

استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن entC استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از عفونت‌های انسانی و تعیین سکانس آن

رمضانعلی عطایی^{۱*} PhD، مهدی کامالی^۲ PhD، رضا رنجبر^۳ PhD، علی کرمی^۴ PhD، محمود قربانی^۲ MSc

^۱گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

^۲مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

^۳تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

^۴مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف این تحقیق استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن انتروتوکسین C استافیلوکوکوس آرتوس می‌باشد.

روش‌ها: با استفاده از ژن استاندارد موجود در بانک ژن پرایمر طراحی گردید، سپس روش مولکولی PCR جهت تشخیص entC در استافیلوکوکوس آرتوس‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی (۳۰۰ سویه جدا شده) set up گردید. محصول PCR تعیین سکانس و با ژن استاندارد مقایسه شد. همچنین، توانایی تولید انتروتوکسین C در تمام سویه‌های ناقل ژن entC نیز با کیت الیزا بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، روش مولکولی PCR با پرایمرهای مختلف به خوبی set up شده است. زیرا، با جفت پرایمر اول قطعه ۱۰۲ bp و با جفت پرایمر دوم قطعه ۱۲۲۳ bp تکثیر شد. نتایج مقایسه سکانس حاصل از باند ۱۲۲۳ bp با ژن استاندارد انطباق ۹۹ درصدی را نشان داد. ترجمه آنها وجود تنها اختلاف در جایگاه ۲۱۸ یعنی آلانین به جای والین بود. همچنین، نتایج توکسین‌زایی سویه‌های ناقل ژن entC با آزمون الیزا حاکی از آن بود که ۳۷ درصد سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی حاوی entC می‌باشند.

نتیجه‌گیری: علاوه بر سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس کوآگولاز مثبت سویه‌های کوآگولاز منفی نیز انتروتوکسین‌های سوپر آنتی‌ژن را تولید می‌نمایند. تحقیق حاضر روشی ساده و سریع جهت تأیید توانایی توکسین‌زایی باکتری ارایه و تشخیص سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین C را استاندارد سازی نموده است. زیرا، تشخیص انتروتوکسین‌های سوپر آنتی‌ژن می‌تواند راهنمای با ارزشی جهت درمان مناسب و پیشگیری از عوارض بعدی آنها باشد.

کلیدواژه‌ها: استاندارد سازی، استافیلوکوکوس آرتوس، entC و PCR

Standardization of Molecular Diagnostic of the entC Staphylococcus Aureus Isolated from Human Infections and Determine its Sequence

Ataee R. A.¹ PhD, Kamali M.³ PhD, Ranjbar R.⁴ PhD, Karami A.⁴ PhD, Ghorbani M.² MSc

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Nanotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The aim of this study was to standardize the molecular detection Staphylococcus aureus enterotoxin C gene method.

Methods: Based on gene bank data, the PCR molecular method was set up for detection of entC gene in Staphylococcus aureus isolated from human subjects (300 isolated strains were assayed). The PCR Product was sequenced and were compared with the standard gene. By using the ELISA test, ability to produce enterotoxin C of all strains which hair born entC gene were evaluated and analyzed by ELISA kit.

Results: The results showed that the molecular technique of PCR is well set up. Because, the first primer pair amplified a 102bp fragment and the second primer pair were amplified a 1223bp fragment with ease. Multiple Alignment the sequence of 1223bp fragment with the reference gene showed 99 percent compliance. They translated form shows only difference in position 218 which the alanine was replace the valine. Using ELISA test the toxigenicity of all strain containing entC gene was shown that the 37% of strains contained the entC gene.

Conclusion: In addition to coagulase positive Staphylococcus aureus strains coagulase negative strains also have ability to produce supperantigenic enterotoxins. This research provides a simple and quick confirmation and identification method of which capable detect enterotoxin C-producing strains and it has been standardized. Because of the diagnosis the supperantigens could represent valuable guide for proper treatment and prevention of complications of them.

Keywords: Standardization, Staphylococcus aureus, entC and PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس آرتوس شایعترین ارگانیزم بیماریزای فرصت طلب می باشد که در بینی ۳۰ درصد افراد به صورت ناقل سالم گزارش شده و بیش از ۵۰ درصد سویه های جدا شده از نمونه های انسانی توکسین تولید می نمایند [۲، ۱]. در سال های اخیر به دلایل متعدد، توکسین زایی سویه های استافیلوکوکوس آرتوس مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. این دلایل عبارتند از: الف) برخی از سویه های کوگولاز منفی نیز قادرند انتروتوکسین های عامل مسمومیت غذایی را تولید نمایند [۳]، این امر اعتبار آزمون کوگولاز را در نشان دادن بیماریزایی این باکتری ها کم رنگ نموده است. ب) همه توکسین های تولید شده توسط این باکتری ها دارای فعالیت سوپرآنتی ژنی می باشند که قادرند اثرات متعددی در میزبان برجای گذارند [۴، ج]، ارتباط آنها با برخی از بیماری های غیر گوارشی گزارش شده است [۵، د]، نشان داده شده است، استافیلوکوکوس های تولید کننده توکسین سندرم شوک سمی همیشه انتروتوکسین تیپ C را تولید می نمایند [۷، ۸، ذ]، کاربرد برخی از انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی به عنوان داروی ضد سرطان [۸-۱۰] و نیز به عنوان تسریع دهنده درمان شکستگی ها در مدل حیوانی گزارش شده است [۱۱]. با آن که فراوانی سویه های توکسیژن استافیلوکوکوس آرتوس در عفونت های انسانی به طور دقیق تعیین نشده است اما گزارشات فراوانی وجود دارد که نشان داده است این باکتری ها از فراورده های لبنی [۱۲] و عفونت های مختلف جدا شده اند [۱۳]. تاکنون ۲۰ نوع مختلف آنتی ژنیک آنتروتوکسین های استافیلوکوکوس آرتوس نام گذاری و معرفی شده است [۱۴]. آنتروتوکسین تیپ C یکی از ۵ انتروتوکسین شایع می باشد که در ایجاد مسمومیت غذایی و سندرم شوک سمی دخالت دارد. نشان داده شده است که SEC (Staphylococcal Enterotoxin C) در افزایش شدت بیماری در عفونت زایی تجربی مدل حیوانی نقش داشته است. این توکسین دارای ۳ بیوتیپ می باشد (SEC۱، SEC۲ و SEC۳). در هر حال، شهرت انتروتوکسین های استافیلوکوکوس دخالت آنها در ایجاد مسمومیت غذایی است. البته شواهد موجود حاکی از آن است که مسمومیت غذایی ناشی از تولید انتروتوکسین ها در شرایط *In vitro* می باشد. لذا خوردن غذای آلوده می تواند با ایجاد مسمومیت غذایی همراه گردد. این امر نشان دهنده مقاومت انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی نسبت به آنزیم های گوارشی است. هر چند مکانیسم سوپرآنتی ژنی و نیز عملکرد آنها در دستگاه گوارش به طور دقیق مشخص شده است اما مکانیسم اثر آنها در ارگان های غیر از دستگاه گوارش نامعلوم است. عقیده بر آن است که ژن رمز کننده انتروتوکسین C (entC) استافیلوکوکوس آرتوس روی پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک ها قرار دارد [۱۵]. به همین دلیل امکان انتشار و فراوانی آن دور از انتظار نیست. لذا بعد از انتروتوکسین تیپ A انتروتوکسین تیپ C به عنوان فراوان ترین عامل مسمومیت غذایی ناشی از مصرف لبنیات معرفی شده است. در هر حال، با آن که ارتباط بین entC و entA مشخص نیست، برخی سویه های تولید کننده انتروتوکسین C به طور هم زمان، سایر انتروتوکسین ها و نیز توکسین عامل سندرم شوک سمی را نیز تولید می نمایند. به این ترتیب، بروز اپیدمی های مسمومیت غذایی شایع است [۱۶]. در هر حال، با توجه به پراکندگی گسترده استافیلوکوکوس ها در طبیعت و توانایی تولید انواع مختلف انتروتوکسین همیشه خطر آلودگی انواع مختلف خوراکی ها به انتروتوکسین ها وجود دارد. حتی آلودگی آبیان از جمله: میگوها به انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی نیز گزارش شده است [۱۷]. نکته قابل توجه آن است که انتروتوکسین ها

