

БИОАНАГААХ

Үхрийн түүхий махнаас ялгасан *Staphylococcus aureus*-ийн хоруу чанарыг тодорхойлсон дүн

Анужин Б.¹, Мөнхдэлгэр Я.², Урангоо З.³, Удвал У.², Сарантуяа Ж.²

¹"Ач" Анагаах ухааны их сургууль

²Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль, Био-Анагаахын сургууль

³Хавдар судлалын үндэсний төв

Цахим шуудан: anujin@ach.edu.mn

Abstract**Detection result of virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from retail beef**

Anujin B.¹, Munkhdelger Ya.², Urangoo Z³, Udval U², Sarantuya J.²

¹"Ach" Medical University

³National Cancer Center of Mongolia

0School of Biomedicine, Mongolian National University of Medical Sciences

E-mail: anujin@ach.edu.mn

Introduction

In the United States, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) is considered one of the top five pathogens causing domestically acquired foodborne diseases and is responsible for an estimate of 241,000 illnesses per year. Foods that have been frequently implicated in Staphylococcal food-borne disease are meat, meat products, egg products, milk, dairy products, salads and bakery products. β -lactam antibiotics are routinely prescribed for treating *S. aureus* caused infections, but antibiotic resistance is increasing at an alarming rate.

Aim

Detection of virulence factors and antibiotic resistance in *S.aureus* isolated from retail beef

Materials and Methods

A total of 100 meat samples were collected from markets including Kharkhorin 28, Bars 4, Bayanzurkh 15, Huchit shonkhor 33, Denjiin myanga 4 and Bumbugur 16. *S.aureus* strains were determined on the basis of MNS 6308:2012 standard using Baird-Parker selective agar and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) in retail beefs. Bacterial susceptibility to antimicrobial agents determined by the Kirby Bauer disk diffusion method.

Results

Overall, 81% meat samples were contaminated with staphylococcal of which 54.3% were low, 28% were moderate, 11.1% were high and 6.1% were very high. PCR amplification of the thermostable nuclease-encoding *nuc* gene using the gene-specific primers and the chromosomal DNA preparation yielded a 270 bp amplicon, as expected and 35 (43.2%) confirmed as *S. aureus*. According to the findings of the current study, *S.aureus* strains isolated from the beef were high resistant (88.6% -97.1%) to antibiotics of penicillins group and low resistant (8.6%) to chloramphenicol. In total, 48.6% of isolates were multidrug resistant.

Conclusion

The contamination of staphylococcal was high in retail beef in Ulaanbaatar. Most *S.aureus* isolates exhibited resistance to a antibiotics of penicillin group. The half of the isolates were multidrug resistant and high virulence.

Keywords: antimicrobial resistance, foodborne disease, retail beef, *Staphylococcus aureus*

Pp. 3-7, Table 1, Figure 1, Picture 1, References 15

Үндэслэл

ДЭМБ-аас мэдээлж байгаагаар дэлхий даяар жилд 600 сая хүн буюу 10 хүн дутмын 1 нь бохирдсон хоол хүнс хэрэглэсний дараа хоол хүнсээр дамжих халдварт өртдөг байна. АНУ-д жил бүр *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)-ийн шалтгаант хоолны хордлогын тохиолдол 241000 бүртгэгддэг байна [1]. Стафилококкийн шалтгаант хоолны хордлогын үед бөөлжих, дотор муухайрах, хэвлийгээр өвдөх болон суулгах шинжүүд 2-6 цагийн дотор илэрч, 24-48 цаг үргэлжилдэг бөгөөд бага насны хүүхэд, өндөр настан, дархлаа суларсан хүмүүст өвчин хүндэрч болно [2].

