مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره اول (پیاپی ۲۶) بهار ۱۳۹۵
صفحات ۶۱-۵۳

Original Article

بررسی فراوانی و ارتباط ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* با مقاومت چند دارویی در *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از پنیرهای سنتی

الهام دوستی[۱]، عباس دوستی[*۲]، ابراهیم رحیمی[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، شهرکرد، [۳] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، گروه بهداشت مواد غذایی.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *سالمونلا* یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است. یکی از منابع زیست این باکتری فرآورده های لبنی مانند پنیر می باشد. این مطالعه با هدف جداسازی *سالمونلا انتریتیدیس* از پنیر های سنتی جمع آوری شده از استان چهارمحال و بختیاری و بررسی فراوانی ژن های مرتبط با ایجاد مقاومت دارویی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی از سطح استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری گردید. به منظور جداسازی و شناسایی *سالمونلا* از روش های کشت باکتریایی و آزمون های بیوشیمیایی بهره گرفته شد. به منظور تشخیص جنس *سالمونلا*، تشخیص مستقیم *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه ها و بررسی فراوانی ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده گردید. برای ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسک استفاده شد.

یافته ها: در مجموع از ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه ۳۲ (۳۲٪) نمونه آلوده به جنس *سالمونلا* بودند. از این تعداد نیز ۱۰ (۳۱/۲۵٪) نمونه به عنوان *سالمونلا* انتریتیدیس شناخته شدند. در میان ژن های مورد مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به *tetC* بود (۷۰٪). بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به تتراسایکلین (۱۰۰٪) و بیشترین حساسیت نسبت به سفوتاکسیم (۱۰۰٪) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن های ایجاد کننده مقاومت دارویی در *سالمونلا انتریتیدیس* فراوانی بسیار بالایی دارد. به طوری که مقاومت آنتی بیوتیکی بسیار زیاد نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و کلرامفنیکل می تواند به دلیل وجود ژن های مقاومت نسبت به آن ها باشد.

واژگان کلیدی: *سالمونلا انتریتیدیس*، پنیر سنتی، مقاومت چند دارویی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹٤

مقدمه

پنیر فرآورده ای غذایی است که از شیر بریده شده (ترش شده) حیوانات تهیه می شود. معمولاً در تهیه پنیر از شیر گاو استفاده می کنند. اگرچه گاهی شیر بز، گوسفند یا حتی گاومیش هم به کار می رود. پنیر از جمله مواد غذایی است که پروتئین آن مرغوب بوده و از نظر دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری بسیار غنی می باشد. پنیر در مقایسه با سایر محصولات لبنی (ماست و شیرهای تخمیری) به دلیل دارا بودن برخی ویژگی ها شامل pH تقریباً خنثی، چربی بالا و بافت متراکم و منسجم به عنوان غذای حامل پروبیوتیک ها جهت ماندگاری و حفظ فعالیت زیستی آنها در تمام مراحل عبور از دستگاه گوارش و هضم بسیار مناسب می باشد (۱).

سالمونلا (*Salmonella*) یک باکتری بیماری زای درون سلولی اختیاری است که به سروتیپ و میزبان وابسته است. این باکتری می تواند باعث ایجاد بیماری هایی مانند التهاب

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

مغزی و تب تیفوئید شود (۲). باکتری *سالمونلا*، میله ای کوتاه، گرم منفی، فاقد کپسول و اکثرا فاقد تاژک می باشند (۳). جنس *سالمونلا* از دو گونه *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*) و *سالمونلا بونگاری* (*Salmonella bongori*) تشکیل شده است. اکثر گونه های بیماری زای *سالمونلا* که باعث بیماری در انسان می‌شوند، متعلق به گونه *سالمونلا انتریکا* هستند که در دستگاه گوارش میزبان زندگی می کنند. در طبقه بندی جدید تمام گروه های قبلی به عنوان سروواریته ای از دو گونه یاد شده معرفی می شوند و سروواریته ها را با حرف بزرگ و غیر ایتالیک معرفی می نمایند.

