

مطالعه فراوانی ژن های کد کننده انتروتوکسین و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های سبزیجات و سالاد در استان چهارمحال و بختیاری

منوچهر مومنی شهرکی^{۱*}، امیر شاکریان^۲، ابراهیم رحیمی^۲، فرهاد صفرپور دهکردی^۳

۱. کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: Momeniman@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یکی از اصلی ترین عوامل نوظهور ایجاد کننده مسمومیت های غذایی مقاوم به آنتی بیوتیک در انسان است. باکتری همچنین توانایی تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت را دارد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی میزان شیوع، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های کد کننده انتروتوکسین در سوش های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد انجام پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۴۸۵ نمونه سبزیجات و سالاد جمع آوری و سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از کشت میکروبی استفاده و سوش های مقاوم به متی سیلین با استفاده از دیسک های سفوکسیتین و اگزاسیلین تایید شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن های کد کننده انتروتوکسین به ترتیب با استفاده از روش های انتشار دیسکی و PCR ارزیابی شدند. میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در نمونه های سبزیجات و سالاد به ترتیب ۷/۲ و ۸/۵۱ درصد بود. سوش های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتری آکسون (۱۰۰ درصد) داشتند. شیوع مقاومت برعلیه ایمی پنم (۱۰/۵۲ درصد) و کلرامفنیکل (۲۳/۶۸ درصد) کمتر از سایر آنتی بیوتیک ها بود. فراوان ترین انتروتوکسین های ردیابی شده در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، SEA (۶۳/۱۵ درصد) و SEB (۵۲/۲۶ درصد) بودند. حضور همزمان چند ژن کد کننده انتروتوکسین و مقاومت چندگانه برعلیه چندین آنتی بیوتیک در سوش های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های سبزیجات و سالاد نشان دهنده بروز یک مشکل بهداشتی عمده در این دسته از مواد غذایی است. جلوگیری از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک ها می تواند خطر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انتروتوکسین زا را در سبزیجات و سالاد کاهش دهد.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، انتروتوکسین، مقاومت آنتی بیوتیکی، سبزیجات، سالاد.

مقدمه

نیز به دلیل استفاده از مواد اولیه با کیفیت بهداشتی پایین و همچنین عدم رعایت بهداشت فردی در تهیه آن ها، می توانند منبع مناسبی برای انتقال میکروارگانیسم های بیماری زا به انسان باشند (2010 Kluytmans).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و همچنین دلیل بروز اکثر مسمومیت های غذایی در جوامع محسوب می شود

امروزه مصرف سبزیجات و سالاد بیش از پیش مورد توجه تمامی اقشار جامعه قرار گرفته است. با این وجود، تماس مستقیم سبزیجات با کودهای حیوانی و انسانی، آب های آلوده مورد استفاده برای آبیاری آن ها و خاک که بستری از انواع میکروارگانیسم هاست، سبب شده است تا این گروه از مواد غذایی به عنوان یک فاکتور مهم برای ابتلا مصرف کنندگان به انواعی از بیماری های غذازا باشند. سالادهای تولید شده در انواع رستوران ها

ساختمان فشرده، این انتروتوکسین‌ها نسبت به حرارت و پروتئازهای روده مقاوم هستند و تنها در اثر جوشیدن طولانی مدت غیر فعال می‌شوند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). در نتیجه این امکان وجود دارد که فردی در اثر مصرف مواد غذایی عاری از سلول‌های زنده استافیلوکوکوس/اورئوس، دچار بیماری شود (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018).

یکی از راهکارهای درمانی برای موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌هاست اما متأسفانه تجویز نامناسب و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی و پزشکی سبب ایجاد سوش‌های مقاوم استافیلوکوکوس/اورئوس شده است (Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019). در سال ۱۹۴۰ بعضی از سوش‌های استافیلوکوک به پنی‌سیلین مقاوم شدند. یک دهه بعد سوش‌های مقاوم چندگانه به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین گزارش شد (Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019). اولین بار در سال ۱۹۶۰ استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد. گزارشات نشان داده است که سویه‌های MRSA از حدت بالاتری برخوردار هستند و معمولاً مقاومت بیشتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پنی‌سیلین‌ها، تتراسایکلین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها، کوئینولون‌ها و ... دارند (Chang et al., 2015; Lee et al., 2018; Khamash et al., 2019).

با توجه به مصرف بالای سبزیجات و سالاد، تماس مستقیم سبزیجات با خاک آلوده، آب و کودهای حیوانی و بعضاً انسانی، اهمیت غذازاد بودن استافیلوکوکوس/اورئوس، شیوع بالای آن در موارد مسمومیت‌های غذایی و در نهایت با توجه به فقدان مطالعات میکروبیولوژیک، اپیدمیولوژیک و بهداشتی در

