



Identification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Genes of *sea*, *seb* and *sec* among Healthy Carriers in Ardabil City

Daryoush Asgarpoor¹, Mahrokh Bahrami², Shahrzad Daneshamooz¹, Mehdi Ghasemi²

1. Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2. Department of Microbiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/11/19

Accepted: 2018/01/15

Available online: 2018/02/19

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2018; 11(6): 149-157

Corresponding author:

Daryoush Asgarpoor

Department of Microbiology
and Virology, Faculty of
Medicine, Zanjan University
of Medical Sciences, Zanjan,
Iran

Tel: 0989371728653

Email:

D.asgarpoor@zums.ac.ir



Abstract

Background and Aims: *Staphylococcus aureus* is a gram-positive, non-motile, non-spore-forming, aerobic, and facultative anaerobic bacterium, which is colonized in anterior part of the human nasal cavity. The carriers' individuals working in the food industry are the main source of spreading food-borne diseases. Staphylococcal enterotoxins (SEs) are the key virulence factors in the staphylococcal food poisoning (SFP). The aim of this study was to identify the *S. aureus* enterotoxin genes of *sea*, *seb* and *sec* among healthy carriers.

Materials and Methods: In the current descriptive cross-sectional study, 136 nasal swab samples were collected from the personnel working at butchers, dairy stores, and fast food restaurants through Ardabil city. The samples were cultured and then confirmed using the biochemical tests. The DNA of *S. aureus* isolates was extracted to detect *sea*, *seb* and *sec* genes as markers for SEA, SEB and SEC enterotoxins using the PCR method.

Results: Among the 136 nasal swab samples, 46 (33.8%) were positive for *S. aureus*, that were confirmed by the presence of *femA* gene. Out of 46 isolates, the *sea*, *seb* and *sec* genes were found in 11 (23.9%), 6 (13%) and 5 (10.8%) isolates, respectively.

Conclusions: According to the findings, a significant percentage of the food-chain personnel were nasal carriers of enterotoxigenic *S. aureus*. Therefore, for prevention and distribution of Staphylococcal infections, screening program and control of such carriers are recommended.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, PCR

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Asgarpoor D, Bahrami M, Daneshamooz S, Ghasemi M. Identification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Genes of *sea*, *seb* and *sec* among Healthy Carriers in Ardabil City. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) :149-157



شناسایی ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb* و *sec* استافیلوکوکوس اورئوس در ناقلین سالم شهرستان اردبیل در سال ۱۳۹۶

داریوش عسگرپور^۱، ماهرخ بهرامی^۲، شهرزاد دانش‌آموز^۱، مهدی قاسمی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت، فاقد حرکت، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است که در ناحیه قدامی بینی افراد کلنیزه می‌شود. کارکنان ناقل مشغول به کار در صنعت غذایی منبع اصلی برای گسترش بیماری‌های منتقله از غذا محسوب می‌شوند. انتروتوکسین استافیلوکوکی مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی دخیل در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی است. هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb* و *sec* استافیلوکوکوس اورئوس در ناقلین سالم بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۱۳۶ نمونه از سوآپ بینی پرسنل رستوران‌ها، قصابی‌ها، لبنیات فروشی‌ها و فست‌فودهای شهرستان اردبیل در بهار ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از کشت اولیه، با آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. نمونه DNA ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس استخراج شده و ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* به‌عنوان مارکر برای ردیابی انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEC با روش PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: در مجموع، از ۱۳۶ نمونه سوآپ بینی، ۴۶ نمونه (۳۳/۸٪) ناقل استافیلوکوکوس اورئوس بودند که این میزان ناقلی با مثبت شدن ژن *femA* ثابت شد. از مجموع ۴۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۱۱ سویه (۲۳/۹٪) واجد ژن *sea*، ۶ سویه (۱۳٪) واجد ژن *seb* و ۵ سویه (۱۰/۸٪) نیز واجد ژن *sec* بودند.

