بررسی خصوصیات مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده بیوفیلم جداشده از گوشت و فراورده‌های گوشتی

مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس آرئوس*

کبری عباسی[۱]، منوچهر مؤمنی شهرکی[۲*]

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

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

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

چکیده:

یکی از پاتوژن‌هایی که به راحتی می‌تواند گوشت را آلوده سازد، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است تحقیق حاضر برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع ژن‌های انتروتوکسین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از از گوشت خام و فرآورده‌های گوشتی انجام شده است. در این مطالعه در طی فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۸ تعداد ۴۴۰ نمونه انواع گوشت خام و فرآورده‌های گوشتی از فروشگاه‌های عرضه کننده در شهرستان شهرکرد جمع آوری گردید و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. شایع‌ترین ژن‌های انتروتوکسین و ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در حضور پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی ۶۱ نمونه (۱۳/۸۶ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. که در ۵۶ ایزوله (۹۱/۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد. بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۸۳/۶۰ درصد) و کمترین مقاومت به ونکومایسین (۰ درصد) گزارش شد. فراوانی حضور ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed* در ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد گزارش شد.

با توجه به این که بین ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک و تولید بیوفیلم ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید، مشخص می‌گردد که مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشند نسبت به سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نمی‌باشند بیشتر است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، بیوفیلم، گوشت

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی سلامت و بهداشت عمومی، بیماری‌های منتقل شونده از راه غذا می‌باشد که سالانه با صرف هزینه‌های زیاد، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شود. مسمومیت غذایی با *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذا و هضم آن ایجاد می‌شود و موجب خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای می‌گردد (۱). این باکتری به‌علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فراورده‌های لبنی، گوشت و فراورده‌های گوشتی و به‌خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است. گوشت با داشتن املاح معدنی مانند آهن، پروتئین، کلسیم و ویتامین‌ها به عنوان یکی از غنی‌ترین منابع پروتئین در جهان، روزانه توسط میلیون‌ها نفر مورد مصرف قرار می‌گیرد و به این‌علت توجه به بهداشت گوشت از اهمیت فراوانی، برخوردار است. متاسفانه کنترل دقیقی بر روی بازررسی گوشت طیور و گوشت نشخوارکنندگان در ایران انجام نمی‌پذیرد. علاوه بر این اکثر کشتارگاه‌ها معمولاً به شکل سنتی و با استفاده از نیروی کار غیر مجرب، اداره می‌شوند. از این رو امکان انتقال عفونت‌های ثانویه از محیط کشتارگاه، کارکنان و وسایل به لاشه و گوشت دام و طیور وجود دارد (۲).

یکی از پاتوژن‌هایی که به راحتی می‌تواند گوشت را آلوده سازد، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است که یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در خانواده میکروکوکاسه است. این پاتوژن عامل اصلی بیشتر عفونت‌های مکرر در بیمارستان‌ها و القا مشکلات شدید در انسان و حیوانات است (۳). علاوه براین باکتری قادر است از طریق غذاهای آلوده به دستگاه گوارش انسان وارد شود و سبب بروز عواقب شدید مانند استفراغ، دل درد، دل پیچه و تهوع شود. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* محلول بوده و توسط برخی ازسویه‌های *استافیلوکوکوس* ترشح می‌شود. انتروتوکسین ماده‌ای پروتئینی است و این سم در برابر حرارت مقاوم است و قادر است حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به‌مدت ۳۰ دقیقه تحمل کند. در ضمن آنزیم‌های گوارشی روده بر آن تاثیری ندارد. این سم به‌صورت ۸ سروتیپ A، B، C1، C2، C3، D، E و H وجود دارد و یکی از علل مهم مسمومیت‌های غذائی به‌حساب می‌آید تولید این سم در غذاهایی که دارای کربوهیدرات و پروتئین است صورت می‌گیرد. انتروتوکسین از جمله فاکتورهای ویرولانس مهم این باکتری و از دسته سوپر آنتی‌ژن‌های پیروژنیک (PTSAgs) می‌باشند که تأثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. وجود انتروتوکسین به‌میزان خیلی کم، در حد ۲۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم، بسته به نوع انتروتوکسین می‌تواند موجب بروز علائم مسمومیت غذایی شود به‌طوری‌که اگر تعداد 10^5 باکتری در هر

گرم ماده غذایی وجود داشته باشد باکتری می‌تواند انتروتوکسین تولید کند و حتی اگر در صورت حرارت باکتری از بین رفته باشد، توکسین فعال باقی مانده و باعث مسمومیت غذایی می‌گردد. از میان انتروتوکسین-های *استافیلوکوکوس اورئوس* انواع SEA تا SEE که نسبت به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیکی دستگاه گوارش مقاومت بیشتری دارند، در مسمومیت غذایی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند (۴،۵).

تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها و مصرف بی رویه آن‌ها در ایجاد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک نقش دارد. در سال ۱۹۴۱ بعضی از سوش‌های *استافیلوکوکوس* به پنی سیلین مقاوم شدند. یک دهه بعد سوش‌های مقاوم چندگانه به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین گزارش شد. برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به‌عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد. *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر آنتی بیوتیک متی‌سیلین، نسبت به آنتی بیوتیک-های دیگری مثل بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، لینکوزامیدها، فلوروکینولین‌ها، استرپتوگرامین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم است (۶،۷). تا کنون بیشترین میزان مقاومت‌های آنتی بیوتیکی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شده است به‌همین علت معمولاً به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نمی‌دهد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که سوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* غذا زاد دارای مقاومت بالا (۶۱٪ تا ۷۱٪) نسبت به اکثر انواع آنتی بیوتیک‌ها هستند که بسیار قابل توجه است (۲).

باتوجه به اهمیت غذازاد بودن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، مصرف گوشت توسط ایرانیان و در نهایت با توجه به فقدان مطالعات میکروبیولوژی، اپیدمیولوژیکی و بهداشتی در زمینه بار آلودگی، خصوصیات میکروبی و مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در انواع گوشت، بررسی حاضر با هدف تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت و فراورده‌های گوشتی و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در شهرستان شهرکرد انجام شد.