(Kluytmans, 2010). استافیلوکوکوس/اورئوس یک باکتری کوکسی شکل، گرم مثبت، هوازی بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و مهم‌ترین گونه از جنس استافیلوکوک است. علاوه بر عفونت‌های پوستی، عفونت زخم و سوختگی، مننژیت، اندوکاردیت، پنومونی و سندرم شوک‌سمی (Barber et al., 1948)، استافیلوکوکوس/اورئوس عامل بروز مسمومیت غذایی با دوره کمون کوتاه ۲ تا ۴ ساعته و علائم تهوع، استفراغ، دل پیچه و ضعف، می‌باشد، هر چند که اسهال نیز در پاره‌ای از موارد گزارش شده است (Kadariya, 2014). دلیل اصلی دوره کمون کوتاه بیماری، خوردن سم از قبل تولید شده در ماده غذایی است (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). به عبارت دیگر انتروتوکسین‌های باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس (شامل انتروتوکسین‌های A-E، G-R و U) با تاثیر روی گیرنده‌های موجود در روده موجب ایجاد پاسخ استفراغ در فرد می‌گردند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). در اصل گیرنده‌های تحریک شده توسط انتروتوکسین از طریق اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک موجب تحریک مرکز استفراغ در مغز می‌شوند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). هنوز مکانیسم اصلی ایجاد اسهال توسط انتروتوکسین‌ها به خوبی شناسایی نشده است اما تحقیقات نشان داده اند که انتروتوکسین‌ها فعالیت آدنیلات سیکلاز را تحریک نمی‌کنند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). بررسی‌های متفاوت نشان می‌دهند که در موارد شیوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، کمتر از یک میلی گرم سم خالص جهت ایجاد علائم بیماری کفایت می‌کند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). انتروتوکسین‌ها از پلی‌پپتیدهای کوچک تک رشته‌ای تشکیل شده‌اند و هر یک از آن‌ها دارای یک حلقه دی‌سولفیدی نزدیک به مرکز مولکول می‌باشد (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). به دلیل

$$n = (1.96 \times 1.96) \times \frac{0.35 \times 0.65}{0.043 \times 0.043} = 472.66 = 485$$

جداسازی استافیلوکوکوس/اورئوس از نمونه‌ها به منظور جداسازی باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس از نمونه‌های سبزیجات و سالاد، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت Tryptic Soy Broth (مرک، آلمان) غنی شده با ۱۰ درصد نمک کشت داده شدند و به مدت ۱۸ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس کلنی‌های رشد یافته در محیط Baird Parker Tryptic Soy Broth به محیط Agar (مرک، آلمان) غنی شده با امولسیون تلوریت-زرد تخم مرغ انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند. کلنی‌های سیاه رنگ با هاله رسوبی در اطراف به عنوان کلنی‌های تپیک برای باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس در نظر گرفته شد و با تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، O/F، اوره آز، فسفاتاز، کوواگولاز، DNase و تخمیز مانیتول مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

برای این منظور تمامی ایزوله‌های استافیلوکوکوس-اورئوس جدا شده از سبزیجات و سالاد از نظر مقاومت نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اگزاسیلین (۱ میکروگرم) (Oxoid, UK) ارزیابی در محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) ارزیابی شدند و ایزو له‌هایی که به صورت همزمان نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک مقاومت داشتند، به عنوان جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند (Wu et al., 2019).

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

به منظور بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

زمینه استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در سبزیجات و سالاد، بررسی حاضر را به منظور مطالعه میزان شیوع، الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد انجام پذیرفت.

روش کار

نمونه‌گیری و انتقال به آزمایشگاه

مطالعه حاضر کاربردی و از نوع توصیفی^۱ و مقطعی^۲ می‌باشد. در این مطالعه جامعه آماری نمونه‌های سبزیجات جمع‌آوری شده از میوه‌فروشی‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری و در مورد نمونه‌های سالاد، نمونه‌های سالاد تولید شده در رستوران‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری بودند. نمونه‌های مطالعه حاضر در بهار سال ۱۳۹۶ در طول ۳ ماه جمع‌آوری شدند.

روش نمونه‌گیری در مطالعه حاضر، نمونه‌گیری تصادفی ساده بود. نمونه‌های سبزیجات و سالاد از نظر ظاهری و فیزیکی (رنگ و قوام) سالم بودند. نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل (به دور از امکان ایجاد آلودگی متقاطع در زمان نمونه‌گیری) و در روز نمونه‌گیری در مدت ۲ ساعت در یخچال حاوی یخ و در دمای حدود ۴ درجه سلسیوس به مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال داده شدند. تعداد نمونه‌ها با توجه به میانگین شیوع حدود ۳۵ درصدی استافیلوکوکوس/اورئوس ذکر شده در مطالعات پیشین در مواد غذایی با استفاده از فرمول زیر مجموعاً ۴۸۵ نمونه شامل ۲۵۰ نمونه از انواع سبزیجات و ۲۳۵ نمونه سالاد سنتی، بود.

$$n = z^2 \frac{pq}{d^2}$$

1_ Description

2_ Cross sectional

استخراج DNA و ارزیابی حضور ژن‌های کدکننده انتروتوکسین
 به منظور استخراج DNA از کشت یک شبه باکتری در محیط Brain Heart Infusion (مرک، آلمان) استفاده شد. برای این منظور سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت BHI گرم‌خانه‌گذاری شدند. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت مورد نظر، استخراج شد. سپس نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، قرار داده شد.
 به منظور ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین از تکنیک PCR استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی سیلین جداول ۱ تا ۱۰ از نمونه‌های سبزیجات و سالاد در جدول ۱ نمایش داده شده است.

سبزیجات و سالاد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین (30 µg/disk)، اریترومایسین (5 µg/disk)، کلرامفنیکل، کوآموکسی‌کلاو، ایمی‌پنم، کوتریموکسازول، ریفامپین (30 µg/disk)، پنی‌سیلین، سفتری‌راکسون، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، متی-سیلین (10 µg/disk) و آمپی‌سیلین (10 µg/disk) (Oxoid, UK)، از روش دیسک‌گذاری در محیط مولر-هینتون آگار (Merck, Germany) و با توجه به دستورالعمل انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی، استفاده شد (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). پس از گرم‌خانه‌گذاری هوای کلنی‌های جداسازی شده در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به وسیله روش ارائه شده توسط انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی، مورد بررسی قرار گرفت. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) از باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس ATCC 10392 به منظور کنترل در بررسی مقاومت آنتی-بیوتیکی استفاده شد.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد (Młynarczyk et al., 1998; Jay et al., 2000; Seo and Bohach, 2013; Tong et al., 2015).

