بررسی مقایسه مولکولی مقاومت به فلزات سنگین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه غذایی و بالینی

فرزانه حسینی [1*]، مریم ذبیحی [2]، زهراشوقی[3]، فاطمه حیدری[4]، ساجده نوروزیان لنگرودی[5]

۱. استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴.دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی و عفونت های بیمارستانی درجهان می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع ژنهای CzrC و mecA درسویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی، آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی آنها و تعیین حساسیت سویه ها به فلزات روی و کادمیوم به روش MIC می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق تعداد ۲۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از مواد غذایی و نمونه های بالینی جمع-آوری و در محیط‌های اختصاصی کشت داده و با آزمونهای بیوشیمیایی تایید شد. آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC علیه فلزات روی و کادمیوم انجام گردید. جهت شناسایی ژن‌های مقاومت mecA و CrcZ از آزمون PCR Multiplex استفاده شد.

یافته ها: هر ۲۴ جدایه با استفاده از کشت و آزمونهای بیوشیمیایی به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید شدند. نتایج آنتی بیوگرام نمونه ها نشان داد بیشترین حساسیت در نمونه های غذایی نسبت به تیکوپلانین (۱۰۰٪) و بیشترین مقاومت به آنتی-بیوتیک های کلیندامایسین و آزیترومایسین (۳۳/۳٪) بود. در نمونه های بالینی نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۹۱/۷٪) و بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی سیلین (۵۸/۳٪) بدست آمد. فراوانی ژن مقاوم به متی‌سیلین و czrC در نمونه‌های غذایی به ترتیب ۱۶/۶ و ۵۰ ٪ و در نمونه های بالینی به ترتیب ۵۰ و ۷۵ ٪ مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون MIC نشان داد که کمترین غلظت تاثیر نمک کادمیوم بر روی نمونه های غذایی ۰/۶۲ppm و در نمونه های انسانی ppm ۰/۳ بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ppm ۰/۰۷ حساس بوده اند.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بالای ژنهای mecA و czrC در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی می باشد. به علاوه نشان داده شد میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این سویه ها نسبت بسیار زیاد می باشد که این امر هشداری جدی می باشد و تشخیص سریع جدایه‌های مقاوم جهت جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی بیوتیکی ، czrC ، mecA، Multiplex PCR

Molecular comparison of resistance to heavy metals in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples

Farzaneh Hoseini[1*], Maryam Zabihi[2], Zahra Shoghi[3], Fatemeh Heydari[4], Sajedeh Noruzian langroodi[5]

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
2. MS degree students, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
3. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
4. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
5. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of food poisoning and nosocomical infections throughout the world. The aims of this study were to identify the prevalence of CzrC and mecA genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples, antibiotic susceptibility testing and determination of the sensivity of the isolates against Zinc and Cadmium by MIC method.

Methods: In this study, 24 *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples were collected and and confirmed by culture in specific media and biochemical tests.Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method and MIC test against Zinc and Cadmium was performed. Multiplex-PCR was carried out to identify mecA and CrcZ resistance genes.

Results: All of the 24 isolates were confirmed as *Staphylococcus aureus* by culture and biochemical tests. The results of Antibiogram showed the most sensivity in food samples was to teichoplanin (100%) and the most resistance was to clindamycin and azithromycin (33.3%). In clinical samples the most sensivity was to vancomycin (91.7%) and the most resistance was to methicillin (58.3%). The methicillin resistance gene and czrC in food samples were 16.6 and 50 percent and in clinical samples were 50 and 75 percent. MIC test results showed the minimum effect of Cadmium in food samples was 0.62 PPM and in clinical samples was 0.3 PPM. In Zinc sulphate results it was found that both food and clinical samples were sensitive to 0.07 PPM.

Conclusion: The present study shows the high prevalence of mecA and czrC in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. In addition it was shown that the antibiotic resistance in these strains is very high which is serious alarm and rapid and early diagnosis of resistant isolates is essential to prevent spread of resistance.

