طب نظامی
تابستان ۱۳۸۵ – سال ۸ (۲)
صفحات ۱۱۹-۱۲۸

جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های انتروتوکسوژنیک تایپ A به وسیله‌ی Multiplex PCR

بابک براتی M.Sc.[1*]، مجتبی سعادتی Ph.D.[2]، میرزاخلیل بهمنی Ph.D.[2]

*آدرس مکاتبه: *گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران.*

تاریخ اعلام وصول: ۸۵/۶/۲۸ *تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۵/۹/۲۰* *تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۵/۱۰/۱۹*

خلاصه

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس سموم پروتئینی و فاکتورهای بیماریزایی خارج سلولی مختلفی تولید می‌کند. یکی از مهمترین پروتئین‌های خارج سلولی، انتروتوکسین می‌باشد که عامل ایجاد مسمومیت غذایی به وسیله‌ی این گونه از باکتری است. این توکسین‌ها از دستگاه گوارش به دستگاه گردش خون وارد شده، سپس مرکز عصبی غیرارادی استفراغ را تحریک کرده، باعث ایجاد حالت تهوع، استفراغ، دل‌پیچه و اسهال می‌شود که می‌تواند باعث کم آب شدن بدن گردد. روش‌های مستقیم متعددی برای شناسایی انتروتوکسین‌ها وجود دارد (الایزا، روش‌های ایمنی اگلوتیناسیون لاتکس و ...)، اما با روش‌های تکثیر DNA [واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)] می‌توان حضور سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک را قبل از بیان انتروتوکسین و بر اساس توالی اختصاصی ژن نشان داد.

مواد و روش کار: در این مطالعه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه‌های بیماران، ناقلین سالم و محیطی با آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس نسبت به طراحی پرایمرهای مورد نظر اقدام و در واکنش PCR، ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A (sea) و ژن نوکلئاز استافیلوکوکی (nuc) تکثیر گردید. قطعات تکثیر یافته DNA برای ژن نوکلئاز استافیلوکوکی، ۲۷۹جفت باز و برای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A، ۵۵۲ جفت باز بود که توسط هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی در این واکنش مورد استفاده قرار گرفت که فاقد هرگونه محصول در واکنش PCR بود.

نتایج: در این تحقیق ۹۸ سویه مورد بررسی قرار گرفتند که ۸۹ سویه جداسازی شده با استفاده از واکنش Multiplex PCR به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفته، وجود ژن انتروتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. شش سویه (۶/۷۴٪) از استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، واجد ژن انتروتوکسین تایپ A بودند. نه سویه‌ی جداسازی شده (۹/۱۸٪) که در آزمایش‌های بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده بودند در بررسی مولکولی مورد تأیید واقع نشدند.

بحث: این روش سریع، حساس، اختصاصی، ارزان و متفاوت نسبت به سنجش‌های مرسوم بیوشیمیایی و سرولوژیکی بوده، قادر است عامل تولید کننده ی انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A را شناسایی نماید.

واژگان کلیدی: شناسایی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین تایپ A، Multiplex PCR.

۱- گروه علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع) e-mail: barati1987@yahoo.com
۲- گروه علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع)

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن فرصت طلب است که در شرایط مساعد قادر به ایجاد عفونت در انسان و حیوان می باشد. این در حالی است که این باکتری می‌تواند با ایجاد آلودگی در مواد غذایی سبب مسمومیت غذایی در افراد شود. استافیلوکوکوس اورئوس پروتئین‌های فراوانی ترشح می‌کند که در استقرار و بیماریزایی این باکتری در میزبان‌های پستاندار دخیل هستند [۱]. برخی از این سویه‌ها قادرند یک یا چند پروتئین ترشحی اضافی نیز ترشح کنند که شامل توکسین سندرم شوک توکسینی [(TSST-1) Toxic shock syndrome toxin 1] انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ)، توکسین اگزفولیاتیو (ETB, ETA) و لکوسیدین‌ها هستند. در این باکتری عوامل بیماریزای فراوانی وجود دارد اما آن چه که در مسمومیت غذایی مهم است انتروتوکسین تولید شده توسط این باکتری می‌باشد [۴-۲]. تحقیقات فراوانی در مورد انتروتوکسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده و تا کنون بیش از ۱۴ نوع انتروتوکسین مختلف که ساختمان و توالی نسبتاً یکسانی دارند، گزارش گردیده است [۷-۵].

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۹-۲۶ کیلودالتون هستند که به وسیله‌ی استافیلوکوک کواگولاز مثبت تولید می‌شوند [۳، ۵]. مهم ترین خصوصیات انتروتوکسین استافیلوکوکی، توانایی ایجاد استفراغ در پریمات‌ها، مقاومت به حرارت، هضم پپسین و خاصیت سوپرآنتی‌ژنیسیته است [۸]. مسمومیت با انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در انسان باعث افزایش بزاق دهان، تهوع، استفراغ و سپس دل‌پیچه و اسهال می‌شود که ممکن است با خون نیز همراه باشد [۲]. انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A، مهمترین انتروتوکسین تولید شده توسط استافیلوکوک کواگولاز مثبت است. این سم عامل اصلی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی در دنیا بوده و بیشترین مطالعات نیز در مورد آن انجام شده است؛ هر چند انتروتوکسین تایپ B نیز به علت قابلیت جذب از طریق استنشاق و کاربردهای بیوتروریستی مورد توجه محققین بوده است [۵، ۹].

