شناسایی مولکولی ژن‌های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بثورات بافت پوستی انسان و شیر میش‌های مبتلا به ورم پستان تحت حاد

عبداله کیانی‌سلمی[۱]، عزیزاله ابراهیمی‌کهریزسنگی[۲]، اعظم مختاری[۲]*

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری کروی و گرم مثبت از خانواده *میکروکوکاسه* است و با ترشح سموم مختلف از جمله انتروتوکسین شرایط تهاجم به میزبان را فراهم می‌آورد. هدف این مطالعه شناسائی ژن انتروتوکسین *Sea, Seb, Sec* و *Sed* در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جداشده از عفونت‌های پوستی بافت انسان و میش‌های مبتلا به ورم پستان تحت حاد بود. در این تحقیق، تعداد ۱۱۰ ایزوله مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد، ابتدا ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی تأیید شدند. سپس آزمون PCR بر روی ٦٧ نمونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی ژن‌های ذکر شده انجام شد. نتایج نشان داد از ۳۸ ایزوله جدا شده از عفونت‌های بافت پوستی انسان ۱۹ ایزوله از نظر حضور ژن‌های *Seb*و *Sec* مثبت بودند که از آن میان ،۷ ایزوله (۱۸/٤۲٪) ژن*Seb* و ۱۲ ایزوله (۳۱/۵۸) ژن *Sec* را داشتند. همچنین از ۲۹ ایزوله جدا شده از میش‌های مبتلا به ورم پستان تحت حاد،۱۳ ایزوله از نظر ژن‌های*Sea, Seb, Sec* و *Sed*مثبت شدند،که از آن میان،۵ ایزوله (۱۷/۲٤٪) ژن *Sea*، ٤ ایزوله (۱۳/۷۹٪) ژن *Seb*، ۳ ایزوله (۱۰/۳٤٪) ژن Secو ۱ ایزوله (۳/٤۵٪) ژن *Sed* را داشتند.نتایج با تعیین توالی تأیید شد و نشان داد درصد بالایی از *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از نمونه‌های بالینی دارای ژن‌های انتروتوکسین می‌باشند که با توجه به اهمیت تولید این توکسین‌ها توسط سویه‌های بیماری‌زا، در صورت بیان این ژن‌ها، درمان سریع عفونت ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، عفونت پوستی انسان، ورم پستان تحت حاد میش.*

تاریخ دریافت: ۹٤/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۲/۳

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس (*Staphylococcus*) در خانواده میکروکوکاسه (*Micrococcaceae*) قرار دارند(۱). این اجرام باکتریایی، کروی و گرم مثبت به قطر ۰/۵ تا۱/۵ میکرون، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری‌اند (۳). اعضای این جنس دارای بیش از ۲۰گونه می‌باشند، که برخی از گونه‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند (۵).*S. aureus* یک عامل بیماری زای فرصت طلب است که به عنوان عامل عفونت زخم‌های سوختگی پس از *سودوموناس آئروژینوزا* در رتبه دوم قرار داشته و بسیار شایع است (۱۲). این باکتری تعداد زیادی پروتئین‌های خارجی ترشح می‌کند که از علل اصلی بیماری‌ها در میزبان می‌باشند (۱۱). یکی از مهمترین این پروتئین‌ها سم انتروتوکسین است. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی شامل انواع A تا Vهستند(۱۵و٦). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ۸۰-۱۵ ٪ از موارد *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از منابع مختلف، قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشند(۱٦).

التهاب پستان به وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا ایجاد می‌شود، اما عفونت‌های پستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و در سراسر جهان و از آن جمله کشور ایران هرساله خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را در اثر کاهش تولید شیر، کاهش کیفیت شیر، هزینه درمان و غیره به صنعت دامپروری وارد می‌سازد (٤ و۲). عفونت بافت پستان گاو از نظر تهدید سلامت جامعه انسانی نیز اهمیت زیادی دارد. در حال حاضر با استفاده از روش‌های کنترلی جامع میزان بروز التهاب پستان در گاو کاهش یافته است، اما با این حال در طی مطالعات مختلف انجام

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*۲- استادیار،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir

شده مشخص گردیده است که *استافیلوکوکوس اورئوس* همچنان به عنوان یکی از میکرو ارگانیسم‌های بیماریزای مهم در ارتباط با التهاب پستان بالینی و تحت بالینی در گاو مطرح می‌باشد(۱۹و۳).

انتروتوکسین‌ها به لحاظ ساختاری و عملکردی مشابه بوده اما از نظر آنتی‌ژنیک متفاوت از یکدیگر هستند. بیش از ۹۰٪ از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس که عامل مسمومیت غذایی هستند جزء گروه A-E بوده و گروه‌های A و D در بین انتروتوکسین‌های عامل مسمومیت غذایی از بقیه مهم‌تر هستند (۵) به طور کلی در موارد غیر از مسمومیت غذایی انتروتوکسین‌های A و B از بقیه فراوانی بیشتری دارند (۷و٤).