Keywords: *Staphylococcus auereus*, Antibiotic resistance, czrC, mecA, Multiplex PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus auereus*) یک باکتری‌گرم مثبت است که بخشی از فلور طبیعی پوست و مجاری بینی می‌باشد و به عنوان دومین پاتوژن بیمارستانی محسوب می شود. این باکتری می تواند موجب طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل عفونت‌های پوستی، مسمومیت غذایی، پنومونی، سپتی‌سمی، اندوکاردیت، آبسه‌های مغزی، انتروکولیت استافیلوکوکی و سندرم شوک سمی شود (۱). این باکتری از مهم ترین عوامل منتقله از مواد غذایی (Food Borne Diseases) می باشد که باعث ایجاد مسمومیت غذایی و گاسترو انتریت می گردد. وقوع بیماری های منتقله از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استانداردهای بالای بهداشتی نیز رو به افزایش است. تا به امروز ۲۵۰ بیماری مختلف منتقله از مواد غذایی تعریف شده و باکتری ها مسئول دو سوم شیوع این بیماریها هستند (۲). مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در نتیجه مصرف غذای آلوده به انتروتوکسین استافیلوکوکی ایجاد می شود و اسهال و استفراغ از علائم معمول این مسمومیت هستند (۳).

نویسنده مسئول: استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک :
hosseinimicrobiology@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

امروزه گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمتر ین مشکلات موجود در درمان این بیماری می باشد. مقاومت این باکتری به متی سیلین یک عامل نگران کننده است که در نتیجه مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ایجاد شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) (Methicillin resistant Staphylococcus aureus)اولین بار در یک عفونت بیمارستانی در دهه ۱۹۷۰ شناسایی شد و به سرعت در جهان گسترش یافت و امروزه یکی از معضلات عفونت های بیمارستانی می باشد. علت بروز این مقاومت وجود ژن mecA می باشد که وابسته به کروموزوم می باشد (۴ و ۵). کلرید روی و کادمیوم به عنوان افزودنی در مواد ضدعفونی کننده در بیمارستانها استفاده می شوند اما امروزه شیوع مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به این دو فلز سنگین گزارش شده است. مقاومت به فلزات روی و کادمیوم توسط ژن czrC کد می شود (۶). متاسفانه در مورد حضور این ژن مواد غذایی و بالینی بویژه در ایران مطالعات بسیار اندک بوده است. با توجه به گسترش روزافزون این باکتری باید به اهمیت جدا سازی آن از مواد غذایی و بالینی تاکید نمود و به این وسیله به دنبال راهکارهای جدید برای جلوگیری از شیوع، انتقال و گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و مواد ضدعفونی کننده بود. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نمونه های غذایی و بالینی به نمک های فلزات سنگین، بررسی شیوع ژنوتیپی آن از نظر حضور ژن مقاومت به کادمیوم و روی (czrC) و مقاومت به متی سیلین (mecA) با استفاده از تکنیک PCR چندگانه، تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به روش دیسک دیفیوژن و بررسی مقاومت به فلزات سنگین به روش میکرودایلوشن MIC می باشد.

مواد و روش ها

تعداد ۲۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* که ۱۲ نمونه مربوط به نمونه های بالینی و ۱۲ نمونه مربوط به نمونه های مواد غذایی بودند، از میان مجموع ۸۰ نمونه جمع آوری گردید. بعد از جمع آور ی سویه ها ، بر رو ی محیط ها ی کشت بلاد آگار و مانیتول سالت آگار کشت و به مدت ۲۴ساعت انکوبه گردید، سپس کلنی ها رنگ آمیزی و تست های DNase، کاتالاز، کوآگولاز انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه سویه های بالینی از بیمارانی جدا شده بود که در آنها *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل اصلی بیمار ی بود . آنتی بیوگرام برای جدایه های استافیلوکوکوس از طریق روش دیسک دیفوزیون بر اساس راهنمای استاندارد CSLI انجام شد (۷ و ۸). در این آزمایش حساسیت به آنتی بیوتیک های آزیترومایسین، کلیندامایسین، لینزولید، اوفلوکساسین، تیکوپلانین، ونکومایسین، متی‌سیلین و دالفوپریستین/کوینوپریستین سنجیده شد. جهت بررسی اثر نمک‌های سولفات روی و کادمیوم با استفاده از روش تهیه رقت های سریالی(Micro dilution Broth) حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری MIC(Minimum Inhibitory Concentration) مشخص شده و سپس جهت تعیین (MBC) حداقل غلظت کشندگی باکتری(Minimum Bactericidal Concentration) علیه باکتری‌های مورد آزمایش از گوده های رشد یافته کشت انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام شد. جهت شناسایی ژنهای مقاومت به متی سیلین از پرایمر mec و مقاومت به فلزات روی و کادمیوم از پرایمر czrC استفاده شد. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵mMکلرید منیزیم، ۲۵۰ µmol از dNTP، ۰/۴ µmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن های حدت و ۱/۵ واحد ازTaq پلی مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۰ نانو گرم) الگو انجام شد. شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

