مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در همبرگر و کباب لقمه در مشهد و پروفایل ژن SE

شبنم سلطان احمدی[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۱*]، مریم طهرانی پور[۱]

۱-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱/۲۷

کلمات کلیدی:

استافیلوکوکوس اورئوس،

انتروتوکسین،

مقاومت آنتی‌بیوتیکی،

کباب لقمه،

همبرگر

DOI:10.22034/FSCT.21.157.157.

* مسئول مکاتبات:

Mahboobe_nak@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در همبرگر و گوشت لقمه در مشهد و فراوانی ژن SE بود. بدین منظور تعداد ۱۷۵ نمونه‌ی گوشتی با روش نمونه‌برداری خوشه‌ای، از برندهای تجاری مختلف طی فروردین تا خرداد ۱۴۰۲ از مراکز عرضه در سطح مشهد جمع‌آوری شد. پس‌از کشت نمونه‌ها در محیط کشت‌های اختصاصی و جداسازی ایزوله‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس*، باکتری‌ها با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند و سپس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تأیید هویت شدند. فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین نیز ردیابی گردید و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. نتایج نشان داد که از ۱۷۵ فراورده‌ی گوشتی، ۲۸ نمونه‌ی همبرگر (۱۶ درصد)، ۱۲ نمونه‌ی کباب لقمه (۷ درصد) و ۱۵ نمونه‌ی همبرگر دستی (۹ درصد) به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند. در مقایسه با نمونه‌های کباب لقمه، نمونه‌های همبرگر آلودگی بیشتری داشتند و به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت گزارش شدند. ژن *nuc* در تمامی باکتری‌های شناسایی‌شده با روش‌های بیوشیمیایی ردیابی گردید. حضور ژن *sea*، *sec* و *see* به ترتیب در ۴۵ (۲۵/۷۱ درصد)، ۴ (۲/۲۸ درصد) و ۶ (۴/۰۸ درصد) نمونه تشخیص داده شد. در هیچ‌یک از نمونه‌های غذایی، ژن‌های کدکننده‌ی *seb* و *sed* یافت نشد. به‌علاوه، بسیاری از ایزوله‌ها مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، کلیندامایسین و اگزاسیلین نشان دادند. همچنین براساس نتایج به دست‌آمده از آنالیزهای بلاست SEA-F و SEA-R مشخص شد که توالی‌ها دارای بیش‌از ۹۸ درصد تطابق با نتایج هم‌پوشانی بودند.

۱-مقدمه

ایمنی موادغذایی، یکی از مهم‌ترین زمینه‌های بهداشت عمومی در سرتاسر جهان به‌شمار می‌آید. *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذایی در نقاط مختلف جهان درنظر گرفته می‌شود. این باکتری بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت، غیرمتحرک، غیراسپورزا و کوکسی شکل است [۲،۱]. این باکتری فاکتورهای بیماری‌زایی متنوعی مانند انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs)، توکسین‌های اکسفولیاتیو A (ETB)، توکسین‌های اکسفولیاتیو B (ETB)، همولیزین، سندرم شوک سمی (TSS)، توکسین پنتون-والنتین لوکوسیدین (PVL) و غیره سنتز می‌کند. به‌منظور سنتز SEs، چگالی بحرانی مورد نیاز سویه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت بایستی بالاتر از 10^5 واحد تشکیل‌دهنده‌ی کلنی (CFU) در هر گرم یا میلی‌لیتر باشد. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، پروتئین‌های کروی شکل با وزن مولکولی kDa ۲۹-۲۲ و متعلق به خانواده‌ی سوپرآنتی‌ژن‌های سمی تب‌زا (PTSAgs) هستند. این توکسین‌ها یکی از قوی‌ترین سموم مواد غذایی محسوب می‌شوند؛ به‌طوری که، غلظت‌های بسیار پایین (ng ۲۰ تا µg ۱) آن‌ها باعث شروع علایم بیماری از جمله تب، استفراغ، حالت تهوع، دردهای شکمی و اسهال می‌شود [۳،۲]. به‌طورکلی، SEs به دو گروه انتروتوکسین‌های کلاسیک و انتروتوکسین های غیرکلاسیک (یا جدید) طبقه‌بندی می‌شوند. معمولاً، *استافیلوکوکوس اورئوس* سموم SEA-SEE را سنتز می‌کند که به‌عنوان SEs کلاسیک نام‌گذاری شده‌اند و غالباً بیشترین فراوانی را نشان می‌دهند. *استافیلوکوکوس اورئوس* غالباً از نمونه‌های محیط‌زیستی، پوست، سوراخ‌های بینی و دستگاه تنفسی حیوانات و انسان جداسازی شده است. بااین‌حال، موادغذایی مختلف از قبیل شیر و فراورده‌های لبنی، گوشت خام و فراورده‌های گوشتی، تخم مرغ و فراورده‌های تهیه‌شده از آن، موادغذایی آماده‌ی مصرف و همچنین فراورده‌های غذایی دریایی بستر مناسبی جهت رشد و تکثیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و به‌دنبال آن تولید توکسین‌های استافیلوکوکی به‌شمار می‌آیند [٤،١].

مواجهه با یک یا چند انتروتوکسین کلاسیک به‌واسطه‌ی مصرف آب و مواد غذایی آلوده سبب ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی (SFP) در انسان می‌شود. موادغذایی آلوده به‌عنوان یک حامل بالقوه‌ی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین به‌شمار می‌آیند. ممکن است این آلودگی به روش‌های مختلف ذیل رخ بدهد: سطوح در تماس با موادغذایی، تولیدکنندگان و توزیع‌کنندگان موادغذایی، مواد اوّلیه‌ی خام، ابزارها و تجهیزات مورداستفاده، هوا و گرد و غبار و غیره. در این‌میان، مهم‌ترین عوامل آلودگی، دست‌ها یا ترشحات تنفسی افراد دست‌اندرکار در چرخه‌ی تولید و توزیع موادغذایی است که حامل *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مولد انتروتوکسین در دست‌ها یا بینی خود می‌باشند. درمیان انواع موادغذایی مطالعه شده، از گوشت خام و فراورده‌های گوشتی به‌عنوان منابع اصلی *استافیلوکوکوس اورئوس* نام برده شده است [٤،٢].

اغلب، انجام یک فرایند حرارتی مناسب طی فراوری مواد غذایی سبب از بین رفتن تمامی سویه‌های رویشی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود. با این‌حال، نمی‌توان انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی را با استفاده از تیمارهای حرارتی از بین برد؛ زیرا آن‌ها در برابر حرارت پایدار هستند و در برابر آنزیم‌های پروتئازی دستگاه گوارش نیز مقاومت نشان می‌دهند. بنابراین، شناسایی استافیلوکوکوس‌های مولد انتروتوکسین و جمع‌آوری اطلاعات در مورد سایر عوامل خطر میکروبی و خطرات مرتبط با فراورده‌های گوشتی خام و پیش‌فراوری‌شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردارست. به‌علاوه، ارزیابی خطر و پایش میکروبی نقش بسزایی در تضمین کیفیت فراورده‌های گوشتی ایفا می‌کند [٤،٢]. در این راستا مطالعات متعددی انجام شده است. کومودروموس و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ی خود، فراوانی، تنوّع ژنتیکی و ویژگی‌های عفونی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) موجود در گوشت ورودی و فراورده‌های گوشتی، محیط کارخانه و حفره‌های بینی کارگران در دو کارخانه‌ی فراوری