ژن‌های رمزکننده انتروتوکسین استافیلوکوکی توسط عناصر ژنتیکی متحرک مثل باکتریوفاژها (*sea, see, sep*) یا پلاسمیدها(*sed, sej, ser, ses, set*)و یا توسط جزیره های بیماریزایی (SaPIs) بر روی قطعات کروموزمی استافیلوکوکوس (*seb,sen, seo, sep, seq, sec, seh, sei, sek, sel, sem*) رمز می‌شوند(۲۲). بنابراین میتوان گفت ژن‌های انتروتوکسین به طور افقی نیز می‌توانند میانسویه‌های استافیلوکوکوس منتقل شوند و این احتمال وجود دارد که این عناصر ژنتیکی متحرک نقش مهمی را در تکامل استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن بازی کنند(۱۸).

روش‌های مختلفی از جمله لاتکس آگلوتیناسیون، الایزا، ایمونو دیفیوژن و رادیو ایمونواسی برای شناسایی عوامل بیماری‌زای نامبرده توسط این باکتری وجود دارند که در همه‌ی این روش‌ها به فراهم شدن شرایطی برای بیان شدن ژن‌های استافیلوکوکی نیاز است. روش‌های تشخیصی مولکولی نیز برای شناسایی ژن‌های استافیلوکوکی استفاده می‌شوند که نه تنها نیازی به فراهم شدن این شرایط ندارند بلکه قادر به شناسایی استافیلوکوک‌هایی که سم را به میزان کم ترشح کرده‌اند نیز می‌باشند. روش‌های مولکولی ازجمله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR برای جستجوی این ژن‌ها بسیار مناسب است (۲۲ و ۲۰، ۱۷).

مطالعات متعددی در ایران صورت گرفته که از آن جمله می‌توان به مطالعات انوری و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ایمانی فولادی و همکاران در سال ۲۰۰۷ اشاره نمود (۱۱و۷). با توجه به اهمیت این انتروتوکسین‌ها در بهداشت و سلامت جامعه و اهمیت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و نقش انتروتوکسین‌های آنها به عنوان سوپر آنتی‌ژن در ایجاد بیماری‌های مختلف این مطالعه با هدف جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های دامی و انسانی و شناسایی جدایه‌های واجد ژن کد کننده انتروتوکسین‌های A تا D به روش مولکولی انجام شد.

مواد و روش کار

۱ـ نمونه‌گیری

این مطالعه روی ۱۱۰ نمونه (از مهرماه ۱۳۹۲ تا اسفندماه ۱۳۹۳) در شهرکرد انجام شد. جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از موارد عفونت‌های قارچی بافت پوستی انسان، ارجاعی به درمانگاه‌های پوست سطح شهرکرد و جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از موارد بیماری‌های دامی دامداری‌های سطح شهرکرد جمع‌آوری گردیدند. از نمونه‌های پوست با استفاده از سواب مرطوب نمونه‌گیری به عمل آمد و سواب در محیط انتقالی استوارت (Stuart transfer medium, Himedia, India) به آزمایشگاه منتقل گردید. از موارد تحت بالینی التهاب پستان گاو با رعایت اصول نمونه گیری به روش Sears و همکاران – ۱۹۹۱ نمونه‌های شیر در ویال‌های استریل درپوش دار اخذ شد (۲۱) پس از دریافت جدایه‌ها، آزمایش‌های فنوتیپی تأییدی شامل کشت مجدد، آزمایشات بیوشیمیایی و نیز کواگولاز انجام شد و در نهایت از ۵۰ نمونه عفونت‌های پوستی انسانی ۳۸ نمونه و از ٦۰ نمونه بیماری‌های

دامی ۲۹ نمونه تأیید شده وبرای جستجوی ژن‌های *sea*، *seb*، *sec*و*sed*توسط روشPCRمورد مطالعه قرار گرفتند.

۲ـ آزمایشات فنوتیپی تأییدی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*):

نمونه‌ها روی محیط آگار خون دار تهیه شده از خون گوسفندی کشت گردید. پلیت‌ها ۲٤ ساعت در دمای ۳۷^{oC} در انکوباتور (گرمخانه) قرار گرفته و بعد از مشاهده پلیت‌ها پرگنه‌های به قطر٤ تقریبی میلی‌متر، صاف، براق با منطقه‌ی همولیز دوتایی به عنوان پرگنه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس انتخاب شده و آزمون‌های کاتالاز، کواگولاز، اوره‌آز و رشد در محیط مانیتول سالت آگاربرای آنها انجام گرفت (۹).

۳ـ استخراج DNA

به منظور استخراج DNA به روش جوشاندن (٤)، باکتری‌های کشت داده‌شده در محیط LB در بن ماری ۱۰۰^{oC} به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس محتویات به لوله های اپندورف جدید منتقل و به مدت ۵ دقیقه با دور۶۰۰۰rmp سانتریفوژ شدند. مایع رویی حاوی DNA باکتریایی تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰^{oC}- قرار گرفت.

