ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد

حامد کریمیان[1]، الهه تاج بخش[1*]، ابراهیم رحیمی[2]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *ee_tajbakhsh@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۵

چکیده

در دو دهه اخیر، *انتروکوک*‌ها مقاومت گسترده‌ای به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها کسب کرده‌اند که این امر سبب پیچیدگی در درمان عفونت-های ناشی از این باکتری‌ها گردیده است. از آن جایی که گوشت قرمز به‌عنوان یک ماده غذایی پر مصرف مورد استفاده در ایران است و به سهولت با این باکتری آلوده می‌شود بر آن شدیم تا فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد را مورد بررسی قرار دهیم. این تحقیق به‌صورت مقطعی-توصیفی روی ۱۰۴ نمونه گوشت قرمز در سال ۱۳۹۴ در شهرکرد انجام شد. جداسازی باکتری با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تائید آن بر اساس ردیابی ژن *16srDNA* صورت گرفت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش کربی بائر و ردیابی مولکولی ژن‌های *tetM*، *ant(2'')-I*، *ermB* و *aac(6')/aph(2')* انجام شد. بیشترین مقاومت میکروبی به استرپتومایسین (۹۵/۲ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به وانکومایسین (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. ژن *ermB* با فراوانی ۷۶/۹ درصد و ژن *aac(6')/aph(2')* با فراوانی ۴۰ درصد بیشترین و کمترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* بودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تا کنون مقاومت نسبت به ونکومایسین در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد مشاهده نشده اما مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، سفوتاکسیم، مروپنم، اریترومایسین، تتراسایکلین مشاهده گردید. هم‌چنین مشخص شد که ژن *ermB* در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار است و فراوان‌ترین ژن عامل مقاومت است.

واژگان کلیدی: *انتروکوکوس فکالیس، گوشت، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی.*

مقدمه

انتروکوک‌ها کوکسی های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که قادرند در حضور ۶/۵ درصد نمک و ۴۰ درصد املاح صفراوی رشد نمایند. شایع‌ترین *انتروکوک*‌های دخیل در عفونت‌های انسانی *انتروکوکوس فکالیس* (۹۰-۸۵ درصد) و *انتروکوکوس فاسیوم* (۱۰-۵ درصد) می‌باشند که منجر به ایجاد عفونت مجاری ادراری، عفونت زخم و حتی اندوکاردیت می‌شوند (Saeed et al., 2005; Cetinkaya et al., 2000). *انتروکوکسی* معمولاً در دستگاه گوارش انسان یا حیوانات ساکن است. *انتروکوکوس فکالیس* سویه غالب از *انتروکوکسی* در دستگاه گوارش انسان است (Foulquie Morenor et al., 2006). مقاومت *انتروکوکسی* به درجه حرارت پاستوریزه شدن، سازش-پذیری آن‌ها به سوبستراهای مختلف و شرایط متفاوت رشد (درجه حرارت بالا و پائین، pH حداکثر و نمک) به دلیل این است که این باکتری‌ها می‌توانند در محصولات غذایی تهیه شده از مواد خام (گوشت و شیر) و محصولات غذایی که تیمار حرارتی دیده‌اند، یافت شوند. این بدین معنی است که باکتری‌ها می‌توانند در شرایط معمول تولید غذا پایدار بمانند. به‌علاوه آن‌ها می‌توانند محصولات غذایی را در زمان بسته‌بندی آلوده کنند؛ بنابراین *انتروکوکسی* می‌تواند قسمت مهمی از میکروب‌های غذاهای تخمیری به‌ویژه گوشت و پنیرهای تخمیر شده را تشکیل دهد (Foulquie Morenor et al., 2006). در این گروه از باکتری‌ها مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده می-گردد از جمله این مقاومت‌ها می‌توان به مقاومت ذاتی

www.SID.ir

Archive of SID

به ماکرولیدها، کلرامفنیکل، پنی‌سیلین، تتراسایکلین و آمینوگلیکوزیدها اشاره کرد.

