تعیین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به ونکومایسین جدا شده از شیر خام گاو

حمید آدیم[۱]، راضیه پرتوی*[۱]، حمیدرضا کاظمینی[۱]، راحم خوشبخت[۲]، مریم عزیزخانی[۱]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل، ایران.
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ۱۳۹۹، بازنگری: ۲ اسفند ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس عامل اصلی اندوکاردیت، سپسیس و مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی حساسیت به اریترومایسین در ۵۰ سویه استافلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین (VRSA) و حساس به ونکومایسین (VSSA) جدا شده از شیر خام گاو و نیز تعیین انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌ها می‌باشد. براث مایکرودایلوشن به منظور تعیین مقاومت به ونکومایسین و تعیین حداقل غلظت مهار رشد اریترومایسین مورد استفاده قرار گرفت. حضور ژن‌های ermA، ermB، ermC و msrA کدکننده مقاومت به اریترومایسین از طریق PCR مورد بررسی قرار گرفت. ۸۴ درصد از جدایه‌ها حساس و ۱۶ درصد مقاوم به ونکومایسین بودند. یک جدایه نسبت به اریترومایسین حساس بود و هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشت. ۹۰ درصد جدایه‌ها نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند که از این تعداد ۲۴/۴ درصد هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند، در حالی که ۵۱/۱ درصد از نظر ژن ermB مثبت بودند. ermA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. حضور همزمان ژن‌های مقاومت در ۸ جدایه مشاهده شد. هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و MIC اریترومایسین مشاهده نشد. ۳۷/۵ درصد از جدایه‌های VRSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند، در حالی که ۲۵ درصد دارای دو ژن مقاومت بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود. تمام جدایه‌های VRSA نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند. هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و حساسیت به ونکومایسین مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: *اریترومایسین، استافیلوکوکوس اورئوس، ژن مقاومت به اریترومایسین، شیر خام، ونکومایسین*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dvmr.partovi@ut.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری پاتوژن فرصت‌طلب می‌باشد که به میزان زیادی در محیط پراکنده بوده و مسئول ایجاد عفونت‌هایی چون سلولیت، اندوکاردیت، پیودرم، پنومونی، استئومیلیت، عوارض مربوط به زخم‌های جراحی و سپسیس می‌باشد. این باکتری همچنین عامل ایجاد آبسه‌ها، ورم پستان و سندوم شک سمی در گاوها می‌باشد (۵-۱). سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده انتروتوکسین‌های مقاوم به دما موجب مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌شوند که یک سوم سندروم‌های گاستروانتریت غذازاد را در برمی‌گیرد (۳، ۶، ۷). یک ویژگی نامطلوب سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم بودن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل تولید یک سد اگزوپلی ساکارید و ایجاد محافظت از طریق مایکروآبسه‌ها و دریافت مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک از طریق فاکتورهای ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها و یا ترانس پوزون‌ها می‌باشد (۹-۷). برخی از مطالعات نشان دادند که اغلب سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند (۱۰-۸).

گلیکوپپتید ونکومایسین نقش بسیار مهمی در درمان عفونت‌های مرتبط با استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارد. استفاده بیش از حد یا استفاده نادرست از این آنتی‌بیوتیک موجب ایجاد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به ونکومایسین (VRSA) در جهان می‌شود (۱۳-۱۱). بر اساس سازمان بهداشت جهانی، VRSA و استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت متوسط به ونکومایسین (VISA) به‌عنوان اولویت‌های اصلی "پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک" در نظر گرفته می‌شوند که آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای آنها به صورت اضطراری مورد نیاز است (۱۴).

ماکرولیدها مانند اریترومایسین برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس‌های مقاوم به چندین دارو به طور وسیعی استفاده می‌شوند (۱۵، ۱۶). اثر ضد میکروبی اریترومایسین بر ضد استافیلوکووس اپیدرمیدیس مقاوم به ونکومایسین قبلاً گزارش شده است (۱۷). اگرچه، تجویز بیش از حد و طولانی مدت این آنتی‌بیوتیک موجب افزایش سویه‌های مقاوم در پاتوژن‌های انسانی و حیوانات مزرعه شده است (۱۵، ۱۶). چندین مطالعه در رابطه با پایه ژنتیکی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از طیور، سگ سانان و نمونه‌های بالینی قبلاً گزارش شده است (۱۵، ۱۶، ۱۸). شایع‌ترین مکانیسم‌های مربوط به مقاومت اریترومایسین تولید متیلاز ریبوزومال و سیستم افلاکس کد شده به ترتیب توسط ژن‌های erm و msr می‌باشد (۱۹، ۲۰).

