

شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده انتروتوکسین تایپ C از نمونه‌های ناقلین سالم به وسیله PCR

دکتر مجتبی سعادتی^۱، بابک براتی^۲، مهدی شیرازی^۳، دکتر محمد جواد سلطان پور^۴

^۱ استادیار میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

^۲ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مربی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

^۳ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع)

^۴ دکترای علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه مرکزی بیمارستان بقیه...، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دکتر مجتبی سعادتی

E-mail: saadati_m@yahoo.com

وصول: ۸۶/۴/۱۶، اصلاح: ۸۶/۵/۸، پذیرش: ۸۶/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن است که در شرایط مساعد می‌تواند با رشد در مواد غذایی و تولید انتروتوکسین سبب مسمومیت غذایی در انسان شود. تنها برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تولید انتروتوکسین و ایجاد مسمومیت غذایی را دارند که با استفاده از روش‌های تکثیر DNA می‌توان حضور سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک را بر اساس توالی اختصاصی ژن شناسایی نمود. لذا این پژوهش با هدف شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که قادر به تولید انتروتوکسین تایپ C هستند، انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از سوآپ استریل از ۱۵۰ نفر ناقل باکتری از طریق بینی، ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شدند که با آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شدند. سپس با پرایمرهای طراحی شده برای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ C (sec) و تکثیر در واکنش PCR، اقدام به شناسایی سویه‌های انتروتوکسوژنیک تایپ C گردید.

یافته‌ها: قطعات تکثیر یافته DNA برای ژن نوکلئاز استافیلوکوکی ۳۹۷bp و برای ژن انتروتوکسین تایپ C استافیلوکوکی ۲۷۱bp بود که توسط هضم آنزیمی و تعیین توالی قطعه تکثیر شده مورد تأیید قرار گرفت. از همه سویه‌های مورد مطالعه، تنها ۹/۵ درصد سویه جدا شده حاوی ژن sec بودند. ویژگی و حساسیت واکنش نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که حساسیت آن ۱۲۵ سلول تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: این روش سریع، حساس، اختصاصی، ارزان و متفاوت نسبت به سنجش‌های مرسوم بیوشیمیایی و سرولوژیکی بوده و قادر است عامل تولیدکننده انتروتوکسین تایپ C استافیلوکوکی را شناسایی نماید. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۴/ شماره ۲ / صص ۱۱۷-۱۲۷).

واژه‌های کلیدی: شناسایی؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ انتروتوکسین تایپ C؛ PCR.

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان تنها جنس مهم خانواده میکروکوکاسیه، دارای اشکال گرد به قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میکرومتر با آرایش نامنظم، گرم مثبت، کاتالاز مثبت، بی حرکت، بدون اسپور و بی هوازی اختیاری بوده که روی محیط کشت جامد رنگدانه‌های مختلف از جمله طلائی، لیمویی و سفید رنگ ایجاد می‌نماید. این باکتری در شرایط مساعد می‌تواند در تمام نقاط بدن انسان و حیوان عفونت‌های شدید و خطرناک ایجاد نماید و موجب مسمومیت غذایی در افراد گردد. استافیلوکوکوس اورئوس عوامل حدت‌زایی را ترشح می‌کند که در استقرار و بیماری‌زایی این باکتری در میزبان‌های پستاندار دخالت دارند (۱). یکی از این عوامل انتروتوکسینی است که توسط سویه‌های مختلف این باکتری SEA, SEB, SEC_n, SED, SEE تولید می‌شود (۴-۲). اخیراً انتروتوکسین‌هایی مانند SEQ, SEP, SEO (۴-۲) و SEN, SEM, SEL, SEK, SEJ, SEI, SEH, SEG (۵-۹) با روش‌های جدید مورد شناسایی قرار گرفته است. تحقیقات فراوانی در مورد انتروتوکسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده و تاکنون بیش از ۱۴ نوع انتروتوکسین مختلف که ساختمان و توالی نسبتاً یکسانی دارند گزارش شده است (۱۰-۱۲).

