بررسی توزیع فراوانی ژن tst با ژن‌های entA , entC و entA/C در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی مختلف

سعید اشراقی[۱]، زهره صالحی‌پور[۱]
محمدرضا پورمند[۱]
عباس رحیمی فروشانی[۲]
محمد تقی زهرایی صالحی[۳]
سولماز آقا امیری[۱]، روناک بختیاری[۱]
ترانه پیمانه عابدی محتسب[۱]
نادیا مردانی[۱]، سونیا سید امیری[۱]
محمد مهدی سلطان دلال[۱*]

۱- گروه پاتوبیولوژی
۲- گروه آمار و اپیدمیولوژی
دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- بخش باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
* نویسنده مسئول: تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه پاتوبیولوژی تلفن: ۶۶۴۲۲۶۸
email: soltanirad34@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۳/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین علل مهم بیماری‌های منتقله از راه غذا در جهان می‌باشد. انتروتوکسین‌ها و توکسین سندروم شوک توکسیک این باکتری از دسته فاکتورهای ویرولانس بسیار مهم و جزء سوپر آنتی ژن‌های توکسین پیروژنیک (PTSAgs) می‌باشند که تاثیرات عمیقی بر میزبان خود دارند. گردش خطرناک سویه‌های مولد $TSST_1$ در زنجیره مواد غذایی و نتیجتاً در جامعه، موضوع قابل اهمیتی است. هدف مطالعه نیز دستیابی به الگوهای ترکیبی ژن tst با ژن‌های انتروتوکسین (ent) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی مختلف می‌باشد. ***روش بررسی:*** بیش از ۱۰۴۰ نمونه ماده غذایی مختلف جمع‌آوری و از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس، طبق استاندارد ملی ایران به‌شماره ۱۱۹۴ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA ژنومی سویه‌های ایزوله شده، واکنش PCR برای ژن‌های نامبرده به‌کمک پرایمرهای اختصاصی و سوش استاندارد انجام شد. ***یافته‌ها:*** در مجموع، تعداد ۱۰۰ سویه (۹/۵٪) استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های غذایی جدا گردید. از ۲۵٪ ایزوله‌های حامل ژن entC، هفت سویه (۲۸٪) به‌طور همزمان دارای ژن tst نیز بودند و از ۸٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن entA، یک سویه (۱۲/۵٪) به‌طور همزمان ژن tst را نیز تولید می‌کرد. همچنین از مجموع ۹٪ سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن‌های entA+C به‌صورت ترکیبی، چهار سویه (۴۴/۴٪) ژن tst را نیز همراه داشتند. ***نتیجه‌گیری:*** شیوع سویه‌های دارای ژنوتیپ‌های ترکیبی tst-entC و tst-entA-C در کشور ما بالا می‌باشد و گردش این سویه‌ها در جامعه، سلامت و بهداشت عمومی را به مخاطره می‌اندازد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، توکسین سندروم شوک توکسیک، انتروتوکسین A، انتروتوکسین C.

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه غذا (food borne diseases) معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه با صرف هزینه‌های چند بیلیون دلاری، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus* به‌عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم این بیماری‌ها محسوب می‌شود.[۱-۳] مسمومیت غذایی این باکتری که به‌علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها و هضم آن ایجاد می‌شود، برخلاف مسیر آرام خود خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای ایجاد می‌کند. این باکتری به‌علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فرآورده‌های‌لبنی، فرآورده‌های‌گوشتی، سبزیجات، سالاد، غذاهای پخته و نمکی و به‌خصوص غذاهایی که نیازمند دستکاری‌های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است.[۴] استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویرولانس متعددی دارد که پاتوژنسیته و کلونیزاسیون باکتری را به آنها نسبت می‌دهند.[۵] انتروتوکسین‌های باکتری و توکسین سندروم شوک توکسیک ($TSST_1$) از فاکتورهای ویرولانس مهم این باکتری و از دسته سوپر آنتی‌ژن‌های توکسین پیروژنیک (PTSAgs) می‌باشند که تاثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. سوپر آنتی‌ژن‌ها توانایی منحصر به فردی برای واکنش با مولکول MHC کلاس دو، پرولیفراسیون وسیع لنفوسیت‌های T و در نهایت آسیب ناشی از انتشار مقادیر بالایی از سایتوکاین‌ها دارند.[۵و۶] از طرفی توکسین‌های این خانواده همگی به‌طور افقی و از طریق عناصر متحرک ژنتیکی مانند فاژها و جزایر پاتوژنیسته منتقل می‌شوند و این