نتیجه‌گیری: درصد قابل توجهی از پرسنل شاغل در زنجیره غذایی، ناقل استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسیژنیک در بینی خود بودند. از این رو، برنامه غربالگری و کنترل این ناقلین به منظور جلوگیری از شیوع عفونت‌های استافیلوکوکی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، PCR

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

میکروبیولوژی مولکولی

IJMM1396;11(6): 149-157

نویسنده مسئول:

داریوش عسگرپور

گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۷۱۷۲۸۶۵۳

پست الکترونیک:

D.asgarpoor@zums.ac.ir

مقدمه

کلنیزه شده و باعث افزایش خطر ابتلا به عفونت‌های استافیلوکوکی می‌شود؛ به طوری که میزان این عفونت‌ها در ناقلین این باکتری نسبت به افراد غیر ناقل بیشتر است (۶). افراد ناقل هنگام تهیه مواد غذایی در زنجیره تولید و یا عرضه، باعث آلوده شدن مواد غذایی شده و از این طریق افراد سالم را دچار عفونت‌های استافیلوکوکی می‌کنند (۷). از آنجا که استافیلوکوکوس اورئوس در طیف وسیعی از درجه حرارت و pH رشد می‌کند، لذا ممکن است در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی حضور داشته و رشد کند. همچنین مواد غذایی که با سویه‌های تولیدکننده انتروتوکسین آلوده شده باشند،

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین دلایل مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورها، باکتری گرم مثبت، فاقد حرکت، بدون اسپور، بصورت هوازی و همچنین بی‌هوازی اختیاری متعلق به خانواده میکروکوکاسه است (۱، ۲). استافیلوکوکوس اورئوس در ۲۰ الی ۳۰ درصد از جمعیت انسانی به صورت پایدار و در ۶۰٪ افراد نیز به صورت ناقلین متناوب یافت می‌شود؛ لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل‌آوری و پخش مواد غذایی فعالیت می‌کنند، در صورت رعایت نکردن نکات بهداشتی می‌توانند باکتری را به فرآورده‌های غذایی منتقل کنند (۳-۵). این باکتری در ناحیه قدامی مجاری بینی

پروتئاز گوارشی، باعث ایجاد علائمی از قبیل تهوع، استفراغ، دردهای عضلانی، شکمی و اسهال و حتی مرگ می‌شود (۱۴). در سال ۲۰۰۰ در کشور ژاپن یک اپیدمی وسیع ناشی از مسمومیت غذایی استافیلوکوکی ۱۳۴۲۰ نفر را درگیر کرد که ناشی از مصرف شیر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بود (۱۵). در آمریکا ۱۴ الی ۲۰ درصد آلودگی‌های غذایی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بوده و تخمین زده می‌شود که ۸۱-۶ میلیون طغیان را ایجاد و ۹۰۰۰ نفر را به کام مرگ می‌کشاند (۳). در ایران هر چند آمار دقیقی از افرادی که در اثر بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بستری می‌شوند و یا اینکه می‌میرند، وجود ندارد، با این حال گزارشات مختلفی مبنی بر ناقل بودن افراد وجود دارد. گزارش‌ها حاکی از آن است که حدود ۲۶-۲۰ درصد افراد بررسی شده در ایران ناقل این باکتری هستند. لذا این افراد می‌توانند نقش مهمی در انتقال این باکتری ایفا کنند (۱۶-۱۸). با توجه به اهمیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و نقش آنها در بهداشت و سلامت عمومی، این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های انتروتوکسین SEA، SEB و SEC استافیلوکوکوس اورئوس در ناقلین سالم شهرستان اردبیل انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۱۳۶ نمونه سوآپ بینی از افراد شاغل در رستوران‌ها، قصابی‌ها، لبنیات‌فروشی‌ها و فست-فودهای سطح شهرستان اردبیل به‌طور تصادفی طی فروردین ماه تا اوایل خرداد ۱۳۹۶ جمع‌آوری و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد نمونه براساس فرمول:

$$n = Z^2 \times P \times (1-P) / d^2$$

محاسبه و روش نمونه‌گیری تصادفی ساده بود. معیار ورود به مطالعه مصرف نکردن آنتی‌بیوتیک طی ۲ هفته قبل بود. نمونه‌های بینی با استفاده از سوآپ پنبه‌ای استریل از بخش قدامی سوراخ‌های بینی اخذ و به محیط تریپتیک سوی براث منتقل شدند. سپس در محیط بلاد آگار (به‌منظور بررسی فعالیت همولیتیک) و مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) (برای بررسی فعالیت تخمیر مانیتول) -به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز و Voges Proskauer (VP) آزمایش شدند.