٤-PCR

برای آزمایش PCR توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer طراحی شد. توالی‌های مورد نظر در جدول ۱ قابل مشاهده است. پرایمرها توسط شرکت ژن فناوران ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

حجم هر واکنش PCR انجام شده در این پژوهش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که این حجم شامل: DNA ۲µl و ۱۲/۵µl محلول Red Taq polymerase mastermix (2X، Ampliqon، ID NO: 5200300 ، محصول دانمارک)، µl ۰/۵ از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول و µl ۹/۵ آب مقطر دیونیزه استریل بود. پس از مخلوط کردن، میکروتیوب‌های PCR در داخل دستگاه ترموسایکلر (Corbett-Research، استرالیا) قرار داده شد. پس از انجام PCR، نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵٪ (سیناژن،ایران، شماره کاتالوگMR7730C) با استفاده از سایز مارکر با نام تجاری GeneRuler 50 bp DNA مورد الکتروفورز قرار گرفتند. سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین شامل *sea+*: D4508، *seb+*:ATCC14458، *sec+*: AB80002 و *sed+*: NCTC 9393 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران به عنوان کنترل مثبت در هر واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر (´5 به ´3)	طول باند
sea	پرایمرF	CTTGTAAATGGTAGCGAG	٤۰۱
sea	پرایمرR	CCATAAATTGATTGGCAC	
seb	پرایمرF	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	۱٦٤
seb	پرایمرR	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	
sec	پرایمرF	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	٤۵۱
sec	پرایمر R	CACACTTTTAGAATCAACCG	
sed	پرایمرF	AGCATTAATTGTTATGGTGG	٤۰۰
sed	پرایمرR	TATGAAGGTGCTCTGTGG	

جدول ۲ـ برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۳ دقیقه	۹٤	دناتوراسیوان اولیه
۳۰	۳۰ ثانیه	۹٤	دناتوراسیون
	٤٥ ثانیه	(*sed*)٥۳	اتصال
	٤٥ ثانیه	(*sec*)٤۷	
	٤٥ ثانیه	(*seb*)٤۸	
	٤٥ ثانیه	(*sea*)٤۸	
	۳۰ثانیه	۷۲	پیشروی
۱	٥ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی

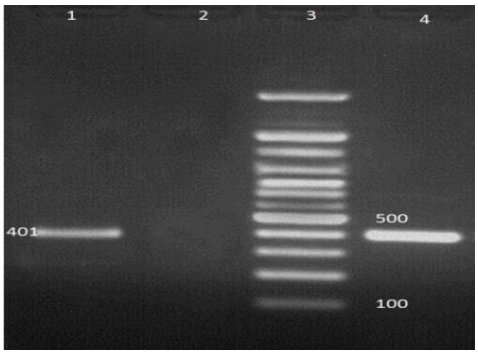
۵-تعیین توالی

به منظور تأیید محصولات به‌دست آمده در واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

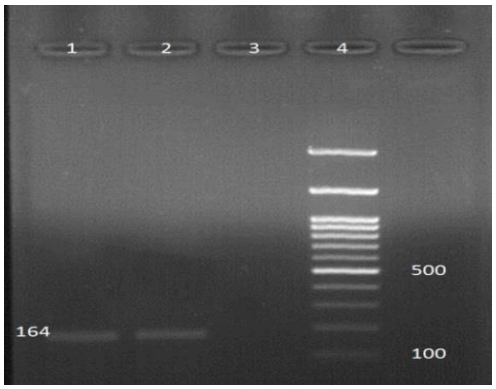
نتایج

۱- PCR

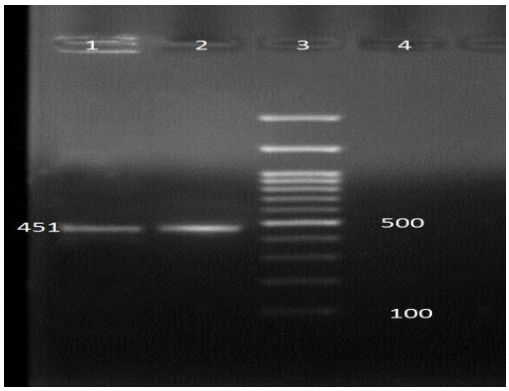
در آزمون PCR، قطعه ٤۰۱ جفت بازی در نمونه کنترل مثبت و نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن *Sea* (نگاره۱) و قطعه ١٦٤ جفت بازی در کنترل مثبت و نمونه‌های مثبت از نظر ژن *Seb*، (نگاره ۲) قطعه ٤٥١ جفت بازی در نمونه کنترل مثبت و نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن *Sec* (نگاره۳) و قطعه ٤۰۰ جفت بازی در کنترل مثبت و نمونه‌های مثبت از نظر ژن *Sed*، مشاهده شد(نگاره٤).



