مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۱، ۷۰-۶۵

شیوع استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در پنیر و کره محلی: یک مطالعه میدانی در تبریز

حمید میرزایی[1*] افشین جوادی[1] مهدی فرجلی[2] امیررضا شاه محمدی[2] علیرضا منادی[3] ابوالفضل برزگر[4]

۱) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

۲) دانش آموختهٔ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

۴) مرکز تحقیقات زیست فناوری دارو ئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۴ اسفند ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۲۵ خرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: درسال‌های اخیر جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به‌آنتی بیوتیک‌ها بخصوص متی‌سیلین از دام‌ها و مواد غذائی حاصل از آنها افزایش یافته است. **هدف:** هدف از مطالعه حاضر تعیین میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در پنیرهای سفید و کره‌های سنتی عرضه‌شده در تبریز با روش‌های کشت و PCR و همچنین تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آنها می‌باشد. **روش کار:** در مطالعه حاضر ۲۵۰ نمونه از پنیرهای سفیدسنتی و کره‌های محلی از مناطق مختلف سطح شهر تبریز ابتدا از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به روش کشت مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس ایزوله‌های حاصله توسط روش بر اساس ژن جهت تایید استافیلوکوکوس اورئوس و ژن مقاومت متی‌سیلین (A) ارزیابی شده و در نهایت الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** بر اساس روش کشت ۲۶ نمونه از پنیرها و ۲۴ نمونه از کره‌های مورد آزمایش آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت تشخیص داده شدند. از این نمونه‌ها به ترتیب ۱۹ و ۱۱ ایزوله بر اساس با جفت پرایمر ژن بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفتند. از مجموع ۳۰ ایزوله دارای ژن، ۱۱ مورد دارای ژن بودند. از مجموع ۵۰ ایزوله ۱۱ ایزوله به ۴ آنتی بیوتیک، ۱۲ ایزوله ایزوله به ۵ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۶ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۷ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۸ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۹ آنتی بیوتیک، ۱ ایزوله به ۱۰ آنتی بیوتیک و ۲ ایزوله به ۱۱ آنتی بیوتیک بطور همزمان مقاومت نشان دادند. **نتیجه‌گیری نهایی:** در مجموع می‌توان گفت که میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به طیف وسیعی از انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها از همه مهمتر مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های مورد آزمایش در حد قابل توجهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به متی‌سیلین، پنیرسنتی، کره محلی، PCR.

مقدمه

استافیلوکوک‌ها از جمله باکتریهای مقاوم با پراکندگی و گسترش بالا هستند. این باکتری‌ها از جمله نخستین پاتوژن‌های شناخته شده انسانی می‌باشند که می‌توانند بر روی پوست و غشاءهای مخاطی کلنیزه شوند (۹). میان گونه‌های مختلف این جنس، استافیلوکوک اورئوس مهمترین گونه پاتوژن است که بواسطه دارا بودن توانایی ذاتی و همچنین توانایی کسب مقاومت نسبت به عوامل و داروهای ضدمیکروبی به یکی از نگرانی‌های عمده سلامت عمومی مبدل شده است (۱۸).

استافیلوکوکوس اورئوس شایعترین و از نظر اقتصادی مهمترین عامل ایجاد عفونت‌های داخل پستانی در دام‌های شیری بوده (۵،۱۰) و عامل حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد از موارد ورم پستانی گزارش شده است (۷). از طرف دیگر این میکروارگانیسم بعنوان فلور طبیعی ۳۰ تا ۸۰ درصد افراد جامعه می‌باشد (۱۹) لذا این میکروارگانیسم می‌تواند از طریق پستان مبتلا به ورم پستان بالینی و یا تحت بالینی استافیلوکوکی و یا از طریق محیط در طول دستکاری و فرآوری، شیر را آلوده نموده و براحتی در داخل شیر و فرآورده‌های آن در طول مراحل تولید، فرآوری و دوره نگهداری رشد و تکثیر نموده و منجر به تولید آنترو توکسین‌های بیماریزا شود (۱۸).