S.aureus-ийн шалтгаант хоолны хордого бохирлогдсон түүхий болон хагас боловсруулсан мах, махан бүтээгдэхүүн, өндөг, сүү, сүүн бүтээгдэхүүн, нарийн боов, сэндвич зэргээс үүсэх нь элбэг тохиолддог [3]. Монгол улс нэг хүнд ноогдох махны хэрэглээгээр дэлхийд 10 дугаарт байрлаж, нэг хүнд жилд 108.8 кг мах ноогдож байгаа нь дэлхийн дундаж хэрэглээнээс 2.7 дахин их байна. Статистикийн газар болон хоол хүнсний судалгаа хийдэг байгууллагаас гаргасан мэдээллээс үзвэл манай улсын мах махан бүтээгдэхүүний хэрэглээнд малын мах 69.3%, гахайн мах, 2.3% шувууны мах 0.4%, хиама лаазалсан мах 15%, загас далайн бүтээгдэхүүн 13% тус тус эзэлдэг [4].

S.aureus нь өргөн хүрээний хоруу чанарын олон хүчин зүйлийг агуулдаг учраас стафилококкийн шалтгаант хоолны хордлого, хоол хүнсээр дамжих халдвар нь нийгмийн эрүүл мэндийн томоохон асуудал болдог. Эдгээр хоруу чанарын хүчин зүйлд энтеротоксинууд (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), цочмог хордлогын хамшинж үүсгэгч токсин (*tsst*), эс хордуулагч токсин (*eta*, *etb*), гемолизин, адгезийн уургууд болон протеазаууд орно. Ялангуяа стафилококкийн энтеротоксин, цочмог хордлогын хамшинж үүсгэгч токсин, эс хордуулагч токсинууд нь өндөр температур болон хүчиллэг орчинд тэсвэртэй учраас хоол боловсруулах замын трипсин, пепсин гэх мэт протеолитик энзимүүдээр задардаггүй. Стафилококкийн энтеротоксины ген нь плазмид (*sed*), фаг (*sea*, *see*) болон хромосомын геномд (*seb*, *sec*) кодлогддог [5].

Дэлхий дахинд эмэнд тэсвэрт байдал нэмэгдсээр байгаа нь нийгмийн эрүүл мэндийн томоохон асуудал юм. Стафилококкийн халдварын эмчилгээнд бетта лактамын бүлгийн антибиотикийг түгээмэл хэрэглэдэг боловч бетта лактамаз ялгаруулдаг, лактамын бүлгийн антибиотикт тэсвэртэй *S.aureus*-ийн омгууд

нэмэгдсээр байна. 1960 онд пенциллин бүлгийн шинэ антибиотик болох метициллин нээж *S.aureus*-ийн халдварын эмчилгээнд үр дүнтэй хэрэглэж байсан боловч одоо *S.aureus*-ийн ихэнх омгууд *mecA* генийг кодолсон гадны ДНХ элементийг өөртөө нэгдүүлснээр метицилинд тэсвэртэй болж, бетта лактамын бүлгийн бүх антибиотикийн эмчилгээний үр дүн буурсан [6]. Нидерланд болон Канадад хийсэн судалгаагаар гахайн махнаас авсан сорьцны 20-40% метицилинд тэсвэртэй *S.aureus* (МТСА) эерэг байжээ [7]. *S.aureus* нь хүний бусад эмгэгтөрөгч бактериас илүү дасан зохицож, эмэнд тэсвэржилтийн механизмаа хөгжүүлснээр пенциллин, метициллинээс эхлээд саяхан нээгдсэн линезойд, даптомицинд тэсвэртэй омгууд хүртэл олдсоор байна [8].

