فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسیکلین در *انتروکوکوس*‌های جدا شده از مواد غذایی شهر قم

هما طباطبایی[۱]، محسن زرگر[۲]، عباس مروتی[۳]، علی جوادی[۴]، اشکان دیربازیان[۵]، مهرداد معماریان[۶*]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۳- دانشجوی دکترای ویروس‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۴- دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، گروه علوم پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۵- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۶- استادیار،گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۲ شهریور ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۳ شهریور ۱۴۰۱

چکیده

انتروکوک‌ها باکتری‌های فلور نرمال دستگاه گوارش انسان می‌باشند و این باکتری‌ها عامل آلوده کننده مواد غذایی نیز به شمار می‌روند. هدف از این مطالعه غربالگری جدایه‌های *انتروکوکوس* با توجه به وجود ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین از نمونه‌های جدا شده مواد غذایی در شهر قم است. جمع‌آوری و کشت ۱۰۰ نمونه (گوشت و لبنیات)، در سطح شهر قم که بعد از کشت نمونه‌ها، *انتروکوک*‌ها جداسازی شدند و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی در سطح جنس تأیید هویت شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به کمک روش PCR میزان فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. در این مطالعه از ۵۳ جدایه *انتروکوکوس*، (۴۵ درصد) *انتروکوکوس فاسیوم* و (۵۵ درصد) *انتروکوکوس فیکالیس* تشخیص داده شد. فراوانی ژن‌های مقاومت *tetL*، *ermB*، *tetS*، *tetM* و *tetO* به‌ترتیب ۳، ۷، ۶، ۱۷و ۱۲ درصد گزارش شد. به‌منظور کاستن عفونت با این ارگانیسم و پیشگیری و کنترل شیوع و مرگ و میر ناشی از آن، بررسی اپیدمیولوژی و تعیین فراوانی مقاومت به تتراسایکلین به کمک PCR امری مهم در جهت شناسایی و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتروکوکوس*، *PCR*، *تتراسایکلین*، *مقاومت*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mehrdad0291@gmail.com

مقدمه

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت جز فلور نرمال روده انسان و بعضی حیوانات می‌باشند که در شرایط خاص توانایی تهاجم و گاهی ایجاد بیماری‌های خطرناک را نیز دارند. در گذشته این ارگانیسم‌ها غیر بیماری‌زا تلقی می‌شدند ولی بعد از جداسازی این باکتری از بیماران با بیماری زمینه‌ای و پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اهمیت آن مورد توجه قرار گرفت (۱). امروزه بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه با مصرف هزینه‌های چند میلیون دلاری، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان می‌شوند (۲). *انتروکوک‌ها* عامل شایع سیستیت*، پروستاتیت† و اپیدیدیمیت‡ در افراد مسن می‌باشند که در این افراد، عفونت‌های دستگاه ادراری فوقانی می‌تواند منجر به باکتریمی گشته و در مورد خانم‌های جوان، عامل سیستیت مزمن غیر شایع می‌باشد (۳). *انتروکوک‌ها* جهت افزایش ویرولانس، با مواد تجمع دهنده و سیتولیزین به‌طور سینرژیستیک از طریق سیستم درک حد نصاب§ با تنظیم ترشح سیتولایزین منجر به آسیب بافتی بیشتر در موارد اندوکاردیت می‌گردند (۴). از ۱۲ گونه انتروکوکال عفونت‌زای شناسایی شده تنها دوگونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بیشترین گونه‌های بیماری‌زا در انسان را تشکیل می‌دهند (۵). بروز مقاومت در *انتروکوک‌ها* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که باعث بروز عفونت‌های خطرناک بالینی می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد (۶). دلیل مقاومت VRE به آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی، که یکی از اعضای این خانواده آنتی‌بیوتیکی ونکومایسین است، به خاطر وجود ۶ خوشه‌ی ژنی *van* مختلف به نام‌های *vanE*، *vanD*، *vanC*، *vanB*، *vanA* و *vanG* است که دلیل مقاومت *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومایسین را توجیه می‌کند (۷). بیشترین و رایج‌ترین فنوتیپ مقاومت *انتروکوک‌ها* به ونکومایسین به دلیل خوشه‌های ژنی *vanA* و *vanB* و در مراحل بعدی *vanC* می‌باشد که ژن *vanA* عامل اصلی مقاومت سطح بالای *انتروکوکی* به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین (MICs > 64 µg/ ml) و تایکوپلانین (MICs >16 µg/ ml) و ژن *vanB* صرفاً عامل مقاومت سطح بالای باکتری به ونکومایسین (MICs 32 to 64 µg/ml) بوده اما همچنان به تایکوپلانین حساس است (۸). مهم‌ترین و شایع‌ترین مکانیسم مقاومتی آمینوگلیکوزیدها در *انتروکوک‌ها* غیر فعال‌سازی دارو با استفاده از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی است که توسط سه گروه از آنزیم‌های استیل ترانسفراز (ACC)، آدنیلیل ترانسفراز (ANT) و فسفوترانسفراز (APH) ایجاد می‌شود (۹). ژن‌های مقاومت در برابر تتراسیکلین *tetK* و *tetL* هستند. ژن *tetL* عامل مقاومت به کلیه تتراسیکلین‌ها به جز مینوسیکلین بوده و بر روی پلاسمید کونژوگه *انتروکوک فکالیس* و یا روی کروموزوم قرار دارد. ژن *tetK* با منشأ استافیلوکوک اورئوس، در ایزوله‌های اوروژنیتال انتروکوک شناسایی شده است (۱۰). شاخص *tetM* که بارزترین ژن مقاومت در برابر تتراسیکلین می‌باشد، از طریق ترانسپوزون کونژوگه قابل انتقال می‌باشد که از نظر ساختمان شبیه *Tn916* است. این ترانسپوزون به همراه شاخص *tetM* در *انتروکوک فکالیس* و *فاسیوم* یافت شده است. این شاخص در