غذا می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را از طریق انتقال پاتوژن‌های مقاوم غذازاد یا فاکتورهای مقاومت از میکروفلور غذا به پاتوژن‌ها در بدن انسان منتقل کند (۷). علاوه بر این، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان یا پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی در حیوانات تولیدکننده غذا مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در سویه‌های مختلف باکتریایی ایجاد می‌کند (۸). استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان فلور نرمال بینی، پوست و موی انسان و حیوانات بوده و به راحتی از طریق افراد در تماس با غذا به غذا منتقل می‌شود (۳).

مطالعاتی در رابطه با مقاومت به ونکومایسین و اریترومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد (۱۰، ۲۱، ۲۲). همچنین، تعدادی از نویسندگان حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام در ایران گزارش کرده اند (۲۳،۲۴). اگرچه اطلاعات

محدودی در رابطه با خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های VRSA و VSSA جدا شده از شیر خام در ایران وجود دارد. مطالعه حاضر به ارزیابی حساسیت به اریترومایسین در سویه‌های VRSA و VSSA جدا شده از شیر خام و تعیین انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان این جدایه‌ها می‌پردازد.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی: پنجاه سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو از خرده فروشی‌های استان مازندران در بازه زمانی دسامبر ۲۰۱۷ تا فوریه ۲۰۱۸ جمع‌آوری شد و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (۳۲). این جدایه‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران نگهداری شدند. جدایه‌ها در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز (BHI broth) دوبار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک دوره ۱۸ ساعته کشت داده شدند (Merck, Darmstadt, Germany).

تست حساسیت به ونکومایسین: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به منظور ارزیابی حساسیت به ونکومایسین با استفاده از روش براس مایکرودایلوشن و بر اساس روش CLSI بررسی شدند (۳۳). جدایه‌های با MIC بیشتر مساوی ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان VRSA و جدایه‌های با MIC کمتر مساوی ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان VSSA طبقه‌بندی شدند.

تعیین حداقل غلظت مهاری رشد اریترومایسین: روش براس مایکرودایلوشن در محیط کشت مولر هینتون براس به منظور تعیین MIC اریترومایسین (Sigma, Steinheim, Germany) در رنج ۰/۰۳۲ تا ۶۷/۱۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر طبق روش CLSI انجام شد (۳۳). میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل برای این تست مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به میکروپلیت منتقل شد و سپس ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر اضافه شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، MIC که همان کمترین غلظت اریترومایسین بدون رشد قابل مشاهده است، تعیین گردید. شاخص‌های زیر برای اریترومایسین مورد استفاده قرار گرفت: MIC بیشتر مساوی ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه مقاوم، MIC برابر با ۱ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه حد وسط و MIC کمتر مساوی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سویه حساس می‌باشد.

جستجوی ژن‌های کدکننده مقاومت به اریترومایسین: حضور ژن‌های ermA، ermB، ermC و msrA که مسئول ایجاد مقاومت به اریترومایسین هستند در جدایه‌های استافیلوکوکس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. کلونی‌های خالص سویه‌های جدا شده در محیط BHI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. کیت استخراج DNA باکتریایی و براساس دستورات شرکت سازنده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت (Gene Transfer Pioneers, Tehran, Iran). پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. دستگاه PCR ترمال سایکلر به ترتیب زیر تنظیم شد: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل از دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد (برای msrA در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، و تکثیر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه تکثیر محصولات ناکامل به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه

سانتی‌گراد. تست PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر PCR 1×، $MgCl_2$ ۲ میلی‌مولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، dntp ۰/۲ میلی‌مولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، هریک از پرایمرها به میزان ۱۰ پیکومولار (CinnaGen, Tehran, Iran)، DNA پلیمراز ۱ واحد (CinnaGen, Tehran, Iran) و نمونه DNA ۲ میکرولیتر و به میزان کافی از آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد (وزنی/حجمی) در بافر تریس استات EDTA (۸۰ دقیقه، ۹۲ ولت) شناسایی شد. محصولات PCR با استفاده از اتیدیوم بروماید (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رنگ شدند و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت UV (Technogen, Tehran, Iran) مشاهده شدند. سایز بخش‌های تکثیر شده با مقایسه با مارکر استاندارد با باندهای ۱۰۰ جفت بازی (CinnaGen, Tehran, Iran) تعیین شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده به منظور جستجوی ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو

نام پرایمر	توالی پرایمر (´۵ به ´۳)	ژن هدف	سایز محصول (جفت باز)	منبع
ermA-F	TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT	*ermA*	۱۳۹	۱۹
ermA-R	CTACACTTGGCTTAGGATGAAA			
ermB-F	CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	*ermB*	۱۴۲	۱۹
ermB-R	GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA			
ermC-F	AATCGTCAATTCCTGCATGT	*ermC*	۳۰۰	۳۴
ermC-R	TAATCGTGGAATACGGGTTTG			
msrA-F	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	*msrA*	۹۴۰	۳۵
msrA-R	AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT			

آنالیز آماری: تست غیر پارامتریک من ویتنی یو تست به منظور ارزیابی داده‌های کمی مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های کیفی با استفاده از تست دقیق فیشر آنالیز شد و به‌صورت میزان بروز دقیق و نسبی نشان داده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۵ مورد بررسی قرار گرفت. برای تمام آنالیزها، $P<0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌ها براساس حساسیت نسبت به ونکومایسین ارزیابی شدند و به دو گروه VRSA و VSSA طبقه‌بندی شدند. از ۵۰ جدایه مورد بررسی،

۴۲ مورد (۸۴ درصد) حساس به ونکومایسین بودند. مقاومت به ونکومایسین در ۸ جدایه (۱۶ درصد) مشاهده گردید.

جدول ۲- حساسیت به اریترومایسین و انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو

فنوتیپ مقاومت	MIC (µg/ml)	*ermA* (%)	*ermB* (%)	*ermC* (%)	*msrA* (%)	*ermB/ermC* (%)	*ermB/msrA* (%)	فاقد ژن مقاومت	تعداد سویه‌ها (٪)
حساس	۰/۲۶۲	-	-	-	-	-	-	۱ (۲)	۱ (۲)
حد واسط	۱/۰۴۸	-	۱ (۲)	-	-	-	-	۱ (۲)	۲ (۴)
	۲/۰۹۷	-	۱ (۲)	-	-	-	-	۱ (۲)	۲(۴)
مقاوم	۴/۱۹۴	-	۵ (۱۰)	-	-	-	-	۳ (۶)	۸ (۱۶)
	۸/۳۸۸	-	۳ (۶)	۱ (۲)	-	۱ (۲)	۲ (۴)	۱ (۲)	۸ (۱۶)
	۱۶/۷۷۷	-	۴ (۸)	۱ (۲)	-	۳ (۶)	-	-	۸ (۱۶)
	۳۳/۵۵۴	-	۸ (۱۶)	-	۱ (۲)	۱ (۲)	۱ (۲)	۷ (۱۴)	۱۸ (۳۶)
	۶۷/۱۰۸	-	۳ (۶)	-	-	-	-	-	۳ (۶)
تعداد سویه‌ها (٪)	-	-	۲۵ (۵۰)	۲ (۴)	۱ (۲)	۵ (۱۰)	۳ (۶)	۱۴ (۲۸)	۵۰ (۱۰۰)

حساسیت ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو نسبت به اریترومایسین و انتشار ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. رنج MIC اریترومایسین در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۲۶۲ تا ۶۷/۱۰۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. تنها یک جدایه با MIC ۰/۲۶۲ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد که نسبت به اریترومایسین حساس گزارش گردید و هیچ یک از ژن های مقاومت به اریترومایسن را نداشت. چهار جدایه از نظر مقاومت به اریترومایسین حد وسط بودند. درصد بسیار بالایی از جدایه‌ها (۹۰درصد) نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند که از این تعداد، ۲۴/۴ درصد هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند و ۵۱/۱ درصد دارای ژن ermB بودند. ۱۷/۸ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین (ERSA) دو ژن مقاومت به اریترومایسین را حمل می‌کردند. شایع‌ترین ژن مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌ها ermB بود که در ۵۰ درصد جدایه‌ها وجود داشت. ژن ermC در دو جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد، در حالی که یک جدایه دارای ژن msrA بود. ErmA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. حضور همزمان ژن‌های مقاومت در ۸ جدایه (۱۶ درصد) مشاهده شد، در حالی که ۵ جدایه دارای ژن‌های ermB و ermC بودند و ۳ جدایه نیز دارای ermB و msrA بودند. ۱۴ جدایه (۲۸ درصد) هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند. MIC اریترومایسین در تمام ۸ جدایه که حضور همزمان ژن‌های مقاومت را نشان دادند،

