

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

جمیله نوروزی^۱، گويا گودرزی^۲، پرویز پاکزاد^۱، رؤيا رضوی پور^۳

^۱استاد میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.

^۲دانشجوی کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.

^۳کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد تهران، واحد شمال، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انتروتوکسین ها و TSST-1 از مهم ترین عوامل بیماریزای این باکتری هستند. این بررسی با هدف شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن انتروتوکسین (sea، seb، sec، sed، see) و TSST-1 در نمونه های جمع آوری شده از منابع مختلف با استفاده از روش PCR صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه طی ۵ ماه، از ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده، ۸۰ سویه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی گردید. از روش PCR جهت شناسایی ژن های انتروتوکسین A-E و TSST-1 استفاده شد.

یافته ها: در این بررسی از ۸۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، ۵۳ سویه (۶۶/۲۵٪) حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین و TSST-1 بودند. در میان نمونه های 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. ژن های انتروتوکسین همراه با ژن tst نیز در ۴۰ نمونه (۷۵/۴۷٪) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: در این پژوهش درصد بسیار بالایی از استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن های انتروتوکسین و tst در نمونه های کلینیکی، مواد غذایی و انسان های سالم مشاهده گردید، که اهمیت توجه به انسان به عنوان منبع اصلی و ناقل استافیلوکوکی را مشخص می کند. لذا پیشنهاد می شود از واکنش PCR برای جستجوی ژن های انتروتوکسین و tst در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از منابع مختلف استفاده گردد.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس؛ انتروتوکسین؛ سندرم شوک سمی؛ واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).

لطفاً به این مقاله به صورت 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 پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۸

مقدمه

پستانداران، مواد غذایی مختلف و محیط اطراف یافت می شود و عامل ایجاد ذات الریه بعد از عفونت های ویروسی، ورم پستان گاو، التهاب وریدها، مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، التهاب موضعی استخوان ها، اندوکاردیت، ضایعات سطحی پوست و غیره می باشد (۳). استافیلوکوکوس اورئوس توکسین های پروتئینی خارج سلولی

در بین باکتری ها، استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم ترین پاتوژن هایی است که باعث مسمومیت غذایی شده و هر ساله صدها هزار نفر از مردم را به این بیماری مبتلا می کند (۲، ۱). استافیلوکوکوس اورئوس بر روی غشاهای مخاطی و پوست

با وزن مولکولی کم و فاکتورهای بیماریزایی مختلفی را تولید می‌کند. چندین نوع انتروتوکسین استافیلوکوکی شامل:

(R, Q, P, O, N, M, L, K, J, I, H, G, E, D, C, B, A) و ژن‌های مرتبط با آنها (sej, sei, seh, seg, see, sed, sec, seb, sea) (ser, seq, sep, seo, sen, sem, sel, sek, se,

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 به علت قابلیت

جذب از طریق استنشاق و کاربردهای بیوتروستی 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 ۵٪/۷، pH، دما و رقابت با باکتری‌های دیگر، تولید انتروتوکسین را در غذا تحت

تأثیر قرار می‌دهد. انتروتوکسین‌ها در محصولات لبنی مانند شیر و پنیر خام، گوشت خام، 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 گوشت خام 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

ترانسلومیناتور اندازه گیری 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 Taq DNA Polymerase و ۸μl 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 Temperature)، 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 برمایند رنگ آمیزی شده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول شماره ۲: مراحل واکنش PCR

زمان (دقیقه)	حرارت (درجه سانتی گراد)	ژن	مراحل
۵	۹۶		دنا توره 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 جمع آوری شده، 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

