شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSE)، مرتبط با شیوع مسمومیت غذایی در نمونه‌های بالینی

پریسا بهشود[1]، الهه تاج‌بخش[2*]، حسن ممتاز[2]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰

چکیده

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین یک پاتوژن مهم است که باعث بیماری‌های عفونی که درمان آن‌ها بسیار مشکل است می‌شود. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با اثر بروی سلول‌های اپی‌تلیال روده می‌توانند باعث ایجاد مسمومیت غذایی در افراد شوند. هدف از این مطالعه، شناسایی سویه‌های MRSE مرتبط با شیوع مسمومیت غذایی در اصفهان می‌باشد. در یک بازه زمانی ۶ ماهه، ۶۰ نمونه بالینی جهت جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شناسایی جدایه‌ها، ایزوله‌های MRSE با روش PCR جداسازی شدند و سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با استفاده از روش Kirby – Bauer تعیین شد. حضور ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb*، *sed* و *sei* با روش PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از ۶۰ نمونه مورد بررسی، ۴۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداسازی شد که ۳۰ جدایه (۶۶/۶ درصد) MRSE بودند. جدایه‌های MRSE بالاترین میزان مقاومت به پنی‌سیلین (۸۰ درصد) و سفوکسیتین (۵۶/۶ درصد) نشان دادند، درحالی‌که کمترین مقاومت را به لووفلوکساسین (۱۳/۳ درصد) و ریفامپیسین (۶/۶ درصد) نشان دادند. علاوه براین شیوع فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb*، *sed* و *sei* در جدایه‌ها به ترتیب برابر با ۶۰ درصد، ۶۳/۳ درصد، ۱۳/۳ درصد و ۷۶/۶ درصد بود. در این مطالعه درصد بالایی از سویه‌های MRSE، مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند و انتروتوکسین تولید کردند. با توجه به این‌که این توکسین‌ها سوپرآنتی‌ژن می‌باشند و می‌توانند عوارض عفونت‌های بالینی و بیمارستانی را شدیدتر نمایند، تشخیص و درمان سریع این عفونت‌ها ضروری می‌باشد.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSE)، مسمومیت غذایی، PCR.

مقدمه

امروزه بیماری‌های منتقل شونده از راه غذا یکی از مشکلات اساسی سلامت و بهداشت عمومی در جهان می‌باشند، که سالانه با صرف هزینه‌های زیاد، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی از افراد نیز در اثر آن دچار مرگ و یا بستری در بیمارستان‌ها می‌شوند (Wu et al., 2011). استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی باکتری‌های بسیار مهم فرصت‌طلب و عامل عفونت‌های حاد بخصوص در بیماران دارای نقص ایمنی و بیماران با وسایل تهاجمی می‌باشند. در میان استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مرتبط با بیماری‌هایی نظیر باکتریمی، اندوکاردیت، عفونت پوست و زخم، عفونت ادراری، پنومونی و عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و جامعه است که به متی‌سیلین مقاوم بوده و در درمان اشکال ایجاد می‌کند (Shariati et al., 2011; Liu et al., 2013). مقاومت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین به عوامل ضد میکروبی، یک مشکل جهانی در میان پاتوژن‌های بیمارستانی است. مقاومت آن‌ها علیه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به وسیله مکانیسم‌های غیر ژنتیکی و ژنتیکی ایجاد می‌شود. پایداری در برابر چندین آنتی‌بیوتیک، یکی از ویژگی‌های اصلی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*‌ها است. آن‌ها الگوی یکسانی برای بروز

مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ندارد. مقاومت آنتی بیوتیکی در میان آن‌ها، بسیار شایع بوده و وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیفی است که در بیمارستان‌ها استفاده می‌شود (Norouzi et al., 2012; Kazemi and Tajbakhsh, 2017). عفونت‌های بیمارستانی محیطی مناسب برای رشد استافیلوکوکوس-های کواگولاز منفی و تولید انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی هستند، غذا به آسانی هنگام دست‌کاری توسط افرادی که حامل *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در دست یا بینی خود هستند آلوده می-شود. مصرف مواد غذایی حاوی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی، سبب ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود (Chajęcka-Wierzchowska, et al., 2015; Cunha et al., 2006; Norouzi et al., 2012). امروزه ثابت شده ابتلای عفونت با MRSE ها ارتباط نزدیکی با عفونت‌های بیمارستانی و پرسنل بهداشتی داشته و در طول قرن‌های اخیر این عفونت‌ها بسیار افزایش یافته‌اند. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی از پلی‌پپتیدهای کوچک تک‌رشته‌ای تشکیل شده‌اند و هر یک از آن‌ها دارای یک حلقه دی‌سولفیدی نزدیک به مرکز مولکولشان هستند. مهم‌ترین انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی تولید شده A و B هستند. تایپ A عامل اصلی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکوسی در دنیا بوده و بیشترین مطالعات نیز در مورد آن انجام شده است (Norouzi et al., 2012). معمولاً از لحاظ ترکیب اسیدهای آمینه انتروتوکسین‌های SEA، SED، SEE و SEI در یک گروه قرار می‌گیرند؛ زیرا ۷۰ الی ۹۰ درصد همولوژی دارند، درحالی‌که SEB و انواع SEC و SEG در گروه دیگری طبقه‌بندی می‌شوند. انواع SEC بر پایه اپی‌توپ‌های جزئی از یکدیگر متمایز می‌شوند. به دلیل ساختمان فشرده انتروتوکسین‌ها، آن‌ها به حرارت و پروتئازهای روده مقاوم هستند و تنها در اثر حرارت با مدت زمان طولانی غیرفعال می‌شوند (Argaw and Addis, 2015; Norouzi et al., 2012; Hoseiyni et al., 2015; Pinheiro et al., 2015). انتروتوکسین-های استافیلوکوکوسی سوپرآنتی‌ژن می‌باشند و می‌توانند عوارض عفونت بیمارستانی را شدیدتر نمایند و از نظر مکانیسم عمل، انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی برخلاف انتروتوکسین‌های کلاسیک (مانند کلراتوکسین)، بر سطح سلول‌های اپی‌تلیال عمل نمی‌کنند، بلکه تأثیر روی عصب واگ و سمپاتیک دارند؛ بنابراین انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی بهتر است نوروتوکسین نامیده شوند (Hoseiyni et al., 2015; Imani Fouladi et al., 2011; Argaw and Addis, 2015). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی در حالت فعال در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک، نظیر تریپسین، کیموتریپسین، رنین و پاپائین مقاوم هستند، اما در برابر پپسین در pH حدود ۲ حساسیت نشان می‌دهند. انتروتوکسین‌های مختلف در برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند، اما همه آن‌ها تقریباً دارای قدرت و توانایی یکسان می‌باشند (Hoseiyni et al., 2015; Imani Fouladi et al., 2011; Norouzi et al., 2012). با توجه به اهمیت تشخیص، کنترل و گزارش سویه‌های تولیدکننده انتروتوکسین و مقاوم به متی‌سیلین از طرف سازمان بهداشت جهانی و هم‌چنین خطر شیوع بیش از پیش عفونت‌های ناشی از سویه‌های توکسین‌زا و مقاوم به متی‌سیلین و انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ناشی از آن‌ها در اجتماع و محیط (García-Álvarez et al., 2011)، در نتیجه مطالعه حاضر با هدف جداسازی و ردیابی ژن‌های *sea*، *seb*، *sed* و *sei* در میان سویه‌های MRSE طراحی و اجرا گردید.

روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی

در یک مطالعه توصیفی و مقطعی در بازه زمانی ۶ ماهه در سال ۹۸-۹۷، تعداد ۶۰ نمونه بالینی مشکوک به عفونت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر اصفهان، مورد بررسی قرار گرفتند.

جدایه‌ها با روش‌های بیوشیمیایی میکروبیولوژیکی مرسوم مانند رشد روی آگار خون‌دار، تست تخمیر مانیتول (مرک، آلمان)، تست کواگولاز، DNase، حساسیت به نووبیوسین تعیین هویت شدند (Karbalaei et al., 2011).

در این پژوهش جهت جداسازی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین، از روش PCR طبق پروتکل شرح داده شده توسط هوایی و همکاران استفاده شد (Havaei et al., 2015). پرایمر مورد استفاده در این واکنش در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت ردیابی این ژن، DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت (سیناژن، ساخت ایران) بر اساس پروتکل آن به ترتیب زیر استخراج شد.

باکتری‌های رشد یافته در محیط BHI براث در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری در ۷۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر پروتئاز بافر به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه انکوبه گردیدند و مراحل بعدی استخراج به شرح زیر صورت گرفت.

۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر با ۴۰۰ میکرولیتر lysis solution مخلوط شد و ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر precipitation solution به مخلوط اضافه شد و بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد و در ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد محلول رویی دور ریخته شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر Wash buffer به رسوب اضافه شد و میکروتیوپ بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس در ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از خالی کردن محلول رویی، میکروتیوپ به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه به‌صورت در باز قرار داده شد. سپس به رسوب باقی‌مانده ۵۰ میکرولیتر solvent buffer اضافه و ورتکس شد و در ۶۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و۳۰ ثانیه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی DNA است. جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده و برای تعیین غلظت و نسبت A260/A280 از دستگاه بایوفوتومتر (اپندورف) استفاده شد. نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند. جهت انجام واکنش PCR، حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد، DNA ژنومی حاوی ۵ میکرولیتر و از Taq DNA پلیمراز ۱۲/۵ میکرولیتر، PCR master mix حاوی ۲/۵ میکرولیتر، بافر ۱۰ میلی‌لیتر، MgCl2 ۰/۶ میکرولیتر، dNTP ۰/۴ میکرولیتر، پرایمر فوروارد و ریورس از هرکدام ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ پیکومول/ میکرولیتر) و ۱۵/۲ میکرولیتر ddH2O. دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل چرخه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد و به‌دنبال رنگ‌آمیزی با سایبرگرین مورد بررسی قرار گرفتند (Havaei et al., 2015). برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*های طبق دستورالعمل انسیتو استاندارد آزمایشگاه و بالین، از روش انتشار دیسک در آگار از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی: پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، ریفامپیسین (۵ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) که از شرکت (مست، انگلستان) تهیه شده بودند، استفاده شد. مقاومت به متی‌سیلین با بررسی مولکولی حضور ژن *mecA* به روش PCR بررسی شد. هم‌چنین جهت ردیابی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه-های مقاوم به متی‌سیلین، DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت (سیناژن، ساخت ایران) بر اساس پروتکل شرکت