بیماری‌های با منشاء مواد غذائی یکی از عوامل عمده در بهداشت و سلامت جامعه بوده و استافیلوکوکوس اورئوس از نظر اهمیت سومین عامل ایجاد کننده بیماری‌های با منشاء مواد غذائی در دنیا می‌باشد(۴). مسمومیت‌های استافیلوکوکی در اثر مصرف غذاهای حاوی ۲۰ تا کمتر از ۱۰۰۰ نانوگرم (۱میکروگرم) از سم استافیلوکوکی ایجاد می‌شود. علائم بالینی بیماری بسته به حساسیت فردی و مقدار سم مصرفی در حدود ۱ تا ۶ ساعت بعد از مصرف غذای آلوده ظاهر شده و عموما در ۲۴ تا ۴۸ ساعت از بین میرود. شیر و فرآورده‌های شیری و بخصوص فرآورده‌هایی که بصورت سنتی و دستی تولید می‌شوند در بروز مسمومیت‌های استافیلوکوکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۵).

افزایش روزافزون مقاومت‌های داروئی باکتری‌ها و به تبع آن، گسترش عفونت‌های ناشی از آنها در بیمارستان‌ها و جامعه، توجه مجامع علمی را به خود معطوف نموده است و عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های مقاوم به متی سیلین به یکی از معضلات بزرگ در درمان

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۳۱۸۶۸۹-۰۴۱۱، نمابر: ۳۳۲۸۵۶۰-۰۴۱۱ Email: hmirzaei@iaut.ac.ir

آنتی بیوتیکی مبدل شده است(۱۷). اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (*Staphylococcus aureus* resistant-methicillin) یا (MRSA) در سال ۱۹۶۱ در اروپا در انسان شناسائی شد و اولین سویه MRSA در دام‌ها در سال ۱۹۷۲ متعاقب جداسازی آن در شیر از گاو گزارش شده است(۷). از آن زمان تاکنون و بویژه طی دو دهه گذشته شیوع این سویه در بسیاری از قسمت‌های جهان افزایش یافته است. این سویه به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها، از جمله بتالاکتام‌ها، پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک، سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و پنم‌ها مقاومت نشان می‌دهد (۷).

سویه MRSA دارای ژن مقاومت به متی سیلین (ژن mec-A) است. این ژن پروتئینی با نام PBP2a (پروتئین‌های باند شونده به پنی سیلین) را کد می‌نماید که میل ترکیبی آن در اتصال به متی سیلین کمتر از سایر پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین در دیواره باکتری می‌باشد. در باکتری حساس (فاقد ژن mec-A)، متی سیلین با میل ترکیبی بیشتری به پروتئین PBP در دیواره سلول متصل می‌شود که سبب لیز دیواره سلول باکتری و سرانجام مرگ آن می‌گردد. سویه‌هائی که دارای این ژن هستند به بسیاری از آنتی بیوتیک‌های دیگر هم مقاومت نشان می‌دهند و این امر درمان بیماری‌های ناشی از این میکروارگانیسم را مشکل ساخته و منجر به انتشار هرچه بیشتر آن در جامعه می‌شود (۱۷).

هدف از مطالعه حاضر تعیین میزان شیوع و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در پنیر و کره‌های محلی عرضه شده در بازار تبریز می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع توصیفی مقطعی بوده و در آن ۱۰۰ نمونه از پنیرهای سفید سنتی نگهداری شده در آب نمک و ۱۵۰ نمونه از کره‌های محلی از فروشندگی‌های مناطق مختلف سطح شهر تبریز خریداری شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد.

