مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۵، ۳۲۶-۳۲۱

تشخیص و آنتی بیوگرام استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه استان تهران به روش Multiplex PCR و مقایسه با کشت میکروبی

حامد اهری[۱] دلاور شهباززاده[۲]* علی میثاقی[۳] محمدرضا پورشفیع[۴]

۱) گروه تحقیقات و توسعه مشترک نانونصب پارس، عضو دفتر علم و فناوری دانشگاه تهران، تهران-ایران.
۲) انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی
۳) گروه بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.
۴) بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۴)

چکیده

باکتری استافیلوکوکوس ارئوس ازشایع‌ترین باکتری‌های عامل ورم پستان می‌باشد که جهت تشخیص تعداد کم‌آن درشیر نیاز به روش‌های حساس می‌باشد. در این مطالعه روش ازواکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تشخیص ژن‌های تولید کننده توکسین‌های SEA، SEB، SEC که مختص گونه ارئوس بوده وهمچنین ژن حراست‌شده 23S rRNA که در تمام استافیلوکوک‌ها مشترک می‌باشد، استفاده‌شده است. در نهایت نتایج حاصل از تشخیص ملکولی با روش مرسوم کشت مورد مقایسه قرارگرفته است. به‌دلیل سختی دیواره باکتری استافیلوکوکوس وعدم تأثیرآنزیم‌های لایزوزیم، پروتئناز K وموتیلایزین، ازروش ازت مایع جهت تجزیه دیواره باکتری استفاده‌گردید. تعداد ۴۸ نمونه‌شیر غیر پاستوریزه ازدامداری‌های حومه استان تهران تهیه وبعد ازانجام PCR وکشت بر روی محیط آگار خون‌دار تعداد ۴ نمونه مثبت تشخیص داده‌شد. نتایج حاصل ازآنتی بیوگرام نشان داد که سیپروفلوکساسین، ریفامپین وجنتامایسن بهترین آنتی بیوتیک‌های انتخابی در درمان اورام پستانی ناشی از استافیلوکوکوس طلائی می‌باشد. حساسیت روش ملکولی با تعداد ۱۰ باکتری در هر میلی لیتر ازمحیط کشت درمدت زمان کوتاهی بدست‌آمد درحالیکه درروش کشت، تعداد ۱۰۰ باکتری بعد ازمدت ۴۸ ساعت قابل تشخیص بود. بیان کننده‌آن است که روش ملکولی در مقایسه با روش‌های مرسوم حساس وبسیارسریع می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس ارئوس، PCR، SEs، 23S rRNA.

مقدمه

گزارش‌های متعددی از بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به پاتوژن‌های غذایی وجود دارد. این پاتوژن‌ها سبب ایجاد عفونت‌های باکتریایی از جمله سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس، شیگلا، لیستریامونوسیتونز می‌شوند. از میان باکتری‌های پاتوژن غذایی، استافیلوکوک طلایی از اهمیت به سزایی برخوردار می‌باشد.

باکتری استافیلوکوکوس، کوکسی گرم مثبت است که عفونت‌های متنوعی را در انسان و دام ایجاد می‌کند. به علت مقاومت سویه‌های بیماری‌زای انسانی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، تشخیص سریع عوامل پاتوژن از اهمیت بسزایی برخوردار است(۱،۷). امروزه از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به موقع عفونت‌های میکروبی استفاده می‌گردد(۸،۹).

با توجه به شایع بودن آلودگی نمونه‌های لبنی به انواع گونه‌های استافیلوکوکوس و همچنین راندمان پایین روش‌های متداول مانند آزمایش الایزا و کشت میکروبی، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جایگزین متدهای مذکور کمک به سزائی در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن می‌نماید.

ژن 23S rRNA که در تمامی گونه‌های استافیلوکوکوس حراست شده می‌باشد و نمایانگر کنترل DNA استافیلوکوک‌ها از سایر باکتری‌های پاتوژن رایج است و همچنین ژن‌های SEA، SEB، SEC که اختصاص به گونه استافیلوکوکوس ارئوس دارند جهت تشخیص آلودگی‌های ناشی از استافیلوکوکوس ارئوس مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲).

