گزارش کوتاه
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، مهر ۱۳۹۸ ۷۲۸-۷۲۱

بررسی فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بستنی سنتی و دستگاهی عرضه شده در شهر قزوین در سال ۹۷-۱۳۹۶: یک گزارش کوتاه

حاتم ابراهیمی[۱]، رزاق محمودی[۲]، پیمان قجربیگی[۳]، سعید شهسواری[۴]، شقایق موسوی[۵]، نسیم بیگلری خوش مرام[۶]

دریافت مقاله: ۹۸/۱/۱۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۲/۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۵/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۸/۶/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در بستنی سنتی و دستگاهی عرضه شده در شهر قزوین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی، ۱۰۰ نمونه بستنی سنتی و دستگاهی عرضه شده در شهر قزوین به صورت نمونه‌گیری تصادفی طی یک‌سال و در فصول مختلف جمع‌آوری شدند. با استفاده از روش کشت و سپس با استفاده از تکنیک (polymerase Chain Reaction; PCR) ، مقاومت باکتری به متی سیلین تأیید شد.

یافته‌ها: میزان آلودگی به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در فصول مختلف در بستنی سنتی و دستگاهی ۵ درصد و بیش ترین آلودگی، در فصل تابستان بود. ۸۰ درصد (۴ مورد) از باکتری‌های جدا شده به متی‌سیلین مقاومت داشتند.

نتیجه‌گیری: آموزش استفاده از بستنی پاستوریزه و تهیه بستنی سنتی و دستگاهی به روش بهداشتی سبب کاهش مسمومیت غذایی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، بستنی سنتی، بستنی دستگاهی، PCR ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، قزوین

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار، مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران،
تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱، دور نگار: ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱، پست الکترونیکی: r.mahmodi@yahoo.com
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات ایمنی محصولات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴- مربی آمار زیستی مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵- دانشجوی Ph.D پزشکی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۶- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

مقدمه

به طور متوسط سالانه یک سوم از جمعیت کشورهای در حال توسعه به بیماری‌های منتقله از راه آب و مواد غذایی مبتلا می‌شوند که از این جمعیت به طور تقریبی ۱/۸ میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند. اکثر قربانیان این بیماری-ها کودکان می‌باشند. از آنجایی که شیر و فرآورده‌های آن از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت و عفونت‌های غذایی ناشی از غذا می‌باشند، بنابراین عاری بودن بستنی از عوامل بیماری‌زا ضرورت دارد [۱]. بستنی یک فرآورده غذایی است که مواد اولیه آن شیر، شکر، خامه و تخم مرغ بوده و به آن انواع چاشنی‌ها، مواد رنگی، میوه و مغزهای خوراکی اضافه می‌شود. چربی آن ۳-۲ برابر چربی شیر و پروتئین آن نیز کمی بیش‌تر است. از نظر میزان انرژی، یکی از عالی‌ترین منابع غذایی می‌باشد[۲]. بدون تردید بستنی یکی از محبوب‌ترین و پرطرفدارترین دسر مورد علاقه کودکان و بزرگسالان در فصل تابستان محسوب می‌شود [۳].

کیفیت میکروبی بستنی در طی فرآوری به چگونگی پاستوریزاسیون، آلودگی ثانویه ناشی از وسایل و لوازم کار آلوده و عدم ملاحظات بهداشتی کارگران واحدهای تولید کننده بستگی دارد [۴]. با توجه به تولید بستنی‌های سنتی از شیر غیر پاستوریزه ارزیابی آلودگی میکروبی این فرآورده مهم می‌باشد. برخی از مطالعات مسمومیت غذایی ناشی از آلودگی میکروبی بستنی را گزارش نموده‌اند [۵].

