

“Research article”

DOI: DOI: 10.71876/jhf.2024.3081416

## Prevalence of *Staphylococcus aureus* A and B enterotoxins contamination in traditional dairy products, salad and nuggets Presented in Shahrekord and antibiotic resistance of the isolates

Vahad Dehkordi, N.<sup>1</sup>, Rahimi, E.<sup>\*2</sup>, Zia Jahromi, N.<sup>3</sup>

1. PhD student in food hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

\*Corresponding Author: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(Received: 2023/8/19 Accepted: 2023/12/8)

### Abstract

*Staphylococcus aureus*, a gram-positive bacterium known for its resistance to desiccation and production of enterotoxins, is a prominent foodborne pathogen causing gastroenteritis and vomiting through its enterotoxin genes. This study aimed to assess the prevalence of *S. aureus* strains carrying enterotoxins A and B in traditional dairy products, salads, and nuggets distributed in Shahrekord. Additionally, antibiotic resistance profiles of these isolates were investigated. A total of 300 food samples were randomly collected from the Shahrekord market in spring 2023 and processed under sterile conditions to prevent contamination. Results indicated contamination rates of 63% in salads, 5% in nuggets, and 28.43% in traditional dairy products. Specifically, one seasonal salad isolate (0.33%) tested positive for the A gene, and one sandwich isolate (0.33%) contained the B gene. Antibiotic susceptibility testing revealed a high resistance rates to ampicillin (86.18%) and gentamicin (88.8%), while resistance was the lowest for imipenem (38.6%) and tetracycline (39.2%). The findings underscore the critical need for stringent regulations to enhance hygiene standards and mitigate the prevalence of toxin-producing microorganisms in fast-food settings, given the serious implications of antibiotic resistance and inadequate oversight on food safety.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Antibiotic resistance, Foods, Shahrekord

## بررسی میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس حاوی انتروتوکسین‌های A و B در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت‌های عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها شیوع استافیلوکوکوس در مواد غذایی

نجمه واحددهکردی<sup>۱</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>، نوشا ضیا جهرمی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

نویسنده مسئول: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۹/۱۷)

### چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به خشکی و تولیدکننده انتروتوکسین بوده که رایج‌ترین عامل مسمومیت‌زا در مواد غذایی می‌باشد که مقاومت زیادی به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته و به دنبال حضور ژن‌های انتروتوکسین‌زای آن، گاستروانتریت و استفراغ رخ می‌دهد. در همین راستا هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس حاوی انتروتوکسین‌های A و B در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت‌های عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۳۰۰ نمونه غذایی در بهار ۱۴۰۲ از بازار شهرکرد به صورت تصادفی ساده نمونه‌گیری و در شرایط سترون جهت جلوگیری از آلودگی ثانویه به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی انتقال داده شد. نتایج نشان داد که ۶۳ درصد از سالادها، ۵ درصد ناگت‌ها و ۲۸/۴۳ درصد از لبنیات سنتی نمونه‌گیری شده به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند که از بین آن‌ها ۱ نمونه زن A در سالاد فصل (۰/۳۳ درصد) و ۱ نمونه زن B در سالاد عرضه‌شده در ساندویچی‌ها (۰/۳۳ درصد) وجود داشت. نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین (۸۶/۱۸ درصد) و جنتامایسین (۸۸/۸ درصد) و همچنین کمترین میزان مقاومت مربوط به امی‌پنم (۳۸/۶ درصد) و تتراسایکلین (۳۹/۲ درصد) بود. با توجه به عوارض بالای ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عدم نظارت دقیق بر روی مواد غذایی عرضه‌شده در فست‌فودها، لذا قوانین دقیق، منسجم و سخت‌گیرانه جهت بهبود وضعیت بهداشتی و همچنین کاهش سطح آلودگی به میکروارگانیسم‌های مسمومیت‌زا، بیش‌ازپیش لازم است.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مواد غذایی، شهرکرد

## مقدمه

بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های غذازاد، یک تهدید دائمی برای سلامت عمومی و مانع مهمی برای توسعه اجتماعی و اقتصادی در سراسر جهان است. سازمان بهداشت جهانی بیماری‌های با منشأ مواد غذایی (Food borne disases) را، بیماری با ماهیت عفونی یا سمی ناشی از مصرف غذا یا آب تعریف می‌کند (Cheung et al., 2021). تخمین زده می‌شود که سالانه ۷۶ میلیون بیماری، ۳۲۵۰۰۰ مورد بستری در بیمارستان و ۵۰۰۰ مرگ ناشی از بیماری‌های منتقله از طریق غذا در ایالات متحده اتفاق می‌افتد. در میان این موارد، ۳۱ پاتوژن شناخته‌شده باعث ۹/۴ میلیون بیماری، ۵۶۰۰۰ بستری شدن در بیمارستان و ۱۳۰۰ مرگ می‌شود (Guo et al., 2020). با این حال بیماری‌های ناشی از غذا متعدد هستند و آن‌ها شامل ویروس‌ها و باکتری‌ها، انگل‌ها، مواد شیمیایی، سموم و آلرژن‌ها هستند که باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها می‌گردد. ایمنی مواد غذایی از بخش‌های مهم سلامت هر جامعه‌ای می‌باشد که امروزه حاکمیت‌ها، به خاطر افزایش مشکلات ناشی از آن و به منظور ارتقای سطح اطلاعات مصرف‌کنندگان در تلاش برای آگاهی بخشی آن‌ها در این حوزه هستند. (Heidarzadi, 2021).

استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت یکی از علل مهم بیماری‌های با منشأ مواد غذایی است که سالانه باعث ۲۴۱۰۰۰ بیماری در ایالات متحده می‌شود. با این حال، بروز واقعی بیماری استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند بسیار بیشتر باشد زیرا بیماری پراکنده منتقله از غذا توسط استافیلوکوکوس اورئوس در ایالات متحده قابل گزارش نیست. استافیلوکوکوس اورئوس یک

پاتوژن خطرناک است که می‌تواند باعث بسیاری از بیماری‌های مختلف شود. اغلب باعث عفونت‌های پوستی و عفونت‌های مجاری تنفسی می‌شود. عفونت‌های پوستی معمولاً اکتسابی جامعه هستند (یعنی از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شوند)، در حالی که عفونت‌های ریه در بین عفونت‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس غالب است. در بین پاتوژن‌های بیمارستانی، استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین بوده و با عوارض و مرگ و میر بالا همراه است. این باکتری می‌تواند در طیف وسیعی از دماها (۷ تا ۴۸/۵ درجه سلسیوس؛ بهینه ۳۰ تا ۳۷ درجه سلسیوس)، pH (۴/۲ تا ۹/۳؛ بهینه ۷ تا ۷/۵) و غلظت کلرید سدیم تا ۱۵ درصد NaCl رشد کند، در نتیجه یک میکروارگانیسم مقاوم به خشکی با توانایی زنده ماندن در محیط‌های بالقوه خشک و استرس‌زا مانند بینی انسان و روی پوست و سطوح بی‌جان مانند لباس و سطوح است. (Idrees et al., 2021)

استافیلوکوکوس اورئوس سموم متفاوتی را تولید می‌کند. انترتوکسین‌های استافیلوکوکی یک خانواده از نه نوع اصلی سرولوژیکی انترتوکسین‌های پایدار در برابر حرارت (A, B, C, D, E, G, H, I, J) هستند که به خانواده بزرگ سوپرآنتی ژن‌های سمی تب‌زا تعلق دارند. سموم پیروژنیک باعث فعالیت سوپرآنتی ژنی مانند سرکوب سیستم ایمنی و تکثیر سلول‌های T غیراختصاصی می‌شوند. انترتوکسین‌های تولیدشده توسط برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس عوامل ایجادکننده بیماری هستند و انترتوکسین A شایع‌ترین سم دخیل در چنین بیماری‌هایی است. انترتوکسین A در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک بسیار

بالای این باکتری در مواد غذایی، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن‌های A و B در لبنیات سنتی، سالاد و ناگت‌های عرضه‌شده در شهرستان شهرکرد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری

در گام نخست، تعداد ۳۰۰ نمونه مواد غذایی از جمله ۱۰۰ نمونه سالاد، شامل ۵۰ نمونه سالاد فصل (ترکیبی از خیار، کاهو، کلم، فلفل دلمه‌ای، هویج و گوجه)، و ۵۰ نمونه سالاد عرضه‌شده در ساندویچی‌ها (ترکیبی از خیار، کاهو و گوجه)، ۱۰۰ نمونه لبنیات سنتی، شامل ۲۰ نمونه خامه، ۳۰ نمونه کره، ۳۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه ماست و ۱۰۰ نمونه ناگت (RTE) شامل ۵۰ نمونه ناگت مرغ ۵۰ گرمی (با ۷۰ درصد گوشت مرغ) و ۵۰ نمونه ناگت گوشت ۵۰ گرمی (با ۷۰ درصد گوشت) که به‌صورت باز در یخچال نگهداری می‌شدند را از مراکز عرضه این محصولات در شهرستان شهرکرد به‌صورت تصادفی جداسازی و به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال داده شد.

### جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس ۵ گرم از نمونه‌های مورد آزمایش به درون ظرف توزین استریل منتقل و سپس میزان ۴۵ میلی‌لیتر محلول رینگر به‌عنوان حلال به آن افزوده شد تا رقت  $10^{-1}$  به دست آید. پس از حل کردن، مخلوط کردن و یکدست شدن و ایجاد یک محلول همگن، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از آن

مقاوم است و گزارش‌شده که ائروتوکسین‌های A، D و B به ترتیب در ۷۷/۸، ۳۷/۵ و ۱۰ درصد از اپیدمی‌های مربوط به مسمومیت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را به خود اختصاص داده است (Kadariya et al., 2014).

سالاد سبزیجات سرشار از ویتامین‌ها و مواد معدنی هستند و بدون هیچ‌گونه عملیات حرارتی، گاهی بدون شستن و پوست‌کندن مصرف می‌شوند و به همین دلیل احتمال آلودگی به میکروارگانیسم‌های پاتوژن در آن وجود دارد. مصرف ناگت‌ها به‌عنوان غذاهای آماده (Ready to eat) که دارای محتوای پروتئینی می‌باشند افزایش‌یافته و امروزه استفاده از غذاهای نیمه آماده و آماده به علت عدم وقت کافی جهت پخت غذا، در دسترس نبودن منابع غذایی و درنهایت گرایش مردم نسبت به غذاهای بازاری آماده و نیمه آماده را می‌توان از دلایل استفاده از آن‌ها دانست (Madahi et al., 2015).

افزایش تعداد مسمومیت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آگراسیلین و متی‌سیلین سبب برتری آنتی‌بیوتیک‌های گلیکولپیدی، ماکرولپیدی و لینکوزامیدی شده است. مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به اریترومايسين معمولاً با مقاومت سایر ماکرولیدها همراه است. اریترومايسين یک ماکرولید است که به‌طور گسترده در مسمومیت‌های استافیلوکوکی استفاده می‌شود که مطابق پژوهش‌های صورت گرفته، مشخص شده است که سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس غذازاد دارای مقاومت بالا نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که قابل توجه است (Azizpour, 2022). با توجه به مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع نسبتاً

میلی لیتر آبگوشت غذایی فاقد باکتری اضافه گردید. لوله‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و در فواصل معین تا ۶ ساعت از نظر تشکیل لخته مورد بررسی قرار گرفتند. در هر لوله که پلاسمای منعقد شده و واکنش مثبت بود به‌عنوان کواگولاز مثبت گزارش شد (Salehi et al., 2014).

#### انجام تست PCR

برای استخراج DNA، باکتری‌های رشد کرده در طول یک‌شب در محیط آب پیتونه که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شده بودند، به‌وسیله‌ی کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و تا زمان انجام PCR در فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس برای انجام واکنش PCR از جفت پرایمرهای طراحی شده بر اساس ردیف نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، استفاده شد.

برای انجام آزمایش PCR برای تشخیص ژن 16s rRNA، از دستگاه Master cycler gradient (Mastersyler, Germany) استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR، ۳۰ میکرولیتر و شامل ۹۰ نانوگرم پرایمر، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۱۰ میلی مول تریس HCl، ۱/۵ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۵۰ میلی مول KCl و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. برنامه‌ی حرارتی مورداستفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه بود. سپس تمام نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن 16s rRNA

به‌وسیله سمپلر روی محیط برد پارکر آگار (Parker Agar (Miimedia, Iran) به روش کشت سطحی کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از پایان انکوباسیون در صورت رشد، باکتری‌های با کلنی‌های گرد و سیاه رنگ، جهت انجام کشت تأییدی، از کلونی‌های مشکوک به‌وسیله لوپ استریل روی محیط مانیتول سالت آگار (-نام شرکت سازنده درج شود؟ Manitol Salt Agar) کشت داده و محیط‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و بعد از گذشت ۲ ساعت بر روی کلنی‌های مانیتول مثبت (کلونی‌های زردرنگ دارای هاله زردرنگ) تست DNase جهت تأیید استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت. همچنین باکتری‌های موردنظر با تست کواگولاز ارزیابی و نتیجه این تست در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شدند (Pishadast et al., 2021).

#### -آزمایش کواگولاز مثبت

از محیط برد پارکر، با استفاده از یک حلقه کشت، چند پرگنه انتخاب‌شده را برداشته و به لوله حاوی محیط کشت آبگوشت مغز و قلب انتقال داده شد و در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۰/۵ میلی لیتر از این کشت مایع استافیلوکوکی در لوله آزمایش ریخته شد و ۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای سیتراته خرگوش که چهار بار رقیق شده، به آن اضافه گردید و کاملاً باهم مخلوط و به هم زده شد. در لوله دیگر، به‌عنوان شاهد منفی برای هر سری ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته، به ۰/۵

مول ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲۰۰ میکرومول dNTP بود. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۵ دقیقه بود. تأیید وجود قطعه‌ی تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده می‌شود. برای این منظور ۱ گرم از پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE حل و بعد از ذوب شدن مقدار ۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن اضافه و در سینی مخصوص الکتروفورز ریخته شد. سپس ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و روی ژل ۱ درصد آگارز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA Fermentas در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت الکتروفورز شد (de Andrade et al., 2019).

