ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین جدا شده از شیرینی‌های خامه‌ای در شهرستان شهرکرد

زهرا هاشمی، مجتبی بنیادیان*، حمداله مشتاقی

گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

***نویسنده مسئول:** *boniadian@sku.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳

چکیده

استافیلوکوک اورئوس یکی از عوامل شایع مسمومیتهای غذایی در انسان است. رشد این باکتری و ترشح انتروتوکسین در مواد غذایی باعث بروز این مسمومیت می شود که در برخی اوقات بخصوص در نوزادان، کودکان و افراد مسن می تواند موجب بروز عوارض وخیم و حتی مرگ شود. هدف مطالعه حاضر تعیین میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در شیرینی‌های خامه‌ای ارائه شده در قنادی‌های شهرستانهای شهرکرد، سامان و بن و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها است. تعداد ۱۵۰ نمونه بطور تصادفی از شیرینی‌های خامه‌ای نمونه گیری به عمل آمد. آزمون‌های میکروبی برای جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام و کلنی‌های مشکوک با آزمونهای تکمیلی از جمله رنگ آمیزی گرم، کاتالاز و کوآگولاز تایید و جهت بررسی تولید انتروتوکسین (A، B، C، D) در واکنش Multiplex PCR آزمایش شدند. مقاوت آنتی بیوتیک جدایه‌ها با روش دیسک انتشاری انجام شد. در مجموع ۳۸ (۲۵/۳ درصد) نمونه به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند، میزان آلودگی در فصل تابستان ۲۸ درصد و در فصل زمستان ۲۲/۷ درصد بود. ۱۳ جدایه (۳۴/۳ درصد) واجد ژن‌های مولد انتروتوکسین بودند . از بین جدایه های *استافیلوکوک اورئوس* ۱۱ جدایه (۲۹ درصد) واجد ژن *SEA* و ۲ جدایه (۵/۳ درصد) واجد ژن *SEC* بودند. از بین جدایه های انتروتوکسیژن ۹ (۷۰ درصد) جدایه به فصل تابستان و ۴ (۳۰ درصد) جدایه آن به زمستان مربوط بود. هیچ یک از جدایه‌ها واجد ژن‌های *SED* , *SEB* نبودند. آزمون آنتی بیوگرام نشان داد که جدایه‌ها نسبت به سولفامتوکسازول بیشترین حساسیت (۹۷/۴ درصد) و نسبت به اریترومایسین بیشترین مقاومت (۶۳/۲ درصد) را دارا می باشند. در کل ۱۰۰ درصد جدایه های انتروتوکسیژن به پنی سیلین و ۹۵ درصد جدایه‌های واجد ژن*SEA* به اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. بطور کلی نتایج نشان داد که شیرینی‌های خامه‌ای به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که بالقوه قادر به تولید آنتروتوکسین هستند آلوده بوده و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های واجد ژنهای آنتروتوکسین به مراتب بیشتر از جدایه های فاقد این ژنها است.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، شیرینی‌های خامه‌ای، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

علی رغم ارتقاء و بهبود شرایط و تکنیک‌های تولید، سلامت و ایمنی غذا همواره یکی از مسائل مهم بهداشت عمومی است. بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالانه بیش از ۳۰ درصد مردم در کشورهای صنعتی از بیماری‌های ناشی از غذا رنج می برند. مساله مهم دیگر در بخش تولیدات مواد غذایی، رشد متناسب تولید با عرضه و تقاضا می باشد که باید هم بهداشتی و هم با کیفیت بالا باشد. آلودگی مواد غذایی دلایل متعددی دارد که شامل: رعایت نکردن بهداشت، غفلت و سهل انگاری و کمبود آگاهی بهداشتی و سودجویی‌ها، می باشد. یکی از موارد رایج آلودگی مواد غذایی وجود باکتری‌ها و سم حاصل از آن‌ها در مواد غذایی است که باعث غیر بهداشتی و غیر قابل مصرف شدن غذا می گردد. امروزه با افزایش تنوع غذایی و گرایش به غذاهای فانتزی، مصرف محصولات قنادی جایگاه محکم تری در سبد غذایی انسان پیدا کرده است. یکی از این محصولات، شیرینی‌های خامه‌ای است که به دلیل وجود تخم مرغ، شیر، اسیدیته پایین و بالا بودن آب فعال، جزء مواد غذایی مستعد به آلودگی میکروبی من جمله باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است (مرتضوی و کاشانی نژاد،۱۳۹۲). در اکثر کشورها، از نظر بیماری زایی، این باکتری پس از سالمونلا و *کلستریدیوم پرفرینجنس*، جزء باکتری‌های عفونت زا و مسمومیت زا به

شمار می رود. انسان‌ها و اغلب حیوانات اهلی میزبان این باکتری به شمار می روند (Munoz and Ananou, Shimelis and Mekonnen 2015., 2006). بنابراین *استافیلوکوکوس اورئوس* می تواند در اکثر محصولات غذایی که به طور مستقیم توسط انسان دستکاری می شوند حضور داشته باشد. این باکتری علاوه برایجاد مسمومیت‌های غذایی، عامل زخم‌های پوستی، پنومونی، سپتی سمی و عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک است که گاهی به درمان نیز مقاوم می باشند (جزنی و بابازاده، ۱۳۹۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* باکتری فرصت طلب سطوح بدن جانداران خونگرم است که وجود آن در غذا معمولا مبین آلودگی به وسیله پوست، ترشحات دهان یا بینی افرادی است که با غذا سروکار دارند که ممکن است مستقیما در خلال تولید به وسیله کارگرانی که دارای زخم‌های استافیلوکوکی در روی دست یا دیگر سطوح بدن هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه وارد غذا می شود. هم چنین شیرخام و فرآورده‌های شیری غیر پاستوریزه (خامه) نیز می تواند حاوی تعداد زیادی *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد که در نتیجه ورم پستان استافیلوکوکی یا آلودگی‌های محیطی وارد شیر شده است(کریم، ۱۳۶۰).

استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه تولید انتروتوکسین‌ها مانند A، B، C، D و E یکی از عوامل شایع مسمومیت غذایی است که با علائم تهوع، استفراغ، اسهال و کاهش فشار خون همراه است، که در برخی گروههای سنی مانند کودکان و افراد مسن خطرناک می باشد (مرتضوی و ضیاالحق، ۱۳۹۴). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در کشورهای جهان سوم اسهال شایع ترین عامل مرگ و میر کودکان در پنج سال اول زندگی محسوب می شود، به طوری که برآورد شده، میزان مرگ و میر کودکان سالانه ۱۲۰ میلیون نفر است که ۵ میلیون مورد آن به علت بیماری های اسهالی است (WHO, 1988). سروتیپ DوA این باکتری، عامل اصلی مسمومیت غذایی می باشند (اصلانی مهر و همکاران، ۱۳۹۲). انتروتوکسین باکتری نسبت به اغلب آنزیم‌های معده و روده و حرارت مقاوم بوده و در حین پخت غذا، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و یا پس از خورده شدن توسط آنزیم‌های گوارشی از بین نمی رود، ولی با دمای بالایی که برای استریل نمودن غذاهای کنسرو شده به کار می رود، غیرفعال می شود. بنابراین انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی نسبت به شرایطی که خود باکتری را از بین می برد (حرارت، اسیدیته بالاو...) مقاوم اند (جزنی و بابازاده، ۱۳۹۲). در این نوع مسمومیت غذایی، مرگ و میر بسیار نادر است و بهبودی طی ۴۸-۲۴ ساعت بعد از بروز علائم رخ می دهد. در ایجاد مسمومیت، تیپ A و سپس تیپ D باکتری شایع تر و نوع E آن کمتر باعث مسمومیت شده است (مرتضوی و ضیاالحق، ۱۳۹۴).

علاوه بر روش PCR (Polymerase chain reaction)، روش‌های دیگری نیز برای شناسایی سویه های توکسیژنیک این باکتری وجود دارد، از جمله: لاتکس آگلاتیناسیون، الیزا، ایمنوکروماتوگرافی، لاتکس ایمنواسی و مگنتیک ایمونواسی، که در همه ی این روش‌ها نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی می باشد تا بتوان نسبت به شناسایی این سموم اقدام نمود (سالاری شریف و همکاران، ۱۳۹۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از محیط می باشد که از عفونت‌های نسبتا خفیف در بافت نرم تا عفونت‌های سیستمیک تهدید کننده سلامت انسان است. شیوع سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف و حامل ژن‌های تولید کننده توکسین، به یک امر جدی و خطرناک تبدیل شده است. این سویه‌ها در کنار مقاومتی که پیدا کرده اند قدرت تهاجمی بیش تری نسبت به سویه‌های فاقد توکسین دارند که علاوه بر مقاومت در مقابل درمان، بیمار را با شدت بیش تری آزار می دهد، که این امر موجب گسترش بیماری‌های ناشی از این باکتری و افزایش مرگ و میر و هزینه درمان و غیره می شود(عبداللهی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به تنوع ژنومی گونه‌ها و توکسین سویه‌ها و هم چنین افزایش مقاومت این باکتری، لزوم تشخیص

سریع باکتری به منظور کاهش انتقال و شیوع این باکتری امری ضروری است. با توجه به این که مطالعه ی مدونی در خصوص میزان آلودگی به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرینی‌های خامه‌ای تولید شده در شهرکرد و توانایی توکسین زایی آن‌ها انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای تولید شده در شهرستان شهرکرد به *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن‌های تولیدکننده ی انتروتوکسین و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها طراحی و اجرا شد.

روش کار

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی مقطعی است که از آذر ماه ۱۳۹۷ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۸ در شهرستان شهرکرد انجام شد.

نمونه برداری

نمونه گیری از شیرینی‌های خامه‌ای از دو نوع نان خامه ای و میوه ای به شرح ذیل انجام شد. مجموعا ۱۵۰ نمونه از ۴۰ قنادی در سطح شهرستان شهرکرد، به روش کاملا تصادفی، نمونه گیری شد. بطوریکه در هر فصل ۷۵ نمونه شامل ۳۵ نان خامه ای و ۳۵ شیرینی خامه ای میوه ای اخذ شد. این نمونه‌ها در ظرف‌های استریل و در مجاورت یخ، در مدت زمان حداکثر ۱ ساعت به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی منتقل شد.

کشت و جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

برای جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲۵ گرم از نمونه را به ۲۲۵ میلی لیتر محیط استریل TSB شرکت (ایبرسکو، ایران) انتقال داده و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. پس از آن مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه به روش خطی در پلیت حاوی محیط Baired Parker Agar (مرک، آلمان) کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس کلنی‌های سیاه رنگ باهاله نفتی شفاف (هضم لسیتین) به عنوان کلنی مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا سازی و روی محیط آگار مغذی شرکت (ایبرسکو، ایران) خالص سازی شدند. بر روی کلنی‌های خالص سازی شده آزمون‌های تاییدی و بیوشیمیایی شامل: رنگ آمیزی گرم و کاتالاز و کوآگولاز انجام و موارد کوکسی گرم مثبت، کاتالاز و گواگولاز مثبت به عنوان باکتری *استافیلوکوک اورئوس* جدا و در محیط TSB در یخچال نگهداری شد (خرم روز و همکاران، ۱۳۹۴. سعادتی و همکاران، ۱۳۸۸).