مواد و روش کار

جمع آوری و شناسایی نمونه‌ها

مطالعه‌ی حاضر در طی فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۸ بر روی ۴۴۰ نمونه انواع گوشت خام و فرآورده‌های گوشتی از قبیل: گوشت گاو، گوشت مرغ، سوسیس، کالباس، همبرگر مرغ، ژامبون مرغ، کباب لقمه، جوجه کباب همبرگر گوشت، کباب کوبیده و ناگت مرغ از فروشگاه‌های عرضه کننده در شهرستان شهرکرد صورت گرفت. نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن با رعایت شرایط اسپتیک به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. تمامی نمونه‌ها از

نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد ازمایش قرار گرفتند.

ابتـدا در زیر هود در شرایط استریل نمونه‌ها با استفاده از اسکالپل استریل قطعه قطعه شدند. سپس ۱۰ گـرم از هـر نمونـه بـه ۹۰ گـرم از محلـول استریل بافر فسفات نمکی اضافه شد و سپس بـه‌مـدت دو دقیقه با استفاده از استومکر مخلوط گردید تا به‌صـورت همگـن درآیـد و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند.سپس توسط سواپ استریل به محیط بردپاکر حاوی تلوریت پتاسیم و امولسیون تخم مرغ انتقال داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. پس از گذراندن زمان فوق پلیت‌های مشکوک به کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شدند پلیت‌هایی با حضور کلنی‌های محدب، براق، سیاه، با هاله رسوبی از نظر ریخت شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند و جهت تأیید و تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* تست‌های گرم، کاتالاز، کواگولاز، DNase بر روی پرگنه‌های مشکوک انجام شد (۸).

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[1] مطابق دستورالعمل CLSI (Clinical Laboratory Standard Institue) ۲۰۱۹ استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پادتن طب تهیه گردید و شامل: پنی‌سیلین (P 10µg)، متی سیلین (P 2µg)، آمپی سیلین (AM 25µg)، اگزاسیلین (OX 5µg)، ونکومایسین(V 30µg)، تتراسایکلین(TE 10µg)، جنتامایسین (G 10µg)، استرپتومایسین (S 20µg)، کانامایسین (K 30µg)، کلرامفنیکل (C 30µg)، اریترومایسین (E 15µg)، لینکومایسین (L 2µg)، کلیندامایسین (CC 2µg)، ریفامپیین (R 2µg) بودند (۹).

آزمایش تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی قدرت اتصال باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC12228 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در این مطالعه جهت ارزیابی تولید بیوفیلم، کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد کرده بر روی محیط جامد به محیط TSB (Tripticase soy broth) حاوی یک درصد گلوکز تلقیح شد. از نمونه‌های تلقیح شده کدورتی معادل نیم مک فارند تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استیرن منتقل شده و پس از گذشت ۲۰ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. چاهک‌ها با استفاده از فسفات

[1]. Kirby Bauer

بافر سالین چهار مرتبه شستشو داده شد و پس از خشک شدن کامل چاهک‌های پلی استرین رنگ آمیزی انجام شد. در این روش از رنگ کریستال ویوله به‌مدت ۱۵ دقیقه در هر چاهک استفاده شد. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب معمولی شستشو داده شد و جهت آزاد سازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم می‌باشند، ۱۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به اضافه‌ی اتانول ۷۰ درصد به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طوح موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا بررسی شد. نمونه کنترل منفی در این روش، محیط TSBحاوی یک درصدگلوکز بود. جهت اطمینان از روش کار برای جدایه‌های مورد مطالعه ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی نمونه‌ها از نظر تولید بیوفیلم نمونه-هایی با جذب نوری کمتر از ۰/۱ به‌عنوان ایزوله‌های منفی از نظر تولید بیوفیلم، جدایه‌های با جذب نوری بین ۰/۱ تا ۰/۲ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف و ایزوله‌های با جذب نوری ۰/۲تا ۰/۳ به‌عنوان ایزوله‌های بیوفیلم متوسط و نمونه‌های با جذب نوری بالای ۰/۳ به‌عنوان ایزوله‌های بیوفیلم قوی مطرح شدند.

نمونه‌هایی که از نظر تشکیل بیوفیلم مثبت و منفی تشخیص داده می‌شوند، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت استخراج DNA ، DNA آن‌ها استخراج گردید.

آزمایشات مولکولی

به‌منظور تشخیص مولکولی و تائید تشخیص باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (DNPTM) شرکت سیناژن و طبق راهنمای آن استخراج شد. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به‌منظور کمیت سنجی DNA استخراج شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه‌گیری میزان DNA نمونه در طول موج نوری۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه-های DNA که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

۵-تشخیص قطعی و ردیابی ژن‌های انتروتوکسین و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

تشخیص قطعی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از پرایمر *16sRNA* صورت گرفت. از طریق بررسی مطالعات مشابه در این زمینه، بهترین پرایمر مربوط به ژن‌های انتروتوکسین شامل: *sed*، *sed*، *sec*، *seb* و *sea*

ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی شامل: ژن‌های *aac A-D* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها)، *emA* و *ermC* (کد کننده مقاومت به اریترومایسین)، *mecA* (کد کننده مقاومت به متی سیلین)، *blaZ* (کد کننده مقاومت به داروهای بتالاکتام)، *tetK* و *tetM* (کد کننده مقاومت به تتراسیکلین)، *vanA* (کد کننده مقاومت به ونکومایسین)، *LinA* (کد کننده مقاومت لینکوزآمیدها) که بیشترین رفرانس به آن داده شده بود، انتخاب و جهت تهیه به شرکت سیناژن سفارش داده شد و توالی آن در پایگاه داده‌های NCBI بلاست و مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است (۸،۱۱،۱۲).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Sequence	Number Accession	Size (bp)
16srRNA	F: CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R: CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	CP050691	791
See	F: CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC R: CACCTTACCGCCAAAGCTG	M21319	482
Sec	F: CTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACATG R: CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	X05815	275
Sea	F: GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	M18970	560
Seb	F: CAATCACATCATATGCGAAAGCAG R: CATCTACCCAAACATTAGCACC	M11118	404
Sed	F: GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R: GCTGTATTTTTCCTCCGAGAGT	M28521	492
mecA F	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	Y00688	532
blaZ	F: TACAACTGTAATATCGGAGGG R: CATTACTCTTGGCGGTTTC	NG-05599	861
Aac A-D	F: TAATCCAAGAGCAATAAGGGC R: GCCACACTATCATAACCACTA	M18086	227

