بررسی فراوانی سویه‌های استافیلوکوکی جدا شده از مواد غذایی مختلف و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴

لاله هویدا[۱]، سینا مباشری زاده[۲*]، سودابه رستمی[۲]، بهروز عطایی[۳]، عباس داعی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *mobasherizadeh@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

چکیده

در کشورهای در حال توسعه حضور و تنوع گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* در مواد غذایی به طور گسترده مطالعه نشده است. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی توزیع گونه‌های *استافیلوکوکوس* در مواد غذائی متنوع و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها در شهر اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴بود. تعداد ۱۹۴ نمونه مختلف مواد غذایی از مناطق مختلف شهر اصفهان جمع آوری شد و از نظر وجود گونه‌های متنوع *استافیلوکوکوس* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات فنوتیپی برای جداسازی اولیه و بررسی توالی ژن *16SrRNA* به منظور شناسایی گونه‌ها انجام شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها با روش انتشار دیسک در سطح آگار نیز مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۹۴ نمونه مواد غذائی، ۹۲ جدایه (۴۷/۵ درصد) کوکسی گرم مثبت شناسایی و جداسازی شد. از این بین، ۸۴ جدایه *استافیلوکوکوس*، ۷ جدایه *ماکروکوکوس* و یک جدایه *میکروکوکوس* تشخیص داده شد. بیشترین فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* جدا شده مربوط به جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی ۲۵ درصد (۲۱/۸۴)، *استافیلوکوکوس ویتولینوس* ۱۵/۵ درصد (۱۳/۸۴) و *استافیلوکوکوس سوکسینوس* ۱۱/۹ درصد (۱۰/۸۴) بود. بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۵۹/۵ درصد) و تتراسایکلین (۰/۲ درصد) و کمترین میزان مقاومت در برابر لووفلوکساسین، ریفامپیسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین تشخیص داده شد. بررسی گونه‌های *استافیلوکوکوس* برای تحقیقات اپیدمیولوژی اهمیت دارد. همچنین تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های *استافیلوکوکی* جداشده از مواد غذایی نشان می‌دهد که مواد غذایی به عنوان یک خطر بالقوه برای سلامتی افراد جامعه و پراکندگی هرچه بیشتر مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. با انجام روش *16SrRNA* شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس* بهتر انجام می‌شود تا امنیت غذایی افزایش یابد و از هزینه‌های درمان اضافی جلوگیری شود.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس*، مواد غذایی، مقاومت آنتی بیوتیکی، بررسی توالی DNA.

مقدمه

در سراسر جهان بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی به عنوان یک مسئله مهم در سلامت عمومی مطرح می‌باشند. سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization; WHO)، بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی را به عنوان بیماری‌های عفونی و یا سمی تعریف کرده است (Abebe et al., 2020). براساس تخمین این سازمان در سال ۲۰۱۰، بیش از ۳۰ پاتوژن موجود در مواد غذایی عامل ۶۰۰ میلیون بیماری بوده اند و آلودگی مواد غذایی با باکتری‌های مضر، انگل‌ها، ویروس‌ها و مواد شیمیایی منجر به بیش از ۲۰۰ نوع بیماری می‌شود (Griffith., 2006 ; Abebe et al., 2020). همچنین مسمومیت غذایی ممکن است به علت وجود مواد سمی شیمیایی، توکسین‌های میکروبی و یا سایرمواد مضر ایجاد شوند. در کل، بیماری های ناشی از مواد غذایی سالانه مسئول تقریباً ۷۶ میلیون بیماری، ۳۲۵۰۰۰ بستری شدن و ۵۲۰۰ مورد مرگ و میر می‌باشند (Ameme et al., 2016). در میان باکتری‌ها، جنس *استافیلوکوکوس* یکی از متداول‌ترین عوامل مسمومیت غذایی است. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی (Staphylococcal Food Poisoning; SFP) که بطور معمول به توکسین

استافیلوکوکوس ارتباط داده می‌شود اغلب به دنبال بلعیدن غذای حاوی حداقل ۰/۱ میکروگرم از انتروتوکسین *استافیلوکوکی* رخ می‌دهد (Aye et al., 2014). *استافیلوکوکوس*ها معمولاً به دو گروه *استافیلوکوکوس‌های* کوآگولاز مثبت (Coagulase-Positive Staphylococci; CPS) و استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی (Coagulase-Negative Staphylococci; CNS) تقسیم می‌شوند. *استافیلوکوکوس اورئوس* گونه شاخص گروه کوآگولاز مثبت است و عامل اکثر موارد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌باشد (Layer et al., 2006; Karimi et al., 2017). گونه‌های *استافیلوکوکوس* سم‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند علائمی از اختلالات دستگاه گوارش تا فلج و مرگ ایجاد کنند (Schmitt et al., 1990). گونه‌های *استافیلوکوکوس* جزئی از فلور نرمال پوست و مخاط انسان‌ها و حیوانات مختلف مانند گاو و گوسفند هستند. همچنین آن‌ها در منابع محیطی و طیف وسیعی از مواد غذایی یافت می‌شوند (Even et al., 2010). توانایی *استافیلوکوکوس*ها برای رشد در طیف‌های دمایی، pH واسمولاریته گسترده، سبب شده تا بتوان این باکتری را از مواد غذایی متفاوت مانند کالباس، سالاد و محصولات لبنی فرآوری شده جداسازی نمود (Karimi et al., 2017). افزون بر آن، اغلب *استافیلوکوکوس*ها بعنوان آغازگر (Starter) در برخی غذاهای تخمیری مانند پنیر برای ایجاد طعم و عطر استفاده می‌شوند (Ruaro et al., 2013). علاوه بر این شیرینی‌ها نیز می‌توانند منبع آلودگی و انتقال *استافیلوکوکوس*ها باشند. در بررسی مواد غذائی از نظر وجود آلودگی به این باکتری روش‌های مختلفی وجود دارد. در چندین مطالعه گزارش شده است که برای بررسی آلودگی مواد غذایی با *استافیلوکوکوس*ها روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های فنوتیپی ارجحیت دارد (Heikens et al., 2005; Layer et al., 2006) یکی از روش‌های مولکولی مناسب، ارزیابی پلی مورفیسم در ژن‌های خانه دار مانند ژن *16SrRNA* به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تعیین توالی است. با توجه به اهمیت تشخیص وجود *استافیلوکوکوس*‌های مختلف در مواد غذائی، هدف از این مطالعه بررسی فراوانی گونه‌های *استافیلوکوکوس* با استفاده از روش‌های فنوتیپی و روش مولکولی تعیین توالی ژن *16SrRNA* و همچنین ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها از مواد متنوع غذایی جمع‌آوری شده در شهر اصفهان در سال ۹۵-۱۳۹۴ بوده است.