گوشت در شمال یونان را بررسی نمودند. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از نظر مقاومت به ترکیبات ضدمیکروبی، دارا بودن ژن‌های *mecA* و *mecC*، ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین، ژن‌های کدکننده‌ی سم پنتون–والنتین لوکوسیدین (PVL) و سندرم شوک سمی و توانایی تشکیل بیوفیلم آزمایش شدند. *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۳/۸ درصد از ۱۶۰ نمونه‌ی بررسی‌شده جدا گردید؛ درحالی‌که، تنها یک نمونه (۰/۶ درصد) توسط MRSAحامل ژن *mecA* آلوده شده بود. ارزیابی حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌ها، مقاومت ضدمیکروبی پایین آن‌ها را نشان داد. میزان مقاومت بیشتر در برابر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۶۸/۲ درصد)، آموکسی‌سیلین/ اسید کلاولانیک (۳۶/۴ درصد) و تتراسایکلین (۱۸/۲ درصد) مشاهده شد؛ در حالی‌که ۳۱/۸ درصد از جدایه‌ها به تمامی ترکیبات ضدمیکروبی مورد آزمایش حساس بودند [۵]. محمد و همکاران (۲۰۲۱) به‌منظور جداسازی و شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت و انتروتوکسین‌های آن‌ها و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها به متی‌سیلین، ۱۰۰ نمونه‌ی ساندویچ گوشت (۵۰ برگر گوشت گاو و ۵۰ هات‌داگ) را ازنظر باکتری‌شناسی و مولکولی ارزیابی نمودند. *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۸۶ درصد از نمونه‌های آزمایش‌شده، ۹۰ درصد در همبرگر گوشت گاو و ۸۲ درصد در ساندویچ‌های هات‌داگ، در تعداد $۱۰ \times ۵/۳ - ۱۰^{۴} \times ۲/۹$، $۱۰ \times ۹/۵ - ۱۰^{۴} \times ۱/۹$ و $۱۰^{۴} \times ۳/۸ - ۱۰ \times ۱$ یافت شد. از ۱۰۶ سویه‌ی تأییدشده‌ی کوآگولاز مثبت، ۱۴ سویه (۱۳/۲درصد) تولیدکننده‌ی انتروتوکسین بودند و ۴۷ سویه‌ی (۴۴/۳ درصد) حامل ژن *mecA*، مقاومت آن‌ها به متی‌سیلین را تأیید کرد. از نظر کیفیت میکروبیولوژیکی نمونه‌ها براساس شمارش‌های میکروبی به‌ترتیب ۱۰، ۷۹ و ۱۱ درصد ساندویچ‌های گوشت آماده، قابل‌قبول، نامطلوب و بالقوه خطرناک بودند [۶]. سواریراج و همکاران (۲۰۲۱)، فراوانی و پروفایل ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین را در *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از ۱۲۰ گوشت مرغ در شهر چنای در کشور هند را مطالعه نمودند. از ۱۲۰ نمونه‌ی گوشت جمع‌آوری‌شده، ۶۶/۶۷ درصد (۸۰ نمونه از ۱۲۰ نمونه) از نمونه‌ها براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و PCRاختصاصی گونه براساس ژن نوکلئاز مقاوم به حرارت (*nuc*) از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. پروفایل ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین جدایه‌ها، حضور ۹ ژن (*sea-sej*) را نشان داد که ۵۰/۵۲ درصد (۴۲ نمونه از ۸۰ نمونه) از جدایه‌ها حاوی یک یا چند ژن کدکننده‌ی این سموم بودند. ژن *seb* در بسیاری از جدایه‌ها تشخیص داده شد و به‌دنبال آن *seg*، *sei*، *sec*، *sed* و *sej* به تنهایی یا به‌صورت ترکیبی قرار داشتند. تمامی جدایه‌ها فاقد *sea*، *see*، *seh* بودند. نتایج مطالعه به‌وضوح نشان‌دهنده‌ی شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا در گوشت‌های عرضه‌شده است که می‌تواند عامل مسمومیت غذایی و تهدید بزرگی برای سلامت عمومی باشد [۷]. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که ساندویچ‌های گوشت آماده‌ی آزمایش‌شده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و انتروتوکسین‌زا بوده و خطری بالقوه برای مصرف‌کنندگان به‌شمار می‌آیند. ازاین‌رو، اقدامات بهداشتی سختگیرانه در رستوران‌های فست‌فود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در کل تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* و SEs در مواد غذایی دشوار است. یکی از روش‌های سریع و بسیار اختصاصی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و انتروتوکسین‌های سنتزی، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است. بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در همبرگر و گوشت لقمه در مشهد و پروفایل ژن SE انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

محیط کشت آب پپتونه، برد–پارکر آگار، مانتیول سالت آگار (MSA)، نوترینت آگار (NA) و زرده تخم مرغ از شرکت ibresco (ایران)، محیط کشت تست DNase آگار و آگاروز

از شرکت Condalab (اسپانیا)، محیط کشت مولر-هینتون آگار (MHA)، گلیسرول و اسید هیدروکلریک (HCL) از شرکت Merk (آلمان)، مارکر Ladder DNA، Primers، Master Mix، Green viewer از شرکت Sinaclon (ایران)، آب مقطر تزریقی از شرکت آبان (ایران)، Loading dye و buffer TBE (Tris/Borate/EDTA) از شرکت پارس توس (ایران)، کیت رنگ آمیزی گرم از شرکت لابترون (ایران)، معرف کاتالاز، پلاسمای خرگوش و روغن ایمرسیون از شرکت بهار افشان (ایران) و پتاسیم تلوریت از شرکت QUELAB (کانادا) خریداری شدند.

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-تهیه‌ی محیط‌کشت‌های میکروبی

از محیط کشت آب پپتونه‌ی بافری برای تهیه‌ی سوسپانسیون اولیه استفاده شد. به‌منظور جداسازی و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* موجود در مواد غذایی از محیط کشت انتخابی برد-پارکر آگار استفاده شد. پس از پایان عملیات اتوکلاو کردن و کاهش دمای محیط‌کشت حدود ٤٥ درجه سانتی‌گراد با استفاده از پیپت استریل میزان ۱۰ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم تلوریت و ۵۰ میلی‌لیتر زرده‌ی تخم‌مرغ به محیط‌کشت اضافه شد. به‌علاوه، محیط‌کشت انتخابی-افتراقی مانیتول سالت آگار (MSA) برای تأئید حضور باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده‌ی آنزیم DNase مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت تست DNase آگار استفاده شد. میزان حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز با استفاده از محیط‌کشت مولر-هینتون آگار (MHA) آزمایش شد. از محیط‌کشت غیرانتخابی و مغذی نوترینت آگار (NA) برای رشد و تکثیر این باکتری استفاده گردید [۸].

۲-۲-۲-آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک‌فارلند

پس از کشت باکتری بر سطح محیط‌کشت نوترینت آگار، با استفاده از یک لوپ استریل تک کلنی از باکتری برداشته شد و در لوله‌ی حاوی سرم فیزیولوژی حل گردید. به‌منظور استانداردسازی غلظت سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح در آزمون سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی از لوله‌ی استاندارد حاوی باریم سولفات برابر با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند استفاده شد. به‌منظور تعیین چگالی صحیح کدورت استاندارد، میزان جذب به‌وسیله‌ی دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید. در ابتدا، محلول ۱ درصد اسید سولفوریک و محلول ۱/۱۷۵ کلرید باریم را به‌صورت جداگانه در دو لوله تهیه کرده و سپس، ۹/۹۵ میلی‌لیتر از محلول اسید سولفوریک با ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول کلرید باریم مخلوط شدند. کدورت ایجاد شده با محلول ۰/۵ مک‌فارلند در کنار یک صفحه‌ی سفید با خطوط سیاه رنگ مقایسه شد. سپس، از مخلوط تهیه‌شده به‌میزان مساوی در لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی پوشیده‌شده با ورقه‌های آلومینیم ریخته شد و تا هنگام مصرف در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید [۹].

۲-۲-۳-ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه، اطلاعات دریافت‌شده از شرکت‌های تولیدکننده‌ی کباب لقمه و همبرگر محرمانه بود. هزینه‌ای از شرکت‌های تولیدکننده دریافت نشد و تمامی نکات اخلاقی رعایت گردید. کد اخلاق با شناسه‌ی IR.IAU.MSHD.REC.1402.072 از کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دریافت شد.

۲-۲-٤-جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

در این پژوهش توصیفی عملی، تعداد ۱۷۵ نمونه‌ی گوشتی شامل ۷۰ نمونه‌ی همبرگر، ۷۰ نمونه‌ی کباب لقمه و ۳۵ نمونه‌ی همبرگر دستی به‌صورت غیرتکراری از برندهای تجاری و درصدهای مختلف (۳۰، ٦۰، ۷۰ و ۹۰ درصد) طی ماه‌های فروردین تا خرداد از مراکز عرضه در مشهد با روش خوشه‌ای از مناطق مختلف جمع‌آوری گردید و در مجاورت کیسه‌های یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی (علوم پایه) مشهد انتقال داده شد. ابتدا، ۱۰ گرم از هر نمونه تحت شرایط استریل توسط پنس استریل به شیشه‌های درب‌دار حاوی ۹۰ میلی لیتر محیط‌کشت آب پپتونه‌ی بافری انتقال داده شد و به مدت ۵ دقیقه به‌خوبی مخلوط گردید تا سوسپانسیون همگنی تشکیل شود. سپس،

۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط همگن‌شده بر سطح محیط‌کشت برد-پارکر آگار کشت داده شد. در پایان، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت۴۸-۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند [۱].

۲-۲-۵- احیای سویه‌ی استاندارد میکروبی

به‌منظور کنترل نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، سویه‌ی استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. جهت فعال‌سازی باکتری، ابتدا طبق دستورالعمل و در شرایط استریل سر آمپول شکسته شد. به‌وسیله‌ی یک پیپت استریل درحدود ۰/٤ میلی‌لیتر از محیط‌کشت نوترینت براث به‌درون آمپول اضافه و مخلوط شد. سپس، از سوسپانسیون آماده شده به درون لوله‌های حاوی محیط‌کشت آب پپتونه‌ی بافری و پلیت‌های حاوی محیط‌کشت برد-پارکر آگار کشت داده شد و نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲٤-٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند [۱۰].

۲-۲-٦-روش‌های شناسایی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

جهت تشخیص و تأیید ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از ویژگی‌های مورفولوژیکی و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. طبق دستورالعمل وزارت بهداشت سازمان غذا و دارو، استاندارد کلی برای همبرگر ۲۳۰٤ و استاندارد انجام آزمون *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگالاز مثبت ۱-٦۸۰٦ می‌باشد [۱۱].

