



شناسایی ژن‌های sea, sec و seq استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های

ناقلین سالم

دکتر مجتبی سعادتی^{۱*}، بابک براتی^۲، مهدی شیرازی^۳

^۱ دانشیار میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) و دانشگاه امام حسین (ع)

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

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

چکیده

زمینه: استافیلوکوکوس اورئوس انواع انتروتوکسین خارج سلولی را تولید می نماید که سبب مسمومیت غذایی می شوند. روش‌های مختلفی جهت شناسایی سم تولید شده توسط این باکتری وجود دارد. به دلیل آن که شباهت آنتی‌ژنی زیادی بین انتروتوکسین‌ها وجود دارد، ممکن است همیشه نتوان از ارزیابی سرولوژیکی استفاده نمود. در این میان تست PCR، یک تست بسیار حساس و دارای اختصاصیت بسیار زیاد و سریع می باشد. این پژوهش با هدف شناسایی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس (sea, sec و seq) به روش PCR مرکب بود.

مواد و روش‌ها: از ۱۵۰ سویه بدست آمده از بینی ناقلین، ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شدند که با آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفتند. سپس برای شناسایی ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A، C و Q (sea, sec, seq) از سیستم PCR مرکب استفاده شد. ژن nuc که کد کننده نوکلناز مقاوم به حرارت می باشد به عنوان مارکر جهت شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قرار گرفت.

یافته‌ها: قطعات تکثیر یافته DNA برای ژن نوکلناز استافیلوکوکی ۳۹۷ جفت باز و برای ژن انتروتوکسین تایپ A ۵۵۲ جفت باز، برای ژن انتروتوکسین تایپ C ۲۷۱ جفت باز و برای ژن انتروتوکسین تایپ Q استافیلوکوکی ۱۲۲ جفت باز بود که با تعیین توالی قطعه تکثیر شده، مورد تأیید قرار گرفت. از باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی استفاده و هیچ محصولی از PCR انجام شده به دست نیامد. از میان ۹۵ فرد سالم که حمل کننده باکتری در بینی خود بودند، چهل و یک سویه (۴۳/۱ درصد) به عنوان sea, sec و یا seq سویه مثبت تشخیص داده شد. بیست و چهار سویه (۲۵/۳ درصد) مربوط به ژن sea، ۹ سویه (۹/۵ درصد) جدا شده حاوی ژن sec و ۸ سویه (۸/۴ درصد) حاوی ژن seq و ۵۴ سویه (۵۶/۸ درصد) مربوط به دیگر انواع این باکتری بودند.

نتیجه گیری: به دلیل آنکه استافیلوکوکوس اورئوس از بینی ناقلین سالم جداسازی شده است، بنابراین آزمایش PCR می تواند برای شناسایی سویه‌های واجد ژن انتروتوکسین‌های A، C و Q در این افراد مفید باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین تایپ A، انتروتوکسین تایپ C، انتروتوکسین تایپ Q، PCR مرکب

دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۸ - پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۳۰

* تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست و دانشگاه امام حسین (ع)

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل فرصت‌طلبی است که در شرایط مساعد قادر به ایجاد عفونت در انسان و حیوان می‌باشد. عوامل حدت‌زای فراوانی توسط این باکتری تولید می‌شود که نقش هر کدام در ایجاد بیماری مشخص شده است (۱). یکی از این عوامل، انتروتوکسینی است که توسط سویه‌های مختلف این باکتری (sea, seb, secn, sed و see) تولید می‌شود (۲ و ۳). تا کنون بیش از ۱۸ تایپ از این باکتری با روش‌های مختلف شناسایی شده است (۴-۶). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که انتروتوکسین تولید شده توسط سویه‌های مختلف استافیلوکوکوی دارای ساختمان و توالی نسبتاً یکسانی می‌باشند (۷ و ۸).

