مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره ششم ـ شماره سوم ـ پاییز ۹۱
صفحه۷۸ الی ۸۵

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن انتروتوکسین A-E و TSST-1 توسط روش PCR

جمیله نوروزی[1]، گویا گودرزی[2]، پرویز پاکزاد[1]، رؤیا رضوی‌پور[3]

[1]استاد میکروب‌شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.
[2]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.
[3]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انتروتوکسین‌ها و TSST-1 از مهم‌ترین عوامل بیماریزای این باکتری هستند. این بررسی با هدف شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن انتروتوکسین (sea، seb، sec، sed،see) و TSST-1 در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از منابع مختلف با استفاده از روش PCR صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه طی ۵ ماه، از ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۸۰ سویه به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید. از روش PCR جهت شناسایی ژن‌های انتروتوکسین A-E و TSST-1 استفاده شد.

یافته‌ها: در این بررسی از ۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده، ۵۳ سویه (۶۶/۲۵٪) حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین و TSST-1بودند. در میان نمونه‌های مثبت، ۱۷ سویه (۳۲/۰۷٪) دارای ژن sea، ۳۹ سویه (۷۳/۵۸٪) حاوی ژن seb، ۳۰ سویه (۵۶/۶٪) دارای ژن sec، ۲ سویه (۳/۷۷٪) حامل ژن sed، ۲۱ سویه (۳۹/۶۲٪) حاوی ژن see و ۱۴ سویه (۲۶/۴۱٪) دارای ژن tst بودند. ژن‌های انتروتوکسین همراه با ژن tst نیز در ۴۰ نمونه (۷۵/۴۷٪) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش درصد بسیار بالایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن‌های انتروتوکسین و tst در نمونه‌های کلینیکی، مواد غذایی و انسانهای سالم مشاهده گردید، که اهمیت توجه به انسان به‌عنوان منبع اصلی و ناقل استافیلوکوکی را مشخص می‌کند. لذا پیشنهاد می‌شود از واکنش PCR برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین و tst در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از منابع مختلف استفاده گردد.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*؛ انتروتوکسین؛ سندرم شوک سمی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR).

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Nowroozi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. Isolation and Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A-E and TSSt-1 Genes from Different Sources by PCR Method. Qom University of Medical Sciences Journal 2012;6(3)

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: goodarzi.gooya@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۶

مقدمه

در بین باکتری‌ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که باعث مسمومیت غذایی شده و هرساله صدها هزار نفر از مردم را به این بیماری مبتلا می‌کند (۲،۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی غشاهای مخاطی و پوست پستانداران، مواد غذایی مختلف و محیط اطراف یافت می‌شود و عامل ایجاد ذات الریه بعد از عفونت‌های ویروسی، ورم پستان گاو، التهاب وریدها، منتژیت، عفونت دستگاه ادراری، التهاب موضعی استخوان‌ها، اندوکاردیت، ضایعات سطحی پوست و غیره می‌باشد (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* توکسین‌های پروتئینی خارج سلولی