روش کار

نمونه گیری

در این مطالعه مقطعی- توصیفی تعداد ۱۹۴ نمونه مواد غذایی (متعلق به ۱۸ کارخانه متفاوت از ۲۹ مغازه و ۳۰ کارگاه شیرینی پزی) شامل ۵۷ نمونه از انواع شیرینی (۳۰ نمونه شیرینی‌تر، ۲۷ نمونه شیرینی دانمارکی یا کیک عصرانه)، ۶۳ نمونه از فرآورده‌های پروتئینی (۳۴ نمونه سوسیس یا کالباس مرغ و ۲۹ نمونه سوسیس یا کالباس گوشت) و ۷۴ نمونه محصولات لبنی پاستوریزه (۲۰ نمونه شیر، ۱۸ نمونه پنیر، ۱۸ نمونه ماست، ۸ نمونه دوغ، ۵ نمونه خامه و ۵ نمونه کشک) از مراکز مختلف شهر اصفهان در فاصله زمانی خرداد ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ به روش خوشه ای خریداری گردید. نمونه‌ها حداکثر ظرف مدت ۲۴-۱۲ ساعت و با رعایت زنجیره سرد (برای مواد غذایی فاسد شدنی) به آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال داده شد.

جداسازی و شناسایی *استافیلوکوکوس*

برای جداسازی *استافیلوکوکوس*، ابتدا ۱۰ گرم یا ۱۰ میلی لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده با ۹۰ میلی‌لیتر بافر استریل فسفات سالین (PBS) با pH برابر۷/۴ ، به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه به آرامی روی شیکر همگن شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به لوله های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع ژیولیتی-کانتونی (Giolitti-contoni broth) حاوی ۰/۱ میلی لیتر محلول یک درصد

تلوریت پتاسیم (HiMedia, India) اضافه و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (Aye et al., 2014; Ebrahimzadeh et al., 20). سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع برداشته و بر روی محیط کشت برد پارکر آگار (Baird Parker Agar) (HiMedia, India) حاوی امولسیون تلوریت زرده تخم مرغ، به صورت خطی کشت و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شد (Aye et al., 2014). کلنی های مشکوک به *استافیلوکوکوس* که ظاهری سیاه رنگ با هاله شفاف ، براق و محدب در محیط برد پارکر آگار داشتند خالص سازی و با استفاده از تست‌های استاندارد میکروبیولوژی شامل رنگ آمیزی گرم، واکنش کاتالاز، بررسی مقاومت به باسیتراسین (۰۴/ ۰ واحد)، تست اکسیداز، واکنش کوآگولاز لوله‌ای، تست DNase و رشد روی محیط مانیتول سالت آگار (Quelab, Canada) شناسایی شدند.

(Khoori et al., 2017; Azizkhani et al., 2018).

جهت کنترل کیفی آزمایش کوآگولاز لوله‌ای از *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Aye et al., 2014).

شناسایی مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA کروموزومی به وسیله روش ساده جوشاندن انجام شد. بطور خلاصه، چند کلنی خالص از باکتری به ۱۰۰ میکرولیتر بافر (Tris TE EDTA pH 7.8, 1Mm,) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس سوسپانسیون باکتری‌ها در ۹۰۰۰×g برای ۳۰ ثانیه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و مایع روئی آن که حاوی DNA بود در ۲۰- درجه برای انجام PCR نگهداری شد (Sedaghat et al., 2017).

شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکی

برای تکثیر ژن *16SrRNA* از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی براساس پرایمر عمومی باکتریایی 27F (5′-AGAGTTTGATYMTGGCTC AG-3′) و 515R (5′-TTA CCGCGG CKG CTG GCA C-3′)

که توسط شرکت بیونر کره سنتز شده بود استفاده شد (Bakrt et al., 2003). برای واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X، ۲ میکرولیتر از ($MgCL_2$ (50 mM، ۱میکرولیتر از (dNTP 2.5 mM)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (20 pmol/µL)، ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (50 µL) (سیناکلون، تهران، ایران) و ۳۵/۶ میکرولیتر از آب استریل استفاده گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradiant, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در آخر طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام (Baker et al., 2003). در نهایت محصول PCR در کنار نشانگر ۱۰۰bp (شرکت Thermo، آمریکا) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ شده با اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داک (شرکت Biorad، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

برای تعیین توالی کردن DNA محصولات تکثیر شده ژن *16SrRNA* محصولات به شرکت پیشگام (تهران، ایران) فرستاده شد و در آنجا با استفاده از ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) و روش تعیین توالی سنجر و به صورت دوطرفه توالی محصولات تعیین شد. پرایمرهای بکار رفته برای تعیین توالی ژن *16SrRNA* همان پرایمرهای PCR بودند. توالی‌ها با اطلاعات نوکلئوتیدی *استافیلوکوکوس‌های* تعیین توالی شده براساس *16SrRNA* که در سایت (NCBI http://www. ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

در دسترس می‌باشند، مقایسه و بلاست شدند. توالی‌های *استافیلوکوکوس*ها با نرم افزار Clustal Wv.20 بررسی و درخت فیلوژنی آن‌ها با نرم افزار MEGA نسخه ۶ و با روش رسم شد (Tamura et al., 2013; Argudin., 2010).