Erm A	F: AAGCGGTAAACCCCTCTGA R: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	X03216	190
Erm C	F: AATCGTCAATTCCTGCATGT R: TAATCGTGGAATACGGGTTTG	V01278	299
Tet K	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	S67449	360
Tet M	F: AGTGGAGCGATTACAGAA R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA	AF117258	268
Lin A	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAACTGG R: GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGA	X61307	323

بسته به اندازه قطعات ژنی مورد مطالعه، آزمایش PCR در سه مرحله در قالب PCR چندگانه با شرایط ذکر شده در جدول ۲ صورت گرفت.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده، اجزای واکنش PCR و برنامه‌ی دمایی

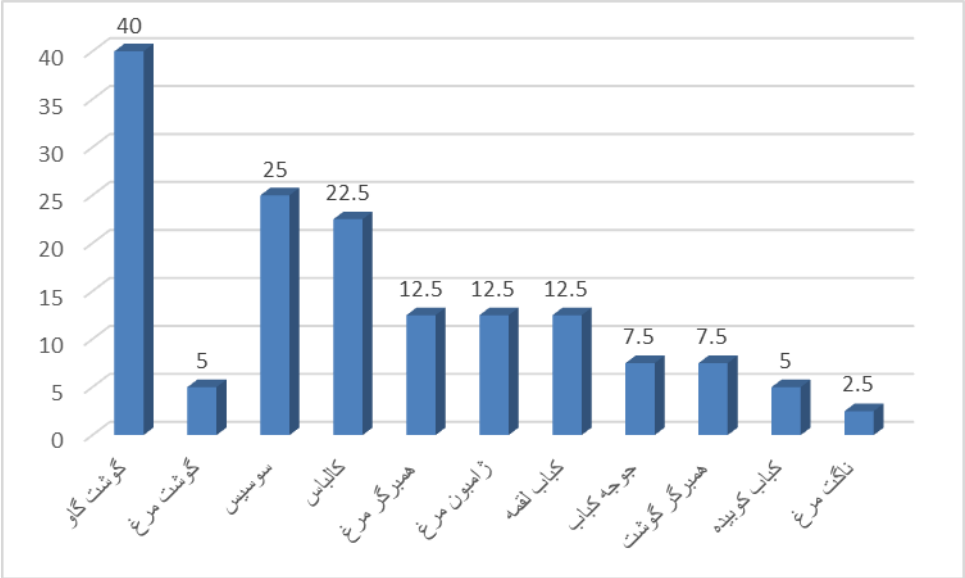
Gene	M-PCR Volume (50 µL)	PCR programme
16srRNA	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95˚C for 5 min, followed by 31 cycles of 45s at 95 ˚C, 60 s at 59 ˚C and 60s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 5 min.
See *Sec*	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 94 ˚C for 5 min, followed by 35 cycles of 60 s at 94 ˚C, 60 s at 58 ˚C and 120 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 10 min.
Sea *Seb* *Sed*	5 µl PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.5 µm of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 µl DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 5 min, followed by 30 cycles of 30 s at 95 ˚C, 30 s at 51 ˚C and 60 s at 73 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 6 min.
mecA F	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 ˚C, 60 s at 55 ˚C and 60 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 5 min.
blaZ	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.4	Initial denaturation at 95 ˚C for 5 min, followed by 31 cycles

	µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	of 45 s at 95 ˚C, 60 s at 50 ˚C and 60 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 5 min.
vanA	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 ˚C, 60 s at 55 ˚C and 60 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 5 min.
Aac A-D	5 µL PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 6 min, followed by 30 cycles of 60 s at 94 ˚C, 60 s at 55 ˚C and 45 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 7 min.
Erm A *Erm C*	5 µL PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 6 min, followed by 30 cycles of 60 s at 94 ˚C, 60 s at 55 ˚C and 45 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 7 min.
Tet K *Tet M*	5 µL PCR buffer 10X, 2.5 mM Mgcl2, 300 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 2 U Taq polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 94 ˚C for 6 min, followed by 35 cycles of 60 s at 95 ˚C, 90 s at 55 ˚C and 45 s at 73 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 7 min.
Lin A	5 µL PCR buffer 10X, 2 mM Mgcl2, 200 µM dNTP, 0.4 µM of each primers, 1 U Taq DNA polymerase, 3 µL DNA template	Initial denaturation at 95 ˚C for 5 min, followed by 31 cycles of 45 s at 95 ˚C, 60 s at 57 ˚C and 60 s at 72 ˚C, and final extention at 72 ˚C for 5 min.

نتایج

نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی

در این تحقیق از مجموع ۴۴۰ نمونه مورد بررسی ۶۱ نمونه (۱۳/۸۶ درصد) از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. از فراورده‌های گوشتی مختلف از هر کدام ۴۰ نمونه تهیه شد که پس از انجام آزمون‌های میکروبی آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌صورت زیر گزارش شد:



نمودار ۱: شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در فراورده‌های گوشتی

نتایج مربوط به تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی

در روش میکروتیتر پلیت به‌منظور تشکیل بیوفیلم، ۶۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند از ۶۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی در ۵۶ ایزوله (۹۱/۸ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده شد. در ۲۹ ایزوله (۴۷/۵۴ درصد) بیوفیلم قوی و در ۲۷ ایزوله بیوفیلم ضعیف (۴۴/۲۶ درصد) و در ۵ ایزوله (۸/۲ درصد) واکنش بیوفیلم مشاهده نگردید. در جدول ۳ واکنش بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از انواع گوشت مورد بررسی نشان داده شده است. برطبق نتایج جدایه‌های جدا شده از گوشت گاو بیشترین قدرت تولید بیوفیلم قوی را داشتند (۳۱/۰۳٪). براساس آزمون دقیق فیشر بین هیچ یک از نمونه‌ها و واکنش بیوفیلم ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (p-value>0.05).