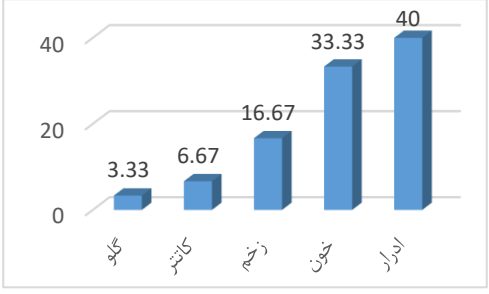
سازنده، استخراج گردید. غلظت DNA و خلوص آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد تأیید قرار گرفت (Havaei et al., 2015; Mohammed-Ali and Jamalludeen, 2015). جهت تکثیر ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb*، *sed* و *sei* از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش را نشان می‌دهد. واکنش PCR جهت انجام این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن کد کننده انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

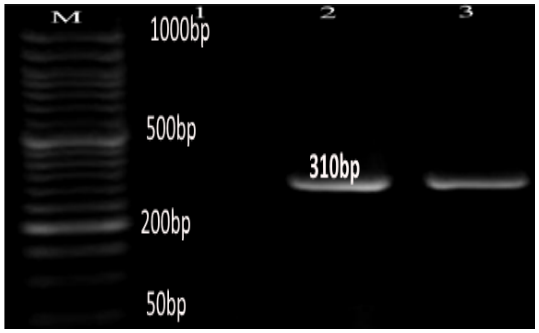
ژن	اندازه محصول	توالی نوکلئوتیدی	منبع
mecA	310 bp	F: TGGCTATCGTGTCACAATCG R: CTGGAACTTGTTGAGCAGAG	(Havaei et al., 2015)
sea	127 bp	F: CCTTTGGAAACGGTTAAAACG R: TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	(Havaei et al., 2015)
seb	164 bp	F: GTATGGTGGTGTAACTGAGC R: CCAAATAGTGACGAGTTAGG	(Mohammed-Ali and Jamalludeen, 2015)
sed	278 bp	F: CCAATAATAGGAGAAAATAAAA R: ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	(Mohammed-Ali and Jamalludeen, 2015)
sei	454 bp	F: TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA R: TCCATATTCTTTGCCTTTACCAGTG	(Mohammed-Ali and Jamalludeen, 2015)

نتایج

از ۶۰ نمونه بالینی مشکوک به عفونت *استافیلوکوکوس* ۴۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداسازی شد. که ۳۰ جدایه (۶۶/۶ درصد) مقاوم به متی‌سیلین بودند. نمودار ۱ درصد توزیع ایزوله‌های MRSE در نمونه‌های بالینی را نشان می‌دهد. نتیجه واکنش زنجیره پلیمراز ژن *mec* در شکل ۲ نشان داده شده است.



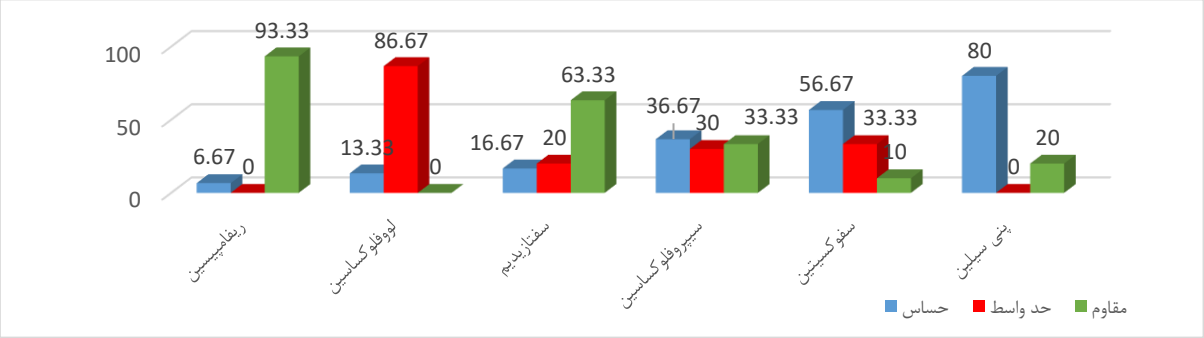
نمودار ۱: درصد توزیع ایزوله‌های MRSE در نمونه‌های بالینی



شکل ۱: واکنش PCR ژن *mecA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*. ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی (*S.aureus* (*ATCC 25923*)، ستون ۲: کنترل مثبت (*S. aureus* (*ATCC 33591*)، ستون ۳: نمونه بالینی

در مطالعه حاضر بالاترین درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۸۰ درصد) و سفوکسیتین (۵۶/۶۷ درصد) و پایین‌ترین درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین (۱۳/۳۳ درصد) و ریفامپیسین (۶/۶۷

