ردیابی ژن مولد توکسین سندرم شوک سمی در ایزوله‌های *استافیلوکوس اورئوس* جدا شده از شیر و پنیر در شهر تبریز

نسرین پورشفیع[1]، جلال شایق[2*]، هایده مبین

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروب شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲. گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۳. دانشکده پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *jalalshayegh@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های مهم مولد مسمومیت‌های مواد غذای است. این باکتری معمولاً مسمومیت را به‌واسطه تولید توکسین‌های متعدد اعمال می‌کند. هدف از این مطالعه تعیین میزان حضور ژن سندرم شوک توکسیک در ژنوم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از پنیر محلی و شیر گاو و گاومیش می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۵۱ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیر گاو (۲۳)، گاومیش (۵) و پنیر سنتی (۲۳) استفاده شد. محصولات مذکور از سطح دامداری‌های و مراکز سنتی شهرستان تبریز جمع‌آوری گردید. تعیین میزان ژن مولد توکسین سندرم شوک توکسیک (*tst*) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد. از میان ۵۱ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع‌آوری شده در این تحقیق، دو نمونه (۳/۹ درصد) جداشده از پنیر دارای ژن *tst* بودند. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات دیگر مشابه نشان‌دهنده فراوانی پایین این توکسین در مواد لبنی منطقه موردمطالعه است. به نظر می‌رسد انتقال این سویه‌های حامل توکسین از طریق افراد دخیل در فرآوری غذا امکان‌پذیر باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن مولد توکسین سندرم شوک سمی، شیر، پنیر، تبریز.

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کوکسی گرم مثبت غیر متحرک، فاقد تاژک، بی‌هوازی اختیاری است که فلور طبیعی پوست یا بینی محسوب می‌شود. هم‌چنین این باکتری به‌عنوان یک پاتوژن خطرناک مسئول طیف گسترده‌ای از بیماری‌هاست (Di Giannatale et al., 2001). مسمومیت حاصل از *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است و در اغلب کشورها از نظر وقوع، در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد و با وجود افزایش چشمگیر مقاومت استافیلوکوکوس‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باید موارد امنیتی در خصوص این باکتری را رعایت کرد (Becker et al., 2001).

مطالعات انجام‌شده در کشورهای مختلف میزان آلودگی شیر گاو و گاومیش به *استافیلوکوکوس اورئوس* را از ۲۸ تا ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند (Singh and Prakash, Adesiym. et al., 1998; 2010; Daka et al., 2012,).

اگرچه جداسازی و شناسایی آزمایشگاهی این باکتری کار چندان دشواری نیست، اما به دلیل هتروژنسیته بالای درون‌گونه‌ای باکتری هنوز اپیدمی مولکولی بیماری نیاز به تجزیه و تحلیل بیشتری دارد (Dastmalchi Saei and Ahmadi, 2010). تاکنون مطالعات فراوانی برای مطالعات تنوع داخل گونه‌ای در این باکتری به‌ویژه در سطح مولکولی پیشنهادشده است. از معروف‌ترین این روش‌ها هضم کوروموزمی DNA، Multilocus sequence typing، pulsed-field gel electrophoresis و تعیین تیپ براساس آنالیز ژن‌های *Spa*، کوآگولاز و *aroA* بیشتر مشهورند (Shayegh et al., 2013).

استافیلوکوکوس اورئوس طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های خارج سلولی را ترشح می‌کند که موجب بیماری‌زایی باکتری می‌شود (Di Giannatale et al., 2001). همولیزین‌ها، انتروتوکسین‌ها و آنزیم‌های مختلف تولیدی توسط این باکتری می‌توانند در ایجاد مسمومیت‌ها با منشأ مواد غذایی بسیار مهم و پراهمیت باشند. ازجمله توکسین‌های تولیدی توسط این باکتری توکسین سندرم شوک توکسیک (Tsst-1) است (Dinges et al., 2000). مطالعات، توکسین سندرم شوک سمی در *استافیلوکوس اورئوس* را از عوامل مهم سندرم مرگ ناگهانی نوزادان و نیز از عوامل آسیب‌رسان قلبی می‌دانند (Dinges et al., 2000). توکسین سندرم شوک سمی سوپرآنتی ژن و مقاوم به حرارت بوده و به سهولت در شرایط مختلف از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فرآورده‌ای لبنی، گوشتی و سبزی‌ها قابل جداسازی است (Becker et al., 2001 و El-Ghodban, et al., 2006، Dinges et al., 2000). از راه‌های مهم انتقال این توکسین‌ها می‌توان به انتقال از طریق مواد غذایی اشاره کرد. انواع مختلف مواد غذایی ازجمله غذاهای پروتئینی مثل فرآورده‌های گوشتی، شیر و فرآورده‌های شیر، شیرینی‌های خامه‌دار رشد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مولد این توکسین را حمایت می‌کنند (El-Ghodban, et al., 2006، Becker et al., 2001).