تنها توسط استافیلوکوکوس آرتوس های کوگولاز مثبت تولید نمی گردد، بلکه در سال های اخیر نشان داده شده است که استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین ها می باشند [۱۹، ۱۸]. نقش انتروتوکسین ها در ایجاد بیماری های غیر گوارشی نامشخص است اما با این حال، در موارد متعددی حضور ژن انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی در بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک، پسوریازیس و اریتمها مشاهده شده است [۲۰]. این امر حکایت از نقش احتمالی انتروتوکسین ها در ایجاد برخی بیماری ها دارد. چنانچه در سال ۱۹۹۲ میلادی Malam و همکاران، مرگ های ناگهانی اطفال را ناشی از تجمع انتروتوکسین های استافیلوکوکوسی در کلیه ها ذکر نموده اند [۲۱]. نکته قابل توجه آن است که بسته به منطقه جغرافیایی در ترادف ژن رمز کننده انتروتوکسین ها تنوع وجود دارد [۲۲]. اما معلوم نیست اختلاف در ترادف ژنی باعث تغییر ترادف اسید آمینه ای و نیز در آنتی بادی های اختصاصی نیز می گردد یا نه. در هر حال، تشخیص استافیلوکوکوس آرتوس بیماریزا مبتنی بر تست کوگولاز می باشد، از طرفی استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین های سوپرآنتی ژن می باشند، لذا تشخیص توکسین زایی این باکتری ها در کنار تست کوگولاز می تواند راهنمای مفیدی جهت درمان صحیح و پیش گیری از عوارض بعدی باشد. این امر ضرورت استاندارد سازی روش تشخیص سویه های تولید کننده انتروتوکسین به ویژه به منظور بررسی های اپیدمیولوژیک را اجتناب ناپذیر نموده است. افزون بر این، بین توانایی تولید انتروتوکسین ها و ایجاد مقاومت به متی سیلین گزارشاتی وجود دارد [۲۳، ۲۴]. اما معلوم نیست ایجاد مقاومت به متی سیلین باعث القای تولید انتروتوکسین ها می گردد یا برعکس. با توجه به مطالب فوق، هدف این مطالعه، استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن انتروتوکسین C استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های بالینی می باشد.

روش ها

مواد مورد نیاز: مواد ملکولی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت ایرانی سیناژن که ارایه دهنده محصولات فرمنتاز است خریداری گردید. همچنین، محیط های کشت مورد استفاده از شرکت آریا وجد ارایه دهنده محصولات مرک آلمان خریداری شد. کیت استخراج محصول PCR (DNA Extraction; Cat. No. K-۳۰۳۲, Lot No. ۱۰۰۳۲) از شرکت تکاپوزیست، ارایه دهنده محصولات شرکت Bioneer خریداری گردید. کیت تشخیص آنتروتوکسین ها از شرکت روکت اینترنشنال ارایه دهنده محصولات شرکت r-Biopharm خریداری گردید.

روش کار: در این تحقیق تجربی (Experimental) روش تشخیص ژن انتروتوکسین C (entC) در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از بیماران طراحی و set up گردید. سپس ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های بالینی بررسی شدند. همچنین، تولید انتروتوکسین C در سویه های حاوی ژن entC با (RIDASCREEN SET A,B,C,D,E: Art. No.: R۴۱۰۱) بررسی گردید. همچنین، با روش ایمونوبلات و استفاده از آنتی بادی پلی کلونال منواسپسیفیک اختصاصی انتروتوکسین تیپ C (Rb PAb) Staphylococcus Enterotoxin C ۵۰۰ Ug (۱mg/ml), (Ab ۱۵۸۹۷, Abcam) مورد تأیید قرار گرفت.

معیار انتخاب سویه های باکتریایی: معیار انتخاب سویه های باکتریایی از این قرار بود. باکتری های جدا شده از کشت نمونه های عفونی با مشخصات کوکسی گرم مثبت با آرایش خوشه انگوری، کاتالاز مثبت، کوگولاز مثبت، DNase مثبت و توانایی رشد در محیط مانیتول سالت

دمایی (۴۶ الی ۵۶ درجه سانتیگراد)، گرادیان غلظت کلراید منیزیم (۵/۱ - ۸/۰ میلی مولار)، و گرادیان غلظت تمپلت (۱۰ الی ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از ژنوم استخراج شده) بکاربرده شد. این واکنش با دستگاه Thermal Cycler, C۱۰۰۰ ساخت شرکت Bio-RAD انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ تا ۵/۱ 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.

با توجه به اینکه ممکن است، بخش تشکیل دهنده قطعه ۱۰۲bp با سایر انتروتوکسین‌ها مشترک باشد. لذا، پرایمرهای F۲ و R۲ که تکثیر کننده ژن entC به طور کامل بود و قطعه ۱۲۲۳bp را تکثیر می‌کرد طراحی و بکار برده شد. در حقیقت واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه ۱۲۲۳bp طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۲ انجام شد. به منظور بهینه سازی شرایط PCR از گرادیان درجه حرارت (۵۳ الی ۹۶/۲ درجه سانتیگراد)، گرادیان غلظت کلراید منیزیم (۲ - ۱ میلی مولار)، و گرادیان غلظت تمپلت (۱۰ الی ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از ژنوم استخراج شده) بکاربرده شد.

