Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

BRIEF REPORT

Prevalence of Enterotoxin A and Enterotoxin B Genes in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Hospitalized Patients, Medical Personnel, and Kitchen Staff in Two Educational Hospitals, Sari, Iran

Sahar Khalili Dizabadi[1],
Hamid Reza Goli[2],
Mohammad Ahanjan[3],
Fatemeh Firouzi[1],
Mohtaram Nasrollahi[4]

[1] MSc Student in Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 21, 2018 ; Accepted August 7, 2018)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) produces various toxins. One of the most important toxins is enterotoxin. Enterotoxin A and B play a major role in food poisoning. This research was conducted to determine the enterotoxin A and B genes in *S. aureus* strains.

Materials and methods: In this study, 223 specimens were collected from the skin and nose of patients, medical personnel and kitchen staff in Imam Khomeini and Bouali Sina hospitals, Sari, Iran. Culture of samples and biochemical tests were used to detect *S. aureus*. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect enterotoxin A and B genes.

Results: Out of 223 specimens, 49 (21.97%) were positive for *S. aureus*, from which 17 (34.7%) isolates were positive for enterotoxin A gene, while none contained enterotoxin B gene.

Conclusion: In this study, isolates of *S. aureus* were positive for presence of enterotoxin A gene. This bacterium has a major role in causing food poisoning, therefore, its prevalence in hospital strains can lead to secondary infections in patients and should be regarded as a serious threat to community health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxin A, enterotoxin B, PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (165): 159-164 (Persian).

* **Corresponding Author: MohtaramNasrollahi -** Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: mnasrolahei@yahoo.com)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۵ مهر سال ۱۳۹۷ (۱۶۴-۱۵۹)

بررسی فراوانی ژن های انتروتوکسین A و B در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بستری، پرسنل درمانی و کادر آشپزخانه بیمارستان های آموزشی ساری

سحر خلیلی دیزآبادی[۱]
حمیدرضا گلی[۲]
محمد آهنجان[۳]
فاطمه فیروزی[۱]
محترم نصرالهی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* سموم مختلفی تولید می‌کند. یکی از مهم‌ترین آن ها، انتروتوکسین می‌باشد. انتروتوکسین A و B بیش‌ترین نقش را در ایجاد مسمومیت غذایی دارند. این تحقیق جهت ردیابی ژن‌های انتروتوکسین A و B در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۲۳ نمونه از پوست و بینی افراد، پرسنل درمانی و کارکنان آشپزخانه بیمارستان‌های امام خمینی و بوعلی ساری جمع‌آوری گردید. کشت و آزمایشات بیوشیمیایی برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. جهت شناسایی ژن انتروتوکسین A و B از روش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: از ۲۲۳ نمونه مورد آزمایش، ۴۹ نمونه (۲۱/۹۷ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و از این میان ۱۷ ایزوله (۳۴/۷ درصد) از نظر ژن انتروتوکسین A مثبت بودند و هیچ کدام از ایزوله ها ژن انتروتوکسین B را نداشتند.

استنتاج: با توجه به این که ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران و پرسنل بیمارستانی درصد بالایی از حضور ژن انتروتوکسین A را نشان دادند و نظر به اهمیت و نقش این باکتری در ایجاد مسمومیت‌های غذایی، شیوع این ژن در سویه‌های بیمارستانی می‌تواند منجر به عفونت‌های ثانویه بیماران شده و هشداری جدی برای بهداشت جامعه می‌باشد.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین A، انتروتوکسین B،PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی است که هرساله صدها هزار نفر را به مسمومیت غذایی مبتلا می‌کند(۱). این ارگانیسم عامل عفونت‌هایی همچون سپسیس، آبسه، پنومونی، استئومیلیت و اندوکاردیت می‌باشد. حمل *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی نقش کلیدی در اپیدمیولوژی و پاتوژنز عفونت داشته و مخزنی برای ایجاد سویه های مقاوم به متی‌سیلین Methicillin Resistant *Staphylococcus* aureus (MRSA) می‌باشد(۲). در بین فاکتورهای بیماریزایی مختلف این باکتری، انتروتوکسین‌ها (به خصوص انتروتوکسین‌های

مولف مسئول: محترم نصرالهی– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:mnasrolahei@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار،گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار،گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۱/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۱۱/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۵/۱۶

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

نوع A و B) نقش بسیار عمده‌ای در ایجاد مشکلات بهداشتی دارند(۳). در حالی که اکثر موارد بیماری ناشی از انتروتوکسین A است، انتروتوکسین‌های C و D بیش‌تر در فرآورده‌های شیر آلوده بوده و انتروتوکسین B عامل کولیت با غشا کاذب می‌باشد. تغییرات بافتی مشخص در معده و ژوژنوم شامل ارتشاح نوتروفیل‌ها به داخل اپیتلیوم و لایه زیرین لامیناپروپریا و از دست رفتن حاشیه مسواکی ژوژنوم بوده و تحریک آزاد سازی واسطه‌های التهابی از ماست سل عامل استفراغ می‌باشد(۴).

گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین نسبت به گونه‌های فاقد آن مقاومت بیش‌تری در برابر دفاع ایمنی میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌توانند تحت عنوان سوش‌های جدید آشکار گردند و در صورت دارا بودن خواص انترتوکسیژنیک بالا شرایط غیر قابل کنترلی را به وجود آورند(۶،۵). مسمومیت ناشی از انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با علائمی مانند دل درد، اسهال، استفراغ، درد عضلانی، تب و سردرد در مدت ۲ تا ۵ ساعت پس از خوردن غذای آلوده ایجاد می‌شود(۷). تحقیق حاضر جهت شناسایی میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های A و B در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران، پرسنل درمانی و کادر آشپزخانه در شهر ساری انجام شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۵ انجام شد تعداد ۲۲۳ نمونه، از بیماران، پرسنل درمانی و کادر آشپزخانه بیمارستان‌های بوعلی سینا و امام خمینی ساری (به صورت تصادفی و با رضایت افراد) اخذ گردید. نمونه‌ها با استفاده از سوآب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی، از ناحیه قدامی بینی، روی پوست دست و زیر ناخن افراد در شرایط استریل گرفته شده و بلافاصله در بلاد آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند(۸). سپس با تست‌های کاتالاز، کواگولاز اسلایدی و لوله‌ای، مانیتول سالت آگار و دی ان آز ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و جداسازی شدند(۹). استخراج DNA باکتری با روش لیز قلیایی انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از تیشو بافر (0/5gr SDS + 0/4gr NaOH) در میکروتیوب ریخته و چندکلنی باکتری در آن حل گردید. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس به مدت ۱ دقیقه در g ۱۳۰۰۰سانتریفیوژ شد و به آن ۱۸۰ میکرولیتر آب افزوده و مایع رویی به عنوان DNA تخلیص شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی ژن‌های انتروتوکسین A و B

نام پرایمر	توالی نوکلوتیدی '3 – '5	منبع
Sea F	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG	(۱۰)
Sea R	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT	
Seb F	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	(۱۱)
Seb R	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش مخلوطی از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر پرایمر F، ۱ میکرولیتر پرایمر R و ۲ میکرولیتر DNA باکتری با هم مخلوط و حجم نهایی را با ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رساندیم و واکنش در ۳۵ چرخه مطابق با جدول شماره ۲ انجام شد.

جدول شماره ۲: مراحل انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن های انتروتوکسین A و B

تعداد دور	زمان	درجه حرارت (سانتی گراد)	مراحل
۱	۵ (دقیقه)	۹۴	واسرشته شدن اولیه
۳۵ سیکل	۴۵ (ثانیه)	۹۴	واسرشته شدن ثانویه
	۴۵ (ثانیه)	۵۶	مرحله اتصال
	۴۵ (ثانیه)	۷۲	طویل شدن اولیه
۱	۱۰ (دقیقه)	۷۲	طویل شدن نهایی

۶ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتیجه مورد بررسی قرار گرفت.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

یافته ها و بحث

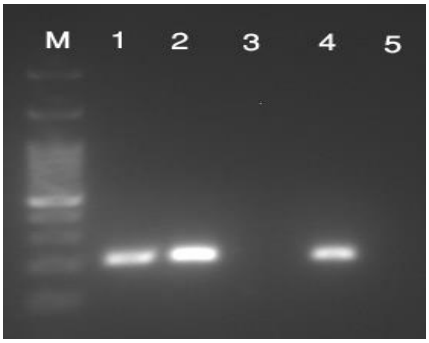
پس از انجام آزمایشات تأییدی، ۴۹ نمونه از کل نمونه‌های اخذ شده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و از این میان ۱۷ ایزوله حامل ژن انتروتوکسین A بوده و همگی از نظر ژن انتروتوکسین B منفی بودند (جدول شماره ۳). هم‌چنین تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری chi-square و توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ ارزیابی شد.

