مجـله‌ی علمـی، پژوهــشی دانشــگاه علــوم پزشــکی زنجــان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۷۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۱ تا ۱۲

استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ent D استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از عفونت‌های انسانی و تعیین سکانس آن

دکتر رمضانعلی عطایی[1]، دکتر علی کرمی[2]، دکتر رحیم سروری‌زنجانی[3]، محمد کمال باقری[4]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشکده‌ی پزشکی، گروه میکروب شناسی ataee@bmsu.ac.ir

دریافت: ۹۰/۴/۲۱ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *انتروتوکسین D استافیلوکوکوس به عنوان یک سوپر آنتی‌ژن توسط نمونه‌های عفونی منابع انسانی و حیوانی تولید می‌گردد. هدف این تحقیق استاندارد سازی روش تشخیص استافیلوکوکوس تولید کننده‌ی انتروتوکسین D بود.*

روش بررسی: *روش PCR جهت تشخیص ent D در استافیلوکوکوس آرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی (۳۱۰ سویه جدا شده) Set up گردید. محصول PCR خالص سازی و تعیین سکانس شد. سکانس حاصل Blast گردید. همچنین، توانایی تولید انتروتوکسین D تمام سویه‌های ناقل ent D نیز با کیت الیزا بررسی شدند.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد، روش مولکولی PCR به خوبی Set up شده است. زیرا، در یک مرحله پرایمرهای مورد استفاده دو باند تکثیر شدند، یکی در محدوده‌ی ۱۴۰۰ bp و دیگری در محدوده‌ی ۷۰۰ bp بود. هر دو باند از روی ژل جدا و تعیین سکانس شدند. مقایسه‌ی سکانس حاصل از باند ۷۰۰ bp با سکانس ژن استاندارد موجود در بانک ژن انطباق ۹۹ درصد را نشان داد. نتایج حاکی از آن بود که ent D در محصول ۷۰۰ bp قرار داشت. چنان‌که Multiple Alignment سکانس حاصل با سکانس ژن استاندارد مقایسه و تأیید گردید. توکسین‌زایی سویه‌های ناقل ent D با آزمون الیزا تأیید گردید.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس اطلاعات موجود، در حال حاضر سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس کواگولاز مثبت در نمونه‌های بالینی مورد توجه قرار می‌گیرند. اما روشی جهت نشان دادن توانایی تولید انتروتوکسین‌ها از جمله انتروتوکسین D وجود ندارد. تحقیق حاضر روشی ساده و سریع جهت تأیید توانایی توکسین‌زایی باکتری را ارایه و تشخیص سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین D را استاندارد سازی نموده است.*

واژگان کلیدی: استافیلوکوس آرئوس، ent D و PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زایی است که باعث ایجاد مسمومیت غذایی نیز می‌باشد (۱). علت ایجاد مسمومیت غذایی توانایی تولید انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت است. تحقیقات گذشته،

۱- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی پزشکی، استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی

۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۳- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۴- دانشجوی دکترای تخصصی مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...

فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس که فقط ژن رمز کننده انتروتوکسین D (entD) را حمل می‌نمایند، ۱۹/۷ درصد تخمین زده‌اند (۲). برخی گزارش‌های دیگر مدعی هستند که بیشتر سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس (۶۸/۸ درصد) انتروتوکسین D را تولید می‌کنند (۳). عقیده بر آن است که ژن رمز کننده‌ی انتروتوکسین D (entD) استافیلوکوکوس آرئوس روی پلاسمید حاوی ژن پنی‌سیلیناز (pIB485) قرار دارد (۴). به همین دلیل امکان انتشار و فراوانی آن دور از انتظار نیست. چنان‌که در کشور سوئد به عنوان فراوان‌ترین عامل مسمومیت غذایی ناشی از فراورده‌های گوشتی معرفی شده است (۵). به‌علاوه، با آن که ارتباط بین entD و entA مشخص نیست برخی سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین D به‌طور هم‌زمان انتروتوکسین A را نیز تولید می‌نمایند. به این ترتیب، بروز اپیدمی‌های مسمومیت غذایی، به‌ویژه در اطفال به دلیل مصرف شیر خشک آلوده به آنتروتوکسین‌های A و D استافیلوکوکوس آرئوس نشان داده شده است (۶). در هر حال، استافیلوکوکوس آرئوس قادر است در غدد شیری گاوها عفونت ایجاد نموده و مدت‌ها انتروتوکسین D را تولید و آلودگی شیرها را به همراه داشته باشد (۷). از طرفی به دلیل مقاومت توکسین به عوامل فیزیکوشیمیایی در جریان تهیه‌ی شیر خشک، این توکسین از بین نرفته و به عنوان یک عامل خطر برای مصرف کننده به حساب می‌آید. بنابراین، با توجه به پراکندگی گسترده‌ی استافیلوکوکوس‌ها در طبیعت و توانایی تولید انواع مختلف انتروتوکسین همیشه خطر آلودگی انواع مختلف خوراکی‌ها به انتروتوکسین‌ها وجود دارد. حتی آلودگی آبزیان از جمله: میگوها به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی نیز گزارش شده است (۸). نکته‌ی قابل توجه آن است که انتروتوکسین‌ها تنها توسط استافیلوکوکوس آرئوس‌های کواگولاز مثبت تولید نمی‌گردد، بلکه در سال‌های اخیر نشان داده شده است که استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین‌ها می‌باشند (۱۰و۹). نقش انتروتوکسین‌ها در ایجاد بیماری‌های غیر گوارشی نامشخص است اما با این حال، در موارد متعددی وجود انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی در بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک، پسوریازیس و اریتماها نشان داده شده است (۱۱). این امر حکایت از نقش احتمالی انتروتوکسین‌ها در ایجاد برخی بیماری‌ها دارد. چنانچه در سال ۱۹۹۲ میلادی مالام و همکاران، مرگ‌های ناگهانی اطفال را ناشی از تجمع انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی در کلیه‌ها ذکر نموده‌اند (۱۲). نکته قابل توجه آن است که بسته به منطقه‌ی جغرافیایی، در ترادف ژن رمز کننده‌ی انتروتوکسین‌ها تنوع وجود دارد (۱۳). اما معلوم نیست اختلاف در ترادف ژنی باعث تغییر ترادف اسید آمینه‌ای و نیز آنتی‌بادی‌های اختصاصی نیز می‌گردد. در هر حال، این امر ضرورت استاندارد سازی روش تشخیص سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین به‌ویژه به‌منظور بررسی‌های اپیدمیولوژیک را اجتناب ناپذیر نموده است. افزون براین، بین توانایی تولید انتروتوکسین‌ها و ایجاد مقاومت به متی‌سیلین گزارشاتی وجود دارد (۱۵و۱۴). اما معلوم نیست ایجاد مقاومت به متی‌سیلین باعث القای تولید انتروتوکسین‌ها می‌گردد یا برعکس. با توجه به مطالب فوق، هدف این مطالعه، استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن انتروتوکسین D استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشد.