Зорилго

Жижиглэнгээр худалдаалж байгаа түүхий махнаас *S.aureus*-ийг илрүүлж, хоруу чанарыг тодорхойлох

Материал, арга зүй

Судалгааг *in vitro* нөхцөлд лабораторийн туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэнэ. Бид Хар хорин захаас 28, Барс худалдааны төвөөс 4, Баян зүрх захаас 15, Хүчит шонхор захаас 33, Дэнжийн мянга захаас 4, Бөмбөгөр худалдааны төвөөс 16, нийт 100 дээжийг ариун пластик уутанд цуглуулж судалгаанд хамруулсан бөгөөд судалгааг дараахь үе шатаар хийж гүйцэтгэлээ. Үүнд:

Дээжнээс стафилококк илрүүлэх: MNS ISO 6888-1:2011 стандартын дагуу махны дээжнээс 25 гр авч пептоны шөлөнд 103 хүртэл шингэрүүлэн, Baird-Parker (BP)-ын сонгомол тэжээлт өсгөвөрлөн тунгалаг хүрээтэй, хар колони өсгөвөрлөгдсөн тохиолдолд стафилококкоор бохирлогдсон гэж дүгнэлээ [3].

S.aureus-ийг ПГУ-аар баталгаажуулах: Өсгөврөөс нянгийн булинга бэлтгэн ДНХ-г халааж, буцалгах аргаар [9] ялгаж *S.aureus*-ийн зүйл өвөрмөц термонуклеаз генийн 270 х.н урттай бүтээгдэхүүнийг *nuc-F* 5'-3' CGATTGATGGTGATACGGT, *nuc-R* 5'-3' AGCCAAGCCTTGACGAACATAAGC дараалалтай праймер ашиглан ПГУ-аар илрүүлж баталгаажууллаа [10].

Эмэнд мэдрэг чанар тодорхойлох: M100-S23 стандартын дагуу ампициллин (10мкг), Оксациллин (30мкг), Пенциллин (10мкг), Гентамицин (10мкг), Ацитромицин (15мкг), Ципрофлоксацин (5мкг), Глиндамицин (2мкг), Тетрациклин (30мкг), Ванкомицин (30мкг),

Хлорамфеникол (50мкг) нийт 5 бүлгийн, 10 антибиотикийн дискийг хэрэглэв. Мюллер Хинтоны тэжээл орчин бэлтгэн нянгийн булингаа Макфарландын 0.5 стандарттай тэнцүү байхаар бэлтгэн тарилт хийсний дараа антибиотикийн дискүүдийг байрлуулж өсгөвөрлөн антибиотикийн дискүүдийг тойрч үүссэн өсөлт дарангуйлагдсан бүсийн диаметрийг хэмжиж мэдрэг, тэсвэртэй гэж үнэллээ [5]. Бактерийн эсрэг эмийн дискүүдийг *S.aureus* ATCC 25923 стандарт омогт шалгаж баталгаажууллаа.

S.aureus-н хоруу чанарын хүчин зүйлийг кодлогч генүүдийг мультиплекс ПГУ-аар олшруулж илрүүлэх: *S.aureus*-ийн энтеротоксин (*sea*-102х.н, *sed*-278х.н), цочмог хордлогын хамшинж үүсгэгч токсин (*tsst*-326х.н), эс хордуулагч токсин (*eta*-93х.н, *etb*-226х.н) болон метициллин тэсвэртэй *mecA* (163х.н) генүүдийг 2 багц болгон мультиплекс ПГУ-аар олшрууллаа [11].

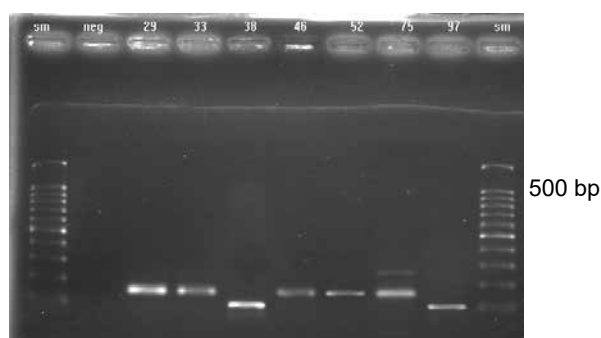
Судалгааны ёс зүй

АШУУИС-ийн судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2019/Д-06 хурлаар судалгааны ажил хийх зөвшөөрөл авсан болно.

