بررسی تشخیص ملکولی استافیلوکوکوس اورئوس توسط ژن های SEA-SEB-SEC-23SR rRNA و روش کشت میکروبی

دکترحامد اهری[۱]، دکتردلاور شهباززاده[۲] *،دکترعلی میثاقی[۳]، دکترمحمدرضا پورشفیع[٤]، شیما قلی‌زاده سلطانی[٥]، سمیه عنایتی[٦]

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی مقایسه ای روش PCR با روش کشت میکروبی استافیلوکوکوس ارئوس می باشد. دو ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری استافیلوکوکوس، پپتیدگلیکان و اسیدهای تیکوئیک وابسته است که به علت سختی دیواره این نوع کوکسی گرم مثبت و عدم تأثیر آنزیم‌های لیزوزیم، پروتئاز K یا موتیلایزین، از لیز سلولی در ازت مایع استفاده گردید . به علت تنوع گونه ای (شامل ۷ گونه و ۲۷تحت گونه) و همچنین نقش این باکتری در بهداشت مواد غذائی، تشخیص سریع و دقیق آن از اهمیت به سزائی برخوردار است. در این بررسی ازژنS rRNA ۲۳که در انواع استافیلوکوکوس‌هاحفاظت شده استفاده گردید که مشخص شدکه تشخیص این باکتری با استفاده از روش ملکولی با پرایمر مذکور از سایر باکتری های گرم مثبت امکان پذیر و کاملا اختصاصی است و همچنین از سه پرایمر دیگر(A, B, C) جهت شناسائی واریته باکتری در روش PCR استفاده شد. در آزمایش انجام شده بر روی باکتری استرپتوکوکس فکالیس به عنوان کنترل منفی با استفاده از این پرایمر های اختصاصی، نتایج بیانگر آن بود که هیچگونه باندی در ژل الکتروفورز بدست نیامد و اختصاصی بودن آزمایش به اثبات رسید . محصولات به دست آمده bp ٤۹۹و۱۰۲و۱٦٤و٤٥۱به ترتیب برای ژن های A, B, C, 23 S rRNA بوده و همچنین میزان دقت آزمایش(۱۰۱) سلول در روش PCR بودکه در مقایسه با کشت میکروبی (۱۰۲) سلول قابل ملاحظه است.

واژ گـان کلیـدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، واکنش زنجیره ای پلی مراز، 23SrRNA*

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس از خانواده میکروکوکاسه اولین بار در سال ۱۸۷۸ توسط کخ در چرک مشاهده شد(۱). استافیلوکوکوس، کوکسی گرم مثبتی است که عفونت‌های متنوعی را در انسان ودام ایجاد می‌کند و به علت مقاومت

A Survey of Staphylococcus oreous molecular detection by using23S rRNA, A, B, C genes and microbial culture.

Ahari, H. [1] , Shahbazzadeh, D. [2] *, Misaghi, A. [3] , Pourshafie, M. [4] ,Gholizadeh, Sh. [5] , Enayati, S. [6]

1-Graduated of veterinary Medicine, Islamic Azad University, Urmia Branch ,Urmia, Iran
2-Department of Biotechnology, Pasteur Institute,Tehran, Iran (shahbazzadeh@pasteur.ac.ir)
3-Department of food hygiene, faculty of veterinary medicine, Tehran University, Tehran, Iran
4-Department of microbiology, Pasteur Institute, Tehran, Iran
5-Student of Veterinary Medicine, Urmia University,Urmia, Iran
6-Department of Biotechnology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

The aim of this study is comparing of two method of molecular technology PCR and microbial culture for detection of *Staphylococcus aureus*. Because of stiffness of cell wall composed of peptiglycan and related ticoeic acids of this positive gram cocci and lack of effect of lyzozyme enzymes, proteinase k or mutilysine, the liquid nitrogen lysis method was used. Due to the several kinds of these bacterium species (27 species and 7 sub species) and also role of this pathogen in food hygiene, rapid and accurate detection is very important. In this study 23S rRNA gene that is conserved in *staphylococcus* spp. was used in order to design a set of primers in molecule detection. By this method, each species and subspecies among other gram positive bacterial strains in contaminated samples could easily yraced. Furthermore three set of primers were designed to detect staph. Aureus species in PCR method. Streptococcus was used as negative control and by using these specific primers no bands were observed in gell electrophoresis which is a reason for specificity of this primer in different kinds of Staphylococcus spp. PCR products obtained were 499 bp, 102 bp, 164 pb and 451 pb for 23SrRNA, A, B,C genes respectively .Sensitivity of test was 10 cell in PCR, method comparing to 100 cell in culture method, is considerable.

