مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۲، آذر ۱۳۹۵، صفحه ۳۲-۲۶

شناسایی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده Multiplex PCR

المیرا ولی‌زاده (MSc)[۱]، کیومرث امینی (PhD)[۲*]

۱-دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۵/۲/۲۷، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی در جهان می باشد. در تحقیقات مختلف مشخص گردیده است که ۱۸-۱۵ درصد سویه های استافیلوکوکوس که از منابع مختلف جدا می شود قادر به تولید انتروتوکسین می باشند که فاکتور اصلی مسمومیت می باشند. هدف از تحقیق حاضر شناسایی ژنهای انتروتوکسین نظیر: (femA، see ،sed ،sec ،seg،seb ،sea) در استافیلوکوکوس اورئوس که با استفاده از روش PCR چندگانه ای تایید شدند، می باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از عفونتهای چرکی ترشح‌دار، پوستی و دارای علائم مسمومیت: اسهال و استفراغ در انسان، تولید انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج ژنومی سویه های ایزوله شده واکنش PCR چندگانه ای برای ژن‌های انتروتوکسین به کمک پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۵۰٪ استافیلوکوکوس اورئوس جداشده حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین بودند. فراوانترین ژن sea (۳۰٪) بود و به دنبال آن به ترتیب sed (۱۰٪)، see (۸/۳٪)، sec (۱/۶٪)، شناسایی شدند.

نتیجه گیری: مشخص شد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده انتروتوکسین با توجه به اینکه در ایجاد حدّت بیماری علاوه بر ژن های فوق، سایر ژن های دیگر نظیر TSST-1 دخالت دارند. به طور کلی حضور استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی انسانی، بویژه سویه‌های انتروتوکسیژنیک، می تواند یک خطر بالقوه برای سلامتی محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن انتروتوکسین، واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه، مسمومیت غذایی.

مقدمه

در طول دهه گذشته وقوع بیماری‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است (۱). در این ارتباط، گزارشهای متعددی از بیماری‌های ناشی از مواد غذایی آلوده به پاتوژن‌های غذایی وجود دارد که شامل عفونت ها و مسمویت های باکتریایی غذایی ناشی از سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس، شیگلا، لیستریا مونو سیتوژنز می باشد، که در بین باکتری های پاتوژن غذایی، استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت بسزایی بر خوردار است (۲). طبق گزارش Casman و همکاران در سال ۱۹۶۷ میزان تنوع در قدرت انتروتوکسین زایی سویه‌های استافیلوکوکی جدا شده از منابع کلینیکی حدود ۴۷ درصد و در مورد سویه های غیر کلینیکی حدود ۳۱ درصد گزارش گردید(۳). جنس استافیلوکوکوک متعلق به خانواده میکروکوکاسه بوده و گرم مثبت، غیرمتحرک، فاقد اسپور وهوازی بی هوازی اختیاری است. چهار گونه مهم از نظر بالینی: استافیلوکوک اورئوس (طلایی)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک ساپروفتیکوس و استافیلوکوک لوگدونسیس(۴). در این جنس عامل مسمومیت‌های غذایی، زخم‌های پوستی، دمل و برخی سبب عفونت‌های بیمارستانی بسیار خطرناک و گاهاً مقاوم به درمان وجود دارد (۶و۵). انتروتوکسین های استافیلوکوکی شامل، انواع: R, Q, P, O, N, M, L,K, J, I, H, G, E, D, C, B, A و ژن های مرتبط با آنها (ser،seq ،sep ،seo ،sen ،sem، sel،sek ،sej ،sei ،seh ،seg ،see ،sed،sec،seb ،sea) می باشند (۷). مقدار انتروتوکسین مورد نیاز برای ایجاد علایم مسمومیت غذایی بسیار کم است، بنابراین روش های حساس برای تشخیص انتروتوکسین های استافیلوکوکی حتی در مقادیر کم مورد نیاز است،امروزه از روش‌های تشخیص مولکولی مانند PCR و Multiplex PCR برای شناسایی ژنهای انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی استفاده می‌شود ولی در روش‌های تشخیص مولکولی، نیازی به آنتی ژن نبوده و حتی در صورت نبود توکسین یا میزان کم توکسین، ژن ها قابل ردیابی هستند (۷). میزان ژن های انتروتوکسین برحسب این که منشأ باکتری حیوان، انسان، عفونت ها، غذا یا محیط باشد، متفاوت است (۸و۹). در این مطالعه، شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن کدکننده انتروتوکسین های J, I, H, G, B, A از انسان با استفاده از تکنیک Multiplex PCR انجام شد. شناسایی مولکولی ژنهای (femA ,see ,sed ,sec ,seg ,seb ,sea) استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی انسانی بوسیله Multiplex PCR صورت گرفته است.