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۹-۲۶ کیلودالتون هستند که به وسیله استافیلوکوک کواگولاز مثبت تولید می‌شوند (۷). مهم‌ترین خصوصیات انتروتوکسین استافیلوکوکوی، توانایی ایجاد استفراغ در پریمات‌ها، مقاومت به حرارت و هضم پپسین و خاصیت سوپرانتی‌ژنیسته است (۹). سم تولید شده توسط این باکتری در انسان ایجاد مسمومیت می‌نماید که تقریباً ۵ درصد مسمومیت‌های غذایی، ناشی از انتروتوکسین‌های تولید شده توسط این باکتری می‌باشد. این در حالی است که گزارش مسمومیت‌های ناشی از این انتروتوکسین به دلیل شناسایی تایپ‌های جدید رو به افزایش است (۲ و ۶) هر چند در ایران اطلاعات بسیار کمی در این خصوص وجود دارد و بیشتر تحقیقات انجام شده به بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این باکتری مربوط می‌باشد (۱۰ و ۱۱).

برگدال (Bergdoll) گزارش نمود که ۹۵ درصد مسمومیت‌های ناشی از انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس به علت تایپ‌های A, B, C, D و E بوده و

۵ درصد باقی‌مانده به علت دیگر تایپ‌های این باکتری می‌باشد (۱۲).

انتروتوکسین تایپ A استافیلوکوکوی مهم‌ترین انتروتوکسین تولید شده توسط استافیلوکوک کواگولاز مثبت است. این سم عامل اصلی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکوی در دنیا بوده و بیشترین مطالعات نیز در مورد آن انجام شده است (۱۳). این در حالی است که اطلاعات کمی در خصوص انتروتوکسین‌های تولید شده توسط دیگر سوش‌ها به خصوص تایپ C و Q وجود دارد و این به علت نقش کم آن‌ها در ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد (۱۴).

روش‌های مختلفی برای شناسایی سم این باکتری از جمله لاتکس‌آگلانتیناسیون، الیزا (۱۷-۱۵)، ایمونوکرماتوگرافی (۱۸) و لاتکس ایمونواسی (۱۹) و مگنتیک ایمونواسی (۲۰) وجود دارد که در همه این روش‌ها نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان ژن انتروتوکسین استافیلوکوکوی می‌باشد، تا بتوان نسبت به شناسایی این سموم اقدام نمود.

هر چند تعدادی از این تست‌ها قادرند تا ۱۰۰ pg/well از سم تولید شده را شناسایی نمایند و سرعت تشخیص آن حتی ۴ برابر بیشتر از تست الیزا می‌باشد (۲۱)، لیکن در روش‌های فوق وجود سم مورد بررسی قرار خواهد گرفت. این در حالی است که ممکن است باکتری در شرایط خاص علی‌رغم داشتن ژن تولیدکننده سم، قادر به بیان آن نبوده و نتایج بدست آمده در روش‌های فوق‌الذکر منفی گردد (۲۲). لذا تلاش محققین بر آن شد تا روش‌های تشخیص مولکولی را جانشین روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی نمایند. در روش مولکولی که با شناسایی ژن کدکننده سم انجام می‌شود، می‌توان نسبت به شناسایی استافیلوکوک‌های

صنعتی ایران تهیه گردیدند. باکتری تولیدکننده انتروتوکسین تایپ A استافیلوکوکوس اورئوس از دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شد.

در این تحقیق ۱۵۰ نمونه از مخاط بینی افراد (ناقلین سالم)، نمونه برداری شد. سوآب نمونه برداری شده درون محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت و سپس به وسیله آزمایش های بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. **پرایمرهای مورد استفاده:** با استفاده از توالی ژن های *nuc*، *sec*، *sea* و *seq* در بانک های ژنی به طراحی چهار جفت پرایمر برای ژن های آنزیم دزکسی ریبونوکلئاز (*nuc*) که شاخصی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد و انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ های A، C و Q اقدام گردید. پس از انتخاب پرایمرهای مورد نظر، به وسیله نرم افزارهای مولکولی (*DNASIS*، *Blast*، *Oligo*) وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات پرایمرها 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 پلی اکریل آمید نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از پرایمر *IpaH F* به عنوان کنترل استفاده گردید (جدول ۱).

واجد ژن کدکننده این سم اقدام نمود. در این روش می توان سوش هایی که به میزان کم سم را ترشح نموده و روش های ایمنولوژیکی قادر به شناسایی آنها نیستند را شناسایی نمود.

هدف از این تحقیق جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و شناسایی سویه های واجد ژن کدکننده انتروتوکسین تایپ های A، C و Q به وسیله PCR مرکب بود.