Key words: *Staphylococcus oreous,Polymerase chain reaction, 23S rRNA*

۱- دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲- بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران(shahbazzadeh@pasteur.ac.ir)
۳-گروه بهداشت مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه تهران، تهران، ایران
٤- بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
٥- دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
٦- کارشناس بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

سویه‌های انسان به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان و تشخیص را مشکل می‌نماید. تشخیص سریع و به موقع سویه‌های باکتری از اهمیت ویژه‌ای در درمان عفونت برخوردار است. امروزه از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به موقع عفونت های میکروبی استفاده می‌نمایند.(۲،۱).با توجه به شایع بودن آلودگی نمونه های لبنی به انواع گونه های استافیلوکوکوس و همچنین راندمان پائین روش هائی مانند الیزا و کشت میکروبی می توان گفت که جایگزینی واکنش زنجیره ای پلی مراز به جای روش های مذکور کمک به سزائی در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن می نماید. در این راستا استفاده از ژن ۲۳S rRNA که در تمامی گونه های استافیلوکوکوس مشترک است نقش تعیین کننده ای در شناسائی انواع آلودگی های ناشی از استافیلوکوکوس و تمایز آن با دیگر باکتری ها را دارا می باشد(٦،۳).

مواد و روش کار

الف) کشت باکتری

سوش استاندارد استافیلوکوکوس (RTCC 2411) از بخش بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران فراهم شد.

با استفاده از لوله های استریل مقدار ۵ml از محیط کشت TSBحاوی۱۰۰ µl از سوش باکتری تهیه گردید و مدت (۲٤– ۱۸ ساعت) در انکوباتورمتحرک کشت داده شد. سپس حجم ۱/۵ ml را به داخل میکروتیوب انتقال داده و با دور g* ۳۰۰۰ به مدت ۵دقیقه سانتریفیوژ نموده پس از دور ریختن مایع روئی که حاوی محیط کشت TSB بوده ، سلولهای باکتری رسوب یافته جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

ب) استخراج DNA ژنومیک باکتری

در بررسی مولکولی ژنوم باکتری، اولین مرحله استخراج DNA ژنومیک می‌باشد.(۲۵) میزان ۳۰ µl از SDS(Sodium dodecyle sulfat)ده درصدبه میکروتیوپ حاوی کشت باکتری افزوده و سپس میکروتیوپ را به درون هاون چینی اتوکلاو شده تخلیه وازت C^o ۱۹٦– را به ۲ برابر حجم معادل در هاون ریخته و بعد از تشکیل کریستال‌های یخ در هاون، سلول‌ها خرد می شود که به علت تشکیل کریستال‌های یخ، دیواره سلولی باکتری (تحت تأثیر ضربات مکانیکی) به راحتی شکسته شده و بدون استفاده از هرگونه آنزیمی که جهت سوش‌های مختلف مصرف می‌گردد لیز سلولی انجام و DNA قابل استخراج می گردد(۲). سپس محتوای هاون را به درون میکروتیوپ انتقال داده و بعد از افزودن فنل کلروفورم وسانتریفوژ با g * ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه، مایع رویی را برداشته و فنل دور ریخته شد. سپس هم حجم فنل خارج شده، کلروفورم ایزوآمیل الکل ۱ به ۲٤ افزوده و با g*۱۰۰۰۰ به مدت ۲دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم. میتوان حجم ۲۰ µl آنزیم RNase جهت لیز RNA اضافه کرد. سپس ۷/۵ µl کلرور سدیم (٦,۵ مولار)جهت رسوب کلاف DNA اضافه کرده و با اضافه نمودن ٦۰۰ µl از ایزوپروپانل و باقی ماندن در دمای محیط به مدت ۱۰دقیقه و سانتریفوژ g * ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای C^o ٤ و تخلیه مایع رویی و باقی ماندن پلیت کف میکروتیوپ شستشو با اتانل ۷۰٪ انجام گرفت و این عمل دو بار تکرار گردید. و سپس سانتریفوژ نهایی با g*۹۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و در نهایت الکل رویی را تخلیه و میکروتیوپ را به صورت وارونه و درباز به روی کاغذ رطوبت‌گیر برای ۳۰ دقیقه گذارده. و بعد خشک شدن این پلیت، ۱۰۰ µl آب مقطر دوبار تقطیرشده به آن اضافه گردید.