روش کشت: ابتدا جهت تهیه سوسپانسیون اولیه از پنیر، ۲۵ گرم از نمونه همگن شده در ۲۲۵ میلی لیتر محلول ۲ درصد سیترات سدیم رقیق سازی شد. برای نمونه‌های مربوط به کره‌های محلی ۲۵ گرم از نمونه‌ها در ۲۲۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد حل می‌شد. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون حاصله به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت آبگوشت نمک دار (Cooked meat salt medium) اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. ۰/۵ میلی لیتر از محیط حاصله بر روی محیط برد پارکر پخش شده و ۳۵ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق و محدب از طریق تست‌های تاییدی مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت کلنی‌های گرم، کاتالاز، گلوکز، مانیتول و کوآگولاز مثبت بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در نظر گرفته شدند (۸).

استخراج DNA و آزمایش PCR جهت ردیابی ژن Nuc: برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده شد و برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از جفت پرایمر اختصاصی تعریف شده توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۰۱ استفاده گردید (۱۱).

واکنش PCR شامل 2µl buffer (10x)، 1 µl dNTP(10mM)، 1µl MgCl2(50mM)، از هر پرایمر 1 µl (10mM)، 0.5 µl polymerase Tag(2.5unite)، 2 µl DNA Template، آب مقطر دیونیزه 12.5 µl، حجم نهائی مجموعا برابر ۲۰µl و مراحل حرارتی برای انجام PCR شامل ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون اولیه، ۴۰ سیکل شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون در سیکل‌ها، ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمر، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای تکثیر قطعه هدف و در نهایت بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (۱۱).

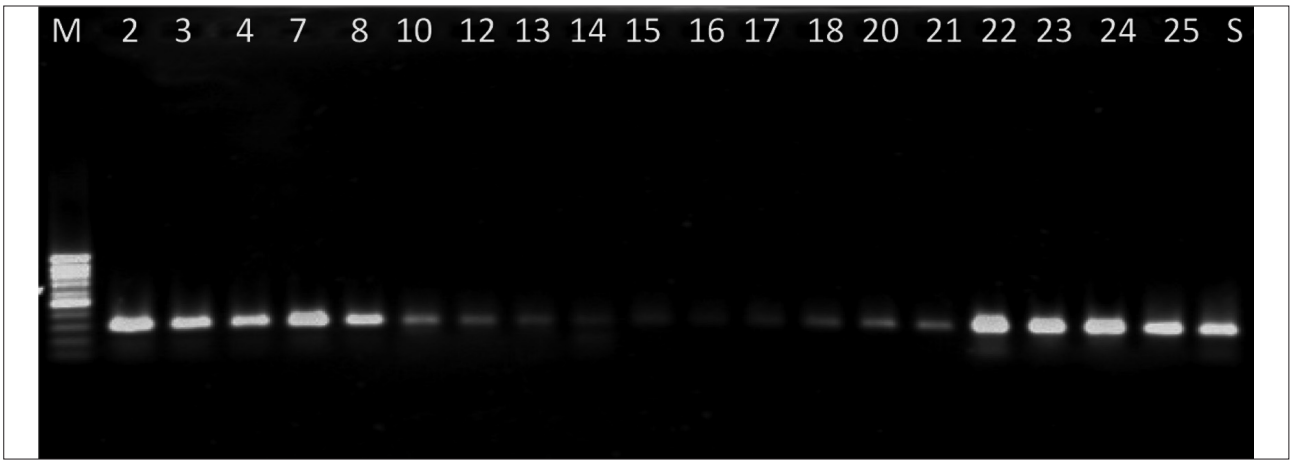
۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و پس از انجام الکتروفورز به مدت حدود یک و نیم ساعت با ولتاژ ۷۵، از باندهای حاصله زیر اشعه UV عکس برداری شد. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از نشانگر با اندازه ۱۰۰bp تولیدی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن A-cMe: برای این منظور از جفت پرایمر اختصاصی تعریف شده توسط Merlino و همکاران در سال ۲۰۰۲ استفاده گردید (۱۳).