مقاومت چندگانه یکی از خصوصیات *انتروکوک*‌ها است (Sutcliffe et al., 1996). آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن عوارض جانبی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها دارد، همچنان در درمان عفونت‌های باکتریایی با ارزش می‌باشند. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال سازی آنزی‌ماتیک دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است. ژن‌های رمز کننده این آنزیم‌ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل انتقال نظیر ترانسپوزون‌ها انتقال می‌یابد. *انتروکوک*‌ها به‌ویژه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* دارای مقاومت ذاتی به غلظت‌های پایین جنتامایسین می‌باشند. در این باکتری‌ها آنزیم-های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. از این میان سه آنزیم *APH(3')III* و *ANT(4')I*، *AAC(6')/APH2* که به ترتیب توسط ژن‌های *ant(4')Ia*، *aac(6')Ie/aph* و *aph(3')IIIa* کد می-شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و باعث غیر فعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به ماکرولیدها در *انتروکوک*‌ها، تغییر جایگاه هدف است که به‌واسطه ژن‌های *erm* کد شده و مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B را سبب می‌شود (Sutcliffe et al., 1996). ژن‌های *erm* مسئول کد کردن متیل ترانسفرازها می‌باشند. این آنزیم سبب القاء دمتیلاسیون یک گروه آدنین در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز زیر واحد ۲۳s ریبوزومی می-گردد که در نهایت سبب کاهش میل ترکیبی اتصال و ایجاد مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامین‌ها و استرپتوگرامین B می‌گردد. ژن‌های *erm* در بسیاری از ترانسپوزون‌ها شناسایی شده‌اند (Zou et al., 2011; Emaneini et al., 2008; Cauwerts et al., 2007). هدف از این تحقیق تعیین الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی-بیوتیک‌های مختلف از جمله ژن‌های *tetM* (مقاومت به تتراسایکلین)، *ant(2'')-I* (مقاومت به آمیکاسین)، *ermB* (مقاومت به اریترومایسین) و *aac(6')/aph(2')* (مقاومت به جنتامایسین) با تکنیک PCR در ایزوله-های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد است.

روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی *انتروکوکوس فکالیس*

در این مطالعه مقطعی- توصیفی در سال ۱۳۹۴ تعداد ۱۰۴ نمونه گوشت قرمز (گوشت گوسفند، گاو، بز و گوساله از هر کدام ۲۶ نمونه) از مراکز عرضه گوشت شهرستان شهرکرد تهیه شد و در شرایط استریل و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید سپس ۵ گرم از هر نمونه گوشت توزین و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS مخلوط و یکنواخت گردید. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر در یک پلیت حاوی محیط کانامایسین اسکولین آگار پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌های رشد یافته در هر پلیت پس از سپری شدن مدت انکوباسیون از نظر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، اکسیداز، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و تخمیر قند-های آرابینوز، مانیتول،سوربیتول، لاکتوز و سوربوز تعیین هویت گردیدند (Talon et al., 2011).

بررسی مقاومت ضد میکروبی

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها از روش کربی- بایر[1] بر طبق دستورالعمل CLSI[2] استفاده شد برای این منظور سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت TSB را تهیه و در دمای ۳۷

[1]. Kirby Bauer
[2]. Clinical and Laboratory Standards Institute

www.SID.ir

Arc JFM ID

درجه قرار دادیم تا زمانی که کدورت آن به اندازه کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند برسد. سپس با استفاده از سواپ استریل از باکتری برداشته بر روی محیط مولر هینتون کشت انجام شد و دیسک‌های مورد نظر با حفظ فاصله روی آن قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس اندازه هاله‌های ممانعت از رشد، بر اساس جدول شرکت پادتن طب نتایج ثبت شد. دیسک‌های آنتی-بیوتیکی سیپروفلوکساسین (CP 5)، تتراسیکلین (TE 30)، مروپنم (MEN 10)، کوتریماکسازول (SXT 25)، آمیکایسین (AN 30)، جنتامایسین (GM 10)، ونکومایسین (V 30)، کلرامفنیکل (C 30)، آموکسی‌سیلین (AM 10)، استرپتومایسین (S 10) و سفوتاکسیم (CTX 30) مورد استفاده قرار گرفتند (Institute Clinical and Laboratory Standards (CLSI), 2006).