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جهت بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* از روش انتشار دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار (Biolif, Italia) مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2017) استفاده شد. میزان حساسیت با استفاده از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک (شرکت Mast، انگلیس) شامل پنی‌سیلین (۱۰µg)، سفوکسیتین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، کلیندامایسین (۲µg)، تری متوپریم-سولفومتاکسازول (۱/۲۵/۲۳/۷۵ µg)، کلروآمفینیکل (۳۰µg)، ریفامپین (۵ µg)، لینزولید (۳۰µg)، لووفلوکساسین (۵ µg) و اریترومایسین (۱۵ µg) سنجیده شد. براساس معیارهای FDA و EUCAST، در صورتی که باکتری *استافیلوکوکوس* حداقل به یک عامل در سه یا چند دسته آنتی بیوتیکی مقاومت داشته باشد به عنوان جدایه *استافیلوکوکوس* با مقاومت چندگانه دارویی یا MDR (Multi Drug Resistant; MDR) در نظر گرفته می‌شود (Magiorakos et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. نتایج بررسی تست‌ها با استفاده از آزمون کای اسکوئر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این آنالیز آماری درجه معنی داری با میزان P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فنوتیپی

از مجموع ۱۹۴ نمونه، ۹۲ جدایه باکتری (۴۷/۵ درصد) کوکسی گرم مثبت مشکوک به *استافیلوکوکوس* در محیط کشت برد پارکرآگار خالص سازی شد. جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* پس از شناسایی توسط رنگ‌آمیزی گرم به عنوان کوکسی گرم مثبت و با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی، کاتالاز مثبت، مقاوم به باسیتراسین و اکسیداز مثبت گزارش شد. جدایه‌ها توانایی تخمیر مانیتول در محیط کشت مانیتول سالت آگار و تولید آنزیم DNase بر روی محیط DNase آگار را داشتند. از مجموع ۹۲ نمونه کوکسی گرم مثبت، ۸۴ نمونه جدایه *استافیلوکوکوس* (۴۰ جدایه از شیرینی، ۳۲ جدایه از فرآورده‌های پروتئینی و ۱۲ جدایه از محصولات لبنی)، یک جدایه *میکروکوکوس* و ۷ جدایه *ماکروکوکوس* تشخیص داده شد. براساس واکنش کوآگولاز لوله‌ای ۷۵ درصد (۶۳/۸۴) از جدایه‌ها کوآگولاز منفی و ۲۵ درصد (۲۱/۸۴) از جدایه‌ها کوآگولاز مثبت بودند (جدول ۱). یافته‌ها نشان داد بین نوع مواد غذایی و حضور باکتری رابطه معنی داری وجود دارد ($P<۰/۰۰۱$) که کمترین مقدار در لبنیات (۳/ ۱۴درصد) و فرآورده‌های پروتئینی (۳۸ درصد) و بیشترین مقدار در شیرینی جات (۴۷/۷ درصد) مشاهده شد.

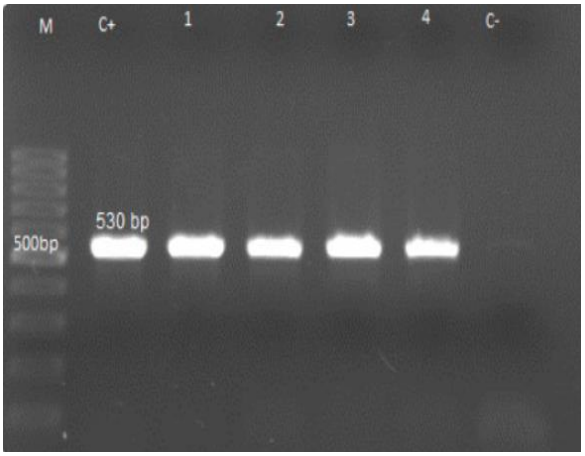
جدول ۱. فراوانی جدایه های کوآگولاز منفی و کوآگولاز مثبت به تفکیک نوع نمونه

نوع نمونه	کوآگولاز مثبت (CPS) درصد (تعداد)	کوآگولاز منفی (CNS) درصد (تعداد)
شیرینی جات	٪۳۰ (۲۱/۴۰)	٪۷۰ (۲۸/۴۰)

محصولات لبنی	٪ ۷۵ (۹/۱۲)	٪ ۲۵ (۳/۱۲)
فرآورده‌های پروتئینی	۸/٪۱۸ (۶/۳۲)	۸۱/٪۲ (۲۶/۳۲)

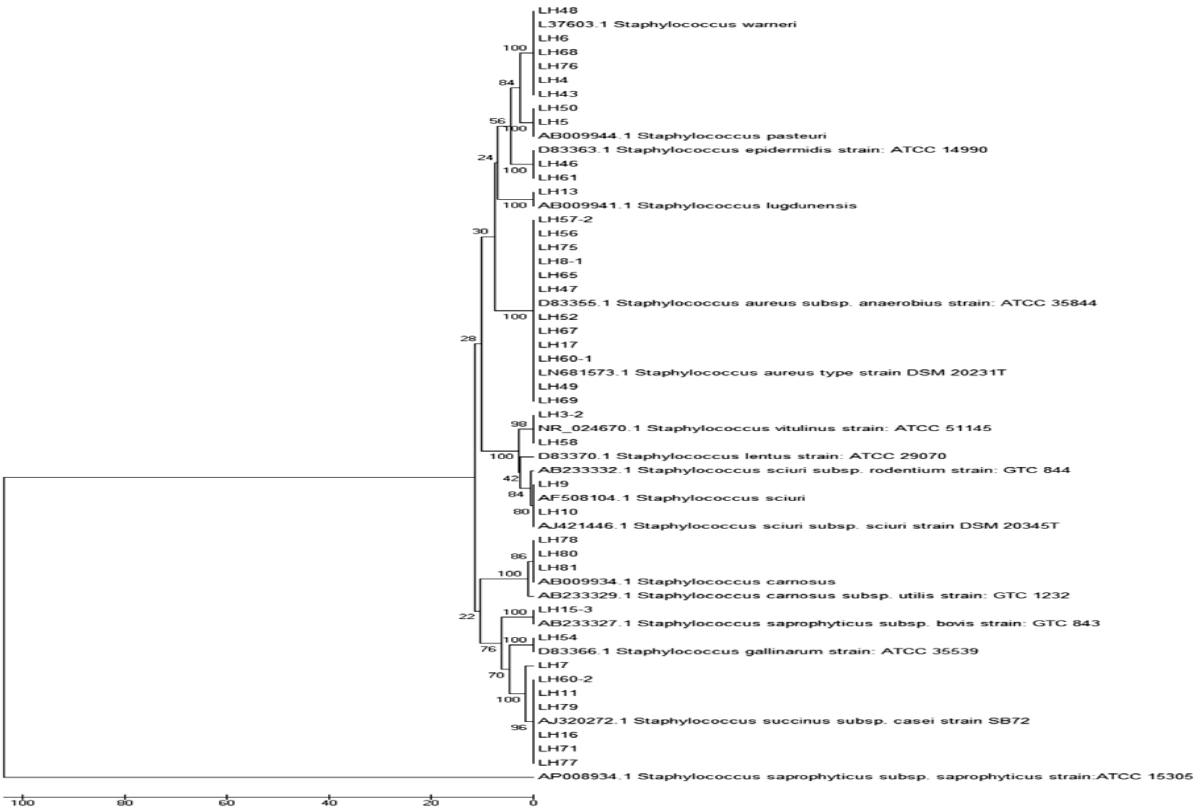
شناسائی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* جدا شده براساس روش مولکولی