مثبت بودند، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز چندتایی (PCR Multiplex) برای ردیابی توکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی شدند.

واکنش PCR چندتایی جهت ردیابی ژن‌ها در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر X10 PCR buffer، ۱/۵ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم Polymerase Taq DNA انجام شد. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: یک سیکل ۹۵ درجه سلسیوس ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه و نهایتاً یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس ۱۰ دقیقه بود. به منظور ردیابی ژن‌های مورد مطالعه باکتری حجم نهایی واکنش ۲۵، MgCl<sub>2</sub> میکرولیتر بود که شامل: ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی

جدول (۱) - توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های هدف در استافیلوکوکوس اورئوس در واکنش PCR

منبع	اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن هدف
(Tavakoli-Far et al., 2020)	۷۹۱	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGC	16srRNA
(de Andrade et al., 2019)	۵۴۴	TTGAAAACGGTAAAAACGA GAACCTTCCCATCAAAAACA	A
	۴۱۶	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	B

### سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تست آنتی‌بیوگرام به روش diffusion\_Disk انجام گرفت. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک‌های

آنتی‌بیوگرام، شامل آمپی‌سیلین (AM)، پنی‌سیلین (PEN)، جنتامایسین (GM)، سولفامتاکسازول (SXT)، آموکسی‌کلاو (AMC)، تتراسیکلین (TE)، اریترومایسین (ER)، کانامایسین (KM)، سفوتاکسیم (CX)، امی‌پنم (IM)، کارباپنم (CP)، کوتریموکسازول (CMZ) و

و سالاد عرضه شده در ساندویچی‌ها، ۲۳ نمونه سالاد فصل (۴۶ درصد) و ۴۰ نمونه سالاد عرضه شده در ساندویچی‌ها (۸۰ درصد)، از ۱۰۰ نمونه لبنیات سنتی، ۷ نمونه خامه (۳۵ درصد)، ۹ نمونه کره (۳۰ درصد)، ۱۱ نمونه شیر خام (۳۶/۶ درصد)، ۲ نمونه ماست (۱۰ درصد) و از ۱۰۰ نمونه ناگت (RTE)، ۴ نمونه ناگت مرغ (۸ درصد) و ۱ نمونه ناگت گوشت (۲ درصد) به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند. نتایج نشان داد که آلودگی بین نمونه‌های سالاد، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.01$ )؛ اما تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های لبنیات سنتی و ناگت‌ها وجود ندارد. همچنین نتایج نشان داد که از بین ۳۰۰ نمونه غذایی، ۲ نمونه (۰/۶۶ درصد) آلوده به جدایه‌های دارای ژن‌های A (۰/۳۳ درصد) و ژن B (۰/۳۳ درصد) بود.

ریفامپین (RP) روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص گردید (Heidarzadi et al., 2021).

### آنالیز آماری

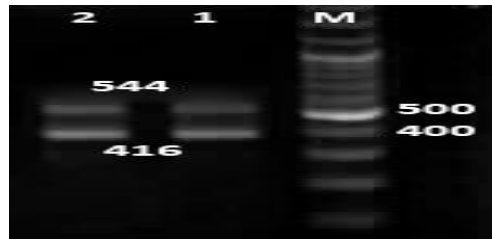
در مطالعه حاضر برای بررسی داده‌ها، از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. برای مقایسه میزان آلودگی نمونه‌های مورد مطالعه به استافیلوکوکوس اورئوس از آزمون آماری مربع کای (خی دو) در سطح معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) استفاده شد.

### یافته‌ها

مطابق نتایج جدول (۱) - از مجموع ۳۰۰ نمونه مواد غذایی از جمله ۱۰۰ نمونه سالاد، شامل سالاد فصل

جدول (۱) - مقایسه آلودگی سالاد فصل و سالاد عرضه شده در ساندویچی‌ها، لبنیات سنتی و ناگت گوشت و مرغ به استافیلوکوکوس اورئوس

مواد غذایی	آلوده تعداد (%)	غیر آلوده تعداد (%)	ژن A تعداد (%)	ژن B تعداد (%)
سالاد فصل	۲۳ (۴۶)	۲۷ (۵۴)	۱ (۰/۳۳)	-
سالاد عرضه شده در ساندویچی‌ها	۴۰ (۸۰)	۱۰ (۲۰)	-	۱ (۰/۳۳)
سطح معنی‌داری		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
ناگت مرغ	۴ (۸)	۴۶ (۹۲)	-	-
ناگت گوشت	۱ (۲)	۴۹ (۹۸)	-	-
سطح معنی‌داری		۰/۱۶۹		
کره	۹ (۳۰)	۲۱ (۷۰)	-	-
شیر	۱۱ (۳۶/۶)	۱۹ (۶۳/۴)	-	-
خامه	۷ (۳۵)	۱۳ (۶۵)	-	-
ماست	۲ (۱۰)	۱۸ (۹۰)	-	-
سطح معنی‌داری		۰/۰۸۷		