تشخیص انتروتوکسین‌زایی: تمام سویه‌هایی که با استفاده از روش مولکولی PCR ناقل ژن انتروتوکسین C تشخیص داده شدند، به محیط کشت BHI- broth تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جهت بررسی وجود انتروتوکسین C با استفاده از کیت الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، به عنوان کنترل کیفی، توکسین‌زایی سویه‌های فاقد ژن entC نیز مورد آزمایش الیزا قرار گرفتند.

به منظور انجام آزمایش الیزا از کیت اختصاصی تشخیص ۵ انتروتوکسین شایع استافیلوکوکوس آرنوس (RIDASCREEN SET) ساخت شرکت آلمانی - r-Bi-pharm طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمون‌های فنوتیپی تمام سویه‌ها، استافیلوکوکوس آرنوس بودن آنها را تأیید کرد. به این ترتیب ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرنوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج استخراج ژنوم تک تک سویه‌ها با روش Sal- ing out تغییر یافته قابل مقایسه با نتایج حاصل از کیت‌های تجاری بود. شکل ۱ اندازه گیری غلظت ژنوم استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس و الکتروفورز آن را نشان می‌دهد.

نتایج روند بهینه سازی تکثیر بخشی از ژن entC در شکل ۲ نشان داده شده است. در تصویر A؛ PCR با گرادیان دمایی (۴۶ الی ۵۶ درجه سانتیگراد) و نیز گرادیان $MgCl_2$ (۵/۱ - ۸/۰) میلی مولار نشان داده شده است. در شرایط غیر اپتیمم تکثیر entC باندی در ناحیه ۱۰۲bp ایجاد نمود در تصویر B؛ با ایجاد شرایط حرارتی بهینه (گرادیان حرارتی ۴۷ الی ۵۷ درجه سانتیگراد)، محصول PCR در چاهک ۵ و ۶ یک باند قوی در ناحیه ۱۰۲bp ایجاد گردید. در تصویر C؛ با استفاده از شرایط بهینه حرارتی (۵۱/۹ درجه سانتیگراد) و غلظت بهینه $MgCl_2$ (۲ میلی مولار) و نیز غلظت پرایمرها باندهای مورد نظر تقویت و باندهای اضافی حذف گردید. در تصویر D؛ خالص سازی محصول PCR و آماده سازی و ارسال آن جهت تعیین سکانس نشان داده شده است. نظر به این که تحقیقات گذشته طول ژن انتروتوکسین‌های C را ۶۱۳

آگار، در این مطالعه وارد شدند. به این ترتیب ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرنوس جدا شده از عفونت‌های سطحی، خون، مدفوع، کشت گلو، ادرار و مایع نخاع جدا سازی و مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور نگهداری آنها ۲۰ درصد گلیسرول به کشت ۱۸ ساعته آنها افزوده شد و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

شست باکتری و استخراج ژنوم: استخراج ژنوم با استفاده از روش Sal- ing out با کمی تغییر انجام شد [۲۵]. کلنی هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه به محیط کشت LB تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، ۱ میلی لیتر از آن را در تیوب استریل ۲ میلی لیتری ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در $5000 \times g$ سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی $400 \times g$ میکرولیتر محلول بافر STE وارد و بطور کامل مخلوط گردید. سپس ۱۲۵ میکرولیتر محلول ۲ درصد SDS و ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۳ مولار استات سدیم به محلول اضافه و با سر و ته کردن (۱۰ بار) کاملاً مخلوط شد. پس از آن بمدت ۵ دقیقه در $5000 \times g$ سانتریفیوژ شد. در این حالت ژنوم وارد مایع رویی می‌گردد. محلول رویی را به لوله استریل منتقل و بعد از اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (یا اتانول خالص ۱۰۰٪) به آرامی مخلوط و به مدت یک ساعت و گاهی تا یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن محلول سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در $12000 \times g$ و دمای ۴ درجه سانتیگراد) شده و محلول رویی دور ریخته شد. سپس رسوب کاملاً خشک گردید. به رسوب خشک شده؛ ۷۵۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰٪ افزوده و پس از ۱ ساعت قرار دادن آن در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ ($12000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد) گردید. مایع رویی را دور ریخته و رسوب بطور کامل خشک گردید. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل اضافه کرده و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت DNA حاصل اندازه گیری شد. یک میکرولیتر از محلول ژنومی حاصل را (به عنوان تمپلت) به تیوپ‌های مخصوص PCR وارد و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در موقع لزوم هر یک از تیوپ‌های حاوی ۱ میکرولیتر تمپلت از فریزر خارج و با تهیه گرادیان از آن جهت انجام PCR استفاده گردید.

پرایمر: در این تحقیق دو جفت پرایمر استفاده شد. یک جفت از آنها با بررسی مقالات متعدد، پرایمری که بیشتر مورد استفاده محققان قرار گرفته شده بود و با ترادف

F1: 5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3' و
R1: 5'-AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA-3'

انتخاب گردید [۱۷]. جفت پرایمر دیگر با استفاده از ترادف ژن فرانس entC که از بانک ژنی به شماره GenBank: AB084256.1 اخذ گردید و با استفاده از نرم افزار Alel ID به عنوان پرایمر اختصاصی با ترادف

F۲: ۵'-GGAATGTTGGATGAAGGAG-۳'
R۲: ۵'-TATGGACACAATGATACTGG-۳'

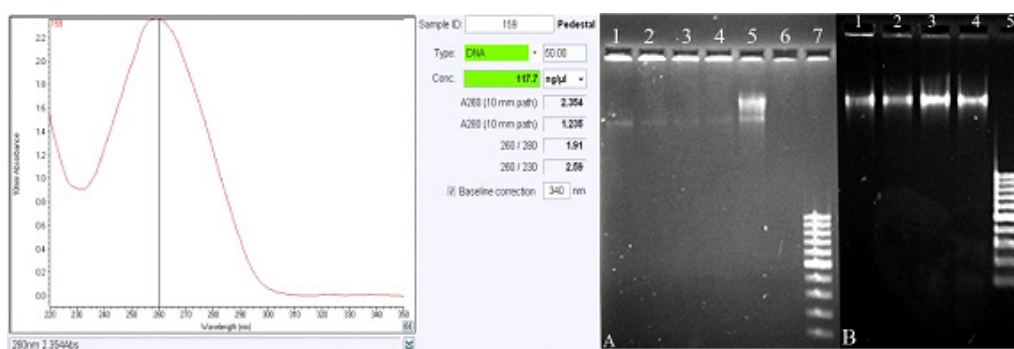
طراحی گردید. سپس توسط شرکت سیناژن سنتز شدند. طبق آنالیزهای بیوانفورماتیکی جفت پرایمر F۱ و R۱ یک قطعه ۱۰۲bp و جفت پرایمر F۲ و R۲ یک قطعه ۱۲۲۳bp را تکثیر می‌کردند.

