تعیین اکوارها، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن *tst* در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از مواد غذایی لبنی

رضا حکیمی‌آلنی[۱]، عبدالمجید محمدزاده[۲*]، پژمان محمودی‌کوهی[۳] و محمدرضا پژوهی‌الموتی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری‌های غذا زاد در کل جهان مطرح است. هدف از مطالعه‌ی اخیر بررسی منشاء آلودگی و شناسایی ژن *tst* در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از مواد غذایی با منشاء دامی در استان همدان بود. در این مطالعه، منشاء آلودگی ۶۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* که پیش از این از شیرینی خامه‌ای (۴۵ جدایه) و پنیر سفید ایرانی سنتی (۲۰ جدایه) ایزوله شده بودند، با استفاده از روش بیوتایپینگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین شناسایی ژن *tst* در این جدایه‌ها با روش PCR و حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک سنجیده شد. از میان ۶۵ جدایه مورد مطالعه، ۵۲/۳ درصد (۳۴ جدایه) و ۴۴/۶ درصد (۲۹ جدایه) به ترتیب متعلق به بیوتیپ‌های با میزبان خاص (Host specific: HS) و بیوتیپ‌های غیر میزبان خاص (Non-host specific: NHS) بودند و ۳/۱ درصد (۲ جدایه) نیز در تیپ مشخصی جای نگرفتند. در ضمن اکوارهای انسانی در شیرینی خامه‌ای و اکوارهای گاوی در پنیر از فراوانی بالایی برخوردار بودند. میزان فراوانی ژن *tst* در میان جدایه‌ها ۴/۶ درصد (۳ جدایه) بود همچنین بر اساس نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی، بیوتیپ‌های با میزبان خاص نسبت به بیوتیپ‌های غیر میزبان خاص مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نشان دادند. با توجه به فراوانی اکوارهای انسانی و گاوی به ترتیب در جدایه‌های شیرینی خامه‌ای و پنیر، امکان منشاء آلودگی شیرینی از انسان و پنیر با گاو بیش‌تر است. از طرف دیگر با توجه به بالا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، وجود سویه‌های حامل ژن *tst* در میان بیوتیپ‌های HS و احتمال گردش این سویه‌ها در جامعه، امکان به خطر افتادن سلامت افراد و بهداشت عمومی وجود دارد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوتایپینگ، ژن *tst*، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه غذا[۱] یکی از معظلات مهم بهداشت و سلامت عمومی در سراسر جهان به حساب می‌آید. در این میان *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان سومین عامل شایع ایجاد کننده‌ی مسمومیت غذایی در سراسر جهان مطرح می‌باشد و هر ساله صدها هزار نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند (Normanno et al. 2007, Peles et al. 2007). وجود فاکتورهای حدت فراوان در *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل مؤثر در گستره‌ی بیماری ناشی از این باکتری در میزبان پستاندار بوده است. توکسین سندرم شوک سمی که عضوی ازخانواده سوپر آنتی‌ژن‌های تب‌زا است، عامل چندین نوع بیماری مانند سندرم شوک سمی[۲] سندرم مرگ ناگهانی نوزادان[۳] و

[۱] دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

[۲*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان E-mail: mohammadzadeh4@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

[۴] استادیارگروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

1- Food borne diseases
2- Toxic Shock Syndrome
3- Sudden Infant Death Syndrome

سندروم کاوازاکی[1] می‌باشد که در سال‌های اخیر شیوع یافته است (El-Ghodban et al. 2006, Hakimi Alni et al. 2018). از طرف دیگر مقاومت این باکتری نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب افزایش اهمیت آن از نظر بهداشت عمومی شده است (Levy and Marshall 2013).

وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت فلور طبیعی در پوست و غشای مخاطی انسان و دام و از سوی دیگر عدم رعایت بهداشت در حین تهیه‌ی مواد غذایی باعث انتقال راحت آن به موادغذایی شده و موجب مسمومیت غذایی در انسان می‌شود (Bendahou et al. 2008, Huong et al. 2010). از این رو تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برای اطلاع از منشاء آلودگی و شناسایی تیپ‌های غالب آن در جهت کنترل و درمان هر چه بهتر بیماری ناشی از این باکتری ضروری به نظر می‌آید. در سال‌های گذشته از روش‌های فنوتیپی (بیوتایپینگ، سروتایپینگ و فاژ تایپینگ) جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی با پیشرفت علم بیولوژی، تکنیک‌های مولکولی بسیاری مانند روش‌های مبتنی بر برش آنزیمی، تعیین توالی در چند لوکوس ژنی، ژل الکتروفورز در میدان ضربانی و ...، جایگزین آن‌ها شده‌اند (Hakimi Alni et al. 2018, Dastmalchi Saei and Hosseinzadeh 2014, Bahmani et al. 2017). با این همه عدم دسترسی به تعدادی از روش‌های مولکولی، هزینه‌ی بالا و نیاز به کارشناس مجرب باعث شده است که برخی از روش‌های فنوتیپی ارزش خود را حفظ کرده باشند (Hallin et al. 2007).