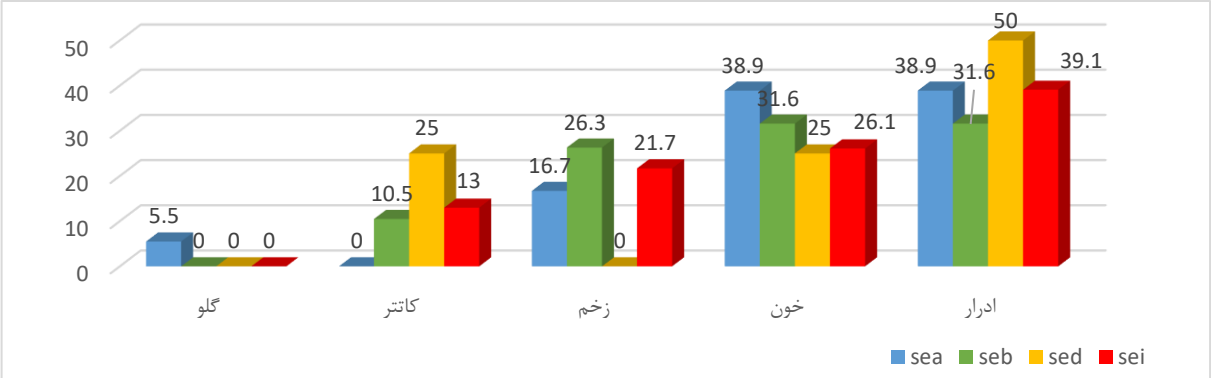
درصد) بود. نمودار ۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های MRSE را نشان می‌دهد.

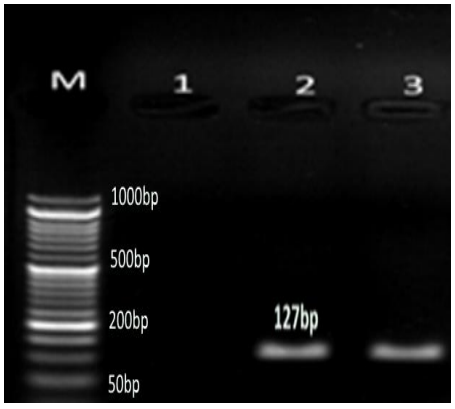


نمودار ۲: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های MRSE

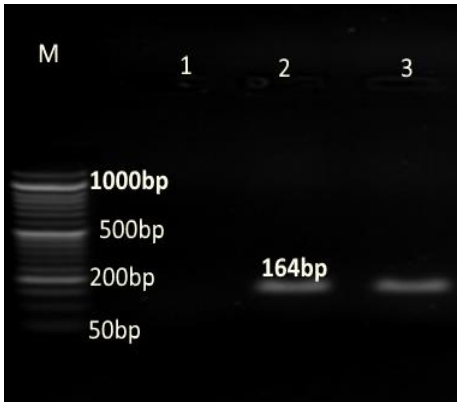
نتایج فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb*، *sed* و *sei* با استفاده از سیستم PCR به ترتیب برابر با ۶۰ درصد (۱۸ سویه)، ۶۳/۳ درصد (۱۹ سویه)، ۱۳/۳ درصد (۴ سویه) و ۷۶/۶ درصد (۲۳ سویه) بود. نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های انتروتوکسین، در شکل‌های ۶-۳ نشان داده شده است. نتایج مربوط به توزیع فراوانی ژن‌های انتروتوکسین برحسب نمونه در نمودار شماره ۳ آمده است. همچنین با توجه آزمون دقیق فیشر بین نوع نمونه و ژن انتروتوکسین ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value< 0.000).

نمودار ۳: توزیع فراوانی ژن‌های انتروتوکسین برحسب نمونه

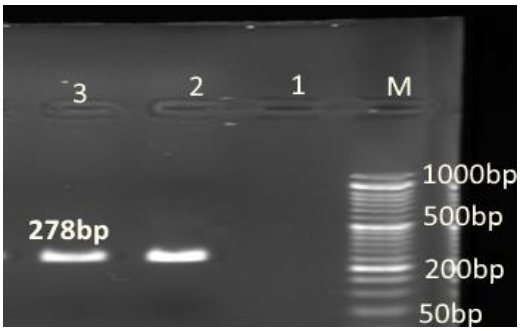




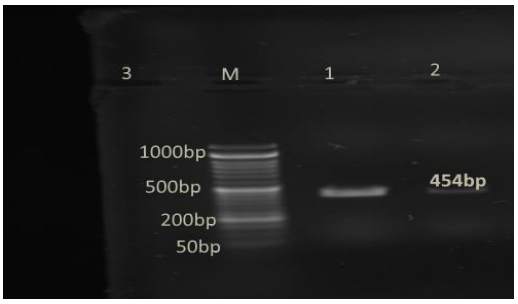
شکل ۳: واکنش PCR برای ژن انتروتوکسین *sea* در جدایه‌های MRSE. ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت(*ATCC* 13565) *S. aureus*, ستون ۳: نمونه بالینی



شکل ۴: واکنش PCR برای ژن انتروتوکسین *seb* در جدایه‌های MRSE. ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت (*ATCC* 14458) *S. aureus*, ستون‌های ۳: نمونه بالینی



شکل ۵: واکنش PCR برای ژن انتروتوکسین *sed* در جدایه‌های MRSE. ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۳: کنترل مثبت، ستون ۲: نمونه بالینی



شکل ۶: واکنش PCR برای ژن انتروتوکسین *sei* در جدایه‌های MRSE. ستون M: مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل مثبت (*S.aureus*(*ATCC* 13565، ستون ۲: نمونه بالینی، ستون ۳: کنترل منفی

در این مطالعه نمونه‌های دارای ژن *sei* بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفوکسیتین، سفتازیدیم، ریفامپیسین داشتند.