محل قرار گرفتن ژن‌های انتروتوکسین‌ها متفاوت است. برخی همچون sej و sec1 درون پلاسمید [(Plasmid (pIB485] واقع شده‌اند، در حالی که sei, sem, sen و seo در کروموزوم و به صورت گروهی(Enterotoxin gene cluster) قرار گرفته‌اند. ژن sea در پروفاژ و ژن see در فاژهای ناقص واقع شده است و ژن‌های sek و sel در جزایر پاتوژنیسیت (Pathogenicity island) 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 [۵، ۱۰]. طول ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A برابر با ۷۷۴ جفت باز است که باعث تولید انتروتوکسین اولیه به طول ۲۵۷ اسیدآمینه می‌شود. انتروتوکسین تایپ Aی بالغ دارای ۲۳۳ اسیدآمینه است که ۲۷۱۰۰ دالتون وزن داشته، pH ایزوالکتریک آن ۷/۳ است [۱۳-۱۱].

روش‌های مختلفی از جمله لاتکس آگلاتیناسیون، الایزا، ایمونودیفیوژن و رادیوایمونواسی برای شناسایی سم این باکتری وجود دارد که در همه ی این روش‌ها نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان شدن ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی وجود دارد [۶، ۹، ۱۴]. روش‌های تشخیص مولکولی هم برای شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی استفاده می‌شوند که نه تنها نیازی به فراهم شدن این شرایط ندارند، بلکه قادر به شناسایی استافیلوکوک‌هایی که سم را به میزان کم ترشح نموده‌اند نیز می‌باشند که در روش‌های ایمنولوژیکی نمی‌توان آنها را شناسایی نمود. لذا نسبت به استفاده از روش‌های ایمونولوژیکی، استفاده از تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR و Multiplex PCR برای یافتن باکتری دارای ژن کدکننده‌ی سم مناسب‌تر است [۹، ۱۵، ۱۶]. هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و شناسایی سویه‌های واجد ژن کدکننده ی انتروتوکسین تایپ A به وسیله PCR بود.

مواد و روش کار

آنزیم Taq DNA Polymerase، آنزیم‌های با اثر محدود و مارکر 100 bp DNA ladder از شرکت Fermentase، Tris-base، EDTA، dNTP، MgCl2، RNAse، اتیدیوم بروماید و لیزوزیم از شرکت سیناژن تهیه شد؛ باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC=25923)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس [(SLIR) standard laboratory of Iran] و استرپتوکوکوس پیوژنز (SLIR) نیز از آزمایشگاه استاندارد ایران تهیه شدند. میکروکوکوس لوتئوس (ATCC=9341)، باسیلوس پلی‌میگسا [ATCC= 10401, NCIB (National collection of 8094 (ATCC= 11778 ،باسیلوس سرئوس ،(industrial bacteria) = (NCTC=10320)، سالمونلا پاراتیفی A (NCTC=5702)،

Archive of SID
www.SID.ir

یرسینیا سودوتوبرکلوزیس (PCTC=1070) و پروتئوس ولگاریس سویه‌ی ox19 (ATCC=6380)، نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

باکتری‌های مورد استفاده

با استفاده از سوآپ استریل، از باکتری‌های استقرار یافته در مخاط بینی افراد (ناقلین سالم)، محیط پیرامون (محل‌های نظیر میزکار، صندلی، نوشت افزارها، درهای ورودی ساختمان، دیوارها و اشیای پیرامون) و بیماران نمونه برداری شد. سوآپ نمونه برداری شده درون محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت داده شده، سپس به وسیله‌ی آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژی باکتریها تعیین هویت گردیدند.

پرایمرهای مورد استفاده

با استفاده از توالی ژن‌های nuc و sea در بانک‌های ژنی، نسبت به طراحی دو جفت پرایمر برای ژن‌های آنزیم دزوکسی‌ریبونوکلئاز (nuc)، که شاخصی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس نیز می‌باشد و انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A (sea) اقدام گردید. پس از انتخاب پرایمرهای مورد نظر، وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات آنها به وسیله‌ی نرم‌افزارهای مولکولی (DNASIS, BLAST, Oligo) مورد بررسی قرار گرفت. 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 واقع شد. پرایمرها عبارت بودند از:

NucF: 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3'
NucR: 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'

SeaF: 5' TTGCGTAAAAAGTCTGAATT-3'
SeaR: 5' ATTAACCGAAGGTTCTGTAGA-3'

تخلیص ژنوم

پس از کشت باکتری، نسبت به تخلیص ژنوم آن اقدام گردید. تخلیص بر اساس روش Sambrook و همکاران انجام شد و ژنوم‌های تخلیص شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNAی ژنومی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. برای اندازه گیری غلظت DNA نیز از دستگاه UV spectrophotometer و جذبهای ۲۶۰nm و ۲۸۰ nm استفاده گردید.

واکنش Multiplex PCR

واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. در این واکنش، ۱ میکرولیتر از DNAی 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 تری‌فسفات (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ x) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار) با یکدیگر مخلوط شده، حجم نهایی با آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در ۳۲ سیکل مطابق جدول ۱ انجام گردید. جهت بررسی محصول واکنش، ۵ میکرولیتر از آن جهت الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و مورد ارزیابی قرار گرفت.