Devriese در سال ۱۹۸۴، یک سیستم بیوتایپینگ را ارائه کرد که بر اساس آن، *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف در ۹ بیوتیپ مختلف قرار می‌گرفت که شامل ۴ بیوتیپ اختصاصی میزبان (HS) (اکوار انسانی، اکوار گاوی، اکوار گوسفندی و اکوار مرغی) و ۵ بیوتیپ غیره میزبان خاص (NHS) بود. در این سیستم ۴ آزمون فنوتیپی شامل قدرت تولید استافیلوکیناز، فعالیت β-همولیتیکی باکتری، انعقاد پلاسمای گاو در مدت ۶ ساعت و الگوی رشد در حضور کریستال ویوله بررسی می‌شود.

با توجه به این که مطالعات اندکی در خصوص تایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد غذایی در استان همدان وجود دارد، در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روش بیوتایپینگ و PCR، اکوارهای غالب و حامل ژن *tst* در جدایه‌های شیرینی خامه‌ای و پنیر سفید ایرانی سنتی تعیین شده و منشاء احتمالی آلودگی مشخص شود تا در صورت نیاز اطلاعات لازم در مورد کنترل مسمومیت ناشی از این باکتری در منطقه حاصل گردد.

مواد و روش کار

در مجموع ۶۵ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* که پیش از این از شیرینی خامه‌ای (۴۵ ایزوله) و پنیر سفید ایرانی سنتی (۲۰ ایزوله) جدا شده بودند (Varmazyar-najafi et al. 2016)، در مطالعه‌ی حاضر مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا DNA تمام جدایه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج شد (Wilson 1987) و در ادامه از روش Multiplex PCR برای جستجوی ژن *femA* (جهت تأیید ژنوتیپی جدایه‌ها) و ژن مولد سندروم شوک توکسیک که قبلاً توسط Mehrotra و همکاران در سال ۲۰۰۰ ارایه شده بود استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (مخلوط اصلی واکنش PCR) تجاری (Ampliqon, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۲۵ pmol, SinaClon BioScience)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. همچنین برنامه‌ی حرارتی برای واکنش PCR شامل واسرشت ابتدایی در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکثیری شامل ۹۲ درجه برای ۱ دقیقه، ۵۵ درجه برای ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه برای مدت ۱/۵ دقیقه

1- Kawasaki Syndrome

بود و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. در ادامه محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری گردید (Mehrotra et al. 2000).

جدول ۱: پرایمرهای به کار رفته در آزمون PCR

اندازه‌ی محصول PCR (جفت باز)	پرایمر	توالی (′3 -′5)
۳۲۶	*tst*-forward	ACCCCTGTTCCCTTATCATC
	tst-reverse	TTTTCAGTATTTGTAACGCC
۱۳۲	*fem*A -forward	AAAAAAGCACATAACAAGCG
	*fem*A-reverse	GATAAAGAAGAAACCAGCAG

برای انجام بیوتایپینگ از روش Devriese در سال ۱۹۸۴ استفاده شد. در این روش چهار آزمون شامل قدرت تولید استافیلوکیناز، بررسی واکنش همولیز، انعقاد پلاسمای گاو و الگوی رشد در محیط حاوی کریستال ویوله به شرح زیر انجام شد.

بررسی واکنش همولیز: تست همولیز در محیط پایه‌ی بلادآگار با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند انجام شد. همچنین برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب و حذف عوامل ضد انعقاد موجود در خون، محیط کشت بلادآگار با خون شستشه توسط سرم فیزیولوژی تهیه گردید و جدایه‌هایی که از نظر ایجاد همولیز واکنش منفی داشتند برای بار دوم با این محیط کشت، مورد آزمایش قرار گرفتند.