درمطالعه حاضرروش مولکولی جهت تشخیص باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه و جمع آوری شده از دامداری‌های حومه استان تهران مورد استفاده قرارگرفته و نتایج حاصل از انجام Multiplex PCR- با روش‌های متداول کشت باکتری مقایسه و ارزیابی شده است.

مواد و روش کار

الف) نمونه‌گیری: با همکاری آزمایشگاه‌های دامپزشکی پاستور و وت، تعداد ۶۰ نمونه شیر غیر پاستوریزه که به صورت مستقیم از گاوداری‌های شیری یا از مخازن تانک ذخیره شیر در کارخانه‌ها تهیه شده بود، در کمتر از دو ساعت در مجاورت یخ جهت آزمایش‌های میکروبی به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌گیری در فواصل معین سال و با رعایت شرایط صحیح نمونه‌گیری انجام گردید.

کشت باکتری و غنی سازی: جهت تشخیص ملکولی نمونه‌های تهیه شده، قبل از انجام PCR نمونه‌ها بر روی محیط آبگوشت برین‌هارت brain heart infusion broth (Merck) غنی سازی گردید. به این نحو که ۱میلی لیتر از هر نمونه شیر به صورت مجزا در محیط BHI broth انتقال و به

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۸۰۷۸۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email :shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- توالی پرایمرها، اندازه محصولات PCR در تکثیر ژن‌های استافیلوکوکوی ارئوس.

Primer Name	Oligonucleotide sequence (30-50)	Amplication size(bp)	Target gene	Reference
23S1200-F 23S1698-R	TTT-GG-TCC-TTG-TCC-GGA-TGT-AGC AGA-AT- CTT- CAC- GCT-CTC- TC	499	23S rRNA	Cremonesi et al. (2005),(2)
A1 A2	GGT-TAT-CAA-TGT-GCG-GGT-GG CGG-CAC-TTT-TTT-CTC-TTC-GG	102	sea	da Silva et al. (2005),(2)
B1 B2	GTA-TGG-TGG-TGT-ACC-TGA-GC CCA-AAT-AGT-GAC-GAG-TTA-GG	164	seb	da Silva et al. (2005),(2)
C1 C2	AGA-TGA-AGT-TGA-TGT-GTA-TGG CAC-ACT-TTT-AGA-ATC-AAC-CG	451	sec	da Silva et al. (2005),(2)

مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس حجم ml ۱/۵ از کشت حاصله را به داخل میکروتیوب انتقال داده و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی که حاوی محیط کشت Tripticase soy broth agar (TSB, Merck) بوده است، سلولهای باکتری رسوب یافته جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

ب) استخراج DNA ژنومیک باکتری: میزان µl 30 از SDS ده درصد به میکروتیوپ حاوی سلول‌های باکتری رسوب یافته افزوده شد. سپس میکروتیوب را به درون هاون چینی اتوکلاو شده تخلیه نموده و از ت ۱۹۶- درجه سانتیگراد را به ۲ برابر حجم معادل آن در هاون ریخته و بعد از تشکیل کریستال‌های یخ در هاون، دیواره سلولی باکتری (تحت تأثیر ضربات مکانیکی) به راحتی شکسته شده و بدون استفاده از هرگونه آنزیمی که جهت سوش‌های مختلف مصرف می‌گردد لیز سلولی انجام و DNA قابل استخراج بوده است (۹). سپس محتوای هاون را به درون میکروتیوپ انتقال داده و بعد از افزودن فنل کلروفورم و سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی، فنل را برداشته و دور ریخته شد سپس هم حجم فنل دور ریخته شده، کلروفورم ایزوآمیل الکل ۱ به ۲۴ افزوده و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه حجم µl ۲۰ آنزیم RNAse جهت لیز RNA اضافه گردید. در نهایت µl ۷/۵ کلرور سدیم جهت رسوب کلاف DNA اضافه نموده و با اضافه نمودن µl ۶۰۰ از ایزوپروپانل الکل و باقی ماندن در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه و سانتریفوژ g×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و تخلیه مایع رویی و باقی ماندن رسوب کف میکروتیوپ، اقدام به شستشو با الکل اتانل ۷۰ درصد گردید و این عمل دو بار تکرار گردید.