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن *sea* درنمونه های جمع آوری شده

	تعداد نمونه ها	حاملین *استافیلوکوکوس اورئوس* تعداد (درصد)	ژن انتروتوکسین تعداد (درصد)	سطح معنی داری
بیماران	۱۲۵	(۶۱/۲)۳۰	(۷۰/۵۸)۱۲	*<۰/۰۰۱
پرسنل درمانی	۸۴	(۲۸/۵)۱۴	(۲۳/۵۲)۴	
کادر آشپزخانه	۱۴	(۱۰/۲)۵	(۵/۸۸)۱	
کل	۲۲۳	(۱۰۰)۴۹	(۱۰۰)۱۷	

* اختلاف معنی داری در بین گروه ها مشاهده شد.

نتایج مربوط به تکثیر ژن‌های انتروتوکسین‌های A و B به روش PCR، در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به ژن *sea* *استافیلوکوکوس اورئوس*

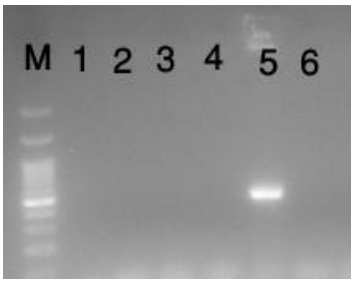
M: اندازه نشانگر DNA (1000 bp)،

۱ و ۲: سویه های حامل ژن *Sea* (اندازه محصول 210 bp)،

۳: سویه فاقد ژن *Sea*،

۴: کنترل مثبت،

۵: کنترل منفی



تصویر شماره ۲: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به ژن *seb* *استافیلوکوکوس اورئوس*

M: اندازه نشانگر DNA(1000 bp)،

۱، ۲، ۳ و ۴: سویه‌های فاقد ژن *seb* (اندازه محصول 478bp)،

۵: کنترل مثبت،

۶: کنترل منفی

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم ایجادکننده بیماری‌های منتقله از طریق غذا FBD(Food born disease) می‌باشد، در حالی که قدرت بیماری‌زایی این باکتری به توانایی تولید سم بستگی دارد(۱۲). بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا، بیماری‌های منتقله از مواد غذایی که به‌وسیله‌ی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس‌ها ایجاد می‌شوند، سالانه حدود ۸۰۰ میلیون نفر را درگیر می‌کنند، در حالی که ۳۲۵۰۰۰ نفر بستری شده و ۵۰۰۰ نفر نیز جان خود را از دست می‌دهند(۱۳).

عباسی و همکاران در سال ۱۳۹۴ نشان دادند که ژن *sea* در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با بقیه ژن‌های انتروتوکسین غالب بود(۱۴)، در حالی که Nashev و همکاران نیز همین نتیجه را در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های بینی گزارش کردند(۱۵)؛ این درحالی است که نتایج این مطالعه مشابه نتایج مطالعه‌ی ما بوده است. در تحقیق مشابه دیگری که توسط براتی و همکاران در سال ۱۳۸۵ انجام گردید، فقط ۶ ایزوله (۶/۷۴ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن انتروتوکسین A بودند(۱۶). این اختلاف می‌تواند به علت تفاوت در نوع نمونه‌های مورد بررسی و جایگاه طبیعی سویه‌ها باشد. در تحقیق دادگر و همکاران، از مجموع ۲۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس*

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

اورئوس جدا شده از کارکنان و بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی گرگان، ۱۲۴ نمونه حاوی ژن *sea* بودند(۱۷). علت این اختلاف با مطالعه ما می‌تواند منشا متفاوت جداسازی نمونه‌ها باشد.

در تحقیق گادیاری و همکاران بر روی نمونه‌های بالینی بیماران دچار سوختگی، ۱۲ درصد سویه‌ها داری ژن *sea* و ۱ درصد آن‌ها حامل ژن *seb* بودند(۱۸). در این مطالعه شیوع ژن *sea* کم‌تر از نتایج ما بود، ولی شیوع ژن *seb* تقریباً مشابه نتایج ما بود، در حالی که نوع نمونه‌ها متفاوت بود. محمدی تحقیقی را بر مبنای پراکندگی ژن انتروتوکسین A در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از پنیر سفید سنتی انجام داد که در این مطالعه، ۱۱ نمونه (۹/۱ درصد) آلوده به این باکتری بوده و ژن *sea* در ۲ ایزوله شناسایی گردید(۱۹). احتمالاً رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر تولید اسیدلاکتیک وکاهش pH در فرایند تخمیر پنیر و تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک متوقف شود(۲۰). با توجه به اهمیت و نقش این باکتری در ایجاد مسمومیت‌های غذایی و عفونت‌های ثانویه در بیماران، شناسایی و توجه بیش‌تر به آن با به کارگیری راهکارهای مناسب درمانی و ابزارهای مناسب کنترل عفونت ضروری است. با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب می‌توان تا حدودی این باکتری پاتوژن را کنترل نمود و تأثیر مخرب توکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را کاهش داد. هم‌چنین، شرایط نگهداری صحیح غذاهایی که احتمال آلودگی آن‌ها با این باکتری وجود دارد و نحوه و میزان پخت مواد غذایی نیز در میزان شیوع این باکتری تأثیرگذار می‌باشد.

