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 چندگانه‌ای و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن

سجاد علیزاده، کیومرث امینی*

گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

***نویسنده مسئول** : *kamini@iau-saveh.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۳/۲٦

چکیده

استافیلوکوکوس‌اورئوس از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی در جهان بوده که در اثر مصرف غذای آلوده ایجاد می‌شود. *استافیلوکوکوس‌اورئوس* حاوی پنتون والنتین لوکوسیدین (*PVL*) و مقاوم به متی‌سیلین (*mecA*) نسبت به حرارت پاستوریزاسیون و بسیاری از آنزیم‌های پروتئولیتیک پایدار بوده و می‌توانند در نمونه‌های غذایی مدت طولانی فعال باقی بمانند. هدف مطالعه حاضر، جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی ژن حدت پنتون والنتین لوکوسیدین (*PVL*) و ژن مقاومت به متی‌سیلین (*mecA*) در نمونه‌های مواد غذایی با استفاده از تکنیک PCR چندگانه‌ای بوده‌است. در این تحقیق ۱۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف (لبنیات، شیرینی، گوشت خام و سبزیجات) جمع‌آوری گردید. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک‌گذاری بر اساس دستورالعمل CLSI انجام گردید. جهت شناسایی و تایید *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جداسازی شده و ژن‌های حدت و مقاومت از آزمون PCR چندگانه‌ای استفاده شد. در نهایت۴۰ مورد (۳۳/۳ درصد) جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده‌شد. نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد، بیشترین حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، تیکوپلانین و متی‌سیلین به ترتیب ۹۵، ۹۰ و ۷۵ درصد بود. مقاومت به لینزولید، آزیترومایسین و متی‌سیلین به ترتیب ۳۵، ۳۲ و ۲۵ درصد بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود. فراوانی ژن مقاوم به متی‌سیلین در کل نمونه‌ها ۵۷/۵ درصد و ژن *PVL* تشخیص داده نشد. همچنین ژن *16sr RNA* جهت تشخیص گونه باکتری در کل نمونه‌ها شناسایی و تایید گردید. توزیع متفاوت ژن مقاومت به متی‌سیلین در این تحقیق با سایر مطالعات نشان از خطر بالقوه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در دنیا می‌باشد. بنابراین، تشخیص سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم، به منظور جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، متی‌سیلین، لکوسیدین پنتون والنتین، PCR چندگانه‌ای.

مقدمه

برخی از گونه‌های جنس استافیلوکوک برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند (Lawrynowicz et al., 2007). غذا برای ایجاد مسمومیت استافیلوکوکی محیط مناسبی برای رشد باکتری می‌باشد (Ahari et al., 2009). در انسان، این باکتری در قسمت قدامی بینی بزرگسالان وجود دارد و در ۲۰ تا ۳۰٪ از جمیعت انسانی بصورت دائم و پایدار و در۶۰٪ افراد بصورت متناوب دیده می‌شود، لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل‌آوری و توزیع مواد غذایی فعالیت دارند در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی قادر هستند باکتری را به غذا انتقال دهند (Udo, Al-Mufti et al., 2009; Best-Fraser et al., 2011; Koneman et al., 1988). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از رایج‌ترین عوامل شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی است، علاوه بر این عامل ایجاد زخم های پوستی، دمل و برخی باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و مقاوم به درمان می‌باشند (Adwan et al., 2005). مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، در نتیجه مصرف غذای آلوده *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد

می‌شود که علایم آن متغییر بوده و اسهال و استفراغ از علایم بسیار معمول مسمومیت های غذایی استافیلوکوکی هستند (Lawrynowicz et al., 2007). استفاده از روش‌های ایمونولوژیکی، استفاده از تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR و Multiplex PCR برای یافتن باکتری دارای ژن کدکننده سم مناسب است (Cremonesi et al., 2005). از طرفی دیگر، مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* در سراسر جهان نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج روبه افزایش بوده که خطر جدی در جهت افزایش مقاومت به عوامل آنتی‌باکتریال مطرح می‌باشد. *PVL*[1] یک توکسین سلولی است اولین بار در سال ۱۹۳۰ در *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شد و توسط اکثر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود (Panton et al., 1932). این توکسین علیه گلبول‌های سفید پلی‌مورفونوکلئر و ماکروفاژها عمل می‌کند و باعث افزایش قدرت نفوذپذیری غشاء سلولی و در نتیجه سبب لیز شدن لکوسیت‌ها و نکروز بافت می‌شود (Younis et al., 2005). این سم دارای دو جزء است که هر دو جزء لکوسیدین آنتی‌ژنیک بوده و قابل تبدیل به توکسوئید می‌باشد. این سم با ایجاد مقاومت در مقابل فاگوسیتوز قدرت تهاجمی استافیلوکوک را افزایش می‌دهد. این توکسین جذب گردش خون شده و با علائم بالینی موجب گرفتاری چندین عضو مختلف می‌شود، که شامل تب، کاهش فشار خون اسهال، درد عضلانی، پنومونی‌های نکروزدهنده و بثورات شبه مخملکی است (Panton et al., 1932; McClure et al., 2006).

مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به متی‌سیلین، ناشی از حضور ژن *mecA*[2] است که رمزکننده یک پروتئین متصل‌شونده به پنی سیلین ۷۸ کیلو دالتونی (PBP2a) می‌باشد (Gunawardena et al., 2012). پاتوژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی لکوسیدین پنتون والنتین و 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 (Younis et al., 2005). تقریباً تمام کشورهای جهان با مشکل مواد غذایی درگیر می‌باشند. مطابق تحقیقات صورت گرفته، ۴۰-۱۴ درصد بیماری‌های منتقله از راه غذا، توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد می‌گردند (Manfreda et al., 2005). همچنین برای بروز ژن *PVL* و ایجاد مقاومت، حضور ژن *mecA* ضروری است (McClure et al., 2006). به جهت اهمیت حضور این دو ژن در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به جهت افزایش بیماری‌زایی و مقاومت به درمان و انتقال از راه غذا، این تحقیق با هدف شناسایی سریع ژن حدت *PVL* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی با روش PCR چندگانه‌ای انجام گردید.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی

تعداد ۱۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف (شیر و فرآورده-های لبنی، گوشت خام، شیرینی حاوی خامه و سبزیجات) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

این نمونه‌ها را بر روی محیط‌های بلاد آگار، مانیتول سالت آگار، بردپارکر آگار و کروم آگار *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. بعد از شناسایی و تایید حضور باکتری، در نهایت تعداد ۴۰ جدایه باکتری

1 Panton Valentine leukocidin
2 Methicillin resistance

استافیلوکوکوس اورئوس از مجموع ۱۲۰ نمونه جداسازی گردید.

آزمون آنتی‌بیوگرام

جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک‌گذاری[3] به روش کربی بائر[4] و بر طبق دستورالعمل CLSI[5] استفاده گردید (CLSI., 2012). تعدادی از کلونی باکتری در سرم فیزیولوژی استریل مخلوط نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد، سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار گرفت و در دمای ۳۷ درجه انکوبه و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید (CLSI., 2012). جهت انجام این آزمون دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، لینزولید (۳۰ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، متی‌سیلین (۵ میکروگرم)، دالفوپریستین /کوینوپریستین (۱۵ میکروگرم) از شرکت هایمدیا[6] تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد *استاف اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA

جهت انجام این آزمون، باکتری‌های جداسازی شده را در محیط لوریا برتانی براث کشت داده و سپس بر طبق دستورالعمل کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت سیناژن[7] استخراج DNA انجام گردید.

