

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

دکتر رضاعلی عطایی^۱، دکتر علی کرمی^۲، دکتر رحیم سروری زنجان^۳، محمد کمال باقری^۴

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: انترتوکسین D استافیلوکوکوس به عنوان یک سوپر آنتی ژن توسط نمونه‌های عفونی منابع انسانی و حیوانی تولید می‌گردد. هدف این تحقیق استاندارد سازی روش تشخیص استافیلوکوکوس تولید کننده‌ی انترتوکسین D بود.

روش بررسی: روش PCR جهت تشخیص ent D در استافیلوکوکوس آرنوس‌های 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 انترتوکسین 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 آرنوس کواگولاز مثبت در نمونه‌های بالینی مورد توجه قرار می‌گیرند. اما روشی جهت نشان دادن توانایی تولید انترتوکسین‌ها از جمله انترتوکسین D وجود ندارد. تحقیق حاضر روشی ساده و سریع جهت تأیید توانایی توکسین‌زایی باکتری را ارایه و تشخیص سویه‌های تولید کننده‌ی انترتوکسین D را استاندارد سازی نموده است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس آرنوس، ent D و PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس آرنوس یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زایی است که باعث ایجاد مسمومیت غذایی نیز می‌باشد (۱). علت ایجاد مسمومیت غذایی توانایی تولید انترتوکسین‌های 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 آرنوس (۶۸/۸ درصد) انتروتوکسین D را تولید می‌کنند (۳). عقیده بر آن است که ژن رمز کننده انتروتوکسین D (entD) استافیلوکوکوس آرنوس 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). به علاوه، با آن که ارتباط بین entA و entD مشخص نیست برخی سویه‌های تولید کننده 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 انتروتوکسین‌های A و D استافیلوکوکوس آرنوس نشان داده شده است (۶). در هر حال، استافیلوکوکوس آرنوس 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 تهیه شیر خشک، این توکسین از بین نرفته و به عنوان یک عامل خطر برای مصرف کننده به حساب می‌آید. بنابراین، با توجه به پراکندگی گسترده 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 آرنوس‌های کواگولاز مثبت تولید نمی‌گردد، بلکه در سال‌های اخیر نشان داده شده است که استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین‌ها می‌باشند (۹ و ۱۰). 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 ملام 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 کننده 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 کننده انتروتوکسین به‌ویژه به‌منظور بررسی‌های اپیدمیولوژیک را اجتناب ناپذیر نموده است. افزون براین، بین توانایی تولید انتروتوکسین‌ها و ایجاد مقاومت به متی‌سیلین گزارشاتی وجود دارد (۱۴ و ۱۵). 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 آرنوس می‌باشد.

روش بررسی

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

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 درصد) به آرامی مخلوط و به مدت یک ساعت و گاهی تا یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن محلول سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) شده و محلول رویی دور ریخته شد. سپس ته‌مانده کاملاً خشک گردید. روی ته مانده خشک شده ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده، پس از ۱ ساعت قرار دادن آن در فریزر منهای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) گردید. مایع رویی را دور ریخته، رسوب به‌طور کامل خشک گردید. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل اضافه کرده، ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت DNA حاصل اندازه‌گیری شد. یک میکرولیتر از محلول ژنومی حاصل را (به عنوان تمپلیت) به تیوپ‌های مخصوص PCR وارد و در فریزر منهای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در موقع لزوم هر یک از تیوپ‌های 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 بانک ژنی به شماره‌ی GenBank: M28521.1 اخذ گردید، با بررسی مقالات متعدد، پرایمری که بیشتر مورد استفاده محققان قرار 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 طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور بهینه‌سازی شرایط PCR از گرادیان درجه حرارت (۵۳ الی ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد)،

خریداری (DNA Extraction; Cat. No. K- 3032, Lot No. 10032) گردید. کیت تشخیص آنتروتوکسین‌ها از شرکت روکت ایترنشنال ارایه‌دهنده‌ی محصولات شرکت r-Biopharm خریداری گردید.