شکل (۱) - ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی انتروتوکسین‌های A (قطعه ۵۴۴ جفت بازی) و B (قطعه ۴۱۶ جفت بازی) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون‌های ۱ و ۲= ایزوله‌های مورد مطالعه)

طبق نتایج به دست آمده از جدول (۲) - مشخص شد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به جنتامایسین (۸۸/۸ درصد)، آمپی‌سیلین (۸۶/۱۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به امی‌پنم (۳۸/۶ درصد) و تتراسایکلین (۳۹/۲ درصد) می‌باشد.

جدول (۲). میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

شماره	نام آنتی‌بیوتیک	درصد سویه‌های مقاوم
۱	آمپی‌سیلین (AM)	۸۶/۱۸ درصد
۲	پنی‌سیلین (PEN)	۷۱/۴ درصد
۳	جنتامایسین (GM)	۸۸/۸ درصد
۴	سولفامتازون (SXT)	۷۰/۸ درصد
۵	آموکسی‌کلاو (AMC)	۷۴/۱۶ درصد
۶	تتراسایکلین (TE)	۳۹/۲ درصد
۷	اریترومایسین (ER)	۶۰/۶ درصد
۸	کانامایسین (KM)	۸۱/۴۹ درصد
۹	سفتو تاکسیم (CX)	۸۳/۳۳ درصد
۱۰	امی‌پنم (IM)	۳۸/۶ درصد
۱۱	کارباپنم (CP)	۷۶/۴ درصد
۱۲	کو‌تریموکسازول (CMZ)	۵۷/۳ درصد
۱۳	ریفامپین (RP)	۴۱/۷ درصد

## بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه‌ای بر روی آلودگی سالادهای عرضه شده در رستوران‌های نظامی ترکیه نشان داد که از بین ۵۱۲ نمونه، ۴۸ نمونه (۹/۴ درصد) دارای استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند (Aycicek et al., 2005)، که پایین‌تر از نتایج به دست آمده از تحقیق

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در سالادهای عرضه شده در ساندویچی‌ها ۸۰ درصد و سالادهای رستورانی ۴۶ درصد و در مجموع سالادهای مورد مطالعه ۶۳ درصد بود (جدول ۱).



لبنیات سنتی مورد مطالعه ۲۷/۹ درصد آلوده بودند (جدول ۱).

در تحقیقی بر روی ۲۵۵ نمونه از لبنیات سنتی عرضه شده در اتیوپی گزارش شده که به استافیلوکوکوس اورئوس دریافتند که از مجموع ۲۵۵ نمونه محصولات لبنی ۴۳ (۲۴/۶ درصد) نمونه شیر، ۷ (۱۷/۵ درصد) نمونه ماست و ۲ (۵ درصد) نمونه پنیر به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داده که ۴۹ نمونه (۹۴/۲ درصد) از جدایه‌ها به آمپی‌سیلین و ۴۲ نمونه (۸۰/۸ درصد) به آموکسی‌سیلین مقاوم بودند. ۲۰ نمونه (۳۸/۵ درصد) از جدایه‌ها نیز به سفوکسیتین مقاوم بودند (Lemma et al., 2021)، که تا حدودی با مطالعه حاضر همسو است، در این تحقیق میزان آلودگی در لبنیات سنتی ۲۸/۴۳ درصد، و بیشترین مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین و جنتامایسین بود.

نتایج مطالعه‌ای که بر روی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در لبنیات سنتی عرضه شده انجام گرفت نشان داد که از مجموع ۱۳۰ نمونه، ۵۶ نمونه (۴۳ درصد) به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده هستند. همچنین آن‌ها دریافتند که جدایه‌ها بیشترین مقاومت به اریترومایسین و پنی‌سیلین داشتند (Výrostková et al., 2021)، که با نتایج تحقیق حاضر در خصوص درصد آلودگی مطابقت ندارد؛ چراکه در مطالعه حاضر میزان آلودگی به لبنیات سنتی ۲۸/۴۳ درصد بود. در این مطالعه میزان مقاومت به پنی‌سیلین و اریترومایسین به ترتیب ۷۱/۴ و ۶۰/۶ بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در تحقیقی که بر روی ۳۳۰ نمونه شیر خام و محصولات لبنی فرآوری شده سنتی

حاضر است. در تحقیقی بر روی آلودگی سالادهای عرضه شده در پاکستان گزارش شده که از مجموع ۱۰۰ نمونه آزمایش شده، ۵۴ نمونه آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از ۵۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۳۲ (۵۹ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت بودند. با این حال، ۲۲ (۴۰ درصد) کوآگولاز منفی بود (Saifullah et al., 2018)، که تا حدودی با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری گزارش شده که از ۳۴۵ نمونه سالاد سبزیجات، ۴۰ نمونه (۱۱/۶ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند (Seo et al., 2010)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوت دارد.