روش بررسی

مواد مورد نیاز: مواد ملکولی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت ایرانی سیناژن که ارایه‌دهنده‌ی محصولات فرمنتاز است، خریداری گردید. همچنین، محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت آریا وجد ارایه‌دهنده‌ی محصولات مرک آلمان خریداری شد. کیت استخراج محصول PCR از شرکت تکاپوزیست که ارایه‌دهنده‌ی محصولات شرکت Bioneer می‌باشد

خریـداری (DNA Extraction; Cat. No. K- 3032, Lot No. 10032) گردید. کیـت تـشخیص آنتروتوکـسین‌هـا از شـرکت روکـت اینترنشنال ارایه‌دهنـده‌ی محـصولات شـرکت r-Biopharm خریداری گردید.

روش کار: در یک تحقیق تجربـی (Experimental) روش تشخیص ژن انتروتوکسین D در سویه‌هـای اسـتافیلوکوکوس آرئـوس جـدا شـده از بیمـاران طراحـی و Set up گردیـد. همچنـین، تولیـد آنتروتوکـسین D در سـویه‌هـای حـاوی ژن ent D بررسی شد.

معیار انتخاب سویه‌ی باکتریـایی: معیـار انتخـاب سـویه‌هـای باکتریایی از این قرار بود. تمام بیمارانی که توسـط متخـصص عفـونی نیازمنـد بررسـی باکتریولوژیـک بودنـد و از کـشت نمونه‌های عفونی آن‌ها کوکوسی گـرم مثبـت، کاتـالاز مثبـت، کواگولاز مثبـت، DNase مثبـت و توانـایی رشـد در محـیط مانیتول سالت آگار بود، در ایـن مطالعـه وارد شـدند. بـه ایـن ترتیب ۳۱۰ سـویه‌ی اسـتافیلوکوکوس آرئـوس جـدا شـده از عفونت‌های سطحی، خون، مدفوع، کـشت گلـو، ادرار و مـایع نخاع جدا سازی شده بودند. با افزودن ۲۰ درصـد گلـیسیرول بـه کـشت ۱۸ سـاعته آن‌هـا در فریـزر منهـای ۲۰ درجـه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت باکتری و استخراج ژنوم: استخراج ژنوم بـا اسـتفاده از روش Salting out با کمی تغییر انجام شد (۱۵). کلنـی هـر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه به محیط کشت LB تلقیح و پس از ۲۴ سـاعت گرمخانـه‌گـذاری، ۱ میلـی‌لیتـر از آن را در تیـوب اسـتریل ۲ میلـی‌لیتـری ریختـه، بـه مـدت ۱۰ دقیقـه در g × ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویـی را دور ریختـه، بـه رسـوب سـلولی ۴۰۰ میکرولیتـر محلـول بـافر STE وارد و به‌طور کامل محلـول گردیـد. سـپس ۱۲۵ میکرولیتـر محلـول ۲ درصـد SDS و ۲۵۰ میکرولیتـر محلـول ۳ مـولار اسـتات سدیم به محلول اضافه، بـا سـر و تـه کـردن (۱۰ بـار) کـاملاً مخلـوط شـد. پـس از آن بـه‌مـدت ۵ دقیقـه در g ×۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در این حالت ژنوم وارد مایع رویی می‌گـردد. محلول رویی را به لوله استریل منتقل و بعـد از اضـافه کـردن ۷۵۰ میکرولیتـر ایزوپروپـانول سـرد (یـا اتـانول خـالص ۱۰۰ درصد) به آرامی مخلوط و به مدت یـک سـاعت و گـاهی تـا یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد قـرار داده شـد. پـس از آن محلـول سـانتریفیوژ (بـه مـدت ۵ دقیقـه در g×۱۲۰۰۰ و ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد) شده و محلول رویی دور ریخته شد. سپس ته‌مانده کاملاً خشک گردید. روی تـه مانـده خشک شده ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده، پس از ۱ ساعت قرار دادن آن در فریزر مهنای ۲۰ درجه‌ی سـانتی‌گـراد سـانتریفیوژ (بـه مـدت ۵ دقیقـه در g×۱۲۰۰۰ و ٤ درجـه‌ی سانتی‌گراد) گردید. مایع رویی را دور ریخته، رسوب بـه‌طـور کامل خشک گردید. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بـافر TE یا آب مقطر استریل اضـافه کـرده، ٤٥ دقیقـه در ۳۷ درجـه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه نـانودراپ غلظت DNA حاصـل انـدازه‌گیـری شـد. یـک میکرولیتـر از محلول ژنومی حاصل را (به عنـوان تمپلیـت) بـه تیـوپ‌هـای مخـــصوص PCR وارد و در فریـــزر منهـــای ۲۰ درجـــه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در موقع لزوم هر یک از تیوپ‌هـای حاوی ۱ میکرولیتر تمپلیت از فریزر خارج و با تهیه‌ی گرادیان از آن، جهت انجام PCR استفاده گردید.