برخی از سروتیپ های *سالمونلا* میزبان خاص و برخی دیگر میزبان عمومی دارند (٤) که از طریق حیوان به حیوان و حیوان به انسان قابل انتقال می باشند (۲). در خانواده انتروباکتریاسه و به خصوص جنس *سالمونلا* ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* به ترتیب موجب مقاومت *سالمونلا* نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و کلرامفنیکل می شوند (۲). مقاومت به آنتی بیوتیک ها در خانواده انتروباکتریاسه می تواند به وسیله هم یوغی به دیگر گونه ها منتقل گردد. مقاومت به صورت سلول-سلول و به کمک فاکتور مقاومت (Resistance factor) منتقل می شود (٤).

جنس *سالمونلا* اغلب به آنتی بیوتیک هایی مانند آمپی سیلین، کلرامفنیکل، نئومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، سولفامامیدها و تتراسایکلین مقاوم می باشد (۳). در بررسی های به عمل آمده در سال ۲۰۰۰ میلادی میزان ۵۰ درصد از گونه های *سالمونلا تیفی موریوم* (سروگروپ B) جدا شده از نمونه های بالینی به یک یا چند آنتی بیوتیک و ۲۸ درصد از آن ها به پنج آنتی بیوتیک مقاوم بوده اند. در سال ۲۰۰۱ میزان ۲٦ درصد از *سالمونلاهای نیوپورت* جدا شده حداقل به ۹ آنتی بیوتیک مقاوم بوده اند. در ایران اطلاعات کافی در مورد مقاومت های چندگانه *سالمونلا* وجود ندارد (۵).

بیماری های قابل انتقال از طریق مواد غذایی از مهم ترین معضلات سلامت بهداشت جامعه می باشند. *سالمونلا* اغلب در مواد غذایی، گوشت، مرغ، تخم مرغ و محصولات لبنی که در معرض حرارت بالا قرار نگرفته اند یافت می شوند (٦ و ۷). این باکتری هر ساله سبب آلودگی حدود ۱/٤ میلیون نفر و چند صد نفر مرگ و میر در آمریکا می گردد (۸). *سالمونلا* عامل ایجاد گاستروانتریت شامل اسهال و کرامپ های شکمی تا تب های انتریک (تب حصبه) در انسان می باشد (۲ و ۹). تب های انتریک یکی از مشکلات جدی سلامتی عمومی در جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشند (٤ و ٦). بیش از یک سوم از موارد سالمونلوز در انسان بین سال های ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۷ در ایالات متحده آمریکا با مصرف گوشت و تخم مرغ های آلوده پرندگان ارتباط داشته است (۸).

میزان مصرف سرانه پنیر در ایران در سال ۲۰۰۷، ۲/٤ کیلوگرم، در سال ۲۰۱۲، ۲/۹۸ کیلوگرم و در سال ۲۰۱۳، ۲/۱۹ کیلوگرم بوده است. با توجه به مصرف بالای پنیر در ایران و همچنین محبوبیت پنیرهای سنتی در میان مردم به دلیل ماندگاری بالا و طعم مطلوب، در صورتی که این محصول به عوامل میکروبی آلوده باشد باعث تحمیل خسارات جانی و مالی سنگین و جبران ناپذیری بر جامعه می شود. هدف از این مطالعه بررسی شیوع *سالمونلا انتریتیدیس* در پنیرهای سنتی استان چهارمحال و بختیاری و همچنین ارزیابی فراوانی ژن های ایجاد کننده مقاومت دارویی و ارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه های مورد بررسی: این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی جمع آوری شده از سوپرمارکت های سطح استان چهارمحال و بختیاری در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ انجام شد.

ب) شناسایی جدایه ها: نمونه های تازه پنیر سنتی که از نوع پنیر سفید ایرانی می باشند و با استفاده از رنت (Rennet) و آب نمک ۲۰ درصد تهیه شده بودند بلافاصله پس از جمع آوری در

ظروف استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه ها در محیط پپتون واتر (Merck, Germany) تلقیح و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلیسیوس به منظور غنی سازی گرمخانه گذاری شدند. سپس ٣ میکرولیتر از محیط غنی کننده حاوی نمونه های مورد آزمایش به محیط کشت اختصاصی RV (راپاپورت واسیلیادیس براث) (Merck, Germany) منتقل گردید. در این مرحله گرمخانه گذاری به مدت ٢٤ ساعت در ٤٢ درجه سلیسیوس انجام شد. شایان یاد آوری است که وجود یون منیزیم و رنگ مالاشیت گرین و همچنین دمای بالای گرمخانه گذاری در این مرحله، از رشد سایر باکتری ها جلوگیری نموده و به صورت اختصاصی سبب رشد *سالمونلا* می گردد.