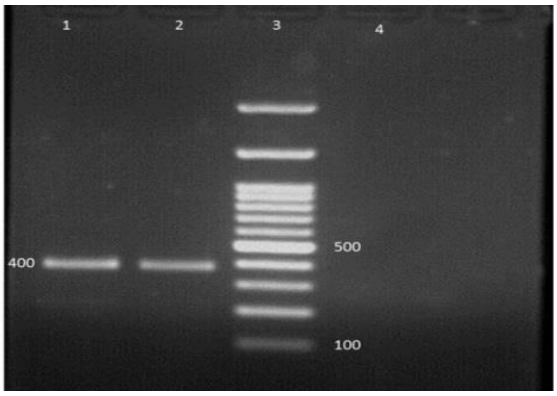
نگاره ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR،۱= باند ٤۰۱ bp مربوط به نمونه مثبت *sea*، ۲- کنترل منفی *sea*، ۳- GeneRuler 100 bp (DNA Ladder, Fermentas) La100، ٤ = کنترل مثبت *sea* (D4508)



نگاره۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR،۱= باند ١٦٤ bp مربوط به نمونه مثبت *seb*،۲-کنترل مثبت seb (ATCC14458)، ۳- کنترل *منفی seb*، ٤- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) La100)



نگاره۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR،۱- باند ٤٥۱bp مربوط به نمونه مثبت *sec* (AB80002)، ۲-کنترل مثبت *sec*،۳- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) La100) ، ٤- کنترل *منفی sec*،



نگاره٤- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR، ۱- باند ٤۰۰bp مربوط به نمونه مثبت *sed*، ۲- کنترل مثبت *sed* (NCTC 9393)، ۳- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) La100)، ٤- کنترل منفی *sed*

به طور کلی از ۳۸ نمونه عفونت پوستی انسانی تعداد ۰ نمونه (۰٪) دارای ژن *Sea* بودند و در ۷ نمونه (۱۸/٤۲٪) باند ١٦٤ جفت بازی مربوط به ژن *Seb* مشاهده شد. تعداد نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن ۱۲Sec نمونه (۳۱/۵۸) بود و هیچ یک از جدایه‌ها ژن *Sed* را نداشتند. از۲۹ نمونه میش‌های مبتلا به ورم پستان تحت حاد در ۵ نمونه (۱۷/۲٤٪) ژن *Sea*، در ٤ نمونه (۱۳/۷۹٪) ژن *seb*، در ۳ نمونه (۱۰/۳٤٪) ژن sec و در ۱ نمونه (۳/٤۵٪) ژن Sed شناسایی شد. ۱۰/٤٤٪ از نمونه‌ها نیز هم زمان دو یا تعداد بیشتری ژن مربوط به انتروتوکسین‌های مجزا را نشان دادند (جدول‌های ۳ و ٤).

جدول ۳- میزان فراوانی ژن‌های انتروتوکسین‌های A_D در نمونه‌های انسانی این مطالعه

نام ژن	تعداد موارد مثبت	درصد موارد مثبت
sea	۰	٪۰
seb	۷	٪۱۸/٤۲
sec	۱۲	٪۳۸/۵۱
sed	۰	٪۰
جمع	۱۹	٪۵۰

جدول ٤- میزان شیوع ژن انتروتوکسین‌های A_D در نمونه‌های دامی این مطالعه

نام ژن	تعداد موارد مثبت	درصد موارد مثبت
sea	۵	٪۱۷/۲٤
seb	٤	٪۱۳/۷۹
sec	۳	٪۱۰/۳٤
sed	۱	٪۳/٤۵
جمع	۱۳	٪٤٤/۸۲

۲- تعیین توالی

پس از تعیین توالی، همترازی توالی گرفته شده از خوانش سکانس محصولات PCR با امپلیکون مورد انتظار به خوبی کفایت جداسازی ژن‌های مورد نظر را تأیید نمود.

بحث

مطالعات نشان می‌دهد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* به ویژه در بیماران مستعد از قبیل بیماران سوختگی یا بیماران مبتلا به بیماری‌های پوستی یا مخاطی رو به افزایش است (٤). در مطالعه حاضر ٤۷/۷٦٪ از ٦۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس حداقل یکی از انواع ژن‌های رمزکننده انتروتوکسین را حمل می‌کردند. مطالعات دیگری نیز در مورد ردیابی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های انسانی در دسترس است. در مطالعه‌ای مانی فولادی و همکاران (۲۰۰۷) جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ۲۰۰ بیمار پوستی تولید کننده انتروتوکسین‌های نوع A و B بودند (۱۱). انوری و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که از ۵۰ جدایه بالینی ۷٤٪ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های زخم، انتروتوکسین تولید می‌کردند (۷). درد و مطالعه اخیر نیز بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های پوستی کار شده است و تفاوت در میزان شیوع می‌تواند مربوط به افزایش تولید توکسین با توجه به گذشت زمان یا مربوط به تفاوت در محل نمونه‌گیری باشد.