۲-۲-٦-۱-آزمون‌های مورفولوژیکی

به‌منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی ماکروسکوپی، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌ی همگن‌شده با ۹۰ میلی لیتر محیط‌کشت آب پپتونه‌ی بافری به‌طور کامل مخلوط تا سوسپانسیون همگنی ایجاد شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده توسط لوپ استریل به‌صورت چمنی بر سطح محیط‌کشت برد-پارکر آگار کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت زمان ٤۸-۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از گذشت مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری، کلنی‌های رشدیافته بررسی شدند و در دو گروه اصلی جای گرفتند: ۱. کلنی‌های مشخص: آن‌ها به‌صورت کلنی‌های سیاه یا خاکستری رنگ براق و محدّب (با قطر ۱/۵-۱ میلی‌متر پس از گذشت مدت زمان ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و قطر ۲/۵-۱/۵ میلی‌متر پس از گذشت ٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری) که برخی از آن‌ها با هاله‌ی شفاف به‌صورت جزئی کدر شده، قابل‌مشاهده بودند. کلنی‌های نامشخص: اندازه‌ای مشابه با اندازه‌ی کلنی‌های مشخص داشتند و شامل کلنی‌های خاکستری رنگ بدون هاله‌ی شفاف و کلنی‌های سیاه براق فاقد هاله‌ی شفاف بودند [۱۲].

۲-۲-٦-۲-آزمون‌های بیوشیمیایی

به‌منظور انجام آزمون‌های بیوشیمیایی از کلنی‌های مشخص *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. آزمون‌های بیوشیمیایی انجام‌شده در این مطالعه شامل آزمون‌های کاتالاز، کوآگولاز، DNase و توانایی تخمیر مانیتول بود [۱۲].

۲-۲-٦-۲-۱-آزمون کاتالاز

یکی از موارد استفاده از این آزمون، جداسازی استافیلوکوکوس‌ها (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوکوس‌ها (کاتالاز منفی) است. پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه، H_2O_2) یکی از محصولات نهایی متابولیسم اکسیداتیو باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری است که تجمع آن در سلول باکتری، سبب از بین رفتن آن می‌شود. با این حال، آنزیم کاتالاز باکتریایی، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. جهت انجام این آزمون، بر سطح یک لام تمیز یک قطره آب اکسیژنه ریخته و با استفاده از سوآب استریل، یک کلنی از کشت خالص باکتری به آن اضافه شد و ایجاد حباب بر سطح لام بررسی گردید. تشکیل سریع جباب‌ها با حالت جوش زدن نشانه‌ی مثبت بودن این آزمون است [۱۲].

۲-۲-٦-۲-۲-تست دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase)

برخی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در آزمون کوآگولاز دارای واکنشی ضعیف یا منفی می‌باشند؛ از این رو، جهت شناسایی آن‌ها از تِست دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase)

استفاده می‌شود. جهت انجام این آزمون، کلنی خالص *استافیلوکوکوس اورئوس* بر سطح محیط‌کشت تست DNaseآگار کشت داده شد و پس از گذشت ٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد تشکیل هاله‌ی شفاف اطراف کلنی بررسی شد. تشکیل هاله نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن این آزمون می‌باشد که به‌دلیل تجزیه DNA توسط آنزیم DNase *استافیلوکوکوس اورئوس* است [١٢].

٢-٢-٦-٢-٣-آزمون کوآگولاز

گونه‌های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس* همانند *اورئوس* قادر به تولید آنزیم کوآگولاز و برخی دیگر از پروتئین با خاصیت انعقادی می‌باشند. برای انجام این آزمون از پلاسمای خرگوش یا انسان به‌همراه EDTA (١ درصد) استفاده می‌شود. بدین منظور در ٠/٥ میلی‌لیتر از پلاسمایی که به نسبت ١ به ٥ با سرم فیزیولوژی رقیق شده بود، چند کلنی از باکتری حل و سپس، نمونه در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. طی ٤-١ ساعت از مدت‌زمان گرم‌خانه‌گذاری، نمونه از نظر تشکیل لخته بررسی شد. در صورت مشاهده‌ی لخته، باکتری کوآگولاز مثبت بود و در غیر این صورت نمونه مجددا به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و سپس وجود لخته بررسی شد [١٢].

٢-٢-٦-٢-٤-توانایی تخمیر مانیتول

استافیلوکوکوس اورئوس برخلاف استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی قادر به تخمیر قند مانیتول می‌باشد. به‌منظور انجام این آزمون، *استافیلوکوکوس اورئوس* بر سطح محیط‌کشت مانیتول سالت آگار (MSA) کشت داده شد و سپس پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. تشکیل کلنی‌های زردرنگ نشان‌دهنده‌ی تخمیر مانیتول و تأیید *استافیلوکوکوس اورئوس* بود [١٢].

٢-٧-استخراج DNA به روش جوشاندن

به‌منظور شناسایی قطعی ایزوله‌ها با روش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی، ابتدا DNA باکتری‌ها استخراج شد و پس از سنجش کمی و کیفی DNA، چرخه‌های زمانی و دمایی PCR بهینه‌سازی گردید. به‌منظور استخراج DNA، ابتدا یک کلنی خالص از باکتری در ١ میلی لیتر از محیط‌کشت نوترینت براث حل شد و مخلوط به‌مدت ٢ دقیقه با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن سوپرناتانت، ٥٠٠ میکرولیتر آب مقطر به رسوب تشکیل‌شده در انتهای میکروتیوب اضافه شد و مخلوط مجددا سانتریفیوژ (به‌مدت ٢ دقیقه با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقیقه) گردید. این مرحله سه بار تکرار شد تا سلول‌های باکتری به‌طور کامل از محیط‌کشت جداسازی شود. در مرحله‌ی بعد، ٢٠٠ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب حاوی باکتری اضافه شد و میکروتیوب در حمام آب گرم با دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌های باکتری از بین رفت، پروتئین‌ها دناتوره شد و مواد ژنتیکی آن نیز آزاد گردید. پس از آن، میکروتیوب‌ها به‌مدت ١٠ دقیقه با سرعت ١٠٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان، سوپرناتانت حاوی DNA استخراج‌شده در فریزر با دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [١٣].

٢-٨-تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نانودراپ

به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. میزان چگالی نوری (OD) در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر، غلظت و خلوص اسیدهای نوکلئیک را مشخص نمود. در صورتی‌که، میزان OD در نسبت طول موج ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر در محدوده‌ی ٢-١/٨ قرار داشت، نشان‌دهنده‌ی خلوص قابل‌قبول DNA استخراج‌شده بود [١٤].

٢-٩-تأیید هویت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *nuc*

ایزوله‌هایی که در روش‌های بیوشیمیایی به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین شدند، با روش PCR و با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *nuc* (جدول ١)، ژن نوکلئاز مقاوم به حرارت تأیید شدند. انتخاب آغازگرهای مناسب برای ژن *nuc* با استفاده از مقاله‌های رفرنس صورت گرفت [١٥]. اختصاصی بودن آغازگرها برای توالی مورد نظر، در سایت NCBI، بلاست و بررسی شدند. سنتز توالی آغازگرها

توسط شرکت سیناکلون انجام شد. ژن مورد نظر با استفاده از ترموسایکلر و مطابق با برنامه‌ی زمانی و دمایی مشخص تکثیر شد. غلظت مواد مورد استفاده در PCR ژن *nuc* در جدول ۲ به نمایش در آمده است. تکثیر ژن، توسط ترموسایکر Kyratec کشور کره و مطابق با برنامه دمایی، زمانی جدول ۱ در ۳۵ چرخه انجام شد. از سویه‌ی مرجع، *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

Table 1. PCR reaction conditions used for *nuc* gene amplification to identify *Staphylococcus aureus* isolates.

Step	Temperature (ºC)	Time (min)	Cycle No.
Initial denaturation	94	5	
Denaturation	94	45	
Annealing	58	45	**35**
Extension	72	48	
Final extension	72	5	

Table 2. Different volumes of ingredients used in *nuc* gene PCR to identify *Staphylococcus aureus* isolates

Ingredients	Initial concentration	Volume (µl)
DNA template	-	**2**
Upstream primer	10 Pmol/µl	**1**
Downstream primer	10 Pmol/µl	**1**
PCR master mix	2 X	**12.5**
Double distilled water	-	**8.5**
-	-	**25**

۱۰-۲-الکتروفورز محصولات PCR

پس از انجام PCR و تکثیر ژن‌ها، از روش الکتروفورز برای تعیین وزن مولکولی و جداسازی مولکول‌های باردار DNA استفاده گردید. در ابتدا، میزان ۰/۸ گرم از پودر آگارز با ۶۰ میلی‌لیتر از محلول TBE 1x مخلوط و حرارت داده شد تا پودر آگارز به‌طور کامل حل گردید و محلول شفافی به‌دست آمد. پس‌از خنک شدن محلول و رسیدن دمای آن به‌حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به‌میزان ۳ میکرولیتر رنگ گرین ویور به مخلوط اضافه گردید. سپس، مخلوط به‌درون سینی مخصوص ژل الکتروفورز ریخته شد و شانه‌های چاهک بر روی ژل قرار گرفتند. پس‌از سفت‌شدن ژل، شانه‌ها برداشته و ژل درون تانک الکتروفورز که از پیش با محلول بافری TBE پر شده بود، قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، ۳ میکرولیتر از محصول PCR به‌همراه ۱ میکرولیتر از لودینگ بافر ترکیب و توسط سمپلر در چاهک‌های ژل ریخته شد و به چاهک وسط ستون نیز ۳ میکرولیتر از DNA Ladder Size marker اضافه گردید. سپس، درب تانک را گذاشته و سیم‌های رابط تانک به Power supply وصل شد. ولتاژ بر روی ۷۵ ولت و مدت‌زمان ۶۰ دقیقه تنظیم شد. به‌منظور ردیابی محصولات PCR بر روی ژل، پس‌از اتمام مدت‌زمان الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel documentation system قرار داده شد و تصویربرداری از ژل انجام گرفت [۱۶،۱].