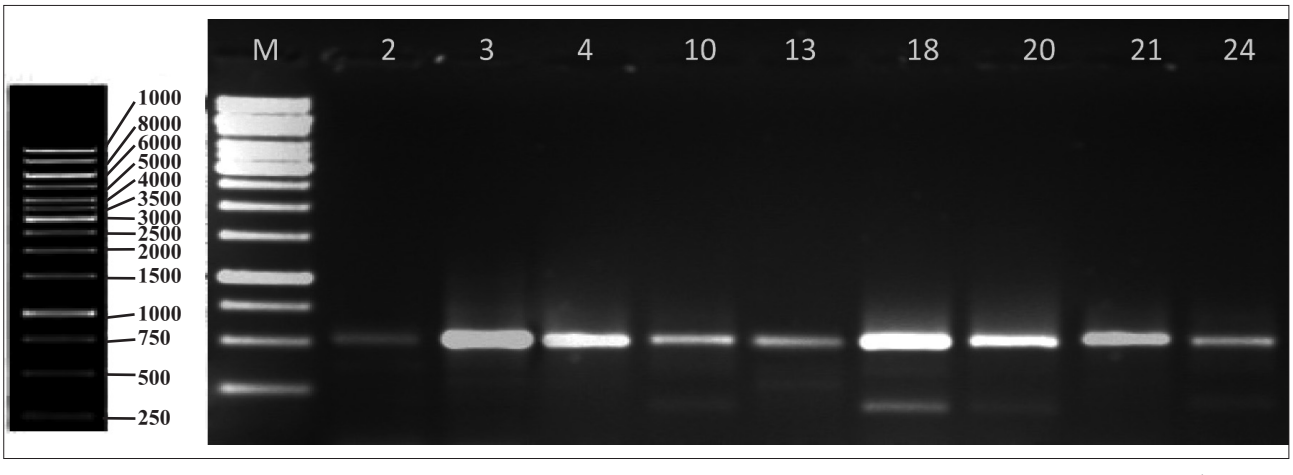
واکنش PCR شامل 2µl buffer (10x)، 2.4 µl dNTP(10mM)، 2µl MgCl2(50mM)، از هر پرایمر 1 µl (10mM)، 0.5 µl Tag polymerase(2.5unite)، 1 µl DNA Template، آب مقطر دیونیزه 10.1، حجم نهائی مجموعا برابر ۲۰µl و مراحل حرارتی برای انجام PCR شامل ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون اولیه، ۴۰ سیکل شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون در سیکل‌ها، ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمر، ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر قطعه هدف و در نهایت بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (۱۳).

۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و پس از انجام الکتروفورز به مدت حدود یک و نیم ساعت با ولتاژ ۷۵، از باندهای حاصله زیر اشعه UV عکس برداری شد. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از نشانگر با اندازه 1kbp تولیدی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر جدایه با استفاده از ۱۳ آنتی بیوتیک ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، گلوکزاسیلین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، متی سیلین (۵ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفولولیسین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن Nuc.



تصویر ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن A-cMe.

جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) به روش دیسک دیفیوژن آگار مشخص شد (۱۹). بدینصورت که از باکتری خالص سازی شده در محیط آگار مغذی (به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) جهت تهیه سوسپانسیون برابر ۰/۵ مک فارلند استفاده و بوسیله سوآپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس آنتی بیوگرام هر جدایه برای ۱۳ عدد دیسک آنتی بیوتیک شامل دیسک‌های فوق الذکر انجام شدند. پلیت‌های حاصله به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و نتایج حاصله بر اساس جدول شرکت سازنده آنتی بیوتیک تفسیر شد.

نتایج

۱- نتایج شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت با روش کشت: براساس روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی ۲۶ نمونه (۲۶درصد) از پنیرها و ۲۴ نمونه (۱۶درصد) از کره‌های مورد آزمایش آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت تشخیص داده شدند.

۲- نتایج انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تایید باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس براساس ژن Nuc: با درنظر گرفتن اختصاصیت آغازگرها، انتظار تکثیر قطعاتی به اندازه ۲۵۵ جفت نوکلئوتید، از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌رفت. باندهای حاصله از تعدادی از جدایه‌ها در تصویر ۱ آورده شده است.