منابع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (5'-3')	انتروتوکسین
۴۰	۱۲۰	F:TTGGAAACGGTTAAAACGAA R:GAACCTTCCCATCAAAAACA	SEA
۴۰	۴۷۸	F:TCGCATCAAACGACAAACG R:GCAGGTA CTCTATAAGTGCC	SEB
۴۰	۲۵۷	F:GACATAAAAGCTAGGAATTT R:AAATCGGATTAACATTATCC	SEC
۴۰	۳۱۷	F:CTAGTTTGGTAATATCTCCT R:TAATGCTATATCTTATAGGG	SED
۴۱	۲۰۹	F:AGGTTTTTTTACAGGTCATCC R:CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	SEE
۴۲	۲۸۷	F:AAGTAGACATTTTTGGCGTTC R:AGAACCATCAAACCTCGTATAGC	SEG
۴۲	۲۱۳	F:GTCTATATGGAGGTACAACACT R:GACCTTTACTTATTTTCGCTGTC	SEH
۴۲	۴۵۴	F:GGTGATATTGGTGTAGGTAAC R:ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	SEI
۴۳	۱۴۲	F:CATCAGAAGCTGTTGTTCCGCTAG R:CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	SEJ

ژن در ۲۵ میکرولیتر مخلوط شامل ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲۰۰

در تمامی واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادینت (اپندورف، آلمان) استفاده شد. فرایند تکثیر

پرایمرها، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. جدول ۲ روند تکثیر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌ها را نشان می‌دهد.

میکرومول dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر 10x (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱ میکرومول کلرید منگنز (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱۰ پیکومول از هر کدام از

جدول ۲- روند تکثیر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در آزمون PCR.

ژن کدکننده انتروتوکسین	فرایند دمایی تکثیر
SEA SEB SEC	۱ سیکل
	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۳۰ سیکل
SED	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه
	۵۵ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۱ سیکل
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه
SEE	۱ سیکل
	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۳۵ سیکل
	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه
	۵۷ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه
SEG SEH	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۱ سیکل
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه
	۱ سیکل
	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
SEI	۳۰ سیکل
	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
	۵۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۱ سیکل
SEJ	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه
	۱ سیکل
	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۳۰ سیکل
	۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۶۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه
	۱ سیکل
	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۸ دقیقه

مثبت، استفاده شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز می‌شوند، سپس ژل‌ها توسط سایبرگرین (فرمنتاز، آلمان) رنگ آمیزی خواهد

در تمام واکنش‌های PCR، از آب مقطر فاقد DNA به عنوان کنترل منفی و از باکتری استافیلوکوکوس/ورئوس ATCC 10357 و همچنین نمونه‌های DNA مثبت از نظر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌ها عنوان کنترل

شد و نوارهای DNA با استفاده از پرتو UV مشاهده و ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری و توسط نرم افزار SPSS آنالیز شد. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود.

نتایج

در کل ۴۸۵ نمونه سبزیجات و سالاد از نظر حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد، مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول ۳ فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را در نمونه‌های

سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری، ۱۴/۰۲ درصد بود. در کل ۴۰ نمونه از ۲۵۰ نمونه سبزیجات (۱۶ درصد) و ۲۸ نمونه از ۲۳۵ نمونه سالاد (۱۱/۹۱ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند. اختلاف معنادار آماری برای شیوع استافیلوکوکوس اورئوس بین نمونه‌های سالاد و سبزیجات دیده شد ($P < 0.05$). از تعداد ۶۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۳۸ ایزوله (۵۵/۸۸ درصد) به طور همزمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اگزاسیلین مقاوم بودن و به عنوان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند.

جدول ۳. فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری.

نوع نمونه ها	تعداد نمونه جمع آوری شده	فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس (%)	فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (%)
سبزیجات	۲۵۰	۴۰ (۱۶)	۱۸ (۴۵)
سالاد	۲۳۵	۲۸ (۱۱/۹۱)	۲۰ (۷۱/۴۲)
کل	۴۸۵	۶۸ (۱۴/۰۲)	۳۸ (۵۵/۸۸)

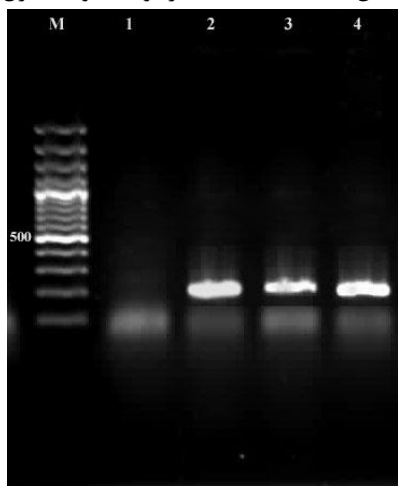
داشته‌اند. کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه آنتی‌بیوتیک های ایمی‌پنم (۱۰/۵۲ درصد) و کلرامفنیکل (۲۳/۶۸ درصد) داشتند. شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر علیه اریترومایسین، کوتریموکسازول، ریفامپین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به ترتیب ۷۳/۶۸، ۶۰/۵۲، ۴۴/۷۳ و ۷۱/۰۵ درصد بود. در کل سوش های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی-سیلین جدا شده از نمونه‌های سالاد مقاومت آنتی-بیوتیکی بیشتری نسبت به سوش‌های جدا شده از سبزیجات داشتند ($P < 0.05$).