تهیه‌کنندگان مواد غذایی که حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی یا بر روی دست خود هستند، به عنوان یک منبع مهم و عمده برای آلودگی غذایی از طریق تماس دست یا از طریق ترشحات تنفسی محسوب می‌شوند. به دلیل این که استافیلوکوکوس اورئوس قادر به رقابت با فلور نرمال در غذاهای خام نیست، لذا آلودگی مواد غذایی به این باکتری اصولاً در ارتباط با روش‌های نادرست در تولید غذاهای پخته شده و فرآیند شده و در ادامه، نگهداری در شرایطی که اجازه رشد به باکتری و تولید آنتروتوکسین می دهد، می باشد [۵].

به علت ناقل بودن افراد از لحاظ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و دخالت مستقیم افراد در تولید بستنی سنتی و از انجایی که اکثر مردم تمایل به استفاده از مواد غذایی سنتی دارند و با توجه به اهمیت موضوع آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس، تعیین فراوانی آن در مواد غذایی می‌تواند راه گشای برنامه‌ریزی و مداخله‌های مناسب در سطح تولید و عرضه مواد غذایی باشد [۶-۵]. بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بستنی سنتی و دستگاهی عرضه شده در شهر قزوین در سال ۹۷-۱۳۹۶ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی طی یک‌سال از مهر ماه سال ۱۳۹۶ لغایت شهریور ماه سال ۱۳۹۷ انجام شد. ۱۰۰ نمونه بستنی

سنتی و دستگاهی عرضه شده در مغازه‌های بستنی فروشی شهر قزوین از نظر آلودگی به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شدند.

نمونه‌گیری به صورت تصادفی سیستماتیک انجام شد. در ابتدا مناطق سه گانه شهرداری شهر قزوین مشخص شد. بدین منظور سیاهه تمام مغازه‌های عرضه بستنی سنتی و دستگاهی استخراج گردید و به روش نمونه‌گیری سیستماتیک از هر منطقه ۸ مغازه به عنوان نمونه انتخاب شدند. علاوه بر این، در مطالعه حاضر تمام اصول اخلاقی رعایت شده است. هم‌چنین این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی قزوین به شماره ثبتی 1396.352 IR.QUMS.REC. می‌باشد.

تحقیقات انجام شده در زمینه‌های مشابه (بررسی آلودگی میکروبی بستنی‌های سنتی تولید شده در قنادی‌های شهر ساری در تابستان ۱۳۹۱، میزان آلودگی میکروبی بستنی‌های سنتی به استافیلوکوکوس اروئوس ۲۸درصد بود) با احتساب شیوع ۲۸٪ حجم نمونه به تعداد ۷۸ مورد خواهد بود و برای افزایش دقت تعداد۱۰۰ نمونه (در هر فصل ۲۵ نمونه) تعیین گردید.

$$n = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}})^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

نمونه‌برداری طبق استاندارد شماره ۱۹۱ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران و آماده سازی نمونه طبق استاندارد شماره ۳۵۶ انجام شد [۶]. از هر نمونه ۳۰۰ گرم در ظروف یک‌بار مصرف (مطابق وضعیتی که فرآورده به مشتری عرضه می‌گردد) برداشته شد و در شرایط مناسب و در کنار یخ به آزمایشگاه بهداشت و ایمنی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شد.

جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بر اساس استاندارد ملی ایران ۶۸۰۶ انجام شد. به این منظور ۱ گرم از هر نمونه در ۴۵ میلی‌لیتر سرم رینگر استریل غوطه‌ور و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شده به ۹ میلی‌لیتر محیط Giolitti-Cantoni broth اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در انکوباتور گذاشته شد. برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ازمحیط Giolitti-Cantoni broth در محیطBaird- Parker agar کشت سطحی و به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در دمای 35 درجه سلسیوس در انکوباتور (Behdad، ساخت ایران) گذاشته شد [۷]. سپس تعداد ۳ کلونی با رنگ سیاه و هاله لیسیتیناز انتخاب و در محیط Mannitol salt agar کشت خطی داده شد. کلنی‌های زرد رنگ رشد کرده در محیط MSA برای بررسی آزمون‌های افتراقی در محیط عمومیBrain Heart Infusion agar کشت شد.

