Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

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

Daryoush Asgarpoor[1], Mahrokh Bahrami[2], Shahrzad Daneshamooz[1], Mehdi Ghasemi[2]

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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۶ – بهمن-اسفند ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

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 میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

میکروبشناسی مولکولی

IJMM1396;11(6): 149-157

نویسنده مسئول:

داریوش عسگرپور

گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۷۱۷۲۸۶۵۳

پست الکترونیک:

D.asgarpoor@zums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت، فاقد حرکت، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است که در ناحیهٔ 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 مطالعهٔ 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. نمونهٔ 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: درمجموع، از ۱۳۶ نمونهٔ سوآپ بینی، ۴۶ نمونه (۳۳/۸٪) ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که این میزان ناقلی با مثبت شدن ژن *femA* ثابت شد. از مجموع ۴۶ ایزولهٔ *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 زنجیرهٔ غذایی، ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسیژنیک در بینی خود بودند. از این‌رو، برنامهٔ غربالگری و کنترل این ناقلین به‌منظور جلوگیری از شیوع عفونت‌های استافیلوکوکی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

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 به‌صورت پایدار و در ۶۰٪ افراد نیز به‌صورت ناقلین متناوب یافت می‌شود؛ لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل‌آوری و پخش موادغذایی فعالیت می‌کنند، درصورت رعایت نکردن نکات بهداشتی می‌توانند باکتری را به فرآورده‌های غذایی منتقل کنند (۳-۵). این باکتری در ناحیه قدامی مجاری بینی کلنیزه شده و باعث افزایش خطر ابتلا به عفونت‌های استافیلوکوکی می‌شود؛ به‌طوری‌که میزان این عفونت‌ها در ناقلین این باکتری نسبت به افراد غیر ناقل بیشتر است (۶). افراد ناقل هنگام تهیهٔ مواد غذایی در زنجیرهٔ 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 تولیدکنندهٔ انتروتوکسین آلوده شده باشند،

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 ازسوی افرادی که حامل باکتری هستند شیوع بالاتری دارد (۸). انتروتوکسین‌ها یکی از فاکتورهای ویرولانس مهم این باکتری محسوب می‌شوند که تأثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود می‌گذارند. این توکسین‌ها به‌طور افقی و ازطریق عناصر متحرک ژنتیکی مثل فاژها و جزایر پاتوژنیسیته منتقل می‌شوند و این به‌خصوص دربارهٔ 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 دستهٔ 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 متحدهٔ 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 ایجادکنندهٔ 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 سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از حیوانات حضور دارد (۷, ۱۳).

بسته به نوع انتروتوکسین، مقدار توکسینی که باعث ایجاد بیماری می‌شود از ۲۰ng الی ۱μg گزارش شده است. حضور 10^5 باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در هر گرم از مادهٔ غذایی باعث تولید انتروتوکسین شده و به‌دلیل مقاومت به حرارت و آنزیم‌های 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 هرچند آمار دقیقی از افرادی که در اثر بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بستری می‌شوند و یا اینکه می‌میرند، وجود ندارد، بااین‌حال گزارشات مختلفی مبنی بر ناقل بودن افراد وجود دارد. گزارش‌ها حاکی از آن است که حدود ۲۶-۲۰ درصد افراد بررسی‌شده 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 مطالعهٔ توصیفی-مقطعی، ۱۳۶ نمونهٔ سوآپ بینی از افراد شاغل در رستوران‌ها، قصابی‌ها، لبنیات‌فروشی‌ها و فست‌فودهای 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) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. در مرحلهٔ بعد کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز و Voges Proskauer (VP) آزمایش شدند.

استخراج DNA ژنومیک به روش Boiling

استخراج DNA ژنومیک جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس روش Gadyari و همکاران با تغییراتی به‌صورت زیر بهینه شد (۱۹). بدین‌ترتیب که ایزوله‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌مدت یک شبانه‌روز در محیط Luria-Bertani (LB) broth (مرک، آلمان) در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. ۱/۵mL از سوسپانسیون میکروبی به‌مدت ۴ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اتوکلاو شده اضافه شد. مجدداً سانتریفیوژ به‌مدت ۴ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm صورت گرفت. عمل شستشو ۳ بار تکرار شد. پس از اتمام عمل شستشو، مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری ۱۰۰µL بافر TE اتوکلاو شده و همچنین ۵µL آنزیم لیزوزیم اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷° گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان درنظر گرفته شده، سوسپانسیون‌های به‌دست آمده، ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه به بن ماری جوش و سپس به‌مدت ۵ دقیقه به یخ منتقل شدند. این عمل ۳ بار تکرار شد. نمونه‌های فوق به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی که حاوی DNA ژنومیک باکتری است، در دمای ۲۰°C- برای مصارف بعدی نگهداری شد. در ادامه DNA سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 13565، ATCC 14458 و ATCC 19095 نیز استخراج شدند تا به‌ترتیب به‌منظور کنترل مثبت ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* در روش PCR به کار روند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به‌منظور تأیید *استافیلوکوکوس اورئوس* بودن سویه‌های جداسازی شده از سوآپ بینی ناقلین سالم، از ژن اختصاصی *femA* با اندازهٔ ۱۳۲ bp که در این باکتری به‌صورت House Keeping حضور داشته، استفاده شد. همچنین به‌منظور ردیابی ژن‌های کدکنندهٔ انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEC به‌ترتیب از ژن‌های *sea* (۲۱۰bp)، *seb* (۴۷۸bp) و *sec* (۲۵۷bp) استفاده شد. پرایمرها به‌منظور سنتز به شرکت Bioneer کره سفارش داده شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µL انجام شد که شامل PCR Master Mix [Taq پلیمراز، dNTPs، $MgCl_2$ و بافر 10 X] (فرمنتاز آمریکا)، ۲۰pmol 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 برنامهٔ دمایی دستگاه ترمال سایکلر (Analytica Jena، آلمان) نیز در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر

منبع	اندازه محصول (bp)	ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر 5'→3'	پرایمر
(۲۰)	132	*femA*	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	femA-F femA-R
(۲۱)	210	*sea*	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	sea-F sea-R
(۱۲)	478	*seb*	TCGCATCAAACTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTCCC	seb-F seb-R
(۱۲)	257	*sec*	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	sec-F sec-R

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

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

*A برنامهٔ دمایی مارکر *femA*

*B برنامهٔ دمایی مارکرهای *sea*، *seb* و *sec*

الکتروفورز محصولات PCR

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

آنالیز آماری

فراوانی ژن‌های انتروتوکسین SEA، SEB و SEC در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، به‌صورت درصد فراوانی گزارش شد. بررسی‌های آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۸ (Microsoft office, Chicago, IL; USA ver 18) و Microsoft Excel Worksheet نسخهٔ ۲۰۱۶ با آزمون Chi-squared تجزیه‌وتحلیل شد. مرز معنادار بودن P-value کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های سوآپ بینی

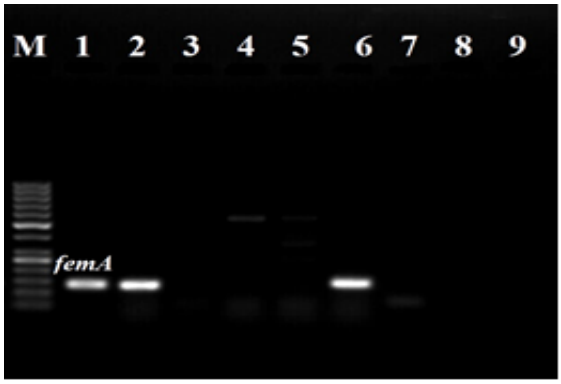
از مجموع ۱۳۶ نمونهٔ سوآپ بینی کشت داده شده، تعداد ۴۶ نمونه (۳۳/۸ ٪) به لحاظ حضور ژن *femA* مثبت بودند (حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند) (تصویر ۱). درصد حاملین *استافیلوکوکوس اورئوس* در پرسنل رستوران‌ها، قصابی‌ها، لبنیات-فروشی‌ها و فست‌فودها به‌ترتیب ۳۰/۵٪، ۳۰٪، ۴۶/۶٪ و ۳۰٪ بودند (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن‌های ***sea*** ***seb*** و ***sec*** در ایزوله‌های سوآپ بینی ناقلین

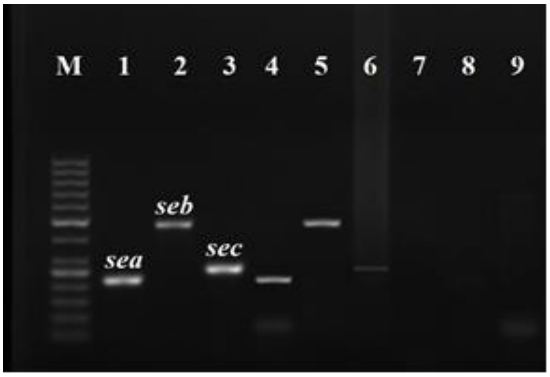
نمونهٔ سوآپ بینی	تعداد	تعداد (٪) ناقلین *استافیلوکوکوس اورئوس*	تعداد (٪) ایزوله‌های حامل ژن انتروتوکسین		
			sea	*seb*	*sec*
پرسنل رستوران	۳۶	۱۱ (۳۰/۵٪)	۳ (۲۷/۲٪)	۱ (۹٪)	۰ (۰٪)
پرسنل قصابی	۴۰	۱۲ (۳۰٪)	۳ (۲۵٪)	۲ (۱۶/۶٪)	۳ (۲۵٪)
پرسنل لبنیات‌فروشی	۳۰	۱۴ (۴۶/۶٪)	۴ (۲۸/۵٪)	۲ (۱۴/۲٪)	۲ (۱۴/۲٪)
پرسنل فست‌فود	۳۰	۹ (۳۰٪)	۱ (۱۱/۱٪)	۱ (۱۱/۱٪)	۰ (۰٪)
جمع	۱۳۶	۴۶ (۳۳/۸٪)	۱۱ (۲۳/۹٪)	۶ (۱۳٪)	۵ (۱۰/۸٪)