استخراج DNA

برای استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن استفاده شد بدین ترتیب که ابتدا با لوپ استریل، ۳-۲ کلنی باکتری از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط آگار مغذی برداشته و به داخل میکروتیوب درب دار پلاستیکی استریل، که حاوی ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل بود انتقال داده و حل شد و سپس ۱۰ ثانیه مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ کرده و از مایع روئی که حاوی DNA باکتری بود در آزمون PCR استفاده شد. غلظت DNA قبل از استفاده، توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد (Ertas et al, 2010)

آزمون PCR برای شناسایی ژنهای انتروتوکسین نوع(A-B-C-D)

آزمون Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است برای شناسایی ژن های توکسین های *SEA, SEB, SEC, SED* انجام شد(سعادتی و همکاران، ۱۳۸۸).

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی (شرکت سیناکلون) برای شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های A,C,D, B *استافیلوکوکوس اورئوس*

Target Genes		Oligonucleotide sequence(5'-3')	Size (bp)
SEA	F	5' TTG CGA AAA AAG TCT GAA TTG C 3'	552bp
	R	5' ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA AGT A 3'	
SEB	F	5' TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG 3'	477bp
	R	5'AGG TAC TCT ATA AGT GCC TGC CT 3	
SEC	F	5' CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG 3	271bp
	R	' 5' TTA TAT CAA AAT CGG ATT AAC ATT ATC 3	
SED	F	5' CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG 3'	319bp
	R	5'TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC 3'	

برای انجام آزمون PCR ۲۱ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۲ میکرولیتر از مولتی پرایمرهای تهیه شده با غلظت ۲۰ پیکومول و ۲ میکرولیتر از DNA الگو در میکروتیوب مخلوط و توسط دستگاه ترموسایکلر (بیورد، آمریکا) تکثیر DNA انجام شد. برای کنترل منفی از ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل و برای کنترل مثبت از سوش استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC25923) موجود در آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی استفاده شد. سیکل دمایی برای تکثیر DNA به شرح جدول (۲) اعمال گردید. پس از پایان سیکل حرارتی، الکتروفورز محصول PCR توسط ژل آگاروز ۱/۵ درصد و رنگ Safe stain (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد و سپس تصاویر توسط دستگاه ژل داک بدست آمد.

جدول ۲: سیکل دمایی آزمون Multiplex PCR برای شناسایی ژنهای انتروتوکسین *استافیلوکوک ارئوس*

مرحله	زمان/ دما (درجه سانتیگراد)
واسرشت اولیه	دقیقه ۴/ ۹۴
واسرشت	ثانیه ۴۵/ ۹۴
اتصال	ثانیه ۴۵/ ۵۴
توسعه	دقیقه ۱/ ۷۲
تعداد سیکل	۳۲
توسعه نهایی	دقیقه ۵/ ۷۲

آزمون آنتی بیوگرام

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* طبق دستور العمل CLSI و روش دیسک انتشاری بر روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت ایبرسکو) با استفاده از دیسکهای آنتی بیوتیک (شرکت پادتن طب، ایران) مورد نظر (پنی سیلین µg ۱۰، سیپروفلوکساسین µg ۵، داکسی سایکلین ۳۰µg، سولفامتوکسازول µg ۳۰، اریترومایسین µg ۱۵) انجام شد (CLSI, 2018). برای این منظور ابتدا سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و توسط سوآپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی با یک پنس استریل با فاصله مناسب بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. بر اساس جدید ترین معیار CLSI، قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه گیری و با

کمک جدول استاندارد، نتایج به صورت حساس (S)، مقاوم (R) و نیمه حساس (I) ثبت شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از جمع آوری داده‌ها، یافته‌ها با استفاده از نرم افزار Sigma stat 4 در قالب جداول فراوانی، نمودار و شاخص‌های توصیفی بیان گردید. همچنین نتایج بدست آمده از آلودگی در دو فصل و نوع شیرینی توسط آزمون مربع کای (Chi square) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج کشت و جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

بر اساس نتایج از تعداد ۱۵۰ نمونه شیرینی خامه‌ای،۳۸(۲۵/۳ درصد)نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. میزان آلودگی در فصل تابستان ۲۸ درصد و در فصل زمستان ۲۲/۷ درصد بود. نتایج آزمون آماری نشانگر این بود که در مجموع بین میزان آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای در دو فصل گرم و سرد اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ($P<0.05$). بین میزان آلودگی شیرینی خامه‌ای میوه ای در دو فصل زمستان و تابستان اختلاف آماری معنی دار وجود دارد ($P<0.05$) ولی بین میزان آلودگی نان خامه ای در دو فصل تابستان و زمستان اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$).(جدول ۳)

جدول ۳: نتایج کشت و جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از شیرینی‌های خامه‌ای

تعداد کل نمونه‌ها	۱۵۰	
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۸(۲۵/۳درصد)	
نوع شیرینی	فصل	
	زمستان	تابستان
نان خامه ای	۱۱(۱۴/۷درصد)[a]	۱۱(۱۴/۷درصد)[a]
میوه ای	۶(۸درصد)[b]	۱۰(۱۳/۳درصد)[a]
جمع کل	۱۷(۲۲/۷درصد)[b]	۲۱(۲۸درصد)[a]

حروف غیر مشابه در هر سطر و ستون نشانگر وجود اختلاف معنی دار است ($P<0.05$)

۳-۲ نتایج شناسایی ژنهای تولید کننده انتروتوکسین

از ۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ، ۱۱ (۲۹ درصد) جدایه حاوی ژن *SEA* و ۲ (۵/۳ درصد) جدایه حاوی ژن *SEC* بودند. در هیچ کدام از جدایه‌ها ژنهای انتروتوکسین *SEB* و *SED* شناسایی نشد (شکل ۱).