جهت تشخیص و تأیید استافیلوکوکوس اورئوس از تست‌های بیوشیمیایی مختلف ازجمله کاتالاز، کواگولاز لوله‌ای، لیستیناز، اکسیداز، مالتوز استفاده شد و در نهایت جهت تأیید نهایی گونه استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین از روش مولکولی PCR استفاده شد [۸].

تایید گونه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از شناسایی ژن و مقاوت به متی‌سیلین با بررسی وجود ژن mecA به روش PCR انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش بر مبنای سکانس ژن NUC (ژن ترمونوکلئاز) مورد استفاده قرار گرفت.

بعد از آماده‌سازی پرایمرهای اختصاصی و تهیه غلظت ۱۰ میکرومول، واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. جهت انجام واکنش PCR، مستر میکس۱۰ میکرولیتر، پرایمر ۱ میکرولیتر، نمونه(DNA (Deoxyribonucleic Acid استخراج شده ۳ میکرولیتر، آب مقطر دیونیزه ۶ میکرولیتر بوده است. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (مدل ABI ساخت آمریکا) استفاده شد. تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. در این مطالعه جهت بررسی متغیرهای مورد نظر از آزمون‌های آماری t-test، آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج این مطالعه میزان آلودگی به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت با استفاده از روش کشت و روش PCR در فصول مختلف در بستنی سنتی و دستگاهی، ۵ درصد بود. طبق جدول ۱، میزان آلودگی بستنی سنتی و دستگاهی در دو فصل بهار و زمستان صفر بوده است. اما در فصل تابستان (۸ درصد) از کل نمونه‌های مورد بررسی در هر دو نوع بستنی سنتی و دستگاهی آلوده گزارش شده است که حداکثر میزان آلودگی در بین فصول سال می‌باشد.

با استفاده از روش PCR مشخص شد که ۸۰ درصد از باکتری‌ها به متی‌سیلین مقاومت داشتند. با توجه به آزمون دقیق فیشر رابطه‌ی معنی‌داری بین فصل و آلودگی به باکتری و مناطق مختلف شهر قزوین و آلودگی به باکتری یافت نشد (p>۰/۰۵). از آزمون t-test برای مقایسه شیوع باکتری در بین بستنی سنتی و دستگاهی استفاده شد. نوع بستنی رابطه معنی‌داری بر روی شیوع باکتری ندارد.

جدول ۱- تعداد موارد آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی سنتی و دستگاهی طی فصول مختلف در شهر قزوین در سال ۹۷-۱۳۹۶(n=۱۰۰)

فصل	تعداد نمونه				موارد آلودگی			
	بستنی سنتی		بستنی دستگاهی		بستنی سنتی		بستنی دستگاهی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بهار	۱۳	۵۲	۱۲	۴۸	۰	۰	۰	۰
تابستان	۱۳	۵۲	۱۲	۴۸	۲	۸	۲	۸
پاییز	۱۳	۵۲	۱۲	۴۸	۰	۰	۱	۴
زمستان	۱۳	۵۲	۱۲	۴۸	۰	۰	۰	۰

آزمون t-test، * p<۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار

بحث

در این مطالعه شیوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی سنتی و دستگاهی ۵ درصد گزارش شد. آلودگی در بستنی دستگاهی بیشتر از بستنی سنتی وجود داشت. در مطالعه Karim و همکاران در سال ۱۳۷۵ در تهران ۲۰ درصد آلودگی در بستنی سنتی گزارش شد [۹]. میزان آلودگی به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی سنتی در اهواز ۶۱ درصد [۱۰]، در مشهد ۹۱ درصد [۱۱]، در ساری ۲۸ درصد [۱۲]، در اراک ۵۰ درصد [۱۲] و در بیرجند ۲۸ درصد بود، که بالاتر از شیوع باکتری در مطالعه ما (۵ درصد) است.

