

## تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه

## های مواد غذایی با روش PCR چندگانه

عصمت خوری<sup>۱</sup>، اسماعیل عطای صالحی<sup>۱\*</sup>، مرضیه خوری<sup>۲</sup>

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 پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰

## چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس با تولید چندین آنروتوکسین 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 آنتی‌بیوتیک‌های 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 جمع‌آوری 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 آنتی‌بیوگرام 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

استافیلوکوکوس اورئوس سومین عامل ایجاد کننده بیماری‌های 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 فرآورده‌های لبنی، فرآورده‌های گوشتی، سبزیجات، سالاد، غذاهای پخته و نمکی و به خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است. در کشورهای پیشرفته بیشتر بیماری‌هایی که از طریق غذا به انسان منتقل می‌شود تحت کنترل متخصصان بهداشتی درآمده اند، ولی در کشورهای درحال توسعه، مشکلات

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 بی‌هوازی اختیاری هستند (Fooladi et al., 2010).

۶۸۰۶ از نظر وجود استافیلوکوکوس 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 گرمخانه گذاری گردید. برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر 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). کنی های زرد رنگ رشد کرده در محیط Mannitol salt agar برای بررسی آزمون-های افتراقی در محیط عمومی BHI agar (Merck, Germany) کشت گردید. برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس از آزمون های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، ترمونوکلناز، Voges-Proskauer، تولید اسید از مانیتول و مالتوز و آزمون همولیز (در محیط آگار خون دار حاوی ۱ درصد خون دفیبرینه گوسفند) استفاده شد (ابراهیم زاده 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 میلی لیتری 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 کردن های متوالی به

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 سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در استافیلوکوکوس اورئوس روز به روز تعداد آنتی بیوتیک های در دسترس برای درمان این عفونت ها کاهش می یابد (ملا عباس زاده و همکاران، ۱۳۹۰). استفاده بیش از اندازه از آنتی بیوتیک ها در صنعت دامپروری موجب ایجاد سویه های مقاوم به دارو در میان استافیلوکوک های بیمارزا می گردد. استفاده از روش های ایمونولوژیکی، استفاده از تکنیک های مولکولی از جمله PCR ساده و PCR چندگانه برای یافتن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داری ژن مناسب است. مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین ناشی از حضور ژن *mecA* است که رمزکننده یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین ۷۸ کیلو دالتونی PBP2a می باشد. استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین نسبت به حرارت پاستوریزاسیون و بسیاری از آنزیم های پروتئولیتیک مقاوم و پایدار بوده و می توانند در نمونه های غذایی برای مدت طولانی فعال بمانند (علیزاده و امینی، ۱۳۹۴). مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی مختلف در شهر مشهد و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی-سلین جدا شده از نمونه های مواد غذایی با روش PCR چندگانه انجام گردید.

### مواد و روش کار

این مطالعه بر روی ۳۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف از قبیل بستنی، شیرینی و آب میوه در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ انجام گردید. نمونه ها به صورت تصادفی از مناطق مختلف مشهد جمع آوری و به آزمایشگاه معاونت غذا و دارو ارسال گردیدند و مطابق با دستورالعمل استاندارد ۳-

۸۰۰۰ rpm 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 ۱/۵ ml 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 اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ nm اندازه گرفته شد. میانگین جذب نوری DNA های استخراج در این مطالعه ۳ درصد بود. پس از شماره گذاری، نمونه های ژنومی استخراج شده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی، درون فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند (مرادینا 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).

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 مجدداً به مدت ۳ دقیقه در دور

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

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

مخلوط های استفاده شده جهت انجام واکنش شامل: آب مقطر ۱۶/۸ میکرولیتر، PCR buffer ۱X به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، MgCl<sub>2</sub> به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، mix (5Mm dNTP) به میزان ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase به میزان ۰/۱ میکرولیتر، نمونه ۲/۵ DNA میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون PCR چند گانه در

برنامه کلی PCR چند گانه مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه می باشد (جدول شماره ۲) (Mehrotra et al., 2000).

شدند و بعد از رنگ آمیزی، در دستگاه ژل داگ BIORAD مورد بررسی قرار گرفتند.

دستگاه ترموسایکلر انجام شد. جهت بررسی محصول PCR چند گانه نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده

جدول ۲- مراحل دمایی و زمانی سیکل های PCR

مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۵	۱
دنا تورا سیون	۹۴	۱	
اتصال	۵۷	۱	۴۰
توسعه	۷۲	۲	
توسعه نهایی	۷۲	۷	۱

گردید. بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه شیرینی تر (۱۹/۷) بود (جدول ۳). میزان حساسیت جدایه های مختلف به آنتی بیوتیک های مورد استفاده در جدول شماره ۴ و ۵ ذکر شده است. بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین با فراوانی و (۱۶/۹۸ درصد) تتراسایکلین با فراوانی (۱۵/۰۹ درصد) ثبت شد. از طرفی ۳/۷ درصد از جدایه ها حداقل به یک و دو آنتی بیوتیک مقاومت بینابینی نشان دادند و همچنین هیچ جدایه ای به آنتی بیوتیک توبرامایسین مقاومت نشان نداد. همچنین Multiplex PCR قطعه ۵۳۳ bp ژن *mecA* از ۵ جدایه از ۱۰ جدایه مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی گردید. در ۱۰۰ درصد جدایه ها، حضور ژن *femA* (اختصاصی گونه) و ژن *16SrDNA* (اختصاصی جنس) مورد تایید قرار گرفت (جدول ۶).