مواد و روش کار

آنزیم DNA پلیمراز Taq، آنزیم های با اثر محدود و نشانگر DNA ladder ۱۰۰ جفت باز از شرکت فرمنتاز خریداری شد. مواد *dNTP*، *EDTA*، *Tris-base*، کلرید منیزیم، *RNase*، اتیدیوم بروماید و لیزوزیم از شرکت سیناژن تهیه گردید. باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC=۲۵۹۲۳)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس پیوژنز از آزمایشگاه رفرانس ایران تهیه شدند. میکروکوکوس لوتئوس (ATCC=۹۳۴۱)، باسیلوس پلی میگسا (ATCC=۸۰۹۴)، باسیلوس سرئوس (ATCC=۱۱۷۷۸)، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس (PCTC=۱۰۷۰)، سالمونلا پاراتیفی A (NCTC=۵۷۰۲)، پروتئوس ولگاریس سویه ۱۹ (ATCC=۶۳۸۰) و باکتری اشیریشیاکلی نیز از سازمان پژوهش های علمی و

جدول ۱: توالی پرایمرهای آنزیم دزکسی ریبونوکلئاز و انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ های A، C و Q

نام پرایمر	توالی پرایمر	تعداد باز	اندازه محصول
nuc ۱	TTG 3' CAA TGG GTA TAT GCA 5' CTG	۲۱	۳۹۷ جفت باز
nuc ۲	CC 3' GGA TCA GCT CTT GCA 5' AAT	۲۰	
sea ۱	5' TTG CGA AAA AAG TCT GAA TTG C 3'	۲۲	۵۵۲ جفت باز
sea ۲	5' ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA AGT A 3'	۲۵	
sec ۱	5' CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG 3'	۲۶	۲۷۱ جفت باز
sec ۲	5' TTA TAT CAA AAT CGG ATT AAC ATT ATC 3'	۲۷	
seq ۱	5' AAT CTC TGG GTC AAT GGT AAG C 3'	۲۲	۱۲۲ جفت باز
seq ۲	5' TTG TAT TCG TTT TGT AGG TAT TTT CG 3'	۲۶	

IpaH F: 5' CCT TGA CCG CCT TTC CGA TA -3' به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

پلی‌میگسا، سالمونلا پاراتیفی A، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، اش‌ریشیاکلی، پروتئوس و لگاریس، سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تایپ A و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس انجام شد.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۵۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که ۹۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. 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.

برای جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس ائتروتوکسوژنیک تایپ A، C و Q واکنش PCR با چهار جفت پرایمر ویژه ژن‌های nuc، sea، sec و seq 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 مولکولی این باکتری اقدام گردید (تصویر شماره ۱ ستون‌های ۲ تا ۱۳). وجود قطعه ۵۵۲ جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن sea بود که نشان‌دهنده ژن کدکننده ائتروتوکسین تایپ A در سویه‌های جدا شده می‌باشد (تصویر شماره ۱ ستون‌های ۶، ۷، ۹، ۱۲ و ۱۳). قطعه ۲۷۱ جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن sec بود که وجود ژن کدکننده ائتروتوکسین تایپ C را تأیید می‌نمود (تصویر شماره ۱ ستون ۴). قطعه ۱۲۲ جفت

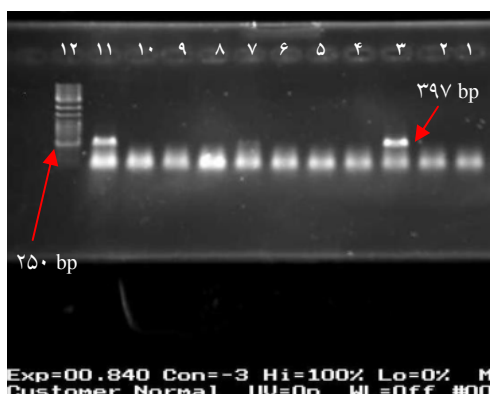
تخلیص ژنوم: پس از کشت باکتری نسبت به تخلیص ژنوم آن اقدام گردید. استخراج ژنوم به روش قلبیایی انجام شد و ژنوم‌های تخلیص شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNA ژنومی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. برای اندازه‌گیری غلظت DNA نیز از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV و جذب‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر 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 DNA پلیمرز Taq (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار) با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب دوبار 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 رنگ‌آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تأیید محصولات بدست آمده در واکنش فوق به منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از قطعه تکثیر شده توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت فرمنتاس تخلیص شد و فرآیند تعیین توالی توسط شرکت زیست فناوری کوثر انجام گرفت.