جدول ۴ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آنتی‌بیوتیک های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی-سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتری‌راکسون (۱۰۰ درصد)

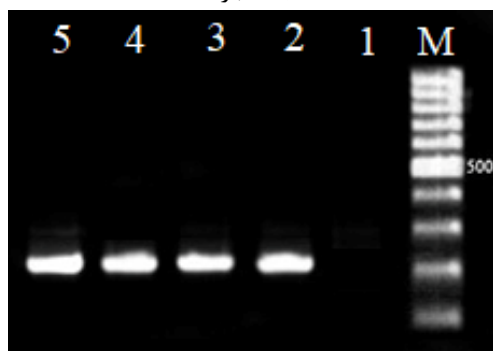
جدول ۴. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های سبزیجات و سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری.

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی (%)											نوع نمونه ها (تعداد)
آمی سیلین	سولفامتوکسازول تری متوپریم	سفتی راکسون	ریفامپین	کو تریموکسازول	ایمی پنم	کو آموکسی کلاو	کلر امفیکل	پنی سیلین	اریترومایسین	تتراسیکلین	استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین
۱۸	۱۲	۱۸	۷	۱۰	۱	۱۸	۴	۱۸	۱۳	۱۵	سبزیجات (۱۸)
(۱۰۰)	(۶۶/۶۶)	(۱۰۰)	(۳۸/۸۸)	(۵۵/۵۵)	(۵/۵۵)	(۱۰۰)	(۲۲/۲۲)	(۱۰۰)	(۷۲/۲۲)	(۸۳/۳۳)	
۲۰	۱۵	۲۰	۱۰	۱۳	۳	۲۰	۵	۲۰	۱۵	۱۷	سالاد (۲۰)
(۱۰۰)	(۷۵)	(۱۰۰)	(۵۰)	(۶۵)	(۱۵)	(۱۰۰)	(۲۵)	(۱۰۰)	(۷۵)	(۸۵)	
۳۸	۲۷	۳۸	۱۷	۲۳	۴	۳۸	۹	۳۸	۲۸	۳۲	کل (۳۸)
(۱۰۰)	(۷۱/۰۵)	(۱۰۰)	(۴۴/۷۳)	(۶۰/۵۲)	(۱۰/۵۲)	(۱۰۰)	(۲۳/۶۸)	(۱۰۰)	(۷۳/۶۸)	(۸۴/۲۱)	

نمونه کنترل مثبت، ۲: نمونه مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ (۱۴۰ جفت باز) و ۳: نمونه کنترل منفی.

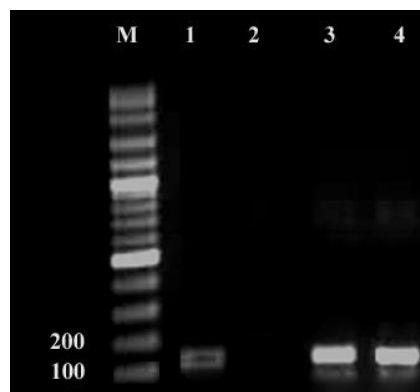


شکل ۳. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲: نمونه کنترل مثبت و ۳ و ۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ (۲۰۹ جفت باز).

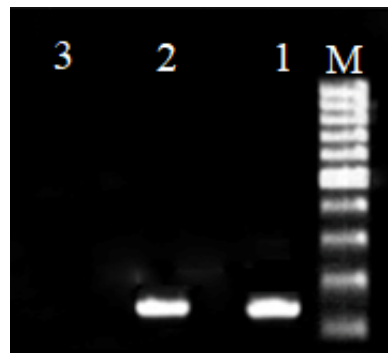


شکل ۴. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEH. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲-۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد

اشکال ۱ تا ۹ تصاویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن های کد کننده انتروتوکسین ها را نشان می دهد.



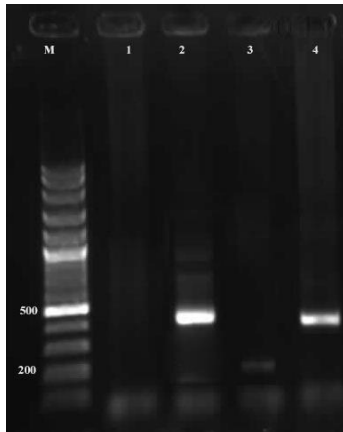
شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEA. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل مثبت، ۲: نمونه کنترل منفی، ۳ و ۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEA (۱۲۰ جفت باز).



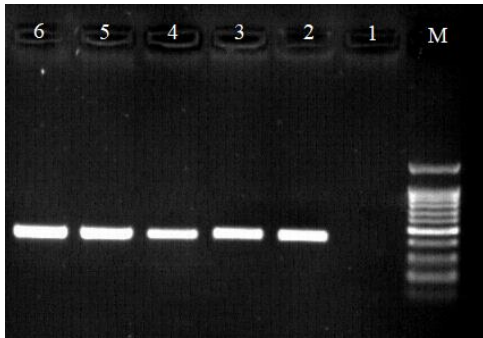
شکل ۲. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEJ. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱:

کننده انتروتوکسین SED (۳۱۷ جفت باز)، ۵: نمونه کنترل

مثبت.



شکل ۸. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEI. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲: نمونه مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEI (۴۵۴ جفت باز)، ۳: نمونه منفی از نظر حضور ژن و ۴: نمونه کنترل مثبت.