ج) تشخیص مولکولی به کمک ژن توکسیک ژن Sr A-B-C– ۲۳RNA

۱) با استفاده از منابع موجود در این زمینه و بررسی سکانس ژن ۲۳Sr RNA باکتری استافیلوکوکوس، یک جفت پرایمرFکه مشترک در انواع استافیلوکوکوس ها می باشد) (۲) و همچنین جهت شناسائی ژنهای توکسیک A-B-C، از پرایمرهای اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد که سرانجام چهار جفت پرایمر به شرح ذیل از طریق شرکت سیناژن تهیه گردید.

جدول۱ : سکانس پرایمرهای مصرفی در واکنش زنجیر های پلی مراز

	Perimer Name	Oligonucleotide sequence ((50–30))	Amplicon size (bp)	Target gene	Reference
1	(23s r1200)F	TTT-GG –TCC-TTG-TCC –GGA –TGT – AGC	499	F1	Cremonesi(2005)
	R (23s r1200)	AGA-AT –CTT –CAC –GCT–CTC –TC		F2	Cremonesi(2005)
2	SEA1	GGT-TAT-CAA-TGT-GCG-GGT-GG	102	A1	E.da Silva(2004)
	SEA2	CGG-CAC-TTT-TTT-CTC-TTC-GG		A2	E.da Silva(2004)
3	SEB1	GTA-TGG-TGG-TGT-ACC-TGA-GC	164	B1	E.da Silva(2004)
	SEB2	CCA-AAT-AGT-GAC-GAG-TTA-GG		B2	E.da Silva(2004)
4	SEC1	AGA-TGA-AGT-TGA-TGT-GTA-TGG	451	C1	E.da Silva(2004)
	SEC2	CAC-ACT-TTT-AGA-ATC-AAC-CG		C2	E.da Silva(2004)

۲) برنامه استفاده در ترمال سایکر:

برنامه مورد استفاده با پرایمرهای ۱۶۹۸ Sr ۲۳ و ۲۳SF۱۲۰۰ در جدول۲ آمده است.

جدول۲: برنامه مورداستفاده دستگاه جهت PC

	دناتوراسیون	اتصال و الحاق	توسعه و تکثیر
سیکل اول	min –٥C°٩٤	……	……
سیکل‌های اصلی	min –٢ C°٩٤	min–١ C°٥٧	min –١C°٦٨
سیکل آخر	……	……	Min –٧C°٧٢

اندازه گیری میزان دقت آزمایش

ابتدا با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰نانومترازحجم ۱mlاز سوش استافیلوکوکوس اورئوس که برابر ۰/۰۲ حاصل گردید(10^7) با انجام رقت سازی به روش Serial Dilution رقت های 10^6تا 10^0را تهیه نموده پس از انجام استخراج DNA وانجام PCR وتزریق به روی ژل آگاروز نتایج زیر به دست آمد.

کشت باکتری

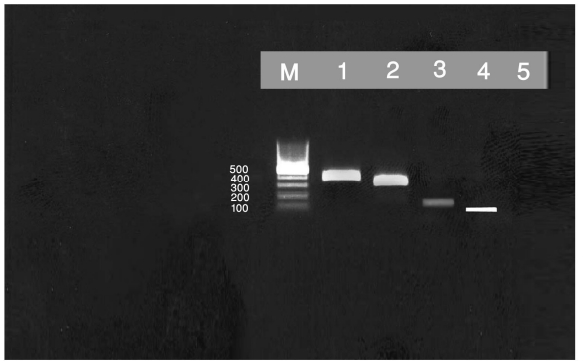
به صورت تجربی نمونه شیر(عاری از هر گونه پاتوژن) را آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس نموده و بعد از ترکیب یک کلونی از کشت باکتری مذکور با شیر پاستوریزه، نمونه را با g *۳۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس بعد از جدا شدن رسوب و خامه شیر مذکور ،مقداری از خامه را با آنس برداشته و الباقی شیر را تخلیه نموده و با همان آنس مقداری از رسوب انتهائی را هم بر می داریم و به میزان یک لوپ کامل روی محیط آگار خون داربرده بعد از ۲٤ الی ٤۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷درجه سانتیگراد به بازدید پلیت ها می پردازیم و در صورت مشاهده پرگنه ای استاف به رنگ سفید و زرد و همچنین لبه های کاملا گرد پرگنه ها به مثبت بودن نتایج کشت پی می بریم . (لازم به ذکر است که هر یک از رقت های تهیه شده در بخش دوم را به محیط های کشت به صورت جداگانه انتقال دادیم تا مقایسه دقت کشت با تشخیص ملکولی نیز انجام شده باشد.)