محل قرار گرفتن ژن‌های انتروتوکسین‌ها متفاوت است. برخی همچون sej و sec1 درون پلاسمید واقع شده‌اند در حالی که sei, sem, sen و seo در کروموزوم و به صورت گروهی قرار گرفته‌اند. ژن sea در پروفاژ و ژن see در فاژهای ناقص واقع شده است و ژن‌های sek و sel در جزایر پاتوژنسیته جای گرفته‌اند. برخی از ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی در چند محل قابل مشاهده هستند؛ به طور مثال ژن seb در کروموزوم، پلاسمید و ترانسپوزون واقع شده است (۱۱، ۱۲). ژن گُدکننده انتروتوکسین تایپ C در جزایر پاتوژنسیته قرار دارد (۱۴) برای سروتایپ SEC چندین اختلاف آنتی-

ژنیک و مولکولی مانند SEC1 (۱۵) SEC2 (۱۶) و SEC3 (۱۷، ۱۸) گزارش شده است.

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۶-۲۹ کیلودالتون هستند که به وسیله استافیلوکوک کوآگولاز مثبت تولید می‌شوند (۳، ۱۰). مهم‌ترین خصوصیات انتروتوکسین استافیلوکوکی، توانایی ایجاد استفراغ در پریمات‌ها، مقاومت به حرارت و هضم پیپسین و خاصیت سوپراآنتی‌ژنیسیته است (۱۹). علائم مسمومیت با انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در انسان شامل افزایش بزاق دهان، تهوع، استفراغ و سپس دل‌پیچه و اسهال می‌باشد که در برخی موارد همراه با خون نیز دیده می‌شود (۲). تقریباً ۵ درصد مسمومیت‌های غذایی ناشی از انتروتوکسین‌های تولیدشده توسط این باکتری می‌باشد (۲۰). این در حالی است که گزارش مسمومیت‌های ناشی از این انتروتوکسین به دلیل شناسایی تایپ‌های جدید رو به افزایش است (۸، ۱۲) اما در ایران اطلاعات دقیقی در این خصوص گزارش نشده است. برگدال گزارش نمود که ۹۵ درصد مسمومیت‌های ناشی از انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس به علت تایپ‌های A, B, C, D و E بوده و ۵ درصد باقی مانده به علت دیگر تایپ‌های این باکتری می‌باشد (۲۱).

روش‌های مختلفی برای شناسایی سم این باکتری از جمله لاتکس آگلانتیناسیون، الایزا، ایمونودیفرژن و رادیو ایمنوآسی وجود دارد که در همه این روش‌ها نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان شدن ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی می‌باشد (۲۳، ۲۲، ۱۱). در حالی که ممکن است باکتری در شرایط خاص علی‌رغم داشتن ژن تولیدکننده سم، قادر به تولید آن نبوده و نتایج به دست آمده در روش‌های فوق‌الذکر را منفی نماید. لذا تلاش محققین بر آن بود تا روش‌های تشخیص مولکولی را جانشین روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی نمایند. در روش مولکولی که با شناسایی ژن گُدکننده سم انجام می‌شود، می‌توان نسبت به شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌هایی که واجد

درون محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت و سپس به وسیله آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردید.

پرایمرهای مورد استفاده: با استفاده از توالی

ژن‌های nuc و sec در بانک‌های ژنی به طراحی دو جفت پرایمر برای ژن‌های آنزیم دزکسی‌ریبونوکلیاز (nuc) که شاخصی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس نیز می‌باشد و انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ C (sec) اقدام گردید. پس از انتخاب پرایمرهای مورد نظر، وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات پرایمرها به وسیله نرم‌افزارهای مولکولی (DNASIS, BLAST, Oligo) مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال تأیید خصوصیات، پرایمرها جهت ساخت به شرکت MWG آلمان سفارش داده شد. پس از ساخته شدن پرایمرها و قبل از استفاده در واکنش PCR کیفیت آن‌ها با الکتروفورز بر روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل آمید نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از پرایمرهای sea F ، sea R ، IpaH F به عنوان کنترل استفاده گردید. این پرایمرها عبارت بودند از:

nucF: 5'- CTG GCA TAT GTA TGG CAA TTG -3'
nucR: 5'- AAT GCA CTT GCT TCA GGA CC-3'
secF: 5' CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG -3'
secR: 5' TTA TAT CAA AAT CGG ATT AAC ATT ATC -3'
seaF: 5'TTG CGA AAA AAG TCT GAA TTG C -3'