روش کار: در یک تحقیق تجربی (Experimental) روش تشخیص ژن آنتروتوکسین D در سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از بیماران طراحي و Set up گردید. همچنین، تولید آنتروتوکسین D در سویه‌های حاوی ژن ent D بررسی شد.

معیار انتخاب سویه‌ی باکتریایی: معیار انتخاب سویه‌های باکتریایی از این قرار بود. تمام بیمارانی که توسط متخصص عفونی نیازمند بررسی باکتریولوژیک بودند و از کشت نمونه‌های عفونی آن‌ها کوکوسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، DNase مثبت و توانایی رشد در محیط مانیتول سالت آگار بود، در این مطالعه وارد شدند. به این ترتیب ۳۱۰ سویه‌ی استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از عفونت‌های سطحی، خون، مدفوع، کشت گلو، ادرار و مایع نخاع جدا سازی شده بودند. با افزودن ۲۰ درصد گلیسرول به کشت ۱۸ ساعته آن‌ها در فریزر منهای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت باکتری و استخراج ژنوم: استخراج ژنوم با استفاده از روش Salting out با کمی تغییر انجام شد (۱۵). کلنی هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه به محیط کشت LB تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، ۱ میلی‌لیتر از آن را در تیوب استریل ۲ میلی‌لیتری ریخته، به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته، به رسوب سلولی ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافر STE وارد و به‌طور کامل محلول گردید. سپس ۱۲۵ میکرولیتر محلول ۲ درصد SDS و ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۳ مولار استات سدیم به محلول اضافه، با سر و ته کردن (۱۰ بار) کاملاً مخلوط شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰×g

درصد الکتروفورز شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت تابش نور مارورای 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.

گرادیان غلظت کلراید منیزیم ($0/3$ تا $0/5$ میلی-مولار)، و گرادیان غلظت تمپلیت (10 الی 100 پیکوگرم در میکرولیتر از ژنوم استخراج شده) به کار برده شد. این واکنش با دستگاه Bio- RAD C1000, Thermal Cycler ساخت شرکت انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز 1 تا $1/5$

جدول ۱: شرایط انجام PCR جهت تشخیص ent D در استافیلوکوکوس های جدا شده از نمونه های 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	MgCl ₂
۵ min	۷۲°C	۰/۴ mM each/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

ساخت (RIDASCREEN SET A,B,C,D,E: Art. No.: R4101) شرکت آلمانی r-Biopharm طبق دستورالعمل کارخانه ای سازنده استفاده گردید.