از دلایل کم‌تر بودن میزان باکتری در مطالعه حاضر می‌توان به پاستوریزاسیون مواد اولیه بستنی و رعایت بهداشت فردی کارکنان اشاره نمود.

با توجه به مطالعات مرتبط، مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به متی‌سیلین بیش‌تر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به چشم می‌خورد. در مطالعه حاضر ۸۰ درصد از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاومت داشتند. در صورتی که در مطالعه Khoori E. et al در سال ۹۵-۱۳۹۴ در تربت حیدریه، ۱۶/۹۸ درصد [۱۴]، در تهران ۳ درصد [۱۵] از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین داشتند که کم‌تر از مطالعه ما بود.

نتیجه‌گیری

بهداشت شخصی ضعیف کارگران و عدم شستشوی دست‌ها یا عدم استفاده از مواد پاک‌کننده در شستشوی آن-ها و نیز تماس دست‌ها با دهان، بینی در حین تهیه فرآورده‌ها در انتقال عوامل باکتریایی مختلف از جمله استافیلوکوکوس اورئوس و یا اشریشیاکلی به فرآورده نقش به‌سزایی دارد.

پاستوریزاسیون مواد اولیه بستنی از جمله شیر، ارتقاء سطح فرهنگ تولیدکنندگان و توزیع‌کنندگان این فرآورده در خصوص رعایت اصول و موازین بهداشتی به منظور کاهش بروز آلودگی‌های ثانویه، از راه‌های افزایش‌دهنده سطح کیفیت بهداشتی این فرآورده می‌باشند. بنابراین به خانواده‌ها توصیه می‌شود از بستنی پاستوریزه استفاده کنند. به دلیل افزایش مقاوت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به متی-سیلین، عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای دام توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجویی می‌باشد، به این وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین تشکر می گردد، از کارشناس آزمایشگاه بهداشت و ایمنی مواد غذایی دانشکده بهداشت و کلیه متصدیان مراکز عرضه بستنی سنتی و دستگاهی شهر قزوین که در این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

Refernces

[1] FAO, WHO. FAO/WHO framework for developing national food safety emergency response plans. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Rome; 2010.

[2] Azadnia P, ShahAhmad Ghasemi M, Abbasi MR, Taarof N, Karimi Jashni M. Microbial Quality of Traditional Ice Cream Produced by Small-Scale Manufacturers in Khormoj and Its Comparison with the Iranian National Standard. 2011; pp:742-4

[3] Hosein Movassagh M, Movassagh A, Mahmoodi H, Servatkhah F, Reza Sourorbakhsh M. Microbiological Contamination of the Traditional Chocolate Ice Cream Sold in the Northwest Region of Iran. *GV* 2011; 6(3): 247-52.

[4] Martin NH, Trmcic A, Hsieh TH, Boor KJ, Wiedmann M. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. *FM*. 2016; 2016 Sep 30;7:1549. eCollection 2016. Epub 2016/10/18.

[5] Kussaga JB, Jacxsens L, Tiisekwa BP, Luning PA. Food safety management systems performance in African food processing companies: a review of deficiencies and possible improvement strategies. *JSFA* 2014; 94 (1) 1:2154-69. Epub 2014/01/16.

[6] Khoramrooz S, Sarikhani M, Khosravani S, Farhang Falah M, Mahmoudi Y, Sharifi A. Microbial contamination determination of Cream suit,Traditional Ice Cream and Olovia in Yasuj City. *AD* 2015; 20(6): 526-37.

[7] Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, et al. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine. *JAC* 2009; 64 (6):1156-64. Epub 2009/10/08.

[8] Gunawardena N, Thevanesam V, Kanakaratne N, Abeysekera D, Ekanayake A, Perera N. Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in Staphylococcus aureus. *SJID* 2012; 2(2): 18-29.