* *Cystitis*

† *Prostitis*

‡ *Epididimitis*

§ *Quarom-sensing*

بین سایر جنس‌های باکتریایی نیز شایع است. گلایسیل سایکلین که از مشتقات جدید تتراسایکلین می‌باشد به دلیل مقاومت در برابر هر دو مکانیسم، جهت درمان *انتروکوک*‌های با مقاومت چند دارویی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱). روش‌های مرسوم تشخیص میکروبی صرفاً بر ویژگی‌های فنوتیپی ارگانیسم تکیه می‌کنند. اگرچه برخی از ویژگی‌های فنوتیپی مانند پروفایل ایزو آنزیم، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی اسیدهای چرب سلولی، دارای ویژگی‌های کافی برای تشخیص سویه میکروبی هستند، اما با این وجود اغلب ویژگی‌های فنوتیپی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی، حساسیت کافی برای تشخیص سویه را ندارند (۱۲). در سال‌های اخیر، توسعه و استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی انقلابی در تشخیص و کنترل بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. سیستم‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص مستقیم عوامل بیماری‌زای نمونه‌های بالینی و بدون نیاز به کشت، در تشخیص سریع میکروارگانیسم‌های غیر قابل کشت و یا سخت رشد حائز اهمیت می‌باشند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تکثیر توالی DNA میکروبی، شناسایی و توصیف بهتر پاتوژن را میسر می‌سازد. با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های تشخیص مولکولی در سالیان اخیر و همچنین کاهش خطر آلودگی، کاهش هزینه‌ها و سریع‌تر بودن این روش‌ها نسبت به روش‌های مرسوم، روش‌های مولکولی پتانسیل جایگزینی روش‌های تشخیصی مرسوم در میکروب‌شناسی را دارند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌عنوان یک مطالعه مقطعی (cross sectional) است که در این بخش از مطالعه با مراجعه به بخش فروش گوشت و لبنیات ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید و با نگهداری در ۴درجه سانتی‌گراد ظرف مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از کشت نمونه‌ها در محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، باکتری‌های رشد یافته در محیط بلاد آگار جهت شناسایی و افتراق سویه‌های انتروکوک کشت داده شدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، رشد بر روی محیط بایل اسکولین آگار، رشد بر روی محیط ۶/۵ درصد نمک و در نهایت تست (Pyrrolidonyl Aminopeptidase) انجام شد.

واکنش PCR: از جدایه‌های خالص شده جهت استخراج DNA با استفاده از کیت DNP استخراج شرکت سیناکلون استفاده گردید. برای بررسی نمونه‌های استخراج شده ارزیابی کیفی و کمی انجام شد. برای انجام واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد، به این صورت که مقادیر لازم ۱۲/۵میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۱ میکرولیتر از پرایمر جلویی و عقبی و ۵ میکرولیتر از DNA و ۵/۵ میکرولیتر آب به ازای هر میکروتیوب آماده گردید، و ۲ میکروتیوب که یکی برای کنترل مثبت و دومی کنترل منفی که به جای DNA، حجم معادل آن آب اضافه می‌شود تهیه گردید. کنترل منفی برای چک کردن عدم آلودگی مواد شرکت کننده در PCR است که در هر واکنش کنار تست‌ها انجام شد (۲۲). پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های *tetM*، *tetS*، *letL*، *tetO* و *ermB* با استفاده از توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری گردید و سپس در نرم‌افزار CLC sequence Viewer (ورژن ۹) این توالی‌ها زیر هم قرار گرفتند. برای ژن *tetL* ۲ سکانس، برای ژن *tetO* ۳ سکانس، برای ژن *ermB* ۳ سکانس، برای ژن *tetS* ۳ سکانس و برای ژن *tetM* ۳ سکانس از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شد سپس بر اساس نواحی ثابت هر یک از این ژن‌ها، توالی‌های مورد نظر پرایمرها انتخاب و سپس برای بررسی