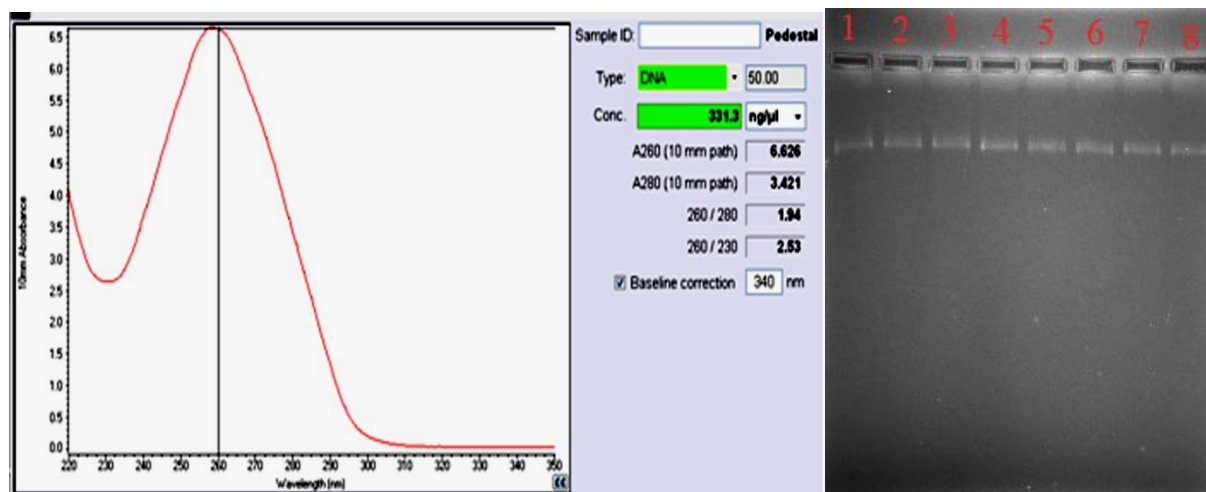
یافته ها

نتایج آزمون های فنوتیپی تمام سویه های مورد استفاده در این تحقیق، استافیلوکوکوس آرنوس بودن آن ها را تأیید کرد. به این ترتیب ۳۱۰ سویه استافیلوکوکوس

تشخیص انتروتوکسین D: تمام سویه هایی 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 سانتریفیوژ گردید و مایع رویی 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 آرنوس

تجاری بود. شکل ۱ اندازه‌گیری غلظت ژنوم استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس و الکتروفورز آن را نشان می‌دهد.

آرنوس کوآگولاز مثبت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج استخراج ژنوم تک تک سویه‌ها با روش Salting out تغییر یافته قابل مقایسه با نتایج حاصل از کیت‌های