جدول ۳: واکنش بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از انواع گوشت مورد بررسی

نوع نمونه	واکنش بیوفیلم					
	قوی		ضعیف		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گوشت گاو	۹	۳۱/۰۳	۴	۱۴/۸۲	۳	۶۰
گوشت مرغ	۱	۳/۴۵	۲	۷/۴۱	۰	۰
سوسیس	۵	۱۷/۲۴	۵	۱۸/۵۲	۰	۰
کالباس	۵	۱۷/۲۴	۴	۱۴/۸۲	۰	۰
همبرگر مرغ	۳	۱۰/۳۴	۲	۷/۴۱	۰	۰
ژامبون مرغ	۲	۶/۹	۳	۱۱/۱۱	۰	۰
کباب لقمه	۲	۶/۹	۳	۱۱/۱۱	۰	۰
جوجه کباب	۱	۳/۴۵	۱	۳/۷	۱	۲۰
همبرگر گوشت	۱	۳/۴۵	۱	۳/۷	۱	۲۰

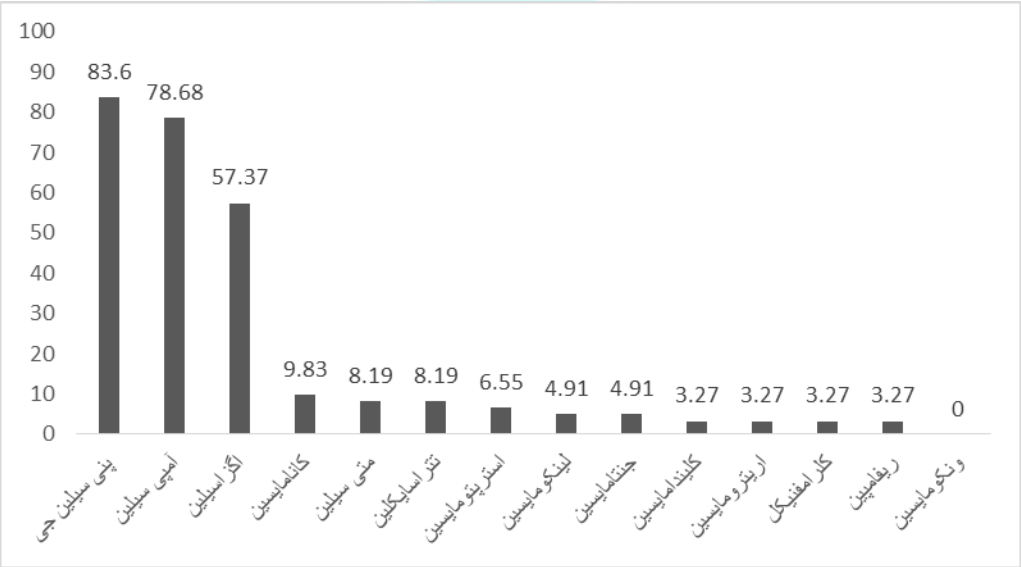
کباب کوبیده	۰	۰	۱	۳/۷	۰
ناگت مرغ	۰	۰	۱	۳/۷	۰
مجموع	۲۹	۱۰۰	۲۷	۱۰۰	۵	۱۰۰

نتایج مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* *استافیلوکوکوس اورئوس*

پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد به‌منظور تشخیص قطعی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* درحضور توالی ژن *16srRNA*، باکتری‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۷۹۱ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند.

نتایج مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی

پس از انجام آنتی بیوگرام بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین در ۵۱ ایزوله (۸۳/۶۰ درصد) و آمپی‌سیلین در ۴۸ ایزوله (۷۸/۶۸ درصد) گزارش شد. مقاومت به ونکومایسین در هیچ یک از جدایه‌ها گزارش نشده است. نتایج مـربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمودار ۱ نشان داده شده است. براساس آزمون دقیق فیشر بین انواع گوشت با آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین و اگزاسیلین ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید (p-value<0.05) اما بین بین انواع گوشت با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط آماری معناداری مشاهده نگردید (p-value>0.05).