هدف از این مطالعه تعیین میزان حضور ژن سندرم شوک توکسیک در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداشده از پنیر و شیر محلی به‌منظور اتخاذ تدابیر بهداشتی می‌باشد.

مواد و روش‌کار

نمونه گیری، جداسازی و تایید بیوشیمیایی ایزوله‌ها

تعداد ۵۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیر گاو (۲۳)، گاومیش (۵) و پنیر سنتی (۲۳) از سطح دامداری‌های سنتی شهرستان تبریز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. رشد و مصرف مانیتول در محیط کشت مانیتول سالت آگار، مثبت بودن تست کوآگولاز، وجود همولیز در محیط کشت ژلوز خون‌دار گوسفندی، واکنش مثبت DNase و مصرف قندمالتوز از اعم واکنش‌های مورداستفاده برای تأیید بیوشیمیایی باکتری مذکور بود. آزمایش‌های تکمیلی بیشتر براساس جداول استاندار پیشنهادی مورد ارزیابی قرار گرفت (Barrow and Feltham, 1993).

استخراج DNA

استخراج DNA از ۵۱ نمونه کشت داده‌شده در محیط آبگوشت قلب-مغز انجام شد. یک میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی در دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از ریختن بافر لیز کننده شامل تریس ۱ مولار(pH= ۷/۵)، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر روی رسوب مخلوط در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده‌شده و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیز شده به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل

با نسبت‌های ۱:۲۴ اضافه و به‌آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشتن لایهٔ رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و هم حجم آن‌ها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک‌شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. نمونه با استفاده از اسپکتوفتومتری DNA در نور UV با طول‌موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی و غلظت ۵۰ نانوگرم در ۱ میکرولیتراز آن تهیه گردید (Shayegh, et al., 2013).

تایید مولکولی جدایه‌ها با استفاده از روش PCR

جهت حصول اطمینان بیشتر با استفاده از روش واکنش PCR بر پایه ژن نوکلئاز (nuc) نیز تعلق آن‌ها به گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* اثبات شد (Brakstad et al., 1992). بدین منظور واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ایزوله‌ها انجام گرفت که توالی پرایمر اختصاصی در جدول ۱ آورده شده است. هر واکنش شامل ۰/۵ میکرولیتر پرایمر، ۱میکرولیتر DNA و ۱۲ میکرولیتر مستر میکس بود. واکنش زنجیرهٔ پلیمراز با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Shayegh et al., 2013).

ردیابی ژن مولد سندرم شوک توکسیک

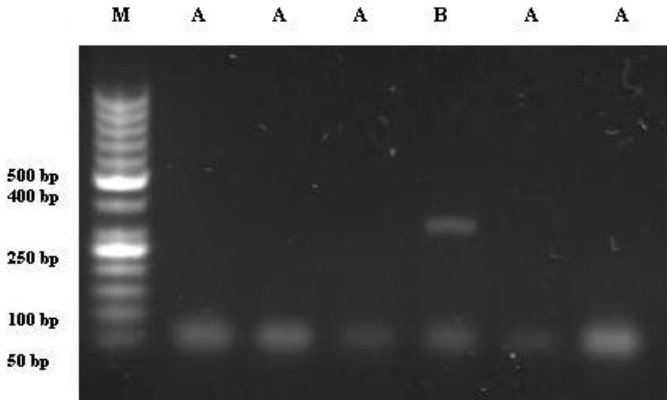
در این مطالعه تعیین حضور ژن توکسین سندرم شوک توکسیک مطابق روش Mehrotra و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از پرایمرهای GTSSTR-1 وGTSSTR-2 انجام شد که توالی پرایمرهای اختصاصی در جدول ۱ نشان داده شده است. کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی۰/۴ میکرومولار و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) مخلوط واکنش را تشکیل می‌دادند. حجم واکنش با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده می‌شد. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مورد عکس‌برداری شدند.