مساوی یا بیشتر از ۸/۳۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. براساس تست دقیق فیشر، هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و MIC اریترومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳- بروز (تعداد و درصد) حساسیت به اریترومایسین و ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌های VRSA و VSSA از شیر خام گاو

	VSSA (۴۲)	VRSA (۸)	P-value
ermA	۰	۰	-
ermB	۲۳ (٪ ۵۴/۷۶)	۲ (٪۲۵)	۰/۲
ermC	۲ (٪ ۴/۷۶)	۰	۰/۷
msrA	۰	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۱
ermB/ermC	۴ (٪ ۹/۵۲)	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۵
ermB/msrA	۲ (٪ ۴/۷۶)	۱ (٪ ۱۲/۵)	۰/۴
فاقد ژن مقاومت	۱۱ (٪ ۲۶/۱۹)	۳ (٪ ۳۷/۵)	۰/۶
MIC ± SD	۱۸/۱۴ ± ۱۹/۷۲	۱۱/۶۴ ± ۲۷/۲۶	۰/۱
فنوتیپ مقاومت:			
ESSA			
EISA	۱ (٪ ۲/۳۸)	۰	
ERSA	۴ (٪ ۹/۵۲)	۰	
	۳۷ (٪۸۸)	۸ (٪۱۰۰)	

استافیلوکوکوس اورئوس حساس به اریترومایسین=ESSA
استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط به اریترومایسین=EISA
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین=ERSA

بروز حساسیت به اریترومایسین و ژن‌های مقاومت به اریترومایسین در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس VRSA و VSSA در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. ErmB به‌ترتیب در ۵۴/۷۶ درصد و ۲۵ درصد از VSSA و VRSA ها یافت شد. ۳۷/۵ درصد از جدایه‌های VRSA هیچ

یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند، در حالی که ۲۵ درصد دارای دو ژن مقاومت بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود، اما این تفاوت معنادار نبود ($P = 0.1$). ذکر این نکته جالب به نظر می‌رسد که تمام جدایه‌های VRSA (۱۶ درصد) نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند. در میان این جدایه‌ها، دو جدایه دارای ermB بودند، یک جدایه ermB و ermC داشت و یک جدایه ermB و msrA و یک جدایه نیز msrA داشت. سه جدایه VRSA و ERSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند. بر اساس تست دقیق فیشر، هیچ ارتباط معناداری بین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین و حساسیت به ونکومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام گاو مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

درصد بالایی (۸۴ درصد) از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حاضر نسبت به ونکومایسین حساس بودند، در حالی که ۱۶ درصد مقاوم بودند. ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک با اثر منحصر به فرد علیه عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد (۱۱). تمام جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی در ترکیه، عفونت‌های جوجه‌های گوشتی در دانمارک، شیر خام در الجزایر و غذاهای عرضه شده در فروشگاه‌ها در چین نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۰، ۱۸، ۲۵، ۲۶). این یافته‌ها مطابق با نتایج مطالعه السايد و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۱۸ می‌باشد که نشان دادند ۱۳/۸ درصد از جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند. گون و همکاران (۳) در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از محصولات گوشت و شیر در ترکیه انجام دادند، نشان دادند که شیوع مقاومت به ونکومایسین ۲۱/۷ درصد گزارش شد. در یک مطالعه در جنوب اتیوپی، ۲۳/۵ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ظروف انتقال شیر نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند که مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲). میزان شیوع بالا برای مقاومت به ونکومایسین (۵۰ درصد) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با منشأ آب‌های مناطق تفریحی و شن‌های ساحلی گزارش شد (۹). فاکتورهایی مانند استفاده بیش از حد یا استفاده نادرست از این آنتی‌بیوتیک که موجب ایجاد فشار انتخابی می‌شود، درمان طولانی بیماران با عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و عفونت با انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین و نیز در دسترس بودن ونکومایسین در داروخانه‌ها بدون نیاز به تجویز پزشک موجب ایجاد سویه‌های VRSA در سراسر جهان شده است (۱۱، ۲۷). مقاومت به ونکومایسین می‌تواند به دلیل تغییر در سنتز پپتیدوگلایکان با افزایش باقیمانده دی‌آلانین و ضخیم شدن دیواره سلولی باشد (۱۱، ۲۷). مصرف شیر خام دارای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک اثرات درمان با آنتی‌بیوتیک را در موارد عفونت در مصرف‌کننده ضعیف می‌کند (۲۶).