در ایزوله‌های مقاوم به پنی سیلین فراوانی ژن *sea* (۷۰/۸ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۶۲/۵ درصد)، فراوانی ژن *sed* (۱۶/۶ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۸۳/۳ درصد) گزارش گردید. در ایزوله‌های مقاوم به سفوکسیتین فراوانی ژن *sea* (۹۴/۱ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۸۸/۲ درصد)، فراوانی ژن *sed* (۱۷/۶ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۱۰۰ درصد) گزارش گردید. در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین فراوانی ژن *sea* (۷۲/۷ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۵۴/۵ درصد)، فراوانی ژن *sed* (۰ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۹۰/۹ درصد) گزارش گردید. در ایزوله‌های مقاوم به سفتازیدیم فراوانی ژن *sea* (۸۰ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۶۰درصد)، فراوانی ژن *sed* (۴۰ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۶۰درصد) گزارش گردید. در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکساسینن فراوانی ژن *sea* (۷۵ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۲۵ درصد)، فراوانی ژن *sed* (۰ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۵۰ درصد) گزارش گردید. در ایزوله‌های مقاوم به ریفامپیسین فراوانی ژن- *sea* (۵۰ درصد)، فراوانی ژن *seb* (۰ درصد)، فراوانی ژن *sed* (۵۰ درصد) و فراوانی ژن *sei* (۱۰۰ درصد) گزارش گردید. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های انتروتوکسین ارتباط آماری معنی دار مشاهده نگردید (P-value< 0.000).

بحث

مقاومت به متی‌سیلین در سال‌های اخیر در بین استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی افزایش یافته است و ۵۰ تا ۸۰ درصد گونه‌های کواگولاز منفی یا دارای ژن *mecA* هستند و یا مقاومت نسبت به اگزاسیلین دارند (Pishva et al., 2013). MRSE ها یکی از شایع‌ترین باکتری‌های مقاوم در برابر دارو هستند. تعداد عفونت‌های ناشی از MRSE در بسیاری از جوامع به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است و این مسئله از نظر مدیریت بیمارستان‌ها جهت درمان بیماران یک مشکل جدی است. در ۱۰ سال گذشته زنگ خطر ناشی از شیوع عفونت‌های MRSE در سرتاسر جهان مشاهده می‌شود (Razavi et al., 2018). رضوی و همکاران بر اساس موقعیت جغرافیایی، توزیع عفونت‌های ناشی از MRSE در شهر اصفهان را بر اساس مقالات بررسی شده قبلی (متا آنالیز) از مارس ۲۰۰۶ تا ژانویه ۲۰۱۶، ۶۵/۸ درصد گزارش کردند. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج پژوهش ما کاملاً تطابق دارد (Razavi et al., 2018). در مطالعه شاه‌منصوری و همکاران در سال (۲۰۱۶)، از ۱۲۰ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداسازی شده از بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان عسگریه و آزمایشگاه تشخیص طبی نوبل اصفهان ۳۷ جدایه

(۵۴/۴۱ درصد) دارای ژن *mecA* بودند (Shamansouri et al., 2016). در مطالعه طهماسبی و همکاران در سال (۱۳۹۷) در شهر همدان از ۵۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداسازی شده از مراکز درمانی منتخب درمانی علوم پزشکی شهر همدان ۲۵ جدایه (۴۵/۴۵ درصد) مقاوم به متی‌سیلین بودند (Tahmasebi et al., 2018). پیشوا و همکاران در سال (۲۰۱۳) با تحقیق بر روی بیماران بخش‌های مختلف بیمارستان الزهرا اصفهان درصد ایزوله‌های MRSE را (۷۵/۳۵ درصد) گزارش کردند (Pishva et al., 2013). با مقایسه نتایج پژوهش‌های فوق با پژوهش حاضر می‌توان گفت که نتایج با هم، هم‌خوانی دارند. نتایج مطالعات در دهه‌های اخیر نشان می‌دهد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*ها نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی از جمله پنی‌سیلین، اگزاسیلین، سفوکسیتین و ...، در درمان بیماری‌های عفونی مقاومت دارند؛ لیکن میزان مقاومت در بین آن‌ها بسیار گوناگون است (Kazemi and Tajbakhsh, 2017). در مطالعه ما ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین بیشترین میزان مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۸۰ درصد)، سفوکسیتین (۵۶/۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۶/۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت را نسبت به سفتازیدیم (۱۶/۶ درصد)، لووفلوکساسین (۱۳/۳ درصد) و ریفامپیسین (۶/۶ درصد) نشان دادند. در مطالعه شارما و همکاران در سال ۲۰۱۰، بالاترین مقاومت در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سیپروفلوکساسین (۳۶/۳ درصد) و پایین‌ترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۲۲/۷ درصد) اختصاص داشت (Sharma et al., 2010). در گزارش ثانی و همکاران در سال ۲۰۱۴، بالاترین میزان مقاومت در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۸۱/۲ درصد) و سفوکسیتین (۵۶/۳ درصد) و پایین‌ترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تیکوپلانین (۱/۶ درصد) و ریفامپسین (۱۲/۹ درصد) بود. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (Sani et al., 2014).