۱۱-۲-ردیابی سریع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های غذایی همبرگر و گوشت لقمه با پرایمر اختصاصی *nuc*

در این مطالعه شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس ژن شناسایی *nuc* و با استفاده از روش PCR انجام گرفت. بدین‌منظور، ۱۰ از نمونه‌ی همبرگر همگن‌شده با استفاده از یک پنس استریل به ۹۰ میلی‌لیتر از محیط کشت BHI براث اضافه گردید. پس‌از همگن‌سازی به‌وسیله‌ی شیکر، نمونه در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه در با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس‌از دور ریختن سوپرناتانت، رسوب با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، مخلوط با سرعت ۳۳۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت توسط سمپلر به میکروتیوب منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس‌از استخراج مستقیم نمونه‌های غذایی به‌روش جوشاندن، مطابق

جدول ۲ مواد مورد نیاز برای PCR در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری آماده گردید. پس از اتمام کار PCR، نمونه‌ها از دستگاه ترموسایکلر خارج شده و بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد سنجیده شد [۱۵].

۲-۱۲-سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن

به‌منظور ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (آزمون آنتی‌بیوگرام) تک‌کلنی‌های تأیید شده‌ی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر ۷ آنتی‌بیوتیک مختلف از روش دیسک دیفیوژن بر سطح محیط‌کشت مولر-هینتون آگار استفاده شد [۲]. در جدول ۳ انواع دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده و غلظت‌های آن‌ها نشان داده شده است. مراحل انجام آزمون آنتی‌بیوگرام بدین صورت است که پس‌از تنظیم pH محیط‌کشت مولر-هینتون آگار در محدوده‌ی ۷/۴-۲/۷، برای کنترل آلودگی پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. در مرحله‌ی بعد، ظروف حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد (نگهداری کوتاه‌مدت) برداشته شدند و در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق رسیدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی استاندارد، از کشت شبانه‌ی باکتری استفاده شد. میزانی از کلنی به لوله حاوی ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل و پس از مخلوط شدن، کدورت سوسپانسیون میکروبی ایجاد شده با کدورت لوله‌ی ۰/۵ مک‌فارلند مطابقت داده شد. با استفاده از سوآب استریل از سوسپانسیون تهیه‌شده بر سطح محیط‌کشت مولر-هینتون آگار کشت یکنواخت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به فاصله‌ی ۲٤ میلی‌متر از مرکز هر دیسک و ۱۰ میلی‌متر از جدار پلیت بر سطح محیط‌کشت قرار گرفتند. پس از گذشت ۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از خط‌کش هاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شد و با جدول استاندارد مقایسه گردید. برای هریک از ایزوله‌ها آزمون دیسک دیفیوژن انجام گرفت.

Table 3. The antibiotic discs used for antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates

Antibiotic disc	Abbreviation	Antibiotic concentration (µg)
Gentamicin	GM	10
Oxacillin	OX	1
Tetracycline	TE	30
Clindamycin	CC	2
Chloramphenicol	C	30
Trimethoprim	TMP	5
Erythromycin	E	15

۲-۱۳-ردیابی ژن‌های مولد انتروتوکسین در ایزوله‌ها با استفاده از روش PCR

در ادامه‌ی مراحل تحقیق به‌منظور شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش PCR استفاده شد. ژن‌های مولد انتروتوکسین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از ترموسایکلر و مطابق با برنامه‌ی زمانی و دمایی مشخص تکثیر شدند. ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل *sea*، *seb*، *sec*، *see* و *sed* (جدول ٤) بودند.

Table 4. Characteristics of specific primers used in PCR reaction

Target gene	PCR product length (bp)	Oligonucleotide sequence (5´-3´)
nuc	279	GCGATTGATGGTGATACGGTT
sea	127	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
seb	477	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG
sec	451	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC
sed	278	TCGCATCAAACTGACAAACG
see	209	AGGTACTCTATAAGTGCCTGCCT

۲-۱۴-سنتز پرایمرهای اختصاصی

ابتدا توالی ژن‌های *sea*، *seb*، *sec*، *see* و *sed* از پایگاه داده‌ی مرکز ملی اطلاعات زیست‌فنّاوری (NCBI) به‌دست آمد و پرایمرهای مناسب برای اتصال و شناسایی ژن‌های موردنظر انتخاب شدند. سپس، به‌منظور بررسی اختصاصی بودن و همپوشانی توالی‌های موردنظر، پرایمرها در پایگاه داده‌ی NCBI بلاست شدند. برای سنتز پرایمرها، توالی‌های مورد نظر به شرکت سیناکلون ارسال گردید. در جدول ٤ ویژگی‌های پرایمرهای مورداستفاده در PCR نشان داده شده است. پرایمرهای سنتزی به‌صورت پودر لیوفیلیزه دریافت شدند و در شرایط استریل مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده با آب مقطر به‌حالت محلول درآمدند. پس از آن، محلول‌های تهیه‌شده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شدند.

۲-۱۵- بهینه‌سازی روش PCR برای ردیابی ژن‌های کدکننده‌ی اگزوتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

بدین‌منظور از مسترمیکس رنگی شرکت سیناکلون استفاده شد. آزمایشات چندین بار در کنار نمونه‌های کنترل مثبت و منفی تکرار شدند تا بهترین شرایط برای PCR هر ژن به‌دست آید. مواد واکنش در میکروتیوب در شرایط استریل و در ظرف آب و یخ مطابق با جدول ۵ اضافه شدند. شرایط دمایی زمانی PCR به کار برده‌شده برای تکثیر ژن‌های *sea*، *seb*، *sec*، *sed* و *see* در جدول ٦ ارائه شده است.

Table 5. Different volumes of ingredients used in the amplification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates

Ingredients	Initial concentration	Volume (µl)
DNA template	-	2
Upstream primer	10 Pmol/µl	1
Downstream primer	10 Pmol/µl	1
PCR master mix	2 X	12.5
Double distilled water	-	8.5
-	-	25

Table 6. PCR reaction conditions used for *sea, seb, sec and sed* and *see* genes amplification to identify *Staphylococcus aureus* isolates.

***Sea* gene**			
Step	Temperature (ºC)	Time (min)	Cycle No.
Initial denaturation	94	4	35
Denaturation	94	1	
Annealing	53	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	10	
***Seb*gene**			
Step	Temperature (ºC)	Time (min)	Cycle No.
Initial denaturation	94	4	35
Denaturation	94	1	
Annealing	55	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	
***Sec*gene**			
Step	Temperature (ºC)	Time (min)	Cycle No.
Initial denaturation	94	4	35
Denaturation	94	1	
Annealing	51	1	

Extension	72	1	
Final extension	72	5	
***sed* and *see* genes**			
Step	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle No.
Initial denaturation	94	4	35
Denaturation	94	1	
Annealing	50	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	10	

۲-۱۶-توالی‌یابی ژن *sea*

به‌منظور تأیید ژن *sea* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، محصولات PCR دو ایزوله با استفاده از پرایمرهای مورد نظر در آزمایشگاه جهاد دانشگاهی مشهد با روش سانگر توالی‌یابی شدند و سپس، توسط نرم‌افزار Snap Gene V5.3.1 بررسی شدند. توالی‌ها با اطلاعات نوکلئوتیدی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* توالی‌یابی‌شده براساس ژن *sea* که در سایت NCBI در دسترس است، مقایسه و بلاست شدند. به‌علاوه، در این مطالعه محصولات PCR دو ایزوله که دارای ژن کدکننده‌ی انتروتوکسین A بودند، نیز بلاست شدند.