جدول ۱-پرایمرهای مورداستفاده در واکنش PCR

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند	منبع
nuc	NucF	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTI-3'	۲۷۵	Brakstad et al., 1992
	NucR	5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'		
tst	GTSSTR-1	F; ACCCCTGTTCCCTTATCATC	۳۲۶	Mehrotra et al., 2000
	GTSSTR-2	R; TTTTCAGTAATTTGAAACGCC		

نتایج

بر پایه آزمایشات بیوشیمیایی متعلق بودن تمام جدایه‌ها به گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* اثبات و با استفاده از روش PCR بر پایه ژن *nuc* مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. برای تعیین حضور ژن سندرم شوک توکسیک واکنش PCR انجام شد. در این روش حضور باند ۳۲۶bp نشانگر حضور توکسین *tst* در نمونه‌های مورد آزمایش‌اند. از میان ۵۱ جدایه مورد مطالعه در پژوهش حاضر ۲ نمونه معادل ۳/۹٪ از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده با داشتن باند ۳۲۶bp دارای ژن *tst* بودند. نمونه‌های مثبت مربوط به پنیر بوده و هیچ نمونه مثبتی از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیر گاو و گاومیش ازنظر حضور ژن مذکور مثبت نبودند.



شکل ۱- الکتروفورز در ژل ۱/۵ درصد. ستون M: مارکر (فرمنتاز)، ستون‌های A: نمونه‌های منفی و ستون B: نمونه مثبت

بحث

تاکنون روش‌های مولکولی بسیاری برای ارزیابی میزان شیوع سندرم شوک توکسیک ابداع گردیده است، از میان این روش‌ها می‌توان به روش Becker و همکاران و Mehrotra و همکاران اشاره کرد که با ابداع روش مولتی پلکس PCR امکان ارزیابی مولکولی هم زمان این توکسین وآنتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس اورئوس* را فراهم آوردند (Malhotra et al., 2000, Becker et al., 2001). مطالعات انجام شده دقت روش‌های مبتنی بر PCR در مقایسه با روش‌های سنتی را مورد تأکید قرار می‌دهند (Di Giannatale et al., 2001).

در مطالعه حاضر میزان فراوانی حضور ژن مولد TSST-1 (*tst*) در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصل از مواد غذایی ۳/۹٪ بر آورد گردید. تنها مطالعه موجود در ایران، میزان شیوع جدایه‌های مشابه را از مواد غذایی مختلف شامل مواد لبنی، گوشتی و غیره را ۱۲٪ گزارش نموده است (Eshraghi et al., 2009). ولی مقاله مذکور میزان فراوانی این ژن را به‌صورت جداگانه بر روی مواد غذایی مختلف مورد مطالعه خویش گزارش ننموده است تا بتوان نتایج حاصل در مواد لبنی را با نتایج مطالعه حاضر مقایسه نمود (Eshraghi et al., 2009). در سایر نقاط جهان نیز فراوانی استافیلوکوکوس آرئوس حاوی ژن مولد TSST-1 را بین ۰ تا ۳۷٪ گزارش نموده‌اند (Adesiyun et al., 1992, Oh et al., 2007 , El-Ghodban, et al., 2006). مطالعات مختلف در جهان و نیز ایران وجود دارد که حضور هم زمان این

توکسین را یا برخی از آنتروتوکسین‌های استافیلوکوکی تأیید می‌نماید (Eshraghi et al., 2009).

به نظر می‌رسد که عمده طریق انتقال باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انتقال از مخاطات افراد مختلف در طول فرآوری مواد غذایی باشد. وجود روش‌های سنتی فراوری و حتی عرضه از موارد مهم انتقال *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی است (Oliver et al., 2005). اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که احتمالاً این توکسین از عوامل دخیل در ایجاد آسیب به بافت پستانی در ورم پستان‌های بالینی و تحت بالینی گاو، بز گوسفند تشخیص داده شده‌اند اگرچه مکانیسم اثر این توکسین در ایجاد بیماری ورم پستان درستی معلوم نیست، اما گفته‌شده است احتمالاً با نقش سوپرآنتی ژنی خود در تحریک سیستم ایمنی بافت پستان نقش دارد (Zschöck et al., 2000). حضور این توکسین در جدایه‌های حیوانی به‌ویژه ورم پستان‌های فاقد علامت می‌تواند یکی دیگر از راه‌های انتقال این توکسین به شیر و مواد غذایی در نظر گرفته شود. در ایران مطالعات نشان از حضور ۱۵/۵ درصدی توکسین سندم شوک توکسیک در جدایه‌های ورم پستانی منطقه آذربایجان دارد (Farahmand-Azar et al., 2013). البته این میزان برای سایر جدایه‌ها از سایر نواحی ایران کمتر از این میزان گزارش‌شده است (Momtaz et al., 2010).

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات دیگر مشابه نشان‌دهنده حضور پایین این توکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده مواد لبنی منطقه مورد مطالعه است. به نظر می‌رسد انتقال این سویه‌های حامل توکسین از طریق افراد دخیل در فرآوری غذا امکان‌پذیر باشد.