از کل ۳۸ جدایه، در فصل زمستان ۴ جدایه و در تابستان ۹ جدایه واجد ژنهای انتروتوکسین بودند. آزمون آماری نشان داد که بین فصل و آلودگی به جدایه‌های واجد انتروتوکسین ارتباط معنی دار وجود دارد ($P<0.05$) بطوریکه فراوانی *استافیلوکوک ارئوس* واجد ژنهای انتروتوکسین در فصل تابستان بیشتر از فصل زمستان بود (جدول ۳). ۹ جدایه از نان خامه ای و ۴ جدایه از نوع میوه ای، واجد ژن‌های انتروتوکسین بودند که تفاوت معنی داری بین دو نوع شیرینی و آلودگی به جدایه‌های واجد ژنهای انتروتوکسین مشاهده شد ($P<0.05$)، (جدول ۵).

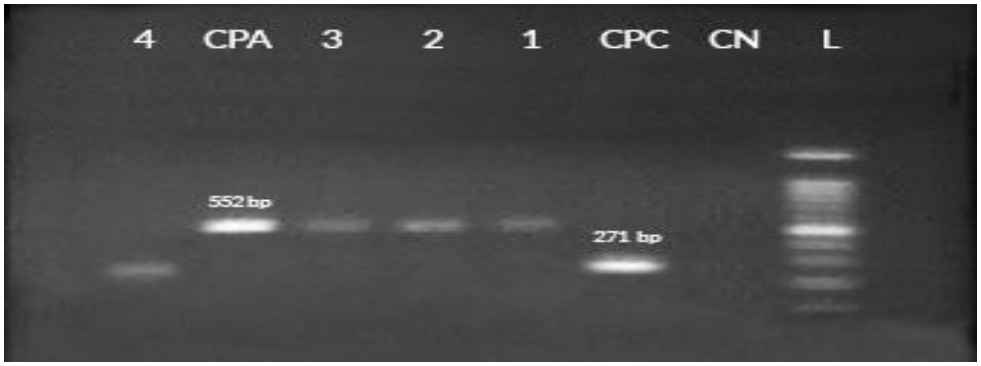
جدول ۴: فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوک اورئوس* واجد ژن انتروتوکسین و ارتباط آن با فصل و نوع شیرینی

تعداد کل سویه‌های انتروتوکسین زا: (۳۴/۲۶ درصد) ۱۳		
فصل	زمستان ۴ (۵۲/۱۰)[b]	تابستان ۹ (۶۸/۲۳)[a]
نوع	میوه‌ای ۴ (۱۰/۵۲)[b]	نان خامه ای ۹ (۶۸/۲۳)[a]

حروف غیر مشابه در سطر و ستون نشانگر وجود اختلاف معنی دار است ($P<0.05$)

جدول ۵: فراوانی ژنهای آنتروتوکسین در باکتری های *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده از انواع شیرینی‌های خامه‌ای

نوع شیرینی	ژن			
	SEA	*SEB*	*SEC*	*SED*
نان خامه ای	۷ (۱۹/۴درصد)	۰	۰	۲ (۵/۲۶ درصد)
میوه ای	۴ (۱۰/۶درصد)	۰	۰	۰
کل	۱۱ (۲۹ درصد)	۰	۰	۲ (۵/۳ درصد)



شکل ۱: ژن‌های انتروتوکسین باکتری های *استافیلوکوک اورئوس* جداشده از شیرینی‌های خامه‌ای

L: مارکر 100 bp،

CN: کنترل منفی، CPC: کنترل مثبت ژن انتروتوکسین C (باند۲۷۱ bp)

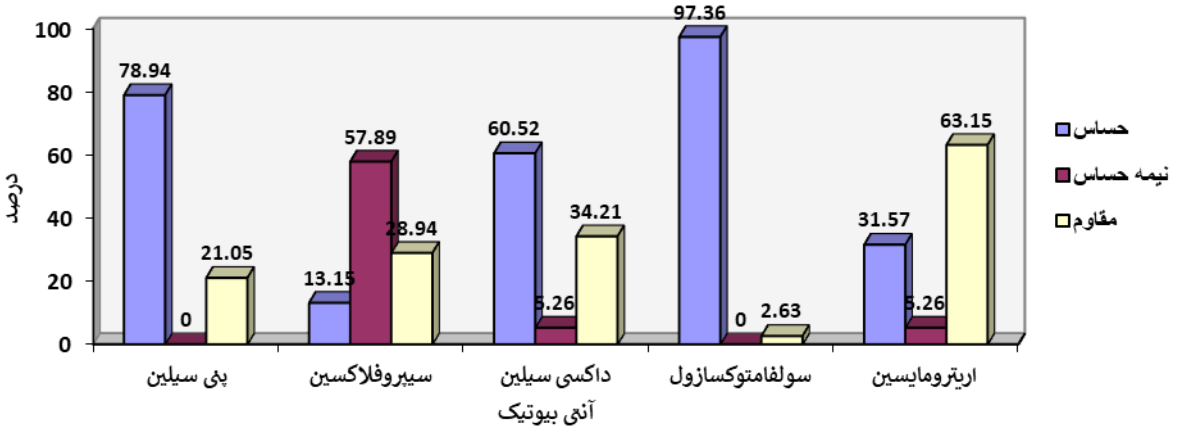
4: نمونه مثبت مربوط به ژن انتروتوکسین C،