بعد از انجام تست‌های فنوتیپی جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* براساس تعیین توالی *16SrRNA* آنالیز شدند. محصول PCR قطعه‌ای به طول ۵۳۰ جفت باز بود (شکل ۱). از ۸۴ جدایه در مجموع ۱۵ گونه و زیرگونه شناسایی شد. مطابق با درخت فیلوژنی *استافیلوکوکوس وارنری* (*S. warneri*) و *استافیلوکوکوس پاستوری* (*S. pasteuri*) ارتباط نزدیک و تقریباً ۸۰ درصدی دارند، همه این جدایه‌ها بجز یک مورد در بین فرآورده‌های پروتئینی و شیرینی جات پراکنده شده‌اند. همچنین *استافیلوکوکوس ویتولینوس* (*S. vitulinus*) و *استافیلوکوکوس سیوری* (*S. sciuri*) ارتباط کامل نزدیکی از نظر تکاملی و فیلوژنی دارند. *استافیلوکوکوس وارنری* و *استافیلوکوکوس پاستوری* با بوت استراپ (bootstrap) ۸۴ درصد ارتباط ژنتیکی نزدیک باهم دارند. بعلاوه با بوت استراپ ۱۰۰ درصدی *استافیلوکوکوس ویتیلینوس* و *استافیلوکوکوس سیوری* در ارتباط کامل با یکدیگر می‌باشند (شکل ۲).



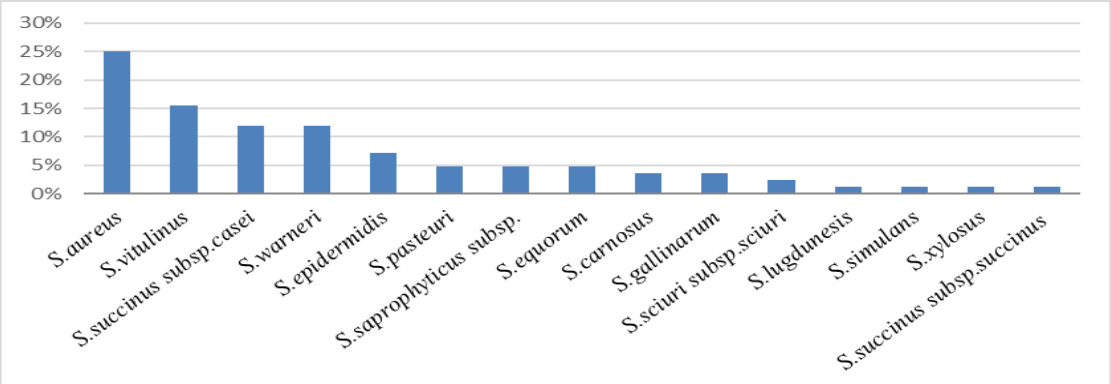
شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR ژن *16SrRND* در جدایه های استافیلوکوکوس از مواد غذایی.

M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی، +C: کنترل مثبت، ۱ تا ۴: نمونه های مثبت، -C: کنترل منفی.



شکل ۲. درخت فیلوژنی ترسیم شده از جدایه‌های *استافیلوکوکوس* مواد غذایی مختلف براساس *16SrRND*

نمودار ۱. درصد فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* در تمام محصولات غذایی



براساس نمودار (۱) بیشترین فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* جدا شده از محصولات غذایی مربوط به جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی ۲۵ درصد (۲۱/۸۴)، *استافیلوکوکوس ویتولینوس* ۱۵/۵ درصد (۱۳/۸۴) و *استافیلوکوکوس سوکسینوس* زیرگونه‌ی *کازئی* (*S.succinus subsp.casei*) ۱۱/۹ درصد (۱۰/۸۴) می‌باشد. *استافیلوکوکوس سیمولنس* (*S. simulans*) *استافیلوکوکوس سوکسینوس* زیرگونه‌ی سکیوری (*S. sciuri subsp sciuri*) (کواگولاز منفی)، *استافیلوکوکوس لوگدننسیس* (*S. lugdunesis*) (کواگولاز منفی) و *استافیلوکوکوس زایلوزوس* (*S. xylosus*) (کواگولاز منفی) با فراوانی یک جدایه در بین محصولات غذایی کمترین جدایه‌های جداسازی شده می‌باشند.

جدول۲: درصد فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* در انواع محصولات غذایی

نام جدایه	نوع مواد غذایی		
	شیرینی جات (تعداد=۴۰)	محصولات لبنی (تعداد= ۱۲)	فراورده‌های پروتئینی (تعداد= ۳۲)
S.aureus	(۱۲) ۳۰٪	(۳) ۲۵٪	(۶) ۱۸/۷۵٪
S.vitulinus	(۲) ۵٪	(۳) ۲۵٪	(۸) ۲۵٪
S.epidermidis	(۲) ۵٪	(۲) ۱۶/۸۰٪	(۶) ۱۸/۷۵٪
S.pasteuri	(۲) ۵٪	(۱) ۸/۳۰٪	(۱) ۳/۱۰٪
S.gallinarum	(۱)٪ ۲/۵۰	(۱) ۸/۳۰٪	(۱) ۳/۱۰٪
S.succinus subsp.casei	(۷) ۱۷/۵٪	۰٪	(۲) ۶/۲۵٪
S.warneri	(۶) ٪۱۵	۰٪	(۲) ۶/۲۵٪
S.carnosus	(۳) ۷/۵	۰٪	۰٪
S.sciuri subsp	(۲) ٪۵	۰٪	۰٪
S.succinus	(۱) ۲/۵۰٪	۰٪	۰٪
S.lugdunesis	(۱) ۲/۵۰٪	۰٪	۰٪
S.simulans	۰٪	(۱) ۸/۳۰٪	٪۰
S.xylosus	۰٪	(۱) ۸/۳۰٪	۰٪
S.saprophyticus subsp	(۱)۲/۵۰٪	۰٪	(۳) ۹/۴۰٪
S.equorum	۰٪	۰٪	(۳) ۹/۴۰٪