تأیید محصولات واکنش

جهت تأیید محصولات به دست آمده در واکنش فوق، از آنزیم با اثر محدود TaqI و تعیین توالی استفاده شد. قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز محصول PCR را با آنزیم TaqI برش داده، حاصل هضم آنزیمی درون ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از قطعه تکثیر شده توسط کیت تخلیص PCR، محصول شرکت Fermentas, تخلیص شد و فرآیند تعیین توالی توسط شرکت Macro Gen انجام گرفت.

تعیین میزان ویژگی و حساسیت واکنش PCR

برای تعیین ویژگی، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده ی۱۰ باکتری شامل سویه‌های میکروکوکوس لوتئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، باسیلوس سرئوس، باسیلوس پلی‌میگسا، سالمونلا پاراتیفی A، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، اشرشیاکلی، پروتئوس ولگاریس و سویه‌های دیگر استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

میزان حساسیت واکنش طراحی شده هم بر اساس میزان ژنوم تخلیص شده و نیز تعداد باکتری محاسبه گردید. برای این منظور ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط بافر TE (pH=8) در رقت‌های۲۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۲۵۰، ۲۵، ۲/۵ و ۰/۲۵ پیکوگرم تهیه گردید و در تمامی رقت‌ها واکنشPCR انجام شد و محصول واکنش توسط ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. پس از شمارش باکتری، نسبت به تهیه رقت‌های مورد نظر اقدام و سپس برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: نحوه اجرای واکنش Multiplex PCR.

ردیف	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل‌ها
۱	دناتوره کردن اولیه	۹٤ درجه	۵ دقیقه	۱ سیکل
	دناتوره کردن	۹٤ درجه	۱ دقیقه	
۲	اتصال	۵۵ درجه	۱ دقیقه	۳۰ سیکل
	تکثیر	۷۲ درجه	۱ دقیقه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه	٥ دقیقه	۱ سیکل

نتایج

در بررسی ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۳ نفر مورد آزمایش واقع شدند که ۵۸/۱۴ درصد از آنها ناقل استافیلوکوکوس و ۱۶/۲۸ درصد، ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شدند. نتایج واکنش Multiplex PCR از ژنوم این باکتری‌ها نشان داد که هیچ یک دارای ژن انتروتوکسین تایپ A نبودند.

در آزمایش جداسازی باکتری از محیط، ۵۶ محل مورد آزمایش واقع شد که در ۶۲/۵ درصد موارد، استافیلوکوکوس و در ۲۳/۲۱ درصد نیز سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس از محیط پیرامون جداسازی و شناسایی شدند. در بررسی مولکولی ژنوم این سویه‌ها مشخص گردید که تنها سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس Im_{12} (جداسازی شده از ایستگاه مترو) دارای ژن کد کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A می‌باشد، یعنی در ۱/۷۹ درصد از موارد نمونه‌برداری، استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ A جداسازی گردید.

تعداد ۷۰ سویه باکتری تحت عنوان استافیلوکوکوس اورئوس، جداسازی شده از بیماران بیمارستان‌های ۱۵ خرداد، فیروزآبادی و پلی‌کلینیک شهید سلیمانی و همچنین آزمایشگاه‌های مختلف تشخیص طبی تهیه شد. پس از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی ۸۷/۱۴ درصد (۶۱ سویه) از باکتری‌های جداسازی شده به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس، شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج آزمایش Multiplex PCR نشان داد که ۸/۱۹ درصد (۵ سویه) از آنها، استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن کد کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A بودند. باکتری‌های جدا شده از بیمارستان‌ها، پلی‌کلینیک و آزمایشگاه‌ها هر یک منشأ عفونی متفاوتی داشتند. منشأ باکتری‌های جدا شده از بیماران به همراه تعداد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از آنها و همچنین تعداد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ A در جدول ۲ نشان داده شده است.

تعداد ۸ سویه استافیلوکوکوس اورئوس نیز از مراکز مختلف دانشگاهی و تحقیقاتی همچون دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دانشگاه تربیت مدرس و آزمایشگاه رفرانس ایران تهیه گردید که فاقد ژن کد کننده انتروتوکسین تایپ A بودند. نتایج به دست آمده در جدول ۳ گزارش شده است.

برای جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ A، واکنش Multiplex PCR با دو جفت پرایمر ویژه‌ی ژن‌های nuc و sea انجام شد که وجود قطعه‌ی ۲۷۹ جفت باز مربوط به تکثیر بخشی از ژن nuc، نشان دهنده‌ی وجود این ژن در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود که از این طریق نسبت به شناسایی آن اقدام گردید (شکل۱ ستونهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱). وجود قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز نیز مربوط به تکثیر بخشی از ژن sea بود که وجود ژن کد کننده ی انتروتوکسین تایپ A را تأیید می‌نمود (شکل ۱ ستون ۷).