سپس سانتریفوژ نهایی با دور g×۹۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و در نهایت الکل رویی را تخلیه و میکروتیوپ را به صورت وارونه و در باز به روی کاغذ رطوبت‌گیر برای ۳۰ دقیقه قرار داده و بعد از خشک شدن این پلیت، µl ۱۰۰ آب مقطر دو بار تقطیر شده به آن اضافه گردید.

ج) تشخیص مولکولی به کمک ژن‌های 23S rRNA و sea_b_c: با استفاده از مقالات موجود در این زمینه (۲،۸) چهار جفت پرایمر به شرح ذیل از طریق شرکت سیناژن تهیه گردید.

۲) دستگاه ترمال سایکلر به صورت زیر برنامه ریزی شد: در سیکل اول در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سیکل اصلی دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد سیکل‌های اصلی ۳۰ بار تکرار شد) و سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود.

پس از طی روند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مقدار µl ۷/۵ از قطعات تکثیر یافته از محصول PCR با افزودن µl ۲ از Loading Buffer به ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال یافت و نتایج حاصله با استفاده از لامپ ماوراء بنفش به صورت باند مشخص گردید.

الکتروفورز DNA در ژل آگارز: بعد از تهیه ژل ۱/۵ درصد و انجام الکتروفورز، ابتدا ژل در تانک حاوی اتیدیوم بروماید mg/ml ۱۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۳ دقیقه به تانک آب مقطر دو بار تقطیر انتقال یافت، آنگاه به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل گردید که نتایج آن در تصویر ۱ نشان داده شده است.

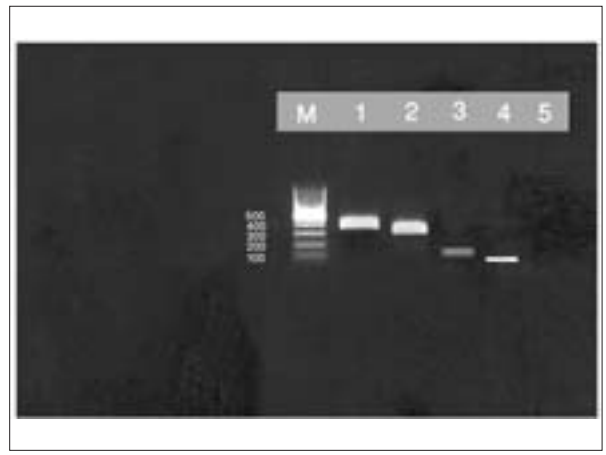
د) اندازه‌گیری میزان دقت آزمایش: جذب نوری باکتری استاندارد استافیلوکوکوس (RTCC 2411) که از گروه بهداشت وکنترل موادغذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اخذ شده بود، بعد از دو بار کشت ۱۸ ساعته باکتری مورد نظر، جذب نوری کشت ۱۸ ساعته دوم در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که معادل ۰/۰۲ بود. همزمان با کشت سطحی در محیط برد پارکر (Baird Parker Agar) شمارش انجام گرفت که نتیجه

جدول ۲- برنامه مورد استفاده دستگاه جهت انجام PCR.

توسعه و تکثیر	اتصال و الحاق	دناتوراسیون	پروفایل حرارتی
———	———	۵min - ۹۴ درجه سانتیگراد	سیکل اول
۱min - ۷۲ درجه سانتیگراد	۱min - ۵۶ درجه سانتیگراد	۲min - ۹۴ درجه سانتیگراد	سیکل‌های اصلی
۷min - ۷۲ درجه سانتیگراد	———	———	سیکل آخر