اختصاصیت پرایمرها در بخش primer Blast بانک اطلاعاتی NCBI بررسی گردید که پرایمرها فقط به ژن‌های مورد نظر در این باکتری‌ها متصل می‌شوند.

براساس توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *tetL*، *tetO*، *ermB*، *tetM*، *tetS* قطعات ۳۱۱، ۴۴۲، ۳۰۶، ۳۷۳ و ۶۴۷ جفت باز را بر اساس انتظار تکثیر می‌دهد.

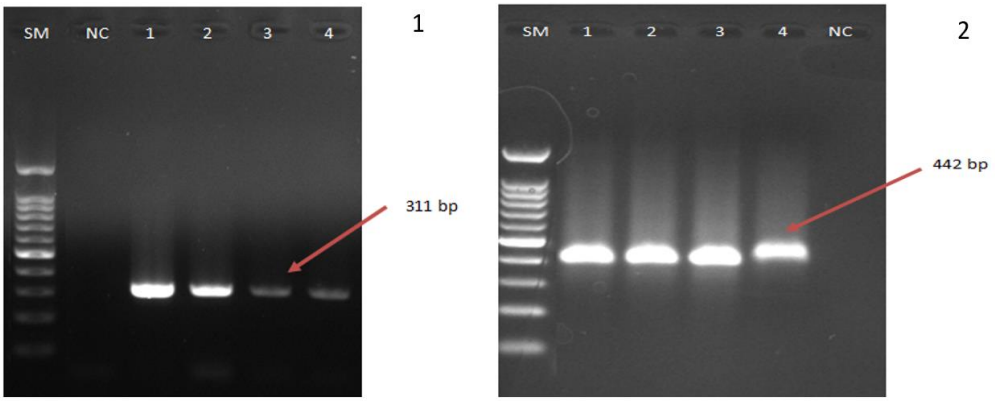
جدول ۱- توالی‌های مربوط به پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Primer name	Sequence	TM(C°)	PCR product
erm B-F	CGAAATTGGAACAGGTAAAGGG	53	311 bp
erm B-R	GTTTACTTTGGCGTGTTTCATTG		
tet(O)-F	CACGTTGACGCAGGAAAGAC	53	442 bp
tet(O)-R	CCTTTTGCTTCACTATAATTTCCG		
tetM-F	CTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTAC	51	373 bp
tetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACACAT		
tetL-F	CAATTATCACTGTTCCGTTTCTTATG	53	306 bp
tetL-R	GAACCATAGAGACAAACCCTGC		
tetS-F	AGAGTTAGGAAGTGTAGATAGCGG	51	647 bp
tetS-R	CTGAATTGAGTTGTGTGGGTG		

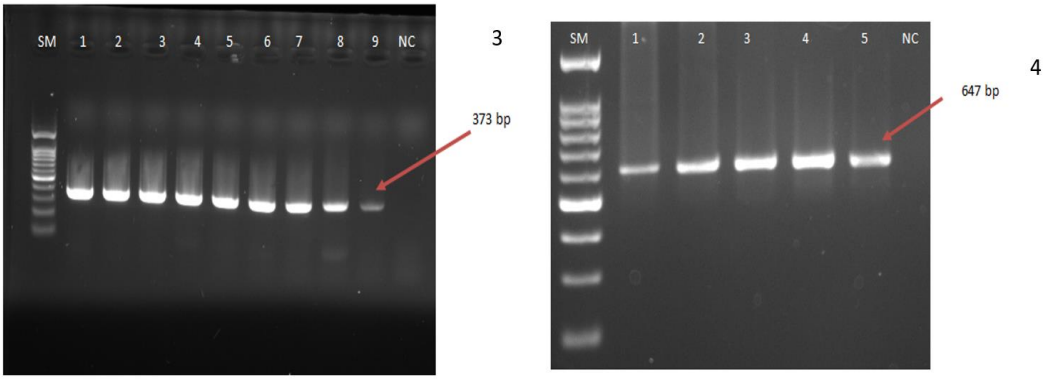
واکنش PCR برای ژن‌های *tetL*، *ermB*، *tetO* در شرایط ۹۵ درجه در ۳ دقیقه، ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه در ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه در ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی در ۵ دقیقه انجام شد. واکنش *PCR* ژن *tetS* و *tetM* در شرایط ۹۵ درجه در ۳ دقیقه، ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه در ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه در ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه پایانی در ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها پس از انجام واکنش برای مشاهده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شدند.