از مجموع ۲۶ ایزوله مربوط به نمونه‌های پنیر و ۲۴ ایزوله مربوط به نمونه‌های کره که در تست‌های بیوشیمیایی بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده بودند به ترتیب ۱۹(۷۳درصد) و ۱۱ ایزوله (۴۶درصد) براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفتند.

۳- نتایج انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای جستجوی ژن مقاومت متی سیلین (Mec-A): با توجه به طراحی آغازگرها از قسمت‌های ابتدائی و انتهایی توالی‌های ژن Mec-A ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) و همچنین با درنظر گرفتن اختصاصیت آغازگرها، انتظار تکثیر قطعاتی به اندازه ۵۳۳ جفت نوکلئوتید، از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز می‌رفت. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای ۳۰ نمونه بهمرا نمونه استاندارد انجام گردید. همانطور که انتظار می‌رفت و در تصویر ۲ نشان داده شده است

جدول ۱- فراوانی و در صد مقاومت جدایه‌های حاصل از پنیرهای سنتی به آنتی بیوتیک‌های مختلف.

آنتی بیوتیک / مقاومت	تعداد	درصد
سیپروفلوکساسین	صفر	صفر
اگزاسیلین	۲۱	۸۱
جنتامایسین	صفر	صفر
تتراسایکلین	۶	۲۳
اریترومایسین	۳	۱۱/۵۴
کوتریموکسازول	۱	۳/۸۵
ریفامپین	۲	۷/۶۹
ونکومایسین	۹	۳۴/۶۲
پنی‌سیلین	۲۶	۱۰۰
گلوکزاسیلین	۲۶	۱۰۰
سفولولیسین	۲۶	۱۰۰
سفازیدیم	۲۶	۱۰۰
متی‌سیلین	۱۴	۵۳/۸۵

محصولات تکثیری با اندازه ۵۳۳ جفت نوکلئوتید حاصل شدند.

از مجموع ۳۰ ایزوله دارای ژن nuc، ۱۱ ایزوله (۹ ایزوله مربوط به نمونه‌های پنیر و ۲ ایزوله مربوط به ایزوله‌های کره) بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک متی‌سیلین مورد تائید قرار گرفتند. شایان ذکر است که ۱۰۰ درصد جدایه‌های دارای ژن مقاومت به متی‌سیلین (A-cMe) از نظر فنوتیپی نسبت به متی سیلین مقاوم بودند لذا از این لحاظ بین روش PCR و روش کشت ۱۰۰ درصد همخوانی وجود داشت.

۴- نتایج مربوط به ارزیابی مقاومت به آنتی بیوتیک جدایه‌ها: بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار از مجموع ۲۶ ایزوله حاصله از نمونه‌های پنیر ۱۰ ایزوله (۵۲درصد) و از مجموع ۲۴ ایزوله حاصله از نمونه‌های کره ۱۶ ایزوله (۶۷درصد) نسبت به متی سیلین مقاوم می‌باشد. در ضمن از مجموع ۵۰ ایزوله (۲۶ ایزوله جدا شده از پنیر و ۲۴ ایزوله جدا شده از کره) ۱۱ ایزوله (۲۲درصد) به ۴ آنتی بیوتیک، ۱۲ ایزوله (۲۴درصد) به ۵ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله (۱۲درصد) به ۶ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله (۱۲درصد) به ۷ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله (۱۲درصد) به ۸ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله (۱۲درصد) به ۹ آنتی بیوتیک، ۱ ایزوله (۲درصد) به ۱۰ آنتی بیوتیک و ۲ ایزوله (۴درصد) به ۱۱ آنتی بیوتیک بطور همزمان مقاومت نشان دادند به عبارت دیگر ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها بطور همزمان به بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاوم بودند.

در جدول ۱ فراوانی و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف ۲۶ جدایه تایید شده در مرحله کشت از نمونه‌های پنیر نشان داده شده است.