www.SID.ir

Archive of SID

با وزن مولکولی کم و فاکتورهای بیماریزایی مختلفی را تولید می‌کند. چندین نوع انتروتوکسین استافیلوکوکی شامل: (A، B، C، D، E، G، H، I، J، K، L، M، N، O، P، Q، R) و ژن‌های مرتبط با آنها (sea، seb، sec، sed، see، seg، seh، sei، sej، ser، seq، sep، seo، sen، sem، sel، sek) گزارش شده است. این انتروتوکسین‌ها از لحاظ ساختار و فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده، ولی خصوصیات آنتی‌ژنی آنها با یکدیگر متفاوت است. بیش از ۹۵٪ از انتروتوکسین‌های این باکتری که ایجاد مسمومیت غذایی می‌کنند، جزء گروه A-E هستند و گروه A و D نیز از مهم‌ترین انتروتوکسین‌های ایجادکننده مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌باشند (۴). انتروتوکسین B نیز به‌علت قابلیت جذب از طریق استنشاق و کاربردهای بیوتروریستی آن دارای اهمیت است. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به حرارت مقاوم بوده، و مقاومت حرارتی آنها در درون مواد غذایی بیشتر از مقاومت آنها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی است، همچنین فعالیت بیولوژیکی این توکسین‌ها بعد از مراحل گرمایی آماده‌سازی غذا، بدون تغییر باقی می‌ماند. این توکسین‌ها به پروتئازهای معده‌ای و روده‌ای مانند پپسین نیز مقاومند و می‌توانند بعد از هضم غذا همچنان فعال باقی بمانند. فاکتورهای زیادی مانند تعداد سلول‌های باکتری، غلظت نمک (بالاتر از ۷/۵٪)، pH، دما و رقابت با باکتری‌های دیگر، تولید انتروتوکسین را در غذا تحت تأثیر قرار می‌دهد. انتروتوکسین‌ها در محصولات لبنی مانند شیر و پنیرخام، گوشت‌خام، سبزیجات و شیرینی‌جات در ارتباط با مسمومیت غذایی می‌باشند. برای ایجاد مسمومیت غذایی توسط انتروتوکسین‌ها تعداد 10^5-10^8 cfu (واحد تشکیل‌دهنده کلنی) باکتری لازم است. اگرچه با پاستوریزاسیون می‌توان سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را از بین برد، ولی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی مقاوم به حرارت، فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ می‌کنند. لذا این توکسین‌ها می‌توانند عوامل مهمی در ایجاد مسمومیت ناشی از مواد غذایی باشند. ابتلا به مسمومیت غذایی در نتیجه خوردن غذای حاوی انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت، که معمولاً توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود، بروز می‌کند. مسمومیت با انتروتوکسین استافیلوکوکی در انسان باعث تهوع، استفراغ، به‌ندرت اسهال و دردهای عضلانی و شکمی می‌شود (۶-۴). روش‌های متداول استفاده‌شده برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی و TSST-1 شامل: الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون، ایمونودیفیوژن، لاتکس ایمونواسی، رادیوایمونواسی و غیره می‌باشد، که در این روش‌ها باید شرایط لازم برای آنتی‌ژن مورد نظر فراهم گردد، ولی در تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) و PCR مرکب، نیازی به آنتی‌ژن نبوده و حتی در صورت نبود توکسین یا میزان کم توکسین، ژن‌ها قابل ردیابی هستند (۷). بیشتر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بیماران مبتلا به بیماری سندرم شوک سمی (بیماری حادی که به سرعت منجر به از کار افتادن اندام‌های حیاتی بدن می‌شود)، توکسینی تولید می‌کنند که به‌عنوان TSST-1 شناخته شده است. اگرچه این بیماری نادر است، ولی بسیار شدید و کشنده می‌باشد. این بیماری عموماً در ارتباط با مصرف تامپون بوده، ولی گزارش‌هایی از ابتلا به این بیماری در حضور شرایط دیگر نیز وجود دارد. توکسین سندرم شوک سمی که عضوی از خانواده سوپر آنتی‌ژن‌ها است، عامل چندین نوع از بیماری‌ها مانند سندرم شوک سمی (Toxic Shock Syndrome)، سندرم مرگ ناگهانی نوزادان (Sudden Infant Death Syndrome) و سندرم کاوازاکی (Kawasaki Syndrome) می‌باشد (۱).

هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی سویه‌های واجد ژن کدکننده انتروتوکسین‌های A-E و TSST-1 در مواد غذایی، نمونه‌های کلینیکی، همچنین سواب بینی در شهر تهران با استفاده از تکنیک PCR بوده است.

روش بررسی

این مطالعه روی ۱۵۰ نمونه (از دی‌ماه سال ۱۳۸۸ تا اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۸۹) در شهر تهران انجام شد. ۷۰ نمونه کلینیکی (۱۱ نمونه از ادرار، ۲۵ نمونه از خون و ۳۴ نمونه از عفونت زخم) از ۲ بیمارستان شهدای تجریش، سوانح و سوختگی مطهری در شهر تهران و ۳۰ نمونه سواب از مخاط بینی افراد بزرگسال سالم جمع‌آوری شد. ۵۰ نمونه ماده غذایی (غیرپاستوریزه) شامل: ۳۰ نمونه لبنیات مختلف، ۷ نمونه شیرینی‌جات، ۷ نمونه گوشت‌خام و ۶ نمونه سبزیجات از مغازه‌های مناطق مختلف خریداری گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در مدت ۲ الی ۳ ساعت برای بررسی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد آزمایش قرار گرفتند. برای جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از مواد

www.SID.ir

Archive of SID

غذایی، ۱۰g از هر نمونه را به ۹۰ml آب پپتونه استریل اضافه کرده، سپس با استفاده از سواب استریل بر روی محیط Baird Parker آگار حاوی ۵٪ زرده تخم مرغ و ماده تلوریت کشت داده شدند. نمونه‌های بینی با استفاده از سواب استریل جمع‌آوری و درون محیط مایع BHI کشت داده شدند، سپس به محیط مانیتول سالت آگار انتقال یافتند. نمونه‌های کلینیکی نیز بر روی محیط‌های Nutrient Agar و BHI آگار کشت داده شدند. در ادامه، کلنی‌های رشدیافته جهت انجام بررسی‌های بعدی به محیط‌های بلاد اگار و مولر هینتون حاوی کلرید سدیم و اگزاسیلین منتقل شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷°C نگهداری شدند. بعد از مدت ۲۴ ساعت بر روی کلنی‌های مشکوک، تست‌های تأییدی از جمله واکنش گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تخمیر مانیتول و تست کواگولاز صورت گرفت.