تست کوآگولاز با پلاسمای گاو: برای انجام این کار ابتدا پلاسمای گاو به نسبت سه برابر با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد. در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از این پلاسما با ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در داخل لوله‌ی باریک کوآگولاز مخلوط شد و بعد از ۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تشکیل لخته در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

محیط کریستال ویوله: این محیط کشت به صورت دو پلیت با غلظت‌های متفاوت ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر از کریستال ویوله در محیط پایه تریپتیک سوی آگار[1] (مرک آلمان) تهیه گردید. در ادامه تمام جدایه‌ها به صورت نقطه‌ای در هر دو پلیت کشت داده شده و نتایج بعد از ۲۴ ساعت و یا ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرائت گردید. ظهور کلنی‌های بنفش و یا آبی کم رنگ به عنوان تیپ C، کلنی‌های زرد و گاهاً با حاشیه-ی بنفش به عنوان تیپ A و در نهایت رشد کلنی‌های سفید هم به عنوان تیپ E در نظر گرفته شد (Devriese 1984).

فعالیت استافیلوکیناز: برای انجام این تست، به جای استفاده از روش پیشنهادی Devriese، از روش جایگزین یعنی هیدرولیز کازئین استفاده شد. بدین منظور، محیط آگار شیر بدون چربی[2] (مرک آلمان) با دو درصد سرم انسانی تهیه شد و بعد از کشت ایزوله‌ها، ظهور هاله‌ی شفاف در اطراف کلنی (پدیده مولر) به عنوان تست مثبت در نظر گرفته شد (Shayegh and Mahdiloo 2015).

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی: برای این منظور ابتدا دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین (۱µg)، پنی‌سیلین (۱۰un)، تتراسایکلین (۳۰µg)، اریترومایسین (۱۰µg)، استرپتومایسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg) و ونکومایسین (۳۰µg) از شرکت پادتن طب تهیه و میزان حساسیت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور به روش انتشار از دیسک در محیط مولرهینتون آگار[3](مرک آلمان) بر طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گرفت (Watts 2008).

1- Tryptic soy agar

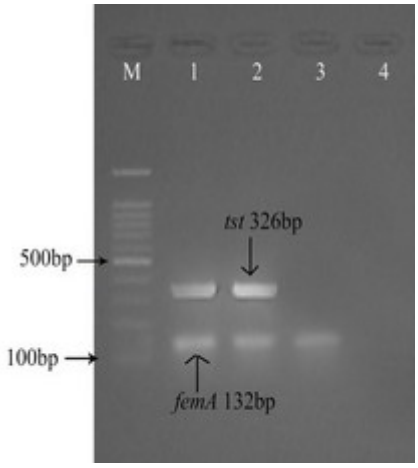
2- Skim Milk Agar

3- Mueller Hinton Agar

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد تحلیل و آنالیز قرار گرفت. تحلیل داده‌ها با آزمون t مستقل در حد معنی‌داری P<۰/۰۵ صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج PCR مطالعه‌ی حاضر نشان داد که همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی از نظر ژن *femA* مثبت بودند و در بارگذاری محصولات PCR، باند ۱۳۲ جفت باز در مورد همه‌ی آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱). هر چند ژن *tst* تنها در سه جدایه (۱/۵۳ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شد که همه این موارد از شیرینی خامه‌ای جدا شده بودند (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *femA* و *tst*: چاهک ۱: محصول مولتی‌پلکس PCR ژن *tst* و *femA* در سویه‌ی کنترل مثبت (*S. aureus* ۱۳۵۶۶)، چاهک ۲: محصول مولتی‌پلکس PCR ژن *tst* و *femA* در جدایه حامل ژن *tst*، چاهک ۳: محصول مولتی‌پلکس PCR ژن *tst* و *femA* در جدایه فاقد ژن *tst*، چاهک ۴: کنترل منفی، چاهک M: مارکر DNA (۱۰۰ جفت باز)

نتایج کشت روی محیط بلادآگار نشان داد که ۱۷ جدایه از نظر همولیز بتا، مثبت بودند. در محیط اسکیم میلک آگار نیز فقط ۲۱ جدایه توانایی هیدرولیز کازئین را داشتند و اطراف کلنی‌های خود هاله‌ی شفاف ایجاد کرده بودند که به پدیده‌ی مولر معروف می‌باشد. در تست کوآگولاز داخل لوله، ۱۷ جدایه مورد مطالعه بعد از ۶ ساعت توانستند پلاسمای گاو را لخته کنند. در محیط کشت حاوی کریستال ویوله ۴۲ جدایه مورد مطالعه کلنی بنفش، ۲۱ جدایه کلنی زرد و ۲ جدایه کلنی سفید ایجاد کردند.

