بررسی آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس*، در نمونه‌های غذایی و تعیین ارتباط اپیدمیولوژیک آن با کارکنان تولیدکننده آن‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

سید منصور میبدی[1]، زهرا معصومعلی نژاد[2]، مریم فخرآبادی[3]

چکیده

غذاهای سریع و سرد، به علت عدم نیاز به زمان پخت و نیز به دلیل تماس با دست کارگران رستوران هنگام آماده‌سازی، موجب افزایش خطرهای میکروبیولوژیکی مصرف‌کنندگان می‌شوند. هدف از این تحقیق، بررسی آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های غذایی با روش PCR است.

در این تحقیق تعداد ۵۰ نمونه از موادغذایی (همبرگر دست ساز، فلافل، سمبوسه سیب زمینی، سمبوسه پیتزایی، کباب، سالاد ماکارونی) از ۱۰ فست فود فروشی در سطح شهرستان سیرجان، در یك بازه زمانی ۳ ماهه از ابتدای تیر لغایت پایان شهریور ۱۳۹٦جمع‌آوری گردید. همچنین ۳٦ نمونهٔ سواب بینی از کارکنان آن‌ها تهیه شدند و توسط آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه بررسی این‌که آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس ٦% و آلودگی کارکنان به این باکتری، ۱۹/٤٤% بود. بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول، سفتی زوکسیم، سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰%، ۹۰% و۹۰% و بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، لینزولید، آزیترومایسین به ترتیب ٦۰%، ۳۵% و ۳۰% گزارش شد.

بر اساس نتیجهٔ تحقیق حاضر می‌توان گفت، از آن‌جا که مراحل تهیه و تولید همبرگر دست ساز، فلافل، سمبوسه، کباب و سالاد ماکارونی در ایران به صورت دستی است، احتمال آلودگی مواد غذایی از طریق نیروهای انسانی کاملاً وجود دارد. لذا آموزش بهداشت شخصی و محیط به منظور کاهش میزان استافیلوکوکوس اورئوس در افرادی که در تهیه غذا نقش دارند؛ از اهمیت بالایی برخوردار است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، آلودگی میکروبی، مواد غذایی، PCR.

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران.

۲. * گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران نویسنده مسئول: zahra.masoumy6623@gmail.com

۳. گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس متشکل از باکتری‌های کروی و گرم مثبت با قطر حدودا یک میکرون است کـه در پوسـت و غشاهای مخاطی انسان و حیوانات به صورت کامنسال کلنیزه می‌شود. با وجـود ایـن کـه سـویه‌های ایـن بـاکتری بخشی از فلور طبیعی انسان هستند؛ به عنوان باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب، یکی از عوامل مهـم در ایجـاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و گسترهٔ وسیعی از بیماری‌های انسانی و حیوانی (پوستی، گوارشی، تنفسی و...) را موجب می‌شوند(۱). در میان اسـتافیلوکوکوس‌ها، اسـتافیلوکوکوس اورئـوس مهـاجم‌ترین گونه است و به عنوان مسبب بیماری‌های مختلفی، مانند عفونت پوست، آبسه‌ها، مسمومیت غذایی، سندرم شوک سمی، سپتی سمی، اندوکاردیت و ذات الریه شناخته می‌شود(۲،۳). مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری، یکـی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی در جهان است و در اکثر کشورها جـزء ۳ عامـل اول مسـمومیت‌های غـذایی است(۴). چندین عامل حدت بالقوه در استافیلوکوک‌ها شناسایی شده‌اند که اکثر ایـن عوامـل در اسـتافیلوکوکوس اورئوس و بعضی در سایر گونه‌ها ملاحظه می‌شوند. عوامل حدت را می‌توان به اجزای وابسته به سلول، اگزوآنزیم‌ها و اگزوتوکسـین‌هـا تقسـیم کـرد. از میـان عوامـل وابسـته بـه سـلول بـه پـروتئین A، پلـی سـاکاریدهای کپسـولی، پپتیدوگلیکان، تیکوئیك اسید، عوامل چسبندگی و فـاکتور جمـع‌کننـده می‌تـوان اشـاره کـرد. همچنـین مهم‌تـرین اگزوآنزیم‌ها عبارتند از: کواگولاز، لیپاز، هیالورونیداز، پروتئاز، کاتالاز، استافیلوکیناز یا فیبرینولیزین، بتالاکتامـاز، دزاکسی ریبونوکلئاز. گروه دیگر عوامل حدت انتروتوکسین (با انواعA ، B، C1، C2، D، Eو یاA ، E، G، J، K، R، U ، V)، توکسین سندروم شوک سمی (انتروتوکسین Fیا اگزوتوکسین پیروژنیك c)، سم اپیدرمولیتیک(اکسـفولیاتیو)، همولیزین(α، β، Δو۷) و لکوسیدین می‌باشند(۵). در بین عوامل معرفـی شـده، کواگـولاز دارای اهمیـت ویـژه‌ای است که پروتئینی خـارج سـلولی بـوده و در میزبـان بـه پروتـرومبین متصـل می‌شـود و کمپلکسـی تحـت عنـوان استافیلوترومبین ایجاد می‌کند. فعالیت پروتئازی این کمـپلکس بـه تبـدیل فیبرینـوژن بـه فیبـرین منجـر می‌شـود. باکتری‌ها با ایجاد لختهٔ موضعی، خود را در برابر سیستم ایمنی و سلول‌های بیگانه‌خوار محافظت می‌کننـد. وجـود کواگولاز با استفاده از پلاسمای اگزالاته یا سیتراته خرگوش که واجد CRF است، بررسی می‌شود. در گاو، فقدان این آنزیم باعث انعقاد پلاسمای این حیوان نمی‌شود؛ اما در انسـان CRF وجـود دارد و باعـث انعقـاد می‌شـود. وجـود کواگولاز می‌تواند معیاری برای حدت باکتری باشد. معمولاً سویه‌هایی از این باکتری که کوآگولاز مثبت هسـتند، دارای حدت بالاتری می‌باشند(۵). استافیلوکوکوس اورئوس، هم به صورت فنوتیپی و هم به صورت ژنـوتیپی قابـل جداسازی و تأیید است؛ اما به دلیل تنوع در ویژگی‌های مختلف، می‌توان این گونه را به انواع مختلفی تقسیم‌بنـدی کرد. تایپینگ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس روش مناسـبی بـرای اهـداف اپیـدمیولوژیك اسـت(۶). بررسـی