نتایج

تعداد تکرار سیکل‌های اصلی ۳۰ بار است، در این پروسه در طی روند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، قطعه هائی به اندازه bp ٤۹۹و۱۰۲و۱٦٤و٤۵۱ تکثیر داده می‌شود که در عمل الکتروفورز با مقدار µl ۷/۵ از محصول حاصله و ۲µl ازسایز مارکر (وزن مارکر)و افزودن به ژل آگارز۱٪ باند به وضوح مشخص می‌گردد.

الکتروفرز DNA در ژل آگاروز

بعد از تهیه ژل ۱٪ و انجام الکتروفرز، ابتدا ژل در تانک حاوی اتیدیوم بروماید ۱۰ mg/ml به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شده و بعد به مدت ۳ دقیقه به تانک آب مقطر و آب مقطر دوبار تقطیر انتقال یافته شد، سپس به دستگاه ترانس الومیناتور برده و نتایج به صورت نگاره ۱ بیان گردید.



نگاره ۱: نتایج ایجاد شده در ژل آگاروز

در این تصویر، در ردیف M سایزمارکر(DNA Ladder) Plus 100Ps شرکت سیناژن که به ترتیب حاوی باندهای۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-٤۰۰-۵۰۰.. بوده و در ردیف ۱، باند حاصل از محصول ٤۹۹bp واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(SEC) و در ردیف ۲ باند محصول٤۵۱مربوط به (SEF) وردیف ۳ باند ضعیف محصول ۱٦٤ مربوط به (SEB) و در ردیف ٤ نیز باند محصول ۱۰۲ bpمربوط به (SEA) و همچنین در ردیف ۵ نمونهٔ کنترل منفی استرپتوکوکوس فکالیس می باشد.همچنین دقت واکنش به میزان 10^1سلول در نمونه بوده که در تصویر شماره ۲ این امر قابل مشاهده می باشد می توان باند حاصل از رقت های 10^0تا 10^5را در تصویر مشاهده نمود ولی رقت 10^0قابل رویت نبوده واین امر بیانگر آن است که دقت تست به نحوی است که حتی با وجود تنها ۱۰ باکتری در هر نمونه می توان به آسانی جهت تشخیص باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود .

نگاره۲: تصویر واکنش زنجیره ای پلی مراز حاصل از رقت سازی ستون M سایز مارکر 100bp DNA ladder plus ستون شماره ۱ رقت 10^{-6}ــ ستون شماره ۲ رقت 10^{-5}ـ ستون ۳ رقت 10^{-4}ــ ستون شماره ٤ رقت 10^{-3}ــ ستون شماره ٥ رقت 10^{-2}ـ ستون شماره ٦ رقت 10^{-1}که به سختی قابل رویت می باشد.

در نهایت کشت میکروبی نمونه های شیر مورد آزمایش به روی محیط های آگارخون دار به صورت همزمان انجام شدو نتایج حاصل از کشت نشان داد که تا رقت 10^{2}سلول قابلیت تشخیص راداراست که در مقایسه با تشخیص ملکولی که تا 10^{1}سلول را تفکیک می نماید فاصله به سزائی دارا می باشد.

بحث

با توجه به نتایج حاصله که در نگاره ۱ مشاهده می شود باند مربوط به پرایمر SEb ضعیف بوده که مربوط به کم بودن توکسین B در سوش پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس دریافت شده از بخش بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران می باشد که در تحقیقات قبلی انجام شده نیز این باند نامشخص بوده که البته با تزریق دو برابر به ژل و همچنین استفاده از قدرتUV٤٠٠می توان این باند را بهتر روئیت نمود (انجام شده ولی نتایج در اینجا ذکر نشده) در مجموع وجود استافیلوکوکوس با پرایمر S ۲۳rRNAو تائید واریته اورئوس با سه پرایمر اختصاصی مربوطه انجام گرفت همچنین روش مطلوب استخراج DNA حاصله در این آزمایش، برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گرفت که در صورت عدم دسترسی به آنزیم های اختصاصی جهت هر گونه می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سیلوا (Silva) و همکاران در سال ۲۰۰٤ برای تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس از سه جفت پرایمر C, B, A استفاده کردند که برخی از مشخصات آن به شرح ذیل می‌باشد:

الف ـ محصول PCR با جفت پرایمر SEA برابر ۱۰۲ bp و SEB برابر ١٦٤bp، و SEC برابر ٤٥١bp بود.