واکنش PCR

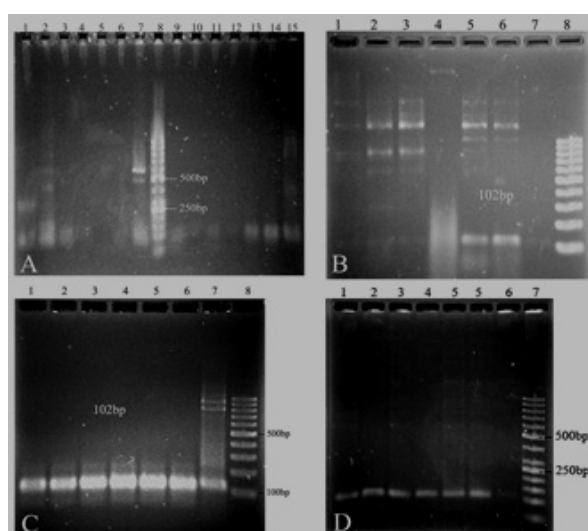
واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه ۱۰۲bp طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور بهینه سازی شرایط PCR، گرادیان

جدول ۲: شرایط انجام PCR جهت تشخیص ژن کامل entC با ۱۲۲۳bp در استافیلوکوکوس های جدا شده از نمونه های بالینی

PCR Condition reaction		Master Mix		
reagents	reagents	Time	Condition reaction	Step
16.9µl	D.D. Water	Denaturation primal	95 °C	4 min
15 ng/1µl	Template DNA			
2.5 µl	Buffer 1X	Denaturation	94 °C	40 sec/ 35 Cycles
1 mM/1.5µl	MgCl ₂	Annealing	60 °C	40 sec/ 35 Cycles
0.5 mM each/0.7 µl	dNTP	Elongation	72 °C	6sec/ 35 Cycles 10 min/1Cycles
0.3 mM/1 µl	F2- Primer	Final Extension	4 °C	5 min
0.3 mM/1µl	R2- Primer			
2 unit/0.4µl	Taq enzyme			
25	Total			



شکل ۱: تصویر سمت چپ، اندازه گیری غلظت DNA استخراج شده از استافیلوکوکوس آرتوس را نشان داده است. غلظت های ۱۰-۲ تا ۱۰-۳ به عنوان تمپلت استفاده می شد. تصویر سمت راست، (A) الکتروفورز ۲ تا ۳ میکرولیتر ژنوم استخراج شده از نمونه ها با روش Salting out (چاهک های ۱ الی ۵ و B) استخراج ژنوم توسط کیت Genomic DNA Extraction شرکت BIONEER (چاهک های ۱ الی ۴) نشان داده شده است.



شکل ۲: روند تشخیص و خالص سازی بخشی از ژن entC در سویه های بومی استافیلوکوکوس آرتوس جهت تعیین سکانس نشان داده شده است. در تصویر A؛ چاهک های ۱، ۳، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ را نگاه کنید. چاهک ۸ استاندارد وزن مولکولی ۵۰ bp است. در تصویر B؛ چاهک های ۵ و ۶ قطعه ۱۰۲bp را و چاهک ۸ راهنمای وزن مولکولی ۱۰۰bp است. در تصویر C؛ چاهک های ۱ الی ۶ بهینه شده شرایط PCR را نشان می دهد و چاهک ۸ راهنمای وزن مولکولی ۱۰۰bp است. تصویر D؛ چاهک های ۱ الی ۵ و نیز تکرار ۵، تخلیص قطعه ۱۰۲bp را نشان داده است. چاهک ۷ استاندارد وزن مولکولی ۵۰bp است.

بحث

در این تحقیق تجربی با استفاده از روش مولکولی PCR ژن entC در ۳۷ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس شناسایی و توانایی آنها در تولید انتروتوکسین C در سطح حساسیت کیت RICASCREEN (۲/۰ SET A, B, C, D, E نانوگرم در میلی لیتر) و نیز ایمونوبلات مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت (به شکل ۶ نگاه کنید). تنها ۱۱ درصد کل سویه‌هایی که ناقل entC بودند انتروتوکسین تیپ C را به تنهایی تولید کردند. در حالیکه سایر سویه‌ها به همراه انتروتوکسین C، 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 از یک انتروتوکسین را تولید نماید. در هر حال، توانایی تولید چند انتروتوکسین 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 [۲۶]. امروزه به منظور شناخت دقیق مکانیسم و نقش انتروتوکسین‌ها و تعیین گیرنده‌های اختصاصی آن تحقیقات فراوانی انجام شده یا در حال انجام است. شاید یکی از دلایل تحقیقات گسترده در خصوص تشخیص و تعیین نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرئوس [۲۷] تحریک تولید انواع مختلف سایتوکاین‌ها از جمله: IL-۱ و TNF- α باشد [۲۸]. با توجه به این که: این سموم در ایجاد بیماری‌های مختلف دخالت دارند. از طرفی تشخیص آنها نیاز مند وجود سویه استاندارد بوده ولی خرید سویه استاندارد میسر نیست. به علاوه ممکن است با ویژگی‌های اکولوژیک این منطقه سازگاری نداشته باشد.