منابع

1- Adesiyun, A.A., Lenz, W., Schaal, K.P. 1992. Production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) by Staphylococcus aureus strains isolated from humans, animals and foods in Nigeria. Microbiologica. 15: 125-33.

2- Adesiym, A.A., Webb, L.A., Romain, H.T. 1998, Prevalence and characteristics of staphylococcus aureus strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. J Food Prot. 61: 629-632.

3- Becker, K., Haverkamper, G.,von Eiff ,C., Roth ,R., Peters, G. 2001. Survey of Staphylococcal Enterotoxin Genes,Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock SyndromeToxin 1 Gene in Non-Staphylococcus aureus Species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 20:407–409.

4- Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J. 1992. A detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 30: 1654-1660.

5- -Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 1993.Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.Cambridge University Press, Cambridge.

6- Daka, D., Silassie, S., Yihdego, D., 2012, Antibiotic-resistance Staphylococcus aureus isolated from cow's milk in the Hawassa area,South Ethiopia, J Annals Clin Microbiol Antimicrob. 11: 1-6.

7- Dastmalchi Saei, H., Ahmadi, M. 2010. Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP

analysis of the aroA gene. Comp Clin Pathol. 19: 163-168.

8- Di Giannatale, E., Prencipe, V., Tonelli, A., Marfoglia, C., Migliorati, G. 2011.Characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from food for human consumption. Vet Ital. 47: 165-73.

9- Dinges, M.M., O Rwin, P.M., S Chlievert, P.M. 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev.13:16-34.

10- El-Ghodban, A., Ghenghesh, K.S., Márialigeti, K., Esahli, H., Tawil, A. 2006 .PCR detection of toxic shock syndrome toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya. J Med Microbial. 55: 179-82.

11- Eshraghi, S., Salehipour, Z., Pourmand, M.R., Rahimiforushani, A., Zahraei Salehi, M.T., Agaamiri, S. 2009.Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in staphylococcus aureus strains isolated from different foods. Tehran Univ Med J. 67: 470-476

12- Farahmand-Azar, S., Ahmadi, M., Saei, H. D., Anassori, E. 2013. Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) gene in Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis milk. Arch. Razi Inst. 68: 17-22.

13- Malhotra, M.,Wang,G.,Wendy, M., Johnson. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and Methicillin Resistance. J Clin Microbiol. 38: 1032–1035.

14- Momtaz, H., Rahimi, E., Tajbakhsh, E. 2010. Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. Afr J Biotechnol. 9: 3753-3758

15- Oh, S.K., Lee, N., Cho, Y.S., Shin, D.B., Choi, S.Y., Koo, M. 2007. Occurrence of toxigenic Staphylococcus aureus in ready-to-eat food in Korea. J Food Prot. 70: 1153-8.

16- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Pathog Dis. 2: 115-29.

17- Singh, P., Prakash, A. 2010, Prevalence of coagulase positive pathogenic Staphylococcus aureus in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. J Acta argiculturae Slovenica. 96: 37- 41.

18- -Shayegh J., Barzegari A., Mikaili P. 2013. Molecular characteristics of Staphylococcus aureus isolates from buffalo's milk. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19: 665-668.

19- Zschöck, M., B Otzler, D., B Löcher, S., S Ommerhäuser, J., H Amann, H.P. 2000. Detection of Genes for enterotoxins (*Ent*) and toxin Shock Syndrome Toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by Polymerase-Chain Reaction. Int Dairy J. 10: 569-574.

Identification of toxic shock syndrome toxin-1 genes of *Staphylococcus aureus* isolated from local cheese and cows milk in Tabriz city

Nasrin pourshafie[1], Jalal Shayegh[2*], Hayedeh Mobayen

1. M.Sc in Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
3. Department of Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

***Corresponding author:** jalalshayegh@gmail.com

Received:04 February 2016 Accepted: 21 December 2015

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the important food poising producing bacteria. The bacterium causes this poising by produce of the different toxin. The aim of this study was determine the presence of toxic shock syndrome gene (tst) of *S. aureus* isolated from milk and traditional cheese of cattle and buffalo. The result of the study is useful in healthy proceedings and epidemiological aspects of food origin disease. For this purpose, 51 isolates included isolates of bovine milk (23), buffalo's milk (5) and traditional cheese (23) collected and were studies in tst gene by PCR. Among mentioned isolates 2(3.9%) isolates were positive for the *tst* genes belong to bacteria were isolated from cheese. Results of this study showed low prevalence of tsst-1 producing gene on Dairy products in mentioned area in comparison with similar study. It maybe this isolates harbored the mentioned gene in their genome transmit by worker on food industry.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, TSST-1, milk, cheese, Tabriz.