CPA: کنترل مثبت مربوط به ژن انتروتوکسین A (باند۵۵۲ bp)،

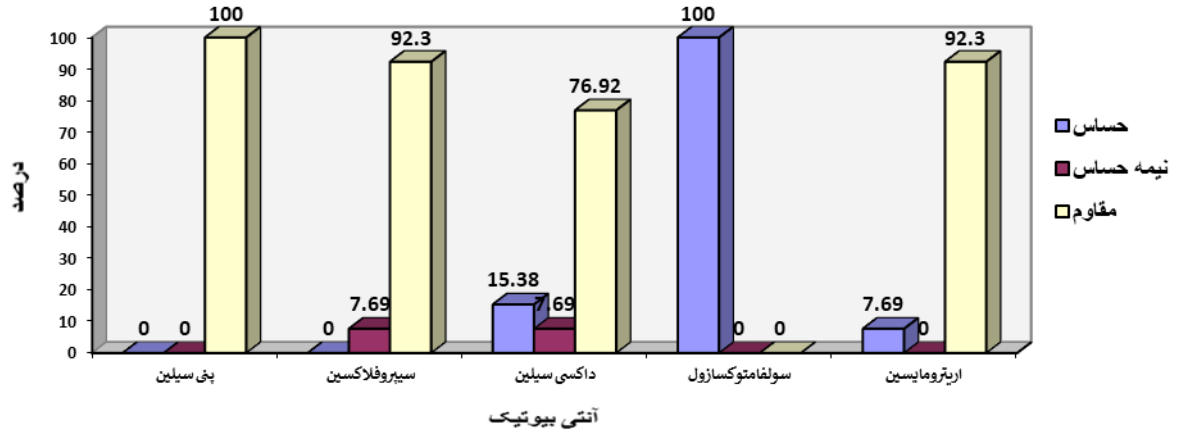
1, 2, 3: نمونه های مثبت ژن انتروتوکسین A

نتایج آنتی بیوگرام جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

بر اساس نتایج از مجموع ۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت به سولفامتوکسازول (۹۷/۴ درصد) و بیشترین مقاومت به اریترومایسین (۶۳ درصد) مشاهده شد (نمودار ۱). سویه‌های واجد ژنهای آنتروتوکسین بیشترین مقاومت را به اغلب آنتی بیوتیک‌ها داشتند (نمودار ۲). بطور کلی ۸ جدایه (۲۱درصد) به هیچ یک از آنتی بیوتیک‌های مورد آزمون مقاومت نداشت. تعداد ۴ جدایه (۱۰/۵۲درصد) به یک آنتی بیوتیک، ۱۰ جدایه به ۲ آنتی بیوتیک (۲۶/۳۱ درصد)، ۴ جدایه به ۳ آنتی بیوتیک (۱۰/۵۲درصد) و ۱۲ جدایه (۳۱/۵۷ درصد) به ۴ آنتی بیوتیک مقاومت همزمان نشان دادند (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱: مقاومت آنتی بوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرینی‌های خامه‌ای



نمودار ۲: مقاومت آنتی بوتیکی جدایه های انتروتوکسیژنیک باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرینی‌های خامه‌ای

بحث

افزایش بیماری‌ها و مسمومیت‌های ناشی از غذا بـه همـراه مشکلات اقتصادی و اجتماعی حاصل از آن سبب گسترش مطالعات مختلف در زمینه تولید غذای سالم شده است. بـا توجه به این که شیرینی‌های خامه‌ای یکی از مـواد غـذایی مستعد به آلودگی میکروبی می باشـد، لـذا بررسـی آن در همه فصول سال مورد توجه متخصصـان صـنایع غـذایی و ناظران مواد غذایی قرار می گیرد. یکـی از مـوارد آلـودگی میکروبی که با خود مسمومیت را به همـراه دارد، بـاکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. این باکتری می تواند به راحتی در طی مراحل تهیه، آمـاده سـازی، بسـته بنـدی و نگهـداری باعـث آلـوده شـدن مـواد غـذایی گـردد. ایـن مسمومیت بیشتر مربوط به غذاهای آماده مصرفی است که پس از فرایند آلوده شده اند مثل سالادها، دسرها، شیرینی خامه‌ای و غیره، که ایـن مسـئله خطـر بـالقوه ای را بـرای سلامت مصرف کننـده بـه همـراه دارد (جزنـی و بابـازاده، ۱۳۹۲). در ایـن مطالعـه در مجمـوع ۲۵/۳ درصـد از شیرینی‌های خامه‌ای از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. آلودگی به این باکتری در تابستان ۲۸ درصـد و در زمستان ۲۲/۷ درصد بود. مطالعات دیگر هـم نشـانگر این است کـه شـیرینی هـای خامـه ای بـه *اسـتافیلوکوک اورئوس* آلوده می باشند. سلطان دلال و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که ۱۲ درصد از شیرینی های مورد آزمون بـه *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودنـد کـه کمتـر از نتـایج مطالعه حاضر می باشد (سلطان دلال و همکـاران، ۱۳۸۹). خرم روز و همکاران (۱۳۹۴) آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای

به *استافیلوکوکوس اورئوس* را در شهر یاسوج ۳۰ درصد گزارش کردند (خرم روز و همکاران،۱۳۹۴). در برزیل، مسمومیت های غذایی متعددی ناشی از مصرف کیک های خامه ای در اثر آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شده و گزارش شده است که در برزیل بیش از ۵۰ درصد شیرینی های خامه ای که در دمای اتاق نگهداری می شدند آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (Anunciacao et al, 1995).