(به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت)

seaR: 5'ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA AGT A -3'

(به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت)

IpaH F: 5' CCT TGA CCG CCT TTC CGA TA -3'

(به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت)

تخلیص ژنوم: پس از کشت باکتری نسبت به تخلیص ژنوم آن اقدام گردید. استخراج ژنوم به روش فلیابی انجام شد و ژنوم‌های تخلیص شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNA ژنومی روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد. برای اندازه‌گیری غلظت

ژن‌گدکننده این سم هستند، اقدام نمود. در این روش می‌توان سوش‌هایی را شناسایی کرد که میزان تولید انتروتوکسین پایینی دارند و در روش‌های ایمونولوژیکی نمی‌توان آن‌ها را آشکار نمود (۲۵، ۲۴، ۲۲). البته گزارشات متعددی در زمینه جداسازی و شناسایی این باکتری‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس از مواد غذایی، ناقلین سالم، عفونت‌ها و نیز مدفوع انسان وجود دارد (۲۶-۲۴، ۱۴). لذا هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و شناسایی سویه‌های واجد ژن‌گدکننده انتروتوکسین تایپ C به وسیله PCR بود. این اولین بار است که در ایران این تایپ شناسایی و گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

آنزیم Taq DNA polymerase، آنزیم‌های محدودالتر و مارکر 100 bp DNA ladder از شرکت Fermentase خریداری شد. EDTA، Tris-base، RNase، MgCl₂، dNTP، اتیدیوم بروماید و لیزوزیم از شرکت سیناژن تهیه گردید. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC=25923)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استریپتوکوکوس پیوژنز از آزمایشگاه رفرانس ایران تهیه شدند. میکروکوکوس لوتئوس (ATCC=9341)، باسیلوس پلی‌میگسا (ATCC= 8094)، باسیلوس سرئوس (ATCC=11778)، سالمونلا پاراتیفی A (NCTC=5702)، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس (PCTC=1070)، پروتئوس ولگاریس سویه ox19 (ATCC=6380)، و باکتری اشیشیا کلی نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری تولیدکننده انتروتوکسین تایپ A استافیلوکوکوس اورئوس از دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد.

در این تحقیق که به صورت تجربی و در آزمایشگاه انجام شد، ۱۵۰ نمونه از مخاط بینی افراد (ناقلین سالم) نمونه‌برداری شد. سوآپ نمونه‌برداری شده

DNA نیز از دستگاه UV spectrophotometer و جذب-های ۲۶۰nm و ۲۸۰nm استفاده گردید.

واکنش PCR: واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. در این واکنش، ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (۲/۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در ۳۲ سیکل انجام گردید. جهت بررسی محصول واکنش، ۵ میکرولیتر از آن جهت الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد انتقال داده شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تأیید محصولات به دست آمده در واکنش فوق به منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از قطعه تکثیر شده توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت Fermentase تخلیص شد و فرآیند تعیین توالی توسط شرکت زیست فناوری کوثر انجام گرفت.

تعیین میزان ویژگی و حساسیت واکنش PCR:

برای تعیین ویژگی، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده ۱۱ باکتری شامل سوش‌های میکروکوکوس لوتئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، باسیلوس سرئوس، باسیلوس پلی میگسا، سالمونلا پاراتیفی A، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، اشیشیا کلی، پروتئوس ولگاریس، سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تایپ A و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس انجام شد. میزان حساسیت واکنش طراحی شده بر اساس تعداد باکتری محاسبه گردید. برای محاسبه حساسیت واکنش بر اساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری در محیط آبگوشت مغذی، ابتدا از محیط مورد نظر تا ۱۰^{-۹} رقت (۱۵ سلول در میکرولیتر) تهیه گردیده و برای تمامی رقت‌ها واکنش

PCR انجام شد و جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت، فرآیند شمارش باکتری (Colony count) انجام گرفت.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۵۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که ۹۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت. سپس نسبت به استخراج DNA و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای تهیه شده اقدام گردید.