در گزارش شاه‌منصوری و همکاران در سال ۲۰۱۶، بالاترین مقاومت در جدایه‌های *استافیلوکوکوس* اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (۷۴/۴ درصد) و سفوکسیتین (۶۰/۲ درصد) و پایین‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (۳۶/۷ درصد) گزارش شد. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما تقریباً شباهت داشت (Shamansouri et al., 2016). در مطالعه چعبی و همکاران در سال ۲۰۱۹، بر روی نمونه‌های ادراری، بالاترین درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۰ درصد) و پایین‌ترین درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک موپیروسین (۲۰ درصد) و ریفامپیسین (۵۰ درصد) بود. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (Chabi and Momtaz, 2019). در مطالعه کاظمی و همکاران در سال ۹۶ در شهرکرد، بالاترین درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۳/۸ درصد) و پایین‌ترین درصد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین (۶/۲۵ درصد)، ونکومایسین (۲/۵ درصد) و آموکسی‌کلاو (۱/۲۵ درصد) بود. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (Kazemi and Tajbakhsh., 2017). در مطالعات قبلی نشان داده شده بیماران ناقل انتروتوکسین می‌توانند منبعی برای انتشار آلودگی در جامعه و خصوصا بیمارستان‌ها باشند. باکتری در بینی و گلوی بیماران از طریق عطسه و سرفه به پوست و مواد غذایی منتقل می‌شود و مصرف مواد غذایی حاوی انتروتوکسین، سبب ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود. تولید این توکسین‌ها توسط سویه‌های بالینی به خاطر نقش سوپرآنتی‌ژنتیکی این توکسین‌ها، بسیار اهمیت دارد (Havaei et al., 2015; Pereira et al., 2018; Pinheiro et al., 2015). امروزه سویه‌های

انتروتوکسین‌زا به علت مقاومت بالا به نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و حضور آن‌ها در چرخه مواد غذایی یکی از نگرانی‌های سلامت عمومی به شمار می‌روند (Hoseiyni et al., 2015; Imani Fouladi et al., 2011). مطالعات بسیاری در خصوص شناسایی انتروتوکسین‌ها از مواد غذایی انجام شده است و مطالعات کمتری در شناسایی این عوامل در موارد بالینی وجود دارد. استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی، علی‌الخصوص *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* توانایی زنده ماندن در عفونت‌های بیمارستانی را دارند. در این مطالعه به بررسی ژن‌های انتروتوکسینی *sea*، *seb*، *sed* و *sei* در سویه‌های MRSE پرداخته شده است و درصد زیادی از جدایه‌های MRSE در مطالعه ما انتروتوکسین‌زا بودند؛ که این موضوع بیانگر اهمیت بالای سویه‌های MRSE در تولید انتروتوکسین‌ها به عنوان یک عامل فی‌نفسه در ایجاد مسمومیت غذایی منطقه می‌باشند. در مطالعات محققین مختلف در خصوص گزارش انتروتوکسین‌ها نتایج متفاوتی ذکر شده در واقع درصد جدایه‌های انتروتوکسین‌زا بر اساس منبعی که از آن جداسازی می‌شوند، تفاوت‌های بسیار زیادی از خود نشان می‌دهند (Havaei et al., 2015; Mohammed-Ali and Jamalludeen, 2015; Rosenthal, et al., 2011). امروزه ثابت شده بیشترین عامل ایجاد کننده اسهال و استفراغ در انسان انتروتوکسین‌های A و B می‌باشند. حضور مکرر و هم‌زمان این دو ژن در یک باکتری این واقعیت را توضیح می‌دهد که آن‌ها یک لوکوس کروموزومی یکسان را اشغال می‌کنند. نوع A در دنیا پراکندگی و شیوع بیشتری دارد (Pereira et al., 2018)، که با یافته‌های مطالعه ما نیز هم‌خوانی دارد. کاسمن و همکاران در سال (۱۹۶۷) در مطالعه خود میزان تنوع در قدرت انتروتوکسین‌زایی سویه‌های استافیلوکوکوسی جدا شده از منابع کلینیکی، شیر و مواد غذایی یخ زده را به ترتیب برابر ۳۰ درصد، ۲۷ درصد و ۲۴ درصد گزارش کردند. کاسمن بیان کرد، شیوع بالای ژن‌های انتروتوکسینی سوپرآنتی‌ژنی در استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی، باعث عفونت‌های شدید می‌شود (Casman et al., 1987). در مطالعه رال و همکاران در سال (۲۰۱۰) ۷۲ درصد از محصولات لبنی مورد آزمایش آلوده به استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی بودند. بیشترین فراوانی انتروکسین تولید شده در این تحقیق مربوط به تایپ A با فراوانی ۷۰/۵۸ درصد بود (Rall et al., 2010). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج پژوهش ما تقریبا تطابق دارد. وازکونسلوس و همکاران در سال (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای با استفاده از روش RT- PCR به تشخیص مولکولی انتروتوکسین‌های H، G، E و I در *استافیلوکوکوس اورئوس* و استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی نوزادان متولد شده در برزیل پرداختند. در این مطالعه ۹۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۹۰ سویه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی مورد آزمایش قرار گرفتند. از میان آن‌ها ۵۴ سویه (۶۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس*ها و ۲۹ سویه (۳۲/۲ درصد) استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی، ژن انتروتوکسین را نشان دادند. هم‌چنین در این مطالعه نشان داده شد که *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* توکسیژنیک‌ترین گونه از استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی است (Vasconcelos et al., 2011). در مطالعه پادکوویک و همکاران در سال (۲۰۱۲)، هیچ‌یک از سویه‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی جداشده از مواد غذایی آماده به مصرف ژن انتروتوکسین مشاهده نشد (Podkowik et al., 2012). این موضوع نشان دهنده این است که جدایه‌های انتروتوکسین‌زا، به خصوص کواگولاز منفی‌ها بر اساس منبعی که از آن جداسازی می‌شوند تفاوت‌های بسیار زیادی از خود نشان می‌دهند(Pinheiro et al., 2015).