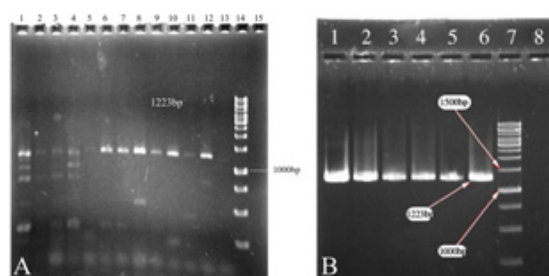
لذا، طراحی روش‌های استاندارد جهت تشخیص سریع سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین از اهمیت بسزایی برخوردار است. زیرا، تشخیص دقیق و درمان مناسب می‌تواند از عوارض بعدی این انتروتوکسین‌های سوپراآنتی‌ژن پیشگیری نماید. افزون بر این، در سال‌های اخیر با ظهور استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و ارتباط آن با افزایش پتانسیل توکسین‌زایی نگرانی‌هایی را ایجاد کرده است [۳۰ و ۲۹]. زیرا، تنوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌ها ضرورت پرداختن به توسعه روش‌های تشخیصی نوین و درمان مبتنی بر آن را اجتناب ناپذیر نموده است [۳۲ و ۳۱]. برخی از کشورها برای هریک از سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین روش‌های استاندارد طراحی و معیارهای لازم برای تشخیص سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین را در نمونه‌های مختلف مواد غذایی یا نمونه‌های بالینی ارایه داده اند. مثلاً مرکز نگهداری باکتری‌ها در امریکا (ATCC) برای تمام گروه‌های باکتریایی روش استاندارد تعیین نموده است. به همین ترتیب، در سال ۱۹۹۳ میلادی Marr و همکاران ویژگی‌های تیپ‌های مختلف انتروتوکسین C را بررسی و برای هر یک از آنها تعداد ۲۴۰ اسید آمینه گزارش نمود. آنها نشان دادند ترادف ۱۰ اسید آمینه ابتدایی انتروتوکسین‌های آنها ESQPDPTPDE و ۱۰ اسید آمینه انتهایی IEVHLTKNG می‌باشد [۳۳]. در حقیقت سکانس ژن آنها حدود ۷۲۰ جفت باز را شامل می‌شد. برخی محققین دیگر قطعه ۸۲۰ جفت بازی را گزارش کرده اند. تحقیقات دیگری نیز وجود دارد که بخش‌هایی از توکسین را جهت تشخیص انتخاب کرده اند. مثلاً برخی پرایمری را طراحی نموده که یک قطعه ۱۰۲ جفت بازی را تکثیر می‌نماید و یا پرایمری که قطعه ۲۸۳ جفت باز را تکثیر می‌کند. در تحقیقی دیگر پرایمری طراحی شده است که قطعه ۴۹۰ جفت بازی را تکثیر می‌نماید. چنانچه ملاحظه می‌گردد هیچ یک از قطعات گزارش شده نمی‌تواند

bp الی ۱۰۹۵ bp جفت باز گزارش کرده‌اند، ممکن است ردیابی قطعه ۱۰۲ bp در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس نتواند نماینده خوبی برای انتروتوکسین C باشد. لذا، با توجه به سکانس موجود در بانک ژن پرایمرهایی طراحی گردید که بتواند یک قطعه ۱۲۲۳bp را که دارای ۱۲۸ باز بیش از سکانس معرفی شده بود را تکثیر نماید (شکل A۳). در هر حال، با ایجاد شرایط بهینه PCR طبق جدول ۲ قطعه ۱۲۲۳bp شد. تصویر B شکل ۳ محصول خالص شده PCR آماده و جهت تعیین سکانس به شرکت مربوطه ارسال گردید.

نتایج تعیین سکانس entC: نتیجه مقایسه ترادف ژنی حاصل از این تحقیق با ژن entC (GenBank: X۰۵۸۱۵.۱) در شکل ۴ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد در باز شماره ۱۰۴ اسید آمینه A به جای T، در جایگاه باز شماره ۴۹۲ اسید آمینه G به جای A، در جایگاه باز شماره ۶۳۶ اسید آمینه G به جای A، در باز شماره ۶۵۹ اسید آمینه C به جای T، در باز شماره ۹۸۰ اسید آمینه T و در باز شماره ۱۰۴۹ اسید آمینه G جایگزین شده است. در این تحقیق، از پرایمرهایی استفاده شد که یک قطعه حدود ۱۲۲۳bp را تکثیر نموده است. مقایسه تعیین ترادف محصول PCR نشان دهنده آن است از باز شماره ۹۱ الی باز ۱۰۵۶ انطباق وجود دارد و تنها در ۶ باز اختلاف دیده شده است. این در حالی است که ترجمه ترادف‌های فوق تنها در یک اسید آمینه اختلاف نشان دادند (به شکل ۴ نگاه کنید).

نتایج آزمون الیزا جهت تأیید تولید انتروتوکسین C: نتایج آزمون الیزا روی تعدادی از سویه‌هایی که دارای entC یا فاقد entC بودند در شکل ۶ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد، ستون‌های ۹ و ۱۰ سویه‌ای از باکتری را نشان می‌دهد که فقط انتروتوکسین C را تولید نموده است. ستون‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ سویه‌هایی از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که تنها انتروتوکسین A را تولید نموده است. ستون‌های ۳ و ۷ سویه‌هایی را نشان می‌دهد که هیچ انتروتوکسینی تولید نکرده اند. ستون ۸ سویه‌ای را نشان داده که مقدار کمی انتروتوکسین B و C و مقدار زیادی انتروتوکسین E را تولید نموده است. ستون ۱۱ سویه‌ای را نشان داده است که مقدار زیادی انتروتوکسین A ولی مقدار کمی انتروتوکسین D و E را تولید نموده است. ستون ۱۲ سویه‌های را نشان داده است که انتروتوکسین C و E را تولید نموده است. واکنش PCR با سویه‌های بررسی شده در ستون‌های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ وجود entC را در آنها تأیید کرد. در این تصویر ردیف‌های F و G کنترل منفی هستند و ردیف H کنترل مثبت مربوط به استاندارد انتروتوکسین (۲ تا ۱۰ نانوگرم در هر میلی لیتر) موجود در کیت می‌باشد.

در هر حال، نتایج بررسی ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس با روش مولکولی PCR حاکی از آن بود که ۳۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن entC هستند. اما نتایج آزمون الیزا نشان داد، تنها ۱۱ درصد سویه‌ها فقط ژن entC را به تنهایی دارا می‌باشند و ۲۶ درصد باقی مانده به همراه انتروتوکسین C سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید می‌نمایند. در شکل ۶؛ ستون‌های ۳ و ۷ سویه‌ای از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که هیچ یک از انتروتوکسین شایع را تولید نکرده اند. در حالی که ستون‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ سویه‌ای از باکتری را نشان داده شده است که بدون اینکه ناقل ژن entC باشد فقط انتروتوکسین A تولید نموده است. ستون ۱۱ سویه‌ای را نشان داده که علاوه بر انتروتوکسین A سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید کرده است. در هر حال، سویه‌هایی که حاوی ژن entC بودند تولید انتروتوکسین علاوه بر کیت الایزا با ایمونوبلات نیز تأیید شدند.