در تحقیقی که بر روی آلودگی سالادهای خیابانی عرضه شده در هندوستان انجام گرفت، مشخص شد که از ۱۵۰ نمونه، ۹۰ (۶۰ درصد) نمونه آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند (Ghosh et al., 2007)، که با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. از مهم‌ترین دلایل آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس عدم شستشوی مناسب مواد تشکیل‌دهنده سالاد، عدم رعایت بهداشت شخصی و در معرض گردوخاک قرار دادن آن‌ها است. مطالعه‌ای بر روی ارزیابی مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در سبزیجات انجام گرفت که مشخص شد ۴۵ مورد از ۳۵۰ (۱۲/۸۵ درصد) نمونه سبزی و سالاد برای استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بود (Tavakoli-Far et al., 2020)، که میزان آلودگی از مطالعه حاضر کمتر است.

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در کره ۳۰ درصد، در شیر خام ۶/۶ درصد، در خامه ۲۵ درصد و در ماست ۲ درصد و در مجموع

(Ayamah *et al.*, 2021) که با نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص درصد آلودگی به استافیلوکوکوس همخوانی ندارد. در پژوهش حاضر آلودگی در ۵ درصد نمونه‌ها وجود داشت؛ اما مقاومت بالای جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس به آمپی‌سیلین، جنتامایسین، اریترومایسین و پنی‌سیلین در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد. در تحقیقی که بر روی آلودگی غذاهای آماده به استافیلوکوکوس/اورئوس انجام شد، دریافتند که از تعداد ۲۵۵ نمونه گوشت، ۹/۴ درصد به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند و در بین جدایه‌ها بیشترین میزان مقاومت نسبت به سفوکسیستین بود (Okoli *et al.*, 2018)، که با نتایج تحقیق حاضر تا حدودی مطابقت دارد. در تحقیقی بر روی غذاهای منجمد شهرستان‌های اهواز و سنندج گزارش شد که از تعداد ۲۵۰ نمونه ۱۸ درصد آن‌ها به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند (Kalantar *et al.*, 2012)، که با این تحقیق مطابقتی ندارد. در مطالعه‌ای که بر روی آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس/اورئوس انجام گرفت، نشان داده شد از مجموع ۳۰ ناگت، ۱۹ نمونه معادل ۶۳/۳ درصد به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند (Shylaja *et al.*, 2018)، که با این مطالعه مطابقتی ندارد. در گزارشی نشان داده شد که از مجموع ۳۰ نمونه ناگت تهیه شده به صورت تصادفی، ۳۰ درصد آن‌ها آلوده به استافیلوکوکوس/اورئوس بودند (Ibrahim *et al.*, 2018) در حالی که در این مطالعه ۵ درصد ناگت‌ها به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند.

در تحقیقی برای جداسازی ژن‌های آنروتوکسین های استافیلوکوکوس/اورئوس از ناگت‌ها عرضه شده در اصفهان و چهارمحال و بختیاری مشخص شد از

برای جداسازی اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس/اورئوس انجام گرفت گزارش شد که از مجموع نمونه‌ها، ۱۲۵ نمونه (۳۷/۸۸ درصد) و ۱۷۹ نمونه (۲۴/۵۴ درصد) به ترتیب به اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند (Teresa Debela *et al.*, 2019) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر در خصوص استافیلوکوکوس/اورئوس مطابقت دارد. مطالعه‌ای در سقز بر روی آلودگی شیر خام نشان داد که از تعداد ۱۰۰ نمونه، ۵۱ نمونه به استافیلوکوکوس/اورئوس آلوده بودند که بالاتر از نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر (۲۸/۴۳) است. از مجموع ۵۱ جدایه، ۱۹ جدایه (۳۷/۲۵ درصد) به ۱ آنتی‌بیوتیک، ۱۹ جدایه (۳۷/۲۵ درصد) به ۲ آنتی‌بیوتیک، ۳ جدایه (۵/۸۸ درصد) به ۳ آنتی‌بیوتیک، ۵ جدایه (۹/۸۰ درصد) به ۴ آنتی‌بیوتیک، ۳ جدایه (۵/۸۸ درصد) به ۵ آنتی‌بیوتیک، ۱ جدایه (۱/۹۸ درصد) به ۶ آنتی‌بیوتیک و ۱ جدایه (۱/۹۸ درصد) به ۸ آنتی‌بیوتیک به طور هم‌زمان مقاومت نشان دادند (Farajpour *et al.*, 2015)، که در مطالعه حاضر از مجموع ۱۳ آنتی‌بیوتیک، جدایه‌ها به ۱۰ آنتی‌بیوتیک بیشتر از ۵۰ درصد مقاومت نشان دادند.