در نمونه‌های شیرینی‌جات *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی ۳۰ درصد (۱۲/۴۰) و *استافیلوکوکوس گالیناروم* (*S. gallinarum*)، *سوکسینوس*، *لوگدننسیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (*S. saprophyticus*) با فراوانی ۱ جدایه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان فراوانی را نشان دادند. همچنین در محصولات لبنی بیشترین و کمترین میزان فراوانی مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵ درصد (۳/۱۲) و *استافیلوکوکوس گالیناروم*، *استافیلوکوکوس سیمولنس*، *استافیلوکوکوس زایلوزوس* و *استافیلوکوکوس پاستوری* با فراوانی یک جدایه بود. در فرآورده‌های پروتئینی بالاترین فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* جداسازی شده مربوط به *استافیلوکوکوس ویتولینوس* ۲۵ درصد (۸/۳۲) و پایین‌ترین فراوانی جداسازی شده مرتبط با *استافیلوکوکوس گالیناروم* و *استافیلوکوکوس پاستوری* با فراوانی ۱ جدایه بود (جدول۲).

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس* بطور خلاصه در جدول شماره ۳ آورده شده است. بیشترین حساسیت در بین جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین، ریفامپیسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین (۱۰۰ درصد) دیده شد و بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۵۹/۵ درصد) و تتراسایکلین (۲۰/۲ درصد) وجود داشت. در مجموع می‌توان گفت میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک پنی سیلین در هرسه گروه بالا بوده است. همچنین بر اساس آزمون کای اسکوئر میزان مقاومت به تتراسایکلین P=۰/۰۰۸، لینوزولاید P= ۰/۰۲ و کلرآمفنیکل P=۰/۰۱۴ در بین *استافیلوکوکوس*‌های جدا شده از انواع مواد غذایی تفاوت معنی‌داری داشت اما میزان مقاومت به بقیه آنتی‌بیوتیک ها در بین سه دسته مواد غذایی تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

براساس نتایج به دست آمده، ۹ جدایه (۱۰/۷درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی (MDR) می‌باشند. ۵ مورد (۱۵/۶ درصد) مقاومت چندگانه در نمونه‌های پروتئینی، ۲ مورد (۵ درصد) در نمونه شیرینی و ۲مورد (۱۶/۷ درصد) در نمونه لبنیات دیده شد که براساس آزمون کای اسکوئر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۲۵). ویژگی‌های کامل نمونه‌های MDR در جدول شماره ۴ آورده شده است.

جدول۳: مقایسه توزیع فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در *استافیلوکوکوس*‌های جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی مختلف

	میزان مقاومت (درصد)				
آنتی‌بیوتیک	انواع محصولات غذایی(۸۴ نمونه) تعداد (درصد)	شیرینی (۴۰نمونه) تعداد (درصد)	جات لبنیات (۱۲نمونه) تعداد (درصد)	فرآورده‌های پروتئینی (۳۲نمونه) تعداد (درصد)	P-value
سیپروفلوکساسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱
اریترومایسین	۹ (۱۰/۷)	۴ (۱۰)	۲(۱۶/۷)	۳ (۹/۴)	۰/۷۹
جنتامایسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱
کلیندامایسین	۱ (۱/۲)	۱ (۲/۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰/۷۲

تتراسایکلین	۱۷(۲۰/۳)	۴ (۱۰)	۱(۸/۳)	۱۲ (۳۷/۵)	۰/۰۰۸
کوتریموکساسول	۵ (۷/۲)	۲ (۵)	۱(۸/۳)	۳ (۹/۴)	۰/۷۶
پنی سیلین	۵۱ (۵۹/۵)	۲۱(۵۲/۵)	۹ (۷۵)	۲۱ (۶۵/۶)	۰/۲۹
ریفامپیسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱
لوفلوکساسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱
لینزولاید	۲ (۲/۴)	۰ (۰)	۲ (۱۶/۷)	۰ (۰)	۰/۰۰۲
کلروآمفینکل	۲ (۲/۴)	۰ (۰)	۰ (۰)	۲ (۶/۲)	۰/۰۱۴
سفوکسیتین	۱۲(۱۴/۲)	۶ (۱۵)	۲ (۱۶/۷)	۴ (۱۲/۵)	۰/۹۲

جدول ۴. خصوصیات جدایه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) :P: Penicillin, E: Erythromycin, LZD: Linezolid, T: Tetracycline, FOX: Cefoxitin, CD: Clindamycin, TS: Trimethoprim & Sulfamethoxazole, C: Chloramphenicol

نوع مواد غذایی	CoPS/CoNS	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	نام جدایه
شیرینی	CoNS	P, TS, CD	*S.pasteuri*
شیرینی	CoNS	E, P, TS, FOX	*S.epidermidis*
پروتئین	CoNS	E, T, P, TS, FOX	*S.warneri*
پروتئین	CoNS	P, C, T	*S.saprophyticus*
پروتئین	CoNS	P, C, T	*S.saprophyticus*
پروتئین	CoNS	P, E, TS, FOX	*S.epidermidis*
پروتئین	CoNS	P, E, TS, FOX	*S.epidermidis*
لبنیات	CoPS	P, T, LZD	*S.aureus*
لبنیات	CoNS	P, E, TS, FOX	*S.epidermidis*

بحث

استافیلوکوک ها گسترش و پراکندگی بالایی در مواد غذایی دارند و سومین عامل ایجاد بیماری با مواد غذایی در سراسر دنیا به شمار می آیند (Khoori et al., 2017). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس*ها در شیرینی‌جات ۴۷/۷ درصد، فرآورده‌های پروتئینی ۳۸ درصد و محصولات لبنی ۱۴/۳ درصد بود.

در نتایج مطالعه ما، بیشترین میزان جدایه‌های *استافیلوکوکوس* در نمونه شیرینی‌جات (۴۷/۷ درصد) مشاهده شد. در مطالعه‌ی خوری و همکاران در شهر تربت حیدریه، ۱۶/۶ درصد نمونه‌های مواد غذایی مختلف به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند و بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه‌های شیرینی (۱۹/۷ درصد) بود (Khoori et al., 2017). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، نیک‌نیاز و همکاران (۲۰۱۱) در شهر تبریز، میزان آلودگی شیرینی‌جات به استافیلوکوکوس *اورئوس* را ۳۱ درصد گزارش کردند (Nikniaz et al., 2011). نتایج مطالعات فوق با نتایج ما همخوانی دارند. مطابق با گزارش موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (شماره ۲۳۹۵)، *استافیلوکوکوس اورئوس* نباید از کشت شیرینی و کیک جدا شود. از آنجائی که شیرینی‌ها در تماس با سطوح و دست کارکنان هستند، بنابراین ممکن است به وسیله کارکنان کارگاه و محیط آلوده شوند.