www.SID.ir

Archive of SID

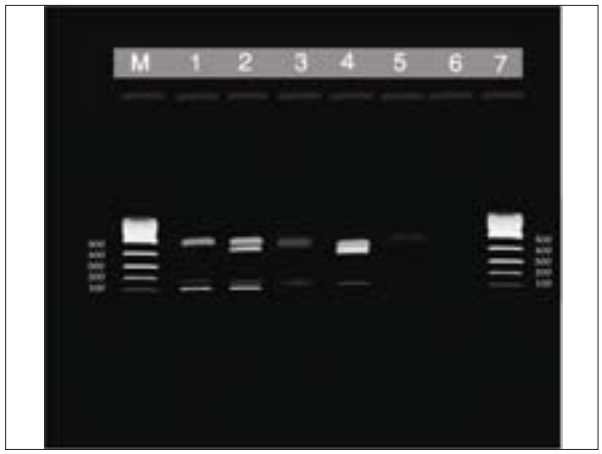


تصویر۱- در این تصویر، سایزمارکر(DNA Ladder Plus 100Ps) شرکت سیناژن که به ترتیب حاوی باندهای ۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰-۵۰۰ جفت بازی در سمت چپ تصویر مشاهده می‌شود. ستون ۱، باند حاصل از محصول ۴۹۹bp واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (23S rRNA)، ستون ۲ باند ۴۵۱bp مربوط به (sec)، ردیف ۳ باند ۱۶۴bp مربوط به (seb) و در ردیف ۵ نیز باند محصول ۱۰۲bp مربوط به ژن (sea) می‌باشد.

معادل با 10^{7} cfu/ml بدست آمد. با انجام رقت سازی به روش Serial dilution رقت‌های ۱ تا 10^{6} را تهیه نموده سپس استخراج DNA و PCR انجام گردید. کشت میکروبی نمونه‌های شیر مورد آزمایش به روی محیط برد پارکر به صورت همزمان انجام شد تا مقایسه‌ای بین دقت روش ملکولی با PCR صورت پذیرد.

هـ) کشت میکروبی: در این بخش هر یک از نمونه‌های شیر را، با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و بعد از جدا شدن رسوب و خامه شیر مذکور، مقداری از خامه را با آنس برداشته و باقی مانده شیر را تخلیه نموده و با همان آنس مقداری از رسوب انتهائی را هم برمی‌داریم و به میزان یک لوپ کامل روی محیط آگارخون دار برده و بعد از ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به بازدید پلیت‌ها پرداخته شد و پرگنه‌های استافیلوکوکوس به رنگ سفید و زرد (با لبه‌های کاملا گرد پرگنه‌ها) مشاهده گردید. حال جهت بررسی کوگلاز مثبت بودن نمونه‌ها از پلاسمای خرگوش((Sclavo Diagnostic_Coagulase Siena:(62021/08/01) استفاده شد بدین نحوکه: از نمونه‌هایی که پرگنه‌های سفید وزرد رنگ در آنها دیده شد به ۰/۳ میلی لیتر محیط BHI (آبگوشت مغز وقلب) منتقل نموده و سپس بوسیله آنس از سوسپانسیون فوق برداشته و در محیط TSA (آگارشیب دار تریپتیک سویا) کشت گردید (هر دو کشت جامد ومایع را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷درجه سانتیگراد گذارده) در نهایت ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای خرگوش را به کشت مایع افزوده و کاملا مخلوط وسپس در حرارت ۳۷ درجه نگهداری کرده، تا فاصله زمانی ۶ ساعت از نظر تشکیل لخته مورد بررسی قرار گیرد. فقط لوله‌هائی که کاملا منعقد شده بودند ۴+ و کواگلاز مثبت محسوب گردیدند و لوله‌هایی که انعقاد در آنها ناقص بود (۱+ تا ۳+) مشکوک قلمداد شدند که این لوله‌ها از لحاظ تست‌های بیوشمیایی مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند.

تصویر۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز حاصل از رقت سازی سلول باکتری. ستون M سایز مارکر 100bp DNA ladder plus ستون شماره ۱ غلظت 10^{6} ـ ستون شماره ۲ غلظت 10^{5} ـ ستون ۳ غلظت 10^{4} ـ ستون شماره ۴ غلظت 10^{3} ـ ستون شماره ۵ غلظت 10^{2}ـ ستون شماره ۶ غلظت 10^{1}.



تصویر۳- نتایج multiplex PCR در نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه. ستون M سایز مارکر (DNA Ladder Plus 100 bp) و ستون ۱ نمونه شیر شماره ۱ که حاوی باندهای sea و seb; ستون ۲ مربوط به نمونه شیر دوم حاوی باندهای sea، seb و sec;ستون ۳ حاوی باند seb ; ستون ۴ مربوط به نمونه شیر چهارم می‌باشد و باندهایی seb و sec رؤیت می‌شود. باند مربوط به ژن 23S rRNA در تمامی نمونه‌ها و از جمله به صورت بسیار ضعیف در ستون ۵ که مربوط به نمونه شیر پنجم است دیده می‌شود. ستون ۶ کنترل منفی و ستون ۷ سایز مارکر می‌باشد که جهت سهولت و تفکیک باندها منظور گردیده است.