اگر در شرایط نامناسب سردخانه‌گذاری شوند، می‌توانند منبع شیوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی باشند (۷، ۸).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی (Staphylococcal [SFP] food poisoning) که از خوردن مواد غذایی آلوده به انتروتوکسین‌ها ایجاد می‌شود، به‌عنوان دومین عامل شایع بیماری‌های منتقله از غذا گزارش شده است. مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی به‌علت پاستوریزاسیون به اندازه ناکافی، آلودگی‌زدایی ناقص منبع محصولات، آلودگی محصولات در روند آماده‌سازی و حمل‌ونقل از سوی افرادی که حامل باکتری هستند شیوع بالاتری دارد (۸). انتروتوکسین‌ها یکی از فاکتورهای ویروالانس مهم این باکتری محسوب می‌شوند که تأثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود می‌گذراند. این توکسین‌ها به‌طور افقی و از طریق عناصر متحرک ژنتیکی مثل فاژها و جزایر پاتوژن‌سیسته منتقل می‌شوند و این به-خصوص درباره افراد در معرض خطر مثل جمعیت سالخورده، کودکان، زنان باردار و افرادی که نقص ایمنی دارند، بسیار خطرناک است (۹). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) Staphylococcal Enterotoxins از دسته سوپر آنتی‌ژن‌ها بوده و ۲۳ نوع مختلف دارند، که از این میان، سروتیپ‌های کلاسیک انتروتوکسین استافیلوکوکی (SEA، SEB، SEC، SED و SEE) عامل بیش از ۹۵٪ مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی هستند، که به‌ترتیب با ژن‌های sea، seb، sec، sed و see کد می‌شوند (۱۰، ۱۱). انتروتوکسین نوع A (SEA) مسئول حدود ۸۰٪ از موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی در ایالات متحده آمریکا است. درحالی‌که انتروتوکسین نوع B (SEB) فقط ۱۰٪ از موارد مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی را به خود اختصاص داده است (۷). انتروتوکسین SEA مهم‌ترین انتروتوکسین ایجادکننده مسمومیت غذایی استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده که شیوع مسمومیت با این تیپ انتروتوکسین کلاسیک بیشتر از سایر تیپ‌ها است؛ به‌طوری‌که این انتروتوکسین در حد بسیار کم نیز مسمومیت غذایی شدید ایجاد می‌کند (۱۲). انتروتوکسین SEC به لحاظ اهمیت در جایگاه سوم قرار داشته و معمولاً در محصولات گوشتی، شیر، لبنیات وجود دارد و معمولاً در سوبه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از حیوانات حضور دارد (۷، ۱۳).

بسته به نوع انتروتوکسین، مقدار توکسینی که باعث ایجاد بیماری می‌شود از ۲۰ ng الی ۱ μg گزارش شده است. حضور ۱۰^۵ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در هر گرم از ماده غذایی باعث تولید انتروتوکسین شده و به‌دلیل مقاومت به حرارت و آنزیم‌های

استخراج DNA ژنومیک به روش Boiling

استخراج DNA ژنومیک جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس براساس روش Gadyari و همکاران با تغییراتی به صورت زیر بهینه شد (۱۹). بدین ترتیب که ایزوله‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس به مدت یک شبانه‌روز در محیط Luria-Bertani (LB) broth (مرک، آلمان) در دمای 37°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. $1/5\text{mL}$ از سوسپانسیون میکروبی به مدت ۴ دقیقه با دور 8000 rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری 100 mL میکرولیتر بافر TE اتوکلاو شده اضافه شد. مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۴ دقیقه با دور 8000 rpm صورت گرفت. عمل شستشو ۳ بار تکرار شد. پس از اتمام عمل شستشو، مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری $100\text{ }\mu\text{L}$ بافر TE اتوکلاو شده و همچنین $5\text{ }\mu\text{L}$ آنزیم لیزوزیم اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان در نظر گرفته شده، سوسپانسیون‌های به دست آمده، ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه به بن ماری جوش و سپس به مدت ۵ دقیقه به یخ منتقل شدند. این عمل ۳ بار تکرار شد. نمونه‌های فوق به مدت ۵ دقیقه با دور 12000 rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی که حاوی DNA ژنومیک باکتری است، در دمای 20°C - برای مصارف

بعدی نگهداری شد. در ادامه DNA سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 13565، ATCC 14458 و ATCC 19095 نیز استخراج شدند تا به ترتیب به منظور کنترل مثبت ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* در روش PCR به کار روند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