این مقاله حاصل پایان نامه المیرا ولیزاده دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر کیومرث امینی
آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده کشاورزی، گروه میکروبیولوژی. تلفن:۰۸۶-۴۲۴۳۳۳۴۲
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۶۰ مورد استافیلوکوکوس اورئوس برای انجام این مطالعه در نظر گرفته شد و در آزمایشگاه میکروبیولوژی نگهداری گردید.

آزمایشات میکروبی: نمونه‌های در آزمایشگاه در زیر هود و کنار شعله با رعایت اصول استریل بودن، در محیط آگار خون دار (مرک.آلمان) حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شدند. تعیین هویت باکتری های رشد کرده، پس از انتقال آن ها به محیط کشت نوترینت آگار از روش های استاندارد میکروب شناسی شامل رنگ آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز، رشد در محیط DNase و مانیتول سالت آگار استفاده شد(۱۰).

تست کواگولاز: این آزمایش برای تشخیص افتراقی استافیلوکوک‌ها استفاده می شود. تست کواگولاز به دو روش روی لام و لوله ای انجام می شود و روش لوله ای دقیقتر است. کواگولاز متصل به دیواره سلولی استافیلوکوک، مستقیماً فیبرینوژن را به فیبرین غیر محلول تبدیل می کند و باعث می شود تا استافیلوکوک لخته شود. کواگولاز آزاد بیشتر به روش لوله ای و کواگولاز متصل بیشتر به صورت روی لام انجام می شود(۱۱).

تخمیر قند مانیتول: هرچند استافیلوکوک‌ها قندهای مختلفی مانند ساکاروز، گلوکز، ریبولوز، لاکتوز و غیره را تخمیر می‌کنند ولی بررسی تخمیر قند مانیتول به وسیله این باکتری دارای اهمیت ویژه ای است. زیرا فقط انواع پاتوژن استافیلوکوک این قند را تخمیر می کنند. برای انجام این آزمایش نیاز به محیط مانیتول سالت آگار می باشد. در این محیط غلظت بالای نمک (۷/۵٪) رشد اکثر سوش های گرم منفی و گرم مثبت بجز استافیلوکوک اورئوس را مهار می کند. با شکستن پپتون موجود در محیط کلنی های قرمز رنگ با هاله ای ارغوانی – قرمز ایجاد می کنند. کلنی های مورد نظر را روی محیط مانیتول سالت آگار تلقیح کرده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت درحرارت ۳۵ °C انکوبه می نماییم. کلنی های استافیلوکوک اورئوس زرد رنگ بوده و توسط هاله زردی احاطه می شود.