تعیین میزان ویژگی واکنش PCR: برای تعیین ویژگی، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده ۱۱ باکتری شامل سوش‌های میکروکوکوس لوتئوس، استرپتوکوکوس پیورنز، باسیلوس سرئوس، باسیلوس

استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش قرار گرفت. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌گردد، از بین ۹ باکتری مورد آزمایش تنها استافیلوکوکوس اورئوس (ستون ۳ و ستون ۱۱) قطعه مورد نظر را ایجاد کرده‌اند و در سایر ستون‌ها قطعه‌ای دیده نمی‌شود که این بیانگر اختصاصی بودن واکنش PCR برای ژن nuc جهت شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

جهت شناسایی همزمان باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و تایپ نمودن آن‌ها از روش PCR مرکب استفاده شد (تصویر شماره ۲).



تصویر ۲: ژل الکتروفورز از PCR با پرایمرهای nuc1 و

nuc2 در ۹ گونه باکتری، ستون ۱: باسیلوس پلی میکسا NCIB=۸۰۹۴ و ATCC=۱۰۴۰۱، ستون ۲: باسیلوس سرئوس NCTC=۱۰۳۲۰ و ATCC=۱۱۷۷۸، ستون ۳:

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC=۲۵۹۲۳، ستون ۴:

میکروکوکوس لوتوس ATCC=۹۳۴۱، ستون ۵:

استرپتوکوکوس پیوژنز (آزمایشگاه فرانس)، ستون ۶: نشانگر

وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، ستون ۷: پروتوس ولگاریس

سویه ۱۹x۶۳۸۰، ATCC=۶۳۸۰، ستون ۸: سالمونلا پاراتیفی A

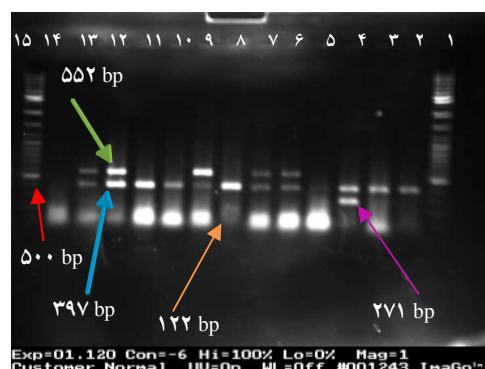
NCTC=۵۷۰۲، ستون ۹: اشیریشیاکلی O۱۱۱ (آزمایشگاه

فرانس)، ستون ۱۰: یرسینیا سودوتوبرکلوزیس

RI=۲۷۳، PCTC=۱۰۷۰

باکتری‌های تایید شده به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس که دارای ژن کدکننده nuc بودند، به صورت

باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن seq بود که وجود ژن کدکننده انتروتوکسین تایپ Q را تأیید می‌نمود (تصویر شماره ۱ ستون ۸). از باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی استفاده شد (تصویر شماره ۱ ستون ۱۴).



تصویر ۱: شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با

استفاده از ژن اختصاصی nuc و نیز تایپ آن‌ها با استفاده از

سه جفت پرایمر ژن‌های sea، sec و seq، ستون شماره ۱ و ۱۵:

نشانگر اندازه DNA Ladder ۱۰۰ جفت باز، ستون‌های ۲،

۳، ۵، ۱۱ و ۱۰: استافیلوکوکوس اورئوس فاقد انتروتوکسین،

ستون‌های ۶، ۷، ۹، ۱۲ و ۱۳: استافیلوکوکوس اورئوس واجد

ژن تولید کننده انتروتوکسین تایپ A،

ستون ۴: استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن تولید کننده

انتروتوکسین تایپ C، ستون ۸: استافیلوکوکوس اورئوس

واجد ژن تولید کننده انتروتوکسین تایپ Q، ستون ۱۴:

استافیلوکوکوس فاقد ژن nuc می‌باشد.