در مطالعه حاضر از بین جدایه های *استافیلوکوک اورئوس*، ۱۳ جدایه (۳۴/۲درصد) واجد ژن‌های تولید انتروتوکسین بودند که ۱۱ جدایه (۲۸/۹ درصد) واجد ژن *SEA*، و ۲ جدایه (۵/۳ درصد) حاوی ژن *SEC* بودند. هیچ یک از جدایه‌ها واجد ژن‌های *SEB* و *SED* نبودند. فولادی و همکاران (۱۳۸۸) در آزمون ۱۰۰ نمونه مواد لبنی با روش PCR ، دریافتند که ۳۲ درصد از نمونه‌ها واجد *استافیلوکوکوس اورئوس* و فراوانی ژن *SEA* در میان این جدایه‌ها، همانند مطالعه حاضر فراوانترین ژن بوده است (فولادی و همکاران، ۱۳۸۸). حسینی جزنی و بابازاده (۱۳۹۱) از ۱۵ درصد نمونه‌های شیرینی خامه‌ای، *استافیلوکوکوس اورئوس* را جداسازی کردند، که ۴۰ درصد جدایه‌ها انتروتوکسیژنیک بودند، از این تعداد ۶۶ درصد آنها نوع A، ۳۳/۳ درصد نوع B و ۱۶ درصد نوع D آنتروتوکسین را تولید می کردند.

در اسلواکی در بررسی نمونه‌های مواد غذایی و تولیدکنندگان مواد غذایی مختلف، ۲۰ جدایه (۳۹ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد آنتروتوکسین شناسایی شد. سه جدایه مولد انتروتوکسین A ، ۱۲ جدایه مولد انتروتوکسین B و ۵ جدایه نیز مولد هر دو سم بودند (Holeckova et al., 2002).

احمدی و دستمالچی ساعی (۱۳۹۱) به بررسی ژن‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان پرداختند. یافته‌ها نشان داد ژن‌های کد کننده انتروتوکسین C در ۵ جدایه، انتروتوکسین G در ۶ جدایه و انتروتوکسین H در ۱ جدایه وجود دارد. ژن‌های کد کننده انتروتوکسین A ،B، D، E در هیچ کدام از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشدند که می تواند بیانگر این باشد که *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین A,B,C,D در بروز بیماری ورم پستان گاو نقشی بسزایی ندارد و بیشتر عامل مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی می باشند (احمدی و دستمالچی ساعی، ۱۳۹۱). در این رابطه، مطالعه Ertas و همکاران (2010) در ترکیه نشان داد که در ۵۷ درصد از نمونه های فراورده‌های لبنی مورد بررسی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده و ژن *SEA* بیش ترین فراوانی را در بین جدایه‌ها داشته است (Ertas et al., 2010).

در هند، به دنبال مسمومیتهای متعدد ناشی از مصرف نان‌های خامه‌ای و سایر مواد غذایی با روش کشت، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را در ۷۳ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش گزارش شد که بیشترین آلودگی مربوط به نان‌های خامه‌ای و غذاهای دریایی بود (Kamat et al., 1998)

بر اساس مطالعه ای به ترتیب ۱۰/۵، ۱۰ و ۶۰/۵ درصد از نمونه‌های شیرینی در مشهد، شهرکرد و زاهدان آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و آلودگی در زاهدان بسیار بالاتر از سایر مناطق بوده است که می تواند به دلیل گرمای هوا باشد (رضوی روحانی و سفیدگر، ۱۳۶۰). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که میزان آلودگی شیرینی خامه در فصل تابستان بیشتر از فصل زمستان می باشد که می تواند به علت گرمای هوا و افزایش رشد باکتری در این ماده غذایی باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که همه جدایه های *استافیلوکوک اورئوس* واجد یک ژن آنتروتوکسین بودند، بررسی Adwan و همکاران (۲۰۰۵) روی مواد غذایی لبنی در فلسطین نیز نشانگر این بود که ۳۷ درصد نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده دارای ژن‌های مولد انتروتوکسین هستند و هیچ کدام از آنها بیش

از یک ژن مولد آنتروتوکسین نداشتند (Adwan et al., 2005).

در فرانسه، مطالعه ای را با هدف شناسایی ژنهای انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی (SED، SEC ، SEB، SEA وSEI ، SEG، SHE، SEJ وSEE) روی نمونه های مواد غذایی مختلف از جمله پنیر، گوشت خام و پخته شده خوک، شیرینی، گوشت چرخ کرده، بستنی و سمولینای ذرت انجام شد. از کل نمونه‌های بررسی شده، ۳۳۲ جدایه استافیلوکوکی، شناسایی شد و ۵۷ درصد از جدایه ها دارای ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی بودند (Rosec and Gigaud, 2002).

این یافته‌ها نشان می دهند که فراورده های حاوی خامه دارای پتاسیل بالایی برای آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشند اگر چه خامه های صنعتی آلودگی میکروبی پایینی دارند اما با این حال آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* می تواند در هنگام تولید شیرینی توسط افراد و وسایل اتفاق بیفتد. مطالعه حکیمی آلنی و همکاران نیز نشان داده است که سویه های استافیلوکوک جداشده از شیرینیهای خامه ای منشاء انسانی و سویه های جداشده از پنیر منشاء گاوی داشته است (حکیمی آلنی و همکاران، ۱۳۹۷).