لوله‌هایی که تشکیل لخته در آنها مشکوک بود به مدت ۱۸ الی ۴۸ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از بازدید مجدد، ۴ نمونه مثبت مشاهده شد.

و) آنتی بیوگرام باکتری‌های جدا شده: استاندارد نیم مک فارلند تهیه و کدورت باکتری با این استاندارد سنجیده شد. سپس با استفاده از سوآپ سه مرتبه با چرخش ۶۰ درجه روی محیط مولر هیلتون آگار، کشت متراکم تهیه گردید و در نهایت دیسک‌های آنتی بیوتیک را روی محیط گذاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری هاله‌های ممانعت از رشد آنتی بیوتیک مشاهده گردید.

ی) شمارش نمونه‌های شیر خام به روش کشت سطحی: ابتدا رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-2} از شیر خام با استفاده از رقیق کننده رینگر تهیه گردید، سپس ۰/۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نمونه‌های مثبت. (Resistant :R) -(Sensitive :S).

نمونه‌ها	اگزاسیلین	ریفامپین	جنتامایسین	تتراسایکلین	انکومایسین	آمپیسیلین	اریزومایسین	سپروفلوکساسین
نمونه شماره۱	S	R	**S**	S	**S**	S	**S**	S
نمونه شماره ۲	R	**S**	S	**S**	S	I	S	**S**
نمونه شماره۳	R	**S**	S	**R**	S	**S**	R	**S**
نمونه شماره ۴	R	**S**	S	**R**	S	**S**	R	**S**

جدول ۳- شمارش میکروبی نمونه‌های شیر آزمایش شده.

نمونه‌های شیر	شمارش میکروبی
نمونه۱	۶×۱۰^{۱} cfu/ml
نمونه۲	۲×۱۰^{۲} cfu/ml
نمونه۳	۱×۱۰^{۲} cfu/ml
نمونه۴	$۱/۶\times۱۰^{۲}$ cfu/ml
نمونه۵	ــــــــ

میلی لیتر از اصل نمونه (شیر خام) و نیز رقت‌های تهیه شده به سطح دو پلیت حاوی محیط BP منتقل گردید و با استفاده از میله شیشه‌ای خمیده در سطح محیط پخش شد. آنگاه پلیت‌های کشت داده شده در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و سرانجام مورد شمارش قرار گرفتند.

نتایج

با انجام multiplex PCR بر روی سوش استاندارد استافیلوکوکوس ارئوس با استفاده از پرایمرهای ژن sea،seb، sec و 23S rRNA اختصاصی بودن پرایمرها در استافیلوکوکوس ارئوس مورد تأیید قرار گرفت، که نتایج آن در جهت شناسایی انواع استافیلوکوکوس‌ها در نمونه‌های لبنی اخذ شده مورد استفاده قرار گرفت. همچنین با توجه به نتایج شکل شماره ۱ باندهای ۱۰۲bp، ۴۵۱،۱۶۴ و ۴۹۹ به ترتیب برای ژن‌های sea،seb، sec و 23S rRNA مشاهده گردید.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت تست، نشانگر آن است که دقت واکنش به میزان $۱۰^{۱}$ باکتری می‌باشد که در تصویر ۲ این امر قابل مشاهده است. همچنین می‌توان رقت‌های $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۶}$ را در تصویر مشاهده نمود، واین امر بیانگر آن است که دقت تست به نحوی است که حتی با وجود تنها ۱۰ باکتری قابل مشاهده می‌باشد. می‌توان از این آزمایش به آسانی جهت تشخیص و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس استفاده نمود.

کشت میکروبی بر روی محیط برد پارکر انجام شد و نتایج حاصل از کشت نشان داد که تا رقت ۱۰۰ باکتری در محیط کشت قابل تشخیص می‌باشد که در مقایسه با روش ملکولی که تا ۱۰ باکتری را تفکیک می‌نماید اختلاف قابل توجهی دارا است.

multiplex PCR نمونه‌های مثبت: بعد از انجام آزمایش ملکولی بر روی نمونه‌های شیر آلوده جمع آوری شده تعداد ۵ نمونه مثبت حاصل گردید. و

جدول ۳- شمارش میکروبی نمونه‌های شیر آزمایش شده.