در مطالعه‌ای نونهال و همکاران (۲۰۱۴)، شیوع آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت و فرآورده‌های گوشتی در شهر اصفهان را بررسی و در مجموع ۵۵/۶ درصد آلودگی را گزارش کردند (Nonahal et al., 2014). میزان آلودگی نمونه فرآورده‌های پروتئینی (۳۸ درصد) مطالعه ما کمتر از نتایج مطالعه فوق بود. اختلاف در میزان آلودگی فرآورده‌های پروتئینی می‌تواند ناشی از کشتار در فصل‌های مختلف سال ، تعداد و نوع نمونه‌های مورد مطالعه و روش‌های متفاوت کشتار و بسته بندی آن‌ها باشد (Sarrafzadeh Zargar et al., 2014).

در مطالعه‌ی دیگری که حسینی و همکاران در شهر همدان انجام دادند نتایج نشان داد که فرآورده‌های پروتئینی با فراوانی ۱۰/۳ درصد بیشترین آلودگی را در نمونه‌های جمع‌آوری شده داشتند و در محصولات لبنی نیز ۹/۲ درصد آلودگی میکروبی گزارش شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد اختلاف معنی‌داری بین محصولات مختلف از نظر آلودگی *استافیلوکوکوسی* وجود نداشته است (Hosseini., 2015). نتایج ما با مطالعه فوق همخوانی ندارد و میزان آلودگی در محصولات و فرآورده‌های مختلف ما بیشتر ارزیابی شد. همچنین در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین حضور باکتری و نوع مواد غذایی دیده شد. این اختلاف در میزان آلودگی در بین مواد پروتئینی و لبنی می تواند به دلیل روش بررسی میکروبی باشد. بطور کلی محصولات لبنی به دلیل تماس کمتر با افراد و روش‌های مختلف آلودگی‌زدایی (پاستوریزه یا استریلیزه کردن)، آلودگی میکروبی کمتری نشان می‌دهند (Knill and Kennedy., 2013).

مطالعات انجام شده در ایتالیا میزان آلودگی محصولات لبنی با *استافیلوکوکوس*، ۰/۵ درصد و در کشورهای چین و بنگلادش میزان آلودگی انواع محصولات پروتئینی با *استافیلوکوکوس* را به ترتیب ۱/۳ درصد و ۲۲ درصد گزارش کردند (Carfora et al., 2015; Islam et al., 2019, Yang et al., 2016). شیوع آلودگی با *استافیلوکوکوس* در مواد غذایی در مطالعه ما بیشتر از نتایج مطالعات در سایر کشورها است. زیرا کشورهای پیشرفته با کمک متخصصان بهداشتی اکثر بیماری‌های منتقله از مواد غذایی را کنترل می‌کنند درحالیکه کشورهای درحال توسعه از جمله ایران به علت وجود مشکلات بهداشتی و اقتصادی در سیستم تهیه مواد غذایی و عدم توانایی ارتقاء آن همچنان شاهد آلودگی با میزان بیشتری هستند (Khoori et al., 2017).

مطالعه‌ی ما برای اولین بار با استفاده از روش مولکولی *16SrRNA* به شناسایی طیف وسیعی از گونه‌های *استافیلوکوکوس* در بین مواد غذایی مختلف پرداخته است.

در نتایج مطالعه ما ۱۵ گونه و زیرگونه را با تعیین توالی قسمتی از ژن *16SrRNA* شناسایی شد و این روش به طور موفقیت‌آمیزی قادر به شناسایی طیف وسیعی از گونه‌ها بود. مشابه با نتایج ما، مطالعه‌ی چاکراورتی و همکارانش (۲۰۰۷) بیان کردند، تعیین توالی با روش مولکولی *16SrRNA* برای تمایز در بین گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مناسب است (Chakravorty et al., 2007). در بسیاری از مطالعه‌ها روش توالی‌یابی جهت شناسایی سویه‌های باکتری‌ها در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا دقت بالایی برای تشخیص گونه‌های نزدیک بهم دارد (Islam et al., 2019, Yang et al., 2016).

در مطالعه حاضر، بیشترین فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس* از محصولات غذایی مربوط به جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵ درصد) ، *استافیلوکوکوس ویتولینوس* (۱۵/۵ درصد) و *استافیلوکوکوس سوکسینوس* زیرگونه‌ی *کازئی* (۱۱/۹ درصد) می‌باشد. *استافیلوکوکوس سیمولنس*، *استافیلوکوکوس سوکسینوس* زیرگونه‌ی *سکیوری*، *استافیلوکوکوس لوگدننسیس* و *استافیلوکوکوس زایلوزوس* کمترین جدایه‌های (با فراوانی یک جدایه در بین محصولات غذایی) جداسازی شده بود. در مطالعه‌ای مشابه، کازئیس نانز و همکارانش (۲۰۱۶) از روش توالی‌یابی ناحیه V5 ژن *16SrRNA* برای شناسایی ۴۵ جدایه *استافیلوکوکوس* استفاده کردند. در این بین ۴۲ گونه و زیرگونه در نمونه‌های پنیر شناسایی شد که تنها ۳ گونه آن تأیید شد که در جنس *استافیلوکوکوس* قرار داشتند (Casaes Nunes., 2016). مطالعه‌ای در کشور برزیل توسط کانها و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی تنوع جدایه‌های ۸۸ نمونه مواد غذایی از قبیل نان، پنیر، شیر، فرآورده‌های شیر و پروتئین پرداختند. نتایج ژنتیکی نشان داد بیشترین میزان فراوانی جدایه‌ها، مربوط به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*S. epidermidis*) ، *استافیلوکوکوس زایلوسوس* (۲۰ درصد) و *استافیلوکوکوس وارنری* (۲۰ درصد) بودند (Cunha MdL et al., 2006).