پرایمرها جهت ساخت به شرکت مبین آزما طب ایران سفارش داده شد. توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است (۸).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین A-E و TSST-1

ژن		توالی پرایمر	تعداد باز	اندازه محصول
sea	F	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	۲۰	۱۰۲
	R	CGCCACTTTTTTCTCTTCGG	۲۰	
seb	F	GGTGGTGTAACTGAGC GTA	۲۱	۱۶۴
	R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	۲۰	
se	F	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	۲۴	۴۵۱
	R	CACACTTTTAGAATCAACCG	۲۰	
sed	F	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	۲۳	۳۷۸
	R	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	۲۰	
See	F	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	۲۱	۲۰۹
	R	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	۲۱	
tst	F	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	۲۰	۳۲۶
	R	TTTTCAGTATTTGTAACGCC	۲۰	

DNA ژنومی از کشت شبانه ۳۷°C بر روی محیط مایع BHI جداسازی شد. برای استخراج ژنوم باکتری نیز از کیت استخراج ژنوم ساخت مرکز رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (MBST) استفاده گردید. ژنوم‌های تخلیص‌شده در دمای ۴°C نگهداری شدند. همچنین جهت بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده، DNA ژنومی با ۱٪ ژل آگارز الکتروفورز گردید. غلظت DNA نیز در طول موج ۲۶۰nm با دستگاه UV ترانسلومیناتور اندازه‌گیری شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl انجام گرفت. در این واکنش، ۲/۵µl بافر PCR (۱۰x)، ۱µl از مخلوط دزاکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (dNTP)، ۰/۵µl از نمک (MgCl2)، ۱µl از هر پرایمر F و R، ۰/۵µl آنزیم Taq DNA Polymerase و ۸µl از DNA الگو با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی توسط آب ۲ بار تقطیر به ۲۵µl رسانده شد. واکنش در ۳۵ چرخه مطابق جدول شماره ۲ انجام گرفت و دمای اتصال برای ژن‌های sea، seb و sec؛ ۵۸°C، برای ژن‌های sed و tst؛ ۵۶°C و برای ژن see؛ ۵۴°C در نظر گرفته شد. برای محاسبه دمای اتصال هر پرایمر Ta (Annealing Tempreture)، با توجه به تعداد و نوع بازهای پرایمر مورد نظر از رابطه:

Ta=[4(G+C)+2(A+T)-4]

استفاده گردید.

برای بررسی محصول واکنش، ۵µl از محصول جهت الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شد. سپس با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول شماره ۲: مراحل واکنش PCR

زمان (دقیقه)	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	ژن	مراحل
۵	۹۶		دناتوره کردن
۲	۹۴		اتصال
۱	۵۸	sea	
۱	۵۸	seb	
۱	۵۸	sec	
۱	۵۶	sed	
۱	۵۴	see	
۱	۵۶	tst	
۷	۷۲		تکثیر
۳	۷۲		تکثیر نهایی

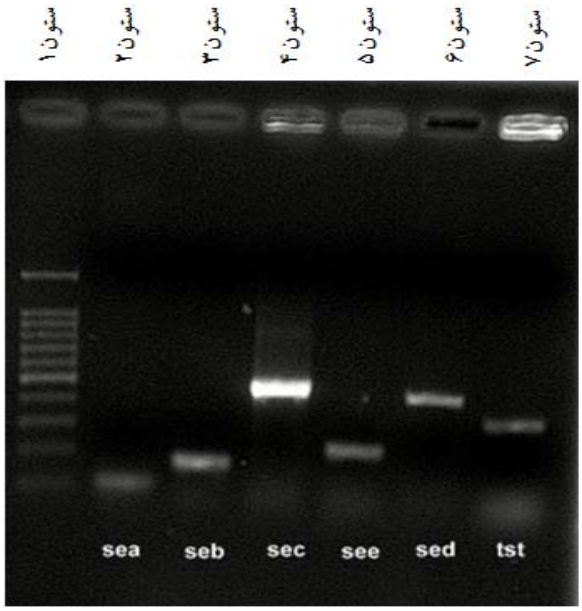
یافته‌ها

از میان ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس نتایج تست‌های میکروب‌شناسی شناسایی شدند. برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین A-E و TSST-1 واکنش PCR بر روی تمامی ۸۰ نمونه انجام شد که وجود قطعه ۱۰۲ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن sea (شکل، ستون ۲)، قطعه ۱۶۴ جفت بازی نشان‌دهنده ژن seb (شکل، ستون ۳)، قطعه ۴۵۱ جفت

www.SID.ir

Archive of SID

بازی نشان‌دهنده ژن sec (شکل، ستون ۴)، قطعه ۲۰۹ جفت بازی نشان‌دهنده ژن see (شکل، ستون ۵)، قطعه ۳۷۸ جفت بازی نشان‌دهنده ژن sed (شکل، ستون ۶) و قطعه ۳۲۶ جفت بازی نشان‌دهنده ژن tst (شکل، ستون ۷) بود.



