تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های مواد غذایی با روش PCR چندگانه

عصمت خوری[1]، اسماعیل عطای صالحی[1]*، مرضیه خوری[2]

۱.گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲.دانشجوی دکتری تخصصی،گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

* **نویسنده مسئول**: *eatayesalehi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۸

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس با تولید چندین انتروتوکسین در مواد غذایی باعث بروز علائم مسمومیت با شدت‌های مختلف می‌شود. به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* روز به روز تعداد آنتی بیوتیک‌های موجود برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد. مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی ژن مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های مواد غذایی با استفاده از تکنیک PCR چندگانه انجام گرفت. در این مطالعه ۳۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ به صورت تصادفی از مناطق مختلف تربت حیدریه جمع آوری و به آزمایشگاه ارسال شدند. نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل استاندارد از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در آگار بر اساس دستورالعمل CLSI انجام گردید. جهت شناسایی و تایید *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده و ژن‌های حدت و مقاومت از آزمون PCR استفاده شد. از تعداد ۳۲۰ نمونه،۵۳ نمونه (۱۶/۶ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. آلوده‌ترین نمونه مربوط به نمونه شیرینی (۱۹/۷ درصد) بود. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد، بیشترین حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک توبرامایسین (شامل ۱۰۰ درصد موارد) و بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (شامل ۱۵/۰۹ درصد) بود. از میان ۵۳ جدایه ۹ مورد (۱۶/۹۸ درصد) در آزمایش انتشار دیسک در آگار به متی‌سیلین مقاوم بودند و ۵ جدایه (۹/۵ درصد) در تست PCR دارای ژن مقاومت *mecA* بودند. با توجه به میزان بالای آلودگی مواد غذایی به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، به منظور جلوگیری از آلودگی و انتقال سویه‌های مقاوم میکروبی تولید و توزیع آنها باید تحت کنترل بهداشتی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، PCR چندگانه.

مقدمه

در طول دهه‌های گذشته *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل ۲۵ درصد از بیماری‌های مرتبط با غذا در آمریکا بوده است. استافیلوکوک‌ها از جمله باکتری‌های مقاوم با پراکندگی و گسترش بالا هستند (Japooni et al., 2004). گزارشات اخیر حاکی از آن است که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمره عوامل بیماریزای حائز اهمیت در صنعت فرآورده‌های شیر می‌باشد (احسانی و همکاران، ۱۳۹۱). جنس استافیلوکوکوس متعلق به خانواده میکروکوکاسه بوده که باکتری‌هایی گرم‌مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور و هوازی و بی هوازی اختیاری هستند (Fooladi et al., 2010). *استافیلوکوکوس اورئوس* سومین عامل ایجاد کننده بیماری-های با منشا مواد غذایی در دنیا محسوب می‌شود (Boerema et al., 2006). این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فرآورده های لبنی، فرآورده‌های گوشتی، سبزیجات، سالاد، غذاهای پخته و نمکی و به خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است. در کشورهای پیشرفته بیشتر بیماری هایی که از طریق غذا به انسان منتقل می شود تحت کنترل متخصصان بهداشتی درآمده اند، ولی در کشورهای درحال توسعه، مشکلات

Archive of SID
www.SID.ir

اقتصادی و بهداشتی ایجاد شده توسط غذاهای تهیه شده به روش سنتی هنوز مشاهده می شود (ملا عباس زاده و حاجی شیخ زاده،۱۳۹۳). گسترش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی یکی دیگر از مشکلاتی است که پزشکان با آن سر و کار دارند و به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در *استافیلوکوکوس اورئوس* روز به روز تعداد آنتی بیوتیک‌های در دسترس برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد (ملا عباس زاده و همکاران،۱۳۹۰). استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دامپروری موجب ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو در میان استافیلوکوک‌های بیماریزا می‌گردد. استفاده از روش‌های ایمونولوژیکی، استفاده از تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR ساده و PCR چندگانه برای یافتن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داری ژن مناسب است. مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به متی‌سیلین ناشی از حضور ژن *mecA* است که رمزکننده یک پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین ۷۸ کیلو دالتونی PBP2a می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مقاوم به متی‌سیلن نسبت به حرارت پاستوریزاسیون و بسیاری از آنزیم‌های پروتئولیتیک مقاوم و پایدار بوده و می‌توانند در نمونه‌های غذایی برای مدت طولانی فعال بمانند (علیزاده و امینی، ۱۳۹۴).

مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در موادغذایی مختلف در شهر مشهد و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مقاوم به متی-سلین جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی با روش PCR چندگانه انجام گردید.

مواد و روش کار

این مطالعه بر روی ۳۲۰ نمونه موادغذایی مختلف از قبیل بستنی، شیرینی و آب میوه در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ انجام گردید. نمونه‌ها به صورت تصادفی از مناطق مختلف مشهد جمع آوری و به آزمایشگاه معاونت غذا و دارو ارسال گردیدند و مطابق با دستورالعمل استاندارد ۳-۶۸۰۶ از نظر وجود *استافیلوکوکس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور ۵ گرم از هر نمونه در ۴۵ میلی لیتر سرم رینگر استریل غوطه ور و به مدت ۱۵ دقیقه در یک جای ثابت قرار داده شد، سپس ۱ میلی لیتر از نمونه مخلوط شده به ۹ میلی لیتر محیط Giolitti-Cantoni broth (Merck, Germany) اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دما ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰۰میکرولیتر از محیط Giolitti-Cantoni broth در محیط Baird-Parker agar (Merck, Germany) کشت سطحی و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس تعداد ۳ کلونی با رنگ سیاه و هاله لیسیتیناز انتخاب و در محیط Mannitol salt agar (Merck, Germany) کشت خطی داده شد (۴۸-۲۴ ساعت در ۳۱ درجه سلسیوس). کنی‌های زرد رنگ رشد کرده در محیطMannitol salt agar برای بررسی آزمون-های افتراقی در محیط عمومی BHI agar (Merck, Germany) کشت گردید. برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، ترمونوکلئاز، Voges-Proskauer، تولید اسید از مانیتول و مالتوز و آزمون همولیز (در محیط آگار خون دار حاوی ۱ درصد خون دفیبرینه گوسفند) استفاده شد (ابراهیم‌زاده و حنیفیان، ۱۳۹۵).

استخراج DNA از جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

یک لوپ از باکتری تازه کشت داده شده در ۳۰۰ میلی لیتر PBS استریل درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط و سپس با استفاده از شیکر به صورت محلول درآمد و عمل سانتریفوژ به مدت ۸ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm انجام شد. مایع رویی به آرامی خارج شد و به رسوب باقی مانده ۲۰۰ میلی لیتر PBS تازه افزوده و با پیپت کردن‌های متوالی به

Archive of SID
www.SID.ir

صورت محلول در آورده شد. به محلول حاصل ۵ میکرولیتر بافر لیز کننده محتوی لیزوزیم و سپس ۲/۵ میکرولیتر آنزیم لیزوستافین اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به هر میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر binding buffer همراه با ۴۰ میکرولیتر proteinase K اضافه و میکروتیوب به آرامی چند مرتبه تکان داده شد تا محلول یکنواختی به دست آید و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه درون بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. میکروتیوب‌ها از بن ماری خارج و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول ۱۰۰ درصد اضافه و پس از اختلاط درون ستون‌های حاوی فیلتر منتقل شدند. ستون‌ها به مدت ۳ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مایع زیرین ستون دور ریخته شد. به هر کدام از فیلترهای حاوی نمونه، ۵۰۰ میکرولیتر Inhibito removal buffer اضافه شد و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از دور ریختن مایع زیرین حاصل از سانتریفوژ و تعویض ستون، بر روی فیلتر ۵۰۰ میکرولیتر washing buffer اضافه و مجددا به مدت ۳ دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm عمل سانتریفوژ انجام شد. با دور ریختن مایع زیرین و تعویض ستون، مرحله ۸ تکرار شد. با دور ریختن مایع زیرین و انتقال فیلتر به میکروتیوب های ml ۱/۵ استریل، ۲۰۰ میکرولیتر elution buffer اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند و پس از آن، سانتریفوژ در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه انجام داده شد. پس از پایان این مرحله، میزان جذب نوری DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰nm اندازه گرفته شد. میانگین جذب نوری DNA های استخراج در این مطالعه ۳ درصد بود. پس از شماره‌گذاری، نمونه های ژنومی استخراج شده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی، درون فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند (مرادنیا و همکاران،۱۳۹۲)