تنها یکی از ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام نسبت به اریترومایسین حساس بود، ۸ درصد حد وسط بوده، در حالی که درصد خیلی زیادی از استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به اریترومایسین (۹۰ درصد) در این مطالعه گزارش شدند. مقاومت به اریترومایسین در مطالعه حاضر بالاتر از موارد گزارش شده توسط داکا و همکاران (۲) در سال ۲۰۱۲، ماتالا و همکاران (۲۶) در سال ۲۰۱۹و شلگلوا و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۰۸ بود، در حالی که کمتر از میزان گزارش شده

توسط زمانتار و همکاران (۵) در سال ۲۰۱۳ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیمارستان‌ها در لیبی بود. این تفاوت را می‌توان به این مسئله نسبت داد که جدایه‌های بالینی نسبت به جدایه‌های مواد غذایی مقاومت بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۸). این تفاوت‌ها در میزان مقاومت به اریترومایسین را می‌توان به استفاده متنوع از این آنتی‌بیوتیک در کشورهای مختلف، برنامه‌های کنترل عفونت توسط دولت‌ها، سیاست‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک و اثر تفاوت‌های جغرافیایی نسبت داد (۱۲، ۱۶، ۱۹). شیوع مقاومت به اریترومایسین در این مطالعه قابل مقایسه با مورد گزارش شده در آفریقای جنوبی می‌باشد (۹). ۷۶ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در لهستان به اریترومایسین مقاوم و ۲۴ درصد حد وسط بودند (۲۰). انتقال جدایه‌های مقاوم از انسان‌های بیمار به مرتع یا محیط، شیردوشی دستی حیوانات، عدم رعایت اصول بهداشتی قبل و بعد از شیردوشی، استفاده بیش از حد از برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور درمان عفونت‌های حیوانات و نیز استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد در غذای حیوانات دلایل افزایش میزان مقاومت در استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱،۷،۲۶).

ژن ermB فاکتور اصلی مقاومت به اریترومایسین (۵۰ درصد) و سپس ermC (۴ درصد) و msrA (۲ درصد) بوده است. ErmA در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. ۱۶ درصد از جدایه‌ها دارای دو ژن مقاومت به طور همزمان بودند، در حالی که ۲۸ درصد هیچ یک از ژن‌ها را نداشتند. مشابه نتایج مطالعه حاضر، آکانبی و همکاران (۹) در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ژن ermB در ۷۱/۴ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از آب‌ها و سواحل یافت شد، در حالی که ermA و ermC وجود ندشت. ErmA در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از غذا، بیمارستان‌ها و جوامع در الجزایر یافت نشد (۸). از طرف دیگر، ermA شایع‌ترین ژن یافت شده در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از طیور در دانمارک، عفونت‌های انسانی در ایالات متحده امریکا و جدایه‌های بالینی در ترکیه بوده است (۱۶، ۱۸، ۲۸). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل منشأ متفاوت جدایه‌ها باشد. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌توانند از طریق ترانس‌پوزون‌ها، پلاسمیدها و انتگرون‌ها از انسان‌ها به حیوانات یا شیر منتقل شود (۷، ۹، ۱۰، ۲۱). تمام استافیلوکوکوس‌های مقاوم به اریترمایسین جدا شده از غذا حداقل دارای یکی از ژن‌های مقاومت می‌باشند (۲۹)، در حالی که در مطالعه حاضر، ۲۴/۴ درصد از جدایه‌های ERSA هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشتند. این نتایج با نتایج پیاتکوسکا و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد. ۴۲ از ERSA در لیبی هیچ یک از ژن‌های مقاومت به اریترومایسین را نداشتند (۵). این مسأله را می‌توان به سایر ژن‌های مقاومت به اریترومایسین مانند A-B Ere و mef در جدایه‌ها، موتاسیون‌های نقطه‌ای، سنتز و فعالیت آنزیم‌های غیر فعال کننده ماکرولید و تولید بیوفیلم نسبت داد (۱۶، ۲۰، ۲۱). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ستین و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۰ مغایرت دارد که نشان دادند که ترکیب مکانیسم‌های مقاومت به اریترومایسین در میان استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از بیمارستان‌ها در ترکیه نادر است. حضور همزمان دو ژن erm در استافیلوکوکوس‌ها قبلاً گزارش شده است (۲۹، ۳۰). MIC هر ۸ جدایه که به صورت همزمان دو ژن مقاومت را داشتند، مساوی یا بزرگتر از ۸/۳۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. پیاتکوسکا و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که جدایه‌های با حضور همزمان دو متیلاز ریبوزومال متفاوت میزان MIC بیشتر از ۱۰۲۴

میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند.