ژنوتیپی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل نقشی که در تمایز ایزوله‌ها دارد، در ردیابی منشاء کنترل آلودگی‌های ناشی از این باکتری می‌تواند کاربرد بسزایی داشته باشد. تاکنون انواعی از روش‌های تایپینگ معرفی شده‌اند که به دو گروه روش‌های فنوتیپی و مولکولی تقسیم می‌شوند. از میان روش‌های فنوتیپی که از گذشته تا به امروز استفاده شده‌اند، می‌توان به سروتایپینگ، بیوتایپینگ، فاژ تایپینگ و آنتی‌بیوتیک تایینگ اشاره کرد که امروزه فاژتایپینگ بسیار معمول و پرکاربرد است. از مهم‌ترین روش‌های مولکولی می‌توان به Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) ، Multilocus sequence typing (MLST)، تایپینگ spa (کدکنندهٔ پروتئینA)، restriction fragment length polymorphism (RFLP) و روش‌های Microarray اشاره کرد(۷). محققان نشان داده‌اند که باکتریوفاژها، در انتقال افقی ژن‌های حدت نقش اساسی دارند و قادر هستند جدایه‌های غیربیماری‌زا را از طریق تبدیل لیزوژنیک باکتریوفاژی به جدایه‌های بیماری‌زا تبدیل کنند(۸). باکتریوفاژهای استافیلوکوکی، به طور گسترده‌ای برای دسته‌بندی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می‌شوند(۹). باکتریوفاژ به صورت پروفاژ در ژنوم باکتری جای می‌گیرد و به لحاظ ریخت شناسی و عملکرد، موجب تغییرات بسیاری در باکتری می‌گردد. از طرفی عوامل حدتی، مانند انتروتوکسین A ، E، G، Kو P ، استافیلوکیناز، همولیزین بتا، لیپاز، لکوسیدین و ... را موجب می‌شود. تاکنون بیش از ۲۵۰ باکتریوفاژ استافیلوکوکی شناسایی شده‌اند(۱۰). باکتریوفاژهای معتدل استافیلوکوکوس اورئوس از خانواده سیفوویریده بر اساس فعالیت کشنده، ریخت شناسی و خصوصیات سرولوژیک، در شش دسته باکتریوفاژ طبقه بندی می‌شوند. برای مطالعه جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس روش‌های معمول که برای شناسایی پروفاژ در جدایه‌های لیزوژنیک استفاده می‌شوند، بسیار طولانی، زمان بر و دشوار هستند و لذا برای بررسی‌های معمول چندان مناسب نیست (۱۱). در مطالعاتی ، پروب‌هایی برای تشخیص پروفاژ در جدایه‌های لیزوژنیک از توالی‌های اختصاصی ژنومی باکتریوفاژهای گروه سرولوژیکیA ، Fو B تهیه شده‌اند(۱۲) که درك انتقال باکتریوفاژ نه تنها در تشخیص تنوع ژنومیکی بالا در استافیلوکوکوس اورئوس، بلکه از منظر ژنومی برای تکامل و حدت جدایه‌های باکتریایی نیز حائز اهمیت‌اند(۱). استافیلوکوکوس در هوا، گرد و غبار، فاضلاب، آب، شیر، مواد غذایی، تجهیزات صنایع مواد غذایی، محیط، انسان و حیوانات وجود دارد(۱۳). استافیلوکوک در بینی، گلو و بر روی مو و پوست ۵۰% یا بیش‌تر افراد سالم موجود است. این میزان، برای کسانی که با اجتماع و یا در تماس با افراد بیمار و محیط بیمارستان می‌آیند بیش‌تر است(۱۴). اشخاصی که غذا را تهیه و توزیع می‌کنند، معمولا منبع اصلی آلودگی مواد غذایی و وقوع مسمومیت‌ها می‌باشند. البته نباید نقش تجهیزات و سطوح محیط آلوده را از نظر دور داشت (۱۵). مسمومیت غذایی انسان به دلیل انتروتوکسین مقاوم به حرارت در مواد غذایی است که توسط برخی گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود و معمولاً به علت عدم حرارت