نتیجه الکتروفورز DNA ژنومیک تخلیص شده: از ژل الکتروفورز جهت مشاهده ژنوم و بررسی کیفیت تخلیص استفاده گردید، پس از گذشت ۶۰ دقیقه از زمان الکتروفورز، نتیجه حاصل از الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. عدم وجود باندهای اضافی، نشان‌دهنده تخلیص نسبتاً مناسب DNA ژنومیک باکتری‌های ذکر شده بود. کیفیت پرایمرهای سفارش داده شده با الکتروفورز بر روی ژل ۱۵ درصد پلی اکریل آمید نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از پرایمرهای sea F ، sea R و IpaH F به عنوان کنترل استفاده گردید

برای جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ C واکنش PCR با دو جفت پرایمر ویژه ژن‌های nuc و sec انجام شد که وجود قطعه ۳۹۷ جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن nuc نشان‌دهنده وجود این ژن در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود که از این طریق نسبت به شناسایی این باکتری اقدام گردید (تصویر شماره ۱ ستون ۵) و وجود قطعه ۲۷۱ جفت باز نیز مربوط به تکثیر بخشی از ژن sec بود که وجود ژن گدکننده انتروتوکسین تایپ C را تأیید می‌نمود (تصویر شماره ۱ ستون ۴). جهت شناسایی همزمان باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و تایپ نمودن از روش multiplex PCR استفاده شد (تصویر شماره ۱ ستون ۲) که در این روش، علاوه بر شناسایی باکتری نسبت به

این ژن بود و به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت، انجام نشده است (تصویر شماره ۲ ستون های ۱۱ و ۱۵). در مورد دیگر باکتری های مورد بررسی نیز واکنشی صورت نگرفته است (تصویر شماره ۲ ستون های ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۳) که نشان از اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق دارد.

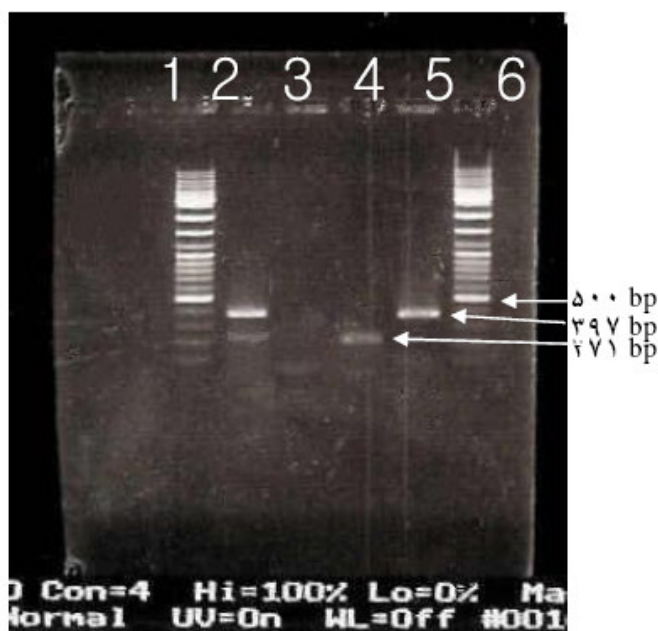
به منظور بررسی حساسیت روش شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، پس از کشت و شمارش نسبت به تهیه رقت از باکتری اقدام گردید. از رقت های تهیه شده (۶۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۰ و ۳۰ سلول در میکرولیتر) باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که واجد ژن کُدکننده انتروتوکسین تایپ C بود واکنش PCR صورت گرفت که نتایج آن در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است.

همان گونه که در تصویر شماره ۳ مشاهده می شود، واکنش PCR برای رقت های ۱۲۵ سلول و بیشتر از آن انجام گردید و محصول واکنش PCR آن ها بر روی ژل

تایپ آن نیز در یک زمان اقدام می گردد. نتایج واکنش PCR از ژنوم این باکتری ها نشان داد که ۹/۵ درصد از افراد ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس تایپ C بوده و بقیه (۹۰/۵ درصد) فاقد ژن انتروتوکسین تایپ C بودند.