نتایج

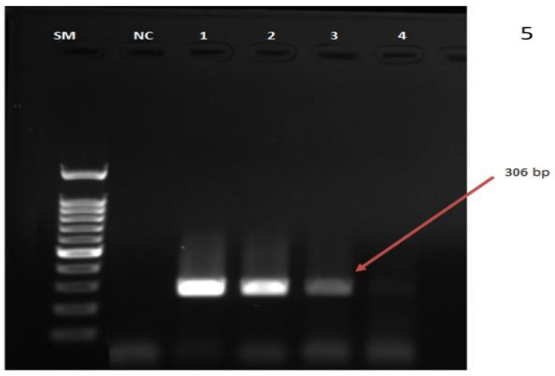
در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی که شامل گوشت و لبنیات بود به‌طور تصادفی از هر کدام ۵۰ نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برروی محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی کشت داده شد و بعد از سپری شدن دوره انکوباسیون پرگنه‌های مشکوک به انتروکوک مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. تست‌های تأییدی در سطح جنس برای شناسایی این باکتری انجام شد. ۵۳ نمونه به این باکتری آلوده بودند و در رنگ‌آمیزی گرم کوکسی‌های گرم مثبت را نشان دادند و نتایج تست‌های رشد برروی بایل اسکولین آگار، رشد روی محیط ۶/۵ درصد نمک، تست PYR مثبت و تست کاتالاز منفی گردید. از این ۵۳ ایزوله حاوی انتروکوک، ۵۵ درصد *انتروکوک فکالیس* و ۴۵ درصد *انتروکوک فاسیوم* تشخیص داده شد. فراوانی ژن *ermB*، براساس پرایمرهای طراحی شده که بایستی باند ۳۱۱ جفت بازی (طبق تصویر ۱)بر روی ژل ایجاد کند از ۵۳ ایزوله مورد بررسی تنها ۷ درصد حامل این ژن بودند. ژن *tetO* براساس محصول PCR ۴۲۲ جفت باز (تصویر ۲) تنها ۱۲ درصد حامل ژن *tetO* بودند. فراوانی ژن *tetM* ۱۷درصد بر اساس پرایمرهای طراحی شده دارای محصول ۳۷۳ جفت باز بودند (تصویر ۳). فراوانی ژن *tetS* و *tetL* بر اساس پرایمرهای طراحی شده برای این ژن‌ها به‌ترتیب باندهای۶۴۷ و ۳۰۶ جفت بازی بر روی ژل ایجاد می‌کند که به‌ترتیب ۶ و ۵ بودند (تصویر ۴ و ۵) (نمودار ۱).



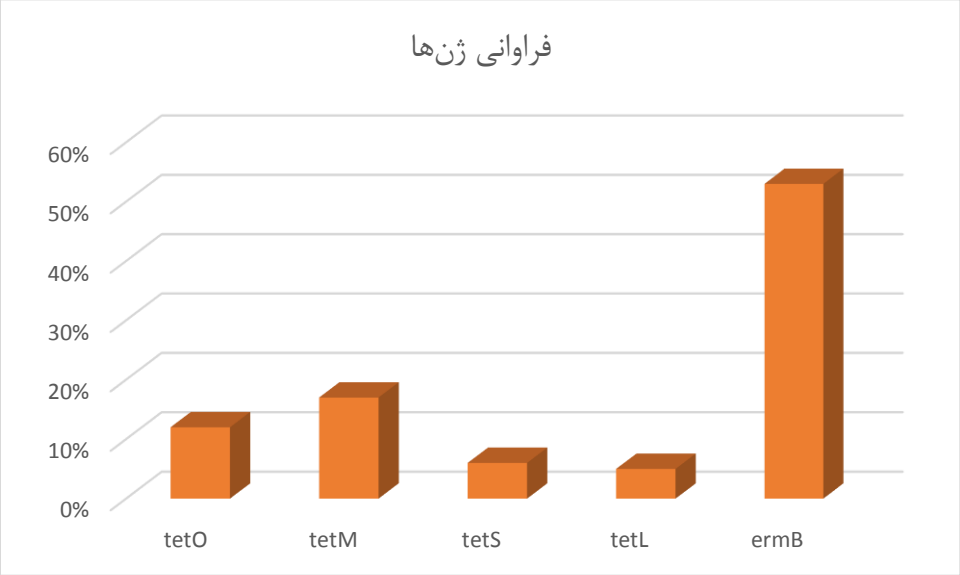
شکل ۱- ژل الکتروفورز ژن *ermB* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های دارای ژن و چاهک NC کنترل منفی، شکل ۲- ژل الکتروفورز ژن *tetO* از چپ سایز مارکر 100 bpچاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک‌های ۲ و ۳ و ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر و NC کنترل منفی