کافی و یا دمای مناسب اتفاق می افتد(۱۶). از آن جا که در بسیاری از نقاط ایران از غـذاهای رسـتوران‌ها و فسـت فودها برای تغذیه استفاده می‌شود، ریسک آلودگی آن‌ها با سو یه‌های مقاوم باید مورد توجه واقع شود. با عنایت به نکات مذکور، بررسی و کنترل کیفی مواد غـذایی رسـتوران‌ها و فسـت فودهـا از نظـر حضـور سـویه‌های دارای مقاومت‌های چند دارویی پرخطر و توکسیژنیک به منظور پیشگیری از مسمومیت غذایی، باید بـه عنـوان اولویـت تلقی شود. هدف از انجام‌دان این تحقیق، تعیین میزان آلودگی استافیلوکوکوس اورئـوس در مـواد غـذایی بـه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)(Polymerase chain reaction) در سیرجان است.

مواد و روش کار

در این تحقیق، ۵۰ نمونه از موادغذایی، همبرگر دست ساز(۱۳ نمونه، فلافل (۹نمونه)، سمبوسه سـیب زمینـی(۹ نمونه)، سمبوسه پیتزایی(۶ نمونه)، کباب(۷ نمونه)، سالاد ماکارونی(۶ نمونه)، از ۱۰ فست فود فروشی در سطح شهرستان سیرجان در یك بازه زمانی ۳ ماهه از ابتدای تیر لغایت پایان شهریور ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید. همچنـین ۳۶ نمونه سوآب بینی از مسئولان تهیهٔ مادهٔ اولیهٔ فست فودها که از آن‌ها استافیلوکوکوس اورئوس جداسـازی شـد؛ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت از نمونه‌های فست فـود بـر اسـاس دسـتورالعمل‌های مؤسسـهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران صورت گرفت. به طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه غذا بـه ۹۰ میلـی لیتـر بـه محلول رینگر استریل اضافه گردید (رقت ۰/۱). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه رقیق شده، روی محیط انتخابی برد پارکر آگار کشت داده شد. همچنین نمونه‌های بینی با استفاده از سوآب‌های پنبه‌دار موجود در لوله‌های حـاوی محیط کشت تریپتیک سوی از بخش قدام هر دو سوراخ بینی کارکنان فست فود جمع آوری و روی محیط‌های بلاد آگار و مانیتول سالت آگار، کشت داده شدند و کلیه پلیت‌ها به مدت ۲٤ سـاعت در دمـای ۳۷ درجـه سلسـیوس انکوبه گردیدند. با مشاهده رشد کلونی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری‌ها توسط تست‌هایی چون رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، DNAase ،کوآگولاز و تخمیر مانیتول، تعیین هویت نهایی شدند(۱۷).

ـ آزمون آنتی‌بیوگرام

بـرای انجام‌دادن آزمون آنتی‌بیوگرام، از روش دیسـک گـذاری(Disk diffusion) بـه روش کربـی بـائر و طبـق دستورالعمل CLSI استفاده گردید. تعـدادی از کلـونی باکتری در سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شـدند تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردنـد، سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شـدند و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سلسـیوس انکوبـه و بعـد از ۲۴ ساعت نتایج ملاحظه شـدند. بـرای انجام این آزمون، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمپـی‌سـیلین (۱۰ میکروگـرم)،

سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم(۱۰ میکروگرم)، لینزولید (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) تهیه گردیدند.

ـ استخراج DNA

به منظور انجام‌دادن این آزمون، باکتری‌های جداسازی شده در محیط لوریا برتانی براث کشت داده شدند و سپس طبق دستورالعمل کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت سیناژن DNA استخراج گردید.

ـ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تست PCR با کیت Master mix (شرکت Takara، ژاپن) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و همچنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز در جدول ۱ ذکر گردیده است(۱۸). برای انجام‌دادن PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف از مخلوط کردن ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری با غلظت ۵۰ نانوگرم، ۱۰pmol ازپرایمر و آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین واکنش PCR طبق برنامه زیر انجام گردید:

ـ واکنش PCR برای شناسایی ژن 16SrDNA

واسرشت اولیه در دمای ۹۴درجه سیلسیوس به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن، ۳۲ چرخه دمایی، هر چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه که هرکدام به ترتیب اختصاص به مراحل واسرشت ثانویه، اتصال پرایمر، و گسترش اولیه بود. مرحله نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰دقیقه صورت گرفت. پس از انجام‌دادن آزمایش PCR محصولات PCR، در ژل آگارز ۱% در بافر TBE ۱x به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد و براساس باندی که محصولات PCR در دستگاه Geldocumentation مشاهده شد؛ مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول (۱): توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگر مورد استفاده در این تحقیق(۱۸)