انتخاب پرایمر: ترادف ژن رفرانس ent D از بانـک ژنـی بـه شماره‌ی GenBank: M28521.1 اخذ گردید، بـا بررسـی مقالات متعدد، پرایمری که بیشتر مورد استفاده محققـان قـرار گرفته بود، انتخاب (۱۷) و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید. ترادف این پرایمرها به قرار زیر بود.

F: 5'- AGTAAAAGAGAAAGAATTGC - 3'
R: 5'-TTTTCATATAAATAGATGTCAATATG - 3'

واکنش PCR: واکنش PCR طبـق پروتکـل ارایـه شـده در جدول ۱ انجام شد. به منظـور بهینـه سـازی شـرایط PCR از گرادیان درجـه حـرارت (۵۳ الـی ۶۳ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد)،

گرادیان غلظت کلراید منیزیم (۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌مولار)، و گرادیان غلظت تمپلیت (۱۰ الی ۱۰۰ پیکوگرم در میکرولیتر از ژنوم استخراج شده) به‌کار برده شد. این واکنش با دستگاه C1000, Thermal Cycler ساخت شرکت Bio- RAD انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ تا ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت تابش نور ماورای بنفش (دستگاه ژل داک) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از کیت استخراج محصول PCR باند مورد نظر تخلیص و جهت تعیین ترادف به شرکت ایرانی نسل امید ارسال گردید.

جدول۱: شرایط انجام PCR جهت تشخیص ent D در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

PCR Condition reaction		Master Mix	
Time	**Condition reaction**	**reagents**	**reagents**
۳ min	۹۵°C	۱۷ µl	D.D. Water
		۱۰ ng/1µl	Template DNA
۳۰ sec	۹۵°C	۲/۵ µl	Buffer 1X
۳۰sec/ ۳۵ Cycles	۵۳°C	۱/۲ mM/1µl	MgCl2
۵ min	۷۲°C	۰/۴ mMeach/1µl	dNTP
		۰/۷ µM/1µl	F- Primer
۵ min	۴°C	۰/۷ µM/1µl	R- Primer
		۱/۲۵ unit/1µl	Taq enzyme
		۲۵/۵	مجموع

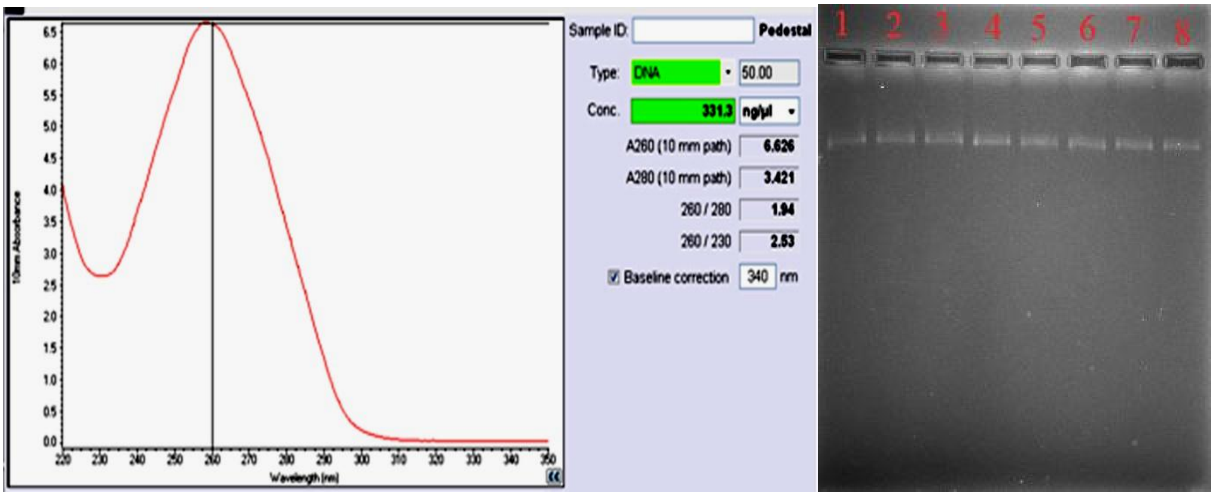
تشخیص انتروتوکسین D: تمام سویه‌هایی که با استفاده از روش مولکولی PCR ناقل ژن انتروتوکسین D تشخیص داده شدند. به محیط کشت BHI- broth تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری سانتریفوژ گردید و مایع‌رویی جهت بررسی وجود انتروتوکسین D با استفاده از کیت الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور انجام آزمایش الیزا از کیت اختصاصی تشخیص ۵ انتروتوکسین شایع استافیلوکوکوس آرئوس (RIDASCREEN SET A,B,C,D,E: Art. No.: R4101) ساخت شرکت آلمانی r-Biopharm طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده استفاه گردید.