شکل ۳- ژل الکتروفورز ژن *tetM* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک های ۲تا ۹ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر و NC کنترل منفی، شکل ۴- ژل الکتروفورز ژن *tets* از چپ سایز مارکر 100 bp چاهک‌های ۱تا ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر چاهک شماره ۵ کنترل مثبت و NC کنترل منفی



شکل ۵- ژل الکتروفورز ژن *tetL* از چپ سایز مارکر 100 bp NC کنترل منفی چاهک شماره ۱ کنترل مثبت و چاهک‌های ۲ تا ۴ نمونه‌های دارای ژن مورد نظر



نمودار ۱- درصد فراوانی مقاومت ژن‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

انتروکوک‌ها در گذشته از لحاظ بالینی جزو باکتری‌های کم‌اهمیت تلقی می‌شدند چرا که به دلیل فقدان توکسین‌های قوی و عوامل بیماری‌زای قابل توجه، پتانسیل کمی در ایجاد بیماری دارند ولی بعد از مشاهده نقش کلیدی آنها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در سال ۱۹۷۰ و گزارش نخستین *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین در سال ۱۹۸۸ از کشور انگلستان، توجه به این باکتری‌ها رو به فزونی گذاشت به‌طوری که امروزه *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین به‌عنوان دومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی در نظر گرفته می‌شوند (۶، ۱۲، ۱۴). بروز مقاومت در *انتروکوک*‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که باعث بروز عفونت‌های خطرناک بالینی می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد (۹). استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها طی ۵۰ سال گذشته و از طرف دیگر ظرفیت بالای *انتروکوک* برای کسب و انتشار عوامل ایجادکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال ژن‌های مقاومت بین این میکروارگانیسم‌ها و یا سایر گونه‌ها درمان بیماری‌های ناشی از آن را به مشکلی جدی تبدیل نموده است (۱۹). با مقاومت روزافزون به ونکومایسین و ابتلا و مرگ و میر بالای آن، کنترل انتروکوک مشکل‌تر شده و تعیین اپیدمیولوژی و عوامل خطرساز مؤثر در گسترش آن حیاتی به نظر می‌رسد. تعیین فراوانی فنوتیپ مولکولی مقاومت *انتروکوک* نیز اهمیت فراوان دارد چرا که مشخص شدن این میزان فراوانی در هر بیمارستان، باعث درک اهمیت برنامه‌های غربالگری یا ارزیابی روزمره و پیشگیری و درمان به موقع بیماران شده که باعث کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی ناشی از آن می‌گردد (۱۸). مهم‌ترین و شایع‌ترین مکانیسم مقاومتی آمینوگلیکوزیدها در *انتروکوک*‌ها غیر فعال‌سازی دارو با استفاده از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی است که توسط سه گروه از آنزیم‌های استیل ترانسفراز (ACC)، آدنیلیل ترانسفراز (ANT) و فسفوترانسفراز (APH) ایجاد می‌شود. این آنزیم‌ها بر اساس تغییر سایت هدف و

طیف مقاومتی در کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی به چندین زیرگروه تقسیم‌بندی شده‌اند (۵). آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی توسط ژن‌های مقاومتی متفاوتی کد می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک‌ها در گروه‌های آمینو توسط آنزیم‌های AAC، در گروه‌های هیدروکسیل توسط ANT یا آنزیم‌های APH تغییر می‌یابند و قابلیت اتصال به ریبوزوم و مهار پروتئین‌سازی در آنها از بین می‌رود (۱۶).