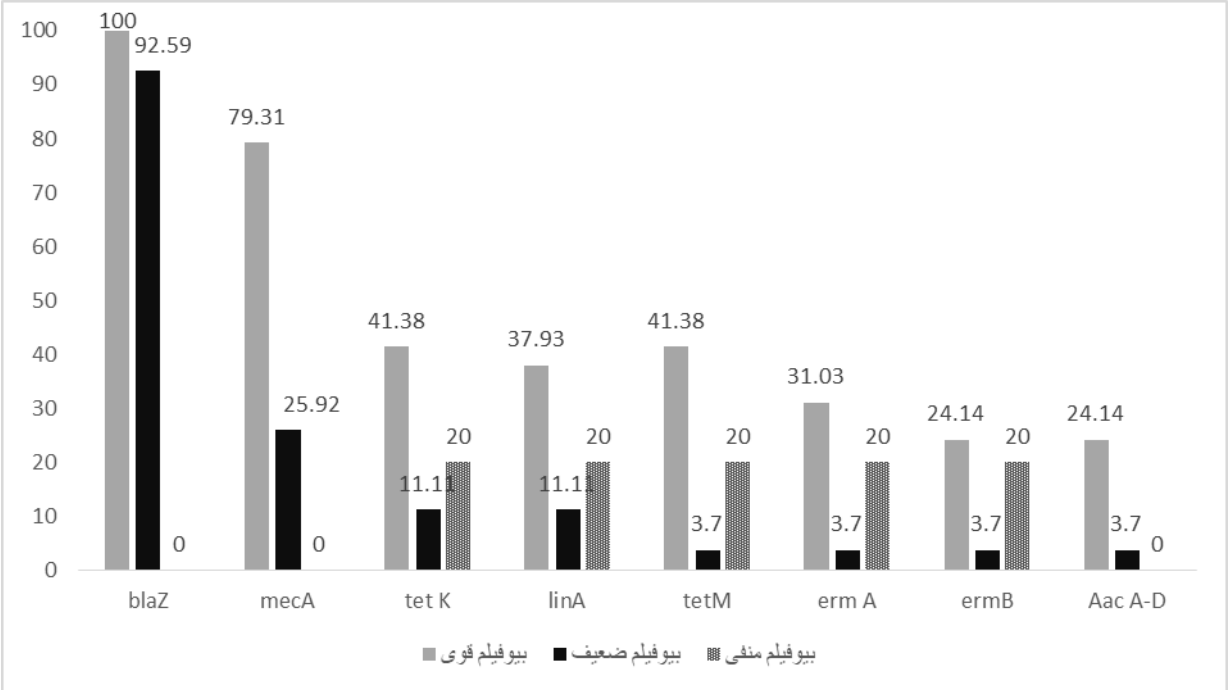


نمودار (۱): مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع گوشتی

همان‌گونه که ذکر گردید بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین و اگزاسیلین گزارش گردید. برحسب نتایج به‌دست آمده، جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم قوی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مذکور مقاومت بیشتری نسبت جدایه‌های تولید کننده‌ی بیوفیلم ضعیف و منفی داشتند. در تجزیه و تحلیل آماری با براساس آزمون کای دو بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با واکنش بیوفیلم قوی ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید (p-value<0.05). هم‌چنین براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت آنتی-بیوتیکی با واکنش بیوفیلم ضعیف نیز ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید (p-value<0.05). اما براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت آنتی-بیوتیکی با بیوفیلم منفی ارتباط آماری مشاهده نگردید (p-value>0.05) .

فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این تحقیق فراوانی ژن‌های *Aca-D*، *ermB*، *ermA*، *tetM*، *linA*، *tetK*، *mecA* و *blaZ* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از فراورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ژن *blaZ* (۱۰۰ درصد) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. فراوانی سایر ژن‌های دیگر به شرح زیر می‌باشد. *mecA* (۲۴/۱۴ درصد)، *tetK* (۴۱/۳۸ درصد)، *linA* (۳۷/۹۳ درصد)، *tetM* (۴۱/۳۸ درصد)، *ermA* (۳۱/۰۳ درصد)، *ermB* (۲۴/۱۴ درصد) و *Aca-D* (۲۴/۱۴ درصد).

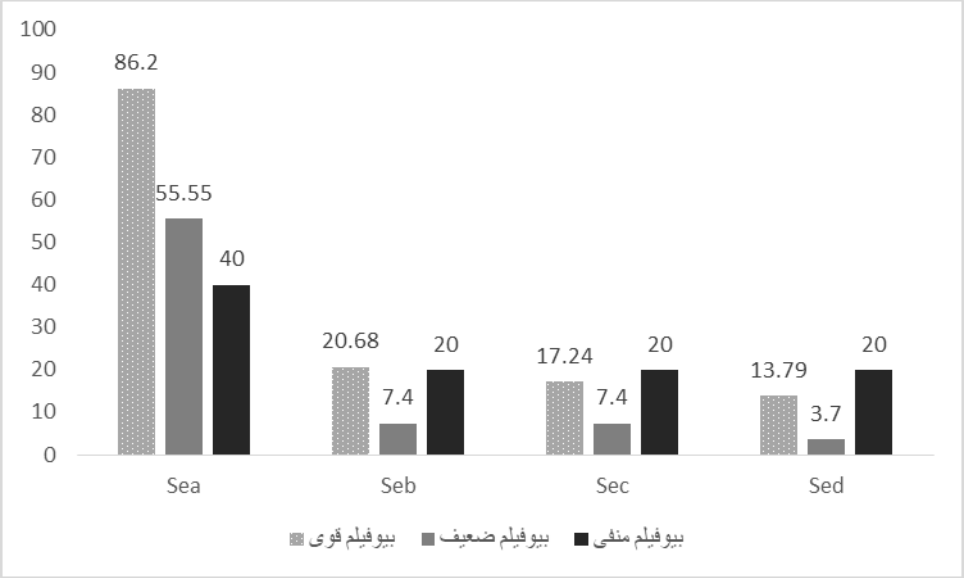


نمودار (۲) فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس واکنش بیوفیلم*

براساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مقاومت آنتی-بیوتیکی و تولید بیوفیلم ارتباط آماری معنی داری وجود دارد (<0.05 p-value=).

فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

جهت ارزیابی ژنوتیپی توان تولید انتروتوکسین در ایزوله-های مورد مطالعه از ردیابی ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed* و به روش PCR چند گانه‌ای استفاده شد. نتایج نشان داد که فراوانی حضور ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed* در ایزوله‌های مورد بررسی به‌ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد می‌باشد. در این میان ژن *sea* با فراوانی ۳۹/۳۴ درصد شایع‌ترین ژن انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه می‌باشد.



نمودار (۳) فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس واکنش بیوفیلم

براساس آزمون کای‌دو بین ژن‌های کدکننده‌ی انتزوتوکسین با واکنش بیوفیلم قوی و ضعیف ارتباط آماری معناداری مشاهده گردید (p-value<0.05) اما براساس آزمون قیق فیشر بین ژن‌های کدکننده‌ی انتزوتوکسین با بیوفیلم منفی ارتباط آماری وجود نداشت (p-value>0.05) .

