

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 Dizabadi¹,
Hamid Reza Goli²,
Mohammad Ahanjan³,
Fatemeh Firouzi¹,
Mohtaram Nasrollahi⁴

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)

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 آهنگان^۳

فاطمه فیروزی^۱

محترم نصرالهی^۴

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس سموم مختلفی تولید می کند. یکی از مهم ترین آن ها، انتروتوکسین می باشد. انتروتوکسین A و B بیش ترین نقش را در ایجاد مسمومیت غذایی دارند. این تحقیق جهت ردیابی ژن های انتروتوکسین A و B در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

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

یافته ها: 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 مسمومیت های غذایی، شیوع این ژن در سویه های بیمارستانی می تواند منجر به عفونت های ثانویه بیماران شده و هشدار جدی برای بهداشت جامعه می باشد.

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

مقدمه

بینی نقش کلیدی در اپیدمیولوژی و پاتوژنز عفونت داشته و مخزنی برای ایجاد سویه های مقاوم به متی سیلین Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) می باشد (۲). در بین فاکتورهای بیماریزایی مختلف این باکتری، انتروتوکسین ها (به خصوص انتروتوکسین های

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم ترین پاتوژن های باکتریایی است که هر ساله صدها هزار نفر را به مسمومیت غذایی مبتلا می کند (۱). این ارگانیسم عامل عفونت هایی همچون سپسیس، آبسه، پنومونی، استئومیلیت و اندوکاردیت می باشد. حمل استافیلوکوکوس اورئوس در

E-mail: mnasrolahei@yahoo.com

مؤلف مسئول: محترم نصرالهی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

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

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 رژونوم شامل ارتشاح نوتروفیل‌ها به داخل اپیتلیوم و لایه زیرین لامینا پروپریا و از دست رفتن حاشیه مسواکی رژونوم 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 انتروتوکسیژنیک بالا شرایط غیر قابل‌کنترلی را به وجود آورند (۵، ۶). مسمومیت ناشی از انتروتوکسین‌های /استافیلوکوکوس/ اورئوس با علائمی مانند دل‌درد، 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 روش‌ها

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 دی‌ان‌آز ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و جداسازی شدند (۹). استخراج DNA با کتری با روش لیز قلبایی انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از تیشو بافر (0/5gr SDS + 0/4gr NaOH) در میکروتیوب ریخته و چند کلنی باکتری در آن حل گردید. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ 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 نوکلئیدی 5' - 3'	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	

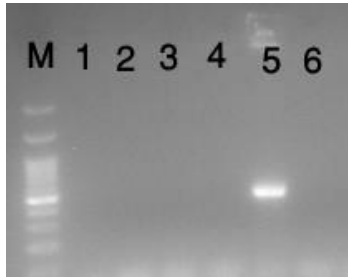
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش مخلوطی از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر پرایمر F، ۱ میکرولیتر پرایمر R و ۲ میکرولیتر DNA باکتری با هم مخلوط و حجم نهایی را با ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رساندیم و واکنش در ۳۵ چرخه مطابق با جدول شماره ۲ انجام شد.

جدول شماره ۲: مراحل انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های

انتروتوکسین A و B

تعداد دور	زمان	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	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.



تصویر شماره ۲: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به ژن *seb* استافیلوکوکوس اورئوس
M: اندازه نشانگر (1000 bp DNA)،
۱، ۲، ۳ و ۴: سویه های فاقد ژن *seb* (اندازه محصول 478bp)،
۵: کنترل مثبت،
۶: کنترل منفی

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم ایجاد کننده بیماری های منتقله از طریق غذا (FBD/Food born disease) می باشد، در حالی که قدرت بیماری زایی این باکتری به توانایی تولید سم بستگی دارد (۱۲). بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری های آمریکا، بیماری های منتقله از مواد غذایی که به وسیله ی انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ها ایجاد می شوند، سالانه حدود ۸۰۰ میلیون نفر را درگیر می کنند، در حالی که ۳۲۵۰۰۰ نفر بستری شده و ۵۰۰۰ نفر نیز جان خود را از دست می دهند (۱۳).

عباسی و همکاران در سال ۱۳۹۴ نشان دادند که ژن *sea* در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با بقیه ژن های انتروتوکسین غالب بود (۱۴)، در حالی که Nashev و همکاران نیز همین نتیجه را در سویه های جدا شده از نمونه های بینی گزارش کردند (۱۵)؛ این در حالی است که نتایج این مطالعه مشابه نتایج مطالعه ی 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 می تواند به علت تفاوت در نوع نمونه های مورد بررسی و جایگاه طبیعی سویه ها باشد. در تحقیق دادگر و همکاران، از مجموع ۲۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس

یافته ها و بحث

پس از انجام آزمایشات تأییدی، ۴۹ نمونه از کل نمونه های 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). هم چنین تفاوت بین گروه ها با استفاده از آزمون آماری χ^2 و توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ ارزیابی شد.

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

تعداد نمونه ها	تعداد (درصد)	ژن انتروتوکسین	سطح معنی داری
بیماران	۱۲۵	تعداد (درصد)	< 0.001
پرستل درمانی	۸۴	(۲۸/۵۱)۴	
کادر آشپزخانه	۱۴	(۵/۸۸)۱	
کل	۲۲۳	(۱۰۰)۴۹	

* اختلاف معنی داری در بین گروه ها مشاهده شد.

نتایج مربوط به تکثیر ژن های انتروتوکسین های 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 (1000 bp DNA)،
۱ و ۲: سویه های حامل ژن *Sea* (اندازه محصول 210 bp)،
۳: سویه فاقد ژن *Sea*،
۴: کنترل مثبت،
۵: کنترل منفی

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 می‌نمایم.

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 انترتوکسین 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 و کاهش pH در فرایند تخمیر پنیر و تولید

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

- 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, Forozandeh-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, Medved'ová 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.