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های کشاورزی و صنایع غذایی منجر به انتشار ژن‌های مقاومت در باکتری‌های پاتوژن و فلور طبیعی، انتقال به انسان و ایجاد بیماری خواهد شد. امروزه این وضعیت به یک تهدید جدی برای بهداشت و سلامت انسان تبدیل شده و توجه بیشتر دست اندرکاران را طلب می‌کند. زنجیره‌ی غذایی به‌عنوان یک منبع انتروکوکی مقاوم به عوامل ضد میکروبی شناخته شده است و این باکتری‌ها در غذاهای با منشأ حیوانی مانند گوشت و شیر وجود دارند (۱۱). از آنجایی که زیستگاه اصلی این باکتری‌ها دستگاه گوارش می‌باشد، پتانسیل قابل توجهی برای آلودگی گوشت‌ها در زمان کشتار دارند. مرحله تخلیه احشاء در کشتارگاه‌ها از نقاط بحرانی در آلودگی گوشت به مواد روده‌ای است. در میان محصولات غذایی، گوشت یکی از حساس‌ترین مواد غذایی فسادپذیر به شمار می‌آید، زیرا محیطی بسیار مساعد جهت فعالیت میکروب‌ها، مخمرها و کپک‌ها است. این باکتری‌ها اکثراً ترموتولرانت بوده که اسپور تولید نمی‌کنند و این موضوع نشان‌دهنده‌ی بقای آنها در گوشت‌های خام و پخته شده است (۲). *انتروکوکوس‌ها* سبب اکتساب و نیز انتقال ژن‌های عامل مقاومت می‌شوند. آنها می‌توانند عوامل مقاومت را از چندین گونه کسب کنند و نگران کننده‌تر این که سبب انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های مهم بالینی همچون: *کلستریدیوم دیفیسیل*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس‌ها* و گونه‌های *لیستریا* شوند از جمله مقاومت‌هایی که در *انتروکوکوس‌ها* ایجاد شده است می‌توان به مقاومت نسبت به دوزهای بالای آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد. با توجه به مطالب ذکر شده‌ی فوق و به‌منظور کاستن عفونت با این ارگانیسم و پیشگیری و کنترل شیوع و مرگ و میر ناشی از آن، بررسی اپیدمیولوژی و تعیین فراوانی مقاومت به ونکومایسین و آمینوگلیکوزیدها به کمک PCR امری مهم در جهت شناسایی و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد.

اغلب مطالعات انجام شده بر روی *انتروکوک‌ها*، بر روی ژن‌های مربوط به ونکومایسین و آمینوگلیکوزیدها می‌باشد و بررسی‌های کمتری در مورد ژن‌های مربوط به تتراسایکلین انجام گرفته است. در این مطالعه از ۵۳ باکتری جدا شده، ۴۵ درصد از نمونه‌ها *انتروکوکوس فاسیوم* و ۵۵ درصد مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشد که بر اساس پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای هر ژن میزان این ژن‌ها در نمونه‌ها *انتروکوکوس فکالیس* برای ژن *teto* ۱۲ درصد، برای *tetS* ۶ درصد، ژن *tetM* ۱۷ درصد، ژن *tetL* ۵ درصد و برای ژن *ermB* ۷ درصد در باکتری‌های جدا شده مشخص شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده می‌شود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می‌باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد.

در مطالعه‌ای که توسط حسینی‌دوست و همکارانش در سال ۱۳۹۱ بر روی بررسی ژن *vanA* در *انتروکوک فاسیوم* و *انتروکوک فکالیس* جداشده از گوشت ماکیان با متد PCR انجام شد، فراوانی ژن