یافته ها

تمامی نمونه ها با استفاده از آزمایشات میکروبی و بیوشیمیایی به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید گردیدند. نتایج آنتی بیوگرام نمونه ها نشان داد بیشترین حساسیت در نمونه های غذایی نسبت به تیکوپلانین (۱۰۰٪) و بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین و آزیترومایسین (۳۳/۳٪) بود. در نمونه های بالینی نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۹۱/۷٪) و بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی سیلین (۵۸/۳٪) بدست آمد (جدول ۲). نتایج MIC نشان داد که کمترین غلظت تاثیر فلزات سنگین بر روی نمونه های غذایی نمک کادمیوم ppm ۰/۶۲ و در نمونه های بالینی ppm ۰/۳ بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ppm ۰/۰۷ حساس بوده و تفاوتی در نتایج مشاهده نشد. در مجموع میزان مقاومت به کادمیوم بیشتر از روی بوده است (جدول ۳). نتایج PCR نشان داد که میزان

فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین (mecA) در نمونه های غذایی ۱۶/۶٪ و در نمونه های بالینی ۵۰٪ بود. همچنین میزان فراوانی ژن مقاومت به فلزات روی و کادمیوم (CzrC) در نمونه های غذایی ۵۰٪ و در نمونه های بالینی ۷۵٪ بود (شکل ۱ و ۲).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	اندازه باند(bp)
czrC	czrC-F	5'- TAGCCACGATCATAGTCATG -3'	۶۶۵
	czrC-R	5'- ATCCTTGTTTTCCTTAGTGACTT-3'	
mecA	Mec-F	5'- GGTGAAGTAGAAATGACTGAACGT-3'	۲۶۴
	Mec-R	5'- CAATATGTATGCTTTGGTCTTTCTGC-3'	

جدول ۲. میزان حساسیت سویه‌های استافیلوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی بیوتیک	حساس (٪)		حساسیت متوسط (٪)		مقاوم (٪)	
	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
آزیترومایسین	۴۱/۷	۵۰	۲۵	۲۵	۳۳/۳	۲۵
کلیندامایسین	۵۳/۴	۵۳/۴	۸/۳	۸/۳	۳۳/۳	۳۳/۳
لینزولید	۷۵	۸۳/۴	-	-	۲۵	۱۶/۶
اوفلوکساسین	۵۸/۴	۶۶/۶	۱۶/۶	-	۲۵	۳۳/۳
تیکوپلانین	۱۰۰	۹۱/۷	-	۸/۳	-	-
ونکومایسین	۹۱/۷	۹۱/۷	۸/۳	۸/۳	-	-
متی‌سیلین	۸۳/۴	۳۳/۳	-	۸/۳	۱۶/۶	۵۸/۳
دالفوپریستین/کوینوپریستین	۶۶/۶	۶۶/۶	۱۶/۶	۲۵	۱۶/۶	۸/۳

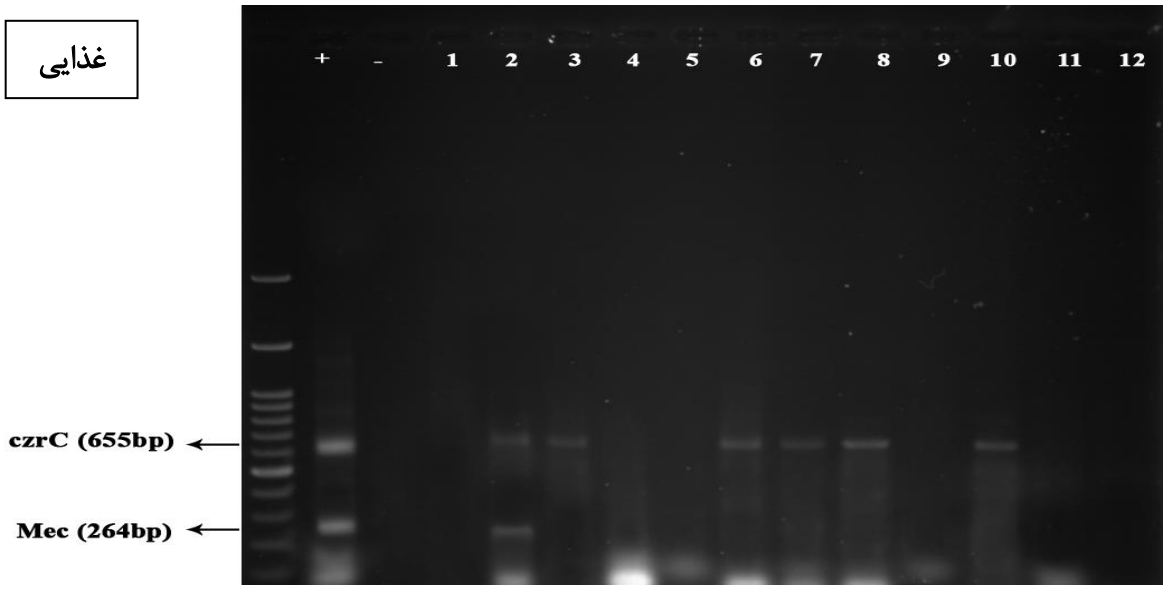
جدول ۳. نتیجه آزمون MIC نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نمک کادمیوم