نتایج آزمون آنتی بیوگرام نشان داد که جدایه‌های *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به سولفامتوکسازول بیشترین حساسیت (۹۷/۴درصد) و نسبت به اریترومایسین بیشترین مقاومت (۶۳درصد) را دارا هستند. مقایسه بین جدایه های واجد ژنهای آنتروتوکسین با جدایه های فاقد ژن نشان داد که جدایه های واجد این ژنها مقاومت بیشتری در برابر آنتی بیوتیکها از خود نشان می دهند.

هدایت ورهام (۱۳۹۲) در بررسی بستنی‌های سنتی نشان داد که از کل ۷۸ نمونه مورد بررسی، ۲۲ نمونه از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از حد استاندارد آلودگی داشته که همه آنها به آمپی سیلین، متی سیلین و پنی سیلین مقاوم بودند و ۱۰۰ درصد به آمیکاسین، ۴/۶ درصد نسبت به سفتریاکسون و ۷/۷۲ درصد به سیپروفلوکساسین حساس بودند. برخلاف مطالعه حاضر که سویه‌های انتروتوکسیژنیک بیشترین مقاومت را به اریترومایسین نشان دادند، در این مطالعه سویه‌های انتروتوکسیژنیک بیشترین مقاومت را نسبت به سیپروفلوکساسین نشان دادند (هدایت ورهام، ۱۳۹۲).

دهقانی و همکاران در ساری نیز نشان دادند که ۳۹ درصد شیرهای خام به استافیلوکوک اورئوس آلوده بوده که بیشترین مقاومت را نسبت به آمپی سیلین، متی سیلین و سفالوتین به ترتیب ۵/ ۸۷ ، ۲۵ و ۵ /۱۲ درصد دارا بودند (دهقانی و همکاران، ۱۳۹۵).

از جمله دلایل این اختلاف می تواند متفاوت بودن منطقه جغرافیایی که مطالعه در آن صورت گرفته و همچنین استفاده از آنتی بیوتیکهای متفاوت در مناطق مختلف برای درمان عفونتها در انسان و دامها را ذکر کرد.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشانگر این است که شیرینی‌های خامه‌ای به *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن‌های انتروتوکسین آلوده بوده که در مقابل آنتی بیوتیکهای متداول مقاومت بیشتری نسبت به سویه‌های فاقد ژن آنتروتوکسین از خود نشان می دهند.

قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد برای انجام این مطالعه قدردانی می نمایند.

منابع

۱. احمدی، ملاحت و دستمالچی ساعی، حبیب. (۱۳۹۲). بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از نمونه‌های شیر مربوط به التهاب پستان گاو به روش PCR. مجله دامپزشکی ایران، سال دوم، شماره ۳، صفحه ۳۵-۲۷.

۲. اصلانی مهر، معصومه.، توکلی، مهناز و پیمانی، امیر. (۱۳۹۲). شناسایی ژن‌های انتروتوکسین زا در نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران

بستری شده در قزوین. مجله دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال دوم، شماره۱، صفحه ۶۶-۶۲.

۳. ایمانی فولادی، عباسعلی.، ریاضی‌پور، مجید و ستاری، مرتضی. (۱۳۸۸). تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس‌های مولد انتروتوکسین از لبنیات. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شماره ۴، صفحه ۲۶-۱۹.

۴. جزنی، نیماحسینی و بابازاده، همایون. (۱۳۹۲). تعیین فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مولد انتروتوکسین و مقاوم به متی سیلین در انواع مختلف شیرینی‌های خامه‌ای عرضه شده در قنادی‌های شهرستان ارومیه. مجله پزشکی ارومیه، شماره۱، صفحه ۵۱-۴۵.

۵. حکیمی آلنی، رضا.، محمدزاده، عبدالمجید.، محمودی کوهی، پژمان و پژوهی الموتی، محمدرضا. (۱۳۹۷). تعیین اکوارها، حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن *tst* در *استافیلوکوک اورئوس* جدا شده از مواد غذایی لبنی. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۱۴، شماره ۳، صفحه ۴۹-۴۱.

۶. خرم‌روز، سیدسجاد.، ساریخانی، محسن و خسروانی، عبدالمحید. (۱۳۹۴). تعیین آلودگی میکروبی شیرینی خامه‌ای و بستنی سنتی شهر یاسوج. مجله دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، شماره ۶، صفحه ۵۳۶-۵۲۶.

۷. دهقانی، محمد هادی.، اکبرپور، بهمن.، سالاری، مهدی.، پورشیخانی، آرش.، رسول زاده، حسن. (۱۳۹۵). بررسی میزان شیوع و مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس در شیرهای خام و پاستوریزه شهرستان ساری در تابستان ۱۳۹۵. مجله سلامت و محیط زیست، دوره ۹، شماره ۲، صفحه ۱۵۴-۱۴۷.

۸. رضوی روحانی، مهدی.، و سفیدگر، جبار. (۱۳۶۰). بررسی کیفیت بهداشتی بستنی در شهرستان ارومیه. مجله دانشکده دامپزشکی تهران، جلد۳۷، صفحه۱۰-۱.

۹. سالاری شریف، علی.، ستاری، مرتضی و مرادی، محمد. (۱۳۹۱). ردیابی ژن‌های انتروتوکسین A و B باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بالینی بیماران شهرستان کرمان و رفسنجان با روش ملکولی. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، شماره ۴، صفحه ۱۳۶-۱۲۸.

۱۰. سعادتی، مجتبی.، براتی، بابک و شیرازی، مهدی. (۱۳۸۸). شناسایی ژن‌های *SEA* و *SEC* و *SEQ* *استافیلوکوکوس اورئوس* در ناقلین سالم. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر، شماره ۲، صفحه ۱۲۷-۱۱۷.