بر حسب نتایج خصوصیات فنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوی اورئوس* در مطالعه‌ی حاضر و طبق سیستم ارایه شده توسط Devriese در سال ۱۹۸۴، جدایه-های مورد مطالعه در بیوتیپ‌های مختلف جای گرفتند که نتایج به صورت خلاصه در جدول ۲ آمده است. در میان ۴۵ جدایه‌ی شیرینی خامه‌ای ۲۰ جدایه (۴۴/۵ درصد) در گروه HS قرار داشت که شامل ۱۲ اکوار انسانی، ۴ اکوار گوسفندی، ۳ اکوار گاوی و یک اکوار مرغی بود. همچنین ۲۳ جدایه (۵۱/۱ درصد) شیرینی خامه‌ای مربوط به گروه NHS بود و ۲ جدایه (۴/۴ درصد) باقیمانده در هیچ تیپی جای نگرفتند. نتایج بیوتایپینگ جدایه‌های پنیر نشان داد که بیوتیپ‌های HS (۷۰ درصد) نسبت به بیوتیپ‌های NHS (۳۰ درصد) از فراوانی بالایی برخوردار می‌باشند و در بین بیوتیپ‌های HS، ۴ جدایه مربوط به اکوار انسانی، ۹ جدایه متعلق به اکوار گاوی و تنها ۱ جدایه به عنوان اکوار گوسفندی قلمداد شد.

جدول ۲: نتایج حاصل از بیوتایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس*های **جدا شده از شیرینی خامه‌ای و پنیر سفید ایرانی سنتی**

منبع جدایه	تعداد جدایه	بیوتیپ‌های غیر میزبان خاص (NHS)				بیوتیپ‌های با میزبان خاص (HS)					غیر قابل تیپ
		اکوار انسانی	اکوار گاوی	اکوار گوسفندی	اکوار مرغی	K-B-CV:C	K-B+CV:C	K+B+CV:A	K+B-CV:A	K-B+CV:A	
شیرینی خامه‌ای	۴۵	۱۲	۳	۴	۱	۴	۱۳	۱	۲	۳	۲
پنیر سنتی	۲۰	۴	۹	۱	۰	۳	۱	۰	۲	۰	۰
مجموع	۶۵	۱۶	۱۲	۵	۱	۷	۱۴	۱	۴	۳	۲

نتایج مربوط به تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدول ۳ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و ونکومایسین می‌باشد. همچنین از ۷ جدایه‌ی مقاوم به اگزاسیلین، ۵ جدایه در اکوار انسانی، ۱ جدایه در اکوار گاوی و یک جدایه در بیوتیپ NHS قرار داشت.

جدول ۳: نتایج مقاومت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در بین بیوتیپ‌های مختلف

بیوتیپ‌ها	تعداد جدایه	تعداد سویه های MR*	آنتی بیوتیک‌ها						
			اگزاسیلین	پنی سیلین	تتراسایکلین	اریترومایسین	ایمی‌پنم	جنتامایسین	ونکومایسین
انسان	۱۸	۹	۵	۷	۶	۴	۸	۶	۰
گاو	۱۰	۴	۱	۴	۳	۵	۶	۲	۰
گوسفند	۵	۲	-	۲	۱	۲	۳	۱	۰
مرغ	۱	-	-	-	۱	-	-	۰	۰
NHS	۲۹	۶	۱	۵	۴	۶	۷	۵	۰
غیر قابل تیپ	۲	۱	۰	۱	۰	۱	۲	۰	۰
مجموع (درصد)	۶۵ (۱۰۰)	۲۲ (۳۳/۸)	۷ (۱۰/۸)	۱۹ (۲۹/۲)	۱۵ (۲۳)	۱۸ (۲۷/۷)	۲۶ (۴۰)	۱۴ (۲۱/۵)	۰ (۰)

*: Multiresistant (مقاومت چندتایی، حداقل مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک)

بر اساس نتایج آماری به دست آمده، بیوتیپ‌های HS نسبت به بیوتیپ‌های NHS به طور معنی‌داری از مقاومت دارویی بالاتری برخوردار بودند ($P<۰/۰۵$).