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]

به‌خصوص در مورد افراد در معرض خطر مانند جمعیت سالخورده، کودکان، زنان باردار و افراد دارای نقص ایمنی بسیار خطرناک است.[۷و۸] سندروم شوک توکسیک استافیلوکوکوس اورئوس یک بیماری تهدید کننده حیات فرد با نقص چندگانه اعضا می‌باشد، که امروزه شیوع در حال افزایش موارد غیر تامپونی آن در افراد با عفونت‌های ساده استافیلوکوکی مانند زخم، آبسه و یا جراحی نگران کننده است.[۹] ژن tst که‌عامل بیماری است، می‌تواند در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در جامعه و مواد غذایی به‌راحتی منتقل شود که این خطر بزرگی در صنعت غذایی و سلامت جامعه می‌باشد.[۱۰] در این زمینه بخش عمده‌ای از کارکنان مسئول در آماده‌سازی غذاها حامل باکتری در پوست خود هستند که می‌توانند آن‌را به‌راحتی به غذاها منتقل نموده و سبب گردش سویه‌های خطرساز مولد $TSST_1$ شوند.[۱۱] بنابراین، این مطالعه در نظر دارد با بررسی الگوهای ژن tst در همراهی با ژن‌های ent نامبرده، میزان شیوع الگوهای ترکیبی این ژن‌ها و درصد ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مولد $TSST_1$ را که همزمان در کلاستر Enterotoxin Gene Cluster (EGC) خود حامل ژن‌های انتروتوکسین نیز می‌باشند، تعیین نماید.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی بر روی ۱۰۴۰ نوع ماده غذایی در طی مدت یک‌سال (۸۶-۱۳۸۵) به‌صورت تصادفی از نقاط مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد. هر یک از نمونه‌ها در ظروف استریل در پیچ‌دار ریخته شد و در حداقل زمان با حفظ شرایط سرمایی به آزمایشگاه کنترل مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید.

شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس: پس از هموژن‌سازی نمونه‌ها در شرایط استریل و به‌کمک سرم فیزیولوژی در دمای اتاق، وارد مرحله غنی‌سازی شده و به‌کمک محیط براث غنی‌کننده (مرک) برای استافیلوکوکوس اورئوس و انکوبه ۲۴ ساعته در 37^{oC} انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط بردپارکر آگار با زرده تخم‌مرغ (مرک) کشت‌شدند و برای کلیه سویه‌ها مطابق استاندارد ملی ایران به‌شماره ۱۱۹۴تست‌های ذیل و رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد.[۱۲]

سایر تست‌های تائیدی و بیوشیمیایی:

تست کواگولاز: این تست به‌کمک پلاسمای سیتراته خرگوش و به هر دو روش اسلاید و لوله انجام شد.

تست DNase: این تست برای کلیه سویه‌ها و به‌کمک محیط DNase آگار (مرک، آلمان) و HCL ۱۰٪ انجام شد.

تخمیر مانیتول: این تست نیز برای همه سویه‌ها و با استفاده از محیط مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) به‌خصوص در شرایط بی‌هوازی انجام شد. در مورد تست تخمیر مانیتول در شرایط بی‌هوازی نیز بایستی یاد آور شد که استافیلوکوکوس اورئوس تنها تخمیرکننده بی‌هوازی مانیتول می‌باشد.

تست VP: همه سویه‌ها از لحاظ وجود واکنش مثبت برای VP جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس از سایر استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت مورد بررسی قرار گرفتند.[۱۳] در واقع استافیلوکوکوس اورئوس تنها VP مثبتی است که کواگولاز مثبت دارد. لازم به ذکر است در کلیه مراحل از استافیلوکوکوس اورئوس سوش COL به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جدول ۱ مواد غذایی آنالیز شده در هر زیر گروه را به همراه درصد آلودگی آنها نشان می‌دهد.

استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها: استخراج DNA تمامی سویه‌ها به‌کمک لیزواستافین و کیت مناسب (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN)) انجام شد. به‌منظور تائید DNA استخراج شده از نمونه‌ها، DNA ژنومی هر سویه بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. در نهایت DNAهای ژنومی استخراج و در -20^{oC} تا زمان استفاده ذخیره شدند.