به منظور تأیید استافیلوکوکوس اورئوس بودن سویه‌های جداسازی شده از سوآپ بینی ناقلین سالم، از ژن اختصاصی *femA* با اندازه 132 bp که در این باکتری به صورت House Keeping حضور داشته، استفاده شد. همچنین به منظور ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEC به ترتیب از ژن‌های *sea* (210 bp)، *seb* (478 bp) و *sec* (257 bp) استفاده شد. پرایمرها به منظور سنتز به شرکت Bioneer کره سفارش داده شدند. واکنش PCR در حجم نهایی $25\text{ }\mu\text{L}$ انجام شد که شامل PCR Master Mix [Taq پلیمرز، dNTPs، MgCl_2 و بافر $10\times$] (فرمنتاز آمریکا)، 20 pmol از هر پرایمر، DNA الگو و آب مقطر دیونیزه بود. توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار و حجم مواد لازم برای انجام PCR و برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر (Analytica Jena، آلمان) نیز در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر

منبع	اندازه محصول (bp)	ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر $5' \rightarrow 3'$	پرایمر
(۲۰)	132	<i>femA</i>	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	femA-F femA-R
(۲۱)	210	<i>sea</i>	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	sea-F sea-R
(۱۲)	478	<i>seb</i>	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTCCC	seb-F seb-R
(۱۲)	257	<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	sec-F sec-R

جدول ۲. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر، مقدار و غلظت مواد مورد نیاز برای PCR مارکرهای *femA*، *sea*، *seb* و *sec*

برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر						مقدار و غلظت مواد واکنش PCR					
برنامه	نوع عملیات	درجه حرارت ($^{\circ}\text{C}$)		زمان (دقیقه)		تعداد سیکل	مارکرهای <i>sea</i> و <i>seb</i>	مارکر <i>femA</i>	مواد PCR		
		*B	*A	*B	*A						
۱	دنا توره شدن اولیه	۹۴	۹۴	۵	۵	۱	مقادیر (میکرولیتر)	۱۲/۵	مستر میکس		
۲	دنا توره شدن ثانویه	۹۴	۹۴	۱/۵	۱	۳۰				۱۲/۵	پرایمر پیشرو
۳	اتصال	۵۵	۵۷	۲	۱						
۴	تکثیر	۷۲	۷۲	۱/۵	۱	۱	۱/۵	۱	پرایمر پیرو		
۵	تکثیر نهایی	۷۲	۷۲	۸	۸	۱	۱/۵	۱	پرایمر پیرو		
*A برنامه دمایی مارکر <i>femA</i>							۱/۵	۱			
*B برنامه دمایی مارکرهای <i>sea</i> ، <i>seb</i> و <i>sec</i>							۱/۵	۱			

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ (مرک، آلمان) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (سیناژن، ایران) الکتروفورز شدند. محصولات PCR با سویه های کنترل مثبت ATCC 13565، ATCC 14458 و ATCC 19095 بررسی و تأیید شدند.

آنالیز آماری

فراوانی ژن های انتروتوکسین SEA، SEB و SEC در بین جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، به صورت درصد فراوانی گزارش شد. بررسی های آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ (Microsoft office, Chicago, IL; USA ver 18) و Microsoft Excel Worksheet نسخه ۲۰۱۶ با آزمون Chi-

squared تجزیه و تحلیل شد. مرز معنادار بودن P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های سوآپ

بینی

از مجموع ۱۳۶ نمونه سوآپ بینی کشت داده شده، تعداد ۴۶ نمونه (۳۳/۸٪) به لحاظ حضور ژن *femA* مثبت بودند (حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند) (تصویر ۱). درصد حاملین *استافیلوکوکوس اورئوس* در پرسنل رستوران ها، قصابی ها، لبنیات-فروشی ها و فست فودها به ترتیب ۳۰/۵٪، ۳۰٪، ۴۶/۶٪ و ۳۰٪ بودند (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن های *sec* و *seb sea* در ایزوله های سوآپ بینی ناقلین

تعداد (%) ایزوله های حامل ژن انتروتوکسین			تعداد (%) ناقلین <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	تعداد	نمونه سوآپ بینی
<i>sec</i>	<i>seb</i>	<i>sea</i>			
۰ (۰٪)	۱ (۹٪)	۳ (۲۷/۲٪)	۱۱ (۳۰/۵٪)	۳۶	پرسنل رستوران
۳ (۲۵٪)	۲ (۱۶/۶٪)	۳ (۲۵٪)	۱۲ (۳۰٪)	۴۰	پرسنل قصابی
۲ (۱۴/۲٪)	۲ (۱۴/۲٪)	۴ (۲۸/۵٪)	۱۴ (۴۶/۶٪)	۳۰	پرسنل لبنیات فروشی
۰ (۰٪)	۱ (۱۱/۱٪)	۱ (۱۱/۱٪)	۹ (۳۰٪)	۳۰	پرسنل فست فود
۵ (۱۰/۸٪)	۶ (۱۳٪)	۱۱ (۲۳/۹٪)	۴۶ (۳۳/۸٪)	۱۳۶	جمع

استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بینی پرسنل فست فودها تعداد ۱ ایزوله (۱۱/۱٪) واجد ژن *sea*، ۱ ایزوله (۱۱/۱٪) واجد ژن *seb* و *sec* نیز منفی بود (جدول ۳). هیچ یک از ۴۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده، هم زمان واجد ژن های *sea*، *seb* و *sec* نبودند.

فراوانی ژن های *sec* و *seb sea* *استافیلوکوکوس اورئوس*

در نمونه های سوآپ بینی

از مجموع ۴۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۱۱ سویه (۲۳/۹٪) واجد ژن *sea*، ۶ سویه (۱۳٪) واجد ژن *seb* و ۵ سویه (۱۰/۸٪) نیز واجد ژن *sec* بودند (تصویر ۲). ۲۳ ایزوله (۵۲٪) از ۴۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* فاقد ژن های *sea*، *seb* و *sec* بودند. از ۱۱ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل رستوران های سطح شهر اردبیل، ۳ ایزوله (۲۷/۲٪) واجد ژن *sea*، ۱ ایزوله (۹٪) واجد ژن *seb* و *sec* نیز منفی بود. از ۱۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل قصابی ها تعداد ۳ ایزوله (۲۵٪) واجد ژن *sea*، ۲ ایزوله (۱۶/۶٪) واجد ژن *seb* و ۳ ایزوله (۲۵٪) نیز واجد ژن *sec* بودند. از ۱۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل لبنیات-فروشی ها تعداد ۴ ایزوله (۲۸/۵٪) واجد ژن *sea*، ۲ ایزوله (۱۴/۲٪) واجد ژن *seb* و ۲ ایزوله (۱۴/۲٪) نیز واجد ژن *sec* بودند. از ۹ سویه

منبع مهم آلوده‌کننده مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسیژنیک هستند (۲۳). روش‌های کشت و شناسایی فنوتیپی با استفاده از تست‌های افتراقی بیوشیمیایی در تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های مواد غذایی و بالینی حائز اهمیت است. از طرفی می‌توان به روش‌های ایمونولوژیکی اشاره کرد که از روش‌های بااهمیت در تشخیص انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌شمار می‌رود (۲۴). روش PCR توانایی شناسایی استعداد سویه‌ها در تولید انتروتوکسین را دارد، به‌خصوص در مواقعی که ژن‌های انتروتوکسین به‌علت شرایط مختلف بیان نمی‌شوند. در این موارد جستجوی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن‌های انتروتوکسین کلاسیک SEA-SEE بسیار اهمیت دارد؛ زیرا این انتروتوکسین‌ها در میزان بسیار کم نیز می‌توانند مسمومیت شدید غذایی ایجاد کنند. به همین علت امروزه بسیاری از محققین از این روش برای شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مولد انتروتوکسین استفاده می‌کنند (۱۲).

در مطالعه حاضر از ۱۳۶ نمونه سوآپ بینی، ۴۶ نمونه (۳۳/۸٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس بود که در مقایسه با سایر مطالعات (۲۵-۲۷) میزان بیشتری از افراد حامل این باکتری بودند. در مطالعه Hassanvand و همکاران میزان افراد حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی، ۱۶/۴۸٪ گزارش شد (۲۵). در مطالعه Norouzi و همکاران از مجموع ۳۰ نمونه سوآپ بینی، ۸ نمونه (۲۶/۷٪) حامل این باکتری گزارش شد (۲۶). همچنین در مطالعه Rall و همکاران در برزیل، سوآپ بینی ۶۸ نفر از افرادی که در تهیه مواد غذایی مشغول بودند بررسی شد. آنها فراوانی افراد حامل استافیلوکوکوس اورئوس را ۲۲/۱٪ گزارش کردند (۲۷). در برخی از مطالعات، فراوانی ناقلین استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به مطالعه حاضر نزدیک و یا بیشتر بود. به‌عنوان مثال میزان فراوانی ناقلین سالم در مطالعه Saadati و همکاران از ۱۵۰ نمونه سوآپ بینی، تعداد ۹۵ نمونه (۶۳٪) گزارش شد (۲۸). در حالی که Alhashimi و همکاران در عراق با بررسی ۳۳۲ نفر از افراد شاغل در مکان‌های عرضه مواد غذایی، تعداد ۱۰۰ نفر (۳۰/۱٪) را حامل استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کردند (۲۹). همچنین در مطالعه Barati و همکاران از ۴۳ نفر بررسی‌شده، ۵۸/۱۴٪ ناقل استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شدند (۳۰). با مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با سایر مطالعات می‌توان گفت که به دلیل تفاوت در حجم نمونه، موقعیت جغرافیایی، نژاد افراد و سطح