ویژگی و حساسیت واکنش: جهت تعیین میزان

اختصاصی بودن واکنش PCR، نسبت به انجام واکنش PCR با باکتری های میکروکوکوس لوتئوس ATCC=9341، استرپتوکوکوس پیوژنز (آزمایشگاه رفرانس)، باسیلوس سرئوس، باسیلوس پلسی میکسا، سالمونلا پاراتیفی، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، اشیریشیاکلی، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس اقدام گردید. همان گونه که در تصویر ۲ مشاهده می شود واکنش در مورد استافیلوکوکوس اورئوسی که دارای ژن کُدکننده انتروتوکسین تایپ C می باشد، صورت گرفته است (تصویر شماره ۲ ستون های ۱۲ و ۱۴). در حالی که این واکنش با باکتری های استافیلوکوکوس اورئوسی که فاقد



تصویر شماره ۱: نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول واکنش PCR ۱- مارکر ۱۰۰ bp ۲- قطعه تکثیر یافته ۳۹۷ جفت بازی ویژه شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس و قطعه تکثیر یافته ۲۷۱ جفت بازی جهت شناسایی ژن انتروتوکسین تایپ C استافیلوکوکوس اورئوس ۳- کنترل منفی واکنش ۴- قطعه تکثیر یافته ۲۷۱ جفت بازی جهت شناسایی ژن انتروتوکسین تایپ C استافیلوکوکوس اورئوس ۵- قطعه تکثیر یافته ۳۹۷ جفت بازی ویژه شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس ۶- مارکر ۱۰۰ bp

تعیین گردید (تصویر شماره ۳ ستون ۷). از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp نیز در ستون ۱ استفاده شد.

آگاروز ۱ درصد ایجاد قطعه ۲۷۱ جفت باز به خوبی قابل تشخیص بود (ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷).



تصویر شماره ۲: تعیین ویژگی واکنش با استفاده از باکتری‌های مختلف

- شماره ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp
- شماره ۲: میکروکوکوس لوتئوس ATCC=9341
- شماره ۳: استرپتوکوکوس پیورنز (آزمایشگاه رفرانس)
- شماره ۴: باسیلوس سرئوس NCTC=10320 , ATCC= 11778
- شماره ۵: باسیلوس پلی میکسا ATCC= 10401 , NCIB = 8094
- شماره ۶: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp
- شماره ۷: سالمونلا پاراتیفی A NCTC=5702
- شماره ۸: بیرسینیا سودوتوبرکلوزیس RI=273 , PCTC=1070
- شماره ۹: اشرفیشیا کلی O111 (آزمایشگاه رفرانس)
- شماره ۱۰: پروتئوس ولگاریس سویه ox19 ATCC=6380
- شماره ۱۱: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC=25923
- شماره ۱۲: استافیلوکوکوس اورئوس (دارای ژن تولید کننده انتروتوکسین تایپ C)
- شماره ۱۳: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (آزمایشگاه رفرانس)
- شماره ۱۴: استافیلوکوکوس اورئوس (دارای ژن تولید کننده انتروتوکسین تایپ C)
- شماره ۱۵: استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن تولید کننده انتروتوکسین تایپ A
- شماره ۱۶: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp

به منظور اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، نسبت به تعیین توالی قطعه ۲۷۱ جفت باز تکثیر یافته نیز اقدام گردید. نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر شده که توسط شرکت زیست فناوری کوثر انجام گرفت نیز با توالی ژن

این در حالی بود که برای کمتر از ۱۲۵ باکتری در واکنش PCR هیچ گونه قطعه‌ای بر روی ژل آگاروز مشاهده نشد (ستون‌های ۸، ۹ و ۱۰). لذا حد تشخیص این روش با استفاده از نمونه‌های مستقیم حدود ۱۲۵ سلول

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، تتراسیکلین، وانکومایسین، کلرامفنیکل و اریترومایسین حساس می‌باشد (جدول ۱).