واکنش PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌کمک پرایمرهای اختصاصی، سوش استاندارد RN8465 به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن tst و تغییرات متوالی رقت‌های پرایمرها، DNA و نیز برنامه دمایی ترموسایکلر انجام شد. پس از بلاست کردن تعداد زیادی پرایمر در سایت برای تعیین اختصاصیت پرایمرها، یک جفت پرایمر مناسب تایید شد.[۵] کنترل مثبت نیز ابتدا از نظر تست DNase، مانیتول، کواگولاز و PCR ژن Spa (Protein A) مورد تائید قرار گرفت. سایر ژن‌های نامبرده مانند entA و entC در مطالعه قبلی و به‌کمک پرایمرهای مناسب و سوش استاندارد ATCC25923 برای ژن entA و ATCC5638 برای ژن entC، PCR شدند.[۱۴] کلیه محصولات PCR برای ژن‌های مورد مطالعه دارای سایز مورد انتظار و بدون هیچگونه باند غیر اختصاصی بودند. در کلیه واکنش‌ها همچنین از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC12228 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۲ آمده است.

روش ایمونو اسی در شناسایی سویه‌های مولد $TSST_1$: در ایـن مطالعه

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]

جدول-۱: مواد غذایی آنالیز شده در هر زیرگروه و درصد آلودگی آنها با استافیلوکوکوس اورئوس

گروه‌های آنالیز شده	مواد غذایی	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت از نظر استافیلوکوکوس اورئوس	درصد آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس
مواد لبنی	بستنی سنتی، شکلاتی، قیفی، نان خامه‌ای، رولت، کیک خامه‌ای، انواع شیرینی تر و غیره	۴۵۵	۷۷	۱۷/۱
مواد گوشتی	گوشت تکه‌ای و چرخ کرده تازه، همبرگر، هات داگ، کباب خام و پخته، جوجه خام و پخته، خوراک جگر و غیره	۴۵۸	۱۶	۳/۵
سایرین	ماکارونی پخته، انواع سالاد، برنج پخته، انواع آبمیوه	۱۳۴	۷	۴/۵
کل موارد		۱۰۴۷	۱۰۰	۹/۵

سویه‌های مثبت از نظر ژن tst با روش PCR، با تکنیک Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند. در این روش از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع استفاده شد و مطابق دستورالعمل کیت سازنده (اکسوئید) مراحل کار دنبال شد. این کیت حاوی بافر PBS، سوش کنترل مثبت و لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی ضد $TSST_1$ از کلاس IgG می‌باشد. مراحل داخل پلیت‌های الایزا انجام می‌شود. پس از رقیق کردن باکتری به‌کمک بافر و افزودن لاتکس مطابق با دستور کیت در داخل پلیت‌های الایزا، سر آنها را برچسب زده و ۲۴ ساعت در دمای اتاق و جای تاریک قرار می‌دهیم سپس پلیت‌ها از نظر وجود حالت شبکه مانند (واکنش مثبت) و یا دکمه مانند (واکنش منفی) بررسی می‌شوند.

یافته‌ها

در این مطالعه بیش از ۱۰۴۰ نوع ماده غذایی از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۱۰۰ سویه (۹/۵٪) استافیلوکوکوس اورئوس جدا گردید. مطابق با جدول ۲ میزان آلودگی در زیرگروه مواد لبنی ۱۷/۱٪، در زیر گروه مواد گوشتی ۳/۵٪ و در سایر مواد غذایی ۴/۵٪ بوده است. در مطالعه ما ۱۲ سویه (۱۲٪) دارای ژن tst به‌کمک تکنیک PCR بودند. شکل ۱ نتیجه PCR ژن tst را در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد. همچنین به‌کمک تست RPLA در بررسی واقعی تولید توکسین ۱۲ سویه (۱۲٪) از ایزوله‌ها شناسایی شدند. به‌عبارتی در مطالعه ما روش مولکولی و ایمونواسی در ردیابی سویه‌های مولد $TSST_1$ همخوانی ۱۰۰٪ داشتند. شکل ۲ نتیجه تست RPLA را نشان می‌دهد. از طرفی توزیع این سویه‌ها در زیر گروه‌های مختلف مواد غذایی به صورت هشت سویه (۱۰/۴٪) در زیـر گروه مواد لبـنی، سه