Үр дүн

MNS 6308:2012 стандартын дагуу түүхий махны дээжний 103 дахин шингэрүүлэлтэд бактер өсгөвөрлөгдсөн тохиолдолд бохирлогдсон гэж үнэлэхэд бидний цуглуулсан 100 дээжний 81 нь стафилакоккоор бохирлогдсон байна. *S.aureus*-ийн зүйл өвөрмөц термонуклеаз генийг (*nucA*) ПГУ-аар илрүүлж баталгаажуулахад өсгөвөрлөгдсөн 81 тохиолдлоос 35 буюу 43.2% нь *S.aureus* байлаа.

S. aureus -ийн 35 омогт хоруу чанарын 6 генийг олшрох бүтээгдэхүүний уртаар нь боломжит 2 багцад (1-р багц: *mecA*, *sed*, *eta*, 2-р багц: *etb*, *sea*, *tsst*) хувааж, мультиплекс ПГУ-аар илрүүлсэн дүнг 1-р зургаар төлөөлүүлэн харууллаа (Picture 1).



Picture 1. Agarose gel-electrophoresis of Multiplex PCR for set 1.

Sm-size marker, DNA bands were detected as follows: neg- negative control; 163 bp of *mecA* in sample 29, 33, 46, 52, 75 and 93 bp of *eta* in sample 38, 97 and 278bp of *sed* in sample 75.

Хоруу чанарын 6 генийг мультиплекс ПГУ-аар илрүүлэхэд метициллин тэсвэржилтийн ген (*mecA*), энтеротоксин A (*sea*), цочмог хордлогын хам шинж үүсгэгч токсин (*tsst*) тус бүр 17.1% (6/35)-д илэрсэн. Харин эс хордуулагч токсин а хэв шинж 5.7% (2/35), b хэв шинж 11.4% (4/35) илэрсэн бол энтеротоксин 2.9% (1/35)-д тодорхойлогдлоо. Хоруу чанарын генүүд давхцан илэрсэн 5 тохиолдолд бүгдэд нь *mecA* ген илэрсэн байлаа.

Түүхий махнаас ялган дүйсэн *S.aureus*-ийн омгуудад эмийн мэдрэг чанарыг тодорхойлоход пенициллин бүлгийн эм болох ампициллин, оксациллин, пенциллин 88.6%-97.1% тэсвэртэй байна. Харин ванкомицид буюу 14.3% (5/35), ципрофлоксацид 22.8% (10/35) нь тэсвэртэй байлаа. Хоолны хордлогын үед хамгийн эхний сонголтын эм болдог хлорамфениколд хамгийн бага буюу 8.6% (3/35) тэсвэртэй нь тодорхойлогдов (Figure 2).

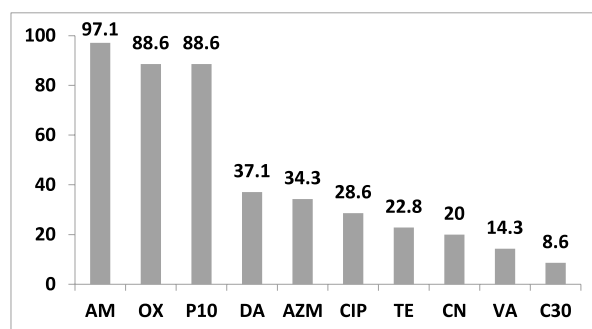


Figure 1. Percentage resistance of *S. aureus* to different antibiotics

Abbreviations: AM – ampicillin; OX – oxacillin; P10 – penicillin; DA – clindamycin; AZM – azithromycin; CIP – ciprofloxacin; TE – tetracycline; CN – gentamicin; VA – vancomycin; C30 – chloramphenicol;

Дээжээс илэрсэн *S. aureus* -ийн 17 (48.6%) омог олон эмэнд тэсвэртэй буюу 3-аас дээш бүлгийн эмэнд тэсвэртэй тодорхойлогдлоо. Олон эмэнд тэсвэртэй 17 омгийн 9 нь 3, 4 нь 4 бүлэг, 2 нь 5 бүлэг, 1 нь 6 бүлэг 1 нь 7 бүлгийн эмэнд тэсвэртэй байсан бол бидний судалгаанд хамруулсан 8 бүлгийн эмэнд бүгдэд нь тэсвэртэй омог илэрсэнгүй (Table 1).