در جدول ۲ فراوانی و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف ۲۴ ایزوله تایید شده در مرحله کشت از کره‌های محلی نشان داده شده است.

جدول ۲- فراوانی و در صد مقاومت جدایه‌های حاصل از کره‌های محلی به آنتی بیوتیک‌های مختلف.

آنتی بیوتیک / مقاومت	تعداد	درصد
سیپروفلوکساسین	۳	۱۲/۵
اگزاسیلین	۲۴	۱۰۰
جنتامایسین	۶	۲۵
تتراسایکلین	۱۵	۶۲/۵
اریترومایسین	۱۹	۷۹/۱۷
کوتریموکسازول	۱۱	۴۳/۸۳
ریفامپین	۱۷	۷۰/۸۳
ونکومایسین	۱۰	۴۱/۶۷
پنی‌سیلین	۲۳	۹۵/۸۳
گلوکزاسیلین	۱۱	۴۳/۸۳
سفولولیسین	۲۴	۱۰۰
سفازیدیم	۲۴	۱۰۰
متی‌سیلین	۱۶	۶۶/۶۷

بحث

بر اساس روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی تأییدی ۲۶ درصد از نمونه‌های پنیر و ۱۶ در صد از نمونه‌های کره و بر اساس آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس ژن nuc ۱۹ درصد از نمونه‌های پنیرهای سنتی و ۷/۳۳ درصد از نمونه‌های کره‌های محلی عرضه شده در بازار تبریز آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت می‌باشد.

Aragon-Alegro و همکاران در سال ۲۰۰۷ ضمن آنالیز ۱۷۲ نمونه غذایی شامل شیر، پنیر نرم، پنیر سخت، بستنی، ماست و غذاهای آماده مثل ساندویچ عرضه شده در بازار شهر Botucitu برزیل گزارش کردند که ۲۶ نمونه (۱۵/۱درصد) از غذاهای آزمایش شده استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت می‌باشد. دستمالچی ساعی و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۳۷۰ نمونه شیر مربوط به گاوهای با ورم پستان بالینی و تحت بالینی موجود در ۹ گاوداری شیری موجود در آذربایجان شرقی و غربی را با روش کشت و تست‌های بیوشیمیایی و نیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار داده و از مجموعه نمونه‌ها ۵۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی نمودند (۶).

Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۸۱ نمونه پنیر تهیه شده از شیر بز را از سطح بازار شهر Hesse آلمان جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار دادند و گزارش کردند که ۱۴ (۱۷/۷درصد) از نمونه‌ها آلوده به استافیلوکوکوسی های کوآگولاز مثبت (>۱۰ CFu/g) می‌باشند (۱).

Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۹ با انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس ژن‌های nuc و 16SrRNA روی ۱۴۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت بر اساس کشت‌های میکروبی و

تست‌های بیوشیمیایی میزان همخوانی PCR و کشت‌های میکروبی را ۱۰۰درصد گزارش کردند (۱۶).

Normano و همکاران در سال ۲۰۰۷، ۱۶۳۴ نمونه شامل ۶۴۱ نمونه از فرآورده‌های شیری و ۹۹۳ نمونه از فرآورده‌های گوشتی را مورد آزمایش قرار داده و گزارش کردند که از فرآورده‌های شیر ۱۰۹ نمونه (۱۷درصد) و از فرآورده‌های گوشتی ۱۰۰ نمونه (۱۰درصد) و از مجموع نمونه‌ها ۲۰۹ نمونه (۱۲/۸درصد) به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند از مجموع ۱۶۳۴ نمونه از فرآورده‌های گوشتی و شیری، ۶ نمونه (۳/۷۵) را آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین گزارش کردند (۱۵).