نتایج مطالعه حاضر با نتایج دیگر مطالعات بیان شده، متفاوت است. علت آن می‌تواند تفاوت در حجم نمونه مطالعه باشد، زیرا مشخص شده که فراوانی سویه‌های *S. aureus* تولید کننده انتروتوکسین بر اساس منشاء انسانی، حیوانی، موادغذایی، نوع عفونت و محیط اطراف متفاوت است. در مطالعه حاضر ژن رمزکننده انتروتوکسین C (*sec*) در بین ژن‌های کلاسیک رمزکننده انتروتوکسین در جدایه‌های انسانی، فراوان‌ترین ژن (۲۲/۳۹٪) بود و به دنبال آن به ترتیب *seb*،*sea* و *sed* با فراوانی کمتر شناسایی شدند. در واقع در نمونه‌های انسانی مطالعه حاضر ژن‌های *sea* و *sed* شناسایی نشدند. این در حالی است که فراوانی ژن‌های انتروتوکسین بطور قابل توجهی در دیگر مطالعات متنوع است. سالاری شریف و همکاران در سال‌های ۱۳۸٦ تا ۱۳۸۷ نمونه‌هایی از محل زخم، خون، گوش، استفراغ، بینی و ادرار بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی کرمان را جمع آوری کرده و به روش PCR از ۲۳/۸۳٪ از نمونه‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا نمودند. نتایج کار آنها نشان داد ۷٤٪ از نمونه‌ها هر دو ژن *sea* و *seb* را داشتند و ۲۲٪ تنها ژن مربوط به انتروتوکسین A و ٤٪ نیز ژن انتروتوکسین B را حمل می کردند. در مطالعه سالاری شریف و همکاران ردیابی ژن‌های *sed* و *sec* انجام نشده بود (۳). در مطالعه ای دیگر دادگر و همکاران در سال ۱۳۹۲ از ۱۲۰ مورد بیماران و ۸۰ مورد حاملین سالم شاغل در مراکز درمانی گرگان استافیلوکوکوس اورئوس جدا نموده و جدایه ها از نظر حضور ژن‌های انتروتوکسین‌های A-E بررسی شدند. ۸۷/۵٪ از جدایه‌های این مطالعه حداقل یکی از ژن‌های A-E را داشته و فراوان‌ترین ژن sea بود و فراوانی ژن‌های *sec*، *seb*، *see* و *sed* به ترتیب کمتر گزارش شد (۲).

گادیاری و همکاران در سال ۱۳۹۰ به ردیابی مولکولی ژن‌های *sea*، *seb*، *sec*، *sed* در نمونه‌های زخم بیماران سوختگی بیمارستان مطهری تهران پرداخته و نشان دادند ۱۲٪ جدایه‌ها دارای ژن *sea*، ۱٪ دارای ژن *seb*، ۳۵٪ دارای ژن *sec* و ۳٪ دارای ژن *sed* بودند (٤). در این مطالعه ٤۲٪ از نمونه‌ها حداقل دو ژن انتروتوکسین را حمل می‌کردند. نتایج این مطالعه تا حدودی با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد اما به طور کلی در میزان فراوانی ژن‌ها در مطالعات مختلف متفاوت است و البتهعاملی که باید مورد توجه قرار گیرد، تفاوت در نوع نمونه‌های بالینی در بین این مطالعات می‌باشد. در واقع درصد جدایه‌های دارای ژن انتروتوکسین براساس محلی که از آن نمونه گیری انجام می‌شود تفاوت معنی داری دارد. Nashev و همکاران در سال ۲۰۰۷ *sea* را به عنوان فراوان‌ترین ژن انتروتوکسین (۲۳٪) در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بینی گزارش دادند (۱٦). می‌توان گفت فراوانی سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین در نمونه‌های جدا شده از عفونت‌های مختلف متفاوت می‌باشد که البته نیاز به بررسی دارد.