در پژوهش حاضر میزان آلودگی به استافیلوکوکوس/اورئوس در ناگت‌های گوشت ۸ درصد و ناگت‌های مرغ ۲ درصد بود و در مجموع ۵ درصد ناگت‌های نمونه‌گیری شده آلوده بودند (جدول ۱). مطالعه‌ای که در کشور غنا بر روی آلودگی غذاهای آماده به استافیلوکوکوس/اورئوس انجام شد نشان داد ۱۰۰ درصد ۳۶ نمونه از غذاهای آماده آلوده بودند. همچنین بیشترین میزان مقاومت به اریترومایسین، آمپی‌سیلین، کوتریماکسازول و پنی‌سیلین مشاهده شد

می‌کند که این خود مقاومت باکتری را در برابر عوامل نامساعد محافظت می‌کند. آنترتوکسین‌های استافیلوکوکوس/اورئوس به حرارت مقاومت بالایی دارند، بنابراین لبنیات سنتی، ناگت و سالادهای عرضه شده در رستوران‌ها و فست‌فودی‌ها آلوده به این توکسین‌ها می‌تواند تهدیدی برای سلامت مصرف‌کننده باشد. وجود استافیلوکوکوس/اورئوس با عوامل ژنتیکی تولید آنترتوکسین باید به‌عنوان یک عامل خطر بالقوه برای ایمنی مواد غذایی در نظر گرفته شود. بنابراین باید با رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌ها، مراکز عرضه لبنیات سنتی، مواد غذایی آماده و همچنین مراکز عرضه مواد غذایی خیابانی جهت پیشگیری از وقوع رخداد آلودگی به استافیلوکوکوس/اورئوس و همچنین درمان محتاطانه این عارضه با آنتی‌بیوتیک‌ها نهایت دقت را به عمل آورد.

### سیاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی برای اعلام ندارند.

مجموع ۴۲۰ نمونه اخذشده ۲۷ نمونه (۶/۴۲ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس/اورئوس بودند. در مجموع ۳۳/۳۳ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین A، ۴/۱۶ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین B، ۱۲/۵۰ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین C، ۸/۳۳ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین D، ۱۲/۵۰ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین A + C و ۱۲/۵۰ درصد از جدایه‌ها قادر به تولید آنترتوکسین A + D بودند. شایع‌ترین ژن شناسایی شده ژن آنترتوکسین A (۲۵ درصد) بود (Madahi et al., 2015)، که از لحاظ فراوانی استافیلوکوکوس/اورئوس تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد. اما در مطالعه حاضر ژن آنترتوکسین A و B هرکدام در ۰/۳۳ درصد جدایه‌ها مشاهده شدند. در تحقیقی بر روی آلودگی شیر به استافیلوکوکوس/اورئوس در منطقه ۳ تهران نشان داده شد که از ۳۰ نمونه شیر خام خریداری شده به‌طور تصادفی، هیچ‌کدام از نمونه‌ها به استافیلوکوکوس/اورئوس حاوی ژن A و B آلوده نبودند (Golafrouz et al., 2020).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که آلودگی استافیلوکوکوس/اورئوس شیوع بالایی را داشته و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به‌صورت قابل ملاحظه‌ای بالا می‌باشد. از آنجایی که غشای سلولی در استافیلوکوکوس/اورئوس فسفولیپیدی است که به‌عنوان یک مانع نفوذپذیر انتخابی عمل می‌کند و سلول باکتری را از ورود موادی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت

## منابع

- Ayamah, A., Sylverken, A.A., Ofori, L.A. (2021). Microbial load and antibiotic resistance of escherichia coli and staphylococcus aureus isolated from ready-to-eat (RTE) kebab sold on a university campus and Its environs in ghana. *Journal of Food Quality*, (6)2: 1-9.
- Aycicek, H., Cakiroglu, S., Stevenson, T.H. (2005). Incidence of Staphylococcus aureus in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, (4)16: 531-534.
- Azizpour, A. (2022). A survey of prevalence and antibiotic resistance pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from eggs in Ardabil area, Iran. *Journal of Comparative Pathobiology*, (16)19: 3831-3840.
- Cheung, G.Y., Bae, J.S., Otto, M., (2021). Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*, (12)1: 547-569.
- de Andrade, A.P.C., de Figueiredo, E.A.T., de Fatima Borges, M., Arcuri, E.F. (2019). Diversity of staphylococcus coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* (36)1: 1032-1041.
- Farajpour, M.T., Sadeghi zali, M.H., Ghiamirad, M., (2015). Prevalence and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus in raw milks of Saqez. *Journal of Food Hygiene*, (5)3: 39-48.
- Ghosh, M., Wahi, S., Kumar, M., Ganguli, A., (2007). Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus and Shigella spp. in some raw street vended Indian foods. *International Journal of Environmental Health Research*, (17)2: 151-156.
- Golafrouz, H., Ahari, H., Anvar, S.A., Shahbazzadeh, D., (2020). Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxin A (SEA) Using dot-elisa in milk samples. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* (8)4: 132-136.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y., (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in staphylococcus aureus. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology* (10)1:101-107.
- Heidarzadi, M. A., (2021). A systematic review on the contamination of traditional Iranian fruit juices with Escherichia coli. *New Findings In Veterinary Microbiology* (4)1: 83-93. [In persian]
- Heidarzadi, M., Rahnama, M., Alipoureskandani, M., Saadati, D., Afsharimoghadam, A., (2021). Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Journal of Food Hygiene* (11)2, 81-90. [In persian]
- Ibrahim, H., Hassan, M., Amin, R., Shawky, N., Elkoly, R., (2018). The bacteriological quality of some chicken meat products. *Benha Veterinary Medical Journal* (35)2: 50-57.
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., Rahman, A., (2021). Staphylococcus aureus biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (18)3: 76-82.
- Kadariya, J., Smith, T.C., Thapaliya, D., (2014). Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International* (20)14: 1-9.
- Kalantar, E., Amin, M., Bahmani, N., Tamimi, M., Hashemzadeh, M., Narenji, H., (2012). Antibiotic resistance pattern in bacterial isolates obtained from frozen food samples of animal origin in Sanandaj and Ahvaz. *African Journal of Bacteriology Research* (4)2: 38-41.
- Lemma, F., Alemayehu, H., Stringer, A., Eguale, T., (2021). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of Staphylococcus aureus in milk and traditionally processed dairy products in Addis Ababa, Ethiopia. *BioMed Research International* (20)21: 20-35.
- Madahi, H., Rahimi, E., Jalali, M., (2015). Detection of enterotoxin genes of staphylococcus aureus isolates from chicken nugget in Esfahan province by PCR technique. *Biological Journal of Microorganism* (4)1: 25-34.

- Okoli, C.E., Njoga, E.O., Enem, S.I., Godwin, E.E., Nwanta, J.A., Chah, K.F., (2018). Prevalence, toxigenic potential and antimicrobial susceptibility profile of Staphylococcus isolated from ready-to-eat meats. *Veterinary World* (11)5: 12-18.
- Pishadast, S., Rahnama, M., Alipour Eskandani, M., Saadati, D., Noori Jangi, A., Heidarzadi, M., (2021). Study of antimicrobial effect of nisin and alcoholic extract of garlic on the activity of staphylococcus aureus ATCC 1113 in Tilapia minced meat during storage at 4° C. *Journal of Food Hygiene* (11)3: 37-47. [In persian]
- Saifullah, S., Abbas, F., Samad, A., Rizwan, M., Bugti, F.S., Saima, R., et al. (2018). 31. Staphylococcus aureus prevalence in the fresh salad and vegetables of the Quetta city. *Pure and Applied Biology (PAB)* (7)11: 255-262.
- Salehi, A., Dehghanifard, E., Alimohammadi, M., (2014). Evaluation of Coagulase-Positive Staphylococcus aureus Contamination in Lighvan Cheese on Retail Stores. *Journal of Environmental Health Engineering* (4)1: 130-136.
- Seo, Y.-H., Jang, J.-H., Moon, K.-D., (2010). Occurrence and characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. *Food Science and Biotechnology* (19)5: 313-319.
- Shylaja, M., Goud, S.S.S., Samatha, K., Pradeep, C., (2018). Studies on the incidence of staphylococcus aureus and its enterotoxins in different meat and meat products. *The Pharma Journal* (7)11: 669-673.
- Tavakoli-Far, B., Mousavi, B., Mashak, Z., Rezaei, M.A., Doregirae, F., Kachoie, M.A., et al. (2020). Molecular Typing and Phenotypic and Genotypic Evaluation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of the Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Bacteria Isolated From Vegetable and Salad Samples. *Researcher Square* (2)1: 1-19.
- Teresa Debela, T., Hiko, A., Sibhat, B. (2019). Assessment of hygienic practice in dairy farm and isolation of escherichia coli and staphylococcus aureus in milk and dairy product in selected towns of central ethiopia. *Food Control* (3)2: 78-90.
- Výrostková, J., Regecová, I., Zigo, F., Semjon, B., Gregová, G.. (2021). Antimicrobial resistance of staphylococcus spp. isolated from cheeses. *Animals* (12)4: 25-36.