آزمایش‌های مولکولی

به‌منظور تائید قطعی وجود *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه‌های کشت داده شده و ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت: در مرحله اول حضور قطعی *انتروکوکوس فکالیس* در ایزوله‌ها با ردیابی ژن کد کننده *16srDNA* باکتری با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10 x)، ۱۸/۰۵ میکرولیتر ddH_2o، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از هر کدام از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNATaq پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۱ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت.

به‌منظور ردیابی ژن‌های *tetM* (مقاومت به تتراسایکلین)، *ant(2'')-I* (مقاومت به آمیکاسین)، *ermB* (مقاومت به اریترومایسین) و *aac(6')/aph(2')* (مقاومت به جنتامایسین) از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای ژن‌های *tetM*، *ant(2'')-I*، *ermB* و متشکل از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10 x)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNATaq پلی‌مراز، ۱۵/۹۵ میکرولیتر ddH_2O، ۱ میکرولیتر از DNA الگو با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه صورت گرفت (Jia et al., 2014).

برنامه حرارتی برای ژن‌های *ermB* و *aac(6')/aph(2')* به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از انجام آزمایش‌های PCR، محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویربردار از ژل (انگلستان، Uviteck) مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srDNA* و ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس*

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
tetM	GTGTGACGAACTTTACCGAA GCTTTGTATCTCCAAGAACA	۵۰۱
ant(2'')-I	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG CTGTTACAACGGACTGGCCGC	۳۲۰
ermB	GAAAAGGTACTAAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	۶۱۶
aac(6')/aph(2')	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	۲۲۰
16srDNA	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT AGGAGGTGATCCAACCGCA	۳۷۰

نتایج

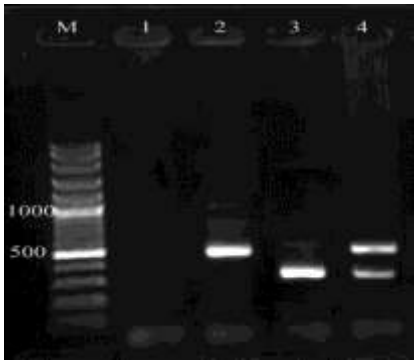
از مجموع ۱۰۴ نمونه، مورد بررسی ۹۰ ایزوله *انتروکوک* جدا شد که ۴۲ ایزوله (۴۰/۳۸ درصد) *انتروکوکوس فکالیس* بود. آلودگی به این باکتری در گوشت گاو ۱۴/۳ درصد، در گوشت گوساله ۳۸/۱ درصد، در گوسفند ۱۳/۸ درصد و در گوشت بز ۲۳/۸ درصد مشاهده گردید. پس از انجام آزمون‌های میکروبیولوژی تمامی نمونه‌ها در بررسی مولکولی با داشتن باند ۳۷۰ جفت بازی در حضور پرایمر اختصاصی *16srDNA* مثبت تشخیص داده شدند. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای دو بین نوع گوشت و آلودگی به *انتروکوکوس فکالیس* رابطه معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($P<0/05$). در آزمایش آنتی-بیوگرام که جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* استفاده شد بیشترین مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۹۵/۲ درصد) و بیشترین حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (۱۰۰ درصد) بود. مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۸۶/۶ درصد)، مروپنم (۸۰/۹۵ درصد)، اریترومایسین (۶۱/۹ درصد)، تتراسایکلین (۲۶ درصد)، آمیکایسین (۲۳/۸ درصد)، جنتامایسین (۱۱/۹ درصد)، کلرامفنیکل (۹/۵ درصد)، آموکسی سیلین (۴/۸ درصد) و مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۴/۷۶ درصد) گزارش گردید. جهت ردیابی ژن‌های کد کننده مقاومت به تتراسایکلین، آمیکاسین، اریترومایسین و جنتامایسین از آزمایش PCR استفاده شد. همان‌گونه که در جدول (۳) مشهود است، شایع-ترین ژن کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد مطالعه ژن *ermB* با فراوانی ۷۶/۹ درصد و کمترین آن‌ها ژن کد کننده مقاومت به جنتامایسین (*aac(6')/aph(2')*) با فراوانی ۴۰ درصد است. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و وجود مقاومت با این آنتی‌بیوتیک، ارتباط معنی‌دار مشاهده گردید اما بین آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکایسین و اریترومایسین و وجود مقاومت با این آنتی‌بیوتیک ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. نتایج در جدول ۲ و شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