تصویر ۱. محصول PCR ژن *femA* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک M: مارکر (DNA Ladder ۵۰bp)، چاهک ۱: سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 13565 (- *femA* positive) 132 bp، چاهک ۲ و ۶: نمونه‌های سوآپ حامل استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن *femA*: چاهک ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸: نمونه‌های سوآپ بینی فاقد ژن *femA*، چاهک ۹: کنترل بلانک (فاقد DNA)



تصویر ۲. محصولات PCR ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک M: مارکر (DNA Ladder ۵۰bp)، چاهک ۱: کنترل مثبت واجد ژن *sea* - ۲۱۰ جفت باز (سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 13565)، چاهک ۲: کنترل مثبت واجد ژن *seb* - ۴۷۸ جفت باز (سویه ATCC 14458)، چاهک ۳: کنترل مثبت واجد ژن *sec* - ۲۵۷ جفت باز (سویه ATCC 19095)، چاهک ۴: نمونه سوآپ بینی حامل استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن *sea*، چاهک ۵: نمونه سوآپ بینی حامل استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن *seb*، چاهک ۶: نمونه سوآپ بینی حامل استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن *sec*، چاهک ۷ و ۸: نمونه‌های سوآپ بینی فاقد ژن‌های انتروتوکسین، چاهک ۹: کنترل بلانک (فاقد DNA)

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس روی پوست، مخاط انسان و حیوانات به‌عنوان مخزن اولیه حضور داشته و کلونیزه می‌شود (۲۲). بینی و دست افرادی که در پروسه تولید غذا و حمل و نقل آن مشغول‌اند، دو

داشته و این موضوع مهم نیز در افزایش قدرت پاتوژنیسیته این باکتری اثرگذار است.

در مطالعه Udo و همکاران در کویت، نمونه‌های سوآپ بینی، مدفوع و دست ۲۵۰ نفر از کارکنان شاغل در رستوران‌ها برای ردیابی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی ارزیابی شدند. از ۲۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از افراد شاغل در رستوران‌ها، فراوانی ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* به ترتیب ۱۱٪، ۱۲/۵٪ و ۲۳٪ گزارش شد. نتیجه تحقیق مذکور از این نظر با مطالعه ما همخوانی داشت که میزان فراوانی ژن *sea* در نمونه سوآپ پرسنل فست‌فودها ۱۱/۱٪ بود (۳). همچنین در مطالعه ما میزان فراوانی ژن *seb* نیز در سویه‌های جدا شده از پرسنل رستوران، لبنیات-فروشی و فست‌فود نیز با مطالعه مذکور همخوانی داشت. میزان فراوانی ژن *sec* در مطالعه مذکور در مقایسه با مطالعه ما بیشتر بود. مکان کلنیزه شدن استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه فوق، مدفوع، دست و بینی کارکنان رستوران بوده است، درحالی‌که ایزوله‌های مطالعه ما از ناحیه قدامی بینی جداسازی شدند. لذا با بررسی نتایج می‌توان گفت که مکان کلنیزه شدن باکتری در میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس‌های انتروتوکسیژنیک تأثیر دارد. همچنین مکان افرادی که به نوعی با مواد غذایی در ارتباط هستند نیز در تغییر الگوی فراوانی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس اثرگذار خواهد بود.