شکل: الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های انتروتوکسین A–E و TSST-1

جدول شماره ۳: سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن‌های جداشده از منابع مختلف

منبع باکتری‌های جداشده	تعداد سویه‌های *S. aureus*	درصد	تعداد نمونه‌های دارای ژن‌های انتروتوکسین A-E و TSST-1	درصد
گوشت‌خام (گوسفند، گاو، مرغ، سوسیس)	۴	٪۵	۴	٪۷/۵۴
مواد لبنی خام (شیر، پنیر، خامه، سرشیر)	۲۰	٪۲۵	۱۳	٪۲۴/۵۳
سبزیجات	۴	٪۵	۳	٪۵/۶
شیرینی‌جات (کیک، نان خامه‌ای)	۴	٪۵	۴	٪۷/۵۴
ادرار	۴	٪۵	۳	٪۵/۶
خون	۱۲	٪۱۵	۶	٪۱۱/۳۲
زخم	۲۴	٪۳۰	۱۵	٪۲۸/۳
سواب بینی	۸	٪۱۰	۵	٪۹/۴۳
مجموع	۸۰	۱۰۰	۵۳	۱۰۰

۵۳ نمونه (٪۶۶/۲۵) از ۸۰ نمونه حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین و tst بودند. در میان ۵۳ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی‌شده، تعداد ۱۷ سویه (٪۳۲/۰۷) دارای ژن sea، ۳۹ سویه (٪۷۳/۵۸) حاوی ژن seb، ۳۰ سویه (٪۵۶/۶) دارای ژن sec، ۲ سویه (٪۳/۷۷) حامل ژن sed، ۲۱ سویه (٪۳۹/۶۲) حاوی ژن see و ۱۴ سویه (٪۲۶/۴۱) ژن tst داشتند. همچنین درصد بسیار بالایی از نمونه‌ها (٪۶۶/۲۵) دارای چندین ژن انتروتوکسین و یا ژن انتروتوکسین به همراه ژن tst بودند. بیشترین فراوانی را ژنوتیپ sec/tst در ۱۹٪ نمونه‌ها و کمترین ژنوتیپ را seb-sed-see در یک نمونه کلینیکی داشت. جدول شماره ۳ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و نمونه‌های حاوی ژن را نشان می‌دهد.

در ۷۰ نمونه جداشده از بیماران بیمارستان‌های مطهری و شهدای تجریش، ۴۰ سویه *استافیلوکوک اورئوس* به‌وسیله آزمایشهای مختلف میکروب‌شناسی شناسایی شدند. در این سویه‌ها، sea در ۸ سویه (٪۲۰)، seb در ۱۵ سویه (٪۳۷/۵)، sec در ۱۴ سویه (٪۳۵)، sed در ۲ سویه (٪۵)، see در ۱۶ سویه (٪۴۰) و tst در ۷ سویه (٪۱۷/۵) مشاهده گردید. در آزمایش ۳۰ نمونه سواب گرفته‌شده از بینی افراد سالم، sea در ۲ سویه (٪۴۰)، seb در ۳ سویه (٪۶۰) و tst در ۲ سویه (٪۴۰) دیده شد. در نمونه‌های جمع‌آوری شده از سواب بینی افراد سالم هیچ‌کدام از ژن‌های sec، sed و see

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده نشد. در ۵۰ نمونه غذایی جمع‌آوری‌شده، ۳۲ سویه (۶۴٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش گردید که در میان سویه‌های مثبت، sea در ۲۹/۲٪، seb در ۸۷/۵٪، sec در ۶۶/۷٪، see در ۲۰/۸٪ و tst نیز در ۲۰/۸٪ نمونه‌ها دیده شد.