بحث

از نظر سازمان جهانی بهداشت غذاهای گوشتی که از پر مصرف‌ترین غذاها در جوامع مختلف محسوب می‌شوند، در گروه غذاهای پرخطر شناخته شده‌اند و سالانه گزارشات متعددی در زمینه مسمومیت‌های غذایی ارائه می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یکی از عوامل مهم

مسمومیت غذایی محسوب می‌شود و از طریق تولید بیوفیلم در سطح فرآورده‌های غذایی سبب ایجاد بیماری-های مزمن می‌گردد. بنابراین شناخت ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و مطالعه ایجاد بیوفیلم توسط این باکتری و جنبه‌های مختلف تشکیل بیوفیلم از اهمیت به سزایی برخوردار است لذا در این تحقیق ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ارتباط با آلوده سازی مواد گوشتی توسط این باکتری و توانایی تشکیل بیوفیلم در فراورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار می‌گیرد (۱۳). در مورد میزان آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مناطق مختلف اطلاعات پراکنده ایی وجود دارد. شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه حاضر ۱۳/۸۶ می‌باشد که بیشترین آلودگی در گوشت گاو و کمترین آلودگی در ناگت مرغ گزارش گردید که در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین نوع نمونه و آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ارتباط آماری معنا دار گزارش گردید. در تحقیق معشوف و همکاران که بر روی ۱۰۵۰ نمونه ماده غذایی صورت گرفت، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۹۸ ایزوله (۹/۳ درصد) گزارش گردید (۱۴). در مطالعه Aydin و همکاران در ترکیه شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی ۱۳/۸ درصد گزارش شد که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، مشابه می‌باشد (۷). در مطالعه‌ی انجام شده توسط حسینی و همکاران شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی ۹/۶ درصد گزارش شد که با مطالعه اشراقی و همکاران در شهر تهران مشابه است، که شیوعی برابر با ۹/۵ درصد را گزارش کرده‌اند، این تشابه می‌تواند به-علت تشابه سطح بهداشتی و هم‌چنین نحوه تولید و توزیع مواد غذایی در داخل کشور باشد (۱۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یکی از عوامل مهم مسمومیت غذایی محسوب می‌شودکه از طریق تولید بیوفیلم در سطح فرآورده‌ای غذایی سبب ایجاد بیماری-های مزمن می‌گردد. بنابراین شناخت ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و مطالعه ایجاد بیوفیلم توسط این باکتری و جنبه‌های مختلف تشکیل بیوفیلم از اهمیت به سزایی برخوردار است. اخیراً اطلاعات متعددی مرتبط با فاکتورهای مؤثر در تولید بیوفیلم در برخی از باکتری‌ها و نقش آن‌ها در بیماری‌زایی باکتری و تنظیم بیان این فاکتورها ارائه شده است؛ از جمله در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* که عنوان شده است در این باکتری تولید بیوفیلم با تأثیر بر بیان برخی ژن‌ها و تحت تأثیر قراردادن شرایط متابولیکی باکتری صورت می‌پذیرد (۱۶).

تولید پلی ساکارید اتصالی بین سلولی تحت کنترل لوکوس ژنی *ica* می‌باشد که ژن‌های *icaA, icaB, icaC,icaD* و *icaR* تشکیل شده است. بیان این لوکوس ژنی تحت کنترل فاکتورهای محیطی و پروتئین‌های تنظیمی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد تولید بیوفیلم در ارتباط

با بیان این لوکوس ژنی می‌باشد. مشخص گردیده سویه-هایی که فاقد ژن *ica* می‌باشند، بیماری‌زا نیستند. از طرفی استقرار و تکثیر باکتری در سطوح مواد غذایی زمینه ساز تولید انتروتوکسین و تشدید بیماری و مسمومیت غذایی می‌شود. (۱۷). در تحقیق حاضر در روش میکروتیتر پلیت واکنش بیوفیلم قوی ۴۷/۵۴ درصد، بیوفیلم ضعیف ۴۴/۲۶ درصد گزارش گردید. ۸/۲ درصد جدایه ها قادر به تولید بیوفیلم نبودند. در تحقیق انجام شده توسط خرمیان طوسی و همکاران که بر روی ۹۰ جدایه ی *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از شیر خام در گاوداری‌های اطراف تهران صورت گرفت، ۳۶ جدایه (۴۰ درصد) واکنش بیوفیلم متوسط و ۴ جدایه (۴/۴۴ درصد) واکنش بیوفیلم قوی و ۵۰ جدایه (۴۳/۳ درصد) واکنش بیوفیلم ضعیف داشتند. شیوع ژن‌های *icaA* و *icaD* در این تحقیق ۸۸/۷ درصد گزارش گردید (۱۸). استفاده بی رویه و نادرست از آنتی بیوتیک‌های قلمرو پزشکی در کشاورزی به‌عنوان محرک رشد یا به عنوان عامل پیشگیری کننده با دوز کمتر از دوز درمان باعث ایجاد فشار انتخابی روی جمعیت‌های باکتریایی ساکن روده حیوانات و بروز مقاومت می‌شود. این گونه باکتری‌های مقاوم می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق فرآورده‌های دامی به انسان انتقال یافته و در انسان ایجاد بیماری کنند یا این‌که مخزن انتقال ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیک‌ها به باکتری‌های بیماری‌زای انسان باشند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس آرئوس* یک مساله ی مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می‌شود به‌گونه‌ای که شاهد افزایش روز افزون مقاومت این باکتری نسبت به گروه بتالاکتام و ونکومایسین می‌باشیم. به این ترتیب گردش سویه‌های مقاوم باکتری در محیط و به دنبال آن آلودگی آب و مواد غذایی از اهمیت فوق العاده ایی برخوردار است (۲۱-۱۹) . در تحقیق Ge و همکاران در آمریکا میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سال ۲۰۱۷ در نمونه‌های گوشت مورد مطالعه ۲۷/۹ درصد گزارش شد که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما بالاتر می‌باشد (۲۲). هم‌چنین نتایج حاصل از تحقیق ما آلودگی کمتری را از مقادیر گزارش شده توسط Tang و همکاران در سال ۲۰۱۷ را نشان می‌دهد که میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های گوشت ۶۸ درصد در دانمارک گزارش کردند(۲۳) .در مطالعه حاضر ۳۱ جدایه (۵۰/۸۱ درصد) به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، ریفامپین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، لینکومایسین و کلیندامایسین موثرترین آنتی بیوتیک‌ها علیه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های گوشت بوده به‌طوری‌که حتی نسبت به ونکومایسین هیچ مقاومتی مشاهده نشد. در مقابل مقاومت بسیار بالا به پنی سیلین، آمپی سیلین و اگزاسیلین مشاهده گردید. در مطالعه Wu و همکاران که در چین ۱۸۵۰ نمونه گوشت خام و محصولات گوشتی از