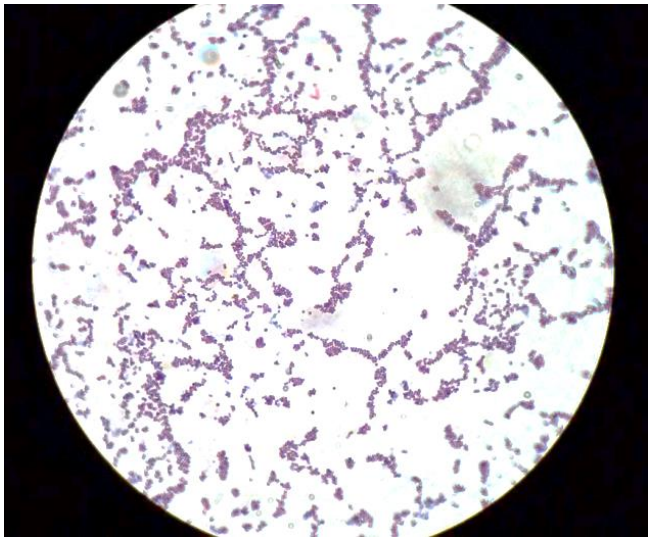
پرایمر	سکانس الیگونوکلئوتیدی	اندازه قطعه (bp)
16SrDNA	F 5'AGAGTTGATCCTGGCTCAG3'	۱۵۰۰
	R 5'CGGTTACCTTGTTACGACTT3'	

ـ تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

نتایج تعیین ترادف، با فرمت الکتروگرام کروماس، با استفاده از نرم افزار کروماس ورژن ۱.۴۱ مورد بررسی قرار گرفت. سپس توالی نهایی با سایرتوالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن (NCBI Gen bank) مقایسه شد. برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی، برنامه MEGA 5.1 مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

در این تحقیق، از میان ۵۰ نمونه موادغذایی (همبرگر دست ساز، فلافل، سمبوسه سیب زمینی، سمبوسه پیتزایی، کباب و سالاد ماکارونی) جمع آوری شده، ۶% جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید. بر این مبنا در بین نمونه‌های کباب مختلف جمع‌آوری شده (۷ نمونه)، دو تا (۲۸/۵۷%) از نمونه‌ها و در بین نمونه‌های سمبوسهٔ سیب زمینی مختلف جمع‌آوری شده (۹ نمونه)، یک (۱۱/۱۲%) نمونه از نظر باکتری یادشده مثبت بود. در بین ۳۶ نمونهٔ سواب بینی کارکنان فست فود سیرجان هفت نمونه (۱۹/۴۵%) از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس مثبت شدند که ناقل باکتری یادشده بودند. بر اساس نتایج این تحقیق یک نمونهٔ کباب، در حالی با استافیلوکوکوس اورئوس آلودگی نشان داد که سواب بینی اخذ شده از متصدی فراوری آن محصول نیز به باکتری مورد نظر آلوده بود. بر این مبنا ۳۳/۳۴% از نمونه‌های غذایی، آلودگی خود را از فرد آلوده احتمالاً کسب کرده‌اند (شکل ۱). نتایج تست‌های بیوشیمیایی به منظور تشخیص سویه مورد نظر در جدول شماره ۲ آورده شده است.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی یکی از نمونه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس*

جدول ۲. نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه انتخابی

نمونه	تست					
استافیلوکوکوس اورئوس	اکسیداز	کاتالاز	مانیتول	DNase	کواگولاز	همولیز بتا
	−	+	+	+	+	+

میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول شماره ۳ آمده است. بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول، سفتی زوکسیم، سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰%، ۹۰% و ۹۰% و بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، لینزولید، آزیترومایسین به ترتیب ۶۰%، ۳۵% و ۳۰% گزارش شده است.

جدول ۳. نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه (n=50)

نام آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه حساس(درصد)	مقاوم (درصد)
آزیترومایسین	۴۵	۲۵	۳۰
کلیندامایسین	۵۰	۳۰	۲۰
تتراسیکلین	۸۰	۲۰	–
کانامایسین	۱۰	۳۰	۶۰
ونکومایسین	۸۹	۱۱	–
کوتریموکسازول	۱۰۰	–	–
سفتی زوکسیم	۹۰	۱۰	–
سیپروفلوکساسین	۹۰	۴	۶
لینزولید	۶۵	–	۳۵

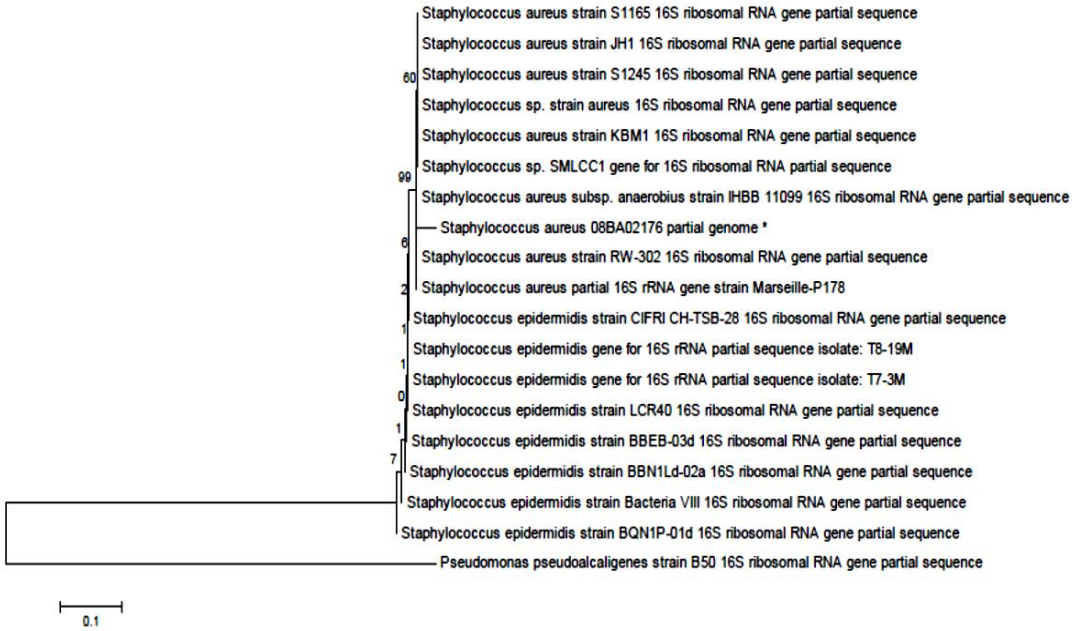
دو نمونه انتخابی برای تأیید نهایی از نظر استافیلوکوکوس اورئوس بودن و از نظر اثبات انتقال آن از شخص به مادهٔ غذایی به روش مولکولی بررسی شد. ژن SrDNA ۱۶برای شناسایی و تأیید باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انتخاب گردید. نتایج شناسایی مولکولی و محصول PCR در شکل ۲ آمده است:

شکل۲. تکثیر قطعه ژن 16SrDNA حاصل از واکنشPCR. از سمت راست به چپ: چاهک ۱ مارکر۱۰۰bp، چاهک ۲ محصول PCR (به طول ۱۵۰۰ جفت باز) و چاهک ۳ کنترل منفی

هم ردیفی توالی به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های NCBI، با استفاده از ابزار BLASTn انجام گرفت. نتایج هم ردیفی نشان می‌دهد که توالی هدف ما با توالی ژن16SrDNA باکتری‌های استافیلوکوکوس ۹۶% مشابه است و ۹۹% همپوشانی دارد. توالی ژنی ۱۶ SrDNA سویهٔ جداسازی شده، پس از تکثیر و توالی یابی کادر در دیتا بیس بانک ژنی پایگاه NCBI با کد دسترسی KY346860.1 ثبت گردید.

رسم درخت فیلوژنتیک

بعد از تکثیر وتوالی‌یابی برای بررسی ساختار فیلوژنتیک از نرم افزار **MEGA 5.1** استفاده شد. برای رسم درخت فیلوژنتیک بعد از توالی‌یابی و بلاست کردن ۱۸ سکشن براساس توالی‌های RNA ریبوزومی انتخاب و سپس با توالی هدف در قالب فایل فستا به نرم افزار مگا معرفی شد بعد از هم ردیف‌سازی، درخت فیلوژنتیکی ترسیم و برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از سویه *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (به عنوان مارکر برای خوشه‌بندی در قالب گروه خارجی= out group) استفاده شد. نتایج، طبق شکل ۳ (که ارزش بوت استرپ با بیان درصد از ۱۰۰۰ تکرار در بالای شاخه‌ها نشان داده شده است و شاخه‌های بالای ۵۰% ارزش قابل استناد محسوب می‌گردد) برای همهٔ جدایه‌ها بالای ۵۰% است و همچنین مشخص شد که توالی ژن هدف ما نسبت به توالی‌های بالادست خودش بر روی درخت قدیم‌تر می‌باشد



شکل ۳. درخت فیلوژنتیک سویه منتخب (*استافیلوکوکوس اورئوس*)

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی، شیوع بیماری‌های منتقله از غذا، یکی از مشکلات تغذیه‌ای جهان است. باکتری‌هایی که در شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی دخالت دارند، کلی فرم‌ها، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس هستند. بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری‌ها(CDC) این باکتری‌ها سالانه به بستری شدن ۲۰۰۰ نفر و مرگ ۶۰ آمریکایی منجر می‌شوند(۱۹). مسمومیت غذایی با استافیلوکوکوس اورئوس به علت وجود سویه‌های انتروتوکسیژنیك، در غذا و هضم آن ایجاد می‌شود و خسارت‌های اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را موجب می‌گردد(۲۰). 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 جداشدن است(۲۱). امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، نوعی معضل جهانی است که بر اثر مصرف بی‌رویه و روزافزون داروها بوده و کشور ما هم از این قاعده مستثنا نیست. باکتری‌ها به راحتی می‌توانند ژن‌های مقاومتی را که بر روی عناصر متحرك ژنتیکی (پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها) قرار دارند، از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال دهند. لذا این احتمال وجود دارد که مواد غذایی، از جمله فست فودها با توجه به مصرف بالا در بین آحاد جامعه بتوانند در انتقال مقاومت‌های دارویی نقش مهمی داشته باشند (۲۲).

در این تحقیق، ۵۰ نمونه از موادغذایی (همبرگر دست ساز، فلافل، سمبوسه سیب زمینی، سمبوسه پیتزایی، کباب و سالاد ماکارونی) از فست فودی‌های سیرجان و همچنین ۳٦ نمونهٔ سواب بینی از کارکنان آن‌ها تهیه شد و توسط آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی، از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس ٦% و آلودگی کارکنان به این باکتری، ۱۹/٤٤% بود. در تحقیق حاضر، بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول، سفتی زوکسیم، سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰%، ۹۰% و ۹۰% و بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، لینزولید، آزیترومایسین به ترتیب ٦۰%، ۳۵% و ۳۰% گزارش شد.