نتایج بهینه‌سازی غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR نشان داد غلظت ۱µl برای هر پرایمر، dNTP ۱µl و ۸µl از DNA ژنومی، مناسب‌ترین میزان برای ایجاد قطعه‌هایی با اندازه مورد نظر در واکنش PCR بوده است.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد بعضی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای یک یا تعداد بیشتری از ژن‌های انتروتوکسین Sea-See و tsst-1 می‌باشند. انتروتوکسین‌ها به‌خصوص گروه Sea تا See، مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند (۸). از روش‌های با اهمیت در تشخیص انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توان به روش‌های استاندارد ایمونولوژیکی اشاره نمود، اما این روش‌ها دارای مشکلاتی مانند زمان طولانی برای ایجاد شرایط مناسب تولید توکسین توسط باکتری، واکنش متقاطع و امکان ایجاد پاسخ‌های کاذب می‌باشد (۹). روش PCR توانایی شناسایی استعداد سویه‌ها در تولید انتروتوکسین را دارد، به‌خصوص در مواقعی که ژن‌های انتروتوکسین به‌علت شرایط مختلف بیان نمی‌شوند. در این مورد جستجوی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن‌های انتروتوکسین A و D بسیار اهمیت دارد؛ زیرا این انتروتوکسین‌ها از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی بوده و شیوع مسمومیت با آنها بیشتر از سایر تیپ‌ها گزارش شده است، همچنین این انتروتوکسین‌ها در میزان بسیار کم نیز می‌توانند مسمومیت شدید غذایی ایجاد کنند. به‌همین علت امروزه بسیاری از محققان از این روش برای شناسایی استفاده می‌کنند (۱۰). *استافیلوکوکوس اورئوس* از منابع مختلفی مانند حیوانات، انسان، دستگاه‌های تهیه و پردازش مواد غذایی، محیط و مواد غذایی مختلف قابل جداسازی است. در تحقیق حاضر از ۵۰ نمونه غذایی جداسازی‌شده، در ۶۴٪ نمونه‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. این یافته‌ها مشابه نتایج Ertas و همکارانش در سال ۲۰۱۰ می‌باشد که در ۵۷/۳٪ از ۱۵۰ نمونه لبنی مورد بررسی آنها، *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد (۴). همچنین در مطالعه Atanassova و همکارانش (سال ۲۰۰۱) در آلمان روی ۱۳۵ نمونه جمع‌آوری‌شده از گوشت قرمز در طی مراحل مختلف ساخت ژامبون، ۶۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید (۱۱)، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. در بررسی حاضر، میزان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های غذایی بیشتر از نمونه‌های کلینیکی بود، همچنین در ۴۰ نمونه (۵۷/۱۴٪) از ۷۰ نمونه جمع‌آوری‌شده از عفونت‌های زخم، ادرار و خون، *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد که با مشاهدات Varshney و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۰٪ نمونه‌های جداسازی‌شده از زخم و خون بیماران ۳ بیمارستان در نیوجرسی مطابقت داشت (۱۲). افزایش میزان جداسازی این باکتری نقش و اهمیت این میکرواورگانیسم را در سلامت عمومی نشان می‌دهد. تحقیقات مختلفی در ارتباط با حضور نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی افراد سالم صورت گرفته است؛ زیرا این باکتری یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های انتقال‌یافته از طریق بینی (Nosocomial) می‌باشد. اولین جایگاه اکولوژیکی این باکتری، بینی انسان است و انتقال این باکتری از طریق بینی افراد باعث افزایش عفونت‌های استافیلوکوکی به‌خصوص در زمان بستری شدن در بیمارستان یا ضعیف بودن سیستم ایمنی می‌شود (۱۳). در تحقیق حاضر، *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۶/۷٪ از ۳۰ نمونه سواب بینی جمع‌آوری‌شده، مشاهده گردید. این اطلاعات با نتایج به دست آمده توسط Vanderbergh و همکارانش که حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* را در ۵۰-۲۰٪ از نمونه‌های بینی افراد سالم بزرگسال گزارش کردند، همچنین با نتایج بررسی‌های Rall و همکارانش در برزیل (سال ۲۰۱۰) که در ۲۲/۱٪ نمونه‌های بینی، *استافیلوکوکوس اورئوس* را مشاهده نمودند، مطابقت داشت (۱۴،۱۳). در این مطالعه بین ۸۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از منابع کلینیکی، نمونه‌های غذایی و سواب بینی؛ ۵۳ سویه (۶۶/۲۵٪)، ژن‌های انتروتوکسین A-E و tst داشتند. همچنین در نمونه‌های غذایی، ۷۵٪ نمونه‌ها حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین و tst بودند که نتایج مشابهی در بررسی‌ها توسط Chapval و همکارانش به دست آمد. آنها با استفاده از روش PCR مشاهده نمودند از میان ۱۳۲ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از مواد لبنی در طی سالهای ۲۰۰۴-۲۰۰۳، تعداد ۹۰ نمونه (۶۸/۱۸٪) دارای یک یا چند ژن انتروتوکسین می‌باشند (۸). همچنین در بررسی توسط بسیاری از پژوهشگران دیگر، میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن‌های انتروتوکسین بسیار بالا

www.SID.ir

Archive of SID

بوده است (۱۶،۱۵)، ولی درصد پایین‌تری از این ژن‌ها در بررسی‌های صورت گرفته توسط محققان دیگر نیز مشاهده شده است. نتایج بررسی توسط Adwan و همکارانش بر روی ۱۰۰ نمونه از مواد غذایی لبنی در شمال فلسطین نشان داد ۳۷٪ نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده، دارای ژن‌های انتروتوکسین هستند، ولی هیچ‌کدام از آنها بیش از یک ژن نداشتند (۱۷،۲). اختلاف‌های موجود در این بررسی‌ها می‌تواند به‌علت تفاوت در نوع مواد غذایی و نمونه‌گیری در مراحل مختلف ساخت مواد غذایی باشد. در این تحقیق درصد بالایی از باکتری، بیشتر در موادی که در تهیه و ارائه آنها از دست استفاده شده بود مانند شیرینی‌جات مشاهده گردید، که لزوم رعایت کامل موازین بهداشتی در مراحل مختلف آماده‌سازی مواد غذایی و غذا را نشان می‌دهد. در این مطالعه، ۶۰٪ نمونه‌های کلینیکی دارای یک یا چند ژن انتروتوکسین و tst بودند. تحقیقات دیگر نتایج مختلفی را نشان داده‌اند. Varshney و همکارانش با بررسی بر روی ۲۷۰ نمونه جداسازی‌شده از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان، مشاهده کردند ۹۹٪ نمونه‌ها حداقل دارای یک ژن و ۱۹۸ نمونه نیز بیش از یک ژن داشتند (۱۲). همچنین در مطالعات انجام‌شده توسط Zschöck و همکارانش در آلمان بر روی ترشحات به دست آمده از گاوهای مبتلا به بیماری ورم پستان؛ ۳۶/۲٪ سویه‌های استافیلوکوکوس جداشده دارای ژن‌های انتروتوکسین و tst بودند (۱۸). علت گسترده بودن تفاوت‌ها در میزان فراوانی ژن‌های انتروتوکسین و tst در مطالعات مختلف ممکن است به‌علت متفاوت بودن منابع جداسازی درکشورهای مختلف یا جایگاه‌های طبیعی سویه‌ها، روش‌های بررسی و حساسیت آنها، تعداد نمونه‌ها و نوع نمونه‌های مورد بررسی باشد.