برنامه آزمون Multiplex-PCR

مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، 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. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده‌است (McClure et al., 2006). مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۱۶/۸ میکرولیتر، 1X. PCR buffer به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، (dNTP mix (5Mm 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 ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده‌شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

3 Disk diffusion
4 Kirby-Bauer
5 Clinical and Laboratory Standards institute
6 Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA
7 Cinna Pure DNA KIT-PR881614

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Multiplex-PCR

پرایمر	توالی پرایمر(5’ to 3’)	ژن هدف	طول محصول (bp)
staph756F	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA	*16S rRNA*	۷۵۶
Staph750R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCACC	*16S rRNA*	۷۵۶
Luk-PV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	*LukS/F-PV*	۴۳۳
Luk-PV-2	GCATCAA GTGTATTGGAT AGCAAAA GC	*LukS/F-PV*	۴۳۳
mecA1	GTAGAAATGA CTGAA CGTCCGATAA	*mecA*	۳۱۰
mecA2	CCAATTCCACATTGT TTCGGTCTAA	*mecA*	۳۱۰

جدول ۲- میزان حساسیت سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

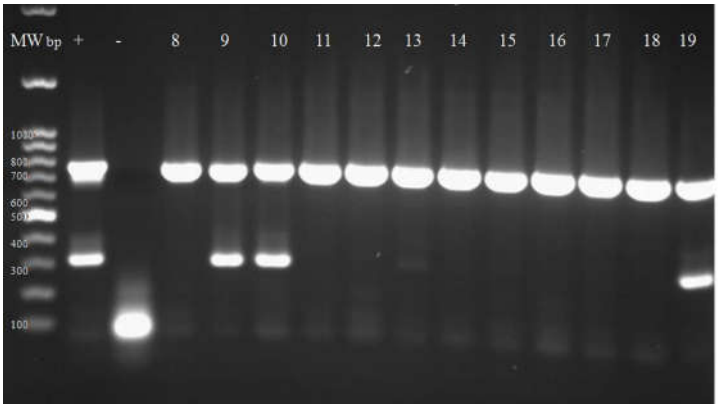
نوع آنتی‌بیوتیک	میزان مقاومت (٪)	حساسیت متوسط (٪)	میزان حساسیت (٪)
آزیترومایسین	۳۲	۲۵	۴۳
کلیندامایسین	۱۷	۳۵	۴۸
لینزولید	۳۵	-	۶۵
اوفلوکساسین	۲۷	۷	۶۶
تیکوپلانین	-	۱۰	۹۰
ونکومایسین	-	۵	۹۵
متی‌سیلین	۲۵	-	۷۵
(دالفوپریستین/کوینوپریستین)	۱۰	۲۷	۶۳

جدول ۳- توزیع فراوانی بر حسب ژنهای *mecA, Luks/F-PV, 16srRNA* در نمونه‌های مواد غذایی

نوع ژن	فراوانی	درصد
mecA	۲۳	٪۵۷/۵
Luks/F-PV	۰	۰
16srRNA	۴۰	٪۱۰۰

جدول ۴- توزیع فراوانی ژن‌های *mecA, Luks/F-PV, 16srRNA* به تفکیک نمونه‌های مواد غذایی

نوع ژن	لبنیات		شیرینی جات		گوشت خام		سبزیجات	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
mecA	۱۲	٪۶۰	۴	٪۵۷/۱	۴	٪۵۷/۱	۳	٪۴۲/۸
Luks/F-PV	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
16srRNA	۲۰	٪۱۰۰	۷	٪۱۰۰	۷	٪۱۰۰	۶	٪۱۰۰



شکل ۱- نتایج Multiplex PCR

از سمت چپ به ترتیب Ladder 100 bp- سویه استاندارد کنترل مثبت - کنترل منفی - نمونه۸ تا ۱۹ دارای ژن (756bp) *16S rRNA* gene می‌باشند. نمونه ۱۹-۱۰-۹ دارای ژن (310bp) *mecA* gene می‌باشند