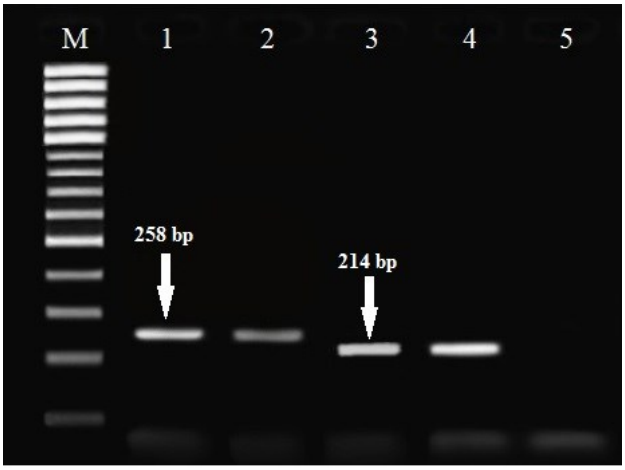
سپس کشت نمونه ها روی محیط SS (*سالمونلا*- *شیگلا* آگار) (مرک، آلمان) انجام شد. شناسایی باکتری بر اساس شکل کلنی (کلنی های سیاه رنگ روی محیط) انجام گرفت (٣).

ج) استخراج DNA: برای این منظور کلنی های به دست آمده در حجم ١٠٠ میکرولیترآب مقطر دیونیزه حل شدند. پس از سانتریفیوژ با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و طبق دستورالعمل کیت، DNA ژنومی باکتری ها تخلیص گردید. کیفیت DNA تخلیص شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ١ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

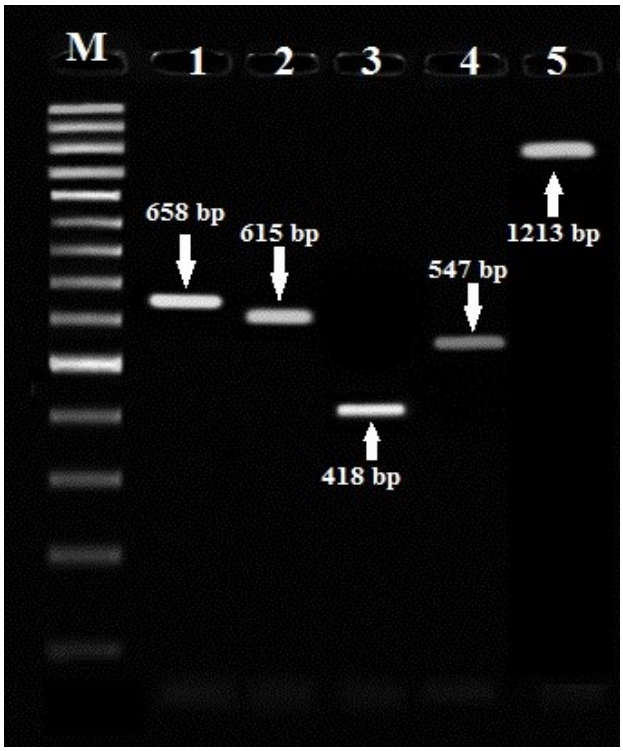
د) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تشخیص قطعی جنس *سالمونلا*، تایید وجود *سالمونلا انتریتیدیس* و تعیین فراوانی ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* از واکنش PCR بهره گرفته شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده و

جدول ١: توالی آغازگرهای استفاده شده و شرایط دمایی واکنش PCR.