۲-۱۷-تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش به‌منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، روش دیسک دیفیوژن سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد محاسبه گردید. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. به‌منظور تحلیل توالی‌یابی نیز از NCBI استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-فراوانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از نمونه‌های غذایی

نتایج آزمون‌های میکروبی (کشت بر سطح محیط‌کشت‌های نوترینت آگار، برد-پارکر آگار و غیره) و بیوشیمیایی (آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، تست دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase)، کوآگولاز و توانایی تخمیر مانیتول) انجام‌شده بر نمونه‌ها نشان داد که از ۱۷۵ نمونه، ۲۸ نمونه‌ی همبرگر (۱۶ درصد)، ۱۲ نمونه‌ی کباب لقمه (۷ درصد) و ۱۵ نمونه‌ی همبرگر دستی (حدود ۹ درصد) به باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند که در مجموع ۵۵ نمونه (۳۲ درصد) از فراورده آلوده *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند. آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در برخی فراورده‌های غذایی نظیر فراورده‌های لبنی، گوشتی و شیرینی‌های خامه‌ای سنّتی گزارش شده است. بالاترین درصد آلودگی در نمونه‌های کباب (۶۱/۵ درصد)، همبرگر (۴۷/۳ درصد) و بستنی (۳۳/۸ درصد) مشاهده شد [۱۷]. در مطالعه‌ی دیگری، ۳۸۷ نمونه‌ی غذایی به‌طور تصادفی از مناطق مختلف بغداد جمع‌آوری گردید. بررسی‌های مورفولوژیکی و آزمون‌های میکروبی انجام‌شده بر نمونه‌ها سبب شناسایی ۱۱۲ ایزوله‌ی استافیلوکوکی شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و تشخیص مولکولی نشان داد که در میان سویه‌های جداسازی‌شده، تنها ۴۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. بالاترین میزان فراوانی این ایزوله‌ها در نمونه‌های موادغذایی آماده‌ی مصرف (RTE) یا موادغذایی پخته شده (۴۲/۸ درصد)، سالاد و پیش‌غذاها (۲۴/۵ درصد)، فراورده‌های گوشتی (۱۴/۳ درصد)، فراورده‌های لبنی (۱۰/۲ درصد) و کیک‌ها (۸/۲ درصد) یافت شد. درحالی‌که، هیچ‌یک از فراورده‌های گوشت مرغ آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* نبودند [۱].

۳-۲-نتایج آزمون‌های تشخیصی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مورداستفاده جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس*

به‌منظور تأیید گونه‌ی مورد بررسی، آزمون‌هایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ذیل انجام گرفت:

۱-۲-۳-نتایج کشت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر سطح محیط‌کشت‌های نوترینت آگار و برد-پارکر آگار و رنگ‌آمیزی گرم

ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوکسی گرم مثبت، بر سطح محیط‌کشت نوترینت آگار کلنی‌های دایره‌ای شکل به‌رنگ زرد طلایی (شکل ۱-a) و بر سطح محیط‌کشت برد پارکر آگار به‌صورت کلنی‌های سیاه یا خاکستری رنگ براق و محدّب با هاله‌ی شفاف (شکل ۲-b) مشاهده شد. همچنین در آزمون رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌صورت کوکسی‌های خوشه‌ای گرم مثبت شناسایی شدند (شکل ۱-c).

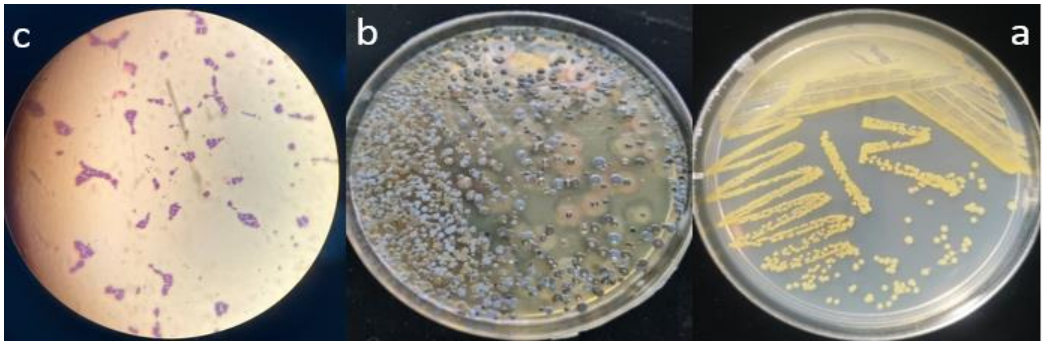

Figure 1. *Staphylococcus aureus* colonies on nutrient (a) and Baird-Parker (b) agar culture medium and gram staining of one of the isolates of *Staphylococcus aureus* (gram-positive, magnification × 100) (c).

۳-۲-۲-تست‌های بیوشیمیایی

در این قسمت آزمون کاتالاز، تست دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase)، آزمون کوآگولاز و توانایی تخمیر مانیتول بررسی شد. یکی از موارد استفاده از آزمون کاتالاز، جداسازی استافیلوکوکوس‌ها (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوکوس‌ها (کاتالاز منفی) است. پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه، H_2O_2) یکی از محصولات نهایی متابولیسم اکسیداتیو باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند که تجمع آن در سلول باکتری، سبب از بین رفتن آن می‌شود. با این‌حال، آنزیم کاتالاز باکتریایی، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. انجام این آزمون با تشکیل حباب‌های گاز اکسیژن همراه بود که نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن آزمون کاتالاز می‌باشد. تمام ایزوله‌های استافیلوکوکی در این تحقیق کاتالاز مثبت بودند (شکل ۲-$a_{1,2}$). تست دئوکسی ریبونوکلئاز (DNase) به‌منظور تعیین توانایی میکروارگانیسم در هیدرولیز DNA و استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی مورد نیاز برای رشد و تکثیر خود، است. اغلب برای تمایز *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر گونه‌های استافیلوکوکی، تست DNase انجام می‌شود. تشکیل هاله‌ی شفاف در اطراف خط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* رشدیافته بر سطح محیط‌کشت تست DNase آگار، حضور آنزیم DNase را تأیید می‌کند. لازم به ذکر است تمامی ایزوله‌ها مثبت بودند (شکل ۲-$b_{1,2}$). آزمون کوآگولاز نیز به‌منظور ایجاد تمایز میان *استافیلوکوکوس اورئوس* (باکتری کوآگولاز مثبت) از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی استفاده می‌گردد. کوآگولاز آنزیم پروتئینی تولیدشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* است که در نتیجه‌ی فعالیت خود، فیبرینوژن (محلول) موجود در پلاسما را به فیبرین (نامحلول) تبدیل می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون، کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* را تأیید کرد (شکل ۲-$c_{1,2}$). همچنین باید گفت *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تخمیر قند مانیتول است و در هنگام رشد بر سطح محیط‌کشت مانیتول سالت آگار (MSA)، کلنی‌های زردرنگ تشکیل می‌دهد. بسیاری از گونه‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی و میکروکوکوس‌ها که قادر به تخمیر مانیتول نیستند، بر سطح محیط‌کشت MSA به‌صورت کلنی‌های کوچک قرمزرنگ مشاهده می‌شوند (شکل ۲-$d_{1,2}$).

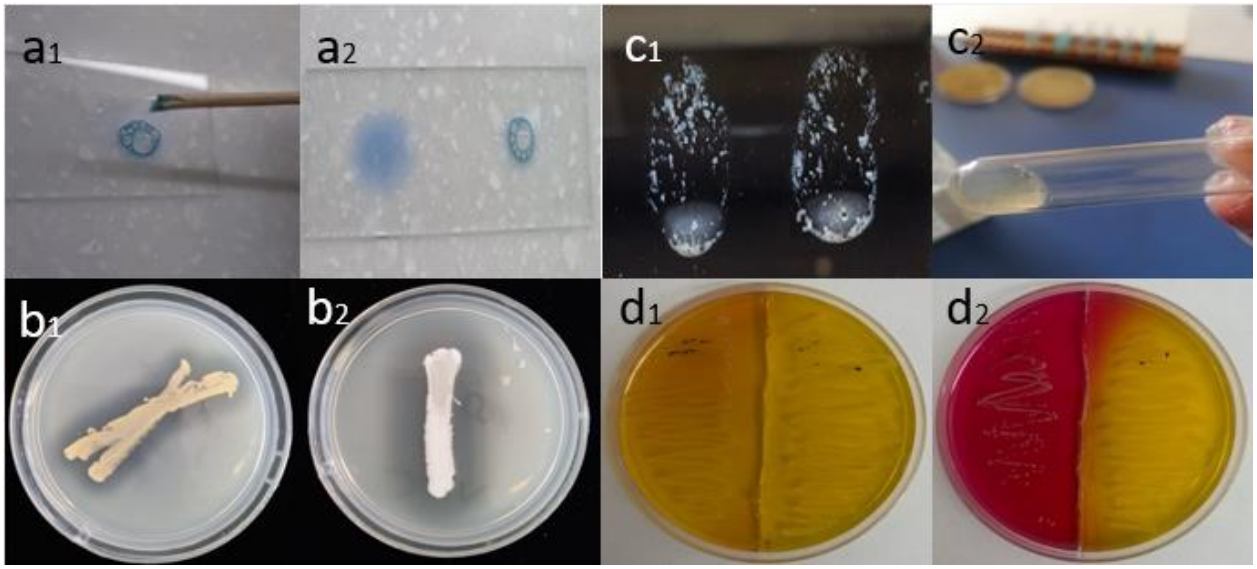

Figure 2. In the catalase test, the bubbles resulting from production of oxygen gas clearly indicate a catalase positive result ($a_{1,2}$), In the deoxyribonuclease (DNase) test, if *Staphylococcus aureus* produce DNase enzymes, in sufficient quantity to hydrolyse the DNA, then clear zones are seen around the colonies ($b_{1,2}$), The coagulase test distinguishes *Staphylococcus aureus* from other staphylococci, c_1: The slide test, c_2: The tube test and On mannitol salt agar (MSA), only pathogenic *Staphylococcus aureus* produces small colonies surrounded by yellow zones, while other coagulase-negative staphylococci produce small pink or red colonies with no colour change to the medium ($d_{1,2}$).