.PCR چندگانه

پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده اند. لازم به ذکر است این پرایمرها از مقالات مختلف گردآوری شدند (McClure et al., 2006).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه bp
(FemA)	F:5- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R:5- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	132bp
(16SrDNA)	F:5- CAG CTC GTG TCG TGA GAT GT-3 R:5- AAT CAT TTG TCC CAC CTT CG-3	420bp
(MecA)	R:5- CCT AGT AAA GCT CCG GAA-3 F:5- CTA GTC CAT TCG GTC CA-3	314bp

برنامه کلی PCR چند گانه

مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم واسرشت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه) تعداد ۴۰ سیکل، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه می‌باشد (جدول شماره۲) (Mehrotra et al., 2000).

مخلوط های استفاده شده جهت انجام واکنش شامل: آب مقطر ۱۶/۸ میکرولیتر، 1X. PCR buffer به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، mix (5Mm dNTP)به میزان ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هرکدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به میزان ۰/۱ میکرولیتر، نمونه DNA ۲/۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵میکرولیتر تهیه گردید. آزمون PCR چند گانه در

Archive of SID
www.SID.ir

دستگاه ترموسایکلر انجام شد .جهت بررسی محصول PCR چند گانه نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شدند و بعد از رنگ آمیزی، در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲- مراحل دمایی و زمانی سیکل های PCR

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۵	۱
دناتوراسیون	۹۴	۱	
اتصال	۵۷	۱	۴۰
توسعه	۷۲	۲	
توسعه نهایی	۷۲	۷	۱

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها

جدایه‌ها، از نظر مقاومت به ۹ آنتی‌بیوتیک با روش انتشار دیسک در آگار برروی محیط مولر هینتون اگار (Merck, Germany) طبق دستور العمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند (Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2006). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل ریفامپین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، متی‌سیلین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، سفتریاکسون (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، تتراسایکلین (۱۰میکروگرم)، لینکومایسین (۱۵میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰میکروگرم) بودند.

نتایج

در این تحقیق از میان ۳۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف جمع آوری شده، ۵۳ مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید. بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه شیرینی‌تر (۱۹/۷) بود (جدول ۳). میزان حساسیت جدایه‌های مختلف به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول شماره ۴ و ۵ ذکر شده است. بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین با فراوانی و (۱۶/۹۸ درصد) تتراسایکلین با فراوانی (۱۵/۰۹ درصد) ثبت شد. از طرفی ۳/۷ درصد از جدایه‌ها حداقل به یک و دو آنتی بیوتیک مقاومت بینابینی نشان دادند و همچنین هیچ جدایه‌ای به آنتی‌بیوتیک توبرامایسین مقاومت نشان نداد. همچنین Multiplex PCR قطعه ۵۳۳ bp ژن *mecA* از ۵ جدایه از ۱۰جدایه مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. در۱۰۰ درصد جدایه‌ها، حضور ژن *femA* (اختصاصی گونه) و ژن *16SrDNA* (اختصاصی جنس) مورد تایید قرار گرفت (جدول ۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳- میزان و درصد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های مختلف

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده
بستنی	۱۱۰	۱۹(۱۷/۲ درصد)
اب میوه	۹۰	۲۳(۱۲/۳ درصد)
شیرینی تر	۱۲۰	۱۱(۱۹/۷ درصد)
مجموع	۳۲۰	۵۳(۱۶/۶ درصد)