جدول-۲: توالی‌پرایمرها در ژن‌های‌انتروتوکسین و توکسین‌سندرم شوک‌توکسیک

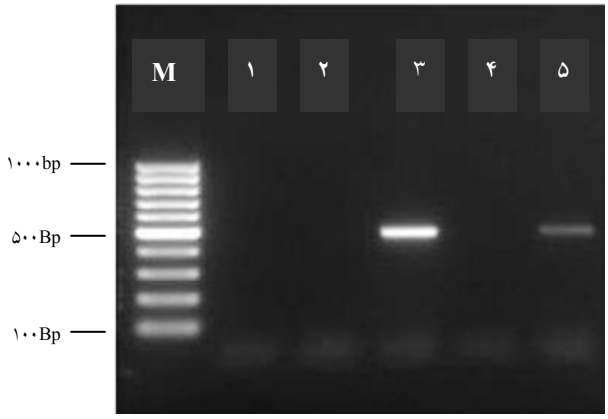
ژن	پرایمر	سکانس اولیگونوکلئوتیدی ('3- '5)	سایز (bp)
SEA	Sea1 Sea2	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	۱۰۲
SEC	Sec1 Sec2	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	۴۵۱
TST	TST-F TST-R	CATCTACACACGATAATATCAAGG CATTGTTATTGTCCAATATCGACCCG	۴۸۱

سویه (۱۸/۸٪) در زیر گروه مواد گوشتی و یک سویه (۱۴/۳٪) در زیر گروه سایر مواد غذایی بود. در این بررسی از ۲۵٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن entC، هفت سویه (۲۸٪) به‌طور همزمان داران ژن tst نیز بودند و از ۸٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن entA، یک سویه (۱۲/۵٪) به‌طور همزمان ژن tst را نیز تولید می‌کرد. بدین ترتیب در مجموع ۹٪ سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که به‌صورت ترکیبی ژن‌های entA و entC را دارا بودند، چهار سویه (۴۴/۴٪) ژن tst را نیز همراه داشتند.

ردیف اول: تشکیل شبکه در نمونه‌های مثبت و مولد توکسین، ردیف دوم: تشکیل ساختار دکمه در نمونه‌های منفی

شکل-۱: نتایج تست RPLA در ردیابی سویه‌های مولد $TSST_1$

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]



M: مارکر **bp** ۱۰۰، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۳: کنترل مثبت، ستون‌های ۲ و ۴: نمونه‌های منفی و ستون ۵: نمونه مثبت.