یافته‌ها

نتایج آزمون‌های فنوتیپی تمام سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق، استافیلوکوکوس آرئوس بودن آن‌ها را تأیید کرد. به این ترتیب ۳۱۰ سویه استافیلوکوکوس

آرئوس کواگولاز مثبت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج استخراج ژنوم تک‌تک سویه‌ها با روش Salting out تغییر یافته قابل مقایسه با نتایج حاصل از کیت‌های تجاری بود. شکل ۱ اندازه‌گیری غلظت ژنوم استخراج شده از استافیلوکوکوس آرئوس و الکتروفورز آن را نشان می‌دهد.

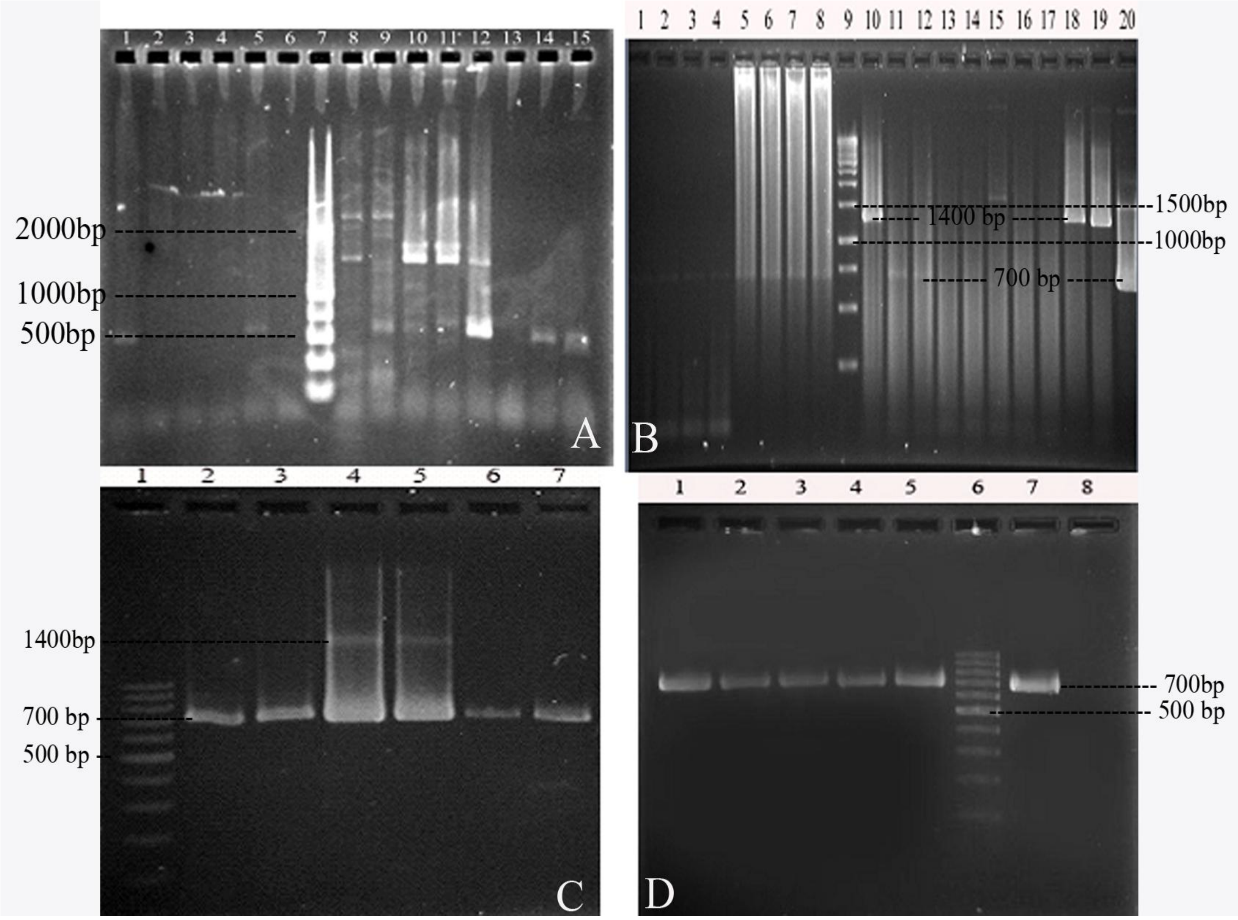


شکل ۱: تصویر سمت چپ، اندازه گیری DNA استخراج شده از استافیلوکوکوس آرئوس که با غلظت‌های $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۳}$ به عنوان تمپلیت استفاده می‌شد. تصویر سمت راست، الکتروفورز ۲ تا ۳ میکرولیتر ژنوم استخراج شده از نمونه‌ها با روش Salting out (چاهک‌های ۱ الی ۴) و نیز استخراج ژنوم توسط کیت Genomic DNA Extraction شرکت BIONEER (چاهک‌های ۵ الی ۸) نشان داده شده است.