بحث

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید پروتئین‌های مختلفی است. یکی از این پروتئین‌ها انروتوکسین می‌باشد که می‌تواند در افراد ایجاد مسمومیت غذایی نماید. در این تحقیق که بر روی باکتری استافیلوکوکوس انجام شد، نسبت به شناسایی ناقلین سالم این باکتری و تایپ نمودن آن با روش multiplex PCR اقدام گردید. در این روش از ژن sec جهت سویه‌هایی استفاده شد که قادر به تولید انروتوکسین تایپ C بودند و سپس مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت. توجه محققین در ایران بر روی تایپ A این باکتری متمرکز بوده است زیرا در بین سروتایپ‌های استافیلوکوکی بیشترین گاستروانتریت توسط این تایپ گزارش شده است. در حالی که مطالعات کمتری در خصوص دیگر تایپ‌های این باکتری از جمله تایپ C انجام شده است.

روش‌های متعددی جهت شناسایی این باکتری و نیز تایپ نمودن آن مورد استفاده قرار گرفته است. در روش الیزا برای تایپ نمودن استافیلوکوکوس اورئوس که بر اساس انروتوکسین باکتری و نیز جسم باکتری طراحی گردیده است، مزایایی از قبیل کیت‌های تجاری اختصاصی و سادگی وجود دارد. ولی معایبی از جمله زمان بر بودن، هزینه زیاد و شناسایی تعداد معدودی از آنتی‌ژن‌ها نیز وجود دارد که همیشه با مشکل واکنش متقاطع به ویژه در مورد انروتوکسین تایپ C نیز روبرو است. نتایج به دست آمده در تحقیقات انجام شده توسط هولکوا و همکارانش نشان داده است که بین RIA و PCR و dot-blot تفاوتی در شناسایی سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نگردید (۲۷). در حالی که در روش



تصویر شماره ۲: تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری. پس از تهیه غلظت ۴۰۰۰ باکتری، رقت‌های زیر از باکتری برای بررسی حساسیت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت ۱. مارکر، ۲. ۴۰۰۰ باکتری، ۳. ۲۰۰۰ باکتری، ۴. ۱۰۰۰ باکتری، ۵. ۵۰۰ باکتری، ۶. ۲۵۰ باکتری، ۷. ۱۲۵ باکتری، ۸. ۶۰.۸ باکتری، ۹. ۳۰ باکتری، ۱۰. ۱۵ باکتری

sec به طور کامل هم‌خوانی داشته و صحت وجود ژن sec در سویه‌های شناسایی شده، تأیید گردید.

به‌منظور بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نسبت به تست حساسیت نیز اقدام گردید. در این تحقیق از ۱۱ نوع آنتی‌بیوتیک استفاده شد که با توجه به نتایج به دست آمده، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تایپ C مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، کلوکساسیلین و پنی‌سیلین می‌باشد. در حالی که باکتری

جدول ۱: بررسی مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده انروتوکسین تایپ C به ۱۱ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف

ردیف	آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
۱	لینکومایسین	+		
۲	تتراسیکلین	+		
۳	متی‌سیلین			+
۴	وانکومایسین	+		
۵	آموکسی‌سیلین			+
۶	کلوکساسیلین			+
۷	کلرامفنیکل	+		
۸	اریترومایسین	+		
۹	آموکسی‌کلاو		+	
۱۰	آمپی‌سیلین		+	
۱۱	پنی‌سیلین			+

dot-blot hybridization و RIA هزینه زیادتری جهت شناسایی در مقایسه با روش PCR مورد نیاز می‌باشد.