استخراج DNA: چند کلونی خالص استافیلوکوکوس اورئوس از محیط نوترینت آگار به لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط BHI براث تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۱ میلی لیتر از محیط BHI براث در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل ریخته شد و در دور ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی میکروتیوب کاملاً تخلیه و ۸۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به آن اضافه گردیده و در دمای ۶۵ درجه در داخل بن ماری به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از این مرحله، ویال های حاوی سلول‌های لیز شده را در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ کرده و فاز رویی را به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری جدید و تمیز انتقال داده و هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت های ۱:۲۴ به آن اضافه شد. این مجموعه به آرامی تکان داده شد. سپس دو فاز تشکیل شده در مرحلهٔ قبل با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد، جداسازی و با برداشتن لایهٔ رویی و انتقال به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال ها را برداشته و هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شد. سپس با سانتریفیوژ در دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، DNA رسوب و مایع رویی تخلیه و میکروتیوپ حاوی DNA وارونه شده و در دمای اتاق خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. برای آگاهی از کیفیت و کمیت استخراج DNA، ۵ میکرولیتر از DNA حل شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه، با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و در همهٔ نمونه ها DNA ژنومی با کیفیت و غلظت خوب مشاهده شد (۱۲).

ارزیابی DNA استخراج شده: برای ارزیابی و تایید استخراج DNA از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه های استخراج شده به نسبت ۶ به ۱ با بافر بار گذاری مخلوط و در چاهک های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل مورد نظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و نوارهای DNA در همهٔ نمونه‌ها با استفاده از نور UV مشاهده و عکسبرداری انجام گرفت.

آزمون M-PCR: در این پژوهش برای شناسایی وجود ۶ ژن انتروتوکسین (sea, seb, sec, sed, see, femA) درجدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش، از تکنیک PCR چندگانه‌ای استفاده شد (جدول ۱). پرایمرها از شرکت تکاپو زیست (تهران،ایران) تهیه شدند. از سوش های رفرانس استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، ATCC 29213، ATCC 33591 به عنوان نمونه کنترل و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

جدول۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR چندگانه‌ای

ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR (bp)
sea	SEA-f	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	۱۰۲bp
	SEA-r	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	
seb	SEB-f	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	۱۶۴ bp
	SEB-r	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	
sec	SEC-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	۴۵۱ bp
	SEC-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	
sed	SED-f	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	۲۷۸ bp
	SED-r	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	
see	SEE-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	۲۰۹ bp
	SEE-2	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	
femA	femA-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	۱۳۲ bp
	femA-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	

آماده‌سازی پرایمرها: در این تکنیک شش جفت پرایمر جهت تکثیر هر کدام از ژنهای انتروتوکسین موجود در ژنوم استافیلوکوکوس اورئوس از شرکت تکاپو تهیه و برای انجام کار در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت. پرایمرها بصوت لیوفیلیزه بوده و قبل از استفاده طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شرح زیر مراحل آماده‌سازی هر کدام از آنها انجام گرفت.

تکثیر DNA بوسیله PCR: آزمون PCR چندگانه‌ای برای شناسایی شش ژن انتروتوکسین با استفاده از شش زوج پرایمر (جدول۱) در یک دستگاه ترمال سایکلرمدل (Eppendorf) انجام شد.برای انجام این واکنش ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۱ میکرولیتر از مخلوط دزاکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (dNTP)، ۱ میکرولیتر از از نمک (Mgcl2)، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از

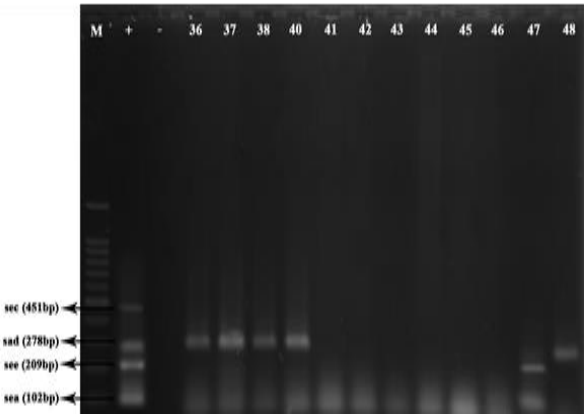
Archive of SID
www.SID.ir

جفت پرایمرهای مربوطه، ۱ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA الگو با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی توسط آب بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. به تعداد نمونه‌ها، میکروتیوب‌های استریل بعد از کدگذاری در داخل راک های آزمایشگاهی استریل قرار گرفت. منظور از کدگذاری نوشتن شماره نمونه مورد استفاده می‌باشد. سپس اجزای آزمایش PCR به میکروتیوب‌ها اضافه شدند. به منظور تعیین هویت باکتری های رشد کرده، پس از انتقال آن ها به محیط کشت نوترینت آگار از روش‌های استاندارد میکروب شناسی شامل: رنگ آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز، رشد در محیط DNase و مانیتول سالت آگار استفاده شد.