۳۹ شهر چین جمع آوری کرده بودند ۳۵ درصد نمونه‌ها با *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند. تنها ۱/۲۶ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمده از نمونه‌های گوشت به تمامی ۲۶ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی حساس بوده و ۶ /۹۴ درصد از جدایه‌ها به بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاومت یا حساسیت حدواسط داشتند و ۱۲ ٪جدایه‌ها به بیش از ۱۰ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند(۲۴). در مطالعه‌ی Xing و همکاران ۹۸/۴ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به بیش از یک آنتی بیوتیک و ۶ /۵۸ درصد به بیش از سه آنتی بیوتیک مقاوم بودند (۲۵).

در تحقیق حاضر ژن *blaZ* در ۵۴ جدایه (۸۸/۵۲ درصد)، *mecA* (کد کننده مقاومت به متی سیلین)، در ۳۰ جدایه (۴۹/۱۸ درصد)، *tetK* (کد کننده مقاومت به تتراسیکلین)، در ۱۶جدایه (۲۶/۲۲ درصد)، *linA* در ۱۵ جدایه (۳۶/۰۵ درصد)، *tetM* در ۱۴ جدایه (۲۲/۹۵ درصد) *ermA* در ۱۱ جدایه (۱۸/۰۳ درصد)، *ermB* (کد کننده مقاومت به اریترومایسین) در ۹ جدایه (۴/۷۵ درصد) و *aac-D* (کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها)، در ۸ جدایه (۱۳/۱۱ درصد) گزارش شد. در تجزیه و تحلیل آماری براساس آزمون کای دو بین ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی با بیوفیلم قوی و بیوفیلم ضعیف ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید. (p-value<0.05). اما براساس آزمون دقیق فیشر بین ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی با بیوفیلم منفی رابطه معناداری آماری یافت نشد(p-value>0.05). در تحقیق معشوف و همکاران که بر روی ۱۰۵۰ نمونه ماده غذایی صورت گرفت، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۹۸ ایزوله (۹/۳ درصد) و فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، ۷۷/۶ درصد گزارش گردید؛ به‌طوری‌که ژن *sea* (۲۵/۵ درصد)، *see* (۱۸/۴ درصد)، *sed* (۱۱/۲ درصد)، *sec* (۵/۱ درصد) و *seb* (۴/۱ درصد) گزارش گردید (۱۴). در تحقیق حاضر فراوانی حضور ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed* در ایزوله‌های مورد بررسی به‌ترتیب معادل ۳۹/۳۴ درصد، ۲۷/۸۶ درصد، ۲۶/۲۲ درصد و ۳۷/۷۰ درصد می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط عزیز خانی و نوریان که بر روی ۱۵۰ نمونه گوشت چرخ شده گوساله (۹۵ نمونه خام و ۵۵ نمونه طبخ شده) صورت گرفت، ۶۸ درصد از نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. در میان ۹۲ جدایه، ۲۳ جدایه (۲۵ درصد) حامل ژن کد کننده انتروتوکسین بودند (۲۶). در تحقیق انجام شده توسط حسینی و همکاران، در همدان ۵۱۰ نوع ماده‌غذایی از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند و ۴۹ سویه (۹/۶۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله گردید. سویه‌ها به‌ترتیب بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیکی را به اریترومایسین و تتراسایکلین (۳۰/۶۱ درصد)، جنتامایسین (۲۸/۵۷ درصد)، کلیندامایسین (۲۶/۵۳ درصد)، سیپروفلوکساسین و ریفامپین (۲۴/۴۸

درصد)، تریمتوپریم/ سولفامتاکسازول (۱۴/۲۸ درصد) و سفوکسیتین (۶/۱۰ درصد) داشتند (۱۵). در تحقیق مشعوف و همکاران، مقاومت به اریترومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین و ریفامپین به ترتیب ۳۰/۶ درصد، ۲۹/۶ درصد، ۲۷/۶ درصد، ۲۶/۵ درصد، ۲۴/۵ درصد و ۲۴/۵ درصد گزارش گردید (۱۴).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت خام بیشتر از محصولات گوشتی پخته می‌باشد، علت این امرآن است که شرایطی مانند pH و آب در دسترس در گوشت خام نسبت به محصولات گوشتی طبخ شده یا فرآوری شده برای رشد و فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس* مناسب‌تر است. علت اصلی آلودگی گوشت به این باکتری وقوع آلودگی ثانویه در اثر دستکاری گوشت توسط افراد بیمار، عدم شستن دست‌ها پیش از تماس با ماده غذایی و نگهداری طولانی مدت ماده غذایی در دمای محیط می‌باشد.

نتیجه گیری

باتوجه به این‌که *استافیلوکوکوس اورئوس* با فراوانی بالا در مواد غذایی وجود دارد، نباید نقش این میکروارگانیسم به‌عنوان یکی از عوامل مسمویت نادیده گرفته شود. از آن‌جایی که انتروتوکسین‌های این باکتری مقاوم به حرارت و پروتئاز هستند و در پروسه گرم کردن و پختن از بین نمی‌روند، میزان بالای شیوع ژن‌های انتروتوکسین در این مطالعه، نقش بالقوه این باکتری برای ایجاد مسمومیت غذایی را مشخص کرد. افزایش شیوع مقاومت آنتی-بیوتیکی در سویه‌های جدا شده از مواد غذایی می‌تواند یک مشکل جدی برای سلامت جامعه باشد. بنابراین باید تصمیمات جدی برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و افـزایش سطح بهداشتی اتخاذ گردد.