پین‌هیرو و همکاران در سال (۲۰۱۵) در مطالعه خود، ژن‌های انتروتوکسین را در کشت‌های خون آلوده به ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس*

ساپروفیتیکوس به ترتیب ۹۵/۳ درصد و ۷۹/۸ درصد گزارش کردند و در مطالعه آن‌ها حداقل هر نمونه کشت خون، دارای یک ژن انتروتوکسین بود که رایج‌ترین آن‌ها، ژن‌های انتروتوکسین کلاسیک مانند: *sea*، *seb*، *sed* و *sei* با فرکانس برابر ۵۹ درصد، ۲۹ درصد، ۳ درصد و ۷۴ درصد بود (Pinheiro et al., 2015). نتایج حاصل از این مطالعه تا حدودی نزدیک به مطالعه ما است. مطالعات مختلف در جهان نشان داده است که این ژن‌ها در استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی غالب هستند. تفاوت در نتایج حاصل از مطالعات مختلف ممکن است به تفاوت در روش مورد استفاده در نمونه‌های مورد مطالعه از جمله تعداد، ماهیت و منشأ جغرافیایی نمونه‌ها مربوط باشد (Pinheiro et al., 2015). طبق گفته پریرا و همکاران در سال (۲۰۱۸) شیوع بالای ژن‌های انتروتوکسینی سوپرآنتی‌ژنی در استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی، باعث عفونت‌های شدید می‌شود. در این مطالعه فراوانی ژن‌های *sea*، *seb*، *sed* و *sei* به ترتیب ۶۹/۸ درصد، ۶۴/۳ درصد، ۷۱/۴ درصد و ۷۲ درصد بودند (Pereira et al., 2018). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج پژوهش ما کاملاً تطابق دارد.

نتیجه‌گیری کلی

ژن‌های انتروتوکسین، به‌عنوان منبعی برای پخش آلودگی در جامعه محسوب می‌شوند. این‌گونه توکسین‌ها در ایجاد عفونت‌های ثانویه نقش مؤثری دارند؛ بنابراین با شناسایی سریع این توکسین‌ها می‌توان کانون این‌گونه عفونت‌ها را شناسایی نمود و از بروز مسمومیت غذایی و عوارض ثانویه این توکسین‌ها جلوگیری به عمل آورد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد جدایه‌های MRSE انتروتوکسین‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، شیوع نسبتاً بالایی در عفونت‌های بالینی دارند. با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های MRSE انتروتوکسین‌زا، بررسی دوره‌ای و پی‌درپی میزان مقاومت و مکانیسم ایجاد مقاومت و ردیابی سویه‌های انتروتوکسین زا در عفونت‌های بالینی و بیمارستانی توصیه می‌گردد.

منابع

1. Adwan, G., Adwan, K., Jarrar, N., Salama, Y. and Barakat, A., 2013. Prevalence of seg, seh and sei Genes among Clinical and Nasal *Staphylococcus aureus* Isolates in Palestine. Microbiol. Res. J. Int. 3:139-49

2. Argaw, S. and Addis, M., 2015. A review on staphylococcal food poisoning. Food Science and Quality Management. 40:59-71.

3. Casman, E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E. and Issa, J.A., 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J. Bacteriol. 94: 1875-1882.

4. Chabi, R., Momtaz, H. 2019. Virulence factors and antibiotic resistance properties of the Staphylococcus epidermidis strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. Trop Med Int Health. 47: 56

5. Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M. and Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2015. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin–phenotypic and genotypic antibiotic resistance. Food microbial. 46: 222-226.

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

7. Danielsson-Tham, M.L., 2013. Staphylococcal food poisoning. *Food associated pathogens*. 25:250.

8. García-Álvarez, L., Holden, M.T., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C. and Parkhill, J., 2011. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 11:595-603.

9. Havaei, S.A., Assadbeigi, B., Esfahani, B.N., Hoseini, N.S., Rezaei, N. and Havaei, S.R., 2015. Detection of mecA and enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in MRSA strains. Iran J Med Microbiol. 7:161.

10. Hoseiyni, 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 :1-10.

11. Imani Fouladi, A., Choupani, A. and Fallah Mehrabadi, J., 2011. Study of prevalence of Enterotoxin type B gene in Meticillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from wound. Kowsar Med J. 16: 21-5.

12. Karbalaei, M., Havaei, S. A., Pishva, E. 2011. Comparison of the Results of Polymerase Chain Reaction andOxacillin Agar Dilution Methods in Determining Resistance to Methicillin in Isolated Staphylococcus Aureus at Alzahra. Hospital, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch. 29:1-8.

13. Kazemi, S., and Tajbakhsh, E. 2017. Determination of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of tetK, ant (4)-Ia, vanA, and ermA Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Clinical Samples in Shahrekord, (IRAN). Qom Univ Med Sci J. 11: 57-65.

14. Liu, L.G., Zhu, Y.L., Hu, L.F., Cheng, J., Ye, Y. and Li, J.B., 2013. Comparative study of the mutant prevention concentrations of vancomycin alone and in combination with levofloxacin, rifampicin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. J Antibiot. 66:709-712.

15. Mohammed-Ali, M.N. and Jamalludeen, N.M., 2015. Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microb Diagn. 5: 2161-0703.