Table1. Results of antibiotic resistance of S. aureus

Antibiotic groups	Antibiotic resistance	Total n (%)
1 group	-	9 (25.7)
2 group	AM+TE+P AM+OX+P+DA-5 AM+AZM+P AM+OX+AZM AM+OX+P+VA	9 (25.7)
3 group	AM+OX+CIP+TE+P AM+OX+TE+P+DA AM+OX+AZM+P+VA AM+OX+AZM+TE+P AM+OX+CIP+TE+P AM+OX+CN+TE+P AM+OX+C30+P AM+OX+CIP+P AM+AZM+P+DA	9 (25.7)
4 group	AM+OX+AZM+P+VA+DA AM+OX+CN+CIP+P+DA AM+OX+CN+C30+P+DA AM+OX+AZM+P+DA+TE	4 (11.4)
5 group	AM+OX+CN+AZM+CIP+P+VA AM+OX+AZM+CIP+TE+CN	2 (5.7)
6 group	AM+OX++CIP+AZM+TE+P+VA+DA	1(2.9)
7 group	AM+OX+CN+AZM+CIP+C30+TE+DA	1(2.9)
Total	35	

Abbreviations: AM – ampicillin; OX – oxacillin; P10 – pencillin; DA – clindamycin; AZM – azithromycin; CIP – ciprofloxacin; TE – tetracycline; CN – gentamicin; VA – vancomycin; C30 – chloramphenicol;

Эмэнд тэсвэртэй болон мэдрэг бүлгүүдэд хоруу чанарын генийн илрэл болон хоруу чанарын генүүд хавсран илрэх байдал ялгаатай эсэхийг үнэлэхэд статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаа ажиглагдсангүй ($p>0.05$).

Хэлцэмж

Сүүлийн жилүүдэд дэлхий даяар S. aureus-аар бохирлогдсон хоол хүнс, өвчлөл, тархалтын олон судалгаа хийгдэж байгаа боловч манай орны хувьд энэ төрлийн тоон үзүүлэлт дутагдаж байна.

Бидний судалгааны үр дүнд нийт махны дээжийн 81% нь стафилококкоор, 35% нь S.aureus-аар бохирлогдсон байна. Энэ нь БНХАУ-ын Shi Wu, Jiahu Huang нарын 2011-2016 онд хийгдсэн 39 хотыг хамруулсан судалгааны дүнтэй тохирч байна. Энэ судалгаанд 24 төрлийн антибиотикийн мэдрэг чанарыг үзсэнээс ампициллин болон пенициллин д тэсвэрт байдал нь бидний судалгааны дүнтэй ойролцоо байсан бол тетрациклин, клиндамицин,

ципрофлоксацин, хлорамфениколд мэдрэг байдал нь харьцангуй ялгаатай байгаа [13] нь тухайн орны эмийн сонголт, олдоц болон эмчилгээний хэрэглээ зэргээс хамааран үр дүн харилцан адилгүй байж болох юм.

Стафилококкийн хоолны хордлого нь S.aureus-ийн энтеротоксинуор бохирдсоноос үүсч хоол хүнсээр дамждаг хамгийн түгээмэл өвчин юм. Бидний судалгааны үр дүнгээс харахад түүхий үхрийн маханд S.aureus-ийн бохирдлын эх үүсвэрийг анхаарах нь нэн чухал байна. Нядалгааны газрын эрүүл ахуй, нядалгааны арга техник, хадгалалт, тээвэрлэлт эрүүл ахуйн ерөнхий дүрэм зэрэг нь S.aureus-аар бохирдох чухал хүчин зүйл болдог [12]. Мөн хүнсний аюулгүй байдал, эрүүл ахуйн хяналтыг сайжруулах шаардлагатайг харуулж байна.