شماره نمونه	میزان MIC (ppm)		میزان MBC (ppm)	
	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱	/۶۲.	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵
۲	/۶۲.	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵
۳	/۶۲.	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵
۴	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵	۲/۵
۵	/۶۲.	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵
۶	۱/۲۵	/۳.	۲/۵	۰/۶۲
۷	۱/۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۲/۵
۸	/۶۲.	/۳.	۱/۲۵	۰/۶۲
۹	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵	۲/۵
۱۰	/۶۲.	/۶۲.	۱/۲۵	۱/۲۵
۱۱	/۶۲.	/۳.	۱/۲۵	۰/۶۲
۱۲	/۶۲.	/۳.	۱/۲۵	۰/۶۲

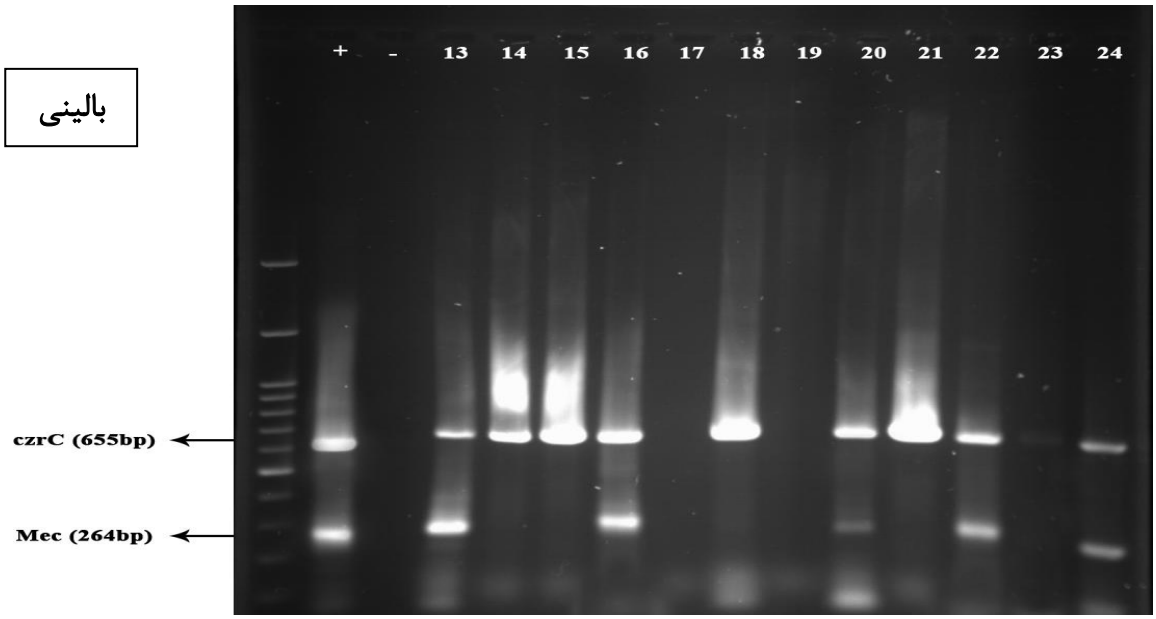
جدول ۴. نتیجه آزمون MIC نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نمک سولفات روی

شماره نمونه	میزان MIC (ppm)		میزان MBC (ppm)	
	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۱۵
۲	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳
۳	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵
۴	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵
۵	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵	۰/۶۲
۶	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۱۵
۷	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵	۰/۶۲
۸	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵	۰/۶۲
۹	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵

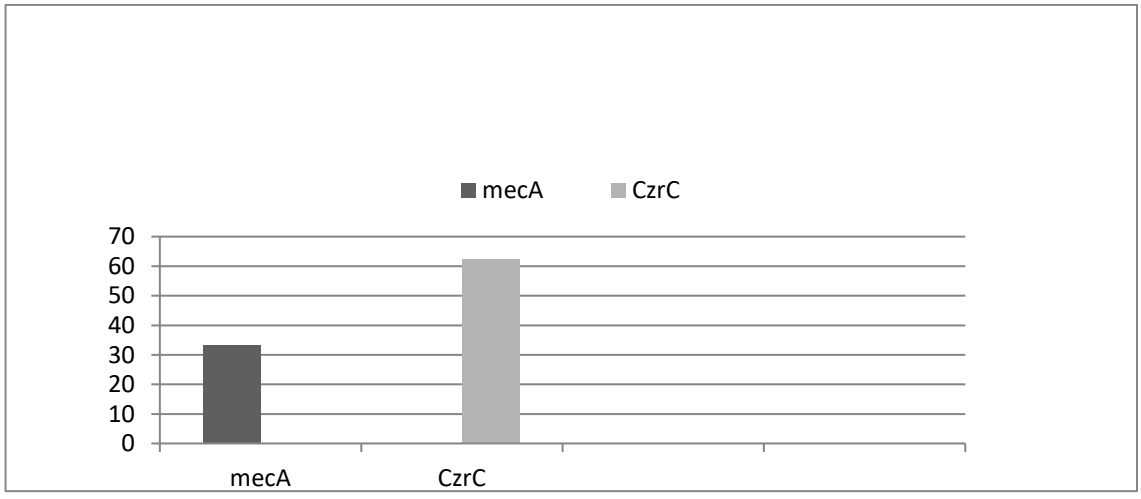
۱۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳	۰/۳
۱۱	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳
۱۲	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۳	۰/۱۵



شکل ۱. نتایج آزمون Multiplex PCR نمونه های غذایی: از سمت چپ به ترتیب Ladder 100 bp، سویه استاندارد کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه ۱ تا ۱۲ نمونه های غذایی که شماره ۲ واجد ژن mecA و شماره های ۲، ۳، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ دارای ژن CzrC می‌باشند



شکل۲. نتایج آزمون Multiplex PCR نمونه های بالینی: از سمت چپ به ترتیب Ladder 100 bp، سویه استاندارد کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه ۱۳ تا ۲۴ نمونه های انسانی که شماره ۱۳، ۱۶، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ واجد ژن mecA و شماره های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۴ دارای ژن CzrC می-باشند