www.SID.ir

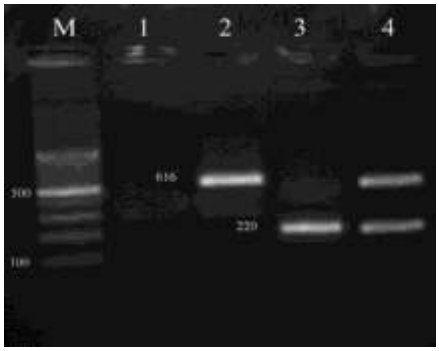
Arc JFM ID

جدول (۲): فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس*

نوع ژن	آنتی‌بیوتیک	مقاومت با دیسک	مقاومت به روش تشخیص مولکولی	p-value
tet M	تتراسایکلین	۱۱ ٪۲۶	۱۵ ٪۶۳/۳۶	۰/۰۰۱
aac(6')/aph(2')	جنتامایسین	۵ ٪۱۱/۹	۵۲ ٪۴۰	۰/۲۳۵
ant(2'')-I	آمیکایسین	۱۰ ٪۲۲/۸	۶ ٪۶۰	
ermB	اریترومایسین	۲۶ ٪۶۱/۹	۲۰ ٪۷۶/۹	



تصویر ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *tet M* و *ant(2'')-I*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی. ستون ۲: باند ۵۰۱ جفت بازی ژن *tet M*، ستون ۳: باند ۳۲۰ جفت بازی ژن *ant(2'')-I*، ستون ۴: باندهای ۵۰۱ و ۳۲۰ جفت بازی ژن‌های *tetM* و *ant(2'')-I*.



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *erm B* و *aac(6')/aph(2')*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: باند ۶۱۶ جفت بازی ژن *erm B*، ستون ۳: باند ۲۲۰ جفت بازی ژن *aac(6')/aph(2')*. ستون ۴: باندهای ۶۱۶ و ۲۲۰ جفت بازی ژن‌های *ermB* و *aac(6')/aph(2')*.

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین فراوانی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، جنتامایسین، آمیکایسین و تتراسایکلین در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از گوشت قرمز در شهرستان شهرکرد با دو روش معمول آنتی‌بیوگرام و مولکولی انجام گرفت. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به‌عنوان مثال در مطالعه ما