یافته ها

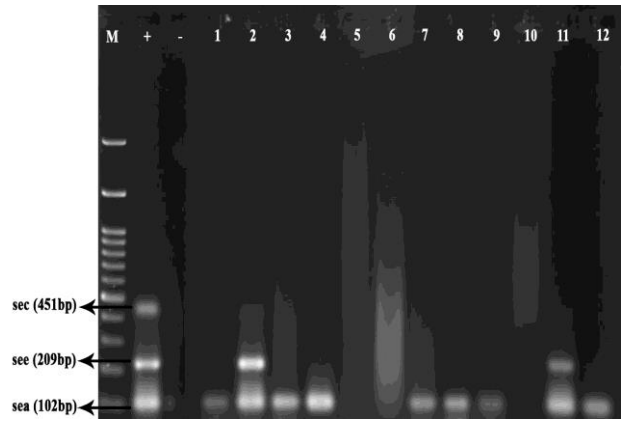
نتایج آزمون M-PCR استافیلوکوک اورئوس: در این مرحله برای جستجوی ژن های انتروتوکسین sea, seb, sec, sed, femA,see واکنش PCR چندگانه‌ای بر روی تمامی ۶۰ نمونه انجام شد که وجود قطعه ۱۰۲ جفت بازی نشان دهنده وجود ژن sea، قطعه ۱۶۴ جفت بازی نشان دهنده ژن seb، قطعه ۴۵۱ جفت بازی نشان دهنده ژن sec، قطعه ۲۷۸ جفت بازی نشان دهنده ژن sed ، قطعه ۲۰۹ جفت بازی نشان دهنده ژن see و قطعه ۱۳۲ جفت بازی نشان دهنده ژن femA بود که این ژن در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین حائز اهمیت است. در این مطالعه از سوش‌های رفرانس استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، ATCC 29213، 33591 ATCC به عنوان نمونه کنترل مثبت و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج آزمون M-PCR سویه های استافیلوکوک اورئوس: در این پژوهش ۳۰ نمونه (۵۰٪) از ۶۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین بودند. در میان ۳۰ نمونه، تعداد ۱۸ سویه (۳۰٪) دارای ژن sea، ۱ سویه (۱/۶٪) حاوی ژن sec، ۶ سویه (۱۰٪) دارای ژن sed، ۵ سویه (۸/۳٪) حامل ژن see بود. ژنهای femA, seb در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشد (شکل ۳و۲و۱).



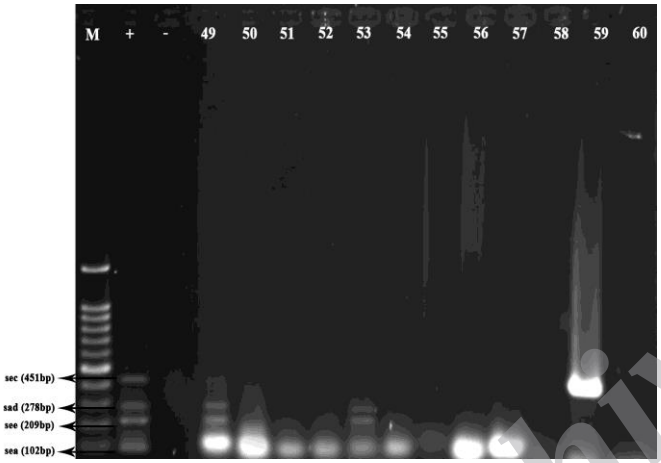
شکل ۱. واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوک اورئوس