به منظور اطمینان از تکثیر صحیح قطعات مورد نظر،

نسبت به تعیین توالی قطعات ۵۵۲، ۲۷۱ و ۱۲۲ جفت

باز نیز اقدام گردید. نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر شده

که توسط شرکت زیست فناوری کوثر انجام گرفت نیز

با توالی ژن sea، sec و seq به طور کامل هم‌خوانی

داشته و صحت قطعات تکثیر یافته از سویه‌های

شناسایی شده تأیید گردید.

برای نشان دادن میزان ویژگی، DNA ژنومی ۹ سوش

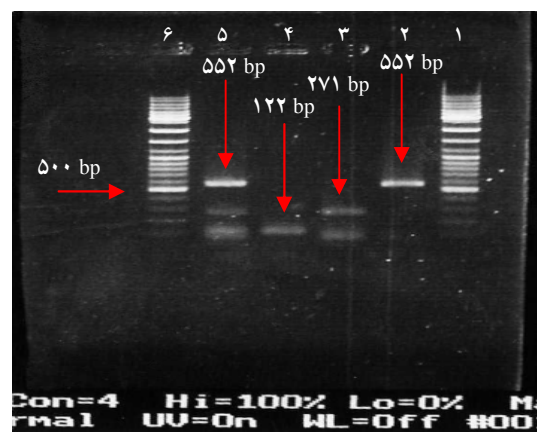
باکتری با یک جفت پرایمر اختصاصی باکتری

اورئوس جداسازی شد. این سویه‌ها قبلاً با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شده بودند. از سویه‌هایی که به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفته، ۴۱ سویه (۴۳/۱ درصد) دارای یکی از ژن‌های *sea*، *sec* و یا *seq* بوده و مثبت تشخیص داده شدند. بیست و چهار سویه (۲۵/۳ درصد) مربوط به ژن *sea* بوده که جزء بیشترین سویه‌های جدا شده می‌باشد. ۹ سویه (۹/۵ درصد) جدا شده حاوی ژن *sec* و ۸ سویه (۸/۴ درصد) حاوی ژن *seq* و ۵۴ سویه (۵۶/۸ درصد) مربوط به دیگر انواع این باکتری بودند.

بحث

وجود انتروتوکسین A تا Q در بین سویه‌های مختلف باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است (۶ و ۲۳) روش‌های متعددی جهت شناسایی سم این باکتری مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های بیوشیمیایی که در آزمایشگاه‌های طبی مورد استفاده قرار می‌گیرد چندان قابل اعتماد نمی‌باشند. براتی و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ۹/۱۸ درصد سویه جداسازی شده که در آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده بودند در بررسی مولکولی مورد تأیید واقع نشدند (۲۴). در روش الیزا که برای تایپ نمودن استافیلوکوکوس اورئوس طراحی گردیده است دارای معایبی از جمله زمان بر بودن، هزینه زیاد و شناسایی تعداد معدودی از آنتی ژن‌ها می‌باشد. این در حالی است که گزارشاتی در خصوص واکنش‌های غیر اختصاصی برای شناسایی انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس ارائه شده است (۲۵). لذا محققین تلاش نموده‌اند تا از روش مولکولی جهت

انفرادی همراه با پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های کلکننده انتروتوکسین (A, C و Q) PCR گردید. در این آزمایش ابتدا نسبت به PCR سویه واجد *sea* به همراه پرایمرهای *sea1* و *sea2* اقدام نموده و قطعه ۵۵۲ جفت باز مشاهده گردید (تصویر شماره ۳ ستون ۲). این آزمایش برای سویه واجد *sec* به همراه پرایمرهای *sec1* و *sec2* و برای سویه واجد *seq* به همراه پرایمرهای *seq1* و *seq2* انجام شد که به ترتیب دو قطعه ۲۷۱ و ۱۲۲ جفت باز ایجاد گردید (تصویر شماره ۳ ستون‌های ۳ و ۴). به منظور شناسایی همزمان ۳ سوش تولیدکننده انتروتوکسین تایپ‌های A, C و Q آزمایش PCR مرکب با شش جفت پرایمر انجام گردید که ۳ قطعه ۵۵۲، ۲۷۱ و ۱۲۲ جفت باز حاصل گردید (تصویر شماره ۳ ستون ۵).