پس از اتمام واکنش Multiplex PCR با محصول ژنومی باکتری‌های مورد نظر، محصول واکنش در ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شد. همان گونه که در شکل ۱ نیز نشان داده شده است، تمامی باکتری‌های مورد استفاده، به استثنای باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که در ستون شماره ۵ قرار داده شده بود، در این واکنش یک قطعه‌ی ۲۷۹ جفت باز ایجاد کردند. این قطعه نشان دهنده وجود ژن nuc است که ویژه‌ی گونه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس بوده، در سایر باکتری‌ها وجود ندارد. نمونه‌هایی که در ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ قرار داشتند در تشخیص مولکولی به عنوان گونه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند. در این تحقیق، باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت که فاقد قطعه‌ی ۲۷۹ جفت باز بود (شکل ۱، ستون ۵).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: منشأ سویه‌های S. aureus جداسازی شده از بیماران و سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A.

ردیف	منشأ باکتری‌های جدا شده از بیماران	تعداد سویه‌های S. aureus	درصد	تعداد سویه‌های تولید کننده ی انتروتوکسین تایپ A
۱	عفونت ادرار	۳۸	۶۲٪	٤
۲	عفونت خون	۷	۱۱٪	۰
۳	ترشحات عفونی زخم	٦	۱۰٪	۱
٤	عفونت گوش	٤	۷٪	۰
٥	ترشحات عفونی پستان	٤	۷٪	۰
٦	عفونت بینی	۲	۳٪	۰
	مجموع	٦۱	۱۰۰٪	٥

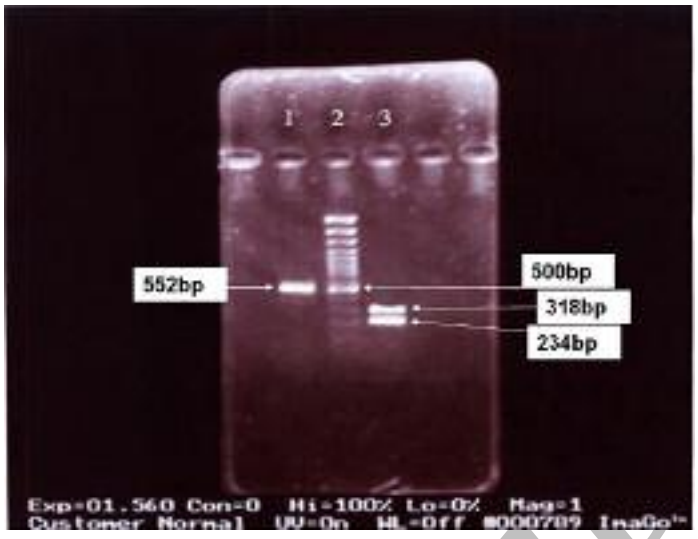
جدول ۳: محل‌های جداسازی باکتری S. aureus و سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A.

ردیف	محل جداسازی باکتری	تعداد سویه‌های S. aureus	تعداد سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A	توضیحات
۱	ناقلین سالم باکتری	۷	۰	تهیه شده از بینی افراد
۲	محیط اطراف	۱۳	۱	تهیه شده از اشیای پیرامون
۳	بیمارستان ۱۵ خرداد	۲۱	۲	نمونه‌های مختلف بیماران
٤	بیمارستان فیروزآبادی	۱٤	۱	نمونه‌های مختلف بیماران
٥	پلی‌کلینیک شهید سلیمانی	۱۰	۰	نمونه‌های مختلف بیماران
٦	آزمایشگاه‌های تشخیص طبی	۱٦	۲	نمونه‌های مختلف بیماران
۷	متفرقه	۸	۰	تهیه شده از مراکز مختلف
	مجموع	۸۹	۶	

شماره۱: **S. aureus B190** (ازکشت خون بیمار بیمارستان ۱۵ خرداد)
شماره۲: **S. aureus C23** (ازکشت ادرار بیمار بیمارستان ۱۵ خرداد)
شماره۳: **S. aureus B1** (ازکشت ادرار بیمار بیمارستان ۱۵ خرداد)
شماره٤: **S. aureus D67** (ازترشحات پستان بیمار کلینیک شهید سلیمانی)
شماره٥: **Staphylococcus epidermidis**
شماره٦: نشانگر وزن مولکولی **۱۰۰bp**
شماره۷: **S. aureus Px2** (ازکشت ادراربیمار بیمارستان فیروزآبادی)
شماره۸: **S. aureus E1** (جداسازی شده از بینی افراد سالم)
شماره۹: **S. aureus M12** (جداسازی شده از ایستگاه مترو)
شماره۱۰: **Staphylococcus aureus (ATCC=25923)**
شماره۱۱: **S. aureus Z95** (تهیه شده از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران)

شکل ۱: نتیجه الکتروفورز واکنش Multiplex PCR با دو جفت پرایمر ویژه‌ی ژن‌های nuc و sea جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ A از ژنوم باکتری‌ها در ژل آگارز یک درصد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: محصول واکنش PCR تحت تأثیر آنزیم TaqI ایجاد دو قطعه ی ۳۱۸ و ۲۳۴ جفت بازی نمود.
شماره ۱: محصولPCR sea
شماره ۲: نشانگر ۱۰۰ bp
شماره ۳: محصول برش خورده به دو قطعه‌ی ۳۱۸bp و ۲۳۴ bp