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین مقاومت به استرپتومایسین (۹۵/۲ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به وانکومایسین (۱۰۰ درصد) برآورد گردید. در مطالعاتی که شریفی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *انتروکوک* جدا شده از عفونت مجاری ادراری داشتند مقاومت این سویه نسبت به آمیکاسین ۸۶/۲ درصد، اریترومایسین ۷۳/۹ درصد، پنی‌سیلینG ۶۸/۸ درصد، سیپروفلوکساسین ۶۵/۴ درصد، استرپتومایسین ۴۷/۳ درصد، آمپی‌سیلین ۲۸/۲ درصد و تیکوپلانین ۱۸/۶ درصد برآورد گردید (Sharifi et al., 2013) که فقط مقاومت نسبت به اریترومایسین با نتایج حاصل از تحقیق ما تقریباً مشابه است. در تحقیق انجام شده توسط (Kuhn et al., 2005) بر روی نمونه‌های بالینی دامی و محیطی در اروپا میزان مقاومت به ونکومایسین را ۸ تا ۱۱ درصد گزارش کردند درصورتی‌که در تحقیق ما مقاومت نسبت به ونکومایسین مشاهده نگردید. در تحقیق انجام شده توسط (Trivedi et al., 2011) که به‌منظور ارزیابی شاخص‌های بیماری‌زایی در ایزوله‌های *انتروکوکوس* جدا شده از پنیر لیقوان صورت گرفت، مقاومت نسبت به استرپتومایسین ۱۰۰ درصد گزارش گردید که مشابه تحقیق ما بالاترین مقاومت را به خود اختصاص داد. هم‌چنین در این تحقیق مقاومتی نسبت به ونکومایسین گزارش نگردید که مشابه تحقیق ما از کمترین فراوانی برخوردار است.

انتروکوک‌ها گروه مهم و متنوعی از باکتری‌ها هستند که اهمیت ویژه‌ای از نظر مقاومت دارویی چندگانه دارند. مهم‌ترین مشکل *انتروکوک‌ها* مقاومت نسبی و مطلق آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها است (Mcdonald et al., 1997). آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در محیط‌های بیمارستانی، انتخاب انتروکوک‌های پاتوژن را تحت تأثیر قرار داده، به‌گونه‌ای که بر تعداد سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی و بعضاً سویه‌های مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌ها افزوده می‌شود. مقاومت به ماکرولیدها در *انتروکوکها* اهمیت اپیدمیولوژیکی زیادی در مناطق مختلف دنیا داشته است. در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و جدید متفاوت است. با این وجود افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری یک پدیده جهانی است (Kim et al., 2012). این باکتری سومین عامل باکتریمی و دومین عامل عفونت دستگاه ادراری به شمار می‌آید و هم‌چنین به دلیل عدم اطلاع کافی به مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه در اپیدمی *انتروکوک‌ها* بعضی از اطلاعات برای درمان مناسب عفونت‌های *انتروکوکی* مورد نیاز است (Feizabadi et al., 2006 and Cetinkaya et al., 2000). در قسمت دیگر از این تحقیق، ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *انتروکوکوس فکالیس* مورد بررسی قرار گرفتند نتایج نشان داد ژن ermB (کد کننده مقاومت به اریترومایسین) با فراوانی ۷۶/۹ درصد و ژن aac(6')/aph(2') (کد کننده مقاومت به جنتامایسین) با فراوانی ۴۰ درصد بیشترین و کمترین ژن‌های کد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی ردیابی شده در ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* بودند. فراوانی ژن‌های ermA,B,C در سال ۱۳۹۳ توسط اصلانی مهر و همکاران (۱۳۹۱) در انتروکوک‌های مقاوم به اریترومایسین جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان‌های دانشگاهی شهر قزوین و تهران بررسی شد که در این مطالعه میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بیان‌کننده مقاومت ذاتی و بالا به ماکرولیدها در سویه‌های *انتروکوک* است که از بین ۱۶۵ ایزوله *انتروکوک* مورد بررسی، مقاومت به اریترومایسین در ۱۴۷ ایزوله (۸۹ درصد) بوده در این مقاومت ermB بیشترین فراوانی را داشته که در ۱۵۸ ایزوله (۹/۵ درصد)، ژن ermC ۱۰۴ ایزوله (۶۳ درصد) و ژن ermA ۵۳ ایزوله (۳۲/۱ درصد) گزارش شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۹ در چین توسط (Zou et al., 2011) صورت گرفت از ۱۱۷ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از بیماران، ۷۸ ایزوله (۶۶/۶ درصد) مقاومت به اریترومایسین گزارش شد. ۵۸ ایزوله (۷۴/۳ درصد) دارای