Culture /multiplex PCR	Positive	Negative	Total
Positive	4 = a	1 = b	5
Negative	0 = c	55 = d	55
Total	4	60	60

این در حالی است که در نتایج حاصل از کشت تنها ۴ نمونه قابل تشخیص بوده است. و یکی از نمونه‌هایی که توسط کشت منفی تشخیص داده شده بود در آزمایش PCR مثبت نشان داده شد. با توجه به حساسیت PCR در مقایسه با روش کشت، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این نمونه به دلیل تعداد کم پاتوژن و عدم توانایی در تکثیر به روش کشت سلولی فقط در نتایج PCR multiplex (تصویر ۳) مشاهده می‌گردد.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام: نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام بیانگر آن می‌باشد که سپروفلوکساسین، ریفامپین، جنتامایسین، وانکومایسین و حتی آمپی سیلین بهترین آنتی بیوتیک‌های انتخابی در درمان اورام پستانی ناشی از استافیلوکوکوس طلایی می‌باشد.

شمارش نمونه‌های شیر خام به روش کشت سطحی: بعد از انجام شمارش، کمترین میزان آلودگی مربوط به نمونه شماره ۵ است که باند ضعیفی در تصویر حاصل گردیده بود، و همچنین بیشترین میزان آلودگی هم مربوط به نمونه شماره ۴ می‌باشد.

محاسبه ضریب توافق یا Kappa:

Kappa= 0P-EP/1-EP

OP(Observation Proportion) = a+d / Number of Samples

4 + 55/60=0.983 ⟶ OP=0.983

EP (Expected Proportion) = (a +b/n) .(a+c/n) +(c+d/n) .(b+d/n)

EP = (5/60 .4/60)+(55/60 .56/60) = 0.855 ⟶ EP = 0.855

Kappa = 0.983 _ 0.855/1 _ 0.855 = 0.128/0.145 ➤ **Kappa** = 0.83

(Perfect agreement result)

بحث

باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان یکی از پاتوژن‌های آلوده کننده انسان، حیوان و محیط زیست مطرح می‌باشد. روش‌های متعددی برای جداسازی این باکتری از موجود زنده و یا در مواد غذایی بکار گرفته شده است. استفاده از روش‌های ملکولی میتواند جایگزین دیگر روش گردد. از حساس ترین مرحله در انجام روش PCR استخراج DNA باکتری است. در

www.SID.ir

Archive of SID

این مطالعه برای اولین بار با استفاده از روش نیتروژن مایع جهت استخراج DNA استفاده گردید. (این روش قبلا در قارچ آسپرژیلوس به کار رفته است(۹).

با توجه به نتایج حاصله که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود باند مربوط به پرایمر seb ضعیف بوده که احتمالا مربوط به حساسیت کم ژن مربوطه در شرایط کاربردی آزمایش می‌باشد که در تحقیقات قبلی انجام شده نیز این باند نامشخص بوده که البته با تزریق دو برابر به ژل و همچنین استفاده از قدرت UV۴۰۰ می‌توان این باند را بهتر رویت نمود (نتایج در اینجا ذکر نشده است). در مجموع وجود استافیلوکوکوس با پرایمر 23S rRNA و تائید گونه ارئوس با سه پرایمر اختصاصی مربوطه انجام گرفت، همچنین روش مطلوب استخراج DNA حاصله در این آزمایش، برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که در صورت عدم دسترسی به آنزیم‌های اختصاصی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

یکی از نتایج دیگر تحقیق این بود که یک نمونه شیر در کشت از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس ارئوس مثبت اعلام نگردیده بود ولی نتیجه حاصل از PCR آن مثبت شد. در مورد نمونه مذکور پس از انجام PCR و الکتروفورز آن باند ضعیفی حاصل گردید که تصویر این باند آورده نشده است. دقت حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در تشخیص آلودگی‌های اورام پستانی بسیار حائز اهمیت بوده و در بعضی موارد به علت کم بودن تعداد پاتوژن در کشت میکروبی قابل مشاهده نباشد با استفاده از روش ملکولی در مدت زمان کمتر از چند ساعت به آسانی می‌توان تشخیص دقیق داد.