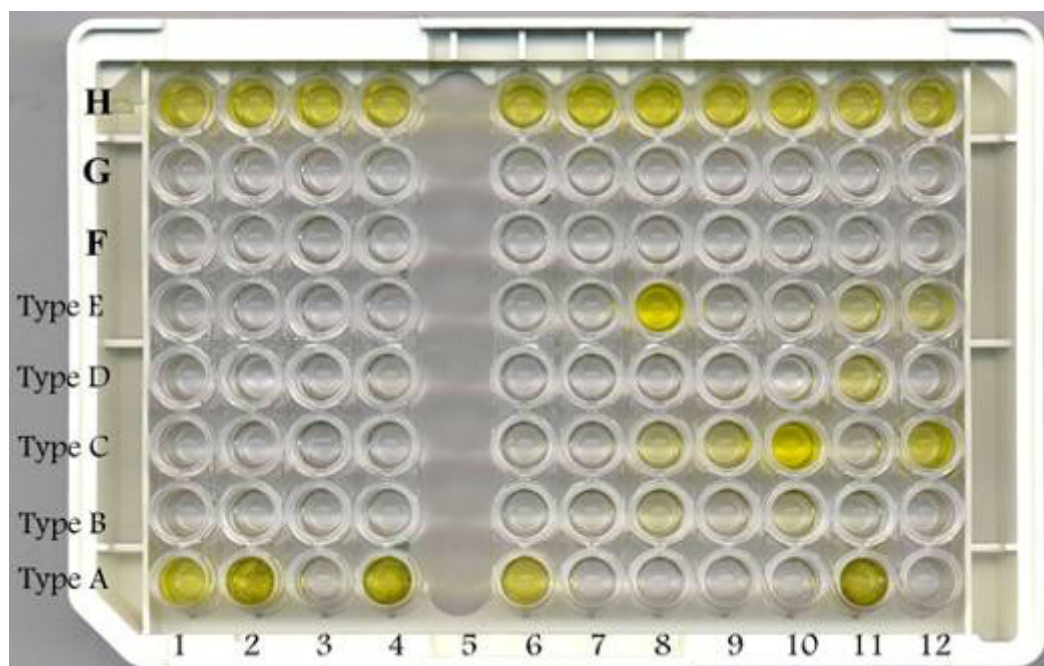
شکل ۳: شرایط بهینه سازی شده تشخیص ژن کامل entC در سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرنوس نشان داده شده است. در تصویر A؛ چاهک‌های ۱ الی ۱۲ قطعه تکثیر شده ۱۲۲۳bp را نشان داده است. چاهک ۱۴ راهنمای وزن مولکولی ۱kb است. تصویر B؛ چاهک‌های ۱ الی ۶ تسویه محصول PCR و آماده سازی آن جهت تعیین سکانس را نشان داده است. چاهک ۷ راهنمای وزن مولکولی ۱kb است.

entC1 gene	Sequence	70	80	90	100	110	120
p15-T7terminator	Sequence				GGGAATGTT	GGA7GAAGGA	GATAAAAAATG
entC1 gene	Sequence	130	140	150	160	170	180
p15-T7terminator	Sequence	AATAAGAGTC	GATTTAGTTT	ATCGTAAT	TTGATATTCG	CACCTATAC	AGTTCTTTT
entC1 gene	Sequence	190	200	210	220	230	240
p15-T7terminator	Sequence	ACACCCAAAG	GATTAGCAGA	GAGCCAACCA	GACCTACCG	CAGATGAGT	GCACAAAGCG
entC1 gene	Sequence	250	260	270	280	290	300
p15-T7terminator	Sequence	AGTAAATCCA	CTGGTTTGA	GGAAAAATG	AAAGTTTAT	ATGATGATCA	TTATGTATCA
entC1 gene	Sequence	310	320	330	340	350	360
p15-T7terminator	Sequence	GCACCTAAAG	TTAAATCTGT	AGATAAAAT	TTGGCAGATG	ATTTAAATTA	TAACATTAAG
entC1 gene	Sequence	370	380	390	400	410	420
p15-T7terminator	Sequence	GATAAAAAAC	TGAAAAATTA	TGACAAAGTG	AAAAACAGAGT	TATTAATAGA	AGGTTTAGCA
entC1 gene	Sequence	430	440	450	460	470	480
p15-T7terminator	Sequence	AAAGATGACA	AGGATGAGT	AGTTGATGTG	TATGGATCAA	ATTACTATAG	AACTGCTAT
entC1 gene	Sequence	490	500	510	520	530	540
p15-T7terminator	Sequence	TTTTCATCCA	AGGATAATG	AGGTAAAGTT	ACAGGTGGCA	AACTTGTAT	GTATGGAGGA
entC1 gene	Sequence	550	560	570	580	590	600
p15-T7terminator	Sequence	ATACCAAAAC	ATGAGGAAA	CCACTTIGAT	AATGGGAAT	TACAAAATG	ACTTATAAGA
entC1 gene	Sequence	610	620	630	640	650	660
p15-T7terminator	Sequence	GTATTGAAA	ATAAAGAAA	CACAAATTC	TTGAGTGTG	AACTGTATA	GAAGATGTA
entC1 gene	Sequence	670	680	690	700	710	720
p15-T7terminator	Sequence	ACAGCTCAAG	AACTAGCA	AAAGCTAGG	AAATTTTAA	TTAATAAATA	AAATTTGTAT
entC1 gene	Sequence	730	740	750	760	770	780
p15-T7terminator	Sequence	GAGTTTAAAC	GTTCACCAT	TGAACAGGA	TATATAAAT	TTATTGAAA	TACGGCAAG
entC1 gene	Sequence	790	800	810	820	830	840
p15-T7terminator	Sequence	ACTTTTGGT	ATGATATGA	GCCTGCACCA	GGCGATAAGT	TTGACCAATC	TAAATATTTA
entC1 gene	Sequence	850	860	870	880	890	900
p15-T7terminator	Sequence	ATGATGTACA	ACGACATAA	AAAGTTTGA	TCTAAAGTG	GAAGATAGA	AGTCCACCT
entC1 gene	Sequence	910	920	930	940	950	960
p15-T7terminator	Sequence	ACACCAAAAG	ATGGATAATG	TTAATCCGA	TTTGATATA	AAAGTGAAG	TATTAGATAT
entC1 gene	Sequence	970	980	990	1,000	1,010	1,020
p15-T7terminator	Sequence	ATTGGAAGG	TAGTACTTT	GGTGTTCG	CTTTTAGGG	TGCATATATA	TAGATTAAAC
entC1 gene	Sequence	1,030	1,040	1,050	1,060	1,070	1,080
p15-T7terminator	Sequence	GGCAGTTCTA	TATTAATAGA	AAAGTGGG	TATTTA	CTCAATCTAA	ACTATATATA

شکل ۴: مقایسه سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس ژن استاندارد استافیلوکوکوس آرنوس موجود در بانک ژنی با کد X۵۸۱۵،۱ نشان داده شده است.