نام ژن	نام آغازگر	توالی ('5→'3)	شرایط دمایی (°C)	
16S rRNA	S-F	CTTGCTATGGAAGACATAACGAACC	٩٥	٤ دقیقه
			٩٤	٤٠ ثانیه
	S-R	CGTCTCCCATCAAAAGCTCCATAGA	٦٢	٤٠ ثانیه
			٧٢	٤٠ ثانیه
sefA	SefA-F	TGCTATTTTGCCCTGTACACTGC	٩٥	٤ دقیقه
			٩٤	٤٠ ثانیه
	SefA-R	TTCGGGGGAGACTATACCTACAG	٥٨	٤٠ ثانیه
			٧٢	٣٠ ثانیه
tetA	tetA-F	GCTGTCGGATCGTTTCGG	٩٥	٥ دقیقه
			٩٤	١ دقیقه
	tetA-R	CATTCCGAGCATGAGTGCC	٦١	١ دقیقه
			٧٢	١ دقیقه
tetB	tetB-F	CTGTCGCGGCATCGGTCAT	٩٥	٥ دقیقه
			٩٤	١ دقیقه
	tetB-R	CAGGTAAAGCGATCCCACC	٦١	١ دقیقه
			٧٢	١ دقیقه
tetC	tetC-F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	٩٥	٤ دقیقه
			٩٤	٥٠ ثانیه
	tetC-R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC	٥٩	٥٠ ثانیه
			٧٢	٤٠ ثانیه
cat3	Cat3-F	AACGGCATGATGAACCTGAA	٩٥	٥ دقیقه
			٩٤	٣٠ ثانیه
	Cat3-R	ATCCCAATGGCATCGTAAAG	٦٠	٣٠ ثانیه
			٧٢	٣٠ ثانیه
floR	floR-F	ATGACCACCACACGCCCCG	٩٥	٦ دقیقه
			٩٤	١ دقیقه
	floR-R	AGACGACTGGCGACTTCTCG	٦٣	١ دقیقه
			٧٢	١ دقیقه



شکل ۱: الکتروفورز ژن *16S rRNA* برای تشخیص جنس *سالمونلا* و ژن *sefA* برای تشخیص *سالمونلا انتریتیدیس*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز، آلمان)، ستون های ۱ و ۲) باند ۲۵۸ جفت بازی ژن *16S rRNA*، ستون های ۳ و ٤) باند ۲۱٤ جفت بازی ژن *sefA*، ستون ۵) کنترل منفی.



شکل ۲: الکتروفورز ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* *سالمونلا انتریتیدیس*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز، آلمان)، ستون ۱) باند ٦٥٨ جفت بازی ژن *tetA*، ستون ۲) باند ٦١٥ جفت بازی ژن *tetB*، ستون ۳) باند ٤١٨ جفت بازی ژن *tetC*، ستون ٤) باند ٥٤٧ جفت بازی ژن *cat3*، ستون ۵) باند ۱۲۱۳ جفت بازی ژن *floR*.

همچنین شرایط دمایی واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است. تمامی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner (Version 3.01) طراحی و برای سنتز به شرکت سیناژن ایران فرستاده شدند.

به منظور انجام واکنش PCR، ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs Mix، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم DNA Taq پلی مراز (سیناژن، ایران) مخلوط و با آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. در پایان برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۱ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش PCR اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۱ برای هر آغازگر انجام شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید الکتروفورز و به کمک دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند.

ه) آزمون حساسیت ضد میکروبی: آزمون آنتی بیوگرام برای نمونه های *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از روش انتشار دیسک به روش Kirby-Bauer انجام شد (۱۰). در مجموع از ٤ نوع دیسک آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۳۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg) و سفوتاکسیم (۳۰ µg) (پادتن طب، ایران) استفاده شد. انتخاب آنتی بیوتیک ها بر اساس ارتباط آنها با ژن های ایجاد کننده مقاومت دارویی در *سالمونلا انتریتیدیس* و همچنین اهمیت شان در درمان عفونت های این باکتری در انسان و حیوانات انجام گرفت. در انتها قطر هاله عدم رشد بر اساس توصیه های کمیته فرعی CLSI تفسیر شد (۱۱).

جدول ۲: الگوی آنتی بیوگرام باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* جداسازی شده از پنیر سنتی.

آنتی بیوتیک	حساس تعداد (٪)	نیمه حساس تعداد (٪)	مقاوم تعداد (٪)
تتراسایکلین	–	–	۱۰ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	٤ (٤۰)	۸ (۸)	٦ (٦۰)
سیپروفلوکساسین	۷ (۷۰)	–	۳ (۳۰)
سفوتاکسیم	۱۰ (۱۰۰)	–	–

و) تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه شانزدهم نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون های آماری مربع کای، آنالیز واریانس و دقیق فیشر مورد آنالیز قرار گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه ۳۲ (۳۲٪) نمونه آلوده به جنس *سالمونلا* بودند. از این میان ۱۰ (۳۱/۲۵٪) نمونه به عنوان *سالمونلا انتریتیدیس* شناخته شدند. تایید وجود جنس *سالمونلا* با شناسایی باند ۲۵۸ جفت بازی ژن *16S rRNA*، *سالمونلا انتریتیدیس* با شناسایی باند ۲۱٤ جفت بازی (شکل ۱) و ژن های *tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR* به ترتیب با شناسایی باند های ٦٥٨، ٦١٥، ٤١٨، ٥٤٧ و ۱۲۱۳ جفت بازی صورت گرفت (شکل ۲). فراوانی ژن های ایجاد کننده مقاومت دارویی (*tetA*، *tetB*، *tetC*، *cat3* و *floR*) به ترتیب برابر با ۳۰٪، ٤۰٪، ۷۰٪، ٤۰٪ و ۳۰٪ بود. در میان این ژن ها بیشترین فراوانی مربوط به *tetC* (۷۰٪) بود.

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین موارد مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین (۱۰۰٪) و کلرامفنیکل (٦۰٪) بوده است. از سوی دیگر بیشترین حساسیت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم (۱۰۰٪) و سیپروفلوکساسین (۷۰٪) بود (جدول ۲).

بحث

سالمونلا دارای گسترش جغرافیایی وسیعی است و قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده مانند انسان، حیوان و پرندگان می باشد. یکی از مهمترین راه های انتقال این باکتری به انسان مواد غذایی آلوده می باشد. در این میان گوشت و فرآورده های گوشتی، فرآورده های لبنی و تخم پرندگان مهمترین منبع آلودگی انسان به گونه های *سالمونلا* محسوب می شوند. مطالعات فراوانی در مورد بررسی آلودگی مواد غذایی به این باکتری در نقاط مختلف ایران و سایر کشورها انجام شده است (۲ و ١٤-١٢).

در مطالعه حاضر مشاهده گردید که *سالمونلا انتریتیدیس* از شیوع نسبتا پایینی (۲۵/۳۱ درصد) در نمونه های پنیر سنتی برخوردار می باشد. در مطالعات انجام شده توسط تورانتاس (Turantas) و همکاران در کشور ترکیه و سالک مقدم (Salek Moghaddam) در ایران درمورد بررسی وضعیت آلودگی انواع پنیرها به گونه های *سالمونلا* مشخص شد که میزان آلودگی پنیر خام به این باکتری نسبتاً پایین است که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد (۱۵ و ١٦). همچنین در مطالعات کاواساکی (Kawasaki) و همکاران در ژاپن و آنجلیدیس (Angelidies) و همکاران در کشور یونان در سال ۲۰۰٦ شیوع *سالمونلا انتریتیدیس* در پنیر های عرضه شده در بازار مورد بررسی قرار گرفت. شیوع این باکتری در ژاپن ۱۱/٤ درصد و در یونان ۵/۱ درصد گزارش شد (۱۷ و ۱۸). نتایج این دو پژوهش رابطه معنا داری با پژوهش حاضر دارند.

کلاک (Colak) و همکاران بین سال ۲۰۰٤ تا ۲۰۰۵ در استانبول در بررسی بر روی ۲۵۰ نمونه پنیر تهیه شده از شیر خام نشان دادند که ۲/٤ درصد از نمونه ها آلوده به *سالمونلا* هستند (۱۹). همچنین دانشمند (Daneshmand) در بررسی که در سال ۲۰۰٦ در ایران انجام داد نیز میزان آلودگی پایین پنیر خام به *سالمونلا* را گزارش کرد (۸). در پژوهش انجام شده توسط تکینسن (Tekinsen) و اوزدمیر (Ozdemir) در سال ۲۰۰٦ بر روی پنیر مشخص شد که از ۵۰ نمونه ۳ نمونه یعنی ٦ درصد آنها آلوده به *سالمونلا* بودند (۲۰). سینگ (Sing) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه بر روی نمونه های لبنیات نشان دادند که درصد محدودی از آنها آلوده به *سالمونلا* است (۲۱).

در مطاله حاضر با وجود اینکه فراوانی *سالمونلا انتریتیدیس* از شیوع نسبتاً پایینی برخوردار بود اما فراوانی ژن های عامل مقاومت دارویی در این باکتری به طور قابل توجهی بالا بود. در بررسی که مازورک (Mazork) و همکاران بر روی ژن های مرتبط با مقاومت چند دارویی در *سالمونلا* انجام دادند فراوانی

ژن های *tetA* و *tetC* به ترتیب ۱/۲۹ و ۴۳ درصد گزارش شد (۱۴). در این مطالعه نیز همانند پژوهش حاضر *tetC* از فراوانی بالایی نسبت به سایر ژن های مقاومت دارویی برخوردار بود. همچنین آکیاما (Akyama) و همکاران نیز با بررسی *سالمونلای* جدا شده از نمونه های بالینی و مواد غذایی دریافتند که از ۴۹ نمونه *سالمونلای* مقاوم در برابر تتراسایکلین تعداد ۳۲ نمونه برای *tetA*، ۱۳ نمونه برای *tetB* و ۲ نمونه برای *tetC* و یک نمونه هم برای هر دو ژن *tetA* و *tetB*، مثبت هستند (۲۲).