در مطالعه تاجبخش و همکاران، آلودگی میکروبی سالادهای الویه سنتی و صنعتی شهرستان شهرکرد به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. از ۵۰ نمونه سالاد الویه (۳۰ نمونه صنعتی و ۲۰ نمونه سنتی)، براساس آزمایش‌های انجام شده، آلودگی سالادهای الویه صنعتی و سنتی به ترتیب به استافیلوکوکوس اورئوس ٤٦% و ۳٤/۸% گزارش شد که این مقادیر در مورد استافیلوکوکوس اورئوس به طور چشمگیری از فراوانی به دست آمده در مطالعهٔ بالاتر حاضر می‌باشد (۲۳).

حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۳، شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در انواع مواد غذایی و الگوی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها را در شهر همدان مورد بررسی قرار دادند. در مجموع، از ۵۱۰ نمونه مواد غذایی مختلف، ٤٩ سویه (٩/٦٠%) استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله گردید. سویه‌ها به ترتیب بیش ترین مقاومت آنتی بیوتیکی را به اریترومایسین و تتراسایکلین ١٥ (٣٠/٦١%)، جنتامایسین ١٤ (٢٨/٥٧%)، کلیندامایسین ١٣(٥٣/%) سیپروفلوکساسین و ریفامپین ١٢(٢٤/٤٨%)، تریمتوپریم /سولفامتاکسازول ٧ (١٤/٢٨%) و سفوکسیتین٣ (٦/١٠%) داشتند. شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حسینی و همکاران با مطالعه حاظر هم‌خوانی دارد(٢٤).

علیزاده و امینی در سال ١٣٩٤، به جداسازی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مواد غذایی و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها پرداختند. در این تحقیق ١٢٠ نمونه مواد غذایی مختلف (لبنیات، شیرینی، گوشت خام و سبزیجات) جمع‌آوری و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک‌گذاری بر اساس دستورالعمل CLSI اجرا گردید. در نهایت، ٤٠ مورد (٣٣/٣%) جدایه استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد که بیش‌ترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، تیکوپلانین و متی سیلین به ترتیب٧٥%، ٩٠% و ٩٥% مربوط است. مقاومت به لینزولید، آزیترومایسین و متی سیلین به ترتیب ٢٥%، ٣٢% و ٣٥% بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود. فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در این تحقیق از مطالعه حاضر بیش‌تر بود که این دلیل بر تفاوت در تعداد نمونه مورد آزمایش و شرایط بهداشتی مکان‌های نمونه‌گیری می‌باشد. در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، علت احتمالی بالابودن میزان آلودگی نمونه‌های غذایی مورد آزمایش این است که این باکتری در مواد غذایی خام، رقیب خوبی برای سایر باکتری‌ها نیست؛ ولی در مواد غذایی پخته که سایر میکروارگانیزم‌ها از بین می‌روند، به راحتی رشد و آلودگی ایجاد می‌کند (٢٥).

Aycicek و همکاران، میزان آلودگی غذاها و سالادهای آماده مصرف به استافیلوکوکوس اورئوس را در رستوران‌های مراکز نظامی‌شهر آنکارا در ترکیه مورد بررسی قرار دادند و ٥١٢ نمونه شامل انواع سالاد، پیتزا و انواع غذاهای گوشتی را که به صورت سنتی تهیه می‌شوند، آزمایش کردند. ۴۸ نمونه (٩/٤%) به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولازمثبت آلوده بودند و در سالادها (سالاد روسی و سالاد سبزیجات) و نوعی غذای گوشتی (به نام میت بال) که در تهیه آن‌ها بیش‌تر از دست استفاده می‌شود، آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس به طور معناداری از سایر نمونه‌ها بیش‌تر بود. این موضوع احتمالاً می‌تواند ناشی از عدم رعایت بهداشت فردی توسط کارکنان، آلودگی مواد اولیه مصرفی یا آلودگی ثانویه باشد. به عنوان مثال طبق بررسی انجام شده، بسیاری از کارکنان شاغل در صنایع غذایی و رستوران‌ها دارای آلودگی باکتریایی هستند(٢٦).

مطالعه Loeto و همکاران مورد فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و انتروتوکسیژنیکی استافیلوکوکوس

اورئوس‌های جدا شده از قسمت‌های مختلف بدن افرادی که به نحوی در تهیه مـواد غـذایی نقـش داشـتند؛ نشـان می‌دهد که از مجموع ۲۰۰ فرد مورد آزمایش ۱۱۵ (۵۷/۵%) نفر حامل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بودند که از ۲۰٤ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس، ٦۳ (۳۰/۹%) نمونه از دست، ۹۱ (٤٤/٦%) نمونه از حفـره بینـی و ۵۰ (۲٤/۵%) نمونه از صورت جدا شد که ٤۳ (۲۱%) نمونه انتروتوکسیژنیک بودند. در مطالعهٔ حاضر تنها از حفـرهٔ بینی نمونه‌گیری به عمل آمد و همچنین فراوانی سویه‌های جدا شده از بینـی از مطالعـه Loeto و همکـاران بسـیار کمتر می‌باشد(۲۷).