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها

جدایه ها، از نظر مقاومت به ۹ آنتی بیوتیک با روش انتشار دیسک در آگار بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) طبق دستور العمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند (Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2006). دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل ریفامپین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، متی سیلین (۵ میکروگرم)، اگزا سیلین (۱ میکروگرم)، سفتریاکسون (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۱۰ میکروگرم)، لینکومایسین (۱۵ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) بودند.

### نتایج

در این تحقیق از میان ۳۲۰ نمونه مواد غذایی مختلف جمع آوری شده، ۵۳ مورد استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی

جدول ۳- میزان و درصد شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های مختلف

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

جدول ۴- میزان حساسیت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش انتشار دیسک در آگار

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

جدول ۵- نتایج آنتی‌بیوگرام بدست آمده از نمونه‌های مواد غذایی

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

جدول ۶- نتایج PCR چندگانه در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

حساسیت آنتی‌بیوتیکی	تعداد	ژن هدف		
		<i>16S rRNA</i>	<i>femA</i>	<i>mecA</i>
مقاوم	۱۰	۱۰	۱۰	۵
نیمه حساس	۲	۲	۲	۰

## 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 می دهد (Momtaz et al., 2013). مسمومیت غذایی ناشی از این پاتوژن سومین علت بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی می باشد. انسان می تواند 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 می باشد. به نظر می رسد که بیشتر آنتی بیوتیک‌های شایع مورد استفاده، بر علیه این پاتوژن موثر نمی باشند. سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می تواند 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 ۲۰۰۳-۲۰۰۵ در کشور ایتالیا بر روی فراورده‌های لبنی مختلف انجام گردید میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس 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 نشان دهنده تأثیر مصرف آنتی بیوتیک در زنجیره غذایی بر سلامت انسان ها می باشند. برخی مطالعات میزان شیوع پایینی را گزارش کرده اند. در مطالعه‌ای که توسط سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی نمونه‌های مواد غذایی 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 تأیید شد (et al, 2009). (Mustafa). در برخی از مطالعات شیوع استافیلوکوکوس اورئوس بالایی را در نتایج خود گزارش کرده اند. حامد ملا عباس 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، محققین گزارش کردند که میزان مقاومت به متی‌سلین ۳ درصد، اریترومایسین ۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۳ درصد، تتراسایکلین ۲۶ درصد، توپرومایسن ۰ درصد و ریفاپمپین ۰ درصد مشاهده گردید. در مطالعه ما میزان مقاومت به تتراسایکلین ۱۵/۰۹ درصد، متی‌سلین ۱۶/۹۸ درصد، توپرومایسن ۰ درصد، سیپروفلوکساسین و اگزاسیلین ۳/۷ درصد، اریترومایسین و سفتریاکسون ۷/۵ درصد مشاهده شد که نشان دهنده مشابهت نتایج به دست آمده می باشد (سلطان دلال و همکاران، ۱۳۸۷) در هر دو مطالعه بیشترین مقاومت مربوط به تتراسایکلین می باشد 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 می باشند (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 سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سلین انجام

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 می‌تواند 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، شماره ۴، صفحه ۴۴.
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، صفحه ۹۳-۹۹.
۳. سلطان دلال، محمدمهدی، آقا امیری، سولماز، اشراقیان، محمدرضا، صبورپراقی، علی اکبر، فرامرزی، طاهره، مهدوی، وحید، صابرپور، فاطمه، فاضلی فرد، پرستوسادات، عابدی، پیمان، 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. عزیززاده، 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

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 ۲۰۰۹-۲۰۱۰ 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 گوشت مرغ، 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 عفونت‌های 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

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.
- بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی آن. مجله میکروبی شناسی مواد غذایی شهرکرد، سال دوم. شماره ۴، صفحه ۴۹-۵۸.
۵. مرادنیسا، 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 آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از پنیرهای سنتی مصرفی در بخش قطور شهرستان خوی مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. سال چهارم. شماره ۲، صفحه ۲۰۹-۲۱۷.
۷. ملاعباس زاده، حامد، مبین، هایده، و میرزایی، حمید. (۱۳۹۰). تعیین میزان شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا 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 متی سیلین 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): 163-168.



- 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 establishment. *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, exfoliative 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

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

Khoori E<sup>1</sup>, Ataye Salehi A<sup>1\*</sup>, khoori M<sup>2</sup>

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](mailto: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.