*vanA*با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در میان سویه‌های *انتروکوک فاسیوم* و *انتروکوک فکالیس* ردیابی شد. در خلال این مطالعه ۱۰۰ نمونه گوشت ماکیان متشکل از ۷۰ نمونه گوشت مرغ و ۳۰ نمونه گوشت بوقلمون مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین نمونه‌ها تعداد ۶۰ *انتروکوک* جدا شدند که حدود ۶۸ درصد به نمونه‌های گوشت مرغ و حدود ۳۱ درصد به نمونه‌های گوشت بوقلمون متعلق بودند. در میان ۶۰ گونه *انتروکوک* ۳۰ درصد *انتروکوک فاسیوم*، ۱۶/۶ درصد *انتروکوک فکالیس* و ۸/۳ درصد *انتروکوک گالیناروم* بودند. در کل ۶۱/۱ درصد از بین گونه‌های *انتروکوک فاسیوم* و ۴۰ درصد از بین گونه‌های *انتروکوک فکالیس* نسبت به ونکومایسین مقاومت سطح بالا (MIC>128 µg/ml) نشان دادند. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۵ در لرستان بر روی ژن‌های بتالاکتاماز در *انتروکوکوس* جداشده از گوشت قرمز که به جنتامایسین مقاوم بودند انجام گرفت، از ۱۸۱ نمونه گوشت‌های مصرفی کشتارگاه‌های شهرستان با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی باکتری‌ها انجام شد، سپس تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی این جدایه‌ها با روش دیسک دیفیوژن انجام و در نهایت فراوانی ژن‌های *TEM* و *SHV* در سویه‌های مقاوم به جنتامایسین با PCR انجام گردید. از ۱۸۱ نمونه، ۸۱ نمونه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شد. با آزمایش آنتی‌بیوگرام مشخص شد ۹۶/۲۹ درصد از سویه‌ها به اریترومایسین، ۵۶/۷۹ درصد به پنی‌سیلین، ۴۱/۹۶ درصد به تتراسیکلین، ۳۹/۵۰ درصد به آمپی‌سیلین، ۳۹/۵۰ درصد به کلرامفنیکل، ۸۶/۱۵ درصد به لینزولید، ۸/۶۴ درصد به جنتامایسین، ۴/۳۸ درصد به استرپتومایسین، ۳/۷۰ درصد به سیپروفلوکساسین و ۲/۴۶ درصد به مروپنم مقاوم بودند و در بین ۷ سویه مقاوم به جنتامایسین ژن‌های *bla tem* و *bla shv* مشاهده نشد (۵).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ که توسط پاویا و همکارانش بر روی ۱۰۰ نمونه گوشت خام انجام گرفت از ۶۵ درصد نمونه‌ها، *انتروکوک* جدا شد و ۷۶ درصد نمونه‌ها به ونکومایسین مقاوم بودند، از این نمونه‌ها ۳۵ درصد *فاسیوم* و ۳۳ درصد *فکالیس* بود. ۸۰ درصد نمونه‌ها به آمپی‌سیلین و ۹ درصد نمونه‌ها به متی‌سیلین مقاوم بودند و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی رشد باکتری‌ها ریفامپین و ایمی‌پنم بود. بیشترین میزان مقاومت به استرپتومایسین با ۸۹ درصد و تتراسایکلین ۸۵ درصد و اریترومایسین ۷۶ درصد از نمونه وجود داشت (۱۳). در مطالعه‌ای توسط جونگ می‌چوی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی *انتروکوکوس فکالیس*‌های جدا شده از مواد غذایی میزان ژن‌های مورد بررسی (۱۹/۶ درصد) *tet*(M) و (۶/۸ درصد) *tet*(L) قرار گرفت (۱۷). در مطالعه‌ای توسط روزانسکا و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی *انتروکوک فکالیس* جدا شده از گوشت ماکیان ۶۵ نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین ۴۰ باکتری به اریترومایسین مقاوم بوده و تمامی سویه‌ها به جنتامایسین، ونکومایسین و پنی‌سیلین حساس بودند (۸). در مطالعه‌ای توسط ورزچوسکا و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی نمونه‌های *انتروکوک* جدا شده از گوشت‌های آماده به مصرف میزان ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (۳۲/۱ درصد) *tetL*، (۴۳/۷ درصد) *tetM*، (۰/۳ درصد) *tetO*، (۰/۷ درصد) *tetW*، (۱۴/۶ درصد) *tetK* بیان گردید.(۱۵). در مطالعه‌ای توسط شهرکی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در زاهدان بر روی نمونه‌های جداشده از بیماران، میزان ژن *tetM* ۴۸ درصد که بیشترین میزان نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمینوگلیکوزیدها در این مطالعه بود و همچنین ژن‌های بیماری‌زا موجود در *انتروکوک*‌ها نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار

گرفت (۷). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ توسط آروموگان و همکارانش در هندوستان بر روی نمونه‌های بیمارستانی میزان ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین *tetL* ، *tetK* به‌ترتیب ۱۳ و ۱۶ درصد گزارش شد (۱۱).

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و ونکومایسین به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد. شناسایی سریع ژن‌های کدکننده آنزیم‌های AME با استفاده از روش PCR از مزیت‌های ویژه‌ای مثل دقت و سرعت بالا برخوردار است. تفاوت‌های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین کشورهای مختلف یک جامعه می‌باشد. همچنین می‌تواند مرتبط با میزان مصرف آنتی‌بیوتیکی در این مناطق و بروز مکانیزم‌های مختلف مقاومت انتخاب و انتشار کلون‌های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی‌بیوتیکی باشد. شاید این دلیلی دیگر برای انجام این گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه را شناسایی کرده و در راستای آن شیوه‌های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت و مهم‌تر از همه کمک به انتخاب شیوه‌های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت‌های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار مقاوم *انتروکوک* را شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد بوده که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و آزمایشگاه مواد غذایی مهر آریا آزما به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از مسئولین پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و سرکار خانم مهندس دهقانی که شرایط اجرای فعالیت‌های پژوهشی را فراهم می‌آورند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Al-Ahdal MN, Abozaid SM, Al-Shammary HF, Bohol MF, Al-Thawadi SI, Al-Jaberi AA, *et al.* Characterization of Enterococcus faecium isolates and first report of vanB phenotype-van A genotype incongruence in the Middle East. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012; 31(11): 3223-9.

2- Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Review Microbiology*. 2012, 10(4): 266-78.

3- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13(4): 686-707.

4- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45(1): 88-94.

5- Facklam R, Collins M. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27(4): 731-4.

6- Farivar TN, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Hashemi HJ, *et al.* Development andevaluation of a Quadruplex Taq Man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and their vanA and vanB genotypes. *Iranian journal of microbiology*. 2015; 6(5): 335-40.[In Persian]

7- Jahan M, Krause DO, Holley RA. Antimicrobial resistance of Enterococcus species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int. J. Food Microbiol*. 2013, 163(2): 89-95.

8- Różańska H, Lewtak-Piłat A, Osek J. Antimicrobial resistance of Enterococcus faecalis isolated from meat. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014; 59: 229-233.

9- Giridhara Upadhyaya P, Ravikumar K, Umapathy B. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen.

Indian journal of medical microbiology. 2009; 27(4): 301

10- Guodarzi A, Zolfaghari MR, Rezazadeh M, Amouzandeh-Nobaveh A, Arjmandzadegan M, Ghaznavi-Rad E. Phenotypic and genotypic determination of aminoglycoside resistance in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from nosocomial infections. *Urmia Medical Journal*. 2014; 24(11):883-93. [In Persian]

11- Klare I, Heier H, Claus H, Witte W. Environmental strains of Enterococcus faecium with inducible high-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiol. Lett*. 1993; 106(1): 23-9.

12- Li W, Li J, Wei Q, Hu Q, Lin X, Chen M, *et al.* Characterization of aminoglycoside resistance and virulence genes among Enterococcus spp. isolated from a hospital in China. *International journal of environmental research and public health*. 2015; 12(3): 3014-25.

13- Pavia M, Nobile C G. A, Salpietro L, I F. Angelillo, Vancomycin Resistance and Antibiotic Susceptibility of Enterococci in Raw Meat. *Journal of Food Protection*. 2000; 63 (7): 912–915.

14- Mohsenzadeh M, Nasiri M, Kolalian Moghadam M. Detection of mecA gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from meat and hamburgers supplied in Mashhad. *7th National Congress of Biotechnology*. 2011. [In Persian]

15- Mohammadi F, Tabaraie B, Sadeghifard N. Evaluation of drug resistance frequency among Entrococcus faecium and E. faecalis strains and detection of vanA/B genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. *Sci J Ilam Unive Med Sci*. 2010; 19: 1-8. [In Persian]

16- Mokta KK, Verma S, Chauhan D, Ganju SA, Singh D, Kanga A, *et al.* Inducible Clindamycin Resistance among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus from Sub Himalayan Region of India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015; 9(8): DC20.

17- Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol Rev*. 1990; 3(1): 46-65.

18- Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resistance Updates. 2010; 13(6): 151-71.

19- Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American journal of medicine*. 2006; 119(6): 11-9.

20- Sood S, Malhotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian Journal Medical Research*. 2008; 128(2): 111-21.

21- Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4(3): 416-20.

22- Zargar M, A Javadi A, Morovvati A. Detection of Clostridium Difficile Associated Diarrhea in Disease Based on Polymerase Chain Reaction and Bacterial Culture and Toxin A, B Frequency. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2019; 9(3). [In Persian]

Frequency of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolated from food

Homa Tabatabaei[1], Mohsen Zargar[2], Abbas Morovvati[3], Ali Javadi[4], Ashkan Dirbazi-yan[5], Mehrdad Memarian[6]*

1- MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2- Associate professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
3- PhD Student in Virology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
4- PhD Student in Bacteriology, Department of Medical Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
5- PhD Student in Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
6- Assistant professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Receive: September 11, 2022; Revise: September 13, 2022; Accept: September 14, 2022

Summary

Enterococcus as a part of the normal flora of human gastrointestinal tracts can cause infections in foods. Aim of this study was to determine tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from food. In this laboratory study, one hundred samples of food from different parts of Qom were collected. After determining the type, they were tested for their resistance against tetracycline genes by specific primer PCR. Out of 53 isolates, 45% isolates belonged to *Enterococcus faecium* 55% isolates were *Enterococcus faecalis*. Size band of this genes were *tetS* 647bp, *tetO* 442 bp, *tetM* 373 bp, *tetL* 306bp, *ermb* 311 bp. Among this samples *tetO* (12 %), *tetS* (6 %), *tetM* (17 %), *tetL*(5%) and *ermB* (7%)isolate. Considering the results, increasing antibiotic resistant strains, especially tetracycline among *Enterococcus*, is a serious threat to the general public, Molecular method could help rapid diagnosis this resistance genes and help to treatment.

Key words: *Enterococcus, tetracycline, PCR, Resistance*