بحث

شناسایی ارگانیسم‌هایی مختلف که در یک گونه واحد قرار دارند تایپینگ نامیده می‌شود. بیوتایپینگ به عنوان یک الگوی بیان ویژگی‌های متابولیکی یک جدایه قلمداد می‌شود. از روش‌های بیوتایپینگ که در تایپینگ استافیلوکوکوس‌ها به کار می‌رود می‌توان به تولید اوره‌آز، هیدرولیز توئین ۸۰ و تحمل به مواد شیمیایی و رنگ‌ها را نام برد (Sabat et al. 2013). روش بیوتایپینگ پیشنهادی توسط Devriese در سال ۱۹۸۴، یک روش مناسب و مورد قبول محققان به حساب می‌آید. این تکنیک ساده،

ارزان و قابل انجام در بیش‌تر آزمایشگاه‌ها بوده و دارای توانایی تشخیص منشاء آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب میزبان مربوطه می‌باشد (Kitai et al. 2005a, Coia et al. 1990). محققان بر این عقیده‌اند که انسان به عنوان منبع اولیه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* در آلودگی مواد غذایی و مسمومیت ناشی از آن نقش ایفا می‌کند (Aycicek et al. 2005, Rosec et al. 1997).

کاهش سطح بهداشت در طول آماده‌سازی مواد غذایی یکی از دلایل اصلی آلودگی مواد غذایی با این باکتری می‌باشد. از طرفی مقاومت این باکتری به دامنه‌ی وسیعی از دما، pH و شوری (۹ درصد نمک) باعث زنده ماندن آن در فراوری تهیه‌ی مواد غذایی و افزایش انتقال آن به انسان می‌شود (Huong et al. 2010).

نتایج در مورد میزان فراوانی بیوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر و محصولات غذایی دامی متفاوت می‌باشد. طی مطالعاتی که توسط Dallal و همکاران در سال ۲۰۱۰، انجام گرفت از ۱۰۰ جدایه به دست آمده از مواد غذایی (محصولات لبنی و گوشت)، ۴۹ درصد در بیوتیپ HS و ۴۷ درصد در بیوتیپ NHS جای گرفتند. همچنین ۴ درصد باقی‌مانده جزو هیچ کدام از این بیوتیپ‌ها نبودند. در مطالعه‌ی دیگر توسط Caspian و همکاران در سال ۲۰۰۳، نشان داده شد که بیوتیپ‌های NHS در مقایسه با بیوتیپ‌های HS با فراوانی بیش‌تری در شیر خام وجود دارند. در حالی که در مطالعه‌ی Kérouanton و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Normanno و همکاران در سال ۲۰۰۷، بیوتیپ‌های HS از فراوانی بالایی در فراورده‌های شیری و گوشت برخوردار بودند. در مطالعه‌ی حاضر نیز فراوانی بیوتیپ‌های HS از درصد بالاتری (۵۲/۳ درصد) برخوردار بود که از این لحاظ با نتایج مطالعه‌ی Kérouanton و Normanno هم-خوانی وجود داشت.

توکسین سندروم شوک توکسیک یکی از عوامل مهم حدت در *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده و فراوانی آن در مناطق مختلف متفاوت گزارش شده است. به طور مثال طی مطالعه‌ای که توسط Eshraghi و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، میزان فراوانی ژن *tst* در میان *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف مواد غذایی ۱۲ درصد بود. در مطالعه‌ی Pourshafie و همکاران در سال ۲۰۱۶، نیز میزان فراوانی *tst* در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از شیر و پنیر ۳/۹ درصد بود. در سایر نقاط جهان نیز میزان فراوانی این ژن در میان نمونه‌های موادغذایی بین صفر تا ۳۷ درصد گزارش شده است (Zschock et al. 2000, Adesiyun et al. 1992).

در مطالعه‌ی حاضر نیز ۴/۶ درصد از جدایه‌ها حامل ژن *tst* بودند که همگی در گروه اکوار انسانی قرار داشتند. تحقیقات نشان داده است اکوارهای انسانی در مقایسه با سایر اکوارها از میزان بالاتری از انتروتوکسین‌ها و توکسین TSST-1[1] برخوردار هستند، لذا وجود این اکوارها در مواد غذایی اهمیت آن‌ها را در ایجاد مسمومیت غذایی دو چندان می‌کند (Dallal et al. 2010, Kitai et al. 2005b).