شکل۳.توزیع میانگین فراوانی ژن هایmecA و CzrC در نمونه های انسانی و غذایی

نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئورس یکی از شایع ترین باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی و مواد غذایی می باشد. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، درصد زیادی از مسمومیت‌های غذایی باکتریایی را شامل می‌شود. طبق گزارشات، ۴۰-۱۴درصد همه موارد بیماریهای منتقله از راه غذا را به این باکتری نسبت می دهند (۹). به جهت اهمیت حضور ژن مقاومت به متی سیلین در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در جهت افزایش بیماریزایی و مقاومت به درمان و انتقال از راه غذا، این تحقیق با هدف شناسایی سریع ژن مقاومت به این آنتی بیوتیک و فلزات سنگین کادمیوم و روی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های مواد غذایی با روش PCR چندگانه‌ای انجام گردید و تمامی ایزوله‌ها با استفاده از پرایمرهایmec, czrC بررسی شده و فراوانی ژن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه حاضراز مجموع ۲۴ نمونه، ۱۲ نمونه از مواد غذایی و ۱۲ نمونه از منابع بالینی بود که میزان فراوانی ژن mecA در نمونه های بالینی ۵۰ ٪ و در مواد غذایی ۱۶/۶٪ بوده است. به علاوه نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه ها نشان داد میزان مقاومت در نمونه های مواد غذایی و بالینی به آنتی بیوتیکهای آزیترومایسین ۳۳/۳ و ۲۵ ٪، کلیندامایسین ۳۳/۳ ٪، لینزولید ۲۵ و ۱۶/۶ ٪ ، اوفلوکساسین ۲۵ و ۳۳/۳ ٪، متی سیلین ۱۶/۶ و ۵۸/۳ ٪ و دالفوپریستین/کوینوپریستین ۱۶/۶ و ۸/۳ ٪ بود. هیچ یک از جدایه های غذایی و بالینی به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و تیکوپلانین مقاومت نشان ندادند. میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۱، میزان شیوع و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین را در پنیر و کره محلی بررسی کردند. در این مطالعه از مجموع ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده، ۱۱ نمونه دارای ژن mecA بودند بر اساس نتایج آنتی بیوگرام ۶۰٪ نمونه ها مقاوم به متی سیلین و ۳۸٪ به ونکومایسین مقاوم بودند (۱۰). سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۸۸ در پژوهشی به جداسازی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از مواد غذایی در تهران در سه منطقه جنوب تهران ، شهر ری و اسلام شهر پرداختند. در این مطالعه ۴۹ نمونه به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند که از این میان ۲٪ *جدایه ها* مقاوم به متی سیلین و کلیندامایسین بودند (۱۱). در مطالعه رضازاده و همکاران در سال ۱۳۹۳، از ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی از نمونه های بالینی ۸۰٪ دارای ژن mecA بودند. به علاوه در این مطالعه مشخص شد شناسایی سویه های مقاوم به متی سیلین با روش PCR از حساسیت بالاتری نسبت به روش فنوتیپی برخوردار می باشد (۱۲). فرج زاده و همکاران در پژوهشی به بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* های جدا شده از نمونه های بالینی بیمارن بستری شده در بیمارستان های آموزشی شهر اهواز پرداختند. در این مطالعه تمامی ایزوله ها به آنتی بیوتیک های لینزولید و ونکومایسین حساس بودند. میزان مقاومت به آنتی بیوتیکهای متی سیلین و آزیترومایسین به ترتیب ۵۰ و ۶۱٪/۵ گزارش شد (۱۳). در مطالعه علیزاده و امینی در سال ۱۳۹۳ بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی میزان فراوانی ژن mecA ۵۰٪ بود. در میان آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت به آزیترومایسین، کلیندامایسین، لینزولید، اوفلوکساسین، متی سلین و دالفوپریستین/کوینوپریستین به ترتیب ۳۲/۵ ٪ ، ۱۷/۵٪، ۳۵٪ ، ۲۷/۵ ٪ ، ۲۷٪/۵ و ۱۰٪ بود (۱۴). همچنین علیزاده و امینی در سال ۱۳۹۴، این آزمایش را بر روی جدایه های

استافیلوکوکوس اورئوس مواد غذایی انجام دادند که در این مطالعه ۵۷/۵٪ نمونه ها دارای ژن mecA بودند. به علاوه ۳۲٪ نمونه ها به آزیترومایسین، ۱۷٪ به کلیندامایسین، ۳۵٪ به لینزولید، ۲۷٪ به اوفلوکساسین، ۲۵٪ به متی سیلین و ۱۰٪ به دالفوپریستین/کوینوپریستین مقاوم بودند (۵). Weese و همکاران در سال ۲۰۱۰، میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در برابر متی سیلین در محصولات گوشت خرده فروشی را مورد بررسی قرار دادند. از مجموع نمونه های مورد بررسی ۵/۳٪ استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شد (۱۵). در مطالعه Vola و همکاران در کشور برزیل در سال ۲۰۱۳، شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و میزان مقامت به متی سیلین در عفونت های چشمی بررسی شد. در این مطالعه ۹/۹٪ سویه ها مقاومت به متی سیلین را نشان دادند (۱۶). در مطالعه حاضر ژن czrC در ۵۰ ٪ نمونه های غذایی و در ۷۵ ٪ نمونه های بالینی حضور داشته است. همچنین میزان مقاومت سویه ها به فلزات روی و کادمیوم با روش MIC بررسی شد. نتایج MIC نشان داد در مجموع میزان مقاومت به کادمیوم بیشتر از روی بوده است. کمترین غلظت تاثیر فلزات سنگین بر روی نمونه های غذایی نمک کادمیوم ppm ۰/۶۲ و در نمونه های بالینی ppm ۰/۳ بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ppm ۰/۰۷ حساس بوده و تفاوتی در نتایج مشاهده نشد. Panda و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی مقاومت به متی سیلین و فلزات روی و کادمیوم در *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی ۱۴۴ نمونه بالینی جداسازی شده به روش Multiplex-PCR پرداختند. در این مطالعه ژنهای مقاومت به فلزات سنگین (czrC) در ۳ نمونه (۲٪) و مقاومت به متی سیلین (mecA) در ۶ نمونه (۴٪) از ایزوله ها شناسایی گردید (۶).