سپاسگذاری

از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌نماییم.

References

1. Norouzi J, Goudarzi G, Pakzad P, Razavipour R. The isolation and detection of Staphylococcus aureus enterotoxins AE and TSST-1 genes from different sources by PCR method. Qom Univ Med Sci J 2012; 6(3): 78-85 (Persian).
2. Rezai S, Peyravii Ghadikolaii F, Ahanjan M, Valadan R, Ahangarkani F, Ghara N. Prevalence of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus with mecA Gene among Healthy Primary School Boys in North of Iran; A Cross-Sectional Study. International Journal of Pediatrics 2017; 5(12): 6515-6525.
3. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DY, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L. Infect Immun 2003; 71(5): 2916-2919.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 8thed. Amsterdam: Elsevier; 2015.
5. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000; 61(1): 1-10.
6. Ellis M, Serreli A, Colque-Navarro P, Hedstrom U, Chacko A, Siemkowicz E, et al. Role of staphylococcal enterotoxin A in a fatal case of endocarditis. J Med Microbiol 2003; 52(2): 109-112.
7. Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36(4): 815-836.
8. Dibaj R SP, Hashemi A, Naser AD Shojaei H. Study of Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus and CA-MRSA Nasal

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Monday February 18th 2019

Colonization in 2-5 YearsOld Children in Isfahan. Iran J Med Microb 2014; 8(3): 22-30 (Persian).

9. Sobhani Poor MH, Mansouri S, Saeidadeli N. Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Antibiotic Resistance Patterns of the Isolates from the Nose of Training Soldiers in Kerman in 2012. Iran J Med Microbiol 2014; 8(3): 15-21 (Persian).
10. Salasia SIO, Khusnan Z, Lammler C, Zschock M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. J Vet Sci. 2004;5(2):103-109.
11. Johnson W, Tyler S, Ewan E, Ashton F, Pollard D, Rozee K. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(3):426-430.
12. Anvari S, Sattari M, Forozandehe-Moghadam M, Najar Peerayeh S, Imanee Fouladi A. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. Res J Biol Sci 2008; 3(8): 826-829.
13. Imani Fooladi A, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus from traditionally dairy products. Shahrekord Uni Med Sci 2009;11:19-26 (Persian).
14. Abbasi S, Taei S, Zamanzad B. The prevalence of methicillin-resistant Staph. aureus strains producing enterotoxin A and B. Tehran Univ Med J 2016;73(11): 778-783 (Persian).
15. Nashev D, Toshkova K, Salasia SIO, Hassan AA, Lämmler C, Zschöck M. Distribution of virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from stable nasal carriers. FEMS Microbiol Lett 2004; 233(1): 45-52.
16. Barati B, Saadati M, Bahmani MKh. Isolation and Detection of Enterotoxigenic Staphylococcus Aureus Type A by Multiplex PCR. J Mil Med 2006; 8(2): 119-128 (Persian).
17. Dadgar T,Ghaemi E, Bahador N, Imani Fouladi A, Abbas A, Kamereye F. Detection of Staphylococcus Aureus Enterotoxin Genes A-E. Medical Laboratory Journal 2013; 7(5): 1-8 (Persian).
18. Gadyari F S, Boroumand, Yaqoubi R, Sepehriseresht S, Purgholi L. The molecular trace of D, C, B, A enterotoxins Staphylococcus aureus isolated from patients burned at Motahari Hospital in Tehran. Iran J Med Microbiol 2011; 5(50): 20-27 (Persian).
19. Mohammadi Kh. Distribution of staphylococcal enterotoxin A gene among Staphylococcus aureus isolates from traditional white–brined cheese. Journal of Comparative Pathology Iran. Scientific-Research 2014; 4(11): 1473-1480 (Persian).
20. Le Marc Y, Valík L, Medveďová A. Modelling the effect of the starter culture on the growth of Staphylococcus aureus in milk. Int J Food Microbiol 2009; 129(3): 306-311.