نتایج

در این تحقیق از میان ۱۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف جمع‌آوری شده، ۴۰ مورد (۳۳/۳٪) جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید. میزان حساسیت سویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در جدول شماره ۲ ذکر شده است. بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین، تیکوپلانین و متی‌سیلین به ترتیب ۹۵، ۹۰، ۷۵ درصد و بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک لینزولید ۳۵ درصد گزارش شده‌است. ژن *16S rRNA* جهت شناسایی و تایید باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انتخاب گردید که کل ۴۰ نمونه تایید شده با آزمون‌های بیوشیمیایی با این ژن نیز تایید قطعی گردیدند. فراوانی ژن‌های *mecA* و *Luk-PV* و *16S rRNA* در جدول ۳ گزارش شده است. در جدول ۴ فراوانی ژن‌های مورد مطالعه به تفکیک نوع ماده غذایی بیان شده‌است که ماده غذایی لبنیات بیشترین فراوانی را از نظر مقاومت به متی‌سیلین دارا بود. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ژن‌ها و محصول PCR در شکل۱ ذکر شده‌است.

بحث

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، از شایع‌ترین موارد مسمومیت‌های غذایی باکتریایی می‌باشد. طبق گزارشات، ۴۰-۱۴ درصد همه موارد بیماری‌های منتقله از راه غذا را به این باکتری نسبت می‌دهند (Manfreda et al., 2005). در مطالعه Little و همکاران بین سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۰۵ در کشور انگلستان نتایج نشان داد که با ایجاد شرایط بهداشتی مناسب می‌توان از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد و پنیرهایی که از شیرخام به‌دست می‌آیند میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتری نسبت به پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه دارند (Little et al., 2008).

در پژوهش اخیر نیز بیشترین میزان آلودگی مربوط به لبنیات با ۲۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس بود* که بیشترین فراوانی را در بین سایر مواد غذایی شامل می‌شد. در بین سایر نمونه‌ها نیز، شیرینی و گوشت خام تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده این مواد از سیزیجات بیشتر بوده‌است که به علت استفاده از فرآورده‌های لبنیات در تولید شیرینی قابل توجه است. اهمیت این موضوع بخصوص در افرادی که حامل این باکتری بوده و به‌طور مداوم با مواد غذایی تماس مستقیم دارند، از این طریق می‌توانند مواد غذایی را آلوده نمایند. بنابراین افرادی که حامل *استافیلوکوکوس اورئوس در بینی* می‌باشند به عنوان منبعی برای انتشار آلودگی محسوب می‌شوند (Khakpoor et al., 2013). یکی از مسائل مهم در درمان بیماری‌ها، مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و منشاء کروموزومی دارد. درحالی‌که مقاومت اکتسابی در اثر قرار گرفتن در معرض عوامل مختلف و تبدیل سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود (McClure et al., 2006). امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی‌رویه و روزافزون داروها بوده و متأسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. باکتری‌ها به راحتی می‌توانند ژن‌های مقاومتی که بر روی عناصر متحرک ژنتیکی (پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها) قرار دارد را از یک باکتری به باکتری دیگر انتقال دهند (Fluit et al., 2001). لذا این احتمال وجود دارد که مواد غذایی از جمله آب میوه‌ها و به خصوص فرآورده‌های لبنی با توجه به مصرف بالا در بین آحاد جامعه بتوانند در