در مجموع نتایج این تحقیق میزان آلودگی گوشت و فراورده‌های گوشتی با *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱۳/۸۶ درصد نشان داد و غالب جدایه ها قادر به تولید بیوفیلم بودند. کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مهم پزشکی در صنعت پرورش دام می‌تواند در کاهش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها دخیل باشد. بنابراین باید کنترل مناسبی بر میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات با کاربرد غذایی و بهداشت مواد غذایی در مراحل مختلف تهیه آن‌ها از پرورش دام، کشتارگاه، بسته بندی و..... صورت گیرد تا از پیدایش و انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت شود

منابع

1. Wu, D., Li, X., Yang, Y., Zheng, Y., Wang, C., Deng, L., and et al. 2011. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in co
2. mmunity-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. J Med Microb. 60 (1): 35- 45.
3. Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Asgarifar, A., and Momeni, M. 2013. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. J Appl Poult Res. 22(4): 913–921.
4. Steinberg, J.P., Clark, C.C., and Hackman, B.O. 1996. Nosocomial and community acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. Clin Infect Di. 23(2): 255-259.
5. Eftekhar, F., Rezaee, R., Azad, M., Azimi, H., Goudarzi, H., and Goudarzi., M. 2017. Distribution of adhesion and toxin genes in *staphylococcus aureus* strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU. Arch Pediatr Infect Dis. 5(1):1-8.
6. Imani-Fooladi, A.A., Riazipour, M., and Sattari, M. 2010. Molecular and serological detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. J Shahrekord Uni Med Sci. 11: 19-26.
7. Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., and et al. 2004. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol. 42(11): 4947-455.
8. Aydin, A., Sudagidan, M., and Muratoglu, K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int J Food Microbiol. 148 (2): 99-106.
9. Hoffman, L.R., Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.L. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature, 436: 1171–1175.
10. CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentyfifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute
11. Kaplan, J.B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs. 34: 737–751.
12. Katsande, S., Matope, M.N., and Pfukenyi, D.M. 2013. Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. J Vet Res. 80: 523-527.
13. Kateete, D.P., Kabugo, U., Baluku, H., Nyakarahuka, L., Kyobe, S., and Okee, M. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cow with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PLoS ONE. 8: e63413.
14. Eshraghi, S., Salehipour, Z., Pourmand, M.R., Bakhtyari, R., Mardani, N., Amiri, S., and et al. 2009. Prevalence of *tst, entC, entA and entA/C* genes in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. Tehran Univ Med Sci. 67(7): 1145-1152.
15. Mashouf, R.Y., Hosseini, S.M., Mousavi, S.M., and Arabestani, M.R. 2015.

Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal originated foods in West of Iran. Oman Med J. 30: 283-290.

16. Hosseini, S.M., Arabestani, M.R., Mahmoodi, H., and Farhangara, E. 2015. 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. 25(123): 1-10.
17. Mack, D., Beckerb, P., Chatterjeec, I., Dobinskya, S., Knoblocha, JKM., and Petersb G. 2004. Mechanisms biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. Int J Med Microbiol. 294(2): 203–212.
18. Shojaei, M., Karimi, D.H., and Javadi., A. 2014. Distribution of genes encoding biofilm production in S. aureus isolated from raw milk in Kurdistan. J Food Hygiene. 14;4(14):1-8.
19. Khoramian, B., Emaneini, M.E., Bolourchi, M.,and Eslampour, MA. 2009. Evaluation of the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Iran. J Comp Pathobiol; 6(4):109-114
20. Normanno, G., Corrente, M.L., and Salandra, G. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol. 2007; 219-22.
21. Founou, L.L., Founou, R.C., Essack, S.Y.2016.. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. Frontiers microbiol. 15;7:1881-1890.
22. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., and Lipsitch, M. 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? Evolutionary applications.8:240-247.
23. Ge B., Mukherjee, S., Hsu, C.H., Davis., J.A, Tran., T.T.T., and Yang Q. 2017. MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US retail meats, 2010-2011. Food Microbiol. 62:289-297.
24. Tang., Y, Larsen., J, Kjeldgaard., J, Andersen., P.S., Skov., R, and Ingmer., H. 2017. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. Int j Food Microbiol. 2017; 249:72-276.
25. Wu., S, Huang., J, Wu., Q, Zhang., J, Zhang., F, and Yang., X. 2018. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. Frontiers Microbiol.9 (2):2767-2783.
26. Xing., X, Li., G., Zhang, W., Wang, X., Xia, X., and Yang. 2014. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and enterotoxin gene detection of Staphylococcus aureus isolates in ready to-eat foods in Shaanxi, People's Republic of China. Journal of food protection. 2014;77:331-334.

۲۷. عزیزخانی، مریم.، و توریان، فهیمه. (۱۳۹۸). ارزیابی فراوانی ژن‌های انتروتوکسین زای *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های گوشت چرخ شده اغذیه فروشی‌های استان مازندران. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۴ (۱): ۶۵-۷۲.

Prevalence of antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* producing biofilm isolated from meat and meat products

Antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus*

Kobra Abbasi[1], Manochehr Momeni Shahraki*[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. . Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: momeniman@yahoo.com

Abstract:

Staphylococcus aureus is one of the pathogens that can easily infect meat. The present study was performed to evaluate the antimicrobial resistance and distribution of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates isolated from raw meat and meat products. 440 samples of raw meat and meat products were collected from suppliers in Shahrekord city and the presence of *Staphylococcus aureus* was examined using biochemical and molecular tests. The most common enterotoxin genes and genes encoding antibiotic resistance were examined in the presence of specific primers. In this study, out of 440 samples, 61 samples (13.86%) were positive for *Staphylococcus aureus*. Biofilm reaction was observed in 56 isolates (91.8%). The highest resistance to penicillin (83.60%) and the lowest resistance to vancomycin (0%). The frequency of the presence of sea, *seb*, *sec* and *sed* genes in the studied isolates were reported 39.34%, 27.86%, 26.22% and 37.70%, respectively. Considering that there was a statistically significant relationship between antibiotic resistance genes and biofilm production, it is clear that antibiotic resistance in strains that are able to produce biofilm compared to strains that are not able to produce biofilms are more

Key Words: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Enterotoxin, Meat