نتایج حاصل از تحقیقات از چند جنبه مشکلات مربوط به شناسایی استافیلوکوکوس را از طریق کشت میکروبی نشان میدهد که مهمترین آن عبارتند از:

تعداد موارد شناسایی شده توسط کشت میکروبی محدودیت بیشتری در شناسائی آلودگی شیر و سایر لبنیات دارد و همچنین طولانی شدن زمان انکوباسیون جهت مشاهده پرگنه‌های این باکتری غالبا باعث افزایش احتمال آلودگی‌های ثانویه آزمایشگاهی و حتی خشک شدن و نا کارامد شدن محیط کشت قبل از حصول نتیجه لازم می‌شود که احتمالا در ثبت نتایج واقعی تاثیر خواهد گذاشت(۴،۵) واز طرفی دیگر مهمترین مزیت این روش بر روش‌های کشت میکروبی در آن است که در کشت آزمایشگاهی گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس ممکن است باعث بوجود آمدن حالات مختلف شود که احتمالا مربوط به عوامل رشد متفاوت هر کدام از آنها باشد که به امر جداسازی میکروبی آنها با یک روش واحد خدشه وارد می‌نماید. و همچنین برای ایجاد جواب مثبت از طریق PCR وجود حدود ۱۰cfu/۵۰ml از باکتری در نمونه غالبا کافی به نظر می‌رسد در حالی که در روش‌های کلینیکی همچون الایزا وکشت میکروبی که در حال حاضر در اکثریت آزمایشگاه‌های ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد، حساسیتی حدود ۸۵ درصد را دارا هستند که این حساسیت هم خود در اولین دوره شیردهی در هر دو روش به ترتیب ۲۵ درصد و ۳۵ درصد کاهش می‌یابد (۱۰).

همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در سال ۲۰۰۱ روش PCR کارایی بالایی برای ورم پستان استافیلوکوکوسی در مقایسه با کشت میکروبی داراست چرا که در بیشتر موارد میکروارگانیسم داخل سلولی مذکور به تعداد کافی در دسترس نمی‌باشد تا توسط کشت متداول باکتریایی جداسازی شود در حالی که PCR چنین محدودیتی ندارد و قابلیت تشخیص تعداد کم پاتوژن در نمونه را داراست(۱۱). در تحقیق حاضر علی‌رغم اینکه کارایی بالای روش PCR نسبت به کشت میکروبی و روش‌های دیگر جهت تشخیص و شناسایی مشخص شده است، ولیکن در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز مشکلاتی نیز وجود دارد که در سایر تحقیقات هم به نوعی شاهد آن بوده‌ایم، زمانی که میزان میکروارگانیسم در نمونه کمتر از ۱۰ cfu/ml باشد، اثبات حضور آن توسط این روش تشخیص مولکولی، می‌تواند بسیار مشکل باشد که این مسئله غالبا به از دست رفتن بسیاری ازاین ارگانیسم‌ها در نمونه در زمان سانتریفوژ مربوط می‌شود. به هر حال بایستی به این نکته توجه داشت که از نظر تئوری واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز توانایی تشخیص حتی یک ژنوم انفرادی را نیز در یک نمونه دارا است. لذا حساسیت بسیار بالایی برای این روش در مقایسه با دیگر روش‌های آزمایشگاهی قائل هستند. مخصوصا استفاده از این روش در مواردی که انجام روش‌های میکروب‌شناسی محدودیت‌های جدی دارد، برای بهبود تشخیص و شناسایی عامل بیماری کاربرد مهمی دارد.

در پایان بر اساس ضریب توافق بدست آمده می‌توان مطرح نمود که نتیجه حاصله (۰/۸۳) جوابی ایده آل می‌باشد. بنابراین می‌توان از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به جای روش مرسوم کشت استفاده نمود.