شکل ۱؛ تصویر سمت چپ، اندازه‌گیری *DNA* استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس که با غلظت‌های 10^{-2} تا 10^{-3} به عنوان تمپلیت استفاده می‌شود. 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.

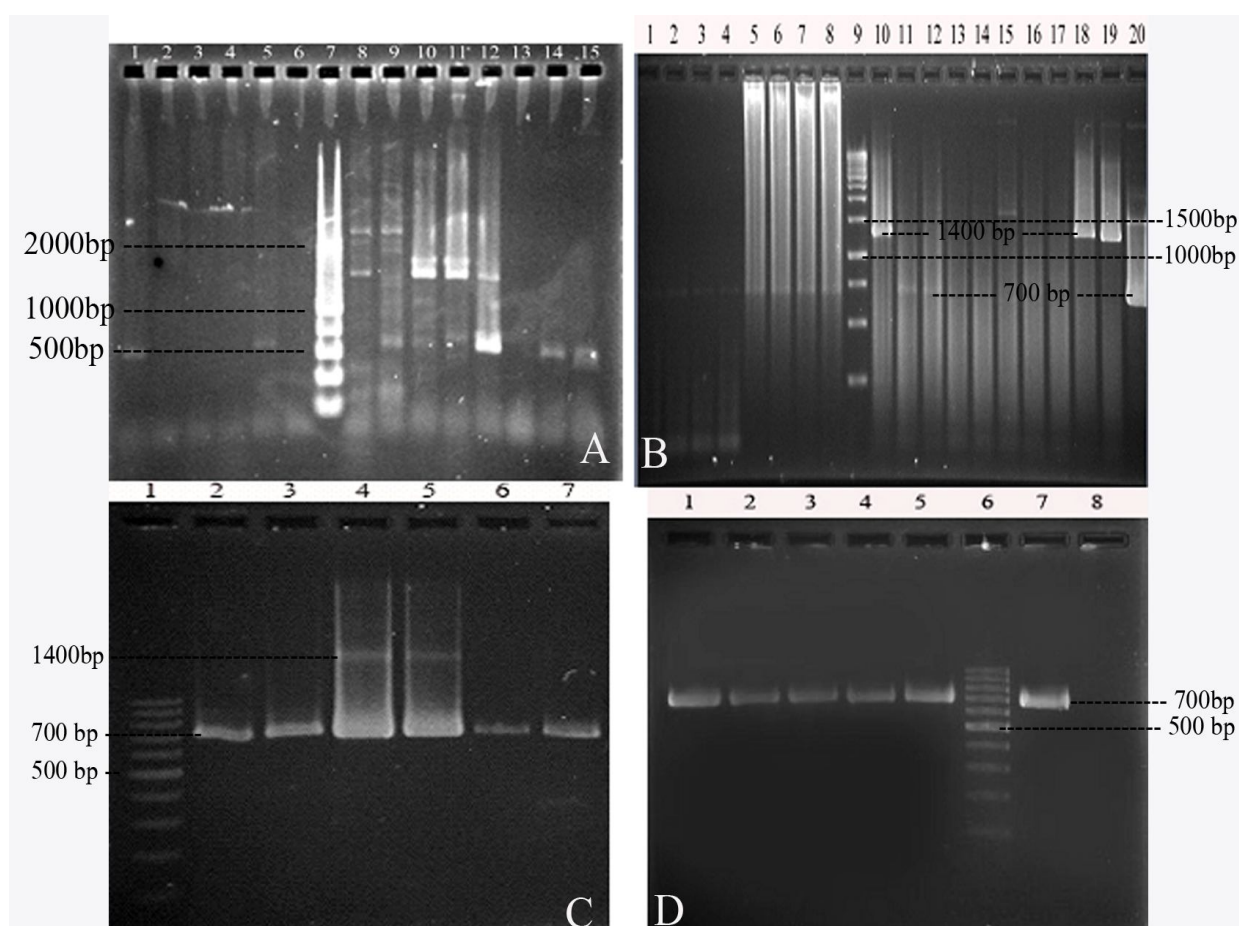
مرحله‌ی اول در تصویر B ارایه شده است؛ چاهک‌های ۱۱ الی ۸ و ۱۲ PCR باند محدوده‌ی ۷۰۰ bp را نشان داده است. چاهک‌های ۱۰، ۱۸ و ۱۹ PCR باند محدوده‌ی ۱۴۰۰ bp را نشان می‌دهد. چاهک ۲۰ در تصویر B محصول PCR مرحله‌ی اول می‌باشد. چاهک‌های ۲، ۳، ۶ و ۷ تصور C الکتروفورز محصول تخلیص PCR است که قطعه‌ی ۷۰۰ bp را به‌طور خالص نشان داده است. در تصویر D، آماه 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 پرایمرهایی استفاده شد که یک قطعه حدود ۷۰۰ bp را