۳-۲-۳- نتایج شمارش کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

مطابق استاندارد ٦٨٠٦-١، تعداد کلنی‌هایی که در پلیت حاوی کشت ۱۰ گرم ماده‌ی غذایی، در محدوده‌ی ۱ تا ۱۰۰۰ قرار داشت، +۱ درنظر گرفته شد [۱۸]. انواعی که از 10^3 تا 10^4 متغیر بودند +۲ و انواعی که دارای مقادیری بیش از 10^4 بودند +۳ گزارش شدند. در میان ۵۵ ایزوله‌ی تأیید هویت‌شده در مطالعه‌ی حاضر ٤٤ ایزوله +۳، ٦ ایزوله +۲ و ۵ ایزوله +۱ گزارش شد (جدول ۷).

Table 7. The results of counting *Staphylococcus aureus* colonies

Colony No.	Isolate No.
1+	**5**
2+	**6**
3+	**44**

۳-۳-نتایج ارزیابی کمّیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نانودراپ

در جدول ۸، نتایج کمی به‌دست‌آمده از دستگاه طیف‌سنج نانودراپ برخی از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌نمایش درآمده است.

Table 8. Quantitative estimation of DNA concentration by Nanodrop Spectrophotometer

Position	260 (nm, raw)	280 (nm, raw)	320 (nm, raw)	260 (nm)	280 (nm)	260/280	µg/µL
A3	0.58	0.055	0.047	0.002	0.003	0.594	**0.002**
B2	0.067	0.055	0.045	0.013	0.006	2.339	**0.013**
B3	0.073	0.065	0.055	0.010	0.005	1.827	**0.010**
C2	0.091	0.078	0.062	0.020	0.011	1.789	**0.020**
C3	0.079	0.070	0.055	0.014	0.010	1.469	**0.014**
D2	0.132	0.111	0.087	0.036	0.019	1.900	**0.036**

D3	0.083	0.079	0.073	0.00	0.001	0.571	**0.00**

٤-٣- نتایج شناسایی تأییدی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از پرایمر اختصاصی *nuc*

برای انجام این آزمون از مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp) استفاده شد. محصول PCR ژن کدکننده‌ی نوکلئاز مقاوم به حرارت (*nuc*)، قطعه‌ای به‌طول ۲۷۹ bp بود. دمای بهینه برای PCR این پرایمر پس از چندین بار تکرار با دماهای ٦٠-٥٩-٥٨-٥٧-٥٦ درجه سانتی‌گراد به‌روش گرادیانت در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. ۱۷۵ نمونه‌ی غذایی مورد آزمایش، ژن *nuc* در ۵۵ فراورده‌ی گوشتی (۲۸ نمونه‌ی همبرگر، ۱۲ نمونه‌ی کباب لقمه و ۱۵ نمونه همبرگر دستی، ۳۱/۵ درصد از کل نمونه‌ها)، شناسایی گردید (شکل ۳).

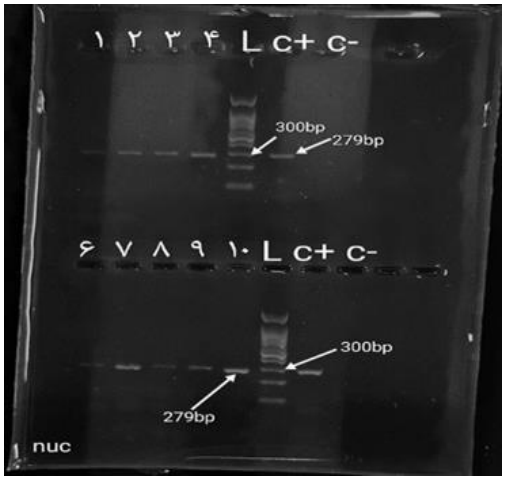

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR product using primers for detection of the *nuc* gene of *Staphylococcus aureus*. L: Ladder, C^+: Positive control, C^-: Negative control

٥-٣-ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*

در جدول ۹، نتایج آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۵۵ سویه) جداسازی‌شده از نمونه‌های همبرگر و کباب لقمه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ارائه شده است. همچنین براساس نتایج مشخص شد بیشترین میزان حساسیت ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کمترین آن در برابر هر دو آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و کلیندامایسین بود. مطابق یافته‌های این پژوهش، ۵۲ ایزوله‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* (٩٤/٥ درصد) مقاومت پایینی در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشتند و تنها یک ایزوله (۱/۸ درصد) نیمه‌حساس و ۲ ایزوله (٣/٦ درصد) مقاوم بودند. در میان ۵۵ ایزوله‌ی مورد بررسی، ۳۷ ایزوله (۵۷ درصد) در برابر فعالیت مهارکنندگی اگزاسیلین مقاوم بودند. به‌علاوه، ٤٠ ایزوله‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۷۲ درصد) مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکین و کلیندامایسین داشتند. دررابطه با اثر آنتی‌بیوتیکی کلرامفنیکل می‌توان گفت که ۳۷ ایزوله (٦٧/٢ درصد) حساس و ۱۸ ایزوله‌ی دیگر (۳۲/۸ درصد) مقاوم بودند. تنها ۱۳ ایزوله (۲۳/۷ درصد) در برابر فعالیت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم مقاومت نشان دادند. بررسی اثر آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بر ایزوله‌ها نیز مشخص ساخت که ١٤ ایزوله (٢٥/٤ درصد) حساس، ۲ ایزوله (٣/٦ درصد) نیمه‌حساس و ۳۹ ایزوله (۷۰/۹ درصد) مقاوم بودند (شکل ٤). مقاومت مشاهده‌شده در برابر سه نوع یا بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان مقاومت چندداروی (MDR) تعریف می‌شود. می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که در میان تمامی ایزوله‌ها، ٤٠ ایزوله (۷۲ درصد) در برابر هر دو آنتی‌بیوتیک تتراسایکین و کلیندامایسین مقاومت نشان دادند. به‌علاوه، ۳۹ ایزوله (۷۰/۹ درصد) در برابر

اریترومایسین مقاوم بودند و به‌همین‌ترتیب ۳۷ ایزوله (۵۷ درصد) در برابر آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین مقاومت نشان دادند. در مطالعه‌ی مشابهی، فراوانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تولید انتروتوکسین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از خرده‌فروشی‌های گوشت گاو، گوسفند و بره در ترکیه بررسی شد. براساس یافته‌های این پژوهش مشخص شد از نمونه‌های غربال‌شده، فراوانی کلی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۱/۲۳ درصد بود. به‌علاوه، در ٦٥/٦٢ درصد از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مناطق ژنی SE شناسایی شد. فراوان‌ترین SEs در جدایه‌های مورد آزمایش شامل *sea* (۵۰/۷۹ درصد) ، *sed* (۲۵/۳۹ درصد) و *seb* (۲۳/۸۰ درصد) بود. با این‌حال، هیچ‌یک از ژن‌های *sec*، *see*، *seg*، *seh*، *sei* و *sej* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی نشدند. بسیاری از جدایه‌های استافیلوکوکی (۱۰۰-٤۰ درصد) در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کاناماسین، تلیترومایسین، پنی‌سیلین G، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلوکساسیلین، آمپی‌سیلین، پریستیناماسین، اسید نالیدیکسیک، آزیترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند و مقاومت چنددارویی (MDR) در ۹٦/۸۷ درصد از جدایه‌ها مشاهده شد [۲].