[9] Karim G, Razavilar V. investigating the contamination of traditional Iranian ice cream with the major bacteria responsible for infections and food poisoning. *JVR* 1995; 50, (1): 71-6.

[10] Jamshidyan M, Taghavi S. Investigation of bacterial contamination of Ahwaz traditional ice cream. *IVJ* 2001; 4(7): 19-27.

[11] Mokhtarian H, Mohsenzadeh M, Khezri M. The survey on the bacterial contamination of traditional ice cream produced in Mashhad city. *HMS* 2004; 10(1): 42-6.

[12] Salehian M, Salehifar E, Esfahanizadeh M, Karimzadeh L, Rezaei R, Molanejad M. Microbial contamination in traditional ice cream and effective factors. *JMUMS* 2013; 2(99): 18-33.

[13] Abolhasannezhad M, Sharifzadeh G, Naseri K, Abedi A, Yosefi S, Nakhaei A. Prevalence of microbial contamination of traditional ice-creams in ice-cream supplier trade units in Birjand in 2015&58; Short Communication. *JBUMS* 2017; 24(1): 73-8.

[14] Khoori E, Salehi AA, khoori M. Determination of antibiotic resistance pattern of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from the food samples by Multiplex PCR. *JFM* 2017; 4(4): 21-30.

[15] Soltan Dallal M, Agha Amiri S, Eshraghian M, Sabour Yaraghi A, Faramarzi T, Mahdavi V, et al. Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Food Stuff. *JAMBR* 2008; 16(64): 65-74.

Study of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Traditional and Device-Made Ice Cream in Qazvin, 2017-2018: A Short Report

H. Ebrahimi[1], R. Mahmoudi[2], P. Ghajarbeygi[3], S. Shahsavari[4], Sh. Mousavi[5], N. Biglarikhoshmaram[6]

Received: 08/04/2019 Sent for Revision: 28/04/2019 Received Revised Manuscript: 10/08/2019 Accepted: 17/09/2019

Background and Objectives: The aim of this study was to determine the prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in traditional and device-made ice cream in Qazvin.

Materials and Methods: In this cross- sectional study, 100 samples of traditional and device-made ice cream in Qazvin were randomly collected over a period of one year and in different seasons. The culture method was then confirmed by PCR (Polymerase Chain Reaction) technique.

Results: The inflammation rate of Staphylococcus aureus bacteria was 5% in most seasons in the traditional and device-made ice cream and the most inflammation was in summer, and 80% (4 cases) of the isolated bacteria were methicillin resistant.

Conclusion: The use of pasteurized ice cream and observance of health principles in producing traditional and device-made ice cream will reduce the risk of contamination and food poisoning.

Key words: Staphylococcus aureus, Traditional ice cream, Device-made ice cream, PCR, Antibiotic resistance, Qazvin

Funding: This research was funded by Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Qazvin University of Medical Sciences approved the study (Ethic Nubmer: IR.QUMS.REC.1396.352).

How to cite this article: Ebrahimi H, Mahmoudi R, Ghajarbeygi P, Shahsavari S, Mousavi Sh, Biglarikhoshmaram N. Study of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Traditional and Device-Made Ice Cream in Qazvin, 2017-2018: A Short Report. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (7): 721-8. [Farsi]

1- Graduate Student of Health and Food Safety, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0002-5237-6435
2- Associate Prof., Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0001-6608-3425
(Corresponding Author) Tel: (028)33336001, Fax:(028)33336001, E-mail: r.mahmodi@yahoo.com
3- Associate Prof., Health Products Safety Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0003-3445-3481
4- Instructor of Biostatistics, Social Determinants of Health Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0002-0806-6026
5- PhD Student of Molecular Medicine, Medical School, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0001-8641-4447
6- Graduate Student of Health and Food Safety, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID: 0000-0002-3764-0453