به طور کلی ۲۴/۶ درصد از جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه (شیرینی خامه‌ای و پنیر سفید ایرانی سنتی) از اکوارهای انسانی بودند. این مسئله به خوبی آلودگی مواد غذایی با سویه‌های خطرناک را نشان می‌دهد. از طرف دیگر در جدایه‌های شیرینی خامه‌ای، سهم اکوار انسانی ۲۶/۶ درصد بود که در نوبه‌ی خود از میزان بالایی برخوردار می‌باشد. علت این امر می‌تواند ناشی از انتقال باکتری از طریق دست کارگران در هنگام تهیه و آماده-سازی شیرینی باشد. در این مورد نیز Normanno و همکاران در سال ۲۰۰۷، خاطر نشان کردند که بالا بودن اکوارهای انسانی در تعدادی از مواد غذایی، می‌تواند به دلیل دست‌کاری زیاد افراد در حین آماده‌سازی آن باشد. با این حال در جدایه‌های پنیر، اکوارهای گاوی از فراوانی

1- Toxic shock syndrome toxin-1

بیش‌تری (۴۵ درصد) نسبت به اکوارهای انسانی برخوردار بودند که نشان می‌دهد احتمالاً آلودگی پنیر به واسطه‌ی شیر آلوده گاو و نه دست‌کاری انسان (به عنوان مثال طی شیردوشی) بوده است.

مسئله‌ی دیگری که در مطالعه‌ی حاضر به آن پرداخته شده است، ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با بیوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. وقوع مقاومت چند دارویی در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی به صورت مکرر، در جدایه‌های دامی به صورت اتفاقی و در جدایه‌های غذایی بسیار کم مشاهده می‌شود (Werckenthin et al. 2001). هر چند به طور کلی به دلیل قرارگیری ژن‌های مقاومت در DNA خارج کروموزومی، در صورت آلودگی متقاطع مواد غذایی با بیوتیپ‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس*، احتمال انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین آن‌ها زیاد است (Teale 2002). از طرف دیگر، انتقال بیوتیپ‌های انسانی به مواد غذایی نیز از علل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. Acco و همکاران در سال ۲۰۰۳، گزارش دادند که ۷۰ درصد *استافیلوکوکوس*‌های جدا شده از موادغذایی دستکاری شد با انسان، به پنی‌سیلین مقاوم بودند. در بیش‌تر مطالعات انجام شده در ایران مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از نمونه‌های غذایی (شیر و محصولات لبنی) درصد پایینی داشتند (Soltan Dalall et al. 2008, Molla Abaszadeh and Haji Sheikhzadeh 2013). با این حال در مطالعه‌ی حاضر، جدایه‌های غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجموع مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبتاً بالایی از خود نشان دادند و بیش‌ترین مقاومت (۴۰ درصد) نسبت به آنتی-بیوتیک ایمی‌پنم مشاهده شد. همچنین ۳۳/۸ درصد از جدایه‌ها دارای مقاومت چندتایی (حداقل مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک) بودند که از این منظر هم بیوتیپ‌های HS درصد بالاتری نسبت به بیوتیپ‌های NHS داشتند. در واقع چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جدایه‌های با میزبان خاص به دلیل مواجهه بیش‌تر با آنتی‌بیوتیک‌ها، از مقاومت بالایی برخوردار شده‌اند. همچنین باید خاطر نشان کرد که وجود اکوارهای انسانی مقاوم به اگزاسیلین در محصولات غذایی، از نظر سلامت عمومی تهدید کننده می‌باشد و باید در این خصوص تدابیر بهداشتی مناسبی اتخاذ گردد.

در مجموع، با توجه به فراوانی اکوارهای انسانی در نمونه‌های شیرینی خامه‌ای و اکوار گاوی در نمونه‌های پنیر سفید ایرانی سنتی، این امکان وجود دارد که آلودگی شیرینی از طریق کارکنان و کارگران شیرینی‌پزی و آلودگی پنیر از محل شیردوشی (گاوداری‌ها) رخ داده باشد. از طرفی با توجه به وجود سویه‌های حامل ژن *tst* در میان بیوتیپ‌های HS، کنترل این بیوتیپ‌ها ضرورت بیش‌تری می‌یابد. لذا جهت کنترل عوارض ناشی از آلودگی با اکوارهای انسانی (مانند مسمومیت‌ها)، شناسایی و درمان کارکنان شیرینی‌پزی حامل این باکتری‌ها و همچنین جهت کاهش عوارض ناشی از آلودگی با اکوارهای گاوی در پنیر، بهداشت محل شیردوشی (ضدعفونی اتاق شیردوشی و شستشوی سرپستانک) بایستی مورد توجه بیش‌تری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا همدان نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

Acco, M.; Ferreira, F.S.; Henriques, J.A.P. and Tondo, E.C. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food microbiology, 20(5): 489-493.