ستون M: سایز مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت واجد ژن sea(۱۰۲bp)، ژن see (۲۰۹bp)، ژن sec (۴۵۱bp)، کنترل منفی (استافیلوکوک اپیدرمیدیس)، نمونه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲ واجد ژن sea(۱۰۲bp)، نمونه‌های ۲و ۱۱ واجد ژن see (۲۰۹bp)



شکل ۲. واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوک اورئوس

ستون M: سایز مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت واجد ژن sea(۱۰۲bp)، ژن see (۲۰۹bp)، ژن sec (۴۵۱bp)، ژن sed (۲۷۸bp)،کنترل منفی (استافیلوکوک اپیدرمیدیس)، نمونه ۴۷ واجد ژن see، نمونه‌های ۳۶، ۳۷، ۳۸ و ۳۹ واجد ژن sed



شکل ۳. واکنش M-PCR برای شناسایی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوک اورئوس

ستون M: سایز مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت واجد ژن sea(۱۰۲bp)، ژن see (۲۰۹bp)، ژن sec (۴۵۱bp)، ژن sed (۲۷۸bp)، کنترل منفی (استافیلوکوک اپیدرمیدیس)، نمونه ۴۹، ۵۰، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۴، ۵۶، ۵۷ واجد ژن sea ، نمونه‌های ۴۹و ۵۳ واجد ژن see، نمونه های ۴۹ و ۵۳ واجد ژن sed. نمونه ۵۹ واجد ژن sec

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه از مجموع ۶۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس،۳۰نمونه (۵۰٪) حاوی حداقل یک ژن انتروتوکسین بودند. فراوانترین ژن sea(۳۰٪) بود و به دنبال آن به ترتیب sed(۱۰٪)، see (۸/۳٪)، sec (۱/۶٪) با فراوانی کمتر شناسایی شدند. در مطالعه حاضر از تکنیک M-PCR برای شناسایی ژنهای مولد انتروتوکسین استفاده شد که یک روش اختصاصی، حساس، سریع و ارزان می‌باشد که توانایی تشخیص چندین ژن مولد انتروتوکسین را به طور همزمان دارد. از مزایای غیر قابل انکار این روش شناسایی عاملین بالقوه مسمومیت غذایی حتی قبل از ایجاد توکسین است که با شناسایی ناقلین سالم و کانون های آلودگی بویژه در مراکز تهیه مواد غذایی، می‌توان مانع بروز مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی شد. در انسان، این باکتری در قسمت قدامی بینی بزرگسالان وجود دارد و در ۲۰ تا ۳۰٪ از جمیعت انسانی بصورت دائم و پایدار و در۶۰٪ افراد