Trans entC this Stu...	Sequen...	10	20	30	40	50	60
Trans entC1 gene	Sequen...	IIKYNFSFNI	FLIEYLRLDI	FKVYLDTFWE	CWMKEIKMNK	SRFISCVILI	FALILVLFTF
Trans entC this Stu...	Sequen...	70	80	90	100	110	120
Trans entC1 gene	Sequen...	NVLAESQDP	TPDELHKASK	FTGLMENMKV	LYDDHYVSAT	KVKSVDKFLA	HDLIYNISDK
Trans entC this Stu...	Sequen...	130	140	150	160	170	180
Trans entC1 gene	Sequen...	KLKNYDKVKT	ELLNEGLAKK	YKDEVVDVYG	SNYYVNCYFS	SKDNVGKVTG	GKTCMYGGIT
Trans entC this Stu...	Sequen...	190	200	210	220	230	240
Trans entC1 gene	Sequen...	KHEGNHFDNG	NLQNVLRVY	ENKRNTISFE	VQTDKKSATA	QELDIKARNF	LINKKNLVEF
Trans entC this Stu...	Sequen...	250	260	270	280	290	300
Trans entC1 gene	Sequen...	NSSPYETGYT	KPIENNNGNTF	WYDMPAPG	KFDQSKYLMM	YNDNKTVDK	SVKIEVHLTT
Trans entC this Stu...	Sequen...	310	320	330	340	350	360
Trans entC1 gene	Sequen...	KNGCSDFDIK	SESIRYIKVS	T---TGACL	FRMHIYRLNR	TSILTEAGY	-----
				TSVLAELGCI	Y-IDTALLYK	VRLFTHSITI	IIGIIF....

شکل ۵: چنانچه مقایسه ترادف آمینواسیدی سکانس حاصل از این تحقیق با ترجمه سکانس ژن استاندارد entC1 حاکی از آن است که ترادف اسید آمینه‌ای سکانس حاصل از این تحقیق از اسید آمینه ۴۶ الی ۳۲۱ تنها یک اختلاف در جایگاه اسید آمینه ۲۱۸ وجود دارد. در حقیقت در ژن تکثیر شده در این تحقیق اسید آمینه والین جایگزین اسید آمینه آلانین شده است.



شکل ۶) نتیجه واکنش الیزا توسط پلیت از قبل تهیه شده موجود در کیت RICA SCREEN SET A,B,C,C,E ساخت شرکت آلمانی r-Biopharm نشان داده شده است. آزمون الیزا طبق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام و تصویر پلیت حاصل اسکن شده است. تصویر فوق نشان دهنده سطح زیرین پلیت می‌باشد.

در خصوص تشخیص تیپ های مختلف انتروتوکسین C تحقیقات متعددی انجام شده است. برخی از تحقیقات تولید و خالص سازی انتروتوکسین را مد نظر قرار داده و بسته به روش تخلیص اوزان مولکولی مختلفی برای آن گزارش کرده اند.

تقدیر و تشکر: این طرح با بودجه پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج)، مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی طراحی و انجام شده است. بدین لحاظ نویسندگان از حمایت و پشتیبانی‌های استاد محترم دکتر مصطفی قانع تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از دکتر محمد جواد سلطانیور و دکتر محمد رهبر جهت واگذاری سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بیمار تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- 1- Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, agr locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. *J MeC Microbiol.* 2008;57: 348-358.
- 2- Mandell L Gerlac, Bennett E John, Dolin Raphael. Mandell, Douglas, and Bennett's. *PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES*. 7th ed. CHURCHILL LIVINGSTONE. 2010;2:2543.
- 3- Veras JF, Do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect dis.* 2008;12: 410-415.
- 4- Schlievert PM, Case LC: Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol Biol.* 2007;391:113-126.
- 5- Suenaga T, Suzuki H, Shibuta S, Takeuchi T, Yoshikawa N: Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki disease. *J PeCiatr.* 2009;155:266-270.
- 6- Van ZT, Vaneechoutte M, Holtappels G, Gevaert P, van CP, Bachert C: Detection of enterotoxin DNA in *Staphylococcus aureus* strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients. *Am J Rhinol.* 2008;22:223-227.
- 7- Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC: [Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes]. *Korean J Lab MeC.* 2007;27: 118-123.
- 8- Crass BA, Berg Coll MS: Toxin involvement in toxic shock syndrome. *J Infect Cis.* 1986;153:918-926.
- 9- Wang X, Xu M, Zhang H, Liu J, Li X, Zhang. Enhancement of superantigen activity and antitumor response of staphylococcal enterotoxin C2 by site-directed mutagenesis. *Cancer Immunol Immunother.* 2009, 58:677-686.
- 10- Xu M, Wang X, Cai Y, Zhang H, Yang H, Liu C et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity and low toxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:705-713.

نماینده قابل اعتمادی برای نشان دادن یکی از تیپ‌های انتروتوکسین C باشد

در این تحقیق با طراحی پرایمر تکثیر کننده یک قطعه ۱۲۲۳ جفت باز اقدام به ردیابی و استاندارد سازی تشخیص ژن انتروتوکسین C گردید. در حقیقت، از ابتدای سیگنال پیتید و ۲۵۰ جفت باز بعد از ژن مد نظر قرار گرفت. به این ترتیب قطعه ۱۲۲۳ جفت بازی تکثیر گردید. چنانچه در شکل ۴ نشان داده شده است از باز شماره ۹۲ الی ۱۰۵۷ در دستگاه سکانسینگ قابل خوانش بوده است. با آنکه مقایسه آن با ژن فرانس تنها در ۴ باز اختلاف را نشان می‌دهد اما ترجمه آن نشان داد که ۱۰ اسید آمینه اول آن از شماره ۶۵ شروع و تا ۳۰۴ ادامه یافته و تنها در یک اسید آمینه اختلاف وجود دارد. یعنی چنانچه در شکل ۵ نشان داده شده است در جایگاه ۲۰۸ اسید آمینه آلانین به جای والین قرار گرفته است. این امر حکایت از یک سکانس جدید و بومی این منطقه می‌باشد.