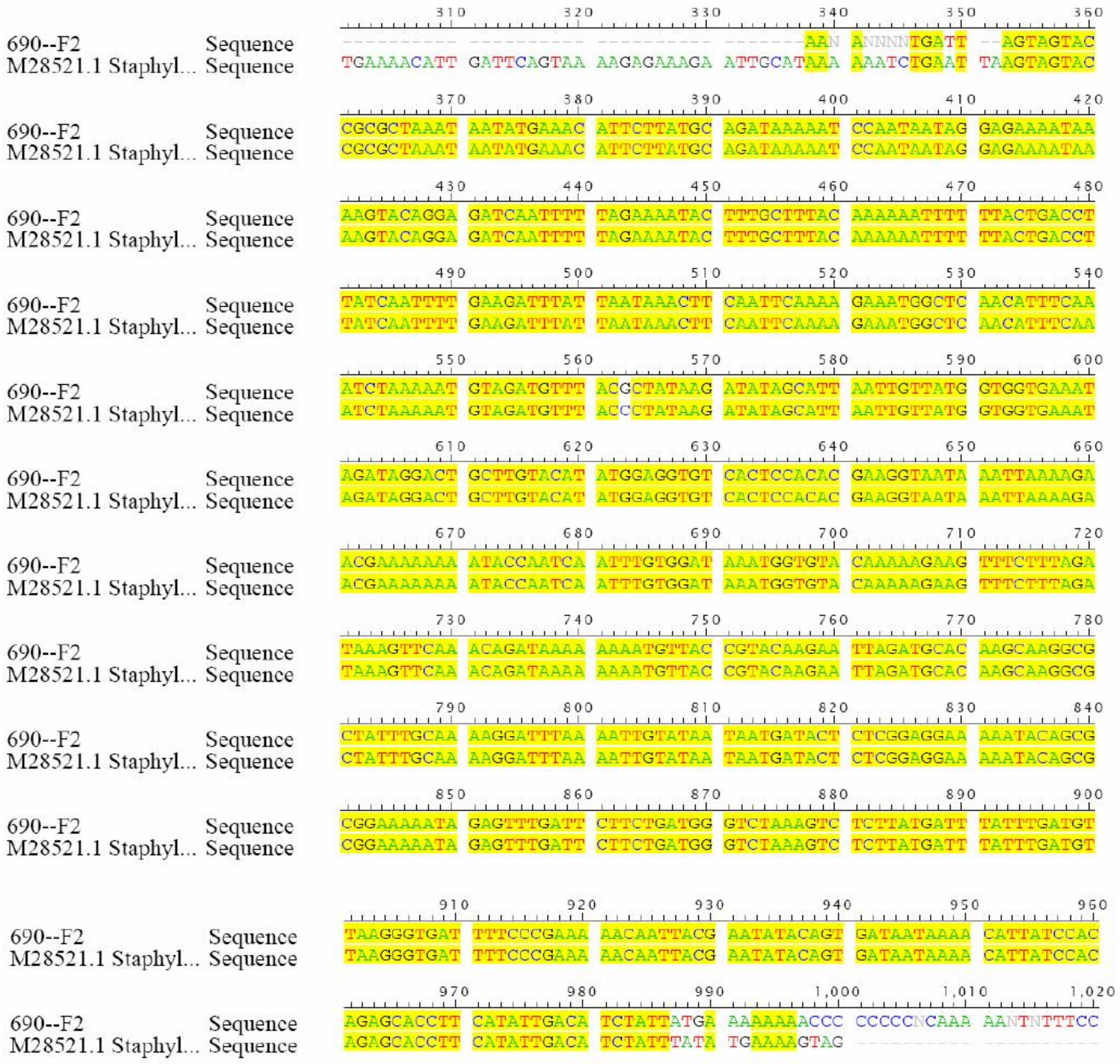
نتایج روند بهینه سازی تکثیر ent D در شکل ۲ نشان داده شده است. در تصویر A؛ ایجاد شرایط بهینه PCR با گرادیان دمایی و نیز گرادیان $MgCl_2$ نشان داده شده است. در شرایط معمولی تکثیر ent D باندهای مختلف ایجاد نمود (چاهک‌های شماره ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ تصویر A را نگاه کنید). چنانچه ملاحظه می‌گردد؛ با ایجاد شرایط بهینه، محصول PCR در چاهک ۱۰ و ۱۱ یک باند قوی در ناحیه‌ی ۱۴۰۰ bp و یک باند ضعیف در ناحیه‌ی ۷۰۰ bp نشان داده شده است. در چاهک‌های ۱، ۵، ۱۴ و ۱۵ الکتروفورز باند محدوده‌ی ۷۰۰ bp را نشان داده است. در هر حال، باندهای محدوده‌ی ۷۰۰ bp و ۱۴۰۰ bp را از ژل جدا و به عنوان تمپلیت استفاده گردید. در حقیقت نتیجه‌ی PCR محصول مرحله‌ی اول در تصویر B ارایه شده است؛ چاهک‌های ۱الی ۸ و ۱۱ و ۱۲ PCR باند محدوده‌ی ۷۰۰ bp را نشان داده است. چاهک‌های ۱۰، ۱۸ و ۱۹ PCR باند محدوده‌ی ۱۴۰۰ bp را نشان می‌دهد. چاهک ۲۰ در تصویر B محصول PCR مرحله‌ی اول می‌باشد. چاهک‌های ۲، ۳، ۶ و ۷ تصور C الکتروفورز محصول تخلیص PCR است که قطعه‌ی bp ۷۰۰ را به‌طور خالص نشان داده است. در تصویر D، آماده سازی غلظت مناسب از قطعه خالص شده جهت ارسال برای تعیین سکانس نشان داده شده است.

نتایج تعیین سکانس ent D: نتایج تعیین سکانس محصول PCR در شکل ۳ نشان داده شده است. در این تحقیق، از پرایمرهای استفاده شد که یک قطعه حدود ۷۰۰ bp را

تکثیر نموده است. در منابع موجود برای پیش ساز ent D حدود ۱۰۶۸ نوکلئوتید ذکر شده است. سکانس اصلی ژن از نوکلئوتید ۲۹۲ شروع می‌گردد. این در حالی است که سکانس ارایه شده در بانک ژن از نوکلئوتید ۲۲۴ شروع و تا نوکلئوتید شماره‌ی ۱۰۰۰ ادامه یافته است. در هر حال، چنانچه در شکل ۳ نشان داده شده است، Multiple Alignment سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس ژن استاندارد انطباق تقریباً ۹۹ درصدی را نشان می‌دهد. چنانچه حد فاصل بین نوکلئوتید ۳۵۳ الی ۹۸۶ این وضعیت را نشان داده است. افزون بر این Blast قطعه‌ی تعیین سکانس شده مشابهت ۹۹ درصدی را با تمام ژن‌های ent D اعم از پلاسمیدی یا کروموزومی را نشان داده است.