ب ـ باند مورد نظر در نمونه‌های غیر از استافیلوکوکوس مشاهده نشده (کنترل منفی) که بیانگر ویژگی مطلوب تست بود.

ج ـ از لحاظ حساسیت، برابر تعداد ٤ باکتری می‌باشد که از این لحاظ بسیار مناسب نشان داد.

د ـ پروفایل حرارتی دارای ۲۵ سیکل بوده که ایده آل و از لحاظ مدت زمانی تست، بسیار مناسب بود.

هـ ـ همچنین تعداد نمونه تهیه شده ۱۰۰ نمونه (۳٦ نمونه ورم پستان بز و ٦٤ نمونه ورم پستان گاوی) بوده که براساس نتایج حاصله میزان سمیت شیرهای حاصله از ورم پستان بز بسیار بالاتر از ورم پستان گاوی بود .

ـ در مقایسه با تحقیق انجام شده، میزان حساسیت تست E.da. Silva بسیار ایده آل تر بوده که با توجه به استفاده از پرایمرهای SEA , SEB, SEC این مقاله در تحقیق مذکور و استفاده از پرایمر ژن ۲۳S rRNA از مقاله (P. cremonesi, 2005) وتنظیم پروفایل حرارتی به صورت تجربی برابر تعداد ۳۰ سیکل که فصل مشترک دو مقاله می‌باشد، میزان حساسیت مناسبی در مقایسه با این تحقیق حاصل گردید.

کرمونسی(cremonesi) و همکاران او در سال ۲۰۰۵ جهت تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس در فرآورده‌های شیری از ۱۱ جفت پرایمر به روش Multiplex PCR استفاده کردند.

الف: استفاده از ۱۰ جفت پرایمر تخصصی و یک جفت پرایمر مشترک که در کلیه گونه‌های استافیلوکوکوس ارئوس ژن (۲۳S rRNA) محافظت شده می‌باشد از مزایای این تحقیق بوده که در نهایت نتایج به دست آمده از روش Multiplex PCR را با روش Immunoassay مورد مقایسه قرار داده است و نشان داده که از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روش ایمونواسی برخوردار بود.

ب : تعداد سیکل های پروفایل حرارتی برابر ۳۰ سیکل بوده و تعداد ۹۲ نمونه شیر مورد بررسی قرار گرفت که ٦٦ نمونه مثبت بودند .

ج : حساسیت تست به روش serial duilution مورد ارزیابی قرار گرفت که توانایی تشخیص دو باکتری را نداشته و تنها تا میزان Pg ۰/۵راتشخیص داده که بسیار مطلوب می‌باشد .

و: ویژگی این تست هم ۱۰۰ درصد بود .

د : ما نیز در این مطالعه همچون P. cremonesi و همکاران از پرایمر ژن (۲۳S rRNA) جهت تشخیص ملکولی استفاده نمودیم چرا که در تمام گونه‌های استافیلوکوک‌ها محافظت شده می‌باشد، لیکن طول مدت زمانی که نمونه‌ها جهت جمع‌آوری و نگهداری صرف گردید سبب کاهش میزان حساسیت تست در مقایسه با تحقیق انجام یافته می‌باشد .