در مطالعه حاضر تمامی ژن‌های انتروتوکسین A-E یافت شدند، و درصد فراوانی ژن sea ۲۳/۰۷٪، ژن seb ۷۳/۵۸٪، ژن sec ۵۶/۶٪، ژن sed ۳/۷۷٪، ژن see ۳۹/۶۲٪ و ژن tst ۲۶/۴۱٪ بوده است. در مطالعه‌ای مشابه، Ran Peck و همکارانش(سال ۲۰۰۸) در طول ۵ ماه به بررسی ۷۰ نمونه کلینیکی و ۹۵ نمونه سواب بینی جمع‌آوری‌شده از افراد بستری در بیمارستانی در کره پرداختند. این نمونه‌ها از یک بیمارستان و در طی یک دوره همزمان گرفته شده بود. این محققان برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین‌های مختلف (sea-sek) و tst به انجام PCR به‌طور جداگانه برای هر ژن پرداختند که در میان ۷۰ سویه کلینیکی؛ ۵۰ نمونه (۷۱/۴٪)، حداقل دارای یک ژن انتروتوکسین بودند، و بیشترین فراوانی را ژن seg (۵۸/۶٪) و بعد از آن ژن tst (۴۴/۳٪) و کمترین را sec (۳۴/۳٪) داشت و ژن see در هیچ‌کدام از نمونه‌های کلینیکی آنها یافت نشد. همچنین در میان ۹۵ سویه *استافیلوکوک اورئوس* جداشده از بینی، ۷۸ نمونه (۸۲/۱٪) برای حداقل یک ژن انتروتوکسین مثبت بودند. در نمونه‌های جداشده از بینی، بیشترین فراوانی را به ترتیب ژن‌های sei (۷۰/۵٪)، tst (۵۲/۶٪) و sea (۴۷/۴٪) داشتند (۱۹). هیچ‌کدام از نمونه‌های بینی حاوی ژن‌های seb، sed و see نبودند، این یافته با نتایج مطالعه حاضر که فقط ژن‌های sea، seb و tst را در نمونه‌های سواب بینی گزارش نمود، از نظر وجود ژن sea و tst همخوانی داشت. همچنین در بررسی‌های انجام‌شده توسط پژوهشگران دیگر، فراوانی کمتری از این ژن‌ها یافت شد. تحقیقات Bystron و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی ۹۹ نمونه *استافیلوکوک اورئوس*، ۵۰ نمونه از گوشت‌خام خوک و بوقلمون و ۴۹ نمونه کلینیکی از آزمایشگاهی در لهستان نشان داد ۳۶ نمونه از ۹۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* حاوی ژن‌های انتروتوکسین (sea-see) بوده، که sea در ۱۲ سویه، seb در ۳ سویه، sec در ۸ سویه و sed در ۶ سویه مشاهده گردید (۱۷). در این پژوهش‌ها تفاوت در فراوانی ژن‌ها ممکن است بدین علت باشد که در مطالعه حاضر نمونه‌ها از منابع متنوع‌تری جمع‌آوری شده بود و البته تفاوت در نوع زندگی و رعایت بهداشت را هم باید در نظر داشت. در مقایسه با مطالعات Ertas و همکارانش (سال ۲۰۱۰) در ترکیه که نشان دادند ژن sea بیشترین میزان ژن‌های جداشده در مواد غذایی را دارا می‌باشد، همچنین گزارشهای دیگر مبنی بر بیشترین میزان ژن‌های sea و sed در نمونه‌های بررسی‌شده (۴،۲۰،۲۱)، در مطالعه حاضر، بیشترین درصد ژن‌های مشاهده‌شده به ترتیب شامل ژن seb ۷۳/۵۸٪ و sec ۵۶/۶٪ بود. گزارشهای دیگری نیز توسط محققان متعدد، نتایج مشابهی را نشان می‌دهد که در آنها بیشترین ژن‌های مشاهده‌شده seb و sea بوده است (۲،۱۵،۱۶). در این بررسی ژن sed، کمترین میزان (۳/۷۷٪) را داشت که فقط در ۲ نمونه کلینیکی مشاهده گردید، و در نمونه‌های غذایی و سواب بینی یافت نشد، این نتیجه نیز با نتایج Rall و همکارانش در برزیل مبنی بر عدم وجود ژن sed در نمونه‌های سواب دست و بینی افراد سالم، مطابقت داشت (۱۴)، و با نتایج بررسی‌های Aragon-Alegro که در آن sed بیشترین میزان ژن‌های مشاهده‌شده در نمونه‌های غذایی را داشت، همچنین با نتایج Nashev و همکارانش در سال ۲۰۰۴ که ۴/۵٪ نمونه‌های سواب بینی و دست افراد سالم دارای ژن sed بودند، مغایرت