در مطاله حاضر با انجام تست مقاومت آنتی بیوتیکی مقادیر متفاوتی (۰-۱۰۰٪) از مقاومت و حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف مشاهده شد. به طوری که بیشترین حساسیت و مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و تتراسایکلین می باشد. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته در این زمینه هم پوشانی دارد (۱۱ و ۱۳). در مطالعه انجام شده توسط باکستال (Boxstael) و همکاران میزان مقاومت *سالمونلا انتریتیدیس* نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، استرپتومایسین و تتراسایکلین ۲۳/۵-۸۳/۱٪ گزارش شد که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد (۲۳).

با توجه به اینکه شیوع سویه های بیماریزای *سالمونلا* در محل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ و میر و افزایش ضررهای اقتصادی می گردد، برای جلوگیری از انتشار تشخیص سریع بیماری الزامی است (۲۱). استفاده از آزمون های متداول کشت و بیوشمیایی در آزمایشگاه ها، حداقل ۷ روز زمان برای تشخیص آلودگی لازم دارد. محیط سازی پی در پی و خطای فردی از علل افزایش میزان خطا در تشخیص آلودگی با استفاده از روش های یادشده محسوب می شوند. هر چند این روش ها در آزمایشگاه های تشخیصی همچنان رایج و پرکاربرد هستند اما بدون شک روش های مولکولی مانند PCR به عنوان دقیق ترین، سریع ترین و حساس ترین روش های تشخیصی عوامل بیماری زا شناخته می شوند.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر شیوع بسیار بالایی از ژن های ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی را در *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد. بنابراین در صورت حضور این باکتری بیماری زا در مواد غذایی مانند پنیرهای سنتی و آلودگی افراد جامعه به این باکتری، راهکارهای درمانی با مشکل جدی مواجه خواهند شد. به همین دلیل استفاده از حرارت پاستوریزاسیون قبل از تولید پنیر تاثیر زیادی در از بین بردن این باکتری در شیر خام دارد. همچنین با توجه به اینکه پنیرهای سنتی در سطح کشور دارای محبوبیت بالایی هستند، انجام پژوهش های بیشتر در مورد آلودگی این فرآورده به عوامل بیماریزا و همچنین ارزیابی رفتار میکروارگانیسم های بیماریزای مختلف در آن توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Stevens M, Humphrey T, Maskell D. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Phil Trans R Sac B. 2009; 364: 2709-2723.
2. Hammad AM, Ishida Y, Shimamoto T. Prevalence and molecular characterization of ampicillin-resistant Enterobacteriaceae isolated from traditional Egyptian Domiati cheese. J Food Protect. 2009; 3: 624-630.

3. Van Boxstaela S, Dierickc K, Van Huffela X, Uyttendaeleb M, Berkvensd D, Hermane L, Bertrandf S, Wildemauweg C, Catryh B, Butayei P, Imberechtsi H. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. Food Res Int. 2012; 45(2): 913-918.

4. Murray P, Rosenthal K, A Falr M. Microbiology Murray. Khosravi with publishing Dibaj. ISBN 978-600-5523-77-5, 2009.

5. Heithoff DM, Shimp WR, lau PW, Badie G, Enioutina EY, Daynes RA, Barbara RA, Byrne A, House J, Mahan MJ. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. Appl Environ Microbiol. 2008; 10: 1757–1766.

6. Clark MA, Barret EL. The phs gene and hydrogen sulfide production by *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 1987; 169(6): 2391–2397.

7. Escobar D, Clark S, Ganesan V, Repiso L, Waller J, Harte F. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. J Dairy Sci. 2011; 94(3): 1201-1210.

8. Nisiotoua A, Chorianopoulosb NG, Gounadakic A, Panagouc EZ, Nychasc GJE. Effect of wine -based marinades on the behavior of *Salmonella typhimurium* and background flora in beef fillets. Int J Food Microbiol. 2013; 164(3): 12-19.