Cavacoو همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به فلز روی با روش MIC و PCR پرداختند. در این مطالعه ۴۷۶ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از کشورهای اروپایی مورد بررسی قرار گرفتند که از این میان ۷۳٪ نمونه ها واجد ژن czrC بودند که همه این نمونه ها دارای MIC>2mM بوده اند (۱۷). به علاوه در این دو مطالعه اخیر مشخص شد فراوانی ژن czrC در سویه های مقاوم به متی سیلین بالاست و بین میزان فراوانی این ژن و مقاومت به متی سیلین رابطه مستقیم وجود دارد که این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد. مقاومت به فلزات روی و کادمیوم در انتخاب و زنده ماندن سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین نقش مهمی دارد (۱۷).در سال ۲۰۲۴ خاکیان و همکاران برای اولین بار در ایران به بررسی ظهور استافیلوکوک های مقاوم به فلزات سنگین در میان گونه های مقاوم به متی سیلین پرداختند. این مطالعه شامل ۳۰۰ جدایه ی استافیلوکوکی انسانی و حیوانات خانگی بوده است. PCR ژن اصلی نشان داد که تنها ۶۶.۷٪ از جدایه های MRS سگ که از نظر فنوتیپی در برابر این فلزات سنگین(کلرید روی و استات کادمیوم) مقاوم بودند، حاوی ژن czrC بودند. در این مطالعه مقاومت فنوتیپی به متی سیلین رابطه ی معنا داری با وجود ژن mecA در تمام سویه های MRS داشت. بنابراین وجود فلزات ستگین(روی وکادمیوم) در محیط زندگی استافیلوکوک ها این باکتری ها را به متی سیلین مقاوم میکند(۱۸). در سال ۲۰۱۶ Angeles Argudin و همکاران ادعا داشت که اکثر LA-MRSA ها در اروپا متعلق به کمپلکس کلونال هستند که دلیل ظهور آنها به طور کامل مشخص نیست. در این مطالعه ارزیابی وقوع ژن های مقاومت به فلز در میان مجموعه ای از استافیلوکوک های حساس به متی سیلین جدا شده از دام و غذای آنها صورت گرفت. نتایج حاصل ازاین مطالعه حاکی از

این است که اکثر جدایه ها حداقل یک ژن مقاومت به فلز را داشتند. در میان این جدایه ها ژن های مقاومت به ترکیبات آرسنیک ، کادمیوم، مس و ترکیب روی و کادمیوم شناسایی گردید. این مطالعه نشان میدهد که ژنهایی که به طور بالقوه مقاومت به فلز را ایجاد میکنند اغلب در LA-MRSA وجود دارد(۱۹). در سال ۲۰۱۴ Nair و همکاران بررسی ای انجام دادند که هدف ازاین مطالعه ی انجام شده در اروپا مشاهده ی مقاومت به فلزات کمیاب مانند کلرید روی و سولفات مس در استافیلوکوک اروئوس جدا شده از دام بوده است. این مطالعه به منظور تعیین شیوع مقاومت به روی و کادمیوم به استافیلوکوکوس اروئوس های مقاوم به متی سیلین جدا شده از ایالات متحده انجام شد. ٪۲۹ جدایه ها czrC مثیت بودند. در نتیجه مشاهده شد که مقاومت در برابر روی و کادمیوم ارتباط مستقیم با MRSA دارد و قرار گرفتن طولانی مدت در معرض روی در خوراک دام و کودها میتواند مقاومت در برابر یون های فلزی را افزایش دهد و از عوامل موضعی مبتنی بر روی را در درمان های عفونت های استافیلوکوکوس اروئوسی مختل کند (۲۰). کاوانیشی و همکاران در سال ۲۰۲۴، شیوع استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین مرتبط با دام را بررسی کردند. این جدایه ها در کشتارگاه های خوک از سال ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۲ در ژاپن شناسایی شدند. این مطالعه نشان میدهد که فشار انتخاب مشترک مرتبط با مقاومت چند دارویی و روی ممکن است به طور قابل توجهی در تداوم LA-MRSA نقش داشته باشد. گرچه LA-MRSA با منشا خوکی در حاضر بعید است که به انسان سرایت کند اما می تواند به یک مشکل بالینی منجر شود و جلوگیری از انتشار آن مستلزم استفاده ی محتاطانه از داروهای ضدمیکروبی، محدود کردن مصرف روی به حداقل ماده ی مغذی مورد نیاز و انجام اقدامات بهداشتی اساسی است(۲۱). به طور کلی مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بالای ژنهای mecA و czrC در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی می باشد. به علاوه میزان مقاومت به آنتی بیوتیکهای متی سیلین، آزیترومایسین، کلیندامایسین، اوفلوکساسین و لینزولید دارای فراوانی قابل توجهی در جدایه های مواد غذایی و بالینی می باشد. بنابر این شناسایی سریع و به موقع این مقاومتها هم به صورت فنوتیپی و هم ژنوتیپی جهت انتخاب درمان مناسب عفونتهای ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم امری ضروری می باشد.