در کل نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد درصد قابل توجهی از پرسنل شاغل در زنجیره غذایی، ناقل استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسیژنیک در بینی خود بودند. همچنین در بررسی‌های انجام شده اهمیت بهداشتی انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEC که عامل اکثریت مسمومیت‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس هستند، مشهود است. اگرچه در ایران نیز مطالعاتی در خصوص شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های انتروتوکسیژنیک و همچنین ردیابی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ناقلینی که با مواد غذایی سروکار دارند صورت گرفته، ولی با وجود این استاندارد و راهکار مناسبی برای جلوگیری از انتقال باکتری به زنجیره غذایی از سوی افراد ناقل، وجود ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که پرسنل شاغل در مراکز عرضه مواد غذایی در گام اول با رعایت نکات ساده بهداشتی مثل شستن دست‌ها و استفاده از دستکش، انتقال سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسیژنیک را به زنجیره غذایی کاهش دهند. از طرفی آموزش کارکنان شاغل در بخش تهیه و توزیع غذا و کنترل بیشتر مسئولین بهداشت می‌تواند در کاهش

بهداشت فردی و عمومی الگوی فراوانی ناقلین استافیلوکوکوس اورئوس متفاوت است.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان فراوانی ناقلین استافیلوکوکوس اورئوس با ۴۶/۶٪ مربوط به پرسنل شاغل در لبنیات‌فروشی‌ها و کمترین میزان فراوانی نیز با ۳۰٪ مربوط به پرسنل شاغل در فست-فودها بود. با بررسی ژن‌های انتروتوکسین، بیشترین میزان فراوانی ژن انتروتوکسین در بین ۴۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به *sea* با ۲۳/۹٪ بود؛ درحالی‌که ژن *sec* با ۱۰/۸٪ کمترین میزان فراوانی در بین ایزوله‌ها بود.

در مطالعه Alhashimi و همکاران از ۱۰۰ نمونه سوآپ ناقل استافیلوکوکوس اورئوس میزان فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb*، *sec* و *sed* به ترتیب ۱۶٪، ۱۸٪، ۸٪ و ۸٪ گزارش شد (۲۹). نتایج این مطالعه با مطالعه ما از این نظر مشابه بود که اولاً ژن‌های کدکننده انتروتوکسین SEA و SEB بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص داده بودند و دیگر اینکه میزان فراوانی انتروتوکسین *sec* نیز شبیه هم بود.

مطالعه Peck و همکاران در کشور کره نشان داد که ژن *sea* بیشترین میزان فراوانی را در بین ژن‌های *seb* و *sec* داشته و از ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از بینی افراد میزان ۴۷/۴٪ حامل این ژن بوده‌اند (۳۱). مطالعه حاضر از این نظر با مطالعه فوق همخوانی دارد که بین ژن‌های کدکننده انتروتوکسین SEA، SEB و SEC ژن *sea* نسبت به بقیه بیشترین فراوانی را داشت. همچنین ژن کدکننده انتروتوکسین SEB در مطالعه فوق منفی گزارش شده است. این درحالی است که در مطالعه حاضر ۱۳٪ ایزوله‌ها واجد ژن *seb* هستند که با نتایج مطالعه Alhashimi و Saadati همخوانی داشت (۲۸، ۲۹). در مطالعه Saadati و همکاران از ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بینی ناقلین فراوانی ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* به ترتیب ۲۵/۳٪، ۱۵/۸٪ و ۹/۵٪ گزارش شد (۲۸). نتایج تحقیق مذکور با مطالعه ما همخوانی داشت و الگوی میزان فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در هر دو مطالعه مشابه بود. با این توضیح که در مطالعه ما، نمونه‌های سوآپ از جامعه هدف مختلفی جمع‌آوری شد.

در مطالعه Norouzi و همکاران از ۳۰ نمونه سوآپ بینی ۲ سویه (۴۰٪) واجد ژن *sea*، ۳ سویه (۶۰٪) واجد ژن *seb* و هیچ نمونه‌ای به لحاظ حضور ژن *sec* مثبت گزارش نشد (۲۶). در مطالعه فوق میزان فراوانی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین نسبت به مطالعه ما بیشتر بوده و نشان‌دهنده این است که سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده در مطالعه فوق قدرت انتروتوکسین‌زایی زیادی

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از مسئولین محترم آزمایشگاه همکار سازمان غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (نیاز آرتا سبز آزما) به دلیل همکاری و حمایت‌های خود سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع گزارش نشده است.