در این مطالعه ۱۰/٤٤٪ از جدایه‌ها، ژن‌های متفاوت رمز کننده انتروتوکسین‌ها را با هم حمل می‌کردند این نتایج مخالف نتایج Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۵) می‌باشد که گزارش کردند هیچ نمونه‌ای بطور هم ـ مثبت نبوده است. علت آن ممکن است تفاوت در روش انجام تحقیق و منشاء سویه‌ها باشد.در مطالعه حاضر فراوانی ژن‌های *sea*، *seb*، *sec* و *sed*در جدایه‌های دامی به ترتیب ۱۷/۲٤٪، ۱۳/۷۹٪، ۱۰/۳٤٪ و ۳/٤۵ ٪ گزارش شد. اما این میزان شیوع در مطالعات دیگری که تاکنون انجام شده متفاوت است. از آن جمله، Srinivasan و همکاران در سال ۲۰۰٦ میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان را بررسی کردند و نشان دادند ۹۳/٦٪ نمونه‌ها از نظر حضور یک یا بیش از یک ژن انتروتوکسین مثبت بودند. در مطالعه آنها ترتیب فراوانی ژن‌های انتروتوکسین به صورت *sen*(٪۸٤/٦)، *sem*(٪۷۱/۸)، *sei*(٪٦۰/۳)، *sed*(٪۵۲/٦)، *seg*(٪۲٤/٤)، *seq*(٪۱٦/۷)، *seo*(٪۱۲/۸)، و *seb*(٪۱/۳) گزارش شد و هیچ یک از نمونه‌ها ژن‌های *sea*، *sec*،*see*،*sej*،*sek*، *sel*، و *sep* را نداشتند (۲۳).

Olivera و همکاران در سال ۲۰۱۱ ، نشان دادند ۰/٦٪ از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *sec*، ۲/٤٪ ژن *sed* را داشته و در ایزوله‌های جدا شده، ژن‌های *sea*، *seb*،*sec*،*sed*، *see*یافت نشد (۱۷). Cenci-Goga و همکاران در سال ۲۰۰۳ تولید انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* را در گاوهای مبتلا به ورم پستان با استفاده از تست لاتکس آگلوتیناسیون بررسی نموده و نشان دادند از بین ۱٦۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۲ جدایه انتروتوکسین تولید می کردند. ۷ جدایه *sec*، ۱۲ مورد*sed* و ۳ جدایه هر دو انتروتوکسین *sed* و*sec* را تولید کردند و هیچکدام از جدایه‌ها *sea* و *seb* را تولید نمی‌کردند (۸).

احمدی و همکاران در سال ۱۳۹۲ فراوانی ژن‌های تولید کننده انتروتوکسین را در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های شیر مربوط به التهاب پستان گاو گاوداری‌های تبریز و ارومیه را به روش PCR مورد بررسی قرار داده و نشان دادند از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵ جدایه ژن *sec*، ٦ جدایه ژن *seg* و یک جدایه ژن *seh* را داشته و ژن‌های کد کننده مربوط به انتروتوکسین‌های A، B، C و Eدر هیچ کدام از جدایه‌ها یافت نشد (۱). در مطالعه انجام شده توسط Naffa و همکاران در سال ۲۰۰٦، گزارش گردید که در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *sea* در مقایسه با بقیه ژن‌های مؤثر در تولید انتروتوکسین غالب بوده است (۱۵).

نتایج مشابهی در ارتباط با غالب بودن ژن *sea* در جدایه‌های با منشاء انسانی توسط Becker و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Mehrotra و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش گردیده است. با این حال Larsen و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که ژن*sec* در بین جدایه‌های با منشاء گاوی معمول‌تر است. (۱٤) در مطالعه‌ای که توسط Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام گرفته است، مشخص شده است که انتروتوکسین‌های I ،J و G بیش از سایر انواع انتروتوکسین در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد التهاب پستان گاو شایع می‌باشند (٦).

مطالعه‌ای که توسط Haveri و همکاران انجام گرفته است، نشان داد از ۱۱۹ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از التهاب پستان گاو، ۹۲ جدایه (۷۷/۳٪) قابلیت تولید انتروتوکسین را داشته و در این بین *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مولد انتروتوکسین *sea* در مقایسه با بقیه غالب بوده است (۱۰).

نتایج مطالعات فوق که توسط محققان مختلف انجام گرفته است نشان‌دهنده اختلاف در پراکندگی ژن‌های مؤثر در تولید انواع انتروتوکسین در بین جدایه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که این امر احتمالاً از تفاوت‌های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه‌های جدا شده (شیر، انسان و دام‌های مختلف) ناشی می‌شود. همچنین الگوی عفونت داخل پستانی *استافیلوکوکوس اورئوس* اغلب از گله‌ای به گله دیگر متفاوت است و این الگوها می‌تواند به تفاوت‌های بین سویه‌ای، ویژگی‌های جغرافیایی و خصوصیات میزبان و بافت مربوطه بستگی داشته باشد(۲٤و٤،۲۱) با توجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد التهاب پستان و نقش توکسین‌های متنوع تولید شده توسط این جرم در ایجاد بیماری در انسان و دام و عدم وجود اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود توکسین‌های مذکور در بین جدایه‌های حاصل از موارد التهاب پستان، انجام مطالعات جامع در مورد انتشار ژن‌های مولد انتروتوکسین در گله‌های دیگر مناطق مختلف استان با تعداد نمونه بیشتر توصیه می‌گردد. همچنین برای به دست آوردن اطلاعات کامل در ارتباط با ژن‌های مذکور می‌توان بررسی‌های بیشتری در مناطق مختلف کشور و نیز در جدایه‌های به دست آمده از منابع دامی دیگر انجام داد.