کلونز و همکاران با استفاده از روش multiplex PCR مشخص نمودند که ۴۷/۳۱ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده واجد ژن‌های گُدکننده انتروتوکسین‌های مختلف است که ۲۱/۵۱ درصد واجد ژن sec بودند (۱۴). در جمهوری اسلواکی، هولکوا همکاران در بررسی نمونه‌های غذایی مختلف (سوسیس و انواع سوپ‌های رشته‌ای) تعداد ۴۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس را شناسایی و جداسازی نمودند که ۱۵ سویه (۳۴/۸۸ درصد) از استافیلوکوکوس اورئوس‌ها پس از آزمایش multiplex PCR انتروتوکسوژنیک شناخته شدند. از این ۱۵ باکتری ۷ سویه (۱۶/۲۸ درصد) واجد ژن گُدکننده انتروتوکسین تایپ بودند. در این تحقیق از سوآپ بینی و گلوی تولیدکنندگان پنیر گوسفندی، ۱۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد که یکی از این سویه‌ها (۵/۲۶ درصد) واجد ژن sea بود (۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ توسط شوک و همکارانش بر روی گاوهای مبتلا به تورم پستان انجام دادند، ۹۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد و نشان دادند که ۲۲ سویه واجد ژن sec بودند. در این مطالعه، آن‌ها نتوانستند سویه واجد ژن see را پیدا نمایند (۲۸). اگرچه انتروتوکسین‌ها از نظر ساختمانی و بیولوژیکی مشابه می‌باشند، اما مقدار تولید سم در بین این تایپ‌ها متفاوت است (۲۹). مقدار بیان انتروتوکسین تایپ B و C بیش از دیگر انتروتوکسین‌ها گزارش شده است. برگدال نشان داد که مقدار ترشح انتروتوکسین تایپ A و D کمتر از انتروتوکسین B و C می‌باشد (۳۰) این در حالی است که کلونز و همکارانش گزارش کردند که مقدار انتروتوکسین تایپ B و C از لحاظ ژنوتیپی و فنوتیپی تقریباً یکسان می‌باشد (۱۴).

در تحقیق حاضر از ۱۵۰ نمونه استافیلوکوکوس مورد آزمایش، ۹۵ سویه به عنوان استافیلوکوکوس

اورئوس شناسایی شدند. بدین معنی که ۷۰/۳۷ درصد، ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شدند که از این تعداد، ۹/۵ درصد واجد ژن sec بودند. به طور کل از ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، تنها ۹ سویه واجد ژن انتروتوکسین استافیلوکوکوی تایپ C بود که تقریباً کمتر از نصف فراوانی به دست آمده در تحقیق شوک و همکاران و نیز کنی و همکارانش می‌باشد. علت عمده تفاوت‌ها در میزان فراوانی سویه‌های انتروتوکسوژنیک تایپ C در این تحقیق با سایر محققین و همچنین تفاوت این فراوانی‌ها در گزارشات مختلف، می‌تواند مربوط به منشاء جداسازی باکتری باشد. میزان فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ C با منشاء حیوان، انسان، عفونت‌ها، غذا و یا محیط متفاوت است (۲۴،۲۵) که البته در هر یک از موارد فوق نیز تفاوت‌های وجود داشته است به طوری که این میزان در انواع غذاها و عفونت‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است (۳۱،۳۲).

در بسیاری از تحقیقات انجام شده از روش‌های مختلف PCR جهت شناسایی ژن‌های گُدکننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوی در مواد غذایی مختلف استفاده شده و واکنش بهینه می‌گردد تا حساسیت واکنش در نمونه‌های غذایی مختلف به بالاترین سطح ممکن برسد. به طور مثال، برای شناسایی ژن‌های گُدکننده انتروتوکسین استافیلوکوکوی در شیر خشک، میزان حساسیت را ۱۰۰۰ باکتری تعیین کردند. (۳۳،۳۴) این در حالی که حساسیت به دست آمده در تحقیق حاضر، برابر ۱۲۵ باکتری است. علت حساسیت نسبتاً خوب این تحقیق، شناسایی باکتری در محیط بافری است اما چنانچه چه باکتری در مواد غذایی مورد آزمایش قرار گیرد (به طور مثال در شیر خشک) به علت وجود مواد ممانعت‌کننده در ماده غذایی، میزان حساسیت ممکن است کمتر باشد (۳۵).

از آن جا که مقاومت‌های میکروبی هر روز بیشتر

نماید، لذا توجه به این مسأله در درمان بیماران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم مجیدی به جهت کمک در انجام این تحقیق، کمال تشکر را داریم.