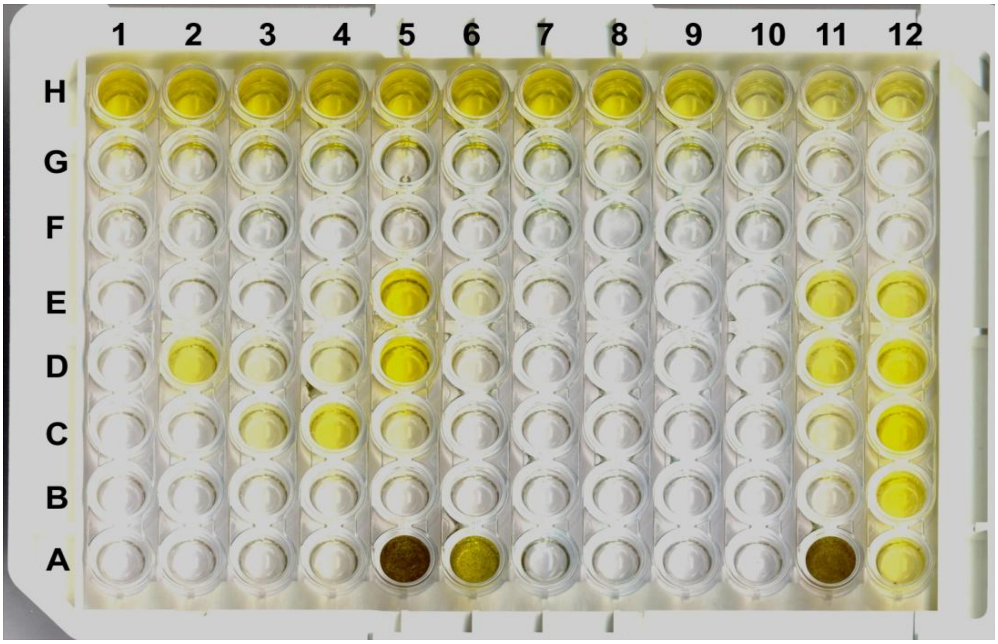
شکل ۲: روند تشخیص و خالص سازی ent D در سویه بومی استافیلوکوکوس آرئوس جهت تعیین سکانس نشان داده شده است. در تصویر A چاهک ۷ و در تصویر B چاهک ۹ راهنمای وزن مولکولی 1kb است. در تصویر A چاهک‌های ۸ الی ۱۲ روند بهینه‌سازی PCR را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌گردد، در چاهک ۱۲ شرایط بهینه PCR ایجاد شده است. تصویر B جداسازی باندهای ۷۰۰ bp و ۱۴۰۰ bp از ژل با درجه‌ی حرارت ذوب پایین و الکتروفورز آن‌ها را نشان داده شده است. در تصور C چاهک ۱ و در تصویر D چاهک ۶ استاندارد وزن مولکولی ۱۰۰ bp می‌باشند. در تصویر C چاهک های ۴ و ۵ شرایط بهینه شده PCR و ایجاد قطعات ۷۰۰bp و ۱۴۰۰ bp را نشان می‌دهد. چاهک های ۲، ۳، ۶ و ۷ تخلیص قطعه‌ی ۷۰۰bp را نشان داده است. تصویر D تهیه‌ی مقدار لازم از قطعه‌ی ۷۰۰bp جهت تعیین سکانس می‌باشد.



شکل ۳: مقایسه‌ی سکانس رشته‌ی Forward حاصل از این تحقیق (690-F2) با سکانس Forward ژن استاندارد انتروتوکسین D استافیلوکوکوس آرئوس موجود در بانک ژنی با کد M28521.1 نشان داده شده است.

نتـایج آزمـون الیـزا جهـت تأییـد تولیـد انتروتوکسـین D:
نتایج آزمون الیزا روی سویه‌هایی کـه دارای ent D بودنـد در شکل ۴ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد، ستون ۳ سویه‌ای از باکتری را نشان می‌دهد که فقط انتروتوکسین D را تولیـد نمـوده اسـت. سـتون ۳ و ۴ سـویه‌هـایی از اسـتافیلوکوکوس را نـشان مـی‌دهـد کـه بـه طـور ضـعیف انتروتوکسین D و نیز مقـدار کمـی انتروتوکـسین C را تولیـد نموده‌اند. با این حال واکنش PCR وجود ent D را در آن‌ها تأیید می‌کرد. ستون‌های ۵ و ۱۱ سویه‌هایی از باکتری را نـشان داده اسـت کـه عـلاوه بـر تولیـد انتروتوکـسین D انتروتوکسین‌های A و E را نیز تولید نموده است. سـتون ۱۲ سـویه‌ای از اسـتافیلوکوکوس را نـشان مـی‌دهـد کـه ۵

انتروتوکسین شایع را تولید نموده است. ستون‌های ۱، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ سویه‌ای از استافیلوکوکوس آرئوس کواگولاز مثبت را نشان می‌دهد که هیچ یک از انتروتوکسین‌ها را تولید نکرده است. واکنش PCR این سویه‌ها نیز ژن ent D را نشان نداد. در این تصویر ردیف H مربوط به گرادیانی از غلظت استاندارد انتروتوکسین (۲ تا ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر) موجود در کیت بوده است.