16. Norouzi, J., Goudarzi, G., Pakzad, P. and Razavipour, R., 2012. The isolation and detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins AE and TSST-1 genes from different sources by PCR method. Qom Univ Med Sci. 6:78-85.

17. Pereira, V.C., Pinheiro, L., Oliveira, A., Martins, K.B., Riboli, D.F.M. and de Souza, M.D.L.R., 2018. Expression of superantigens and the agr system in Staphylococcus epidermidis. Microb Pathog. 115:19-24.

18. Pinheiro, L., Brito, C.I., De Oliveira, A., Martins, P.Y.F., Pereira, V.C. and Da Cunha, M.D.L.R., 2015. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. Toxins. 7: 3688-3699.

19. Pishva, E., Havaei, S.A., Arsalani, F., Narimani, T., Azimian, A. and Akbari, M., 2013. Detection of methicillin-resistance gene in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients in Al-Zahra Hospital using polymerase chain reaction and minimum inhibitory concentration methods. Adv Biomed Res. 2: 23.

20. Podkowik, M., Bystroń, J. and Bania, J., 2012. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. Foodborne Pathog Dis. 9:91-93.

21. Rall, V.L.M., Sforcin, J.M., de Deus, M.F.R., de Sousa, D.C., Camargo, C.H., Godinho, N.C., Galindo, L.A., Soares, T.C.S. and Araujo Jr, J.P., 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. Foodborne Pathog Dis. 7:1121-1123.

22. Razavi, S., Dadashi, M., Pormohammad, A., Khoramrooz, S.S., Mirzaii, M., Gholipour, A. and Darban-Sarokhalil, D., 2018. Methicillin-resistant staphylococcus epidermidis in Iran: A systematic review and meta-analysis. Arch Clin Infect Dis.13:e58410.

23. Rosenthal, M.E., Dever, L.L., Moucha, C.S., Chavda, K.D., Otto, M. and Kreiswirth, B.N., 2011. Molecular characterization of an

early invasive *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection. Microb Drug Resist. 17:345-50.

24. Sani, N.A.M., Sapri, H.F., Neoh, H.M. and Hussin, S. 2014. First report on the molecular epidemiology of Malaysian *Staphylococcus epidermidis* isolated from a University Teaching Hospital. BMC Res Notes. 7: 597

25. Shamansouri, S., Zadeh, V.K. and Khazaei, M., 2016. Study on the percent of frequency of ACME-Arca in clinical isolates resistant to methicillin-Staphylococcus epidermidis in Isfahan, Iran. J Fundam Appl Sci. 8:1046-57

26. Shariati, L., Shojapour, M., Validi, M., Farrokhi, E., Tabatabaiefar, M.A., Karimi, A. and Nafisi, M.R., 2011. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2009. Iran South Med J. 14.

27. Sharma, V., Jindal, N., Devi, P. 2010. Prevalence of methicillin resistant coagulase negative staphylococci in a tertiary care hospital. Iran J Microbiol. 2:185.

28. Tahmasebi, H., Dehbashi, S. and Arabestani, M.R., 2018. Determination of antimicrobial resistance pattern in Methicillin-Resistant Staphylococcus saprophyticus and *Staphylococcus epidermidis* and Detection of Resistance Genes to Clindamycin and Erythromycin. . Iran J Med Microbiol. 12:169-178.

29. Vasconcelos, N.G., Pereira, V.C., Araújo Júnior, J.P. and da Cunha, M.D.L., 2011. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. J Appl Microbiol. 111: 749-762.

30. Wu, D., Li, X., Yang, Y., Zheng, Y., Wang, C., Deng, L., Liu, L., Li, C., Shang, Y., Zhao, C. and Yu, S., 2011. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. J Med Microb. 60:35-45.

Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) strains associated with food poisoning outbreaks in clinical samples clinical samples

Behshood P[1], Tajbakhsh E[2*], Momtaz H[2]

1. Ph.D. student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

Received: 29 February 2020 Accepted: 30 May 2020

Abstract

Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* is an important pathogen that causes infectious diseases whose treatment is extremely formidable. *Staphylococcus epidermidis* enterotoxins with effects on intestinal epithelial cells can are be causing Create food poisoning in people. The aim of the current study is to the identification of MRSE strains associated with food poisoning outbreaks in Isfahan. During six- months, 60 clinical specimens to isolated from strains of *Staphylococcus epidermidis* were screened. Following identification strains, MRSE isolates were isolated by PCR method and, and then antibiotic resistance pattern of them was determined by Kirby – Bauer method. The presence of the *sea*, *seb*, *sed* and, *sei* genes was analyzed by PCR. 45 isolates of *Staphylococcus epidermidis* were isolated from 60 samples, 30 isolates (66.6 percent) were MRSE. MRSE isolates exhibited the highest rates of resistance to penicillin (80 percent), and cefoxitin (56.6 percent), while they showed the lowest resistance to levofloxacin (13.3 percent), and rifampicin (6.6 percent). The prevalence rate of Moreover, the frequency of enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sed* and, s*ei* was 60 percent, 63.3 percent, 13.3 percent and, 76.6 percent respectively, in the isolate. In this study, a high percentage of MRSE isolates were antibiotic-resistant and produced enterotoxin. Considering that these toxins are superantigen and can more intense the complications of clinical and nosocomial infections, detecting and rapid treatment of these infections are essential.

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), food poisoning, PCR.