فراوانی ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های 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 ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* بودند. از ۱۱ سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل رستوران‌های سطح شهر اردبیل، ۳ ایزوله (۲۷/۲٪) واجد ژن *sea*، ۱ ایزوله (۹٪) واجد ژن *seb* و *sec* نیز منفی بود. از ۱۲ سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل قصابی‌ها 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 سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل لبنیات-فروشی‌ها 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 سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بینی پرسنل فست‌فودها 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 ایزولهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمده، هم‌زمان واجد ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* نبودند.



تصویر ۱. محصول PCR ژن *femA* بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪
چاهک M: مارکر (DNA Ladder ۵۰bp)، چاهک ۱: سویهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 13565 (positive *femA*-) 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 (سویهٔ *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: نمونهٔ سوآپ بینی حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن *sea*، چاهک ۵: نمونهٔ سوآپ بینی حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن *seb*، چاهک ۶: نمونهٔ 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 پروسهٔ تولید غذا و حمل‌ونقل آن مشغول‌اند، دو منبع مهم آلوده‌کنندهٔ 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. به‌همین‌علت امروزه بسیاری از محققین از این روش برای شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین استفاده می‌کنند (۱۲).

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

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

در مطالعهٔ 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 ایزولهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به *sea* با ۲۳/۹٪ بود؛ درحالی‌که ژن *sec* با ۱۰/۸٪ کمترین میزان فراوانی در بین ایزوله‌ها بود.

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

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

در مطالعهٔ Norouzi و همکاران از ۳۰ نمونهٔ 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 مطالعهٔ فوق میزان فراوانی ژن‌های کدکنندهٔ انتروتوکسین نسبت به مطالعهٔ ما بیشتر بوده و نشان‌دهندهٔ این است که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله شده در مطالعهٔ فوق قدرت انتروتوکسین‌زایی زیادی داشته و این موضوع مهم نیز در افزایش قدرت پاتوژنیسیته این باکتری اثرگذار است.

در مطالعهٔ Udo و همکاران در کویت، نمونه‌های سوآپ بینی، مدفوع و دست ۲۵۰ نفر از کارکنان شاغل در رستوران‌ها برای ردیابی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی ارزیابی شدند. از ۲۰۰ ایزولهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از افراد شاغل در رستوران‌ها، فراوانی ژن‌های *sea*، *seb* و *sec* به‌ترتیب ۱۱٪، ۱۲/۵٪ و ۲۳٪ گزارش شد. نتیجهٔ تحقیق مذکور از این نظر با مطالعهٔ ما همخوانی داشت که میزان فراوانی ژن *sea* در نمونهٔ سوآپ پرسنل فست‌فودها ۱۱/۱٪ بود (**۳**). همچنین در مطالعهٔ ما میزان فراوانی ژن *seb* نیز در سویه‌های جدا شده از پرسنل رستوران، لبنیات-فروشی و فست‌فود نیز با مطالعهٔ مذکور همخوانی داشت. میزان فراوانی ژن *sec* در مطالعهٔ مذکور در مقایسه با مطالعهٔ ما بیشتر بود. مکان کلنیزه شدن *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعهٔ فوق، مدفوع، دست و بینی کارکنان رستوران بوده است، درحالی‌که ایزوله‌های مطالعهٔ ما از ناحیه قدامی بینی جداسازی شدند. لذا با بررسی نتایج می‌توان گفت که مکان کلنیزه شدن باکتری در میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس*های 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 به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد درصد قابل توجهی از پرسنل شاغل در زنجیرهٔ 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 درخصوص شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس*های 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 زنجیرهٔ غذایی ازسوی افراد ناقل، وجود ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که پرسنل شاغل در مراکز عرضهٔ مواد غذایی در گام اول با رعایت نکات سادهٔ بهداشتی مثل شستن دست‌ها و استفاده از دستکش، انتقال سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسیژنیک را به زنجیرهٔ غذایی کاهش دهند. ازطرفی آموزش کارکنان شاغل در بخش تهیه و توزیع غذا و کنترل بیشتر مسئولین بهداشت می‌تواند در کاهش

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

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع گزارش نشده است.

References

1. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. New York: Springer Science & Business Media publisher; 2008.
2. 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.
3. 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.
4. Kluytmans J, Wertheim H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection. 2005;33(1):3-8.
5. 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.
6. 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.
7. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):2177-97.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Hu D-L, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. Eur J Pharmacol. 2014;722:95-107.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Gadyari F, Sattari M, Boroumand MA, Yaghoubi R, Sepehriseresht S, Purgholi L. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxins 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). Pajoohande. 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.