انتقال مقاومت‌های دارویی نقش مهمی ایفا نمایند (شرافتی و همکاران، ۱۳۸۸). ژن *PVL* یک فاکتور واگیرداری است که همراه با عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین[8] است که کشف آن زمان زیادی را به خود اختصاص می‌دهد و بستگی به محیط کشت آن دارد. با توجه به مطالعاتی که صورت گرفته درصد فراوانی ژن *PVL* در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین بیشتر است. بنابراین در این تحقیق با توجه به نتایج حاصل از آزمایش دیسک-گذاری و مقایسه آن با الگوی استاندارد، بیشتر ایزوله-های جدا شده و مورد بررسی نسبت به متی‌سیلین حساس هستند و نشان‌دهنده عدم بروز ژن *PVL* در سویه‌های مورد بررسی می‌باشد، که تاییدکننده این مطلب است که برای بروز ژن *PVL* و ایجاد مقاومت، حضور ژن *mecA* ضروری است (McClure et al., 2006). همچنین Martínez و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی بر روی کودکان عفونی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند، تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. در نهایت به این نتیجه دست یافتند که میزان شناسایی ژن *PVL* با روش ملکولی در کودکانی که به متی-سیلین مقاوم بوده‌اند به مراتب از سایر کودکان که به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین حساسیت نشان داده‌اند بیشتر بوده‌است (Martínez et al., 2004). Bentzmann و همکاران طی تحقیق خود در سال ۲۰۰۴، به مقایسه تاثیرات *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* دارای ژن *PVL*[9] و *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* فاقد ژن *PVL*[10] در ایجاد پنومونی‌های نکروزدهنده پرداختند. همچنین در نتایج مطالعه خود به این نکته اشاره نمودند که *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* PPSA در مقایسه با PNSA آسیب‌های بافتی بیشتری را در بافت‌های اپی-تلیال ایجاد می‌نمایند (Bentzmann et al., 2004). طی تحقیقی که در مصر سال ۲۰۱۰ انجام گرفت مشخص شد، علیرغم انتشار جهانی حضور ژن *PVL* در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (مقاومت اکتسابی)، این ژن در کشور مصر شناسایی نگردید. و *PVL* یک مارکر خوب برای شناسایی این سویه‌ها می-باشد (Enany et al., 2010). در پژوهش اخیر عدم جداسازی ژن *PVL* در نمونه‌های مواد غذایی می‌تواند تایید نتایج تحقیقات محققین ذکر شده باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که تحقیق حاضر در مقایسه با سویه-های جداشده از سایر نقاط کشور، با امکان بررسی وجود و عدم وجود ژن *PVL*، فاکتور مناسبی برای بررسی پراکندگی جغرافیایی این سویه‌ها است. مختاری و همکاران در مطالعه سال ۲۰۱۳ به بررسی میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک در مخازن جمع‌آوری شیر خام پرداختند. این مطالعه که بر روی ۷۹ مخزن جمع‌آوری شیرخام از چهار نقطه ایران انجام شد، ۳۲/۹ درصد نمونه‌های شیر خام حاوی آنتی‌بیوتیک بودند (Mokhtari et al., 2013). شرافتی چالشتری و همکاران در سال ۱۳۸۶ به مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوک‌های جداشده از آب میوه‌ها (سیب و پرتقال) با الگوی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مجزا شده از نمونه‌های بالینی بر روی ۱۱۱ نمونه در شهرکرد پرداختند. بر اساس یافته‌های این مطالعه، ایزوله‌های جداشده از آب میوه‌ها و نمونه‌های - بالینی الگوی مقاومت یکسانی را نشان دادند (شرافتی و همکاران، ۱۳۸۸). در مطالعه دیگری که توسط خاکپور و همکاران سال ۲۰۰۹ در آذربایجان غربی بر روی پنیرهای محلی انجام شد، مشخص گردید که ۷/۰۵ درصد نمونه پنیرهای سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس*

8 Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*
9 Positive Panton Valentine leukocidin *Staphylococcus aureus* (PPSA)
10 Negetive Panton Valentine leukocidin *Staphylococcus aureus* (NPSA)