در مطالعه‌ای دیگر، بین و همکارانش (۲۰۱۷) در کشور اتیوپی آلودگی استافیلوکوکوسی را در محصولات لبنی و پروتئینی بررسی کردند. یافته‌ها نشان داد، *استافیلوکوکوس اورئوس* با (۱۶ درصد) و *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* (*S. intermedius*) (۱۰/۸ درصد) از فراوان‌ترین جدایه‌ها بودند (Beyene et al., 2017). نتایج فراوانی جدایه‌ها در مطالعه ما با نتایج سایر گزارش‌ها متفاوت است. تفاوت در میزان فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نقاط جهان می‌تواند به دلیل سطح بهداشت متفاوت، نحوه تولید و توزیع مواد غذایی، نوع مواد غذایی و منطقه جغرافیایی مورد مطالعه باشد (Knill and Kennedy., 2013). شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس*، به غیر از *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معمول در آزمایشگاه‌های مرجع ایمنی و مواد غذایی انجام نمی‌شود. به هرحال شناسایی این گونه‌ها برای تحقیقات اپیدمیولوژی و توسعه شیوه‌های مدیریتی اختصاصی برای پیشگیری از ابتلا به مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوسی* می‌تواند دارای اهمیت باشد (Beyene et al., 2017).

در مطالعه حاضر جدایه‌های *استافیلوکوکوس* آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۹/۵ درصد)، تتراسایکلین (۲۰/۲ درصد) و سفوکسیتین (۱۴/۲ درصد) مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین، ریفامپیسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین (۱۰۰ درصد) حساس بودند. علاوه براین، مقاومت چندگانه دارویی (MDR) در ۱۰/۷درصد جدایه‌ها وجود داشت. در تحقیق ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۱۶)، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فرآورده‌های لبنی شهر آذربایجان به پنی‌سیلین (۹۹/۴)، ونکومایسین (۸۸/۵ درصد)، و متی‌سیلین (۷۷/۱ درصد) گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2016).

در مطالعه انجام شده در چین، یان و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس بدست آمده* از مواد غذایی گزارش کردند که بیشترین مقاومت در برابر پنی سیلین (۲۸ درصد) و به دنبال آن تتراسیکلین (۲۸ درصد) ارزیابی شده است که مشابه با

نتایج ما است (Yan et al., 2012). در هر دو مطالعه ذکر شده بیشترین میزان مقاومت مربوط به پنی‌سیلین بود و مشابه نتایج مطالعه ما بود. مقاومت بالای جدایه‌های *استافیلوکوکوس* به یک نوع آنتی‌بیوتیک می‌تواند به علت استفاده بیش از اندازه آن آنتی‌بیوتیک برای کنترل عفونت و درمان دام و طیور در آن کشور باشد (Khoori et al., 2017). همان طور که نتایج مطالعات نشان می‌دهد مقاومت نسبتاً بالا در جدایه‌های *استافیوکوکوس* موادغذایی دارای اهمیت است و نیاز به توجه دارد زیرا انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به وسیله باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی و یا از طریق بلعیدن سویه‌های مقاوم موجود در مواد غذایی ، یکی از مهمترین عوامل انتقال مقاومت آنتی بیوتیک محسوب می‌شود (Pereira et al., 2009).

مطالعه امین الاسلام و همکارانش (۲۰۱۹) در بنگلادش نشان داد که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس* جدا شده از انواع گوشت به ترتیب مربوط به اریترومایسین (۷۴ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۹ درصد)، اگزاسیلین (۳۱ درصد) بوده است. همچنین ۳۷ درصد جدایه‌ها MDR بودند (Islam et al., 2019). در مطالعه‌ی فوق میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و میزان MDR با نتایج ما مغایرت دارد. مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* در این پژوهش و سایر مطالعه‌ها نشان داده است که میزان بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف در نواحی متفاوت می‌تواند به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی باشد که به عنوان محرک رشد به دام‌ها داده می‌شود، به ویژه موادی که معمولاً به طور مشترک بین انسان و حیوان مصرف می‌شود (Pereira et al., 2009). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سایر گونه‌های *استافیلوکوکوس نیز در* آلودگی محصولات مختلف غذایی نقش دارند، از این رو بهتر است آزمایشگاه‌های مواد غذایی به شناسایی گونه‌های غیرمعمول اهمیت دهند. از آنجائی که در کشور ما، تست‌های فنوتیپی محدودی برای شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس* در آزمایشگاه مواد غذایی استفاده می‌شود، بیشتر جدایه‌ها یا به طور کامل شناسایی نمی‌شوند یا اشتباه تشخیص داده می‌شوند. با توجه به اهمیت مسمومیت غذایی، لازم است تا با به کارگیری روش‌های مولکولی دقیق مانند *16SrRNA* به شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس* لااقل به صورت دوره‌ای پرداخت.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه اخیر، بیشترین تعداد *استافیلوکوکوس* جداسازی شده از فراورده‌های پروتئینی، محصولات لبنی و شیرینی متعلق به *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان نسبتا زیادی (۲۵ درصد) از فراورده‌های غذایی مختلف جدا شد. مطابق با نتایج ما، بکار بردن روش *16SrRNA* برای شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس* در محصولات غذایی مناسب و ضروری می‌باشد. بررسی گونه‌های *استافیلوکوکوس* برای تحقیقات اپیدمیولوژی حیاتی است. همچنین تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های *استافیلوکوکوسی* جداشده از مواد غذایی نشان می‌دهد که مواد غذایی ممکن است یک خطر بالقوه برای سلامتی انسان باشد.

منابع

1. Abebe, E., Gugsa, G., Ahmed, M. 2020. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. J of Tropical Medicine. 2020:19.

2. Ameme, D. K., Abdulai, M., Adjei, E. Y., Afari, E. A., Nyarko, K. M., Asante, D., & Wurapa, F. 2016. Foodborne disease outbreak in a resource-limited setting: a tale of missed opportunities and implications for response. Pan African Medical Journal. 23(1): 1-9.

3. Aye, R., Gautam, A., Reyaz, A., Vinson, H., Gibbs, P. S. 2014. Evaluation of selected toxigenic genes and antimicrobial agent susceptibility in Staphylococcus spp isolated from foods purchased from North Dakota grocery stores. J. Food Nutr. Disor. 3(3): 2-5.

4. Azizkhani, M., Tooryan, F. 2018. Contamination of Traditional Cheese in Mazandaran Province to Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus. J Mazandaran Univ Med Sci. 28(163): 47-56.

5. Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of microbiological methods. *55*(3): 541-555.