www.SID.ir

Archive of SID

داشت (۲۲،۲۰). با توجه به نتایج مطالعات دیگر و این بررسی، در کل فراوانی ژن sed پایین می‌باشد. به دلایل ناشناخته، جستجوی ژن sed مشکل است و استفاده از روش‌های موجود برای بررسی آن همیشه کارآمد نیست. بنابراین، نتایج در ارتباط با ژن sed باید با احتیاط بیشتری بررسی شود. در مطالعه حاضر، حضور همزمان چندین ژن در یک نمونه مشاهده گردید، و در بین کل نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده، ۱۷/۵٪ دارای ۲ ژن بودند که بیشترین میزان حضور همزمان را ژن‌های sec و tst (۱۹٪) داشتند. مشابه این نتایج در سال ۲۰۰۸ در اسلواکی توسط Maslankova و همکارانش که بر روی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از منابع حیوانی کار می‌کردند، به دست آمد. از میان ۷۹ نمونه حیوانی گرفته‌شده، تمام ژن‌های توکسین‌های sea, seb, sec, sed و tst بجز see وجود داشت، که بیشترین فراوانی مربوط به ژن sec و بعد از آن ژن tst بود. همچنین در ۳۳٪ نمونه‌ها ژن tst به همراه ژن sec مشاهده گردید (۲۳). در بررسی توسط Zschock و همکارانش نیز ژن sec در ۱۶٪ نمونه‌ها به همراه ژن tst مشاهده شد (۱۸). دلیل همراه بودن دو ژن sec و tst در تحقیقات گزارش شده و این مطالعه، ممکن است به‌علت همراه بودن این دو ژن در کنار هم بر روی یک جزیره بیماری‌زایی باشد که با هم نیز انتقال می‌یابند. همچنین در مطالعه حاضر، ۲۶/۲۵٪ نمونه‌ها ۳ ژن و ۶/۲۵٪ نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۴ ژن را با هم همراه بودند. همچنین حضور همزمان ۴ ژن فقط در نمونه‌های کلینیکی دیده شد و با مشاهدات Ran Peck و همکارانش که بیان نمودند ۳۰٪ نمونه‌های جداسازی‌شده از خون افراد بیمار دارای ۴ ژن با هم همراه می‌باشد، مطابقت داشت (۱۹). این مورد می‌تواند به‌علت انتقال افقی عناصر ژنتیکی متحرک حاوی ژن‌های مورد نظر باشد که معمولاً در مکان‌هایی مانند بیمارستان‌ها که بیماران مبتلا به انواع مختلف عفونت‌ها مخصوصاً عفونت با چند سویه مختلف می‌باشند، یافت می‌شود. در این تحقیق ژن tst در ۷ نمونه (۱۷/۵٪) از نمونه‌های کلینیکی، همچنین در نمونه‌های گرفته‌شده از مواد غذایی (۵ نمونه از ۲۴ نمونه) و افراد سالم (۲ نمونه از ۵ نمونه) نیز مشاهده گردید. همچنین این یافته‌ها با نتایج Mehrotra و همکارانش که از ۱۵۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از سواب بینی افراد سالم در کانادا و هلند؛ ۳۶ سویه (۲۴٪) حاوی ژن tst را گزارش نمودند، مشابه بود (۲۴). این نتایج با مطالعات قبلی که در آنها نیز ژن tst در افراد سالم مشاهده شده بود، مطابقت داشت (۲۵). ولی نتایج بررسی‌ها توسط El-Ghodban و همکارانش در لیبی فراوانی کمتری از ژن tst را نشان داد و تنها در ۳ سویه (۷/۵٪) از ۴۰ سویه کلینیکی مورد بررسی، ژن tst مشاهده گردید، و در هیچ‌کدام از نمونه‌های غذایی این ژن یافت نشد، همچنین این یافته‌ها با نتایج Tsen و همکارانش در تایوان که در ۳ سویه (۴/۸٪) از ۶۲ سویه کلینیکی وجود ژن tst و در نمونه‌های غذایی عدم وجود این ژن را نشان می‌داد، مشابه می‌باشد (۲۶،۱).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق درصد بسیار بالایی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های انتروتوکسین و tst در نمونه‌های کلینیکی، مواد غذایی و انسانهای سالم مشاهده گردید که اهمیت توجه به انسانها به‌عنوان منبع اصلی و ناقل استافیلوکوکی را مشخص می‌کند. همچنین پیشنهاد می‌شود از واکنش PCR برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین و tst در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از منابع مختلف استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و کارکنان آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد شمال به جهت همکاری در انجام این تحقیق نهایت تشکر را داریم.