تمام جدایه‌های VRSA در این مطالعه نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند. میانگین MIC اریترومایسین در جدایه‌های VRSA بالاتر از جدایه‌های VSSA بود. الساید و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که ۸۱/۸ درصد از جدایه‌های VRSA مقاوم به اریترومایسین بودند. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات گذشته نشان داد که جدایه‌های VRSA از شیر گاو و بز و نیز یک بیمارستان به انواع متنوعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند (۱، ۳۱). رحیمی پور و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۸ نیز گزارش کردند که اغلب جدایه‌های VRSA همچنین نسبت به متی‌سیلین مقاوم بودند و مقاومت نسبت به سایر مواد ضد میکروبی نیز نشان دادند.

در مجموع، میزان مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام نه نگران کننده و نه قابل اغماض است. اگرچه میزان مقاومت به اریترومایسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام در ایران هشدار دهنده است. تمام جدایه‌های VRSA نسبت به اریترومایسین نیز مقاوم بودند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای خطر برای مصرف‌کننده است. جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام ناقلین ژن‌های مقاومت به اریترومایسین به ویژه ermB هستند. بنابراین نیاز اضطراری برای ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در غذا، حیوانات تولید کننده غذا و انسان و نیز نظارت بر رعایت اصول بهداشتی در طی شیردوشی و انتقال شیر خام وجود دارد. یک مطالعه در مقیاس بزرگ در آینده به منظور ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و اساس ژنتیکی آها به منظور درک دقیق و عمیق از موضوع لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه‌ی پژوهشی (گرنت) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

References

1- Bhattacharyya D, Banerjee J, Bandyopadhyay S, Mondal B, Nanda PK, Samanta I, Mahanti A, Das AK, Das G, Dandapat P, Bandyopadhyay S. First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microb Drug Resist*. 2016; 22(8): 675-681.

2- Daka D, G/silassie S, Yihdego D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012; 11: 26-32.

3- Guven K, Mutlu MB, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. *J Food Saf*. 2010; 30: 196–212.

4- Mohammed J, Ziwa MH, Hounmanou YMG, Kisanga A, Tuntufye HN. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tanzania. *Hindawi Int J Microbiol*. 2018; 2018: 1-6.

5- Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi SI, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service. *Afr J Microbiol Res.* 2013; 7: 4414-4421.

6- Long SS, Prober CG, Fischer M. Principles and practice of pediatric infectious diseases. *Philadelphia, Elsevier*; 2018.

7- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol*. 2009; 26(3): 278–282.

8- Achek R, Hotzel H, Cantekin Z, Nabi I, Hamdi TM, Neubauer H, El-Adawy H. Emerging

of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Res Notes*. 2018; 11(1): 663-670.

9- Akanbi OE, Njom HA, Fri J, Otigbu AC, Clarke AM. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(9): 1001-1016.

10- Wang W, Baloch Z, Jiang T, Zhang C, Peng Z, Li F, Fanning S, Ma A, Xu J. Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. Front Microbiol. 2017; 8: 2256-2267.

11- Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(Suppl 1): 16–23.

12- ElSayed N, Ashour M, Amine AEK. Vancomycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in a rural setting, Egypt. *Germs.* 2018; 8(3): 134-139.

13- Huang SH, Chen YC, Chuang YC, Chiu SK, Fung CP. Prevalence of VISA and heterogenous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin MICs in Taiwan: *A multicenter surveillance study*. 2012-2013. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015; 49(5): 701-707.

14- World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *Washington, WA, USA: WHO*. 2007.

15- Boerlin P, Burnens AP, Frey J, Kuhnert P, Nicolet J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Vet Microbiol*. 2001;79(2):155-169.

16- Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical Staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010; 43(6): 524–529.

17- Sanyal D, Johnson AP, George RC, Cookson BD, Williams AJ. Peritonitis due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet*. 1991; 337(8732): 54.