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 ۷۰۰ bp و یک باند ضعیف در ناحیه‌ی ۱۴۰۰ 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

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.

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



شکل ۲: روند تشخیص و خالص سازی ent D در سویه بومی استافیلوکوکوس آرنوس 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 تصویر C چاهک ۱ و در تصویر D چاهک ۶ استاندارد وزن مولکولی ۱۰۰ bp می‌باشند. در تصویر C چاهک‌های ۴ و ۵ شرایط بهینه شده PCR و ایجاد قطعات ۷۰۰bp و ۱۴۰۰ bp را نشان می‌دهد. چاهک‌های ۲، ۳، ۶ و ۷ تخلیص قطعه‌ی ۷۰۰bp را نشان داده است. تصویر D تهیه‌ی مقدار لازم از قطعه‌ی ۷۰۰bp جهت تعیین سکانس می‌باشد.

690--F2	Sequence	310 320 330 340 350 360
M28521.1 Staphyl...	Sequence	TGAAACATT GATTCAGTAA AAGAGAAAGA ATTGCATAAA AAATCTGAAT TAAGTAGTAC
690--F2	Sequence	370 380 390 400 410 420
M28521.1 Staphyl...	Sequence	CGCGCTAAAT AATATGAAAC ATTCTTATGC AGATAAAAAAT CCAATAATAG GAGAAAAATAA
690--F2	Sequence	430 440 450 460 470 480
M28521.1 Staphyl...	Sequence	AAGTACAGGA GATCAATTTT TAGAAAAATAC TTTGCTTTAC AAAAAATTTT TTACTGACCT
690--F2	Sequence	490 500 510 520 530 540
M28521.1 Staphyl...	Sequence	TATCAATTTT GAAGATTAT TAATAAACTT CAATTCAAAA GAAATGGCTC AACATTTCAA
690--F2	Sequence	550 560 570 580 590 600
M28521.1 Staphyl...	Sequence	ATCTAAAAAT GTAGATGTTT ACGCTATAAG ATATAGCATT AATTGTTATG GTGGTCAAAAT
690--F2	Sequence	610 620 630 640 650 660
M28521.1 Staphyl...	Sequence	AGATAGGACT GCTTGTCAT ATGGAGGTGT CACTCCACAC GAAGGTAATA AATTAAAAAG
690--F2	Sequence	670 680 690 700 710 720
M28521.1 Staphyl...	Sequence	ACGAAAAAAA ATACCAATCA ATTGTGGAT AAATGGTGTA CAAAAAGAAG TTCTTTTGA
690--F2	Sequence	730 740 750 760 770 780
M28521.1 Staphyl...	Sequence	TAAAGTTCAA ACAGATAAAA AAAATGTTAC CGTACAAGAA TTAGATGCAC AAGCAAGGCG
690--F2	Sequence	790 800 810 820 830 840
M28521.1 Staphyl...	Sequence	CTATTTGCAA AAGGATTTAA AATTGTATAA TAATGATACT CTCGGAGGAA AAATACAGCG
690--F2	Sequence	850 860 870 880 890 900
M28521.1 Staphyl...	Sequence	CGGAAAAATA GAGTTTGATT CTCTGATGG GTCTAAAGTC TCTTATGATT TATTTGATGT
690--F2	Sequence	910 920 930 940 950 960
M28521.1 Staphyl...	Sequence	TAAGGGTGAT TTCCCGAAA AACAAATTACG AATATACAGT GATAATAAAA CATTATCCAC
690--F2	Sequence	970 980 990 1,000 1,010 1,020
M28521.1 Staphyl...	Sequence	AGAGCACCTT CATATTGACA TCTATTATGA AAAAAACCC CCCCNCAAA AANTNTTCC

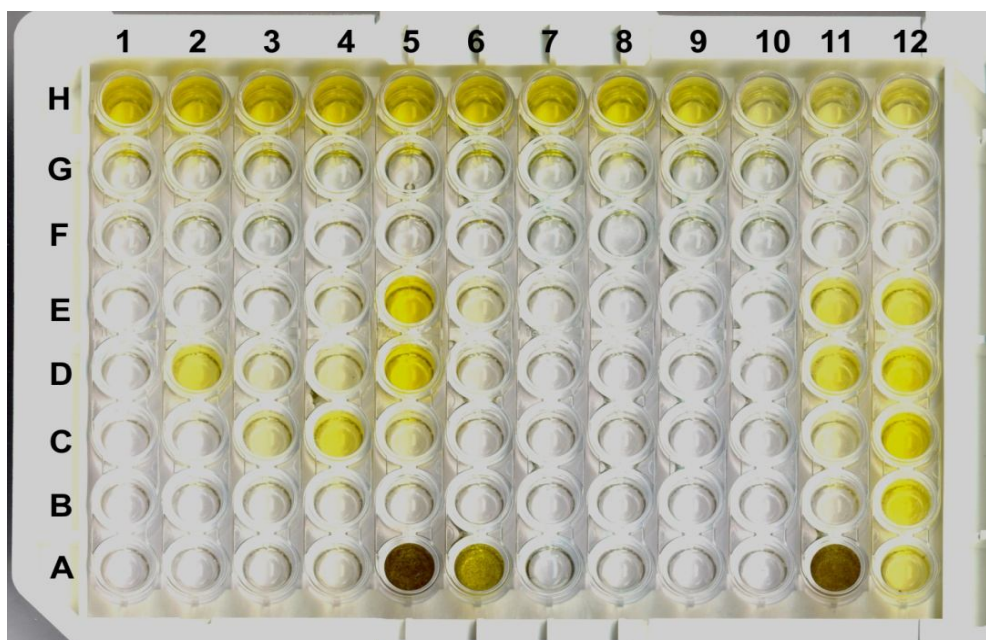
شکل ۳. مقایسه‌ی سکانس رشته‌ی *Forward* حاصل از این تحقیق (690-F2) با سکانس *Forward* ژن استاندارد انترتوکسین D/استافیلوکوکوس آرنوس موجود در بانک ژنی با کد M28521.1 نشان داده شده است.