شکل ۴: نتیجه‌ی واکنش الیزا توسط پلیت از قبل تهیه شده موجود در کیت ***RIDASCREEN SET A,B,C,D,E ساخت شرکت آلمانی r-Biopharm نشان داده شده است. آزمون الیزا طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده انجام و تصویر پلیت حاصل اسکن شده است. بنابراین تصویر فوق نشان دهنده‌ی سطح زیرین پلیت می‌باشد.***

در هر حال، نتایج بررسی مولکولی ۳۱۰ سویه‌ی استافیلوکوکوس آرئوس حاکی از آن بود که ۲۴ درصد سویه‌ها حاوی ژن ent D بودند. اما نتایج آزمون الیزا نشان داد، تنها ۱ درصد سویه‌ها فقط ژن ent D را به تنهایی دارا بودند و ۲۳ درصد باقی مانده به همراه انتروتوکسین D سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید کردند.

بحث

در این تحقیق تجربی با استفاده از روش مولکولی PCR ژن ent D در ۲۳ درصد سویه‌ها شناسایی شد و توانایی آن‌ها در تولید انتروتوکسین D در سطح حساسیت کیت RIDASCREEN SET A,B,C,D,E (۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر) مورد تأیید قرار گرفت (به شکل ۴ نگاه کنید). تنها ۱ درصد کل سویه‌هایی که ناقل ent D بودند انتروتوکسین تیپ D را به تنهایی تولید کردند. در حالی‌که سایر سویه‌ها به همراه انتروتوکسین D، سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید می‌کردند. علت این امر به طور دقیق مشخص نیست و نمی‌توان نشان داد چرا یک سویه باکتریایی قادر است بیش ازیک انتروتوکسین را تولید نماید. این موضوع توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. چنان‌که در سال ۲۰۰۹ میلادی

Ifesan و همکاران نشان دادند، برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس بیش از یک انتروتوکسین تولید می‌نمایند (۱۸). امروزه به منظور شناخت دقیق‌تر نقش انتروتوکسین D و تعیین گیرنده‌های اختصاصی آن تحقیقات فراوانی انجام شده یا در حال انجام است (۱۹و۲). شاید یکی از دلایل تحقیقات گسترده در خصوص تشخیص و تعیین نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرئوس تحریک تولید IL-1β و TNF-α (۲۰) باشد. این امر حاکی از آن است که، این سموم در ایجاد بیماری‌های مختلف دخالت دارند. لذا، طراحی روش‌های استاندارد تشخیص سریع سویه‌های تولیدکننده‌ی انتروتوکسن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. چنان‌که در سال ۱۹۹۳ میلادی He, X و Matsumoto, Y و همکاران نقش انتروتوکسین D استافیلوکوکوس آرئوس را در افزایش تولید فاکتور آرتریت روماتوئید و نیز در ایجاد بیماری‌های خود ایمنی نشان دادند (۲۲و ۲۱). در هر حال، تنوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌ها ضرورت پرداختن به توسعه‌ی روش‌های تشخیصی نوین را اجتناب ناپذیر نموده است (۲۴و۲۳). برخی از کشورها برای هریک از سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین روش های استاندارد طراحی و ارایه نموده و معیارهای لازم برای تشخیص سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین را در نمونه‌های مختلف مواد غذایی یا نمونه‌های بالینی ارایه داده‌اند. مثلاً مرکز کنترل باکتری‌ها در امریکا (ATCC) برای تمام گروه‌های باکتریایی روش استاندار تعیین نموده است. با توجه به اینکه دست‌یابی به استاندارد موجود غیر عملی و ممکن است با صرف هزینه‌های هنگفت همراه باشد. به علاوه ممکن است، تغییرات جغرافیایی بر پایداری ویژگی‌های تعریف شده در نمونه‌ی استاندارد خارجی با شرایط منطقه‌ای سازگار نباشد. لذا، تعیین استانداردهای لازم برای تشخیص سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرئوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین‌ها از جمله انتروتوکسین D اجتناب ناپذیر شده است؛ زیرا، بروز تغییرات ژنتیکی در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس آرئوس نشان داده شده است (۲۵). از این رو، در این تحقیق، با انتخاب پرایمر مناسب روشی جهت تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین D طراحی و ارایه شده است. زیرا، تنها اتکا به کواگولاز مثبت بودن استافیلوکوکوس‌ها در نمونه‌های بالینی کافی نیست. گزارشات فراوانی در دست است که نشان می‌دهد، سویه‌های کواگولاز مثبت انتروتوکسین تولید نمی‌کنند؛ بر عکس برخی از سویه‌های کواگولاز منفی در نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های غذایی انواع مختلف انتروتوکسین‌ها را تولید نموده‌اند. با آنکه در گزارشات مختلف فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین متفاوت (۳/۵ تا ۷۰ درصد) گزارش شده است (۲۹-۲۶)، اما در کشور ما به‌دلیل نبود سویه‌ی استاندارد آمار دقیقی از بروز عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌های ارئوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین D در دست نیست. در این تحقیق با استاندارد سازی روش تشخیص سویه‌ی تولید کننده انتروتوکسین D زمینه‌ی بررسی‌های اپیدمیولوژیک در نمونه‌های بالینی و نیز در آلودگی‌های غذایی فراهم شده است. به این ترتیب سویه‌ی استاندارد شده حاضر آماده تحویل به سایر محققین می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این طرح با بودجه‌ی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی طراحی و انجام شده است. بدین لحاظ نویسندگان از حمایت و پشتیبانی‌های استاد محترم دکتر مصطفی قانعی تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از دکتر محمد جواد سلطانپور و دکتر محمد رهبر جهت واگذاری سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بیمار تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Lin CM, Chiang YC, Tsen HY. Development and use of a chromogenic macroarray system for the detection of *Staphylococcus aureus* with enterotoxin A, B, C, D, E, and G genes in food and milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2009; 6: 445-52.