نتایج بهینه سازی میزان غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR نشان داد که غلظت ۰/۴ پیکومول برای پرایمرها، ۰/۲ میلی مولار برای dNTP و ۲ میلی مولار برای $MgCl_2$ بهترین میزان برای ایجاد قطعه‌ی مناسب در واکنش PCR طراحی شده بود. بررسی‌های انجام شده با برنامه‌های رایانه‌ای بر روی توالی ژن sea از بانک ژنی نشان داد که آنزیم TaqI قطعه‌ی مابین دو پرایمر طراحی شده را در محل باز ۳۱۸ برش می‌دهد و دو قطعه‌ی ۳۱۸ و ۲۳۴ جفت باز ایجاد می‌شود. محصول واکنش PCR نیز تحت تأثیر آنزیم TaqI قرار داده شد، سپس اقدام به الکتروفورز با آگارز یک درصد گردید. وجود دو قطعه‌ی ۳۱۸ و ۲۳۴ جفت باز، تأییدکننده‌ی محصول واکنش بود. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است در ستون ۱، محصول PCR ایجاد قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز نموده و پس از برش با آنزیم TaqI در ستون ۳ دو قطعه‌ی ۳۱۸ و ۲۳۴ جفت باز قابل مشاهده است. علاوه بر برش آنزیمی، نسبت به تعیین توالی قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز تکثیر یافته نیز اقدام گردید. نتایج تعیین توالی قطعه‌ی تکثیر شده که توسط شرکت Macro Gen انجام گرفت نیز با توالی ژن sea به طور کامل همخوانی داشت و صحت وجود ژن sea در سویه‌های شناسایی شده به طور قطعی تأیید گردید.

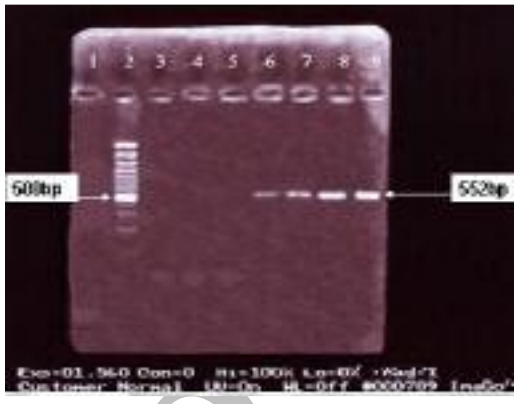
ویژگی و حساسیت واکنش

با رقت‌های ساخته شده برای ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن کد کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A، واکنش PCR انجام گرفت و محصول واکنش درون ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. حد تشخیص واکنش برای DNAی ژنومی باکتری، ۲۵۰ پیکوگرم تعیین گردید.

به منظور شناسایی باکتری مورد نظر، پس از کشت و شمارش آن نسبت به تهیه رقت از باکتری اقدام گردید. از رقت‌های تهیه شده (۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۰ و۳۰ سلول در میکرولیتر) باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که دارای ژن کد کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A بود، واکنش PCR صورت گرفت که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است.

همان گونه که در شکل ۳ مشخص است، واکنش PCR برای رقت‌های۲۵۰ سلول و بیشتر از آن به خوبی قابل تشخیص بود و محصول واکنش PCR آنها در ژل آگارز ۱ درصد ایجاد قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز نمود (ستون‌های ۶، ۷، ۸ و ۹). این در حالی بود که برای رقت کمتر از۲۵۰ سلول باکتری، در واکنش PCR هیچ گونه قطعه‌ای مشاهده نشد (ستون‌های ۳، ۴ و ۵). لذا حد تشخیص این روش با استفاده از نمونه‌های مستقیم حدود ۲۵۰ سلول تعیین گردید (شکل ۳).

Archive of SID
www.SID.ir

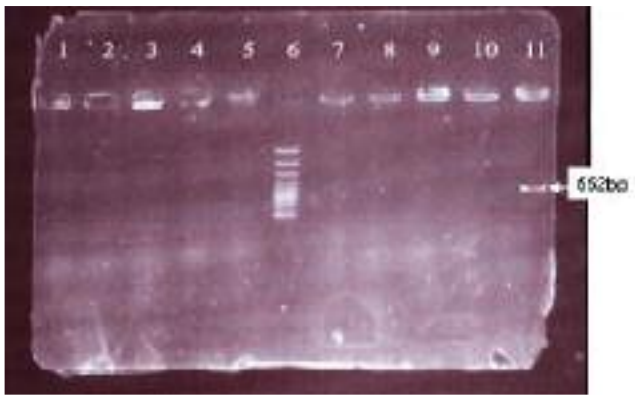


شماره ۲: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp
شماره۳: استفاده از ۳۰ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ٤: استفاده از ٦۰ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ٥: استفاده از ۱۲٥ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ٦: استفاده از ۲٥۰ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ۷: استفاده از ٥۰۰ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ۸ : استفاده از ۱۰۰۰سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR
شماره ۹ : استفاده از ۲۰۰۰ سلول باکتری به عنوان الگو در واکنش PCR

شکل۳: نتایج PCR با تعداد متفاوت سلول در نمونه‌های مستقیم.

برای نشان دادن میزان ویژگی، DNAی ژنومی۱۰ گونه‌ی باکتریایی که در قسمت مواد و روش‌ها مشخص شده است برای واکنش PCR با جفت پرایمر اختصاصی انتروتوکسین تایپ A در نظر گرفته شد. در شرایط بهینه شده واکنش انجام گرفت که نتیجه آن در شکل ۴ نشان داده شده است.