جدول۴- میزان حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش انتشار دیسک در آگار

آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
ریفامپین	۱	۱/۸	۰	۰	۵۲	۹۸/۱۱
سیپروفلوکساسین	۲	۳/۷	۰	۰	۵۱	۹۶/۲۲
متی‌سیلین	۹	۱۶/۹۸	۳	۵/۶	۴۱	۷۷/۳۵
اگزاسیلین	۲	۳/۷	۱	۱/۸۸	۵۰	۹۴/۳۳
سفتریاکسون	۴	۷/۵	۰	۰	۴۹	۹۲/۴۵
اریترومایسین	۴	۷/۵	۱	۱/۸۸	۴۸	۹۰/۰۶
تتراسایکلین	۸	۱۵/۰۹	۰	۰	۴۵	۸۴/۹۰
لینکومایسین	۱	۱/۸	۰	۰	۵۲	۹۸/۱۱
توبرامایسین	۰	۰	۰	۰	۵۳	۱۰۰

جدول ۵- نتایج آنتی بیوگرام بدست آمده از نمونه‌های مواد غذایی

نوع انتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	نوع نمونه		
		بستنی	شیرینی تر	آب میوه
ریفامپین	RA	-	۱	-
سیپروفلوکساسین	CP	۱	-	۱
متی‌سیلین	ME	۶	۳	۲
اگزاسیلین	OXA	۱	-	۱
سفتریاکسون		۲	۲	-
اریترومایسین	ER	-	۱	۳
تتراسایکلین	TE	۲	۴	۲
لینکومایسین		-	۱	-
توبرامایسین	TOB		-	-

جدول ۶- نتایج PCR چندگانه در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

حساسیت آنتی بیوتیکی	تعداد	ژن هدف		
		16S rRNA	*femA*	*mecA*
مقاوم	۱۰	۱۰	۱۰	۵
نیمه حساس	۲	۲	۲	۰