2- Efuntoye MO, Adetosoye AI. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. *East Afr Med J*. 2003; 80: 656.

3- Oliveira AM, Padovani CR, Miya NT, Sant'ana AS, Pereira JL. High incidence of enterotoxin D producing Staphylococcus spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 159-63.

4- Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*. 1989;171: 4799-806.

5- Marta D, Wallin-Carlquist N, Schelin J, Borch E, Radstrom P. Extended staphylococcal enterotoxin D expression in ham products. *Food Microbiol*. 2011; 28: 617-20.

6- Giezendanner N, Meyer B, Gort M, Muller P, Zweifel C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2009; 151: 329-31.

7- Tollersrud T, Kampen AH, Kenny K. *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. *Infect Immun*. 2006; 74: 3507-3512.

8- Beckers HJ, Van Leusden FM, Tips PD. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in shrimp. *J Hyg (Lond)*. 1985; 95: 685-93.

9- Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Izadi M, Hosseini SMJ, Ataee MH. Bacterial meningitis: a new risk factor. *JRMS.* 2011; 16: 207-10.

10- Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Gotz F: Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127: 246-51.

11- Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 53: 67-72.

12- Malam JE, Carrick GF, Telford DR, Morris JA. Staphylococcal toxins and sudden infant death syndrome. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 716-21.

13- Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol*. 2002; 85: 61-7.

14- Limbago B, Fosheim GE, Schoonover V, et al. Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected in 2005 and 2006 from patients with invasive disease: a population-based analysis. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1344-51.

15- Gould IM, Girvan EK, Browning RA, MacKenzie FM, Edwards GF. Report of a hospital neonatal unit outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Epidemiol Infect. 2009; 137: 1242-48.

16- Sombrok J, Rufell WD. Molecular Cloning. Coldspring, Vol 1. New York; 2001.

17- Brown CR, Bingham AHA. Expression of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type D in *Escherichia coli* X1776. FEMS Microbiology Letters. 1991; 80: 299-304.

18- Li YF, Zhong L, Zhu XH, Zhu XH, Yang J. Study on the TCR Vbeta binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin D. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2004; 20: 757-9.

19- Al-Daccak R, Mehindate K, Damdoumi F, Etongue-Mayer P, Nilsson H, Antonsson P *et al*. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors. *J Immunol*. 1998; 160: 225-32.

20- He X, Goronzy JJ, Weyand CM. The repertoire of rheumatoid factor-producing B cells in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1993; 36: 1061-9.

21- Matsumoto Y, Fujiwara M. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by staphylococcal enterotoxin D. *Cell Immunol*. 1993; 149: 268-78.

22- Monecke S, Ehricht R, Slickers P, et al. Microarray-based genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from camels. *Vet Microbiol*. 2011; 150: 309-14.

23- Varshney AK, Wang X, Cook E, et al. Generation, characterization, and epitope mapping of neutralizing and protective monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *J Biol Chem*. 2011; 286: 9737-47.

24- Hallin M, De MR, Denis O, et al. Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Genet Evol*. 2011; 11: 290-9.

25- Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006; 367: 731-9.

26- Humphreys H, Keane CT, Hone R, et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J Med Microbiol*. 1989; 28: 163-72.

27- Normanno G, Corrente M, La SG, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2007; 117: 219-22.

28- Gonano M, Hein I, Zangerl P, Rammelmayr A, Wagner M. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. *Epidemiol Infect*. 2009; 137: 688-99.

29- Peeva T, Gogov I. Presence of enterotoxin D in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food products. *Vet Med Nauki*. 1983; 20: 67-71.

Standardization of the Molecular Method for Detection of the ent D in Staphylococcus Aureus Isolated from Human Infections: and Sequence Determination

Ataee RA[1], Karami A[2], Sorouri Zanjani R[3], Baghery M[4]

[1]Dept. of Medical Microbiology and Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran.

[2]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran.

[3]Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[4]Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran.

Corresponding Author: Ataee RA, Dept. of Medical Microbiology and Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran.

E-mail: ataee@bmsu.ac.ir

Received: 12 Jul 2011 **Accepted:** 12 Sep 2011

Background and Objectives: Staphylococcal enterotoxin D as a supper antigen is produced by infected samples of human and animal sources. The aim of this study was to standardize the detection methods for the *Staphylococcus* strain producing enterotoxin D.

Materials and Methods: A PCR method was set up for detection of enterotoxin D gene (*ent D*) in Staphylococcus aureus samplesisolated from the human subjects (310 strains isolated from clinical samples). The specific PCR-product (a band about 700 bp) was purified and sent off for DNA sequencing. Blast analysis showed a 99% identity with the standard gene sequence from Genebank. The ability to produce enterotoxin D by all strains carrying *ent D* was analyzed by using an ELISA kit.

Results: The results of this study show that the PCR method has been well set up. There were two PCR products obtained by the primer pair, one at 700 bp and another at 1400 bp. Both bands were gel purified and sent for DNA sequencing. The results, based on the alignment with the standard *ent D* sequences from GenBank, suggest that *ent D* is contained within the 700-bp product. Production of the entrotoxin D in the positive strains was confirmed by ELISA.

Conclusion: Based on the available information, coagulase positive *Staphylococcus aureus* strains are recorded in clinical samples. However, there is no routine method available to analyze the ability of the bacterial strains for producingtoxins including enterotoxin D. This study represents a simple, fast, and standard method for verification of the bacteria enterotoxin D and the strains producing it.

Keywords: Staphylococcus aureus, ent D, PCR