9. Johny AK, Hoagland T, Venkitanarayanan K. Effect of sub inhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 to antibiotics. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(10): 1165-1170.

10. Doosti A, Mokhtari-Farsani A. Study of the frequency of *Clostridium difficile tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB* genes in faces of Calves in south west of Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13(21): 1-6.

11. Sharifzadeh A, Doosti A, Mokhtari-Farsani A. Study of multiple-drug resistance transfer factors from isolated *E. coli* of poultry farms to *Salmonella typhimurium*. Adv Life Sci. 2014; 4 (3): 174-177.

12. Galan JE, Zhou D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97: 8754-8761.

13. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. J Animal Sci. 2007; 86: 173-187.

14. Mazrek J, Pusz P, Bok E. Stosik M, Chudzik K. The phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance in *ESCherichia coli* populations isolated from farm animals with different exposure to antimicrobial agents. Polish J Microbiol. 2013; 62 (2): 173-179.

15. Polotsky Y, Dragunsky E, Khavin T. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infection. Crit Rev Microbiol. 1994; 20(3): 161-208.

16. Centers for disease control. outbreak of *Salmonella* serotype *enteritidis* infection associated with easting shell eggs. United States, 1999-2001.MorbM Ortal Wkly Rep. 2003; 51:1149-1152.

17. Ahmeda AM, Shimamotob T, Shimamoto T. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. Int J Food Microbiol. 2014; 189: 39-44.

18. Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou JM, Shao F. The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. Science. 2007; 315: 1000-1003.

19. Coynault C, Robbe-Saule V, Popoff MY, Norel F. Growth phase and SpvR regulation of transcription of *Salmonella typhimurium* spv ABCD virulence genes. Microb Pathog. 1992; 13: 133-143.

20. Gentle A, Anastasopoulos F, Mc Brien NA. High resolution semi quantitative real time PCR without the use of a standard curve. Bio Techniques. 2001; 31: 502-508.

21. Aoust JY. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. Int J Food Microbiol. 1991; 2: 17-40.

22. Akiyama T, Presedo J, Khan A. The *tetA* gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates. Int J Antimicrob Agents. 2013:42(2): 133-140.

23. Van Boxstael S, Dierick K, Van Huffel X, Uyttendaele M, Berkvens D, Herman L, Bertrand S, Wildemauwe C, Catry B, Butaye P, Imberechts H. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. Food Res Int. 2012; 45: 913-918.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 1, April 2016

Original Article

Study of the frequency *tetA*, *tetB*, *tetC*, *cat3* and *floR* genes and their role in multidrug resistance in *Salmonella enteritidis* isolated from traditional cheeses

Elham Doosti[1], Abbas Doosti[2], Ebrahim Rahimi[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord branch ,Islamic Azad University , Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Salmonella* is a member of Enterobacteriaceae. Dairy products, such as cheese, are one of the environmental sources of these bacteria. This study was performed to isolate *Salmonella enteritidis* collected from traditional cheese produced in Chaharmahal va Bakhtiari province, and also to study the frequency of associated gene with drug resistance.
Materials & Methods: In this cross-sectional study, 100 samples of traditional cheese were collected from Chaharmahal va Bakhtiari province. Bacterial culture and biochemical tests were used to isolate and identify *Salmonella* strains. PCR assay was used for final diagnosis of *Salmonella* genus and direct detection of *S. Enteritidis,* and also to study the frequency of *tetA*, *tetB*, *tetC*, *cat3* and *floR* genes. The Kirby-Bauer disk diffusion method was used to perform the antibiogram tests.
Results: Overall, 32 (32%) cases out of 100 samples were detected as *Salmonella* contamination. Of these, 10% (31/25 cases) of samples belonged to *S. enteritidis*. The highest frequency of antibiotic gene resistant belonged to *tetC* (70%). The highest antibiotic resistance (100%) was related to tetracycline and the highest sensitivity (100%) was related to cefotaxime.
Conclusion: The results of present study showed that *S. enteritidis* carry high frequencies of antibiotic resistance genes. The presence of high resistance to chloramphenicol and tetracycline can be because of the presence of these genes.
Keywords: *Salmonella enteritidis,* Traditional cheese, Multidrug resistance.

Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +98 9133838830

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(1): 53-61.