آلوده بودند (Khakpoor et al., 2013). در مطالعه Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداشده از مواد غذایی مختلف ۳۸ درصد به عنوان سویه های مقاوم به متی-سیلین گزارش شدند (Pereira et al., 2009). دکتر سلطان دلال و همکاران طی تحقیقی که در سال ۱۳۸۷ در نقاط مختلف شهر تهران انجام دادند، مشخص گردید که میزان سویه‌های مقاوم به متی-سیلین در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از موادغذایی مختلف درصد قابل توجهی می‌باشد. به همین جهت توجه بیشتر به چگونگی انتشار این سویه‌های مقاوم از طریق موادغذایی حائز اهمیت می‌باشد (Soltan et al., 2009). در مطالعه اخیر نیز میزان مقاومت به متی‌سیلین با روش دیسک دیفیوژن ۲۵ درصد و میزان فراوانی حضور ژن *mecA* در بین نمونه‌های مواد غذایی ۵۷/۵ درصد گزارش شده‌است، که این میزان در مقایسه با مطالعات دیگر قابل توجه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نکته قابل‌توجه این است که میزان مقاومت به متی-سیلین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه در این تحقیق، با بعضی از مطالعات مشابه دیگر در نقاط مختلف جهان و ایران متفاوت است. این اختلافات می توانند ناشی از توزیع متفاوت ژن مقاومت در برابر متی‌سیلین در مکان‌های مختلف و یا مربوط به روش تعیین آنها می‌باشد (Enany et al., 2010). ولی موضوع مشترک در بین تمام این تحقیقات، گستردگی زیاد سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در جهان است که نشان از خطر بالقوه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در دنیا می‌باشد. بنابراین، تشخیص سریع و به موقع جدایه‌های مقاوم، به منظور جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید دو فاکتور عمده یعنی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت.

تشکر و قدردانی

نگارندهٔ این مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد جناب آقای مهندس ابوالفضل مقدم و رامین خاکی-جوان که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد. همچنین از زحمات و تلاش‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر علیرضا مختاری تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. شرافتی چالشتری، رضا.، شرافتی چالشتری، فرهاد.، زمان‌زاد، بهنام، (۱۳۸۸). مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (آنتی بیوتایپینگ) استافیلوکوک‌های جداشده از آب میوه‌ها (سیب و پرتقال) با الگوی سویه-های استافیلوکوک مجزا شده از نمونه‌های بالینی، شهرکرد، ۱۳۸۶، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۵۸-۵۲.

2. Adwan, G., Abu-Shanab, B. and Adwan, K. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. Turk J Biol. 29: 229-232.
3. Ahari, H., Shahbazzadeh, D. and Misaghi, A. 2009. Selective amplification of *SEA*, *SEB* and *SEC* genes by multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus*. Pakistan J Nutr. 8: 1224-1228.
4. Best, N., Fraser, J.D., Rainey, P.B., Roberts, S.A., Thomas, M.G., and Ritchie, S.R. 2011.

Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. J NewZealand Med Associ. 124: 31-39.

5. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved Standard Eleventh Edition. Cockerill, F.R., CLSI. 32: M02-A11.
6. Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini D., Caramenti G., Moroni P., and Castiglioni B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol Cell Probes. 19: 299-305.
7. De Bentzmann, S., Tristan, A., Etienne, J., Brousse, N., Vandenesch, F., and Lina, G. 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. J Infect Dis. 190: 1506-1515.
8. Enany, S., Yaoita, E., Yoshida, Y., Enany, M., and Yamamoto. 2010. Molecular characterization of Panton-Valentine leukocidin positive community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Egypt. Microbiol Res. 165: 152-162.
9. Fluit, A. C., Visser, M.R., and Schmitz, F.J. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 14: 836-871.
10. Gunawardena, N. D., Thevanesam, V., Kanakaratne, N., Abeysekera, D., Ekanayake, A., and Perera, N. 2012. Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in *Staphylococcus aureus*. Sri Lankan J Infect Dis. 2: 18-29.
11. Mola- Abaszadeh, H. 2012. Determines Panton-Valentine leukocidin (*PVL*) gene in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients Imam Reza and Tabriz martyrs Hospital by Real-Time PCR [abstract]. Sixth Congress of Clinical Microbiology and First International Congress of Clinical Microbiology. Mashhad Medical Journal.
12. Khakpoor, M., Ezzati, M., Mahmoodi, K., Khalaji-Pirbaluti, M., and Khaksar, R. 2013. Prevalence of Coagulase positive *Staphylococcus aureus* in local Cheese in West Azerbaijan with culture and PCR method. Iranian J Nutr Sci Food Technol. 7: 238-242.
13. Lawrynowicz-Paciorek, M., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A., and Windyga, B. 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. Int J Food Microbiol. 117: 319-323.
14. Little, C., Rhoades, J., Sagoo, S., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant K., and McLauchlin J. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol. 25: 304-312.