نتایج حاصل از تحقیقات . از چند جنبه مشکلات مربوط به شناسائی استافیلوکوکوس را از طریق کشت میکروبی نشان میدهد که مهمترین آن عبارتند از :تعداد موارد شناسائی شده توسط کشت میکروبی محدودیت بیشتری در شناسائی آلودگی شیر و سایر لبنیات دارد و همچنین طولانی شدن زمان انکوباسیون جهت دیدن پرگنه های این باکتری. غالبا باعث افزایش احتمال آلودگی های ثانویه آزمایشگاهی و حتی خشک شدن و نا کارامد شدن محیط کشت قبل از حصول نتیجه لازم می شود که احتمالا در ثبت نتایج واقعی تاثیر خواهد گذاشت(۵،٤) واز طرف دیگر مهمترین مزیت این روش بر روشهای کشت میکروبی در آن است که در کشت آزمایشگاهی سویه های مختلف استاف ممکن است باعث بوجود آمدن حالات مختلف شودکه احتمالا مربوط به عوامل رشد متفاوت هر کدام از آنها باشدکه به امر جداسازی میکروبی آنها با یک روش واحد خدشه وارد می نماید.و همچنین برای ایجاد جواب مثبت از طریق PCR وجود حدود ۱۰cfu /50ml از باکتری در نمونه غالبا کافی به نظر می رسد در حالیکه در روشهای کلینیکی همچون الایزا وکشت میکروبی حساسیتی حدود ۸۵ در صد را دارا هستند که این حساسیت هم خود در اولین دوره شیردهی در هر دو روش به ترتیب ۲۵ در صد و ۳۵ در صد کاهش می یابد.(٦)همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در سال ۲۰۰۱ روش PCR کارائی بالائی برای تشخیص ورم پستان استافی در مقایسه با کشت میکروبی داراست چرا که در بیشتر موارد میکروارگانیسم داخل سلولی مذکور به تعداد کافی در دسترس نمی باشد تا توسط کشت متداول باکتریائی جداسازی شود در حالیکه PCR چنین محدودیتی ندارد و قابلیت تشخیص تعداد کم پاتوژن در نمونه را داراست(۸) .در تحقیق حاضر علی‌رغم اینکه کارایی بالای روش PCR نسبت به کشت میکروبی و روش‌های دیگر جهت شناسایی و تشخیص مشخص شده، منتها در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز مشکلاتی وجود دارد که در سایر تحقیقات هم به نوعی شاهد آن بوده‌ایم. زمانی که میزان عامل در نمونه کمتر از ۱۰ CFU/ml باشد، اثبات حضور آن توسط این روش تشخیص مولکولی، می‌تواند بسیار متفاوت باشد که این مسئله غالبا به از دست رفتن بسیاری ازاین ارگانیسم‌ها در نمونه در زمان سانتریفوژ مربوط می‌شود. از طرف دیگر بایستی به این نکته توجه داشت که از نظر تئوری واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز توانایی تشخیص حتی یک ژنوم انفرادی را نیز در یک نمونه دارا است. لذا حساسیت بسیار بالایی برای این روش در مقایسه با دیگر روش‌های آزمایشگاهی

قائل هستند. مخصوصا استفاده از ایـن روش در مـواردی کـه انجام روش‌های میکروب‌شناسی محدودیت‌های جـدی دارد، برای بهبود تشخیص و شناسایی عامل بیماری کـاربرد مهمـی دارد.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر تقـی زهرائـی صـالحی و همچنـین خـانم دکترشـبنم شـاملودر آزمایـشگاه دامپزشـکی و آقـای دکترنریمـان شـیخی در آزمایـشگاه دامپزشکی پاستور و پرسنل بخش بیوتکنولـوژی و میکـروب شناسی ا نستیتو پاستور ایران به خصوص سرکار خـانم دکتـر ملیحه طالبی و سرکار خانم سمیه عنایتی که در تمامی مراحل تجقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

فهرست منابع

1-Bergdoll, M.S., (1990). Staphylococcal food poisoning. In: diver,D.O. (Ed.), Foodborne Diseases. Academic Press, San Diego, Pp: 85-106.

2- Da Silva, E.R., do carom, L.S., da Silva, N., (2004). Detection of the enterotoxins A,B and C genes in staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in brazilian dairy herds. Vet. Microbiol. 106, 103_107.

3-Cardoso, H.F.T., Silva, N., Sena, M.J., Carmo. L.S., (1999). Production of enterotoxins and toxic shock toxin by Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazil. Lett. Appl.
Microbiol. 29, 347-349.

4-Chen, T.-R., Hsiao, M.-H., Chiou, C.-S., Tsen, H.-Y., (2001). Devel-opment and use of PCR primers for the investigation of C 1, C2and C3 enterotoxin types of Staphylococcus aureus strainsisolated from food-bome outbreaks. Int. J. Food Microbiol.71, 63-70.

5-Da Silva, E.R., Boechat, J.U.D., Dias Martins, J.C., Barbosa Ferreira,W.P, Pimenta Siqueira, A., da Silva, N., (2004). Hemolysinproduction by Staphylococcus species isolated from mastitic
goat milk. Small Rumin. Res. 55, 45-49.

6-Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M., (2000). Multiplex PCR fordetection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins,exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillinresistance. J. Clin. Microbiol. 38, 1032-1035.

7-Robbins, R., Gould, S., Bergdoll, M., (1974). Detecting the enter-otoxigenicity of Staphylococcusaureus strains. Appl. Microbiol.28. 947-950.

8-Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, Ch., (2001).Characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureusstrains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland.Vet. Microbiol. 78, 373-382.