www.SID.ir

Arc JFM ID

ژن ermB و ۳۷ ایزوله (۴۷/۴ درصد) دارای ermA بودند. ۱۷ درصد ایزوله‌ها دارای هر دو ژن ermA و ermB و ۲/۵ درصد ایزوله‌ها دارای ermC بودند. در مطالعه دیگری که توسط (Emaneini et al., 2008) بر روی ۳۲۶ ایزوله بیمارستانی *انتروکوک* در بیمارستان‌های تهران انجام شد ۴۱ درصد ایزوله‌های مقاوم به اریترومایسین حاوی ژن ermB بودند. ژن ermB در این مطالعه مشابه با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر بیشترین فراوانی را دارد. مطالعه دیگری در اسپانیا توسط (Lopez et al., 2010) برای تشخیص مقاومت MLSB در *انتروکوک‌ها* بر اساس حضور ژن‌های متیلاز rRNA با روش PCR و تعیین حداقل غلظت مهاری نشان داد که از ۱۴۸ ایزوله مورد بررسی، ۹۴ درصد ایزوله‌ها دارای مقاومت به اریترومایسین بوده و ۸۹/۲ درصد ایزوله‌ها دارای ژن ermB بودند. با توجه به این‌که *انتروکوک ها* در دستگاه گوارش انسان و حیوانات کلونیزه شده و باعث بیماری می‌شوند، لذا این باکتری‌ها از نظر دامپزشکی و بیماری‌های مربوط به دام نیز حائز اهمیت می‌باشند. این باکتری‌ها با مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات مولد غذا مقاومت کسب کرده و باعث آلودگی گوشت و فراورده‌های گوشتی شده و از این طریق به دستگاه گوارش انسان راه می‌یابند. در سال‌های اخیر مطالعات مشابه زیادی در دامپزشکی بر روی مقاومت به *انتروکوک‌ها* انجام شده است (Obeng et al., 2013).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که تا کنون مقاومت نسبت به ونکومایسین در ایزوله‌های *انتروکوس فکالیس* جدا شده از گوشت مشاهده نگردیده اما مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، سفوتاکسیم، مروپنم، اریترومایسین، تتراسایکلین مشاهده گردیده است. با توجه به مقایسه‌ی درصدهای مختلف نتایج آنتی‌بیوگرام با آزمایش‌های مشابه، باید توجه داشت که تفاوت منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می‌کند

منابع

۱. اصلانی مهر، معصومه، پیمانی، امیر، درزی رامندی، داود، ناصرپور فریور، تقی. (۱۳۹۳). فراوانی ژن‌های *ermA,B,C* در *انتروکوک*‌های مقاوم به اریترومایسین جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان‌های دانشگاهی شهر قزوین و تهران. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. صفحه ۶۶۲-۶۵۵.

۲. میرحسینی، محبوبه (۱۳۹۱). شناسایی *انتروکوکوس* تولیدکننده باکتریوسین در محصولات لبنی به‌وسیله PCR. مجله زیست‌شناسی ایران. صفحه ۳۵۷-۳۵۱.

3. Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E.M., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2007. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. Avian Pathol. 36: 395-399.

4. Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C.G. 2000. Vancomycin resistant *Enterococci*. Clin Microbiol Rev. 13: 680-707.

5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard Ninth Edition (M2-A9). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

6. Emaneini, M., Aligholi, M., Aminshahi, M. 2008. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. Pol J Microbiol. 57: 173-178.

7. Feizabadi, M. M., Maleknejad, P., Asgharzadeh, A., Asadi, S., shokrzadeh, L., Sayadi, S. 2006. Prevalence of aminoglycoside modifying enzymes gene among isolates of *Enterococus faecalis* and Enterococcus faecium in Iran. Microb Drug Resist. 12: 256-268.

8. Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos,P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of *Enterococci* in food and health. Int J Food Microbiol. 106: 1-24.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Jia, W., Li, G., Wang, W. 2014. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species: A Hospital-Based Study in China. Int J Environ Res Public Health. 3424-3442.
10. Kim, J., Lee, S. and Choi, S. 2012. Copper resistance and its relationship to erythromycin resistance in *Enterococcus* isolates from bovine milk samples in Korea. J Microbiol. 50: 540-543.
11. Kühn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L.G.and Blanch, A.R. 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin resistant *Enterococci* in animals, humans, and the environment in different European regions. Appl Env Microbiol. 71: 5383-5390.
12. Lopez, F., Culebras, E., Betriú, C., Rodríguez-Avial, I., Gómez, M., Picazo, J.J. 2010. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes *in Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin dalfopristin: level of quinupristin dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. Diagn Microbiol Infect Dis. 66: 73-77.
13. McDonald, L.C., Kuehnert, M.J., Tenover, F.C., Jarvis, W.R. 1997. Vancomycin resistant *Eenterococci* outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications**.** Emerg Infect Dis. 3: 311-317.
14. Obeng, A.S., Rickard, H., Ndi, O., Sexton, M., Barton, M. 2013. Comparison of antimicrobial resistance patterns in *Enterococci* from intensive and free range chickens in Australia. Avian Pathol. 42: 45-54.
15. Saeed, A.K., Mohamad, S.N., Ashraf, A.K., et al. 2005. Selective isolation of multi drug resistant *Entrococcus* spp. from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Mol Cell Prob. 19: 27-34.
16. Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Naghili, B., Aghazadeh, M., Milani, M.,, et al. 2013. Virulence and antimicrobial resistance in *Enterococci* isolated from Urinary Tract Infections. Adv Pharml Bulletin. 3: 197-201.
17. Sutcliffe, J., Amelia, T.K., Wondrack, L. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system**.** Antimicrob Agents Chemother. 40: 1817-1824.
18. Talon, R., Leroy, S. 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. Meat Sci. 89 (3): 303-309.
19. Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococci* isolated from food stuffs Vet Med. 56: 352–357.
20. Zou, L.K., Wang, H.N., Zeng, B., Li, J.N., Li, X.T., Zhang, A.Y., et al. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. New Microbiol. 34: 73-80.

www.SID.ir

Prevalence of antibiotic resistance genes in *Entrococcus faecalis* isolated from meat in Shahrekord

Karimian H[1], Tajbakhsh E[2]*, Rahimi E[3]

1. MSc. in Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

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

Received: 4 April 2017 Accepted: 5 June 2017

Abstract

In the past two decades, *Enterococci* resistant to some antibiotics has gained widespread that it would cause complications in the treatment of infections caused by these bacteria. Since meat as a foodstuff consumed in Iran is common and easily contaminated with bacteria therefore, we decided to detect frequency of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from meat in Shahrekord. This cross sectional study was conducted on 104 samples of meat in 2016 in Shahrekord. Isolation of bacteria using by biochemical methods and confirmed with detection of 16srDNA gene, and antibiotic resistance genes isolates using by Kirby-Bauer method and molecular method for detection of *tetM*, *ant (2'')*-I, *erm B* and *aac (6')/aph (2')* genes. Most bacterial resistance to streptomycin (2/95%) and sensitivity to vancomycin (100%) were estimated. Prevalence of *ermB* gene reported 76.9% and prevalence of *aac (6')/aph (2')* gene reported 40% in *E. faecalis* isolated. The results indicate that is not resistance to vancomycin *in E. faecalis* isolated from meat in Shahrekord, but high resistance to Streptomycin, Cefotaxime, Meropenem, Erythromycin, Tetracycline were found also found that *ermB* gene in *E. faecalis* high prevalence of antibiotic-resistant gene is the most abundant strength.

Keywords: Antibiotic resistance genes, *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis*, Meat.

www.SID.ir