شکل-۲: نتایج ردیابی ژن tst به‌روش PCR

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یک باکتری کلونیزه شونده بر روی پوست و مخاط انسان و حیوانات به‌عنوان مخازن اولیه باکتری حضور دارد.[۴] بنابراین به‌راحتی در طی پروسه تهیه، آماده‌سازی، خُرد کردن، بسته‌بندی و ذخیره غذاهایی که نیازمند پروسه‌های دستکاری هستند وارد آنها می‌شود. معمولاً این غذاها به‌علت عدم نیازمندی این باکتری به شرایط خاص و مورد نیاز برای رشد،[۱۵] از تنوع بالایی برخوردار هستند و عمده آنها عبارتند از گوشت و فرآورده‌های گوشتی، شیر و فرآورده‌های لبنی، جوجه، ماهی، غذاهای نمکی و تخمیری، سبزیجات، آبمیوه‌ها و غیره به طوری‌که حتی محصولات غذایی پخته مسئول ۲۴٪ همه موارد این بیماری هستند.[۲] بدون شک تمایل بالای مردم برای خرید غذاهای دست فروش و یا آماده مصرف به لحاظ وجود طعم و رنگ جذاب آن، بهداشت ضعیف محیط و وسایل تهیه این مواد، شستشوی نامناسب دست‌ها و تماس طولانی آنها با غذا از ناحیه افراد مسئول از عوامل مهم آلودگی مواد غذایی به‌شمار می‌روند.[۱۶] در مطالعه ما مبنی بر استفاده از طیف وسیعی از غذاها، میزان آلودگی ۹/۵٪ گزارش می‌شود که بیشترین آلودگی در مواد لبنی (۱۷/۱٪) رویت شد. البته این آمار در نقاط مختلف دنیا از تفاوت‌های معنی‌داری برخوردار است. در کشور ما نیز در سال‌های گذشته مطالعاتی در زمینه آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده است که نقطه ضعف آنها، استفاده از تنوع پائینی از مواد غذایی برای برآورد این آلودگی بوده است.[۱۷و۱۸] بنابراین شاید به‌درستی نتوان نتایج این مطالعه را با آنها مقایسه نمود. چرا که نمونه‌های مورد استفاده در آن مطالعات تنها بخش کوچکی از زیر گروه مواد غذایی را در مطالعه ما تشکیل می‌دهند. در مطالعه انجام شده توسط Normanno در طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ در ایتالیا بر روی ۱۶۳۴ فرآورده گوشتی و لبنی مختلف از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۲/۸٪ مواد غذایی آلوده بودند و این میزان در میان مواد لبنی بالاتر گزارش شده است (۱۷٪).[۴] بدین ترتیب دو مطالعه با یکدیگر همخوانی دارند. همچنین در سال ۲۰۰۶، تعداد ۳۳۳۲ نمونه مواد غذایی آماده مصرف در کره از لحاظ آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شدند که میزان این آلودگی ۸/۶ درصد بود و باز هم این میزان در محصولات لبنی بالاتر گزارش شد (۳۱/۶٪).[۱۵] برعکس در تعدادی دیگر از مطالعات، فرآورده گوشتی از آلودگی بیشتری نسبت به سایر مواد غذایی برخوردار بوده‌اند. در مطالعه Moon بر روی سه گروه مواد غذایی مشابه با مطالعه ما، میزان آلودگی در فرآورده گوشتی ۳۶٪ و بیشترین بوده است.[۱۹] همچنین در مطالعه ما شیوع سویه‌های مولد $TSST_1$، ۱۲٪ بود. در این زمینه آماری در داخل کشور برای مقایسه منتشر نشده است. اما در سطح جهانی مطالعاتی وجود دارد. Adesiyun در مطالعه خود بر روی ۱۵۵ نمونه غذایی در نیجریه ۴۲ مورد (۳۷٪) سویه مولد $TSST_1$ شناسایی کرد.[۱۰] همچنین در یک مطالعه در سطح آسیا Kyung در کره ۱۳/۵٪ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مولد $TSST_1$ از غذاهای آماده مصرف جداسازی کرد.[۱۵] این در حالی است که El-Ghodban در مطالعه خود هیچ سویه مولد $TSST_1$ در میان مواد غذایی گزارش نکرد.[۹] نکته حایز اهمیت در اینجا این است که شناسایی ژن توکسین در ایزوله‌های مورد بررسی به معنای تولید قطعی آن توکسین نمی‌باشد. مثلاً ممکن است ژن مربوطه بیان نشود و یا تولید توکسین زیر حد جستجوی آن باشد. این موارد میتواند منجر به واکنش مثبت PCR شود در حالی که تست RPLA منفی است و یا بالعکس. بنابراین مطابق با مطالعات جهانی بهترین حالت استفاده از تلفیق هر دو روش می‌باشد. بدین ترتیب PCR تکنیک دقیق، حساس و اختصاصی برای بررسی حضور ژن tst غیر وابسته به بیان آن می‌باشد. در حالی‌که RPLA همان طور که به وفور در مطالعات جهانی با حساسیت بالا به‌کار می‌رود، جهت بررسی تولید توکسین استفاده می‌شود.[۲۰] در مطالعه ما ارتباط بسیار خوبی بین این دو تکنیک وجود داشت و همخوانی ۱۰۰٪ بین آنها

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]