6. Beyene, T., Hayishe, H., Gizaw, F., Beyi, A. F., Abunna, F., Mammo, B., Abdi, R. D. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. BMC research notes. 10(1): 1-9.

7. Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Amatiste, S. 2015. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Central Italy. Int Dairy J. 42:12-15.

8. Casaes Nunes, R.S., Pires de Souza, C., Pereira K.S., Del Aguila, E.M., Flosi Paschoalin, VM. 2016. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. J Dairy Sci, 99: 2641-2653.

9. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J microbiological methods. 69(2): 330-339.

10. Cunha, M. D. L. R. D. S. D., Peresi, E., Calsolari, R. A. O., & Araújo Júnior, J. P. 2006. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods.Braz.J. Microbiol. 37(1): 70-74.

11. Ebrahimzadeh, K., and Hanifian,. S. 2016. Contamination rate, antibiotic susceptibility profile, biofilm formation and presence of TSST-1 gene in *Staphylococcus aureus* isolates. J Food Hygiene. 6 (24):1-14.

12. Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N. B., Chacornac, J. P., Lebert, I., Donnio, P. Y. 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. Int. J. Food Microbiol. 139(1-2): 87-95.

13. Griffith, CJ. 2006. Food safety: where from and where to. Br Food J. 108(1): 6-15.

14. Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 43(5): 2286-2290.

15. Hosseini, S. M., Arabestani, M. R., Mahmoodi, H., Farhangara, E. 2015. Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and antibacterial susceptibility pattern in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 25(123): 1-10.

16. Islam, M. A., Parveen, S., Rahman, M., Huq, M., Nabi, A., Khan, Z. U. M., Wagenaar, J. A. 2019. Occurrence and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in processed raw foods and ready-to-eat foods in an urban setting of a developing country. Front. Microbial.10: 503.

17. Karimi, M., Esfahani, B. N., Halaji, M., Mobasherizadeh, S., Shahin, M., Havaei, S. R., Havaei, S. A. 2017. Molecular characteristics and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in tertiary care hospitals of Isfahan, Iran. Infez Med. 25(3): 234-240.

18. Khoori, E., Ataye Salehi, A., khoori M. 2017. Determination of antibiotic resistance pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the food samples by Multiplex PCR. Journal of food Microbiology. 4(4):21-30.

19. Knill, CJ, and Kennedy, JF. 2013. Foodborne Infections and Intoxications, J.

Glenn Morris, ME Potter (Eds.). Academic Press/Elsevier, San Diego, CA, USA, 541 pp. 94-99.

20. Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, KA, Konig, W., Konig, B, 2006. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 44(8):2824-2830.

21. Magiorakos, AP., Srinivasan, A., Carey RB., Carmeli Y., Falagas ME., Giske CG., et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 18(3):268-81.

22. Nikniaz, Z., Mahdavi, R., Jalilzadeh, H., Vahed, J.M. 2011. Evaluation of microbial contamination in cream filled pastries distributed in Tabriz confectionaries. J Food Technology and Nutrition. 29(1): 66 – 71.

23. Nonahal, F., Rahimi, E., AtaieSalehi, E. 2014. Prevalence of Staphylococcus aureusin meat and meat products. Journal of food Microbiology. 1(3):41-46.

24. Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food microbiology. 26(3): 278-282.

25. Ruaro, A., Andrighetto, C., Torriani, S., Lombardi, A. 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. Food microbiology. 34(1):106-111.

26. Sarrafzadeh Zargar, M. H., Hosseini Doust, R., Mohebati Mobarez, A. 2014. *Staphylococcus aureus* enterotoxin a gene isolated from raw red meat and poultry in Tehran, Iran. Int J Enteric Pathog. 2(3): 1-6.

26. Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schmidt-Lorenz, W. 1990. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of Staphylococcus aureus strains isolated from foods. Int. j. food microbiology, 11(1): 1-19.

27. Sedaghat, H., Esfahani, B. N., Mobasherizadeh, S., Jazi, A. S., Halaji, M., Sadeghi, P. & Havaei, S. A. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among Staphylococcus aureus isolates in Isfahan, Iran. Iran j microbial. 9(5): 264.

28. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. SMBE. 30(12): 2725-2729.

29. Yang, X., Zhang, J., Yu, S., Wu, Q., Guo, W., Huang, J., Cai, S. 2016. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureu*s in retail ready-to-eat foods in China. Front microbial. 7:816.

30. Yan, X., Wang, B., Tao, X., Hu, Q., Cui, Z., Zhang, J., Grundmann, H. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. Am Soc Microbiol 78(18): 6637-6642.

Prevalence of *Staphylococci* spp and their antibiotic susceptibility pattern isolated from foodstuffs in Isfahan in 2015-2016

Hoveida L[1], Mobasherizadeh S[2*], Rostami S[2], Ataie B[3], Daei A[3]

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Infectious Diseases and Tropical Medicin Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

***Corresponding author:** *mobasherizadeh@gmail.com*

Received: 2 November 2020 Accepted: 31 January 2021

Abstract

In developing countries, the presence and diversity of *Staphylococcus* species in foodstuffs have not been comprehensively studied. So, the present study aimed to investigate the dissemination of *Staphylococcus* spp. and their antimicrobial susceptibility pattern isolated from foodstuffs in Isfahan in 2015-2016. A total of 194 foodstuff samples were collected from different parts of Isfahan city and processed for the presence of *Staphylococcus* spp. The conventional tests were used for the primary detection of bacteria, and the sequence analysis of 16S rRNA was used for the species identification. The antimicrobial susceptibility pattern of isolates was determined by the disk diffusion method. From a total of 194 food samples, 92 Gram-positive cocci (47.5%) were isolated. Of them, 84 isolates were *Staphylococcus* spp., 7 *Macrococcu*s spp., and one *Micrococcus* spp. The most prevalent species were *S. aureus* 25% (21/84), *S. vitulinus* 15.5% (13/84), and *S. succinus sub casei* 11.9% (10/84). The most antibiotic resistance rates were against penicillin (59/5%) and tetracycline (20.2%), while the lowest antibiotic resistance rates were observed for levofloxacin, rifampicin, gentamicin, and ciprofloxacin. Characterization of *Staphylococcus* species is important for epidemiological investigations. Proper identification and management practices, including analysis of 16S rRNA for species identification, should be considered to increase food safety and prevent extra treatment costs.

Keywords: *Staphylococcus*; foodstuff; antibiotic resistance; DNA sequence analysis.

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

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.