در سال ۱۹۹۹ در مطالعه‌ای که به منظور تعیین سطح آلودگی باکتریایی در دست عرضه کنندگان مـواد غـذایی یک آشپزخانه بیمارستان نظامی صورت پذیرفت؛ در مجموع، ۱۸۰ نمونه از دست و دستکش کارکنان در طول آماده سازی مواد غذایی جمع آوری شد که از این تعداد، ۱٦ بـاکتری مختلـف جداسـازی گردیـد کـه شـایع‌ترین آن‌هـا استافیلوکوکوس اورئوس (۷۰%) بود (۲۸).

در سال ۲۰۰۷، Van و Leus، با تجزیه و تحلیل میکروارگانیسم‌های شاخص(اشرشیاکلی و اسـتافیلوکوکوس اورئوس) در دست و پیش‌بند عرضه‌کنندگان مواد غذایی نشان دادند که فراوانی کلی فرم‌ها در دست متصدیان مواد غذایی ٤۰% و در پیش‌بند آن‌ها ۲٦% بود. عدم رعایت بهداشت و عدم آموزش صـحیح کارکنـان بخـش طـبخ و همچنین تماس با ابزار آلوده طبخ می‌تواند عامل این آلودگی باشد. قرابت فراوانـی ایـن باکتری‌هـا بـین نمونـه‌های تحت مطالعه از ادوات طبخ و کارکنان، وجود این ارتباط احتمالی را تقویت می‌کند(۲۹).

Rall و همکاران در برزیل، با بررسی سواب‌های بینی ٦۸ نفر از تهیـه کننـدگان مـواد غـذایی، میـزان حـاملان استافیلوکوکوس اورئوس را ۲۲/۱% گزارش کردند. تفاوت در حجم نمونه، موقعیت جغرافیایی، سـطح بهداشـتی و همچنین ژنتیک افراد در استعداد به کلونیزاسیون، از جمله عواملی هستند که می‌توانند فراوانی ناقلین بینی را تحـت تأثیر قرار دهند(۳۰).

در مطالعه رسولی و همکاران در سال ۱۳۹٤، به منظور بررسی وضعیت آلودگی کارکنان، ادوات و مواد غـذایی بخش طبخ، ۲۲۰ نمونه جمع آوری گردید. ۳۹ (۵۰%) جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های کارکنان ، ۲٦ (٤۸/۱%) جدایه از ادوات طبخ و ۲۱ (۲۵%)جدایه از مواد غذایی جدا شد(۱۳).

موضوع مشترك در بین تمام ایـن تحقیقـات، گسـتردگی زیـاد سـویه‌های اسـتافیلوکوکوس اورئـوس مقـاوم بـه آنتی‌بیوتیک در دنیا می‌باشد. بنابراین، تشخیص سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم، به منظور جلـوگیری از گسـترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این‌که غذاهای سرد در ایران با دخالت دست تهیه مـی‌شـود و از طرف دیگر به دلیل بالا بودن احتمال آلودگی نیروی انسانی، انتقال باکتری‌ها به مصـرف کننـدگان بسـیار محتمـل

است. بنابراین، مصرف این نوع مواد غذایی آماده را باید به حداقل رساند. استفاده مداوم کارگران از دستکش برای طولانی مدت در شرایط عدم رعایت بهداشت شخصی توسط کارگران؛ ممکن است آثار معکوس داشته باشد. اگر چه استفاده از دستکش تاثیر قابل توجهی بر کاهش انتقال متقابل دارد؛ دستکش نسبت به بعضی از باکتری‌ها نفوذپذیر است. بر اساس نتیجهٔ تحقیق حاضر می‌توان گفت، از آن‌جا که مراحل تهیه و تولید همبرگر دست‌ساز، فلافل، سمبوسه، کباب و سالاد ماکارونی در ایران به صورت دستی است، احتمال آلودگی مواد غذایی از طریق نیروهای انسانی و انتقال سویه‌های مقاوم به افراد دیگر کاملاً وجود دارد. لذا آموزش بهداشت شخصی و محیط به منظور کاهش میزان استافیلوکوکوس اورئوس در افرادی که در تهیه غذا نقش دارند، از اهمیت بالایی برخوردار است.

منابع

1. Rahimi F, Karimi S. Antibiotic resistance pattern and prophage typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from chicken husbandries in tehran. *Iran. J Infect. Dis.Trop. Med.* 2014;18(62):17-22.
2. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009;7(9):629-41.
3. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011;60(2):95-103.
4. Khakpoor M, Ezzati M, Mahmoodi K, Khalaji Pirbaluti M, Khaksar R. Prevalence of Coagulase-positive Staphylococcus aureus in local Cheese in West Azerbaijan with culture and PCR method. *Iran. J. Nutr. Sci. Food Technol*. 2013;7(5):238-42.
5. Topley WWC, Carlton WW. Topley & Wilson's microbiology & microbial infections: Hodder Arnold;; 2005.
6. Razavilar V. Epidemiology of pathogenic microbes in food and food poisoning. Tehran: Tehran University Press; 2009.
7. Stark L. Staphylococcus aureus: aspects of pathogenesis and molecular epidemiology: Linköping University Electronic Press; 2013.
8. Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of Staphylococcus aureus. *J Young Invest*. 2006;15:1-8.
9. Narita S, Kaneko J, Chiba J-i, Piémont Y, Jarraud S, Etienne J, et al. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus: molecular analysis of a PVL-converting phage, *φSLT. Gene*. 2001;268(1):195-206.
10. Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, et al. Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus. *Arch. Virol.* 2004;149(9):1689-703.