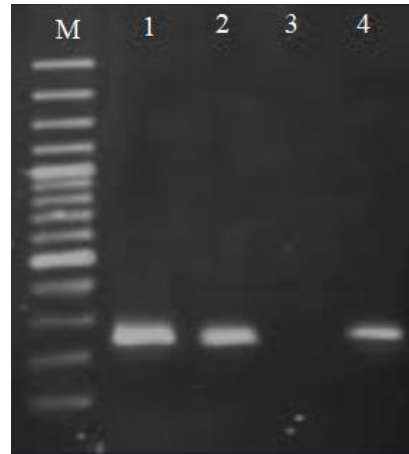


شکل ۹. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEB. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲-۵: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEB (۴۷۸ جفت باز)، ۶: نمونه کنترل مثبت.

جدول ۵ فراوانی ژن های کد کننده انتروتوکسین در سویه های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه های سبزیجات و سالاد جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری را نشان می دهد. بر طبق نتایج بدست آمده از این جدول، ژن های کد کننده انتروتوکسین های SEA (۶۳/۱۵ درصد) و SEB (۵۲/۲۶ درصد) بیشترین فراوانی را در سوش های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری داشتند. کمترین فراوانی ژن های کد کننده

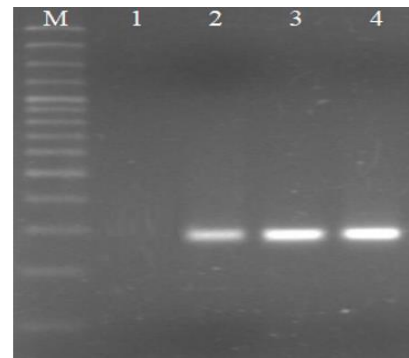
کننده انتروتوکسین SEH (۲۱۳ جفت باز) و ۵: نمونه

کنترل مثبت.



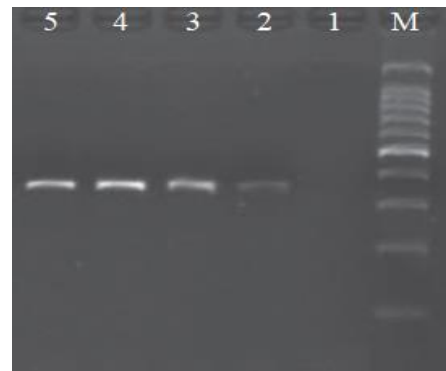
شکل ۵. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEC. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱ و ۲: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEC (۲۵۷ جفت باز)، ۳: نمونه کنترل منفی و ۴: نمونه

کنترل مثبت.



شکل ۶. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SEG. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲ و ۳: نمونه های مثبت از نظر ژن کد کننده انتروتوکسین SEG (۲۸۷ جفت باز)، ۴: نمونه

کنترل مثبت.



شکل ۷. تصویر الکتروفورز محصولات PCR برای ردیابی ژن کد کننده انتروتوکسین SED. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۲-۴: نمونه های مثبت از نظر ژن کد

شیوع ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های کلاسیک در سوش‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سالاد بیشتر از سبزیجات بود ($P < 0.05$).

انتروتوکسینی در سوش‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری مربوط به *SEI* (۲/۶۳ درصد) و *SEJ* (۲/۶۳ درصد)، بود. در کل

جدول ۵. فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات و سالاد جمع‌آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری.

شیوع ژن‌های کدکننده انتروتوکسین (%)									نوع نمونه ها (تعداد)
<i>SEJ</i>	<i>SEI</i>	<i>SEH</i>	<i>SEG</i>	<i>SEE</i>	<i>SED</i>	<i>SEC</i>	<i>SEB</i>	<i>SEA</i>	<i>استافیلوکوکوس/اورئوس</i> مقاوم به متی‌سیلین
-	-	۱ (۵/۵۵)	۱ (۵/۵۵)	۲ (۱۱/۱۱)	۸ (۴۴/۴۴)	۷ (۳۸/۸۸)	۹ (۵۰)	۱۱ (۶۱/۱۱)	سبزیجات (۱۸)
۱ (۵)	۱ (۵)	۲ (۱۰)	۱ (۵)	۳ (۱۵)	۹ (۴۵)	۹ (۴۵)	۱۲ (۶۰)	۱۳ (۶۵)	سالاد (۲۰)
۱ (۲/۶۳)	۱ (۲/۶۳)	۳ (۷/۸۹)	۲ (۵/۲۶)	۵ (۱۳/۱۵)	۱۷ (۴۴/۷۳)	۱۶ (۴۲/۱۰)	۲۱ (۵۲/۲۶)	۲۴ (۶۳/۱۵)	کل (۳۸)

باکتری در سالادهای سنتی احتمالاً حضور باکتری در نمونه‌های خام اولیه مورد استفاده برای تهیه سالاد و همچنین انتقال سوش‌های باکتریایی در زمان تهیه سالاد از ابزار آلات آشپزخانه و ظروف و همچنین دست و ریز قطرات تنفسی کارکنان، می‌باشد. در این ارتباط، Goudarzi و همکاران (۲۰۱۷) اقدام به مطالعه آلودگی میکروبی سالادهای شهر بندرعباس نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که تنها ۴۰ درصد از نمونه‌های سالاد ماکارونی، آلوده به *استافیلوکوکوس/اورئوس* بودند. Tajbakhsh و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به مطالعه آلودگی میکروبی سالادهای الویه سنتی و صنعتی شهرستان شهرکرد نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* در نمونه‌های سالاد الویه سنتی و صنعتی به ترتیب ۳۴/۸ و ۶۵/۲۰ درصد بود. این محققان دلیل آلودگی بالا در سالادهای صنعتی را دخالت دست در بخش عمده ای از مراحل تهیه و تولید سالاد الویه و همچنین عدم قرارگیری مواد الویه سالاد در دمای مناسب دانستند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیش از نیمی از جدایه‌های