۱۱. سلطان دلال، محمدمهدی.، فاضلی فرد، پرستو و طباطبایی بفرویی، اکرم. (۱۳۸۹). تعیین میزان آلودگی میکروبی شیرینی‌های تر در واحدهای عرضه در جنوب تهران. زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، شماره ۶، صفحه۱۲-۷.

۱۲. عبداللهی، عباس.، نجفی پور، سهراب و کوهپایه، امین. (۱۳۹۰). بررسی مقاومت دارویی استافیلوکوکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین. مجله دانشگاه علوم پزشکی البرز، شماره ۱، صفحه ۴۴-۳۸.

۱۳. ویلیام، فریزیر و دنیس، وستهوف. (۱۳۹۲). میکروبیولوژی موادغذایی. ترجمه: مرتضوی علی، و کاشانی نژاد مهدی. چاپ هشتم، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۵۳۸-۵۳۳.

۱۴. کریم، گیتی. (۱۳۶۰). آزمون‌های میکروبی مواد غذایی، چاپ ششم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، صفحه ۱۲۹-۱۲۸.

۱۵. مرتضوی علی، ضیاالحق حمیدرضا. (۱۳۹۴). میکروبیولوژی مدرن. چاپ پنجم، جلد دوم، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۱۴۸-۱۲۳.

۱۶. ورهام، هدایتعلی. (۱۳۹۲). الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* کوآگولاز مثبت جداشده از بستنی‌های سنتی شهر ایلام. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی شیراز، شیراز، بهار ۹۲؛ صفحه ۲۸۳.

17. Adwan, G.H., Abu-Shanab and B, Adwan, K. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestine. Turkich J Biol. 29: 229-232.
18. Anunciacao, L., Linardi, W.R., and Do Carmo L.S. 1995. Production of staphylococcal enterotoxin A in cream filled cake. Int J Food Microbiol. 26: 259-236.
19. Desai, B., and Kamat, M.Y. 1998. Recovery and characterization of enterotoxigenic strains of staphylococci and microbiological quality of processed Indian foods. J Food Sci Technol. 35: 461-465.
20. Ertas, N., Gonulalan, Z., and Yildirim, M. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by Multiplex PCR technique. Int J Food Microbiol. 142: 74-77.
21. Holeckova, B., Holoda. E., and Fotta, M. 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Ann Agri Environ Med. 9: 179-182.
22. Laura, E., Silvia, G., Yacine, N., Frédéric, A., Sara, P., Fabrizia, G., Benedetta, P., Lucia, D., and Stefania, S. 2017. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). Foodborne Patho Dis. 14(7): 407-413
23. Munoz. A., and Ananou. S. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in products by enterotoxin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism. Int Dairy J. 7: 987-991.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. USA.
25. Rosec, J., and Gigaud, O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. Int J Food Microbiol. 77: 61-70.
26. Shimelis, A., and Mekonnen, A. 2015. A Review on Staphylococcal Food Poisoning. Food Sci Qual Manag. 40: 59-71.
27. Virginia, M., Lorena, P., Dianna, C.G., Patricia, C.L., Gustavo, V., and Teresa, C. 2020. Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment surfaces and cases of foodborne diseases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 62(5): 1-10.
28. WHO. 1988. Persistent diarrhea in children in developing countries memorandum from a WHO meeting. Bull World Heal Organ. 66: 709-717.

Evaluation of antibiotic resistance pattern of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from creamy pastries in Shahrekord area

Hashemi Z, Bonyadian M*, Moshtaghi HA

Department of Health and Food Quality control, Faculty of Vet. Med, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

***Corresponding author:** *boniadian@sku.ac.ir*

Received: 13 September 2020 Accepted: 13 December 2020

Abstract

The present study aimed to determine the prevalence of enterotoxin-producing *S. aureus* in creamy pastries producing in confectioneries in the Shahrekord area also, determining the antibiotic resistance of the isolates. One hundred fifty creamy pastries samples were randomly selected from confectioneries. Microbial tests were performed for isolating of *S. aureus* and then on the Beards Parker Agar. Suspected colonies were confirmed by microbiological and biochemical tests including gram stain, catalase, and coagulase tests. Isolates were tested for the presence of enterotoxin genes (A, B, C, and D) by Multiplex PCR and, also antibiotic resistance of the isolates was determined by the disk diffusion method. Overall, 38 (25.3%) samples were contaminated with *S. aureus*. Twenty-one (28%) and 17 (22.7%) isolates were related to summer and winter samples, respectively. Thirteen isolates (29%) of *S. aureus* contained enterotoxin genes. Eleven isolates (84. 61%) contained *SEA*, and 2 isolates (5.3%) contained the *SEC* gene. Nine (70%) and 4 (30%) of the enterotoxigenic isolates were related to summer and winter samples, respectively. None of the isolates had *SEB*, *SED* genes. Four (30%) enterotoxigenic isolates were related to creamy pastry and 9 (70%) to creamy bread. The antibiogram test showed the highest sensitivity to sulfamethoxazole (97.36%) and erythromycin (63.15%). Also, all enterotoxigenic isolates were resistant to penicillin, and 95% of isolates containing the *SEA* gene were resistant to erythromycin and ciprofloxacin. In general, the results showed that creamy pastries were contaminated with *S. aureus* strains which have the potential to produce enterotoxins. According to the results, the antibiotic resistance of enterotoxigenic isolates was much higher than isolates without enterotoxin genes.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Creamy pastries, Enterotoxin genes, Antibiotic resistance.

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

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.