تشکر وقدردانی

بدین وسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر تقی زهرائی صالحی و جناب آقای دکتر سعید بکائی (اعضای هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) و جناب آقای دکتر وحید خلج (عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران) که در آغاز و انجام مراحل این آزمایش، از رهنمودهای خویش ما را بهره‌مند نمودند کمال سپاس را دارد. همچنین از آزمایشگاه دامپزشکی وت خانم دکتر شبنم شاملو و آزمایشگاه دامپزشکی پاستور (جناب آقای دکتر نریمان شیخی) که در انجام کشت میکروبی زحمات فراوانی را تحمل نمودند کمال تشکر را دارد. از زحمات پرسنل بخش بیوتکنولوژی و میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران به خصوص سرکار خانم دکتر ملیحه طالبی و سرکار خانم سمیه عنایتی قدردانی می‌نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Bergdoll, M. S. (1990) Staphylococcal food poisoning. In: Diver D.O. (Ed.), Foodborne Diseases. Academic Press, San Diego, USA. pp. 85-106.
2. Da Silva, E. R., Do Carom, L.S., Da Silva, N. (2005) Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Vet. Microbiol. 106: 103-107.
3. Cardoso, H.F.T., Silva, N., Sena, M.J., Carmo, L.S. (1999) Production of enterotoxins and toxic shock toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. Lett. Appl. Microbiol. 29: 347-349.
4. Fader, R. C., Hals, P. J., Koo, F. C. (1987) Staphylococcal toxins: screening of burn wound isolates and evidence for alpha-haemolysin production in the burn wound. Burns Incl. Therm. Inj. 13: 462-468.
5. Da Silva, E. R., Boechat, J. U. D., Dias Martins, J.C., Barbosa Ferreira, W. P., Pimenta Siqueira, A., Da Silva, N. (2004) Hemolysin production by *Staphylococcus* species isolated from mastitic goat milk. Small Rumin. Res. 55: 45-49.
6. Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C. H. (2001) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in North-east Switzerland. Vet. Microbiol. 78: 373-375.
7. Jorgensen, H.J., Mork, T., Hogasen, H.R., Rorvik, L.M. (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol. 99: 158-166.
8. Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B. (2005) Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* eterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes. 19: 299-305.
9. Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., Itoh, K. (2003) Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. J. Biosci. Bioeng. 96: 337-343.
10. Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W. M. (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J. Clin. Microbiol. 38: 1032-1035.
11. Robbins, R., Gould, S., Bergdoll, M. (1974) Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol. 28: 947-950.

www.SID.ir

Archive of SID

J.Vet.Res. 63,5: 321-326,2008

DETECTION AND ANTIBIOGRAM OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN NON PASTEURIZED MILK SAMPLES FROM TEHRAN PROVINCE RESTRICTS AND COMPARE TO BACTERIAL CULTURE

Ahari, H.[1], Shahbazzadeh, D.[2]*, Misaghi, A.[3], Pourshafie, M.[4]

[1]*Research and Development Section, Pars Nano Nasb Company and Member of Unversity of Tehran Since and Technokogy Fark.*

[2]*Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[4]*Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran -Iran.*

(Received 31 August 2007 , Accepted 28 February 2008)

Abstract:

Staphylococcus spp., is a common bacteria in cattle mastitis. Detection of the low number of bacteria requires a sensitive method. We used multiplex polymerase chain reaction (m-PCR) assay to detect the genes encoding SEA, SEB, SEC toxins, that are specific in *S. aureus* bacteria. The gene of 23S rRNA that is conserved in all *Staphylococcus spp*., also was used. Due to the stiffness and low effective enzyme activity such as lyzozyme, proteinase k, and mutilysine on bacterial cell wall, it was lysed with liquid nitrogen, and multiplex PCR was performed after DNA extraction. The obtained results in molecular method were compared with traditional cell culture. The total number of 48 samples of non pasteurized milk was collected in Tehran province restricts from dairy cattle housing, and 4 positive samples were detected by PCR and microbial cell culture methods. The result of antibiogram showed that Ciprofloxacin, Gentamycin and Rephampine are the best choice of antibiotic for treatment of *Staphylococcus spp*., mastitis infectious. The accuracy of the test was monitored by using O/N cell culture serial dilution (1 to 10^6) of *Staphylococcus spp*., bacteria (OD_{600}=0.02:10^7 cell). It showed that the sensitivity of PCR is 10 bacteria per ml of cells within few hours, meanwhile in bacterial blood agar cell culture; the number of 100 cells was detected after 48 hours. The result indicates that a molecular technique is more sensitive and rapid compared to traditional bacterial culture method.

Key words: *Staphylococcus aureus*, PCR, 23S rRNA, SEA, SEB, SEC.

***Corresponding author's email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir, Tel:021-66480780, Fax:021- 66933222**

www.SID.ir