Table 9. Results of the antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the disk diffusion method

Antibiotic	Isolate No. (%)		
	Susceptibility (S)	Moderate susceptibility (MS)	**Resistance (R)**
Gentamicin	52 (94.5)	1 (1.8)	**2 (3.6)**
Oxacillin	18 (33)	0	**37 (57)**
Tetracycline	15 (27.2)	0	**40 (72)**
Clindamycin	14 (25.4)	1 (1.8)	**40 (72)**
Chloramphenicol	37 (67.2)	0	**18 (32.8)**
Trimethoprim	36 (65.4)	6 (10.9)	**13 (23.7)**
Erythromycin	14 (25.4)	2 (3.6)	**39 (70.9)**

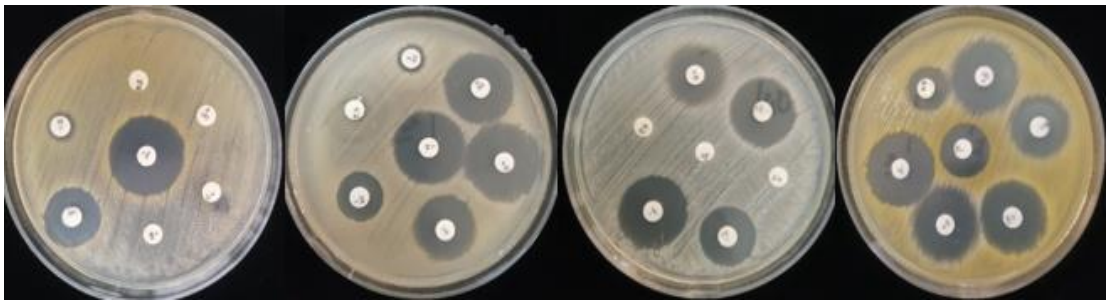

Figure 4. Antibiogram test results of some *Staphylococcus aureus* isolates

٦-۳-نتایج ردیابی سریع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های غذایی همبرگر و گوشت لقمه با استفاده از پرایمر اختصاصی *nuc*

پنج نمونه‌ی غذایی که در کشت، شمارش کلنی آن‌ها ۳+ و ٤+ بود، به‌صورت مستقیم استخراج و PCR شد. شکل ٤، نتیجه‌ی الکتروفورز محصولات PCR ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با ژن شناسایی *nuc* به‌صورت استخراج مستقیم در ۵ نمونه‌ی غذایی (۲ نمونه‌ی همبرگر، ۲ نمونه‌ی کباب لقمه و ۱ نمونه‌ی همبرگر دستی) است.

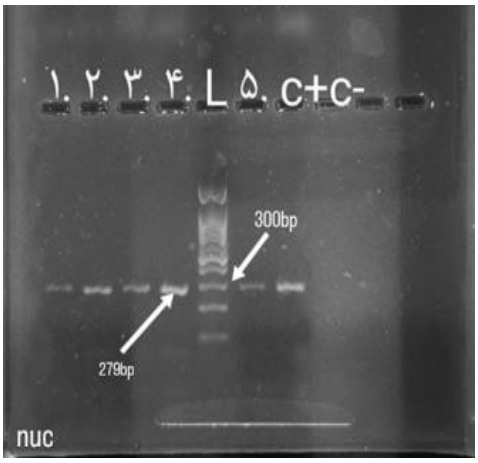

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of PCR product using primers for detection of the *nuc* gene of *Staphylococcus aureus* by direct extraction. L: Ladder, C^+: Positive control, C^-: Negative control

۳-۷- نتایج ردیابی ژن‌های *seb* و *sed* و ژن *sea*، *sec* و *see* با استفاده از روش PCR

در هیچ‌یک از نمونه‌های غذایی مورد مطالعه، ژن‌های کدکننده‌ی *seb* و *sed* یافت نشد. از ۵۵ ایزوله جداسازی‌شده از نمونه‌های غذایی در ٤٥ نمونه از فراورده‌های گوشتی آزمایش‌شده (۲۵/۷۱ درصد از کل نمونه‌های جمع‌آوری شده)، حضور ژن *sea* تشخیص داده شد.محصولات PCR ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت ردیابی ژن کدکننده‌ی *sea* قطعه‌ای به‌طول ۱۲۷ bp بود (شکل ۵-a). برای مقایسه وزن مولکولی و تشخیص دقیق ژن‌ها از DNA Ladder استفاده شد. همچنین براساس یافته‌های این پژوهش مشخص شد از ۵۵ ایزوله جداسازی‌شده از نمونه‌های غذایی ژن *sec* در ٤ ایزوله‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲/۲۸ درصد از کل نمونه‌های جمع‌آوری شده) شناسایی گردید. طول محصولات PCR ژن *sec* برابر با ٤٥١ bp مشاهده شد (شکل ۵-b). محصولات PCR ژن *see* در ناحیه‌ی ۲۰۹ bp تشکیل باند داد. از ۵۵ ایزوله جداسازی‌شده از نمونه‌های غذایی، در ٦ ایزوله‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* (٤/۰۸ درصد از کل نمونه‌های جمع‌آوری‌شده) حضور ژن *see* تشخیص داده شد (شکل ۵-c).

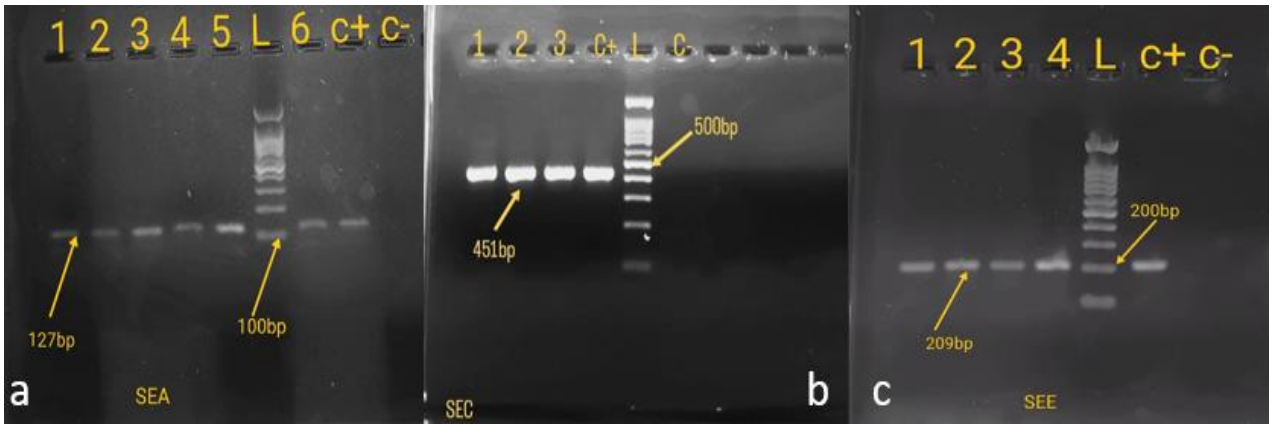

Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR product using primers for detection of the *sea* (a), *sec* (b) *and see* (c) genes of *Staphylococcus aureus*. L: Ladder, C^+: Positive control, C^-: Negative control

۳-۱۱- شناسایی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌وسیله‌ی توالی‌یابی ژن *16S rRNA*

نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز بلاست SEA-D4 و SEA-A4 نشان داد توالی‌ها با بیش از ۹۸ درصد تطابق با نتایج هم‌پوشانی داشتند. سپس نتایج به GeneBank وارد شد و در این پایگاه داده، نام ژن، نام پروتئین و توالی آن‌ها مشخص نمود که توالی سکانس‌شده‌ی انتروتوکسین A بود. به‌منظور اطمینان، توالی پروتئینی در NCBI protein blast وارد شد و

مجدد نتیجه‌ی بلاست با ۱۰۰ درصد تطابق نشان داد که توالی مربوط به انتروتوکسین A بود. در تمامی آنالیزهای بلاست، تنها نتایج مربوط به ژن انتروتوکسین A نمایش داده شد و هیچ‌گونه نتیجه‌ی دیگری مبنی بر مشابهت با سایر پروتئین‌ها مشاهده نگردید. در پژوهش مشابهی، DNA ژنومی با موفقیت از جدایه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* بدون برش DNA یا ناخالصی خالص شدند. یافته‌های این بررسی نشان داد که ژن‌های *16S rDNA* جدایه‌های مختلف با اندازه‌ی حدود ۱۵۲۵ bp با موفقیت تکثیر شدند. داده‌های توالی 16S rDNA به‌دست‌آمده از پایگاه داده‌ی GeneBank تأیید کرد که تمامی سویه‌های جداسازی‌شده (۱۰۰ درصد) به‌عنوان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند و شباهت آنالیز بلاست در محدوده‌ی ۹۹–۹۶ درصد بود [۱۹]. همچنین در پژوهش حاضر برای اطمینان توالی پروتئینی به NCBI protein blast انتقال یافت و مجددا نتیجه‌ی بلاست با ۱۰۰ درصد تطابق نشان داد که توالی مربوط به انتروتوکسین A بود. درنتیجه، تمامی نتایج به‌دست‌آمده از بلاست تنها مربوط به ژن انتروتوکسین A بود و هیچ‌گونه نتیجه‌ی دیگری مبنی بر مشابهت با سایر پروتئین‌ها مشاهده نشد.

همچنین براساس نتایج مشاهده شده پیک‌هایی با رنگ مشکی برای نوکلئوتید G، با رنگ آبی برای نوکلئوتید C، با رنگ قرمز برای نوکلئوتید T و با رنگ سبز برای نوکلئوتید A بود. در بلاست ایزوله‌های SEA-A4 و SEA-D4 تنها در سه نوکلئوتید عدم تطابق مشاهده شد که با رنگ آبی، زرد و قرمز مشخص شده است. همچنین در دو ناحیه نوکلئوتید A و G و در توالی دیگر نوکلئوتید T و C قرار گرفته بود (جدول ۱۰).