در هر حال به دلیل اهمیت بیماری‌زایی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرتوس تحقیق در زمینه استاندارد سازی روش‌های نوین تشخیصی همچنان ادامه دارد. چنانکه، در سال ۲۰۰۷ میلادی Fischer و همکاران به منظور تشخیص انتروتوکسین‌های A و B با استفاده از سویه‌های استاندارد ATCC روش کمی real-time immuno-PCR طراحی و نشان دادند با این روش می‌توان به وجود این انتروتوکسین‌ها پی برد [۳۴]. موفقیت روش آنها در دسترس بودن سویه‌های استاندارد ATCC بوده است. به همین ترتیب در سال ۲۰۰۸ میلادی Veras و همکارانش نیز با طراحی پرایمر تکثیر کننده قطعه ۲۸۳ bp اقدام به شناسایی انتروتوکسین C نمودند [۳].

با توجه به اینکه دست‌یابی به سویه‌های استاندارد موجود جهانی با محدودیت‌هایی همراه است، از طرفی ممکن است تغییرات جغرافیایی بر پایداری ویژگی‌های تعریف شده در نمونه استاندارد خارجی با شرایط منطقه‌ای سازگار نباشد. لذا تعیین استانداردهای لازم برای تشخیص سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرتوس تولید کننده انتروتوکسین‌ها از جمله: انتروتوکسین C اجتناب‌ناپذیر است؛ زیرا، بروز تغییرات ژنتیکی در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس آرتوس گزارش شده است [۳۵]. از این رو، در این تحقیق، با استفاده از الگوی ژن فرانس و طراحی پرایمر مناسب روشی جهت تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس تولید کننده انتروتوکسین C۱ طراحی و ارایه شده است. زیرا، تنها اتکا به کوگولاز مثبت بودن استافیلوکوکوس‌ها در نمونه‌های بالینی کافی نیست. چنانکه در شکل ۶ نشان داده شده است علی‌رغم وجود ژن entC توانایی سویه‌ها در تولید انتروتوکسین متفاوت است. لذا، این سوال مطرح می‌گردد که آیا باکتری که بیش از یک انتروتوکسین تولید نموده قدرت بیماری‌زایی و شدت آن یکسان است و آیا با درمان ثابت پاسخ یکسان وجود دارد؟. همچنین، برخی از سویه‌های کوگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های غذایی انواع مختلف انتروتوکسین‌ها را تولید نموده‌اند. با آنکه در گزارشات مختلف فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس تولید کننده انتروتوکسین متفاوت (۵/۳ تا ۸۸ درصد) گزارش شده است [۳۶-۳۹]، اما در کشور ما بدلیل نبود سویه استاندارد آمار دقیقی از بروز عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌های آرتوس تولید کننده انتروتوکسین C در دست نیست. در این تحقیق با استاندارد سازی روش تشخیص سویه تولید کننده انتروتوکسین C۱ زمینه بررسی‌های دقیق اپیدمیولوژیک در نمونه‌های بالینی و نیز در آلودگی‌های غذایی فراهم شده است. به این ترتیب به منظور انجام تحقیقات بیشتر سویه استاندارد شده در این تحقیق، آماده تحویل به سایر محققین می‌باشد.

- 11- Wan XC, Liu CP, Li M, Hong D, Li DM, Chen HX. Staphylococcal enterotoxin C injection in combination with ascorbic acid promotes the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373:488-492.
- 12- Cui JC, Zhang BJ, Lin YC, Wang QK, Qian AD, Nakane A: Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;135:64-70.
- 13- Zaraket H, Otsuka T, Saito K, Dohmae S, Takano T, Higuchi W. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission. *Microbiol Immunol*. 2007;51:171-176.
- 14- Collery MM, Smyth DS, Tumilty JJ, Twohig JM, Smyth CJ. Associations between enterotoxin gene cluster types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2009;58:13-25.
- 15- Bayles KW, IanColo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin C. *J Bacteriol*. 1989;171:4799-4806.
- 16- Giezendanner N, Meyer B, Gort M, Muller P, Zweifel C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. *Schweiz Arch Tierheilk*. 2009;151:329-331.
- 17- Beckers HJ, Van Leusden FM, Tips PD. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in shrimp. *J Hyg (Lond)*. 1985;95:685-693.
- 18- Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Izadi M, Hosseini SMJ, Ataee MH. Bacterial meningitis: a new risk factor. *JRMS*. 2011; 16:207-210.
- 19- 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;127:246-251.
- 20- 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.
- 21- Malam JE, Carrick GF, Telford DR, Morris JA. Staphylococcal toxins and sudden infant death syndrome. *J Clin Pathol*. 1992;45:716-721.
- 22- 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: 61-67.
- 23- Limbago B, Fosheim GE, Schoonover V, Crane CE, Naddle J, Petit S. 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;47:1344-1351.
- 24- 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;137:1242-1248.
- 25- Sombrok Joseph, and Rufell W David. *Molecular Cloning*. Coldspring New York. 3rd ed. 2001; Vol 1: 6.4.
- 26- Ifesan BO, Voravuthikunchai SP: Effect of Eleutherine Americana Merr. extract on enzymatic activity and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in broth and cooked pork. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6:699-704.
- 27- Seishima M, Kato G, Shibuya Y, Matsukawa S: Cytokine profile during the clinical course of toxic shock syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:e632-e635.
- 28- Hu DL, Cui JC, Omoe K, Sashinami H, Yokomizo Y, Shinagawa K: A mutant of staphylococcal enterotoxin C devoid of bacterial superantigenic activity elicits a Th2 immune response for protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun*. 2005;73:174-180.
- 29- Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML, Leung DY: Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:39-49.
- 30- Strandberg KL, Rotschafer JH, Vetter SM, Buonpane RA, Kranz DM, Schlievert PM: Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. *J Infect Dis*. 2010;202:1690-1697.
- 31- Varshney AK, Wang X, Cook E, Dutta K, Scharff MD, Goger MJ. Generation, characterization, and epitope mapping of neutralizing and protective monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *J Biol Chem*. 2011;286:9737-9747.
- 32- Hallin M, De MR, Denis O, Lefort A, El GF, Butaye P et al. Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Genet Evol*. 2011; 11: 290-299.
- 33- Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Lupher M, Davis WC, Boha GA Characterization of Novel Type C Staphylococcal Enterotoxins: Biological and Evolutionary Implications. *Infection and Immunity*. 1993;61(10):4254-4262.
- 34- Fischer A, von Eiff C, Kuczius T, Omoe K, Peters G and Becker K. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J Mol Med*. 2007;85:461-469.
- 35- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006; 367:731-739.
- 36- Humphreys H, Keane CT, Hone R, Pomeroy H, Russell RJ, Arbutnott JP. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicemia and from healthy carriers. *J Med Microbiol*. 1989; 28: 163-172.
- 37- Normanno G, Corrente M, La SG, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2007;117:219-222.
- 38- 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;137:688-699.
- 39- Peeva T, Gogov I. Presence of enterotoxin D in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food products. *Vet Med Nauki*. 1983;20:67-71.