نتایج آزمون الیزا جهت تأیید تولید انترتوکسین D: نتایج آزمون الیزا روی سویه‌هایی که دارای D ent بودند در شکل ۴ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد، ستون ۳ سویه‌ای از باکتری را نشان می‌دهد که فقط انترتوکسین D را تولید نموده است. ستون ۳ و ۴ سویه‌هایی از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که به طور ضعیف

انترتوکسین D و نیز مقدار کمی انترتوکسین C را تولید نموده‌اند. با این حال واکنش PCR وجود D ent را در آنها تأیید می‌کرد. ستون‌های ۵ و ۱۱ سویه‌هایی از باکتری را نشان داده است که علاوه بر تولید انترتوکسین D انترتوکسین‌های A و E را نیز تولید نموده است. ستون ۱۲ سویه‌ای از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که ۵

در این تصویر ردیف H مربوط به گرادیانی از غلظت استاندارد انتروتوکسین (۲ تا ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر) موجود در کیت بوده است.

انتروتوکسین شایع را تولید نموده است. ستون‌های ۱، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ سویه‌ای از استافیلوکوکوس آرنوس کوآگولاز مثبت را نشان می‌دهد که هیچ یک از انتروتوکسین‌ها را تولید نکرده است. واکنش PCR این سویه‌ها نیز ژن ent D را نشان نداد.



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 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 حالی که 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 از یک انتروتوکسین را تولید نماید. این موضوع توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. چنان‌که در سال ۲۰۰۹ میلادی

در هر حال، نتایج بررسی مولکولی ۳۱۰ سویه‌ی استافیلوکوکوس آرنوس 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

انتروتوکسین D اجتناب ناپذیر شده است؛ زیرا، بروز تغییرات ژنتیکی در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس آرتوس نشان داده شده است (۲۵). از این رو، در این تحقیق، با انتخاب پرایمر مناسب روشی جهت تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس 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 آرتوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین متفاوت (۳/۵ تا ۷۰ درصد) گزارش شده است (۲۹-۲۶)، اما در کشور ما به دلیل نبود سویه‌ی استاندارد آمار دقیقی از بروز عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌های آرتوس 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 سلطانیپور و دکتر محمد رهبر جهت واگذاری سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بیمار تشکر و قدردانی می‌گردد.

Ifesan و همکاران نشان دادند، برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس 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 (۱۹ و ۲۰). شاید یکی از دلایل تحقیقات گسترده در خصوص تشخیص و تعیین نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرتوس تحریک تولید $TNF-\alpha$ (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 انتروتوکسین از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. چنان‌که در سال ۱۹۹۳ میلادی He, X و Matsumoto, Y و همکاران نقش انتروتوکسین D استافیلوکوکوس آرتوس را در افزایش تولید فاکتور آتریت روماتوئید و نیز در ایجاد بیماری‌های خود ایمنی نشان دادند (۲۲ و ۲۱). در هر حال، تنوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌ها ضرورت پرداختن به توسعه‌ی روش‌های تشخیصی نوین را اجتناب ناپذیر نموده است (۲۳ و ۲۴). برخی از کشورها برای هریک از سویه‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین روش‌های 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 استاندارد 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 آرتوس تولیدکننده‌ی انتروتوکسین‌ها از جمله

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 methicillin-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, Rammelmayer 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 RA¹, Karami A², Sorouri Zanjani R³, Bagheri M⁴

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

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

³Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

⁴Therapeutic 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* samples isolated 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 Genbank. 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 enterotoxin 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 producing toxins 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