تصویر ۳: ۱) نشانگر اندازه DNA Ladder (۱۰۰ جفت باز، ۲) قطعه تکثیر یافته ۵۵۲ جفت بازی شناسایی ژن انتروتوکسین تایپ A استافیلوکوکوس اورئوس، ۳) قطعه تکثیر یافته ۲۷۱ جفت بازی جهت شناسایی ژن انتروتوکسین تایپ C استافیلوکوکوس اورئوس، ۴) قطعه تکثیر یافته ۱۲۲ جفت بازی ویژه شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس تایپ Q، ۵) محصول PCR مرکب از تایپ‌های A, C و Q استافیلوکوکوس اورئوس ۶) نشانگر اندازه DNA Ladder (۱۰۰ جفت باز).

واکنش PCR روی باکتری‌های جداسازی شده از بینی ۱۵۰ نفر انجام گردید. تعداد ۹۵ سویه استافیلوکوکوس

شناسایی ژن کد کننده سم استفاده نمایند (۲۶). نتایج به دست آمده در تحقیقات انجام شده توسط هولکوا (Holeckova) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده شد که بین روش‌های مولکولی از جمله RIA و PCR و dot-blot تفاوتی در شناسایی سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نگردید (۲۷). این در حالی است که روش dot-blot و RIA هزینه زیادتری جهت شناسایی در مقایسه با روش PCR مورد نیاز می‌باشد. با توجه به یافته بالا در این تحقیق که بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد نسبت به شناسایی ناقلین سالم این باکتری و تایپ نمودن آن با روش PCR مرکب اقدام گردید. جهت شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از ژن nuc استفاده شد که از ۱۵۰ استافیلوکوکوس مورد آزمایش ۹۵ سویه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. بدین معنی که ۶۳/۳ درصد ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. در تحقیق انجام شده توسط براتی و همکاران نشان داده شد، که ۹۰/۸ درصد سویه جداسازی شده از نمونه‌های بیماران، ناقلین سالم و محیطی با استفاده از واکنش PCR به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفت (۲۴). علت افزایش این تعداد می‌تواند به دلیل تهیه ۷۱/۴ درصد نمونه‌ها از بیماران بیمارستان باشد.

استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده حاوی ژن کد کننده انتروتوکسین می باشد، از این تعداد انتروتوکسین تایپ A و تایپ C هر کدام با ۱۰/۸ درصد بود (۲۸). وت (Kwon) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از روش PCR مرکب مشخص نمودند که ۱۹/۱۴ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده واجد ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های مختلف بوده است (۲۶). بیشترین تایپ انتروتوکسین جدا شده sei (۷۴ درصد) و سپس sea (۳۰ درصد) بود. در مطالعه انجام شده توسط اموئه (Omoe) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده شد که از ۱۴۶ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه گرفته شده از افراد سالم، گاوهایی با تورم پستان و شیر پاستوریزه نشده گاو، ۷۷/۴ درصد دارای یکی از ژن‌های کد کننده انتروتوکسین بوده است (۶). ایشان در این مطالعه گزارش نمود که انتروتوکسین تایپ A بیشترین سوش جدا شده با فراوانی ۴۹/۹ درصد بود. این نتایج با یافته چیانگ (Chiang) و همکاران در سال ۲۰۰۶ که ۷۴/۱ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن کدکننده انتروتوکسین بوده مطابقت دارد. بیشترین تایپ جدا شده انتروتوکسین تایپ A بود (۲۸/۶ درصد) و از سوش‌های جدا شده ۸/۲ درصد مربوط به تایپ C است (۵).

در این تحقیق از استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده تنها ۴۱ سویه (۴۳/۱ درصد) دارای ژن کد کننده انتروتوکسین sea، sec و یا seq بودند. در این میان انتروتوکسین تایپ A بیشترین تایپ جدا شده (۲۵/۳ درصد) و انتروتوکسین تایپ Q کمترین سوش جدا شده بود (۸/۴ درصد). یافته ادوان (Adwan) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که ۳۷ درصد

علت عمده تفاوت‌ها در میزان فراوانی سویه‌های انتروتوکسین‌های مختلف در این تحقیق با سایر محققین و همچنین تفاوت این فراوانی‌ها در گزارشات مختلف، می‌تواند مربوط به منشاء جداسازی باکتری باشد.