11. Wilkinson D, Andrews S, Stewart P. Bacteriophages associated with multiresistant Staphylococcus aureus in Australia. *J. Med. Microbiol*. 1987;23(2):119-26.

12. Do kar J, Pallová P, Pantucek R, Rosypal S, Ruzicková V, Pantucková P, et al. Genomic relatedness of Staphylococcus aureus phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. *Can. J. Microbiol*. 2000;46(11):1066-76.

13. Walderhaug M. Bad Bug Book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: BrainFeed Press; 2014.

14. Farajvand N, Alimohammadi M. Prevalence of Staphylococcus aureus in Four Famous Brand ofDoogh Produced in Iran. *Iran. J. Health Environ*. 2014;7(1):85-94.

15. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, et al. Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol*. 2005;98(1):73-9.

16. NONAHAL F, RAHIMI E, ATAIESALEHI E. PREVALENCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUSIN MEAT AND MEAT PRODUCTS. 2015.

17. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014.

18. Kim T-W, Lee J-H, Kim S-E, Park M-H, Chang HC, Kim H-Y. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol*. 2009;131(2):265-71.

19. Masoumalinejad Z, Zinatizadeh MR, Meybodi SM, Zaree F. Isolation of microbial contamination of wet and dry sweets in Sirjan city. *J. Prev. Med*. 2017;4(1):60-7.

20. 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. Microbiol.* 2011;60(1):35-45.

21. Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Bakhtyari R, TP AM, Mardani N, 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).

22. Fluit AC, Visser MR, Schmitz F-J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. 2001;14(4):836-71.

23. TAJBAKHSH F, TAJBAKHSH E, MOMENI M. DETECTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND SALMONELLA TYPIMURIUM IN TRADITIONAL AND INDUSTRIAL OLIVIER SALADS IN SHAHREKORD CITY. 2015.

24. Hoseiyni SM, Arabestani MR, Mahmoodi H, Farhangara E. Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and Antibacterial Susceptibility Pattern in Staphylococcus aureus strains Isolated from Different Foods. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 2015;25(123):1-10.

25. ALIZADEH S, AMINI K. DETERMINING THE PRESENCE OF VIRULENCE GENES PANTON VALENTINE LEUKOCIDIN PVL AND METHICILLIN RESISTANCE GENE MECA IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM FOOD SAMPLES BY MULTIPLEX PCR AND ANTIBIOTIC RESISTANCE. 2015.

26. Aycicek H, Cakiroglu S, Stevenson TH. Incidence of Staphylococcus aureus in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. Food control. 2005;16(6):531-4.

27. Loeto D, Matsheka M, Gashe B. Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of Staphylococcus aureus strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. *J. Food Prot.* 2007;70(12):2764-8.

28. Ayçiçek H, Aydoğan H, Küçükkaraaslan A, Baysallar M, Başustaoğlu AC. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. Food control. 2004;15(4):253-9.

29. Lues J, Van Tonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. Food control. 2007;18(4):326-32.

30. Rall V, Sforcin J, Augustini V, Watanabe M, Fernandes Jr A, Rall R, et al. Detection of enterotoxin genes of Staphylococcus sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz. J. Microbiol*. 2010;41(1):59-65.

Investigation of *Staphylococcus aureus* contamination in Food Samples and determining of its epidemiological relationship with theirs processing workers by polymerase chain reaction

Seyed Mansour Meybodi[1], Zahra masoumalinejad[2], Maryam Fakhrabadi[3]

1. **Department of Microbiology, Faculty of Science, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Mazandaran, Iran**
2. **Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran**
3. **Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran**

***Corresponding author: zahra.masoumy6623@gmail.com**

Abstract

Background: Fast and cold foods, due to their high diversity, availability, lack of cooking time and due to these foods are not very processed and may be in contact with hand of restaurant workers at the time of preparation, the microbial risks of consumers from this Products have increased.

Material and Methods: In this research, 50 samples of food products (handmade hamburger, falafel, potato sambosa, pizza sombosa, kebab, pasta salad) from 10 fast food stores in Sirjan city in a three month period from the beginning of July to the end of September 2017 were collected. Also, 36 samples were collected from their employees and analyzed by microbiological and molecular tests for the presence of *Staphylococcus aureus*.

Results: Food contamination with *Staphylococcus aureus* was 6% and contamination of the staff was 19.44%. The highest susceptibility to Cotrimoxazole antibiotics (SXT), Zoxidium stiffness (COX), Ciprofloxacin (CP) was 100, 90, 90% respectively, and the highest resistance to antibiotics were kanamycin (K), linzoleide (LINEZ), azithromycin (AZI) 60, 35, 30% respectively were reported.

Conclusion: Based on the results of this research, it can be said that since the stages of preparing handmade hamburger, falafel, potato sambosa, pizza sombosa, kebab, pasta salad in Iran are manually, there is a complete risk of food contamination through human resources. Therefore, personal and environmental health education in order to reduce the rate of *Staphylococcus aureus* in people involved in the preparation of food is very important.

Conflict of interest: None declared

Keywords: Staphylococcus aureus, Microbial Contaminants, Foodstuffs, PCR