Archive of SID
www.SID.ir

بصورت متناوب دیده می شود . لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل آوری و توزیع مواد غذایی فعالیت دارند در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی قادر هستند باکتری را به غذا انتقال دهند (۹و۷و۶). در ایران، Imano Fooladi و همکاران، طی مطالعه ای نشان دادند که ۴۵٪ جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ۲۰۰ بیمار پوستی تولید کننده انتروتوکسین بودند(۶). در مطالعه دیگری Anvari و همکاران نشان دادند که از۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونتهای زخم، ۷۴٪ حاوی ژن انتروتوکسین بودند (۱۳). Barati و همکاران نیز فراوانی ژنsea در نمونه های بالینی را ۶/۴۷٪ گزارش نمودند(۱۴). در مطالعه دیگری که توسط Saadati و همکاران بر روی نمونه ناقلین سالم با کمک تکنیک PCR انجام گرفت فراوانی ژن sea، ۲۵/۳٪ گزارش شد(۱۵). در مطالعه Gadyari و همکاران نیز از۱۰۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس جدا شده از زخم بیماران سوختگی بستری در بیمارستان، ۱۲٪ دارای ژن sea و ۱٪ نمونه ها دارای ژن seb بودند(۱۶). Pinto و همکاران نشان دادند ۳۱٪ از ۱۳۱ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های مواد غذایی دارای یک یا چند ژن تولید کننده انتروتوکسین بوده است. که در این میان sea با فراوانی ۱۷٪ گزارش گردید. که با نتیجه مطالعه ما همخوانی دارد (۱۷). در مطالعه Trnikova و همکاران در اسلواکی ۳۷ درصد آلودگی به انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در غذاهای آماده مصرف گزارش شد که نشان دهنده توانایی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در انواع غذاها می باشد (۱۸). در مطالعه Hwang و همکاران در کره مشخص گردید ۵۰٪ از ۱۴۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از گوشت خوک و مرغ حاوی حداقل یک ژن انتروتوکسین هستند. در این مطالعه فراوانی ژن sea در ۷٪ (۱۰ نمونه) گزارش گردید و ژن seb در هیچکدام از جدایه ها مشاهده نشد. در این میان ژن‌های seg و sei به عنوان شایعترین تیپ انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس با شیوع ۳۷٪ (۵۳ نمونه) گزارش گردید (۱۹). افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت قابل ملاحظه است و این موضوع با در نظر گرفتن‌میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰–۵۰٪ در ناحیه نازوفارنکس و ۳۰–۵ ٪ در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی۲۰–۱۰٪ می‌رسد، به خصوص از ناحیه مسئولین تهیه غذاها پررنگ ترمی شود (۲۰). در این پژوهش از ۶۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس، ۵۰٪ (۳۰ نمونه) حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین بودند. این میزان شیوع، با نتایج گزارش شده از فراوانی سویه‌های انتروتوکسیژنیک درنمونه های استافیلوکوک‌اورئوس جدا شده از بینی در برزیل (۲۲/۱٪)، در نمونه های بالینی در اردن (۲۳٪) و نمونه های جمع آوری شده از افراد شاغل در بخش تهیه و توزیع غذا در بوتسوانا (۲۱٪) مطابقت داشت. همچنین نتایج گزارش شده در نمونه های بالینی (۴۳٪) و جداشده از بینی (۳۹/۵٪) در آلمان، از نمونه های بالینی در ترکیه (۵۷/۵٪) و از نمونه های جدا شده از بیماران مبتلا به مسمومیت غذایی (۷۶٪) در ژاپن تطابق دارد. مشخص شد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده انتروتوکسین با توجه به اینکه در ایجاد حدّت بیماری علاوه بر ژن های فوق، سایر ژن های دیگر نظیر TSST-1 دخالت دارند. به طور کلی حضور استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی انسانی، بویژه سویه‌های انتروتوکسیژنیک، می تواند یک خطر بالقوه برای سلامتی محسوب شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیه کسانی که در مراحل مختلف انجام تحقیق یاری نمودند و از مسئول محترم آزمایشگاه میکروب شناسی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده شان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

Identification of Staphylococcus Aureus Enterotoxin Genes Using Multiplex PCR

E. Valizadeh (MSc)[1], K. Amini (PhD)*[2]

1.Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(12); Dec 2016; PP: 26-32
Received: May 16th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Sep 27th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Staphylococcus aureus is one of the most common causes of food poisoning in the world. Various studies indicated that 18-15 percent aureus strains isolated from different sources are be able to produce enterotoxin which known as the main factor of poisoning. The aim of this study was to identify enterotoxin genes, such as: (femA, see, sed, sec, seg, seb, sea) in S. aureus confirmed using multiple PCR method.

METHODS: In this study, 60 samples of Staphylococcus aureus isolated from purulent infections, skin and have symptoms of poisoning: vomiting and diarrhea in humans, production of enterotoxin was examined. After DNA extraction of isolates, multiple PCR using specific primers for enterotoxin genes was performed.

FINDINGS: Overall, 50% of Staphylococcus aureus isolates contain one or more enterotoxin gene. The most abundant gene was sea (30%) and sed (10%), see (3/8%), sec (6/1%) were also identified.