روش‌های مختلفی جهت شناسایی قابلیت تولید توکسین‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به ایمونودیفوزیون، آگلوتیناسیون و الایزا اشاره نمود. این روش‌ها اغلب امکان شناسایی غلظت‌های بسیار کم توکسین و شناسایی سویه‌هایی با

توانایی تولید بالقوه توکسین را ندارند، لذا شناسایی مستقیم ژن کد کننده انتروتوکسین‌ها با استفاده از روش PCR معیار مناسبی جهت مشخص نمودن قابلیت تولید توکسین توسط یک سویه می‌باشد (۲۰)

تحقیقات نشان می‌دهد که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در خصوصیات ساختاری وبیولوژیکی مشابه هستند اما در مقادیر تولید شده و مکانیسم‌های بیان ژن، نسبت به دیگر انتروتوکسین‌ها متفاوت بوده و به میزان بیشتری بیان می‌شوند (۲٤). با این حال در مطالعه حاضر فقط وجود ژن‌های انتروتوکسین با استفاده از روش ژن و تیپی و PCR مورد بررسی قرار گرفت و از نظر فنوتیپی میزان بیان ژن‌ها یا انتروتوکسین ارزیابی نشد. در اکثر بیماری‌های ایجاد شده توسط *S. aureus* فاکتورهای متعددی در بیماری‌زایی دخیل هستند. تشخیص دقیق نقش هر فاکتور در ایجاد بیماری مشکل است. اما ایجاد ارتباط بین سویه‌های جدا شده از بیماران و بیان عوامل بیماری‌زایی مشخص، ممکن است مسیری را در پاتولوژی بیماری‌های خاص پیشنهاد کند. برای دستیابی به این هدف، کاربرد بیولوژی مولکولی در شناسایی فاکتورهای بیماری‌زایی، پیشرفت‌هایی در نتایج تشخیصی بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس ایجاد خواهد کرد(۲۳،۱۳).

به طور کلی نتایج این مطالعه نتایج نشان داد از ۳۸ ایزوله جدا شده از عفونت‌های بافت پوستی انسان ۱۹ ایزوله (۵۰٪) از نظر حضور ژن‌های *Seb* و *Sec* مثبت بودند که از آن میان، ۷ ایزوله (۱۸/٤۲٪) ژن *Seb* و ۱۲ ایزوله (۳۱/۵۸) ژن *Sec* را داشته و ژن‌های *Sea* و *Sed* شناسایی نشد در حالیکه از ۲۹ ایزوله جدا شده از میش‌های مبتلا به ورم پستان تحت حاد، ۱۳ ایزوله (٤٤/۸۳٪) از نظر ژن‌های*Sea, Seb, Sec* و *Sed* مثبت شدند، که از آن میان، ۵ ایزوله (۱۷/۲٤٪) ژن *Sea*، ٤ ایزوله (۱۳/۷۹٪) ژن *Seb*، ۳ ایزوله (۱۰/۳٤٪) ژن *Sec* و ۱ ایزوله (۳/٤۵٪) ژن *Sed* را داشتند. این نتایج بیانگر این مسأله است که چه در دام و چه در انسان فراوانی سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین قابل تأمل است. کنترل عفونت‌های استافیلوکوکوسی مقاوم به آنتی بیوتیک و مولد توکسین بسیار مشکل است و هیچ راه درمانی سنتی و مشخصی در این زمینه وجود ندارد. در این حالت کنترل سرایت این قبیل میکروارگانیسم‌ها اهمیت زیادی دارد و روش‌های دسته‌بندی فنوتیپی و ژنوتیپی در تشخیص کلونالیتی جدایه‌ها و کنترل بهتر آنها بسیار سودمند خواهند بود. برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم و ضروری است که مطالعات منطقه‌ای با هدف دستیابی به اطلاعات در مورد گونه و نوع استافیلوکوکوس‌ها و همچنین مقاومت آنها انجام شود تا در انتخاب دستورالعمل درمانی مناسب و راهکارهای درست پیشگیرانه راه‌گشا باشد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد (در قالب پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی به شماره ۱۷۰/۲۱/۳۱) قدردانی نمایند. در عین حال مراتب قدرشناسی و تشکر از زحمات کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اعلام می‌گردد.

فهرست منابع

۱- احمدی، م.، دستمالچی ساعی، ح. (۱۳۹۲): بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های شیر مربوط به التهاب پستان گاو به روش PCR، مجله دامپزشکی ایران، ۹(۳): ۲۷-۳۵.

۲- دادگر، ت.، قائمی، ع.الف.، بهادر، ن.، ایمانی فولادی، ع.ع.، کمره ئی، ف. (۱۳۹۲): تعیین ژن‌های انتروتوکسین نوع A_E باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، مجله علوم آزمایشگاهی، ۷ (۵): ۱-۷.