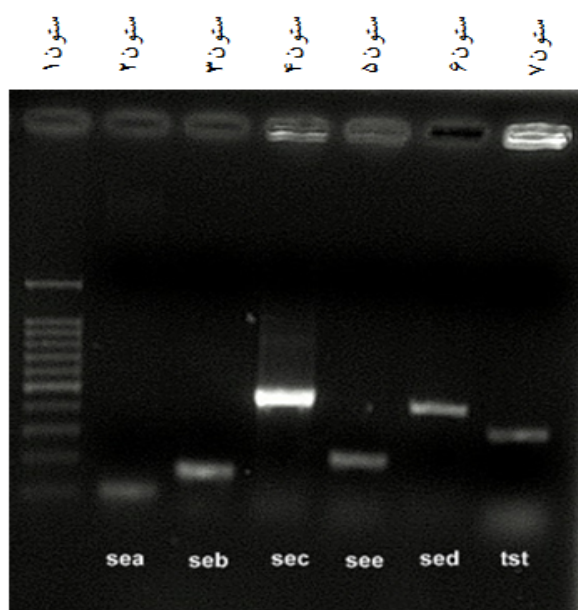
غذایی، ۱۰g از هر نمونه را به ۹۰ml آب پیتونه استریل اضافه کرده، سپس با استفاده از سواب استریل بر روی محیط Baird Parker آگار حاوی ۵٪ زرده تخم مرغ و ماده تلوریت کشت داده شدند. نمونه‌های بینی با استفاده از سواب استریل جمع‌آوری و درون محیط مایع BHI کشت داده شدند، سپس به محیط مانیتول سالت آگار انتقال یافتند. نمونه‌های کلنیکی نیز بر روی محیط‌های Nutrient Agar و BHI آگار کشت داده شدند. در ادامه، کلنی‌های رشد یافته جهت انجام بررسی‌های بعدی به محیط‌های بلاد آگار 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	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	۲۰	۱۰۲
R	CGCCACTTTTTCTCTTCGG	۲۰	
seb	GGTGGTGTAACTGAGC GTA	۲۱	۱۶۴
R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	۲۰	
se	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	۲۴	۴۵۱
R	CACACTTTTAGAATCAACCG	۲۰	
sed	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	۲۳	۳۷۸
R	ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	۲۰	
See	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	۲۱	۲۰۹
R	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	۲۱	
tst	ACCCCTGTTCCTTATCATC	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 تخلیص شده 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



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

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

جدول شماره ۳: سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و ژن های جدا شده از منابع مختلف				
منبع باکتری های جدا شده	تعداد سویه های <i>S. aureus</i>	درصد	تعداد نمونه های دارای ژن های انتروتوکسین TSST-1 و A-E	درصد
گوشت خام (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٪
شیرینی جات (کیک، نان خامه ای)	۴	۵٪	۴	۷/۵۴٪
ادار	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

اورئوس و نمونه های حاوی ژن را نشان می دهد.

در ۷۰ نمونه جدا شده از بیماران بیمارستان های مطهری و شهدای تجریش، ۴۰ سویه استافیلوکوک / اورئوس به وسیله آزمایش های مختلف میکروب شناسی شناسایی شدند. در این سویه ها، 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 گرفته شده از بینی افراد سالم، sea در ۲ سویه (۴۰٪)، seb در ۳ سویه (۶۰٪) و tst در ۲ سویه (۴۰٪) دیده شد. در نمونه های جمع آوری شده از سواب بینی افراد سالم هیچ کدام از ژن های sec، sed و see

۵۳ نمونه (۶۶/۲۵٪) از ۸۰ نمونه حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین و tst بودند. در میان ۵۳ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده، 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 نمونه ها (۶۶/۲۵٪) دارای چندین ژن انتروتوکسین و یا ژن انتروتوکسین به همراه ژن tst بودند. بیشترین فراوانی را ژنوتیپ sec/tst در ۱۹٪ نمونه ها و کمترین ژنوتیپ را seb-sed-see در یک نمونه کلینیکی داشت. جدول شماره ۳ سویه های استافیلوکوکوس

مشاهده نشد. در ۵۰ نمونه غذایی جمع آوری شده، 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، ۱μl dNTP 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 tsst-1 و Sea-See می‌باشند. انتروتوکسین‌ها به‌خصوص گروه Sea تا Sea، 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 جداسازی شده، 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 جمع‌آوری شده

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 جمع‌آوری شده از عفونت‌های زخم، ادرار و خون، *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد که با مشاهدات Varshney و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۰٪ نمونه‌های جداسازی شده از زخم و خون بیماران ۳ بیمارستان در نیوجرسی مطابقت داشت (۱۲). افزایش میزان جداسازی این باکتری نقش و اهمیت این میکروارگانیسم 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 جمع‌آوری شده، 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* جداسازی شده 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* جداسازی شده 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