18- Aarestrup FM, Agersù Y, Ahrens P, Jùrgensen JCE, Madsen M, Jensen LB. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol*. 2000; 74(4): 353-364.

19- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 44(2): 231–238.

20- Piatkowska E, Piatkowski J, Przondo-Mordarska A. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin in caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2012; 17(4): 633-645.

21- Pekana A, Green E. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from meat carcasses and bovine milk in abattoirs and dairy farms of the Eastern Cape, South Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15: 2223-2234.

22- Rahimipour F, Ghazvini K, Youssefi M. Reports of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from Middle East countries. *Arch Clin Infect Dis*. 2018; 13(2): e59522.

23- Khodadadi P, Bijanzadeh M, Najafi A, Zarinpour V, Moshfe A, Ansari H. Antibiotic resistance and detection of femA gene in *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. *Med Lab J*. 2016; 10(4): 40-45.

24- Sahebekhtiari N, Nochi Z, Eslampour MA, Dabiri H, Bolfion M. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiol Imm H*. 2011; 58(2): 113–121.

25- Aydin, N., Gultekyn, B., Eyygor, M., & Gurel, M. The Antibiotic resistance of Staphylococci isolated of clinical specimens. *Meandros Med Dent*. 2001; 2(3): 21-26.

26- Matallah AM, Bouayad L, Boudjellaba S, Mebkhout F, Hamdi TM, Ramdani-Bouguessa, N. *Staphylococcus aureus* isolated from selected dairies of Algeria: prevalence and susceptibility to antibiotics. *Vet World*. 2019; 12(2): 205-210.

27- Park JW, Lee H, Kim JW, Kim B. Characterization of infections with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility in South *Korea. Sci Rep*. 2019; 9: 6236-6245.

28- Nicola FG, Mcdougal LK, Biddle JW, Tenover FC. Characterization of erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* recovered in the United States from 1958 through 1969. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(11): 3024-3027.

29- Schlegelova J, Vlkova H, Babak V, Holasova M, Jaglic Z, Stosova T, Sauer P. Resistance to erythromycin of Staphylococcus spp. isolates from the food chain. *Veterinarni Medicina*. 2008; 53(6): 307-314.

30- Luthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(5): 966–969.

31- Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 1): 72-79.

32- Mahdavi F, Zaboli F, Khoshbakht R. Characteristics of erythromycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Int J Enteric Pathog*. 2019; 7(4): 121-125.

33- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. *Wayne, PA, USA: CLSI*; 2017.

34- Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. Erm (C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(5): 814-817.

35- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(9): 4089-4094.

Characterzation of erythromycin resistance phenotypes and genotypes among vancomycin sensitive and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk

Hamid Adim[1], Razieh Partovi[*1], Hamidreza Kazemeini[1], Rahem Khoshbakht[2], Maryam Azizkhani[1]

1- Assistant professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: February 3, 2021; Revise: February 20, 2021; Accept: February 28, 2021

Summary

Staphylococcus aureus is the causing agent of endocarditis, sepsis and Staphylococcal food poisoning. The purpose of this study was to assess erythromycin sensitivity in 50 Vancomycin Resistant *S. aureus* (VRSA) and Vancomycin Sensitive *S. aureus* (VSSA) isolates from bovine raw milk and also to determine the distribution of erythromycin resistance genes among the isolates. Broth microdilution method was used to determine vancomycin resistance and minimum inhibitory concentration of erythromycin. The presence of the *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes encoding erythromycin resistance was examined by PCR. 84% of the isolates were susceptible while 16% were resistant to vancomycin. A single isolate of *S. aureus* was sensitive to erythromycin and did not possess any of the erythromycin resistance genes. 90% of the isolates were resistant to erythromycin, of which, no resistance gene were found in 24.4% and 51.1% were *ermB* positive. *ErmA* was not found in any of the isolates. Simultaneous presence of resistance genes was detected in eight isolates. There was not any significant relationship between erythromycin resistance genes and MIC_E. 37.5% of VRSA isolates contained none of the erythromycin resistance genes while 25% contained two resistance genes. Mean MIC_E of VRSA was higher than VSSA isolates. All of the VRSA isolates were also erythromycin resistant. There was no significant relationship between erythromycin resistance genes and vancomycin sensitivity.

Key words: *Erythromycin, S. aureus, Erythromycin-resistance gene, Raw milk, Vancomycin*