Adesiyun, A.A.; Lenz, W. and Schaal, K.P. (1992). Production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) by *Staphylococcus aureus* strains isolated from humans, animals and foods in Nigeria. Folia Microbiologica, 15(2): 125-133.

Alni, R.H.; Mohammadzadeh, A. and Mahmoodi, P. (2018). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of different origins based on the polymorphism of the spa gene: characterization of a novel spa type. 3 Biotech. 8(1): 58-65.

Alni, R.H.; Mohammadzadeh, A.; Mahmoodi, P. and Alikhani, M.Y. (2018). Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin (tsst) Gene Among *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients and Healthy Carriers. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection, 5(1): e14249.

Aycicek, H.; Aksoy, A. and Saygi, S. (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey Food Control, 16(3): 263-266.

Bahmani, N.; Mirnejad, R.; Arabestani, M.R.; Mohajerie, P.; Hashemi, SH.; Karami, M. et al. (2017). Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of Brucella isolates from human and livestock specimens. Saudi Journal of Biological Sciences, 66(5): 570-576.

Bendahou, A.; Lebbadi, M.; Ennanei, L.; Essadqui, F.Z. and Abid, M. (2008). Characterization of Staphylococcus species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. The Journal of Infection in Developing Countries, 2(03): 218-225.

Caspian, R.; Alberghini, L.; Peccio, A.; Serraino, A. and Rosmini, R. (2003). Typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. Veterinary Research Communications, 27(1): 289-291.

Coia, J.; Thomson-Carter, F.; Baird, D. and Platt, D. (1990). Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by biotyping, immunoblotting and restriction enzyme fragmentation patterns. Journal of Medical Microbiology, 31(2):125-132.

Dallal, M.M.S.; Salehipour, Z.; Eshraghi, S.; Mehrabadi, J.F. and Bakhtiari, R. (2010). Occurrence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat and dairy products by PCR-RFLP. Ann Microbiol, 60(2): 189-196.

Dastmalchi Saei, H. and Hosseinzadeh, S. (2014). Characterization of trap types in *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis bovine and ovine milk samples in the North West of Iran. Iranian Veterinary Journal, 10(3):13-20.

Devriese, L. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. Journal of Applied Microbiology, 56(2): 215-220.

El-Ghodban, A.; Ghenghesh, K.S.; Marialigeti, K.; Esahli, H. and Tawil, A. (2006). PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. Journal of Medical Microbiology, 55(2): 179-182.

Eshraghi, S.; Salehipour, Z.; Pourmand, M.R.; Rahimi, F.; Zahraei Salehi, M.T. et al. (2009). Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. Tehran University Medical Journal, 67(7): 470-476.

Hallin, M.; Deplano, A.; Denis, O.; De Mendonça, R.; De Ryck, R. and Struelens, M. (2007). Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. Journal of Clinical Microbiology, 45(1): 127-133.

Huong, B.T.M.; Mahmud, Z.H.; Neogi, S.B.; Kassu, A.; Van Nhien, N.; Mohammad, A. et al. (2010). Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. Food Control, 2(3):166-171.

Huong, B.T.M.; Mahmud, Z.H.; Neogi, S.B.; Kassu, A.; Van Nhien, N.; Mohammad, A. et al. (2010). Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. Food Control, 21(2): 166-171.

Kérouanton, A.; Hennekinne, J.; Letertre, C.; Petit, L.; Chesneau, O.; Brisabois, A. et al. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology, 115(3): 369-375.

Kitai, S.; Shimizu, A.; Kawano, J.; Sato, E.; Nakano, C.; Kitagawa, H. et al. (2005a). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 67(3): 269-274.

Kitai, S.; Shimizu, A.; Kawano, J.; Sato, E.; Nakano, C.; Uji, T. et al. (2005b). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan Journal of Veterinary Medical Science, 67(1): 107-110.

Levy, S.B. and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature medicine, 10 (12): S122-S129.

Mehrotra, M.; Wang, G. and Johnson, W.M. (2000). Multiplex PCR for Detection of Genes for*Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38(3): 1032-1035.