بحث

اخیراً *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود. (Lee et al., 2018). همچنین حضور *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی خصوصاً گوشت، شیر و سبزیجات نیز، گزارش شده است (Riva et al., 2015; Ribeiro et al., 2018; Wu et al., 2019). مطالعه حاضر نیز که به منظور ارزیابی میزان شیوع، الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام شد، شیوع باکتری در نمونه‌های سبزیجات و سالاد به ترتیب ۷/۲ درصد (۱۸ نمونه از ۲۵۰ نمونه) و ۸/۵۱ درصد (۲۰ نمونه از ۲۳۵ نمونه) بود که بسیار قابل توجه است. دلیل حضور بالای باکتری در سبزیجات احتمالاً تماس مستقیم آن‌ها با خاک، آب‌های آلوده مورد استفاده برای آبیاری و انواع کودهای حیوانی و حتی انسانی است. دلیل حضور

جنتامایسین، انروفلوکسازین، آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و سفالوتین به ترتیب ۷۵/۶، ۳۱/۷، ۳۱/۷، ۳۱/۷، ۲۹/۲۶، ۲۸/۰۴، ۲۶/۸۲، ۲۰/۷۳ و ۱۷/۰۷ درصد بود. در مطالعه Rodriguez-Lazaro و همکاران (۲۰۱۵) ۱۱۷ نمونه گوشت، ۷۵ نمونه شیر و ۳ نمونه تخم مرغ از نظر حضور استافیلوکوکوس/اورئوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. در کل ۶۶ نمونه (۳۳/۹ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس/اورئوس بودند. از بین سوش‌های مورد بررسی، ۹/۱ درصد آنها مقاوم به متی‌سیلین و در بین سوش‌های حساس به متی‌سیلین، میزان شیوع مقاومت بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۴۴/۱ درصد، تتراسیکلین ۱۰/۲ درصد و آمینوگلیکوزیدها شامل آمیکاسین و توبرامایسین ۸/۵ درصد بود. مقاومت نسبت به پنی‌سیلین، کوآموکسی‌کلاو، آمپی‌سیلین، کوآموکسی‌سیلین و سفتریاکسون در تمام جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یافت شد. دلیل اختلاف در میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در مطالعات مختلف گزارش شده است احتمالاً تفاوت در نوع نمونه‌ها، در دسترس بودن آنتی‌بیوتیک و نظر پزشکان و دامپزشکان مناطق مختلف در نوع و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک و قدرت خرید مردم می‌باشد. با این وجود دلیل اصلی شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تمام گزارشات، مصرف بی‌رویه و غیر اصولی آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

توانایی تولید انتروتوکسین در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس یکی از ویژگی‌های اصلی متمایز کننده بعضی از سوش‌های حدت‌دار و بیماری‌زا از سایر سوش‌هاست. تولید انتروتوکسین‌ها معمولاً به وسیله حضور یکسری از ژن‌های کد کننده انتروتوکسین، انجام می‌شود. یکی از اصلی‌ترین انتروتوکسین‌های اختصاصی طیور، *SED* است (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018) که در مطالعه حاضر از شیوع قابل توجهی در سوش‌های جداسازی شده از سبزیجات و سالاد برخوردار بود. دلیل

استافیلوکوکوس/اورئوس، مقاوم به متی‌سیلین بودند که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، مقاومت بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های ارزیابی شده و خصوصاً پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و سفتری-راکسون (۱۰۰ درصد) داشتند. دلیل بروز مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی، ماهیت سوش‌های استافیلوکوکوس-اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد که به شکل همزمان نسبت به پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مقاوم هستند. دلیل بالاتر بودن شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی-سیلین جدا شده از سالاد نسبت به سبزیجات احتمالاً انتقال سوش‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های انسانی از کارکنان آلوده آشپزخانه رستوران‌ها سطح استان چهارمحال و بختیاری به نمونه‌های سالاد می‌باشد.

Soltan Dallal و همکاران (۲۰۰۸) اقدام به مطالعه آلودگی مواد غذایی رستورانی شهر تهران به استافیلوکوکوس/اورئوس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سیپروفلوکسازین، سفتریاکسون، کلیندامایسین، اگزاسیلین، متی‌سیلین، اریترومایسین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به ترتیب ۳، ۴، ۳، ۳، ۳، ۲ و ۱ درصد بود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Momtaz و همکاران روی ۳۶۰ نمونه گوشت مرغ در استان اصفهان انجام پذیرفت، ۸۲/۹۲ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بودند در حالی که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ماکرولیدها تنها ۳۴/۱۴ درصد بود. میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، سولفامتوکسازول، تری‌متوپریم، استرپتومایسین،