در این بررسی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC=25923) در ستون ۱، میکروکوکوس لوتئوس (ATCC=9341) در ستون ۲، استرپتوکوکوس پیوژنز (SLIR) در ستون ۳، باسیلوس سرئوس(ATCC=11778, NCTC=10320) درستون۴، باسیلوس پلی‌میگسا (ATCC=10401,NCIB=8094) در ستون ٥، سالمونلا پاراتیفی A (NCTC=5702) در ستون ۷، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس (PCTC=1070) در ستون ۸، اشریشیا کلی O111 (SLIR) در ستون ۹، پروتئوس ولگاریس سویه ox19 (ATCC=6380) درستون ۱۰ و استافیلوکوکوس اورئوسPx2 (جداسازی شده ازکشت ادرار بیمارستان فیروزآبادی) در ستون ۱۱ استفاده گردید که مورد آزمایش PCR با جفت پرایمر ویژه‌ی انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A قرار گرفته بود. تنها سویه‌ی Px2 استافیلوکوکوس اورئوس قطعه‌ی ۵۵۲ جفت باز را ایجاد نمود (شکل ۴، ستون ۱۱). از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp نیز در ستون ۶ استفاده گردید.



شماره ۱: *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC=25923
شماره۲ : میکروکوکوس *لوتئوس* ATCC=9341
شماره۳ : *استرپتوکوکوس پیوژنز* (آزمایشگاه رفرانس)
شماره٤ : *باسیلوس سرئوس* NCTC=10320. ATCC= 11778
شماره٥ : *باسیلوس پلی میکسا* NCIB = 8094 ، ATCC= 10401
شماره٦: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp
شماره۷: *سالمونلا پاراتیفی*A NCTC=5702
شماره۸:یرسینیا سودوتوبرکلوزیس PCTC=1070 ، RI=273
شماره ۹ :*اشریشیا کلی O111* (آزمایشگاه رفرانس)
شماره۱۰: *پروتئوس ولگاریس* سویه ی ox19 ATCC=6380
شماره ۱۱:*استافیلوکوکوس اورئوس*Px2 (جداسازی شده ازکشت ادرار بیماران بیمارستان فیروزآبادی)

شکل٤: تصویر ژل الکتروفورز از PCR با پرایمرهای SeaF / SeaR در ۱۰ گونه باکتری.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید پروتئین‌های مختلفی است. یکی از این پروتئین‌ها انتروتوکسین می‌باشد که می‌تواند ایجاد مسمومیت غذایی در افراد نماید. بیشترین مطالعه و توجه محققین به انتروتوکسین‌های تایپ A و B بوده است. چرا که در بین سروتایپ‌های استافیلوکوکی، بیشترین گاستروانتریت توسط این دو تایپ ایجاد شده است. شیوع مسمومیت با انتروتوکسین تایپ A بیشتر از سایر سروتایپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی است، لذا اهمیت آن نیز بیشتر از دیگر سروتایپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی است [۱۷، ۱۸]. هر چند انتروتوکسین تایپ B نیز به دلیل احتمال انتقال آن از طریق تنفس (علاوه بر انتقال از طریق گوارش) در درجه‌ی بالایی از اهمیت قرار دارد [۲، ۱۹].

روش‌های استاندارد سنجش‌های ایمونولوژیکی از روش‌های مهم در تشخیص و شناسایی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های غذایی است اما این تست‌ها خالی از اشکال نیست؛ نکته‌ی مهم در تمامی این تست‌ها، علاوه بر صرف زمان جهت ایجاد شرایط مناسب برای تولید توکسین توسط باکتری و وجود واکنشهای متقاطع، امکان ایجاد پاسخ‌های کاذب است [۱۴، ۲۰]. در تشخیص به روش PCR که بر اساس شناسایی ژن تولید کننده‌ی سم استوار است، می‌توان قبل از تولید سم نسبت به شناسایی باکتری و تایپ نمودن آن اقدام نمود [۲۱]. این روش علاوه بر سرعت در تشخیص، دارای حساسیت و ویژگی بالایی است. لذا اخیراً محققین از روش‌های PCR و Multiplex PCR جهت شناسایی اقدام نموده‌اند [۲۵-۲۲].