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یک نگرانی جدی در سلامت عمومی می باشد. مصرف گوشت‌های آلوده باعث مشکلات گوارشی می گردد. بر اساس گزارشات سالانه ۱۲۰۰ مرگ در اثر مسمومیت های غذایی استافیلوکوکوسی رخ می‌دهد (Momtaz et al., 2013). مسمومیت غذایی ناشی از این پاتوژن سومین علت بیماری‌های مرتبط با موادغذایی می-باشد. انسان می‌تواند از طریق مصرف گوشت آلوده به پاتوژن مقاوم و یا از طریق انتقال ژن‌های مقاومت به فلور طبیعی آلوده شود (Akbar & Anal, 2013). با توجه به مصرف بالای مردم ایران از این ماده غذایی، بررسی گوشت مرغ از لحاظ آلودگی به این باکتری حائز اهمیت می‌باشد. به نظر می‌رسد که بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های شایع مورد استفاده، بر علیه این پاتوژن موثر نمی‌باشند. سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌تواند از طریق مصرف محصولات غذایی حاوی باکتری‌های مقاوم به انسان منتقل گردد. بر اساس نتایج بررسی انجام شده از ۱۶/۶ درصد نمونه‌ها استافیلوکوکوس مثبت بودند. نتایج فوق با برخی مطالعات مطابقت دارد: در مطالعه‌ای که در طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ در کشور ایتالیا بر روی فراورده‌های لبنی مختلف انجام گردید میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را ۱۷ درصد گزارش کردند (Normanno et al, 2007). در سال ۲۰۰۸، در تحقیقی میزان آلودگی پنیرها به *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱۷/۷ درصد گزارش کردند (Akineden et al, 2008). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مصرف آنتی‌بیوتیک در زنجیره غذایی بر سلامت انسان ها می‌باشند. برخی مطالعات میزان شیوع پایینی را گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای که توسط سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی نمونه‌های موادغذایی مختلف میزان آلودگی ۹/۵ درصد گزارش گردید (سلطان دلال و همکاران، ۱۳۸۷). در مطالعه دیگری که توسط مصطفی و همکاران (۲۰۰۹) در پادگانی در هند انجام گرفت، آلودگی ۷/۷۷ درصد از غذاهای گوشتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* تائید شد (Mustafa et al, 2009). در برخی از مطالعات شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* بالایی را در نتایج خود گزارش کرده‌اند. حامد ملا عیاس زاده و همکاران در سال ۱۳۹۱ میزان آلودگی پنیرها، ۵۳/۷۵ درصد نمونه ها حاوی *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند (ملا عباس زاده و حاجی شیخ زاده، ۱۳۹۳). در مطالعه ای که بر روی نمونه‌های مختلف شیر و محصولات تهیه شده از شیر در هند انجام گرفت مشاهده شد که ۶۰/۵۶ درصد از نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (Singh and Prakash, 2010). مطالعه‌ای با عنوان جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک از مواد غذایی در تهران انجام گرفت، محقیقن گزارش کردند که میزان مقاومت به متی‌سلین ۳ درصد، اریترومایسین ۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۳ درصد، تتراسایکلین ۲۶ درصد، توبرومایسن ۰ درصد و ریفامپین ۰ درصد مشاهده گردید. در مطالعه ما میزان مقاومت به تتراسایکلین ۱۵/۰۹درصد، متی‌سیلین ۱۶/۹۸ درصد، توبرومایسین ۰ درصد، سیپروفلوکساسین و اگزاسیلین ۳/۷ درصد، اریترومایسین و سفتریاکسون ۷/۵ درصد مشاهده شد که نشان دهنده مشابهت نتایج به‌دست آمده می‌باشد (سلطان دلال و همکاران، ۱۳۸۷) در هر دو مطالعه بیشترین مقاومت مربوط به تتراسایکلین می‌باشد که این مقاومت زیاد استافیلوکوکوس‌های جدا شده به تتراسایکلین به خاطر استفاده بیش از حد دولت از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل درمان و عفونت در دام ها می‌باشند (Jamali and Radmehr, 2013). در مطالعه دیگری میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۳/۸۵ درصد گزارش شد، با مطالعه ما که میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۳/۷۵ مشابهت دارد (میرزایی و همکاران، ۱۳۹۱). در تحقیقی که در مورد سویه-های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام

Archive of SID
www.SID.ir

شد، میزان مقاومت به متی‌سیلین را در نمونه‌ها ۳/۷۵ درصد گزارش کردند (Normanno, et al., 2007). در حالی که نتایج ما نیز بیانگر آلودگی ۱۶/۹۸ درصدی به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی‌سیلین بود.در مطالعه حاضر، ۹ جدایه در تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به متی-سیلین مقاومت داشته که از این میان، ۵ جدایه در تست PCR، دارای ژن *mecA* بودند. نتایج برخی مطالعات با مطالعه حاضر سازگار می‌باشند. در پژوهشی در سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۰۹ در آمریکا، با بررسی MRSA، ۲۸۹ نمونه گوشت خام شامل (۱۵۶ نمونه گوشت گاو، ۷۶ نمونه گوشت مرغ و ۵۷ نمونه گوشت بوقلمون) در ۲۲/۶ درصد نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. ۶ نمونه MRSA مثبت شناسایی شد که وجود ژن *mecA* نیز آن را تایید کرد (Bhargava et al., 2011). برخی مطالعات میزان جداسازی *mec* را بیشتر از سویه‌های مقاوم گزارش کرده‌اند. در تحقیقی میزان شیوع MRSA را در گوشت‌مرغ، در روش دیسک دیفیوژن ۷۵/۶ درصد اعلام کردند، در حالی که میزان جداسازی ژن *mecA* در این جدایه‌ها ۸۲/۹۲ درصد گزارش شد. به عبارتی ۶ جدایه حساس به متی‌سیلین در روش دیسک دیفیوژن واجد ژن مقاومت بودند (Momtaz et al., 2013).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت ممکن است استفاده بی‌رویه و نابجا از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت-های دام و طیور و با استفاده آنها در جیره غذایی دامی و نیز بکارگیری آنها در مراکز کلینیکی و بیمارستانی در افزایش مقاومت میکروبی این باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها دخیل باشند و در این مورد پیشنهاد می‌گردد بررسی بیشتری جهت پی بردن به تغییر الگوی مقاومت باکتری در فواصل زمانی معین، بعمل آید. هم چنین ضمن انجام تحقیقات جامع‌تر در مراکز درمانی و کلینیکی، بررسی‌های بیشتری در مورد مقاومت میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا-کلی* جدا شده از فراورده‌های دامی و طیور ارگانیک (دام و طیوری که در پرورش آنها آنتی بیوتیک بکار نمی‌رود) بعمل آید، چرا که استفاده از این نوع مواد غذایی می تواند در کاهش مقاومت میکروبی و انتقال آن به انسان نقش داشته باشند.