۳- سالاری شریف، ع.، ستاری، م.، مرادی، م.، شاهرخ‌آبادی، ر. (۱۳۹۱): ردیابی ژن‌های انتروتوکسین A و B باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه

کننده به مراکز درمانی شهرستان کرمان و رفسنجان با روش مولکولی، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۱: ۱۲۸-۱۳۶.

٤- گادیاری، ف.، ستاری، م.، برومند، م.ع.، یعقوبی، ر.، سپهری سرشت، س.، پورقلی، ل. (۱۳۹۰): ردیابی مولکولی انتروتوکسین‌های A، B، C، D *ستافیلوکوکوس اورئوس* در سویه‌های بالینی جدا شده از بیماران سوختگی بیمارستان مطهری تهران، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۵(۵): ۲۰-۲۷.

5- Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E., Usleber, E. (2008): Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. Int. J. Food Microbiol. 124: 211-216.

6- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lamller, C., Wolter, W. and Zschock M. (2001): Toxin genes and other characteristics of*Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 959-964.

7- Anvari, S.h., Sattari, M., Forozandehe-Moghadam, M., Najar Peerayeh, Sh., Imanee-Fouladi, A.A. (2008): Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. Res J. Biol. Sci. 3(8): 826-829.

8- Cenci-Goga, B.T., Karama, M., Rossitto, P.V., Morgante, R.A., Cullor, J.S. (2003): Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. J. Food Prot. 66(9):1693-1696.

9- Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Giangolini, G., Sorbar, L., Dottarelli, S., Battisti, A., Amatiste, S. (2015):Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. Int. Dairy J. 42: 12–15.

10- Haveri, M., Roslof, A., Rantala, L. and Pyprala, S. (2007): Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent andnonpersistent intramammary infections withdifferent clinical characteristics. J. Appl. Microbiol. 103: 993-1000.

11- Imanifooladi, A.A., sattari, M., Najar Peerayeh, Sh., Hassan, Z.M., Hossainidoust, S.R. (2007): Detection the *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from Skin infections in hospitalized patients. Pak. J. Biol. Sci. 10 (3): 502-505.

12- Joo, Y., Fox, L., Davis, W., Bohach, G., Park,Y. (2001): *Staphylococcus aureus* associatedwith mammary glands of cows: genotyping todistinguish different strains among herds . Vet Microbiol. 80: 131-138.

13- Larsen, H.D., Aarestrup, F.M., Jensen, N.E. (2002): Geographical variation in the presence ofgenes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus*isolated from bovine mastitis in Europe andUSA. Vet. Microbiol. 85: 61–67.

14- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. (2000):Muliplex PCR for detection of genes for*Staphylococcus aureus* entrotoxins, exfoliativetoxins, toxic shock syndrome toxin 1, andmethicillin resistance. J. Clin. Microbiol. 38: 1032-1035

15- Naffa, R.G., Bdour, S.M., Migdadi H.M., Shehabi, A.A. (2006): Enterotoxicity and geneticvariation among clinical *Staphylococcus aureus*isolates in Jordan. J. Med. Microbiol. 55: 183-187.

16- Nashev, D., Toshkova, K., Bizeva1, L., Akineden, O., La¨mmler, C., Zscho¨ck, M. (2007): Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. Lett. Appl. Microbiol. 45: 681-685.

17- Oliveira, L., Rodrigues, A.C., Hulland, C., Ruegg, P.L. (2011): Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis. Am. J. Vet. Res. 72(10): 1361-1368.

18- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K. (2005): Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol. Lett. 246: 191-198.

19- Radostis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. Constable, P.D. (2007): Veterinary Medicine10thedition. Saunders, Washington. P: 673-674.

20- Schmitz, F.J., Veldkamp, K.E., Van Kessel,K.P.M., Verhoe, F. J. Van Strijp, J.A.G. (1998):Delta toxin from *Staphylococcus aureus*as a co-stimulator of human neutrophil oxidativeburst. J. Infect. Dis. 176:1531-1537.

21- Sears, P.M., Wilson, D.J., Gonzalez, R.N. and Hancock, D.D. (1991): Microbiological results for milk samples obtained premilking and post milking for the diagnosis of bovine intramammary infections. J. Dairy Sci. 74(12): 4183-4188.

22- Shuiep, E.S., Kanbar, T., Eissa, N., Alber, J., lammler, C., Zuchock, M. (2009): Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw camel milk samples. Res.Vet. sci. 86: 211-215.

23- Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasaris, L., Oliver, S.P. (2006): Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. Foodborne Pathog. Dis. 3(3): 274-783.

24- Veras, J.F., Carmo, L.S.,Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C.h., Santos, D.A., Cerqueira, M.M., Cantini, A., Nicoli, J.R., Jett, M. (2008): A study of the enterotoxigenicity of coagulasenegative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int. J. Infect. Dis. 12: 410-415.