Klotz و همکاران در ماربورگ آلمان در سال ۲۰۰۳ سویه‌های جداسازی شده از مدفوع بیماران بیمارستان‌ها را در طول ۵ ماه مورد آزمایش قرار دادند و با کمک تکنیک Multiplex PCR مشخص نمودند که ۴۴ سویه از ۹۳ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده (۴۷/۳۱ درصد) دارای ژن‌های کد کننده‌ی انتروتوکسین‌های مختلف بودند؛ ۱۲ سویه (۱۲/۹ درصد) دارای ژن sea، ۹ سویه (۹/۶۸ درصد) دارای ژن seb، ۲۰ سویه (۲۱/۵۱ درصد) دارای ژن sec و ۱۳ سویه (۱۳/۹۸ درصد) دارای ژن sed بودند [۲۶]. در کشور ترکیه، Bystron و همکاران در سال ۲۰۰۵ تعداد ۶۵ نمونه از غذاهای تهیه شده از مرغ‌های نیم پخت را به وسیله تکنیک Multiplex PCR جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین مورد آزمایش قرار دادند و ۱۱ سویه از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک را شناسایی و جداسازی نمودند [۱۷]. در جمهوری اسلواکی، Beata Holeckova و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی نمونه‌های غذایی مختلف (سوسیس و انواع سوپ‌های رشته‌ای) تعداد ۴۳ سویه‌ی 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٪) دارای ژن کد کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A بودند. در این تحقیق، از سوآپ تهیه شده از بینی و گلوی تولید کنندگان پنیر گوسفندی، ۱۹ سویه ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد که یکی از این سویه‌ها (۵/۲۶ درصد) دارای ژن sea بود [۱۸]. Beata Holeckova و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی نمونه‌های شیر (شیرهایی که بیش از ۱۰۰۰ باکتری در یک میلی‌لیتر داشتند) تعداد ۴۶ سویه ی استافیلوکوکوس اورئوس را جداسازی نمودند که در بررسی مولکولی ژنومی مشخص شد که ۶ سویه (۱۳/۰۴ درصد) از آنها دارای ژن تولید کننده‌ی انتروتوکسین تایپ A بودند. این محققین با ارزیابی نمونه‌های شیری که باکتری‌های دارای ژن sea داشتند، توانستند وجود توکسین استافیلوکوکوس اورئوس تایپ A را نیز نشان دهند [۲۷]. در این تحقیق تعداد ۸۹ سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس از منابع مختلفی همچون بیماران، ناقلین سالم و محیط پیرامون جداسازی شدند که با انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. از سوآپ بینی ۴۳ نفر مورد آزمایش، تعداد ۲۵ سویه از جنس استافیلوکوکوس جداسازی گردید که ۷ سویه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. بدین معنی که ۵۸/۱۴ درصد از افراد، حامل استافیلوکوکوس بودند و ۱۶/۲۸ درصد آنها ناقلین سالم استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شدند و هیچ یک دارای ژن sea نبودند. به طور کل، از ۸۹ سویه‌ی جداسازی شده تنها ۶ سویه دارای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی تایپ A بودند، یعنی ۶/۷۴ درصد از استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداسازی و شناسایی شده، که این مقدار تقریباً نصف فراوانی به دست آمده در تحقیق Beata Holeckova و همکاران در سال ۲۰۰۲ است [۲۷]. علت عمده‌ی تفاوت در فراوانی سویه‌های انتروتوکسوژنیک تایپ A در این تحقیق با سایر مطالعات و همچنین تفاوت این فراوانی‌ها در گزارشهای مختلف، منشأ جداسازی باکتری است. میزان فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسوژنیک تایپ A بر حسب این که منشأ باکتری، حیوان، انسان، عفونت‌ها،

Archive of SID
www.SID.ir

غذا و یا محیط باشد متفاوت است [۱۵، ۱۶] که البته در هر یک از موارد نیز تفاوتهای وجود دارد؛ به طوری که این میزان در انواع غذاها و عفونتهای گوناگون، متفاوت است. این امر در گزارشهای محققان قابل مشاهده است [۲۸، ۲۹].

در بسیاری از تحقیقات انجام شده، از روش‌های مختلف PCR جهت شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در مواد غذایی مختلف استفاده شده، واکنش بهینه گردیده است تا حساسیت واکنش در نمونه‌های غذایی مختلف به بالاترین سطح ممکن برسد. به طور مثال برای شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی انتروتوکسین استافیلوکوکی در شیر خشک، میزان حساسیت را ۱۰۰۰ باکتری تعیین کردند [۲۷، ۳۰]. این در حالی است که حساسیت به دست آمده در این تحقیق برابر ۲۵۰ باکتری است. علت حساسیت نسبتاً خوب این تحقیق در استفاده کردن از باکتری در محیط بافری است؛ اما چنانچه باکتری در مواد غذایی مورد آزمایش قرار گیرد (به طور مثال شیر خشک) به علت وجود مواد ممانعت کننده در ماده غذایی میزان حساسیت ممکن است کمتر باشد [۳۱].

تعدادی از سویه‌های جداسازی شده از بیماران در آزمایشگاه‌های بیمارستانی با آزمایش‌های بیوشیمیایی (به ویژه DNase) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده بود که در این تحقیق و در بررسی مولکولی فاقد ژن nuc (ژن کدکننده‌ی دزوکسی ریبونوکلئاز مقاوم به حرارت) تشخیص داده شد. در آزمایش بیوشیمیایی DNase که حضور آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز در باکتری بررسی می‌شود، قدرت مقاومت به حرارت آنزیم مورد ارزیابی قرار نمی‌گیرد؛ لذا، وجود نوکلئازهای دیگر در باکتری می‌تواند باعث نتیجه‌ی مثبت کاذب در آزمایش شود. برای جلوگیری از چنین اشتباهی، استفاده از سایر آزمایش‌های بیوشیمیایی به ویژه کوآگولاز، فسفاتاز و تخمیر مانیتول و گلوکز در شرایط بی هوازی لازم است؛ البته بهترین و مطمئن ترین راه شناسایی، تشخیص مولکولی باکتری و استفاده از تکنیک PCR است [۳۲] که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

از مزایای غیر قابل انکار این تحقیق، شناسایی عاملین بالقوه‌ی مسمومیت غذایی استافیلوکوکی تایپ A، حتی قبل از ایجاد توکسین است. با شناسایی ناقلین سالم و کانون‌های آلودگی به ویژه در مراکز تهیه مواد غذایی، می‌توان مانع بروز مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی شد. با استفاده از این روش می‌توان کانون‌های خطر را شناسایی نمود و از بروز مسمومیت احتمالی جلوگیری به عمل آورد؛ ارزش انجام این آزمایش در این موارد بهتر نمایان می‌شود. در روش‌های شناسایی توکسین، تنها پس از تولید توکسین می‌توان آن را شناسایی نمود که در اکثر موارد پس از بروز مسمومیت و برای جستجوی غذای آلوده کاربرد دارد؛ اما با انجام PCR و شناسایی عامل و تعیین تایپ آن ضمن داشتن توانایی فوق، می‌توان شرایطی را فراهم نمود که احتمال آلودگی به پایین‌ترین سطح ممکن برسد.