Mahony و همکاران در سال ۲۰۰۵ از ژن mec-A و روش دیسک آگار دیفیوژن جهت مطالعه میزان شیوع سویه‌های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) در دام‌ها و افراد شاغل در صنف دامپزشکی در ایرلند استفاده نمودند. طبق گزارش این تحقیق ۲۵ راس دام شامل ۱۴ قلاده سگ، ۸ راس اسب، یک قلاده گربه، یک سر خرگوش و یک سر خوک آبی و همچنین ۱۰ نفر از افراد شاغل در صنف دامپزشکی آلوده به سویه‌های MRSA بودند (۱۲).

Neeling و همکاران در سال ۲۰۰۷ ضمن مطالعه روی ۵۴۰ خوک در ۹ کشتارگاه هلند میزان شیوع بالای (۳۹درصد) سویه‌های MRSA در جمعیت خوکی را گوش زد نمودند(۱۴).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار از مجموع ۵۰ ایزوله ۱۱ ایزوله به ۴ آنتی بیوتیک، ۱۲ ایزوله به ۵ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۶ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۷ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۸ آنتی بیوتیک، ۶ ایزوله به ۹ آنتی بیوتیک، ۱ ایزوله به ۱۰ آنتی بیوتیک و ۲ ایزوله به ۱۱ آنتی بیوتیک بطور همزمان مقاومت نشان دادند.

تحقیق نفیسی و همکاران در سال ۱۳۸۶ روی ۵۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت از بین ۲۰۴ پرسنل درمانی بخش‌های مختلف آموزشی هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد با روش‌های Agar Screen و Duplex PCR نشان داد که ۲۳ مورد (۴۴درصد) از جدایه‌ها به لحاظ فنوتیپی و ۲۷ مورد (۵۲درصد) از لحاظ ژنوتیپی (mec A) نسبت به متی سیلین مقاوم هستند (۱۳). در تحقیق دیگر زمانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ نشان دادند که از مجموع ۷۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان و یک آزمایشگاه خصوصی بر اساس PCR ۵۰ درصد سویه‌ها (۳۵ مورد) و بر اساس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن ۳۱/۴درصد سویه‌ها (۲۲ مورد) نسبت به متی سیلین مقاوم بودند (۲۰).

در مجموع می‌توان گفت که میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت، بخصوص سویه‌های مقاوم به طیف وسیعی از انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها از همه مهمتر مقاومت به متی سیلین در پنیرهای سنتی سفید و کره‌های محلی عرضه شده در بازار تبریز در حد قابل توجهی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با پشتیبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شده است لذا از مسئولین این دانشگاه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E., Usleber, E. (2008) Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. Int. J. Food. Microbiol. 124 : 211-216.
2. Aragon-Alegro, L. C., Konta, E. M., Suzuki, K., Silva, M. G., Júnior, A. F., Rall, R. et. al. (2007) Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control. 18: 630-634.
3. Bean, N. H., Goulding, J. S., Lao, C., Angulo, F. J. (1996) Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988- 1992. MMWR. 45:1-66.
4. Boerema, J. A., Clemens, R., 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.
5. Cabral, K. G., Lämmler, C., Zschöck, M., Langoni, H., De Sá, M. E. P., Victória, C. et. al. (2004) Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. Can. J. Microbiol. 50: 901-909.
6. Dastmalchi, H., Ahmadi, M., Mardani, K., Batavani, R.A. (2009) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isdated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Vet. Microbiol. 137:202-206.
7. Devriese, L.A., Vandamme, L. R., Fameree, L. (1972) Methicillin (cloxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. ZBL. Vet. Med. B. 19: 598-605.
8. Institute of Standard and Industrial Research of Iran., (1994) Methods for identification and enumeration

of *Staphylococcus aureus* coagulase (+) in foodstuff. (7th ed.) ISIRI Number: 1194.