در این روش از ژن sea، sec و seq جهت شناسایی سویه‌هایی که قادر به تولید انتروتوکسین تایپ A، C

اهمیت این موضوع در افرادی که حامل این باکتری بوده و به طور مداوم با مواد غذایی سر و کار داشته و از این طریق مواد غذایی آلوده شود بیشتر مشخص می‌شود. و فور تایپ A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین مطالعه و توجه محققین را به این انتروتوکسین معطوف نموده است. این در حالی است که شیوع مسمومیت با انتروتوکسین تایپ A بیشتر از سایر سروتایپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی می‌باشد، لذا اهمیت این تایپ را بیشتر از دیگر سروتایپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی مشخص می‌سازد (۱۵).

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر سلطان پور و سرکار خانم مجیدی به جهت کمک در انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم.

و Q بودند استفاده شد. 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. این در حالی است که مطالعات کمتری در خصوص دیگر تایپ‌های این باکتری از جمله تایپ C و تایپ Q انجام شده است.

آلودگی مواد غذایی خام به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که دارای ژن کد کننده انتروتوکسین باشد، می‌تواند خطر مسمومیت غذایی را در مصرف کنندگان آن افزایش دهد.

به دلیل آن‌که استافیلوکوکوس اورئوس از بینی ناقلین سالم جداسازی شده است، بنابراین آزمایش PCR می‌تواند برای شناسایی سویه‌های واجد ژن انتروتوکسین‌های A، C و Q در این افراد مفید باشد.

References:

- Dinges MM, Dinges P, Orwin M, et al. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 16-34.
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 61: 1-10.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med.* 1998; 339: 520-32
- Su YC, Wong AC. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl environ microbiol* 1995;61:1438-43.
- Chiang YC, Chang LT, Lin CW, et al. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L, and M and survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. *J Food Prot* 2006; 69: 1072-9.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, et al. 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: 857-62.
- Loir YL, Baron F, Gautier M. Review *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2: 63-76.
- Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. *Infect Immun* 2003; 71: 2916-9.
- Hawryluk T, Hirshfield I. A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot* 2002; 65: 1183-7.
- Sattari M, Rahimi-Milashi M, Zavaran Hosseini A, et al. Evaluation of Staphylococcal contamination on dairy products and antibiotic resistance pattern in Tehran. *Modarres J Med Sci* 1998; 2: 63-6.
- Saadati M, Barati B, Shirazi M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Type and molecular assay for the simultaneous detection of sea and seb genes. The 5th national biotechnology congress of Iran, 2007, 782.
- Bergdoll MS. Enterotoxins. In Easton CSF, Adlam C (editors). *Staphylococci and staphylococcal infections*. United Kingdom, London: Academic Press. 1983. pp. 559-98.
- Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, et al. 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: 311-6.
14. Chen TR, Chiou CS, Tsen HY. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 189-97.
 15. Wieneke AA, Gilbert RJ. The use of a sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A in foods from outbreaks of food poisoning. *J Hyg (Lond)* 1985; 95:131-8.
 16. Shinagawa K, Watanabe K, Matsusaka N, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in incriminated foods and clinical specimens from outbreaks of food poisoning. *Nippon Juigaku Zasshi* 1990; 52:847-50.
 17. Bennett RW. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J Food Prot* 2005; 68: 1264-70.
 18. Khreich N, Lamourette P, Boutal H, et al. Detection of *Staphylococcus enterotoxin B* using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Anal biochem* 2008;377:182-8.
 19. Medina MB. Development of a fluorescent latex microparticle immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB). *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4937-42.
 20. Alefantis T, Grewal P, Ashton J, et al. A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-throughput screening. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 379-82.
 21. Khan AS, Cao CJ, Thompson RG, et al. A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B. *Mol Cell Probes* 2003; 17: 125-6.
 22. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, et al. 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: 857-62.
 23. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes sea to sej. *Mol Cell Probes* 2003; 17: 139-47.
 24. Barati B, Saadati M, Bahmani MK. Isolation and Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Type A by multiplex PCR. *J Mil Med* 2006; 8: 119-28.
 25. Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2509-12.
 26. Kwon NH, Kim SH, Park KT, et al. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. *Int J Food Microbiol* 2004; 2: 137-45.
 27. Holeckova B, Holoda E, Fotta M, et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9: 179-82.
 28. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the north of Palestine. *Turk J Biol* 2005; 29: 229-32.