منابع

1- Martin M, Dinges Paul, Orwin M and Patrick Schlievert (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus Clin Microbiol Rev. January; 13(1): 16–34

2- Balaban N and Rasooly A (2000). Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 61: 1-10.

3- Dinges MM, Orwin PM and Schlievert PM (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Rev. 13: 16-34.

4- Lowy FD (1998). Staphylococcus aureus infection.. N Engl J Med. 339: 520-532

5- Loir YL, Baron F and Gautier M (2003). Review Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research. 2 : 63-76

6- Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutierrez JA, Bohach GA and Schlievert P M (2003). Characterization of Staphylococcus aureus Enterotoxin L. *Infect. Immun.* 71: 2916-2919

7- Rosec JP and Gigaud O (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. Int. J. Food Microbiol. 77: 61-70.

8- Hawryluk T and Hirshfield I (2002). A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. J. Food Prot. Jul; 65 (7): 1183-7.

9- Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS and Bergdoll MS (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food Microbiol. 7: 311-316.

10- Iandolo JJ (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of Staphylococcus aureus. Annu. Rev. Microbiol. 43:375-402

Archive of SID
www.SID.ir

11- Betley MJ and Mekalanos JJ (1988). Nucleotide sequence of the type A staphylococcal entorotoxin gene. J. Bacteriol. 170: 34-41.

12- Huang IY, Hughes JL, Bergdoll MS and Schantz EJ (1987). Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. J. Biol. Chem. 262: 7006-7013

13- Schad E M, Zaitseva I, Zaitsev V N, Dohlsten M, Kalland T, Schlievert PM, Ohlendorf DH and Svensson LA (1995). Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. EMBO J. 14:3292-3301

14- Park CE, Akhtar M and Rayman MK (1992). Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl Environ Microbiol. August; 58(8): 2509–2512.

15- 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 enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol Cell Probes. 19:299-305

16- Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Ruiz Olvera P and de la Garza LM (2003). Development of two Multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of Staphylococcus aureus isolated from foods. J Food Prot. 66:1055-62.

17- Bystron J, Molenda J, Bania J and Czerw M (2005). Occurrence of enterotoxigenic strains of Staphylococcus aureus in raw poultry meat. Polish Journal of Veterinary Sciences . 8 : 37-40

18- Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Gondol J and Grolmus J (2002) . Occurrence of enterotoxinic Staphylococcus aureus in food . Ann Agric Environ Med 9 :179–182

19- Rutthrobbins B (1974). Detecting the entrotoxigenicity of Staphylococcal. Appl Microbiol., Dec: 946-50

20- Park CE, Akhtar M and Rayman MK (1993). Simple Solutions to False-Positive Staphylococcal Enterotoxin Assays with Seafood Tested with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA) . Applied and Environmental Microbiology. July . 2210-2213

21- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR and Rozee KR (1991). Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in Staphylococcus aureus by the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 29: 426-430

22- Cortez AL, Carvalho AC, Ikuno AA, Burger KP, Vidal-Martins AM (2006) Identification of Salmonella spp. isolates from chicken abattoirs by Multiplex-PCR. Res Vet Sci. May 13.

23- Garcia AB, Blesa S, Martinez-Hervas S, Mansego ML, Gonzalez-Albert V, Ascaso JF, Carmena R, Real JT and Chaves FJ (2006). Semiquantitative Multiplex PCR: a useful tool for large rearrangement screening and characterization. Hum Mutat. Jun 21.

24- Letertre C, Perelle S, Dilasser F and Fach P (2003). A strategy based on 5' nuclease Multiplex PCR to detect enterotoxin genes sea to sej of Staphylococcus aureus. Mol Cell Probes. 17:227-35

25- Ruzickova V, Voller J, Pantucek R, Petras P and Doskar J (2005). Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in Staphylococcus aureus. Folia Microbiol (Praha).; 50(6):499-502

26- Klotz M, Opper S, Heeg K and Zimmermann S (2003). Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4683-4687

27- Holeckova B, Kalinacova V, Gondol J, Fotta M and Holoda E (2004) . Production of enterotoxins by Staphylococcus aureus isolated from sheep milk. Bull. Vet. Inst. 48 : 41-45

28- Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F (2004). 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. 97:719-30.

29- Loncarevic S, Jorgensen HJ, Lovseth A, Mathisen T and Rorvik LM (2005). Diversity of Staphylococcus aureus enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. J Appl Microbiol. 98:344-50.

30- Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A and Shinagawa K (2003). Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (Suncus murinus). *Infect. Immun.* 71: 567-570

31- Hiroshi F, Satoshi M (2006). Modeling Staphylococcus aureus growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology. 23 (5): 260–267

32- Jacek B, Anna D, Jarosaaw B (2006). Distribution of newly described enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus from food. Inter J Food Microbiology. 108 : 36 – 41

Archive of SID

www.SID.ir