دیده شد. از طرفی در مطالعه ما غالب ایزوله‌های مولد $TSST_1$، از نظر ژن entC به‌طور همزمان مثبت بودند یعنی به عبارتی ۲۸٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌طور همزمان ترکیبی از این دو ژن را دارا بودند. این نتایج با مطالعات متعددی در سطح جهان همخوانی دارد. مثلا Naoko در ژاپن در مطالعه انجام شده بر روی ۵۳ نمونه شیر، ۱۶ ایزوله مولد entC جدا کرد که ۱۵ مورد آنها همزمان مولد $tsst_1$ نیز بودند.[۲۱] Zschock در مطالعه خود بر روی ۹۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست آمده از شیر نمونه‌های ماستیت گاوی یافت که ژن tst در همراهی با ژن entC در ۱۶٪ موارد و به‌طور همزمان با ژن entA در ۱/۱٪ موارد مثبت است.[۲۰] نتایج Scherrer بر روی ۲۹۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۲۳ ایزوله entC مثبت، ۱۱۸ ایزوله (۹۵/۹٪) را که همزمان حامل ژن tst هستند، نشان می‌دهد.[۲۲] همین‌طور در مطالعه دیگری در نیجریه، از میان ۸۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مولد $tsst_1$، ۴۶ مورد (۳۸/۹٪) دارای ژن entC به‌طور همزمان بودند.[۱۰] در مطالعه نامبرده بیشترین ترکیب ژن tst، همراهی این ژن با ژن entC ذکر شده است. در مطالعه ما نیز بیشترین ترکیب ژنی در میان ژن tst با ژن‌های ent نامبرده، به‌صورت tst –entC بوده است و این از لحاظ آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). یعنی ارتباط معنی‌داری بین سویه‌های مولد ژن tst و ژن entC وجود داشته است. اما Chapaval بر روی ۱۳۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست آمده از شیر خام در برزیل یافت که از میان ۳۸ ایزوله مولد ژن tst، بیشترین ترکیب ژنی بین ژن‌های tst و entA (۳۶/۶٪) بوده است[۲۳] که این با نتایج به‌دست آمده از مطالعه ما مبنی بر شیوع ۱۲/۵٪ ایزوله‌های حامل ژن‌های tst و entA به‌طور همزمان، مغایرت دارد. بدین ترتیب عفونت‌های منتقله از راه غذا و مسمومیت‌های غذایی، نگرانی بسیار مهمی برای دولت‌ها و صاحبان صنایع غذایی در چند دهه اخیر ایجاد نموده است. در هر حال میزان آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس در کشور ما نسبتاً قابل ملاحظه می‌باشد. به‌خصوص شیوع ایزوله‌هایی که به‌طور همزمان ژن‌های ent را در ترکیب با ژن tst دارند، موضوع نگران کننده‌ای است. گردش این سویه‌ها که تاکنون با نبود چنین مطالعاتی اهمیت آن خیلی محسوس نبود، هم اکنون زنگ خطری برای آینده است. از طرفی افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی‌دهند. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰–۵۰٪ در ناحیه نازوفارنکس و ۳۰–۵٪ در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی ۲۰–۱۰٪ می‌رسد، به‌خصوص از ناحیه مسئولین تهیه غذاها پررنگ‌تر می‌شود.[۲۳و۴] در هر صورت مانیتورینگ کنترل این سویه‌ها و یا کاهش میزان این بیماری‌ها، نیازمند یک سیستم نظارت موثر در سطح هر جامعه و هر کشور به‌صورت مستقل خواهد بود. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره‌اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده‌است که در این زمینه نسبت به گزارش‌های گذشته و حال خود آگاهی دارند.[۷] بدین ترتیب نتایج به‌دست آمده از نقاط دیگر دنیا نمی‌تواند به‌طور موثری ما را در زمینه وضعیت سلامت صنایع غذاییو بهداشت عمومی کشورمان روشن کند و بدون شک جهت نیل به‌این اهداف نیاز مبرمی به‌مطالعات بیشتر، به‌خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و شناخت سویه‌های غالب با تکنیک‌های حساس تایپینگ ژنوتیپی و فنوتیپی در کشور ما احساس می‌شود.

References

1. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol* 2007;118(2):186-93.
2. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, et al. Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 2005;98(1):73-9.
3. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000;61(1):1-10.
4. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* 2007;115(3):290-6.
5. Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñiz J, Alvarez MA, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1278-84.
6. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2005;246(2):191-8.
7. Todd EC. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q* 1997;50(1-2):30-50.
8. Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of enterotoxigenic Staphylococcus aureus by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9):6117-23.
9. El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Márialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 2):179-82.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]

۱۷. پورمحمدی عزیزاله، محمدی جمشید، میرزایی علی، مومنی نژاد محسن، افشار رحمت اله. آلودگی های میکروبیدر بستنی های سنتی شهر یاسوج. ارمغان دانش ۱۳۸۲: سال ۸ شماره ۲۹: صفحات ۱۳۵ تا ۱۴۲.