می‌شود، مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس تایپ C در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که این باکتری به متی‌سیلین مقاوم بود. میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد به طوری که کمتر از ۱ درصد تا ۶۰ درصد متغیر گزارش شده است (۳۶،۳۷). از آن جا که این باکتری مقاوم می‌تواند در بیماران مشکلاتی را ایجاد

References

- Dinges MM, Dinges P, Orwin M, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1): 16–34
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 61(1): 1-10.
- Bania J, Dabrowski A, Bystron J, Korzekwak, Chrzonowska J, Molenday. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Inter J Food Microbiol.* 2006; 108(1): 36-41.
- Lowy F. D. *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med.* (1998). 339:520-532
- Su Y C, and Wong AC. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61 (4): 1438–43.
- Munson S H, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1998; 66 (7): 3337-48.
- Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8): 2446–9.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D, Ueda S, Shinagawa K. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring seg, seh, or sei Genes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 857-62.
- Sergeev N, Volokhov D, Chizhikov V, Rasooly A. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5): 2134-43.
- LeLoir Y, Baron F, Gautier M. Review *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2003; 2(1): 63-76
- Orwin P M, Fitzgerald J R, Leung D Y, Gutierrez J A, Bohach G A, Schlievert P M. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2916-19.
- Rosec J P, Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol.* 2002; 77(1-2): 61-70.
- Iandolo J J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 1989; 43: 375-402
- Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(10): 4683-7.
- Bohach G A, Schlievert P M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet.* 1987; 209(1): 15–20.

16. Avena R M, Bergdoll M S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C *Staphylococcus aureus* strain. 361. *Biochemistry* 1967; 6(5): 1474–80.
17. Reiser R F, Robbins R N, Noletto A, Khoe G P, Bergdoll M S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect Immun.* 1984; 45(3): 625-30.
18. Marr J C, Lyon J D, Roberson J R, Lupher M, Davis W, Bohach G A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxin: biological and evolutionary implications. *Infect Immun.* 1993; 61(10): 4254–62.
19. Hawryluk T, Hirshfield I. A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot.* 2002; 65(7): 1183-7.
20. Kokan N P, Bergdoll M S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53(11): 2675-6
21. Bergdoll M. S. Enterotoxins p. 559-598. In C. S. F. Easton and C. Adlam (ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections.* 1983; Academic Press, London, United Kingdom.
22. Evenson M L, Hinds M W, Bernstein R S, Bergdoll M S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol.* 1988; 7(4): 311-6.
23. Park C E, Akhtar M, Rayman M K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(8): 2509–12.
24. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Lodi R, Vimercati C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol Cell Probes.* 2005; 19(5): 299-305
25. Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Ruiz Olvera P, Garza L M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J Food Prot.* 2003; 66(6): 1055-62.
26. Bystron J, Molenda J, Bania J, Czerw M. Occurrence of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in raw poultry meat. *Pol J Vet Sci.* 2005; 8(1): 37-40.
27. Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Gondol J, Grolmus J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med.* 2002; 9(2):179–82.
28. Zschokck M, Botzler D, Blocher S, Sommerhak J, and Hamann H. P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int Dairy J.* 2000; 569-574
29. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science.* 1990; 248(4956): 705-11.
30. Bergdoll M S. Staphylococcal intoxications. In: H. Riemann H, Bryan F L, editors. *Foodborne infection and intoxications.* New York: Academic Press; 1979. 443-93.
31. Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *J Appl Microbiol.* 2004; 97(4): 719-30.
32. Loncarevic S, Jorgensen H J, Lovseth A, Mathisen T, Rorvik L M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(2): 344-50.
33. Holeckova B, Kalinacova V, Gondol J, Fotta M, and Holoda E. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Bull Vet Inst.* 2004; 48: 41-5.
34. Hu D L, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K. Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Infect Immun.* 2003; 71(1): 567-70.
35. Hiroshi F, Satoshi M. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiol.* 2006; 23(5): 260–67.

36. Kimura A, Igarashi H, Ushioda H, Okuzuki K, Kobayashi H, and Otsuka T. Epidemiological study of *Staphylococcus aureus* isolated from Japanese national university and medical college hospitals. *Kansenshogaku Zasshi*. 1992; 66 (11):1543-9
37. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl V. T, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13 (1) :50-5.