References:

1. El-Ghodban A, Ghenghesh KHS, Ma Rialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya. J Med Microbiol 2006;55:179-182.

2. Adwan GH, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Raw Milk in the North of Palestine. Turk J Biol 2005;29:229-232.

3. Turkyilmaz S, Kaya O. Determination of some Virulence Factors in Staphylococcus Spp Isolated from Various Clinical Samples. Turk J Vet Anim Sci 2006;30:127-132.

4. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins in Sheep Cheese and Dairy Desserts by Multiplex PCR Technique. Int J Food Microbiol 2010 Aug 15;142(1-2):74-7.

5. Loir YL, Baron F, Gautier M. Review Staphylococcus aureus and Food Poisoning. Genet Mol Res 2003;2(1):63-76.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Akineden O, Hassan AA, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic Properties of Staphylococcus aureus Isolated from Goats' Milk Cheese. Int J Food Microbiol 2008;124(2):211-216.

7. Wang SJ, Chow LW, Wum J. Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of the Sea, Seb, Sec, Sed and See Genes of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus. J Food Drug Anal 2002;10(3):164-169.

8. Chapaval L, Moon DH, Gomes JV, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to Detect Classical Enterotoxins Genes and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Gene (tst) in Staphylococcus aureus Isolated from Crude Milk and Determination of Toxin Productivities of S. aureus. Arq Inst Biol, São Paulo 2006;73(2):165-169.

9. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. Development of a Multiplex PCR Assay for the Identification of Staphylococcus aureus Enterotoxigenic Strainsisolated from Milk and Dairy Products. Mol Cell Probes 2005;19(5):299-305.

10. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins and Toxic Shock Syndrometoxin-I in Staphylococcus aureus by the Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1991;29(3):426-430.

11. Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Pork and Uncooked Smoked Ham-a Comparison of Classical Culturing Detection and RFLP-PCR. Int J Food Microbiol 2001;68(1-2):105-113.

12. Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Wang X, Gialanella PH, et al. Diverse Enterotoxin Gene Profiles among Clonal Complexes of Staphylococcus aureus Isolates from the Bronx, New York. Appl Environ Microbioly 2009;75(21):6839-6849.

13. Vandenbergh MFQ, Yzermann EPF, Belkum AV, Boelens HAM, Sijmons M, Verrugh HA. Follow-up of S. aureus Nasal Carriage after Years: Redefining the Persistent Carrier State. J Clin Microbiol 1999;10:3133-3140.

14. Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes JrA, Rall R, Silva MG, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxin Genes of Staphylococcus sp Isolated from Nasal Cavities and Hands of Food Handlers. Braz J Microbiol 2010;41(1):59-65.

15. Fotta M, Federicova J, Gondol L, Kalinicova V, Heleckova B. Occurrence of Enterotoxigenic Strains of Staphylococcus aureus. Slov Vet Cas 2000;25:291-293.

16. Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinocova V, Gondol C, Grolmus J. Occurrence of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Food. Ann Agric Environ Med 2002;9(2):179-182.

17. Bystronj, Bania J, Zarczynska A, Korzekwa K, Molenda J, Kosek-paszkowska K. Detection of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus Strains Using a Commercial Elisa and Multiplex-PCR. Bull Vet Res Inst Pulawy 2006;50(50):329-333.

18. Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP. 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;10(8):569-574.

19. Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of Genotypes and Enterotoxin Genes Between Staphylococcus aureus Isolates from Blood and Nasal Colonizers in a Korean Hospital. J Korean Med Sci 2008,24(4):585-91.

20. Aragon-Alegro LC, Konta EM, Suzuki K, Silva MG, Fernandes JA, Raal R, Rall VLM. Occurrence of Coagulase Positive Staphylococcus in Various Food Products Commercialized in Botucatu, SP, Brazil and Detection of Toxins from Food and Isolated Strains. Food Control 2007;18(6):630-634.

21. Nájera-Sánchez G, Maldonado-Rodríguez R, Olvera PR, Garza LM. 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):1055-1062.

22. Nashev D, Toshkova K, Isrina S, Salaisa S, Hassan AA, Lammler C, Zschock M. Distribution of Virulence Genes of Staphylococcus aureus Isolated from Stable Nasal Carriers. FEMS Microbiol Lett 2004;233(1):45-52.

23. Mašlanková J, Pilipčincová I, Tkáčiková L. Pheno-and Genotyping of Staphylococcus aureus Isolates of Sheep Origin. Acta Vet Brno 2008;78:345-352.

24. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for Staphylococcus aureus Enterotoxins, Exofoliativetoxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. J Clin Microbiol 2000;38:1032-1035.

25. Chance TD. Toxic Shock Syndrome: Role of the Environment, the Host and the Microorganism. Br J Biomed Sci 1996;53(4):284-289.

26. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of Enterotoxigenic Types, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) Strains and Antibiotic Susceptibilities for Enterotoxigenic Staphylococcus aureus Strains Isolated from Food and Clinical Samples. Food Microbiol 1998;15:33-41.

www.SID.ir