15. Manfreda, G., Mioni R., and Cesare, A. 2005. Surveillance and characterization of enterotoxigenic Staphylococci in foods of animal origin collected in the Veneto region. Vet Res Commun. 29: 331-333.
16. Martínez, A.G., Avalos-Mishaan, A., Hulten, K., Hammerman, W., Mason, Jr., Edward, O., and Kaplan, S.L. 2004. Community-acquired methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. Pediatr Infect Dis J. 23: 701-706.
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. Mokhtari, A., Hosseini, B., and Panahi, P. 2013. ß–Lactams and tetracyclines antibiotic residue detection in bulk tank milk in Iran. Iranian J Public Health. 42: 447-448.
19. Panton, P.N., Came, M.B., and Valentine, F.CO. 1932. Staphylococcal toxin. The Lancet. 1:506-508.
20. Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., and Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol. 26: 278-282.
21. SoltanDalal, M.M., Panahi, E., Saberpour, F., Fazelifard, P., Tabatabaei Bafrouei, A., Fakharian, F., AghaAmiri, S., Rashidi, S., Abedi Mohtasab, T., and Vahedi, S. 2009. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain from food in tehran. J Microbiol Biotechnol. 1: 1-9.
22. Udo, E.E., Al-Mufti, S., and Albert, M.J. 2009. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants. Bio Med Central Res Notes. 2: 108-109.
23. Younis, A., Krifucks, O., Fleminger, G., Heller, E.D., Gollop, N., Saran, A., and Leitner, G. 2005. *Staphylococcus aureus* leucocidin a virulence factor in bovine mastitis. J Dairy Res. 72: 188-194.

Determining the presence of virulence genes Panton Valentine leukocidin *PVL* and methicillin resistance gene *mecA* in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples by Multiplex PCR and antibiotic resistance

Alizadeh S[1], Amini K[2*]

1. Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, sirjan, Iran.

* Corresponding author: *kamini@iau-saveh.ac.ir*

Received: 5 May 2015 Accepted: 16 June 2015

Abstract

Staphylococcus aureus is a major cause of food poisoning in the world that is created by consumption of contaminated food. Resistance to a variety of common and specific antibiotics is increasing. *Staphylococcus aureus* including *PVL* and gene *mecA* to heat pasteurization and many proteolytic enzymes are stable and can remain active for a long time in food samples. The purpose of this study was to isolate *Staphylococcus aureus* and identify virulence gene *PVL* and gene of methicillin resistance in food samples by multiplex PCR technique has been used. The study included 120 samples of various foods (dairy, confectionery, meat and vegetables) collected 40 cases (33/3%) *Staphylococcus aureus* isolates were detected. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method according to CLSI guidelines was conducted. To identify and confirm *Staphylococcus aureus* virulence and resistance genes from multiple PCR assay was used. Antibiogram results showed that antibiotics are among the most sensitive to the antibiotic vancomycin, Teicoplanin and methicillin respectively 95%, 90% and 75%. Resistance to linezolid, azithromycin and methicillin respectively, 35%, 32% and 25% more than other antibiotics was tested. Prevalence of methicillin resistance gene *mecA* in total 57.5% and *PVL* gene was not detected. Also *16srRNA* gene in all samples was identified genus and species and confirmed. Different distribution of methicillin resistance gene in this study with other studies showing the potential risk of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the world. Therefore, early detection and timely resistant strains, in order to prevent the spread of resistance appears to be necessary.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Methicillin, Pantone Valentine leukocidin, Multiplex-PCR