CONCLUSION: It was found that other genes such as TSST-1 are involved staphylococcus aureus enterotoxin production in the creation of visual acuity in addition to above genes. In general, the presence of Staphylococcus aureus in human clinical specimens, especially enterotoxigenic strains, can be considered a potential risk for health.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus, enterotoxin gene, multiplex polymerase chain reaction, food poisoning*.

Archive of SID

Please cite this article as follows:
Valizadeh E, Amini K. Identification of Staphylococcus Aureus Enterotoxin Genes Using Multiplex PCR. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(12):26-32.

***Corresponding author: K. Amini (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran
Tel: +98 86 42433342
E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com

www.SID.ir

References

1.Raissy M, Khamesipour F, Rahimi E, Khodadoostan A. Occurrence of vibrio spp, aeromonas hydrophila, escherichia coli and campylobacter spp. in crayfish (Astacus leptodactylus) from Iran. Iran J Fisher Sci. 2014;13(4):944-54 [In Persian].

2.Abolhassani M. Obituary: professor fereydoun malekzadeh (1933-2012). Iran Biomed J. 2013;17(1):0-20[in persian].

3.Casman EP, Bennett RW, Dorsey AE, Issa JA.(1967) Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J Bacteriol.; 94(6): 1875-82.

4.Gilbert RJ, Humphrey TJ.(1998). Food-borne bacterial gastroenteritis. In: Hausler WJ, Sussman M.(editors). Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Hodder Arnold Pub. p: 577-600.

5.Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology. 2007;115(3):290-6.

6.Imanifooladi A, Sattari M, Peerayeh SN, Hassan Z, Hossainidoust S. Detection the Staphylococcus aureus producing enterotoxin isolated from skin infections in hospitalized patients. Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2007;10(3):502-5.

7.Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. International journal of food microbiology. 2010;142(1):74-7.

8.Adwan GM, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic staphylococcus aureus in raw milk in the north of palestine. Turk J Bio. 2006;29(4):229-32.

9.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, eds.(2005). Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elesvier Mosby; APA Style (6th edition).

10.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis Jr G. Textbook of diagnostic microbiology: Elsevier Health Sciences; 2014:234-85

11.Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Baysse C, et al. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. Proc National Acad Sci U S A. 2005;102(48):17454-9.

12.Atashpaz S, Khani S, Barzegari A, Barar J, Vahed SZ, Azarbaijani R, et al. A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. Microbiol. 2010;79(4):538-42.

13.Anvari S, Sattari M, Forozandehe-Moghadam M, Najar Peerayeh S, Imanee-Fouladi A. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. Res J Biol Sci. 2008;3(8):826-29.

14.Barati B, Saadati M, Kh BM. Isolation and detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus type A by multiplex PCR. Journal of Military Medicine. 2006: 8(2):119-28.

15.Saadati M, Barati B, Shirazi M. Detection of sea, sec and seq genes in Staphylococcus aureus nasal sampling acquiring from healthy carrier. ISMJ. 2009;12(1):8-16.

16.Gadyari F, Sattari M, Boroumand MA, Yaghoubi R, Sepehriseresht S, Purgholi L. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxins A to D in clinical strains isolated from burned patients of Tehran Motahari Hospital. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2011:15;5(1):20-7.

Archive of SID

www.SID.ir

17.Pinto B, Chenoll E, Aznar R. Identification and typing of food-borne Staphylococcus aureus by PCR-based techniques. Systematic and applied microbiology. 2005;28(4):340-52.

18.Trncikova T, Piskernik S, Kacli Kova E, Mozina SS, Kuchta T, Jerse KB. (2010).Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from food produced Slovakia and Slovenia with regard to the presence of genes encodiny for entrotoxins. Food Nutr Res; 49(4): 215-20.

19.Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the Staphylococcus aureus superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. International journal of food microbiology. 2007;117(1):99-105.

20.Salari Sharif A, Sattari M, Moradi M, Shahrokhabad R. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxin Genes A & B in Clinical Samples of the Patients Referring to the Medical Centers of Kerman and Rafsanjan Cities by PCR Technique. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2012;11(2):128-36.

Archive of SID

www.SID.ir