Table 10. Sequence of SEA-A4 and SEA-D4 isolates

Sequence SEA-A4	CCATAATAAGCACCATACAAGTCTACTTTTTTCCCTTTATATTTATCAACAA TATCCTTTGAATCAAAATCTACTAATAAATCGTTATACCACGGATGACCTG TGAAAAA
Gen Bank: CP053353.1 staphylococcal enterotoxin type A	CCATAATAAGCACCATACAAGTCTACTTTTTTCCCTTTATATTTATCAACAA TATCCTTTGAATCAAAATCTACTAATAAATCGTTATACCACGAATGATCTG TAAAAAA
Sequence SEA-D4	TGATAACCATAATAAGCACCATACAAGTCTACTTTTTTCCCTTTATATTTAT CAACAATATCCTTTGAATCAAAATCTACTAATAAATCGTTATACCACGGAT GACCTGTGAAAA
Gen Bank: CP053639.1 staphylococcal enterotoxin type A	TGATAACCATAATAAGCACCATACAAGTCTACTTTTTTCCCTTTATATTTAT CAACAATATCCTTTGAATCAAAATCTACTAATAAATCGTTATACCACGAAT GATCTGTAAAAA

٤-نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که از ۱۷۵ فراورده‌ی گوشتی آزمایش‌شده، ۲۸ نمونه‌ی همبرگر (١٦ درصد)، ۱۲ نمونه‌ی کباب لقمه (۷ درصد) و ۱۵ نمونه‌ی همبرگر دستی (۹ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. ژن *nuc* در ۵۵ فراورده‌ی گوشتی (۲۸ نمونه‌ی همبرگر، ۱۲ نمونه‌ی کباب لقمه و ۱۵ نمونه‌ی همبرگر دستی و در کل ۳۱/۵ درصد نمونه‌ها)، شناسایی شد. در ٤٥ نمونه از فراورده‌های گوشتی آزمایش‌شده (۸/۸۱ درصد) نیز حضور ژن *sea*، تشخیص داده شد. ژن‌های *sec* و *see* به‌ترتیب در ٤ (۲/۷ درصد) و ٦ (۱۱ درصد) نمونه‌ی غذایی یافت شدند. به‌علاوه، در هیچ‌یک از نمونه‌های غذایی موردآزمایش، ژن‌های کدکننده‌ی *seb* و *sed* وجود نداشت. همچنین نتایج به‌دست‌آمده از آنالیزهای بلاست SEA-F و SEA-R مشخص نمود که توالی‌ها دارای بیش از ۹۸ درصد تطابق با نتایج هم‌پوشانی بودند. به‌علاوه، نتایج به‌دست‌آمده از توالی پروتئینی در NCBI protein blast، نتیجه‌ی بلاست با ۱۰۰ درصد تطابق نشان داد که توالی مربوط به انتروتوکسین A بود. علاوه بر این، نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام مشخص ساخت که بسیاری از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد

استفاده مقاومت داشتند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان گفت حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* با عوامل ژنتیکی تولید نوکلئاز مقاوم به حرارت و انتروتوکسین‌ها، بایستی به‌عنوان یک عامل خطر بالقوه برای ایمنی موادغذایی در نظر گرفته شود.

۵- منابع

[1] Jassim, S. A. and Kandala, N. J. (2021). Molecular detection of enterotoxin genes of multiresistant *Staphylococcus aureus* isolates from different sources of food. *Iraqi Journal of Science*, 30: 61-74.

[2] Şanlıbaba, P. (2022). Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, *361*, 109461.

[3] Sundararaj, N., Kalagatur, N. K., Mudili, V., Krishna, K., & Antonysamy, M. (2019). Isolation and identification of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates from Indian food samples: evaluation of in-house developed aptamer linked sandwich ELISA (ALISA) method. *Journal of Food Science and Technology*, *56*, 1016-1026

[4] Haghi, F., Zeighami, H., Hajiloo, Z., Torabi, N., & Derakhshan, S. (2021). High frequency of enterotoxin encoding genes of *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples. *Journal of Health, Population and Nutrition*, *40*(1), 1-6.

[5] Komodromos, D., Kotzamanidis, C., Giantzi, V., Pappa, S., Papa, A., Zdragas, A., ... & Sergelidis, D. (2022). Prevalence, infectious characteristics and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in two raw-meat processing establishments in Northern Greece. *Pathogens*, *11*(11), 1370.

[6] Mohamed, E., Ramadan, H., Abd-Elghany, S., & Mahros, M. (2021). Isolation and characterization of enterotoxigenic coagulase-positive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contaminating beef burger and hot dog sandwiches retailed in Mansoura city. *Mansoura Veterinary Medical Journal*, *22*(1), 20-24.

[7] Savariraj, W. R., Ravindran, N. B., Kannan, P., & Rao, V. A. (2021). Occurrence and enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken meat. *Food Science and Technology International*, *27*(7), 619-625.

[8] Abolghait, S. K., Fathi, A. G., Youssef, F. M., & Algammal, A. M. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in non-refrigerated raw chicken livers. *International Journal of Food Microbiology*, *328*, 108669.

[9] Dhengesu, D., Lemma, H., Asefa, L., & Tilahun, D. (2022). Antimicrobial resistance profile of enterobacteriaceae and drinking water quality among households in Bule Hora Town, South Ethiopia. *Risk Management and Healthcare Policy*, 1569-1580.

[10] Ghaffar, N., Javad, S., Farrukh, M. A., Shah, A. A., Gatasheh, M. K., Al-Munqedhi, B. M., & Chaudhry, O. (2022). Metal nanoparticles assisted revival of Streptomycin against MDRS *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, *17*(3), e0264588.

[11] Iranian National Standard Test Method, No. 2304. (1991). Frozen raw hamburger, test characteristics and methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran.

[12] Bano, S. A., Hayat, M., Samreen, T., Asif, M., Habiba, U., & Uzair, B. (2020). Detection of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. from raw milk samples of different cities of Pakistan. *Natural Science*, *12*(05), 295.

[13] Dimitrakopoulou, M. E., Stavrou, V., Kotsalou, C., & Vantarakis, A. (2020). Boiling extraction method vs commercial kits for bacterial DNA isolation from food samples. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, *3*(4), 311-319.

[14] Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. *Analytica*, *3*(3), 371-384.

[15] Hassan, M. A., Amin, R. A., Eleiwa, N. Z., & Gaafar, H. W. (2018). Detection of *Staphylococcus aureus* in some meat products using PCR technique. *Benha Veterinary Medical Journal*, *34*(1), 392-403.

[16] Özdemir, F. (2022). Antimicrobial resistance, multilocus sequence, and *spa* typing of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw meat products. *BioMed Research International*.

[17] Mahfoozi, A., Shirzad-Aski, H., Kaboosi, H., & Ghaemi, E. A. (2019). Identification of the classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* in

various foods by multiplex PCR assay. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *20*(3), 209.

[18] Iranian Institute of Standards and Industrial Research, No. 6806-1. (2005). Microbiology of food and animal feed, counting of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) test method, Part 1: Method of using board culture medium, parker agar. Iranian National Standard.

[19] Abdulmanea, A. A., Alharbi, N. S., Somily, A. M., Khaled, J. M., & Algahtani, F. H. (2023). The prevalence of the virulence genes of *Staphylococcus aureus* in sickle cell disease patients at KSUMC, Riyadh, Saudi Arabia. *Antibiotics*, *12*(7), 1221.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of the prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in hamburgers and kebabs in Mashhad and the SE gene profile of the isolates

Shabnam Soltan Ahmady[1], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[1*], Maryam Tehranipour[1]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2024/3/5
Accepted:2024/4/15

Keywords:

Staphylococcus aureus,
Enterotoxin,
Antibiotic Resistance,
Kebab,
Hamburger.

DOI: 10.22034/FSCT.21.157.157.

*Corresponding Author E-
Mahboobe_nak@yahoo.com

ABSTRACT

The study aimed to investigate the frequency of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolates in hamburgers and meat bites in Mashhad and the frequency of the gene. In this practical descriptive research, the number of 175 meat samples including 70 hamburger samples, 70 kebab bite samples, and 35 handmade hamburger samples in a non-repetitive and cluster sampling method, from the brand various commercial products were collected from the supply centers in Mashhad from April to June 2023. After culturing the samples in a specific medium and isolating the isolates suspected *of Staphylococcus aureus*, the bacteria were identified using morphological and biochemical characteristics. Then they were confirmed by using a specific primer and polymerase chain reaction (PCR). Using PCR, the frequency of enterotoxin-producing genes was detected and the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates was checked by disc diffusion method in food samples. Among the 175 meat products tested, 28 hamburger samples (16%), 12 kebab samples (7%), and 15 handmade hamburger samples (about 9%) were pathogenic bacteria. were infected with *Staphylococcus aureus*. Compared to kebab samples, hamburger samples showed higher contamination, and more of them were reported as *Staphylococcus aureus* positive. *nuc* gene was detected in all bacteria identified by biochemical method. The presence of the sea gene was detected in 45 samples of tested meat products (25.71% of all samples). *sec* and see genes were found in 4 (2.28%) and 6 (4.08%) food samples, respectively. Genes encoding used and sed were not found in any of the studied samples. In addition, many isolates showed high resistance to tetracycline, clindamycin, and oxacillin; some were resistant to more than one antibiotic. In this study, the results obtained from the SEA-F and SEA-R blast analyses revealed that the sequences had more than 98% agreement with the overlapping results.