آلودگی غذاهای مصرفی، مؤثر واقع شود. همچنین می‌توان با شناسایی افراد حامل باکتری، با درمان صحیح آن‌ها انتشار باکتری در زنجیره غذایی را کاهش داد. بنابراین برای تحقق سلامت عمومی، کاهش خطرات ناشی از انتقال باکتری از افراد ناقل به زنجیره غذایی، لزوم همکاری اپیدمیولوژیست‌ها، میکروبیولوژیست‌ها، کارشناسان دامپزشکی و بهداشت مواد غذایی با همدیگر ضرورت پیدا می‌کند.

References

- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. New York: Springer Science & Business Media publisher; 2008.
- Imani-Fooladi A, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010;11(4):19-26.
- Udo EE, Al-Mufti S, Albert MJ. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants. BMC Res Notes. 2009;2(1):108.
- Kluytmans J, Wertheim H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection. 2005;33(1):3-8.
- Best N, Fraser JD, Rainey PB, Roberts SA, Thomas MG, Ritchie SR. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. N Z Med J. 2011;124(1332):31-9.
- Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N Engl J Med. 2001;344(1):11-6.
- Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):2177-97.
- Scherrer D, Corti S, Muehlherr J, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet Microbiol. 2004;101(2):101-7.
- Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. Appl Environ Microbiol. 2006;72(9):6117-23.
- Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int J Food Microbiol. 2010;142(1):74-7.
- Hu D-L, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. Eur J Pharmacol. 2014;722:95-107.
- Johnson W, Tyler S, Ewan E, Ashton F, Pollard D, Rozee K. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991;29(3):426-30.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2011;2(6):580-92.
- Asgarpoor D, Zeighami H. The role of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins (SEs) in Staphylococcal Food Poisoning (SFP): Systematic review. Laboratory & Diagnosis. 2015;7(28):63-73.
- Suzuki Y, Omoe K, Hu DL, Sato'o Y, Ono HK, Monma C, et al. Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan. Microbiology and immunology. 2014;58(10):570-80.
- Khorvash F, Abdi F, Ataei B, Neisiani HF, Kashani HH, Narimani T. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Frequency and antibiotic resistance in healthy adults. J Res Med Sci. 2012;17(2):229-32.
- Babak Nasiri M, Leila Ballali M. Prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Madani heart hospital, Tabriz. J Cardiovasc Thorac Res. 2010;2(3):13-7.
- Khashei R, Zamani K, Kaveh M, Motamedifar M, Ebrahim-Saraie HS. Nasal Carriage and Resistance Pattern of *Staphylococcus aureus* Among Healthy Medical Students. Jentashapir J Health Res. 2016;7(1): e29408.
- Gadyari F, Sattari M, Boroumand MA, Yaghoubi R, Sepehriseresht S, Purgoli L. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D in clinical strains isolated from burned patients of Tehran Motahari Hospital. Iran J Med Microbiol. 2011;5(1):20-7.

20. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1032-5.
21. Tsen H-Y, Chen T-R. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;37(5):685-90.
22. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(3):290-6.
23. Colombari V, Mayer MD, Laicini ZM, Mamizuka E, Franco BD, Destro MT, et al. Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *J Food Prot.* 2007;70(2):489-93.
24. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol Cell Probes.* 2005;19(5):299-305.
25. Hassanvand M, Goudarzi Gh, Khanizadeh S. The frequency of enterotoxin A and B genes among *Staphylococcus aureus* strains isolated from confectionary products and nares of its processing workers in Khorramabad city (2012). *Pajohande.* 2014;19(5):281-6.
26. Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. The Isolation and Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A-E and TSST-1 Genes from Different Sources by PCR Method. *Qom Univ Med Sci J.* 2012;6(3):78-85.
27. Rall V, Sforcin J, Augustini V, Watanabe M, Fernandes Jr A, Rall R, et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz J Microbiol.* 2010;41(1):59-65.
28. Saadati M, Barati B, Doroudian M, Shirzad H, Hashemi M, Hosseini SM, et al. Detection of Sea, Seb, Sec, Seq genes in *staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers in Tehran province, Iran; by multiplex PCR. *J Paramed Sci.* 2011;2(2):34-40.
29. Alhashimi HMM, Ahmed MM, Mustafa JM. Nasal carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* among food handlers in Kerbala city. *K Int J Mod Sci.* 2017;3(2):69-74.
30. Barati B, Saadati M, Bahmani M.Kh. Isolation and Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Type A by Multiplex PCR. *Military Med J.* 2006;8(2):119-28.
31. Peck KR, Baek JY, Song J-H, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. *J Korean Med Sci.* 2009;24(4):585-91.