Molla Abaszadeh, H. and Haji Sheikhzadeh, B. (2013). Surveying the contamination rate, sensibility and antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheese consumed in Qotur of khoy province. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 4(2): 209-217.

Normanno, G.; La Salandra, G.; Dambrosio, A.; Quaglia, N.; Corrente, M.; Parisi, A. et al. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115(3): 290-296.

Peles, F.; Wagner, M.; Varga, L.; Hein, I.; Rieck, P.; Gutser, K. et al. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. International Journal of Food Microbiology, 118(2): 186-193.

Pourshafie, N.; Shayegh, J. and Mobayen, H. (2016). Identification of toxic shock syndrome toxin-1 genes of *Staphylococcus aureus* isolated from local cheese and cows milk in Tabriz city. Journal of food microbiology, 2(6): 81-87.

Rosec, J.; Guiraud, J.; Dalet, C. and Richard, N. (1997). Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. International journal of food microbiology, 35(3): 213-221.

Sabat, A.; Budimir, A.; Nashev, D.; Sá-Leão, R.; Van, Dijl.; Laurent, F. et al. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Eurosurveillance, 18(4): 1-15.

Shayegh, J. and Mahdiloo, S.G. (2015). Biotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and milk products in Tabriz city. Journal of Food Hygiene, 5(19): 75-89.

Soltan Dalall, M.M.; Aga Amiri, S.; Eshraghian, M.R.; Sabour Yaraghi, A.A.; Faramarzi, T.; Mahdavi, V. et all. (2008). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food stuff. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 16(64); 63-72.

Teale, C. (2002). Antimicrobial resistance and the food chain. Journal of Applied Microbiology, 92(S1): 85S–89S.

Varmazyar-najafia, M.; Pajohi-alamotia, M.; Mohammadzadeh, A. and Mahmoodi, P. (2016). Detection of methicillin-resistance gene in *Staphylococcus aureus* isolated from traditional white cheese in Iran. Archives of Hygiene Sciences, 5(4): 302-309.

Watts, JL. (2008). Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. NCCLS.

Werckenthin, C.; Cardoso, M.; Martel, J.L. and Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine Staphylococcus aureus, porcine Staphylococcus hyicus, and canine Staphylococcus intermedius. Veterinary Research, 32(3-4): 341-362.

Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria." Current protocols in molecular biology, 2-4.

Zschock, M.; Botzler, D.; Blöcher, S.; Sommerhäuser, J. and Hamann, HP. (2000). Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. International Dairy Journal, 10(8): 569-574.

Determination of ecovars, antibiotic susceptibility and *tst* gene frequency in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy food products

Hakimi Alni, R.[1]; Mohammadzadeh, A.[2]; Mahmoodi Koohi, P.[2] and Pajohi Alamoti, M.R.[3]

Received: 24.02.2017 Accepted: 28.10.2017

Abstract

S. aureus is a major cause of food borne diseases throughout the world. The aim of the present study was the identification of source contamination and *tst* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin in Hamedan city. In this study, the contamination sources of 65 *S. aureus* isolates which had previously been isolated from cream pastry (45 isolates) and traditional Iranian white cheese (20 isolates) were evaluated using biotyping method. Meanwhile, the identification of *tst* gene by PCR method and susceptibility of the isolates against several antibiotics was examined using standard disk diffusion test. Of the 65 biotyped isolates, 52.3% (34 isolates) and 44.6% (29 isolates) belonged to the host specific (HS) and non-host specific (NHS) biotypes, respectively, and 3.1% of the isolates (2 isolates) were not placed in certain types. Besides, human ecovars in cream pastry and bovine ecovars in cheese samples were predominant. The prevalence rate of *tst* gene in the isolates was 4.6% (3 isolates), and according to the results of antimicrobial susceptibility test, HS biotypes showed higher resistance rather than NHS biotypes. Due to the abundance of human and bovine Staphylococcal ecovars in cream pastry and cheese samples, respectively, it can be concluded that the contamination of cream pastry and cheese samples may be originated from humans and cattle. Also, because of high antibiotic resistance and presence of *tst* gene among HS biotypes and the possibility of their circulation in the community can have a potentially alarming effect on general health of community.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Biotyping, *tst* gene, Antibiotic susceptibility test

1- PhD Student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Corresponding Author: Mohammadzadeh, A., E-mail: mohammadzadeh4@gmail.ir