9. Japooni, A., Alborzi, A., Orafa, F., Rasouli, M., Farshad, S. (2004) Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* Isolated from clinical specimens. I.B.J. 8: 173-178.
10. Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H. et. al. (2005) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. Vet. Microbiol. 105: 301-305.
11. Kim, C. H., Khant, M., Morin, D. E., Hurleys, W. L., Tripathy, D. N., Kehrli, M. et. al. I. (2001) Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. J. Dairy. Sci. 84: 74-83.
12. Mahony, R. O., Abbott, Y., Leonard, F. C., Markey, B. K., Quinn, P. J., Pollock, P. J. et. al. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. Vet. Microbiol. 109: 285-296.
13. Merlino, J., Watson, J., Rose, B., Beard-Pegler, M., Gottlieb, T., Bradbury, R. et. al. (2002). Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. J. Antimicrob. Chemother. 49: 793-801.
14. Nafisi, M. R., Kalhor, H., Zamanzad, B., Karimi, A., Farokhi, A., Validi, M. (2008) Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord. Arak University of Medical Sciences Journal. 11: 94-100.
15. Neeling, A. J., Broek, M. J. M., Spalburg, E. C., Santen-Verheuvel, M. G., Dam-Deisz, W. D. C., Boshuizen, H. C. et. al. (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet. Microbiol. 122: 366-372.
16. Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A. et. al. (2007) Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int. J. Food. Microbiol. 115: 290-296.
17. Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P. 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.
18. Rahimi F., Bouzari M., Vandyousefi J., Maleki Z., Saberi Kashani, S., Davoudi, S. (2008) Analysis of antibiotic resistance and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals and medical laboratories in Tehran. Iranian Biological Journal. 21: 64-74.
19. Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Stephan, R. (2004) Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet. Micriobiol. 101: 101-107.
20. Viktoria, A., Alexandra, M., Christian, R. (2001) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int. J. Food. Microbiol. 68:105-113.
21. Zamani, A. R., Sadaghian, S., Najafiemosleh, M., Goudarzi, M. T., Yoysefi- Moshouf, R., Ghaderkhani, J. (2007) Detection of methicillin-resistance (mec-A) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Ann. Microbiol. 57: 273-276.

J. Vet. Res. 67, 1:65-70, 2012

Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran.

Mirzaei, H.[1*], Javadi, A.[1], Farajli, M.[2], Shah-Mohammadi, A.R.[2], Monadi, A. R.[3], Barzegar, A.[4]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz- Iran.*

[2]*Graduated from the Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz- Iran.*

[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz- Iran.*

[4]*Research Center of Pharmacological Nanotechnology, Tabriz University of Medicine, Tabriz- Iran.*

(Received 4 Merch 2011 , Accepted 15 June 2011)

Abstract:

BACKGROUNDS: In recent years isolation of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*, especially methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in food and food-producing animals has become more frequent. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine the prevalence of MRSA in traditional white cheese and butter presented in Tabriz by culture and PCR techniques, as well as the determination of their antibiotical susceptibility. **METHODS:** In the present study, 250 traditional white cheese and butter samples were collected from different producers across Tabriz. Evaluation for contamination by coagulase positive *Staphylococcus aureus* was done using the culturing method. The isolates were subjected to the PCR technique according to the *Nuc* gene in order to confirm *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance to the gene (*mecA*) and the antibiotic resistance trend of the isolates were studied by the disc diffusion agar method. **RESULTS:** The culture of the samples indicated that 26 cheese and 24 butter samples were contaminated by coagulase positive *Staphylococcus aureus*. Nineteen cheese samples and 11 butter samples were confirmed to be *Staphulococcus aureus* based on PCR using the Nuc primer gene. From a total number of 30 isolates containing the *Nuc* gene, 11 had the resistant mec-A gene. In overall, from the evaluated samples 100% of the isolates demonstrated simultaneous resistance to more than 3 antibiotics. **CONCLUSIONS:** It can be stated that there was a considerable amount of *Staphylococcus aureus* which was resistant to a variety of antibiotics, most importantly methicillin resistant. *Staphylococcus aureus* in the evaluated samples.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant, traditional cheese, traditional cream, PCR.

***Corresponding author's email: hmirzaei@iaut.ac.ir, Tel: 0411-3318689, Fax: 0411-3328560**