منابع

1. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi S, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, et al. Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. JCM 2010; 48: 867-72.
2. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003; 2(1):63-76.
3. Tachbele E, Erku W, Gebre-Michael T, Ashenafi M. Cockroach-associated food-borne bacterial pathogens from some hospitals and restaurants in Addis Ababa, Ethiopia: Distribution and antibiograms. J Rural Tropic Public Health. 2006;5:34-41.
4. Besaury L, Pawlak B, Quillet L. Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions. Envir Sci Pollution Res. 2016; 23(5): 4013-23.
5. Alizadeh S, Amini K. 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. JFM. 2015; 2(4): 49-58.

6. Panda S, Kar S, Choudhury R, Sharma S, Singh DV. Development and evaluation of hexaplex PCR for rapid detection of methicillin, cadmium/zinc and antiseptic-resistant *staphylococci*, with simultaneous identification of PVL-positive and-negative *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *staphylococci*. FEMS microbiol lett. 2014; 352(1): 114-22.
7. Bauer A, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer J Clin Pathol. 1996; 45: 493-496.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014): Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; twenty first Informational Supplement. M100-S24. Wayne, PA: CLSI.
9. Manfreda G, Mioni R, Cesare A. Surveillance and characterization of enterotoxigenic *staphylococci* in foods of animal origin collected in the Veneto Region. Vet Res Com. 2005; 29: 331-3.
10. Mirzaei H, Javadi A, Farajli M, Shah-Mohammadi AR, Monadi AR, Barzegar A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. J. Vet. Res. 2012; 67(1): 65-70.
11. Soltan Dallal MM, Panahi E, Saberpour F, Fazelifard P, Tabatabaei Bafroei A , Fakharian F, et al. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from food in Tehran J Microbial BIiotech. 2009; 1(2): 1-8.
12. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Comparison of disk diffusion and "PCR" methods for determination of methicillin- resistant *Staphylococcus* aureus (MRSA) strains. ISMJ. 2014; 17(3): 280-289
13. Faraj Zadeh Sheykh A, Ranjbar Y, Meghdadi H, Nazar Zadeh N, Shakori Fard R. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens taken from hospitalized patients in educational hospitals of Ahvaz city, against methicillin, vancomycin, linezolid and macrolides in 2013. Jundishapour scientific Med J. 2015; 13(4): 465-74.
14. Alizadeh S, Amini K. Identification of virulence gene Panton-Valentine Leukocidin (*PVL*) and resistance to methicillin (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens: A short report. Rafsanjan Univ Med Sci 2015; 14(5): 427-34.
15. Weese J, Avery B, Reid-Smith R. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. Lett Appl Microbiol. 2010; 51(3): 338-42.
16. Vola ME, Moriyama AS, Lisboa R, Vola MM, Hirai FE, Bispo PJM, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ocular infections. Arquivos brasileiros de oftalmologia. 2013;76(6): 350-3.
17. Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM, Wagenaar JA, Graveland H, Veldman K, Mevius D, Fetsch A, Tenhagen BA, Porrero MC, Dominguez L. Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. Vet Microbiol. 2011; 150(3): 344-8.
18. Khakian M, Hashemitabar G, Askari Badouei M, Khoramian Tousi B. Phenotypic and genotypic study of resistance to Zinc and Cadmium salts in methicillin-resistant Staphylococci isolated from humans and domestic animals. Journal of Zoonotic Diseases. 2025 Jan 1;9(1):678-89.
19. Argudín MA, Lauzat B, Kraushaar B, Alba P, Agerso Y, Cavaco L, Butaye P, Porrero MC, Battisti A, Tenhagen BA, Fetsch A. Heavy metal and disinfectant resistance genes among livestock-associated

methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Veterinary Microbiology. 2016 Aug 15;191:88-95.

20. Nair R, Thapaliya D, Su Y, Smith TC. Resistance to zinc and cadmium in Staphylococcus aureus of human and animal origin. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2014 Oct;35(S3):S32-9.

21. Kawanishi M, Matsuda M, Abo H, Ozawa M, Hosoi Y, Hiraoka Y, Harada S, Kumakawa M, Sekiguchi H. Prevalence and genetic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from pigs in Japan. Antibiotics. 2024 Feb 4;13(2):155.