC* (۳/۳ درصد)، *SED* (۱/۳ درصد) و *SEE* (۱۰/۹ درصد)، نمونه‌های مرغ حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۵۱/۳ درصد)، *SEB* (۳۰ درصد)، *SEC* (۱/۲ درصد)، *SED* (۱۱/۲ درصد) و *SEE* (۶/۳ درصد) و در نهایت نمونه‌های تخم مرغ پخته حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۴۱/۸ درصد)، *SEB* (۴۰/۶ درصد)، *SEC* (۳/۵ درصد)، *SED* (۲/۲ درصد) و *SEE* (۶/۵ درصد)، سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. سایر انواع انتروتوکسین‌ها در نمونه‌های ارزیابی شده ردیابی نگردید. مطالعه Chang و همکاران در سال ۲۰۱۶ (Chang et al., 2013 ) نشان داد که ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های *SEC* (۵۰ درصد) و *SED* (۷۵ درصد) بیشترین فراوانی را در بین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از مواد غذایی در چین داشتند. Alhashimi و دیگران در سال ۲۰۱۷ (Alhashimiet al., 2017) گزارش نمودند که انتروتوکسین‌های *SEB* (۱۸ درصد)، *SEA* (۱۶ درصد)، *SEE* (۸ درصد)، *SEC* (۸ درصد) و *SED* (۶ درصد) شایع‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده از سواب‌های اخذ شده از بینی کارکنان در مراکز تهیه مواد غذایی در شهر کربلا بودند. Rahimi در سال ۲۰۱۳ (Rahimi et al., 2013) نشان دادند که فراوان‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های گوشت گوساله، گوشت چرخی، گوشت گوسفند، گوشت بز و گوشت شتر به ترتیب *SEA* (۶۲/۵ درصد)، *SEA* (۵۴/۵۴ درصد)، *SEC* (۷۵ درصد)، *SEC* (۶۶/۶۶ درصد) و *SEA*، *SEB* و *SEC* (۲۵ درصد) بودند. Madahi و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Madahi et al., 2014) نیز نشان دادند که انتروتوکسین‌های *SEA* (۴/۱۶ درصد) ، *SEB* (۱۲/۵۰ درصد)، *SEC* (۸/۳۳ درصد) و *SED* (۱۲/۵۰ درصد) فراوان‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در نمونه‌های مواد غذایی بودند. Wu و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Wu et al., 2018) گزارش نمودند که شایع‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات در کشور چین به ترتیب *SEC* (۸۳/۳۰ درصد)، *SEG* (۵۶/۷۰ درصد)، *SEH* (۵۰/۰۰ درصد)، *SEJ* (۴۶/۷۰ درصد) و *SEB* (۳۶/۷۰ درصد) بودند.


www.SID.ir

Archive of SID

## نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه-های سبزیجات و سالاد استان چهارمحال‌و بختیاری بود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج استفاده شده در پزشکی و دامپزشکی و خصوصا پنی-سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها برخوردار بودند. همچنین ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های *SEA*، *SEB*، *SEC* و *SED* از شیوع قابل توجهی در سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین برخوردار بودند. با توجه به بالاتر بودن شیوع باکتری در نمونه-های سالاد و همچنین وجود مقاومت بر علیه آنتی-بیوتیک‌های انسانی احتمالا انتقال آلودگی از کارکنان آلوده مراکز تولید نمونه‌های سالاد دلیل اصلی شیوع بالای باکتری در این نمونه‌ها بوده است. با توجه به شیوع بالای سوش‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حاوی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین، پیشنهاد می‌شود که نظارت بیشتری بر تهیه غذا در رستوران‌های این مناطق اتخاذ گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و سفالوسپورین برای درمان موارد مسومتی‌های غذایی ایجاد شده بوسیله *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، پیشنهاد نمی‌گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مطالعه حاضر از زحمات تمامی پرسنل زحمتکش مرکز تحقیقات بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## منابع

1. Al-Bahry, S., Mahmoud, I., Al-Musharafi, S., and Sivakumar, N. 2014. *Staphylococcus aureus* contamination during food preparation, processing and handling. Int. J. Chem. Eng. Appl. 5: 388.
2. Alhashimi, H.M.M., Ahmed, M.M., and Mustafa, J.M. 2017. Nasal carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* among food handlers in Kerbala city. Karbala. Int. J. Modern. Sci. 3: 69-74.
3. Barber, M., and Rozwadowska-Dowzenko, M. 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. Lancet. 252: 641–644.
4. Chang, V.S., Dhaliwal, D.K., Raju, L., and Kowalski, R.P. 2015. Antibiotic resistance in the treatment of *Staphylococcus aureus* keratitis: a 20-Year Review. Cornea. 34: 698-703.
5. Chang, Y., Gao, H., Zhu, Z., Ye, S., Yang, Y., Shen, X., Zhang, D., and Song, Q. 2016. High prevalence and properties of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* ST5 strains of food sources in China. Foodborne. Pathog. Dis. 13: 386-390.
6. CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second informational supplement M100-S21. Wayne Pa.
7. Fisher, E.L., Otto, M., and Cheung, G.Y.C. 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. Front Microbiol. 9: 436.
8. Goudarzi, B., Ali Pour, V., Rezaei, L., Dindarlu, K., Heidari, M., and Rahmaniyan, O. 2016. Bacteriological quality of ready to use salads at restaurants in Bandar Abbas. J Prev Med. 3: 31-38.
9. Jay, James., M., Loessner, Martin J., Golden, David A. Six th edition. 2000. Staphylococcal Gastroenteritis. Aspen Publishers, Inc. Modern Food Microbiology Gaithersburg, Maryland. 441-459.
10. Kadariya, J., Smith, T.C., and Thapaliya, D. 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: An


www.SID.ir

P.A.S., Pinheiro, R.R., Arruda, M.M., and Afreixo, V. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry and poultry meat: A meta-analysis. J. Food. Prot. 81: 1055-1062.

20. Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Pontello, M.M., and Morace, G. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: Prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. J. Food. Prot. 78: 1142-6.

21. Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Diez-Valcarce, M., Fernández-Natal, I., Hernández, M., and Rovira, J. 2015. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. Int. J. Food. Microbiol. 209: 29-33.

22. Seo, K., and Bohach, G. 2013. *Staphylococcus aureus*, In Doyle M, Buchanan R (ed), Food Microbiology. ASM Press, Washington, DC. 547-573.

23. Soltan Dallal, M.M., Agha Amiri, S., Eshraghian, M.R., Sabour Yaraghi, A.A., Faramarzi, T., Mahdavi, V., Saberpour, F., Fazeli Fard, P., and Peymaneh Abedi Mohtasab, T.P. 2008. Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food stuff. J. Zanjan. Univ. Med. Sci. 16: 63-72. (In Farsi).

24. Tajbakhsh, F., Tajbakhsh, E., and Momeni, M. 2014. Detection of Staphylococcus aureus and *Salmonella typimurium* in traditional and industrial Olivie salads in Shahrekord city. J. Food. Microbiol. 2: 39-48. (In Farsi).

25. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. J.r. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin. Microbiol. Rev. 28: 603-61.

ongoing challenge in public health. Biomed. Res. Int. 2014: 1-9.

11. Khamash, D.F., Milstone, A.M., Carroll, K.C., Gadala, A., Klein, E., Maragakis, L.L., Cosgrove, S.E., and Fabre, V. 2019. Changing antibiotic resistance patterns for *Staphylococcus aureus* surgical site infections. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 40: 486-487.

12. Kluytmans, J.A. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency. Clin. Microbiol. Infect. 16: 11-15.

13. Krakauer, T. 2016. Enterotoxins: microbial proteins and host cell dysregulation. Toxins (Basel). 8: 17.

14. Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat. Rev. Dis. Primers. 4: 18033.

15. Madahi, H., Rostami, F., Rahimi, E., and SafarpoorDehkordi, F. 2014. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from chicken nugget in Iran. Jundishapur. J. Microbiol. 7: 10237.

16. Młynarczyk, A., Młynarczyk, G., and Jeljaszewicz, J. 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. Zentralbl. Bakteriol. 287: 277-314.

17. Momtaz, H., Safarpoor Dehkordi, F., Rahimi, E., Asgarifar, A., and Momeni, M. 2013. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. J. Appl. Poult. Res. 22: 913–921.

18. Rahimi, E. 2013. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. Braz. J. Microbiol. 44: 393-399.

19. Ribeiro, C.M., Stefani, L.M., Lucheis, S.B., Okano, W., Cruz, J.C.M., Souza, G.V., Casagrande, T.A.C., Bastos,


www.SID.ir

Archive of SID

26. Wu ,S., Huang, J., Zhang, F., Wu, Q., Zhang, J., Pang, R., Zeng, H., Yang, X., Chen, M., Wang, J., Dai, J., Xue, L., Lei, T., Wei, X. 2019. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. Front. Microbiol. 10: 304.

27. Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., Lei, T., Chen, M., Ding, Y., and Xue, L. 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China. Front. Microbiol. 9: 1263.



www.SID.ir

# Study the frequency of enterotoxin encoding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable and salad samples in Chaharmahal Va Bakhtiari province

**Momeni Shahraki M[1*], Shakerian A[2], Rahimi E [2], Safarpoor Dehkordi F[3]**

1. MSc Student of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Halal Research Center of IRI, FDA, Tehran, Iran.

***Corresponding author**: *Momeniman@yahoo.com*

Received: 27 August 2019 Accepted: 26 November 2019

## Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the main emerging causative agents of antibiotic-resistant food poisoning in humans. The bacterium also has the ability to the production of heat resistant enterotoxin. The present study was done to assess the prevalence rate, antibiotic resistance pattern, and frequency of enterotoxin encoding genes in methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from vegetable and salad samples. In this study, 485 samples of vegetables and salad were collected and immediately transferred to the laboratory. The microbial culture was used to isolate *S. aureus*, and methicillin-resistant strains were approved using cefoxitin and oxacillin disks. Antibiotic resistance patterns and frequency of enterotoxin encoding genes were analyzed using disk diffusion and PCR methods, respectively. The prevalence rate of methicillin-resistant *S. aureus* in vegetable and salad samples were 7.2% and 8.51%, respectively. Methicillin-resistant *S. aureus* strains had the highest antibiotic resistance against penicillin (100%), co-amoxiclav (100%), ampicillin (100%) and ceftriaxone (100%) antibiotics. The prevalence of resistance against imipenem (10.52%) and chloramphenicol (23.68%) was lower than other antibiotics. *SEA* (63.15%) and *SEB* (52.26%) were the most frequently detected enterotoxins in methicillin-resistant *S. aureus* strains. The simultaneous presence of multiple enterotoxin encoding genes and multiple resistance against several antibiotics in methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from vegetable, and salad samples represent an important health-related concern in this kind of food samples. Preventing uncontrolled administration of antibiotics can reduce the risk of enterotoxigenic methicillin-resistant *S. aureus* enterotoxin in vegetables and salads.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, enterotoxin, antibiotic resistance, vegetables, salad.


www.SID.ir