منابع

۱. ابراهیم زاده، کامران و حنیفان، شهرام. (۱۳۹۵). مطالعه میزان آلودگی، مقاومت آنتیبیوتیکی، تولید بیوفیلم و وجود ژن TSST-1 در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ششم. شماره۴ ، صفحه۴۴ .

۲. احسانی، علی.، محمودی، رزاق.، فیض الله بیگی، حسین.، رئیسی، مجتبی.، هاشمی، محمد.، رضائیان، احمد و زارع، پیمان. (۱۳۹۱). مطالعه اثرات بهداشتی مونولورین در لورک. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره نهم. شماره ۳۷ ، صفحه۹۳-۹۹.

۳. سلطان دلال، محمدمهدی.، آقا امیری، سولماز.، اشراقیان، محمدرضا.، صبوریراقی ،علی اکبر.، فرامرزی، طاهره.، مهدوی، وحید.، صابرپور، فاطمه.، فاضلی فرد، پرستوسادات.، عابدی، پیمانه.، و محتسب، ترانه. (۱۳۸۷). تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی در شهر تهران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دوره شانزدهم. شماره ۶۴، صفحه ۶۳ - ۷۱.

۴. علیزاده، سجاد و امینی، کیومرث. (۱۳۹۴). تعیین وجود ژن حدت پنتون والنتین لکوسیدین *PVL* و ژن مقاومت به متی‌سیلین *mecA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی به روش PCR *چندگانه* و

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن. *مجله میکروب شناسی مواد غذایی شهرکرد*، سال دوم. شماره۴، صفحه ۴۹ -۵۸ .

۵. مرادنیا، حلیمه.، محمدی ثانی، علی و خضری، محمد (۱۳۹۲). بررسی میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی به متی سیلین ها (MRSA) در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نمونه های فراورده های گوشتی و لبنی در مشهد، دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران.

۶. ملاعباس زاده، حامد و حاجی شیخ زاده، بهنود. (۱۳۹۳). بررسی میزان آلودگی و تعیین الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از پنیرهای سنتی مصرفی در بخش قطور شهرستان خوی مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. سال چهارم. شماره۲، صفحه ۲۰۹-۲۱۷.

۷. ملاعباس زاده، حامد.، مبین، هایده.، و میرزایی، حمید. (۱۳۹۰). تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضاء و شهداء تبریز. مجله علمی -پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره سوم. شماره ۹، صفحه ۴۵-۵۰.

۸. میرزایی، حمید.، جوادی، افشین.، فرجلی، مهدی.، شاه محمدی، امیر رضا.، و منادی سفیدان، علیرضا.، و برزگر، ابوالفضل. (۱۳۹۱). شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در پنیر و کره محلی: یک مطالعه میدانی در تبریز. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، دوره ۶۷. شماره ۱، صفحه ۶۵-۷۰.

9. Akbar, A., and Anal, A.K. 2013. Prevalence and antibiogram study of Salmonella and Staphylococcus aureus in poultry meat. Asian Pac J Trop Biomed. 3(2): 163-1688.

10. Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E., and Usleber, E. 2008. Enterotoxigenic properties of Staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese. Int J Food Microbiol. 124: 211-216.

11. Bhargava, K., Wang XDonabedian, S., Zervos, M., da Rocha, L., and Zhang, Y. 2011. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Retail Meat. Detroit, Michigan, USA. *Emerg* Infect *Dis*. 17(6): 1135–1137.

12. Boerema, J.A., Clemens, R., and Brightwell, G. 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus. Int J Food Microbiol. 107: 192-201.

13. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M11-A7. 27(2): 175.

14. Fooladi, A.A.I., Rahmati, S., Abadi, J.F.M., Halabian, R., Sedighian, H., Soltanpour, M.J., and Rahimi, M. 2014. Isolation of Clostridium difficile and detection of A and B toxins encoding genes. Int J *Enteric* Pathog. 2 (1): e15238.

15. Jamali, H., and Radmehr, B. 2013. Frequency, virulence genes and antimicrobial resistance of Listeria spp. isolated from bovine clinical mastitis. Vet J. 198: 541-542.

16. Japooni, A., Alborzi, A., Orafa, F., Rasouli, M., and Farshad, S. 2004. Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. Iran Biomed J. 8: 173-178.

Archive of SID

www.SID.ir

from chicken meat in Isfahan province. J Appl Poultry Res. 22(4): 913-921.

20. Mustafa, M., Jain, S., and Agrawal, VK. 2009. Food poisoning outbreak in a military stablishment. Med J Armed Forces India. 65(3): 240-243.

21. Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., et al. 2007. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol, 117(2): 219-222.

22. Singh, P. and Prakash, A. 2010. Prevalence of coagulase positive pathogenic Staphylococcus aureus in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. Acta Agric Slov. 96(1): 37–41.

17. McClure, J.A., Conly, J.M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W., and Zhang, K. 2006. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin susceptible from resistant staphylococci. J Clin Microbiol. 44: 1141-1144.

18. Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W.M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exofoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 38: 1032–1035.

19. Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Asgarifar, A., and Momeni, M. 2013. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of Staphylococcus aureus isolated

Archive of SID

www.SID.ir

Determination of antibiotic resistance pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the food samples by Multiplex PCR

Khoori E[1], Ataye Salehi1 A[1]*, khoori M[2]

1. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2. Ph.D. student, Department of Food Hygiene, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

***Corresponding author:** *eatayesalehi@yahoo.com*

Received: 09 April 2017 Accepted: 30 October 2017

Abstract

Staphylococcus aureus is able to produce several enterotoxins which can cause poisoning symptoms with different intensities through eating of contaminated food. Due to the emergence of antibiotic-resistant strains of *S. aureus*, the number of antibiotics available for treating these infections is reduced daily. This study aimed to isolate *S. aureus* and identification of methicillin-resistant gene in food samples using PCR technique. The study included 320 samples of different foods were conducted between July of 2015 and March of 2016. The samples were randomly collected from different parts of Mashhad, were sent to the laboratory and in accordance with standard instructions were examined for the presence of *S. aureus*. The antibiotic sensitivity test was done by disk diffusion according to CLSI guidelines. PCR test was used to identify and confirm the isolated *S. aureus* and Virulence genes and resistance. The result showed that 53 samples (16.6%) of the 320 samples were contaminated with *S. aureus*. The most contaminated sample was sample sweet (19/7). Antibiogram results showed that the most sensitivity and the most resistance to the antibiotic are for tobramycin antibiotics 100% tetracycline (15.09%) respectively. isolates 9 (16.98%) isolates of the 53 were resistant to methicillin in disk diffusion and 5 (9.5%) isolates had mecA resistance gene in PCR test. Due to high levels of Staphylococcus aureus food contamination the production and distribution of foods must be healthy controlled in order to prevent contamination and transmission of resistant strains of these microbes.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, PCR.

Archive of SID

www.SID.ir