شده ردیابی نگردید. مطالعه Chang و همکاران در سال ۲۰۱۶ (Chang et al., 2013) نشان داد که ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های *SEC* (۵۰ درصد) و *SED* (۷۵ درصد) بیشترین فراوانی را در بین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از مواد غذایی در چین داشتند. Alhashimi و دیگران در سال ۲۰۱۷ (Alhashimiet al., 2017) گزارش نمودند که انتروتوکسین‌های *SEB* (۱۸ درصد)، *SEA* (۱۶ درصد)، *SEE* (۸ درصد)، *SEC* (۸ درصد) و *SED* (۶ درصد) شایع‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده از سواب‌های اخذ شده از بینی کارکنان در مراکز تهیه مواد غذایی در شهر کربلا بودند. Rahimi در سال ۲۰۱۳ (Rahimi et al., 2013) نشان دادند که فراوان‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های گوشت گوساله، گوشت چرخ‌چ، گوشت گوسفند، گوشت بز و گوشت شتر به ترتیب *SEA* (۶۲/۵ درصد)، *SEA* (۵۴/۵۴ درصد)، *SEC* (۷۵ درصد)، *SEC* (۶۶/۶۶ درصد) و *SEA*، *SEB* و *SEC* (۲۵ درصد) بودند. Madahi و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Madahi et al., 2014) نیز نشان دادند که انتروتوکسین‌های *SEA* (۴/۱۶ درصد)، *SEB* (۱۲/۵۰ درصد)، *SEC* (۸/۳۳ درصد) و *SED* (۱۲/۵۰ درصد) فراوان‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در نمونه‌های مواد غذایی بودند. Wu و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Wu et al., 2018) گزارش نمودند که شایع‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های سبزیجات در کشور چین به ترتیب *SEC* (۸۳/۳۰ درصد)، *SEG* (۵۶/۷۰ درصد)، *SEH* (۵۰/۰۰ درصد)، *SEJ* (۴۶/۷۰ درصد) و *SEB* (۳۶/۷۰ درصد) بودند.

این یافته احتمالاً استفاده از کودهای مرغی برای تقویت رشد سبزیجات بوده است. همچنین ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های *SEA* (۶۳/۱۵ درصد) *SEB* (۵۲/۲۶ درصد) و *SEC* (۴۲/۱۰ درصد) نیز شیوع بالایی در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری داشتند. انتروتوکسین‌های *SEA* و *SEB* انتروتوکسین‌های اصلی ردیابی شده در انواع موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکویی هستند (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). با وجود این که فراوانی انتروتوکسین‌های نو ظهور *SEG*، *SEH*، *SEI* و *SEJ* در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از سبزیجات و سالاد عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری به ترتیب ۷/۸۹٪، ۲/۶۳ و ۲/۶۳ درصد بود اما انتروتوکسین‌های نو ظهور (*SEJ-SEG*) مقاومت حرارتی و همچنین مقاومت پروتئولیتیکی (نسبت به آنزیم‌های پپسین و تریپسین دستگاه گوارش) بیشتری نسبت به انواع کلاسیک دارند که سبب افزایش اهمیت آنها می‌شود (Krakauer et al., 2016; Fisher et al., 2018). Al-Bahry و دیگران در سال ۲۰۱۴ (Al-Bahry et al., 2014) نشان دادند که رول‌های ساندویچی تولید شده در کشور عمان، حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۴۸/۴ درصد)، *SEB* (۳۶/۱ درصد)، *SEC* (۳/۳ درصد)، *SED* (۱/۳ درصد) و *SEE* (۱۰/۹ درصد)، نمونه‌های مرغ حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۵۱/۳ درصد)، *SEB* (۳۰ درصد)، *SEC* (۱/۲ درصد)، *SED* (۱۱/۲ درصد) و *SEE* (۶/۳ درصد) و در نهایت نمونه‌های تخم مرغ پخته حامل انتروتوکسین‌های *SEA* (۴۱/۸ درصد)، *SEB* (۴۰/۶ درصد)، *SEC* (۳/۵ درصد)، *SED* (۲/۲ درصد) و *SEE* (۶/۵ درصد)، سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس بودند. سایر انواع انتروتوکسین‌ها در نمونه‌های ارزیابی

1. Al-Bahry, S., Mahmoud, I., Al-Musharafi, S., and Sivakumar, N. 2014. *Staphylococcus aureus* contamination during food preparation, processing and handling. Int. J. Chem. Eng. Appl. 5: 388.
2. Alhashimi, H.M.M., Ahmed, M.M., and Mustafa, J.M. 2017. Nasal carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* among food handlers in Kerbala city. Karbala. Int. J. Modern. Sci. 3: 69-74.
3. Barber, M., and Rozwadowska-Dowzenko, M. 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. Lancet. 252: 641-644.
4. Chang, V.S., Dhaliwal, D.K., Raju, L., and Kowalski, R.P. 2015. Antibiotic resistance in the treatment of *Staphylococcus aureus* keratitis: a 20-Year Review. Cornea. 34: 698-703.
5. Chang, Y., Gao, H., Zhu, Z., Ye, S., Yang, Y., Shen, X., Zhang, D., and Song, Q. 2016. High prevalence and properties of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* ST5 strains of food sources in China. Foodborne. Pathog. Dis. 13: 386-390.
6. CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second informational supplement M100-S21. Wayne Pa.
7. Fisher, E.L., Otto, M., and Cheung, G.Y.C. 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. Front Microbiol. 9: 436.
8. Goudarzi, B., Ali Pour, V., Rezaei, L., Dindarlu, K., Heidari, M., and Rahmaniyan, O. 2016. Bacteriological quality of ready to use salads at restaurants in Bandar Abbas. J Prev Med. 3: 31-38.
9. Jay, James., M., Loessner, Martin J., Golden, David A. Six th edition. 2000. Staphylococcal Gastroenteritis. Aspen Publishers, Inc. Modern Food Microbiology Gaithersburg, Maryland. 441-459.
10. Kadariya, J., Smith, T.C., and Thapaliya, D. 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: An

نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های سبزیجات و سالاد استان چهارمحال و بختیاری بود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج استفاده شده در پزشکی و دامپزشکی و خصوصاً پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها برخوردار بودند. همچنین ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های *SEC*، *SEB*، *SEA* و *SED* از شیوع قابل توجهی در سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین برخوردار بودند. با توجه به بالاتر بودن شیوع باکتری در نمونه‌های سالاد و همچنین وجود مقاومت بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های انسانی احتمالاً انتقال آلودگی از کارکنان آلوده مراکز تولید نمونه‌های سالاد دلیل اصلی شیوع بالای باکتری در این نمونه‌ها بوده است. با توجه به شیوع بالای سوش‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و حاوی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین، پیشنهاد می‌شود که نظارت بیشتری بر تهیه غذا در رستوران‌های این مناطق اتخاذ گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و سفالوسپورین برای درمان موارد مسمومتی‌های غذایی ایجاد شده بوسیله استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، پیشنهاد نمی‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مطالعه حاضر از زحمات تمامی پرسنل زحمتکش مرکز تحقیقات بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- P.A.S., Pinheiro, R.R., Arruda, M.M., and Afreixo, V. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry and poultry meat: A meta-analysis. *J. Food. Prot.* 81: 1055-1062.
20. Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Pontello, M.M., and Morace, G. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: Prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J. Food. Prot.* 78: 1142-6.
21. Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Díez-Valcarce, M., Fernández-Natal, I., Hernández, M., and Rovira, J. 2015. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int. J. Food. Microbiol.* 209: 29-33.
22. Seo, K., and Bohach, G. 2013. *Staphylococcus aureus*, In Doyle M, Buchanan R (ed), *Food Microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 547-573.
23. Soltan Dallal, M.M., Agha Amiri, S., Eshraghian, M.R., Sabour Yaraghi, A.A., Faramarzi, T., Mahdavi, V., Saberpour, F., Fazeli Fard, P., and Peymaneh Abedi Mohtasab, T.P. 2008. Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food stuff. *J. Zanjan. Univ. Med. Sci.* 16: 63-72. (In Farsi).
24. Tajbakhsh, F., Tajbakhsh, E., and Momeni, M. 2014. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in traditional and industrial Olivie salads in Shahrekord city. *J. Food. Microbiol.* 2: 39-48. (In Farsi).
25. Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. Jr. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28: 603-61.
- ongoing challenge in public health. *Biomed. Res. Int.* 2014: 1-9.
11. Khamash, D.F., Milstone, A.M., Carroll, K.C., Gadala, A., Klein, E., Maragakis, L.L., Cosgrove, S.E., and Fabre, V. 2019. Changing antibiotic resistance patterns for *Staphylococcus aureus* surgical site infections. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 40: 486-487.
12. Kluytmans, J.A. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 11-15.
13. Krakauer, T. 2016. Enterotoxins: microbial proteins and host cell dysregulation. *Toxins (Basel).* 8: 17.
14. Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 4: 18033.
15. Madahi, H., Rostami, F., Rahimi, E., and SafarpourDehkordi, F. 2014. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from chicken nugget in Iran. *Jundishapur. J. Microbiol.* 7: 10237.
16. Młynarczyk, A., Młynarczyk, G., and Jeljaszewicz, J. 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 277-314.
17. Momtaz, H., Safarpour Dehkordi, F., 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: 913-921.
18. Rahimi, E. 2013. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Braz. J. Microbiol.* 44: 393-399.
19. Ribeiro, C.M., Stefani, L.M., Lucheis, S.B., Okano, W., Cruz, J.C.M., Souza, G.V., Casagrande, T.A.C., Bastos,

27. Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., Lei, T., Chen, M., Ding, Y., and Xue, L. 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China. *Front. Microbiol.* 9: 1263.

26. Wu, S., Huang, J., Zhang, F., Wu, Q., Zhang, J., Pang, R., Zeng, H., Yang, X., Chen, M., Wang, J., Dai, J., Xue, L., Lei, T., Wei, X. 2019. Prevalence and characterization of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Front. Microbiol.* 10: 304.

Study the frequency of enterotoxin encoding genes and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable and salad samples in Chaharmahal Va Bakhtiari province

Momeni Shahraki M^{1*}, Shakerian A², Rahimi E², Safarpour Dehkordi F³

1. MSc Student of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Halal Research Center of IRI, FDA, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Momeniman@yahoo.com

Received: 27 August 2019

Accepted: 26 November 2019

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the main emerging causative agents of antibiotic-resistant food poisoning in humans. The bacterium also has the ability to the production of heat resistant enterotoxin. The present study was done to assess the prevalence rate, antibiotic resistance pattern, and frequency of enterotoxin encoding genes in methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from vegetable and salad samples. In this study, 485 samples of vegetables and salad were collected and immediately transferred to the laboratory. The microbial culture was used to isolate *S. aureus*, and methicillin-resistant strains were approved using cefoxitin and oxacillin disks. Antibiotic resistance patterns and frequency of enterotoxin encoding genes were analyzed using disk diffusion and PCR methods, respectively. The prevalence rate of methicillin-resistant *S. aureus* in vegetable and salad samples were 7.2% and 8.51%, respectively. Methicillin-resistant *S. aureus* strains had the highest antibiotic resistance against penicillin (100%), co-amoxiclav (100%), ampicillin (100%) and ceftriaxone (100%) antibiotics. The prevalence of resistance against imipenem (10.52%) and chloramphenicol (23.68%) was lower than other antibiotics. *SEA* (63.15%) and *SEB* (52.26%) were the most frequently detected enterotoxins in methicillin-resistant *S. aureus* strains. The simultaneous presence of multiple enterotoxin encoding genes and multiple resistance against several antibiotics in methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from vegetable, and salad samples represent an important health-related concern in this kind of food samples. Preventing uncontrolled administration of antibiotics can reduce the risk of enterotoxigenic methicillin-resistant *S. aureus* enterotoxin in vegetables and salads.

Keywords: *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, enterotoxin, antibiotic resistance, vegetables, salad.