بوده است (۱۶،۱۵)، ولی درصد پایین تری 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 جدا شده، دارای ژن‌های انتروتوکسین هستند، ولی هیچ کدام از آنها بیش از یک ژن نداشتند (۱۷،۲). اختلاف‌های موجود در این بررسی‌ها می‌تواند به علت 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 شیرینی جات مشاهده گردید، که لزوم رعایت کامل موازین بهداشتی در مراحل مختلف آماده‌سازی مواد غذایی و غذا را نشان می‌دهد. در این مطالعه، ۶۰٪ نمونه‌های کلنیکی 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 جداسازی شده 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 انجام شده توسط Zschöck و همکارانش در آلمان بر روی ترشحات به دست آمده از گاوهای مبتلا به بیماری ورم پستان؛ ۳۶/۲٪ سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده دارای ژن‌های انتروتوکسین و tst بودند (۱۸). علت گسترده بودن تفاوت‌ها در میزان فراوانی ژن‌های انتروتوکسین و tst در مطالعات مختلف ممکن است به علت متفاوت بودن منابع جداسازی در کشورهای 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 کلنیکی و ۹۵ نمونه سواب بینی جمع‌آوری شده 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 کلنیکی؛ ۵۰ نمونه (۷۱/۴٪)، حداقل دارای یک ژن انتروتوکسین بودند، و بیشترین فراوانی را ژن

sec (۵۸/۶٪) و بعد از آن ژن tst (۴۴/۳٪) و کمترین را sec (۳۴/۳٪) داشت و ژن see در هیچ کدام از نمونه‌های کلنیکی آنها یافت نشد. همچنین در میان ۹۵ سویه استافیلوکوک/اورئوس جدا شده از بینی، ۷۸ نمونه (۸۲/۱٪) برای حداقل یک ژن انتروتوکسین مثبت بودند. در نمونه‌های جدا شده از بینی، بیشترین فراوانی را به ترتیب ژن‌های sei (۷۰/۵٪)، tst (۵۲/۶٪) و sea (۴۷/۴٪) داشتند (۱۹). هیچ کدام از نمونه‌های بینی حاوی ژن‌های seb، sed و see نبودند، این یافته با نتایج مطالعه حاضر که فقط ژن‌های sea، seb و tst در نمونه‌های سواب بینی گزارش نمود، از نظر وجود ژن sea و tst همخوانی داشت. همچنین در بررسی‌های انجام شده 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 گوشت خام خوک و بوقلمون و ۴۹ نمونه کلنیکی 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 متنوع تری 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 جدا شده در مواد غذایی را دارا می‌باشد، همچنین گزارش‌های دیگر مبنی بر بیشترین میزان ژن‌های sea و sed در نمونه‌های بررسی شده (۲۱،۲۰،۴)، در مطالعه حاضر، بیشترین درصد ژن‌های مشاهده شده 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 مشاهده شده seb و sea بوده است (۱۶،۱۵،۲). در این بررسی ژن sed، کمترین میزان (۳/۷۷٪) را داشت که فقط در ۲ نمونه کلنیکی 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 مشاهده شده 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

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* جدا شده 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 هیچ کدام 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 به عنوان منبع اصلی و ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* را مشخص می‌کند. همچنین پیشنهاد می‌شود از واکنش PCR برای جستجوی ژن‌های انتروتوکسین و *tst* در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده 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.

داشت (۲۰،۲۲). 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* جدا سازی شده، ۱۷/۵٪ دارای ژن *tst* (۱۹٪) 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* جدا شده از منابع حیوانی کار می‌کردند، به دست آمد. از میان ۷۹ نمونه حیوانی گرفته شده، 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 به علت 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 جدا سازی شده از خون افراد بیمار دارای ۴ ژن با هم همراه می‌باشد، مطابقت داشت (۱۹). این مورد می‌تواند به علت 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

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.

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 Strains isolated 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 Syndrome toxin-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 Microbiol* 2009;75(21):6839-6849.
13. Vandenberg 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, Kalinocova 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):585-591.
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, Istrina 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, Exfoliative toxins, 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.