۱۸. محمد مهدی سلطان دلال، سعید واحدی، حجت زراعتی، مریم صلصالی، حمیده نوروز بابایی،تاج الملوک کفاشی، همکاران. ارزیابی تاثیر پختن بر کاهش آلودگی میکربی کباب و همبرگر آماده برای فروش در جنوب شهرتهران. پیاورد سلامت ۱۳۸۶: سال ۱، شماره ۱، صفحات ۲۳ تا ۳۱.

10. Adesiyun AA, Lenz W, Schaal KP. Production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) by Staphylococcus aureus strains isolated from humans, animals and foods in Nigeria. *Microbiologica* 1992;15(2):125-33.
11. Fueyo JM, Mendoza MC, Martín MC. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in Staphylococcus aureus recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes Infect* 2005;7(2):187-94.
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Methods for identification and enumeration of Staphylococcuse aureus coagulase (+) in food stuff, 1993.
13. Capita R, Calleja CA. Characterization of Staphylococcus aureus from poultry meat in Spain. Poultry Science 2002 ;81:414-21.
14. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1032-5.
15. Oh SK, Lee N, Cho YS, Shin DB, Choi SY, Koo M. Occurrence of toxigenic Staphylococcus aureus in ready-to-eat food in Korea. *J Food Prot* 2007;70(5):1153-8.
16. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* 2005;2(2):115-29.
19. Moon JS, Lee AR, Jaw SH, Kang HM, Joo YS, Park YH, et al. Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among Staphylococcus aureus isolated from animal and vegetable sources in Korea. *J Food Prot* 2007;70(11):2541-8.
20. Zschock M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction. *Int Dairy J* 2000;10:569-74.
21. Nagase N, Shimizu A, Kawano J, Yamashita K, Yoshimura H, Ishimaru M, et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in Japan. *J Vet Med Sci* 2002;64(12):1169-72.
22. Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of Staphylococcus aureus isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol* 2004;101(2):101-7.
23. Chapaval L, Moon DH, Gomes, JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (tst) in staphylococcus aureus isolated from crude milk and determination of toxin productivities of S. aureus isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol* 2006;73:165-9.
24. Loeto D, Matsheka MI, Gashe BA. Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of Staphylococcus aureus strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. *J Food Prot* 2007;70(12):2764-8.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 7, Oct 2009: 470-476

Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods

Eshraghi S.[1]
Salehipour Z.[1]
Pourmand M.R.[1]
Rahimi Forushani A.[2]
Zahraei Salehi MT.[3]
Agha Amiri S.[1]
Bakhtyari R.[1]
Abedi Mohtasab T.P.[1]
Mardani N.[1]
Seyed Amiri S.[1]
Soltan Dallal M.M.[1*]

1- Department of Pathobiology
2- Department of Biostatistics

School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences

3- Bacteriology Division, Veterinary of faculty, Tehran University

* Corresponding author: Dept. of Pathobiology, School of Public Health & Institute Health Research, Tehran University of Medical Sciences, P.O.Box: 6446, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-6642268
email: soltanirad34@yahoo.com

Received: May 13, 2009 Accepted: June 21, 2009

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is a major foodborne pathogen throughout the world. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 are important virulence factors and as pyrogenic toxin superantigens have profound effects on the ir host. Thus circulation of $TSST_1$ producing S.aureus among people and food chain is a worrying issue. The present paper was conducted to study Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in *staphylococcus aureus* strains isolated from different foods.

Methods: Over 1040 food samples have been analyzed differentially according to Iran national standard (number= 1194) for *S.aureus* identification. After DNA extraction, PCR reactions were carried out by reference strain as positive control, adequate primers.

Results: At present study, prevalence of foodstuffs contaminated by *S.aureus* isolates was about 9.5% (100 strains). Of 25% of isolates producing entC, 28% (seven strains) had tst gene at the same time and of 8% of isolates producing entA, 12.5% (one strain) were positive for tst genes simultaneously. Altogether of 9% isolates producing combination of entC and entA, 44.4% (four strains) were also producer of tst gene.

Conclusion: Prevalence of $TSST_1$ producing strains in combination with enterotoxin genes is considerable especially with entC and A plus C. On the other hand, circulation of these isolates in humans, animals, foods and environment has hazardous effect for general public health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, toxic shock syndrome toxin-1, enterotoxin A, enterotoxin C.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, September 10, 2013
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-02]