Бидний судалгаагаар илэрсэн S. aureus-ийн омог нь пенциллиний бүлгийн эмэнд хамгийн их хувиар тэсвэртэй, олон эмэнд тэсвэрт байдал өндөр хувьтай тодорхойлогдлоо. Антибиотикийг замбраагүй, зохисгүй их

хэмжээгээр хэрэглэх нь олон эмэнд тэсвэртэй омог үүсч, өвчний эмчилгээний асуудлыг илүү хүндрэлтэй болгож, өвчлөл нэмэгдэх үндэс болдог. Мөн малд антибиотикийг зохисгүй хэрэглэх нь түүний гаралтай мах, махан бүтээгдэхүүнээс илэрсэн *S. aureus*-ийн омгийн антибиотик эсэргүүцэх чадварыг өндөр түвшинд хүргэдэг [14, 15]. Антибиотикт тэсвэрт байдал нь малын тоо толгой, антибиотикийн зохисгүй хэрэглээ, антибиотикийг малын тэжээл хэрэглэх зэрэг хүчин зүйлээс хамааран ихсэх магадлалтай юм.

Дүгнэлт

Жижиглэнгээр худалдаалж байгаа үхрийн түүхий махны ихэнх хувь нь стафилококкийн бохирдолтой байна. Махнаас ялган дүйсэн *S. aureus* омгууд нь пенциллиний бүлгийн эмэнд хамгийн өндөр тэсвэртэй бөгөөд тал хувь нь олон эмэнд тэсвэртэй, хоруу чанар өндөртэй байна.

Ном зүй

1. Suzuki Y, Kubota H, Ono HK, et al. Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*. *International journal of food microbiology*. Dec 4 2017;262:31-37.
2. Arslan S, Ozdemir F. Molecular characterization and detection of enterotoxins, methicillin resistance genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from fish and ground beef. *Polish journal of veterinary sciences*. Mar 28 2017;20(1):85-94.
3. Bergdoll MS, Borja CR, Robbins RN, Weiss KF. Identification of enterotoxin E. *Infection and Immunity*. 1971 Nov 1;4(5):593-5.
4. Ali R, Al-Achkar K, Al-Mariri A, Safi M. Role of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(3):293-298.
5. Ali R, Al-Achkar K, Al-Mariri A, Safi M. Role of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(3):293-8.
6. Zhang Y, Xu D, Shi L, Cai R, Li C, Yan H. Association Between agr Type, Virulence Factors, Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates From Pork Production. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1876.
7. Ed-Dra A, Filali FR, Bouymajane A, et al. Antibiotic Susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from sausages in Meknes, Morocco. *Veterinary world*. Nov 2018;11(10):1459-1465.
8. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. 2014;2014:827965.
9. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*. Feb 2002;70(2):631-641.
10. Haaber J, Penades JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. Nov 2017;25(11):893-905.
11. Parvez MAK, Ferdous RN, Rahman MS, Islam S. Healthcare-associated (HA) and community-associated (CA) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Bangladesh - Source, diagnosis and treatment. *Journal, genetic engineering & biotechnology*. Dec 2018;16(2):473-478.
12. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(7):1654-1660.
13. Wu S, Huang J, Wu Q, et al. *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Meat and Meat Products in China: Incidence, Antibiotic Resistance and Genetic Diversity. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2767.
14. KEYVAN2 HJ. Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat*. *Geliş tarihi:06.07.2015 / Kabul tarihi:20.02.2016*.
15. Haskell KJ, Schriever SR, Fonoimoana KD, et al. Antibiotic resistance is lower in *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-free raw meat as compared to conventional raw meat. *PloS one*. 2018;13(12):e0206712.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор Б.Ичинхорлоо*