

تشخیص و آنتی بیوگرام استافیلوکوکوس ارتوس در نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه استان تهران به روش Multiplex PCR و مقایسه با کشت میکروبی

حامد اهری^۱ دلور شهباززاده^{۲*} علی میثاقی^۳ محمدرضا پورشفیع^۴

(۱) گروه تحقیقات و توسعه مشترک نانوتیبا پارس، عضو دفتر علم و فناوری دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(۲) انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

(۳) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(۴) بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۴)

چکیده

باکتری استافیلوکوکوس ارتوس از شایع‌ترین باکتری‌های عامل ورم پستان می‌باشد که جهت تشخیص تعداد کم آن در شیر نیاز به روش‌های حساس می‌باشد. در این مطالعه روش از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس برای تشخیص ژن‌های تولیدکننده توکسین‌های SEA، SEB، SEC که مختص گونه ارتوس بوده و همچنین ژن حفاظت‌شده 23S rRNA که در تمام استافیلوکوک‌ها مشترک می‌باشد، استفاده شده است. در نهایت نتایج حاصل از تشخیص ملکولی با روش مرسوم کشت مورد مقایسه قرار گرفته است. به دلیل سختی دیواره باکتری استافیلوکوکوس و عدم تأثیر آنزیم‌های لایزوزیم، پروتئاز K و موتیلایزین، از روش ازت مایع جهت تجزیه دیواره باکتری استفاده گردید. تعداد ۴۸ نمونه شیر غیر پاستوریزه از دامداری‌های حومه استان تهران تهیه و بعد از انجام PCR و کشت بر روی محیط آگار خون دار تعداد ۴ نمونه مثبت تشخیص داده شد. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نشان داد که سیپروفلوکساسین، ریفامپین و جنتامایسن بهترین آنتی بیوتیک‌های انتخابی در درمان اورام پستانی ناشی از استافیلوکوکوس طلائی می‌باشد. حساسیت روش ملکولی با تعداد ۱۰ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان کوتاهی بدست آمد در حالیکه در روش کشت، تعداد ۱۰۰ باکتری بعد از مدت ۴۸ ساعت قابل تشخیص بود. بیان کننده آن است که روش ملکولی در مقایسه با روش‌های مرسوم حساس و بسیار سریع می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس ارتوس، PCR، SEs، 23S rRNA.

رایج است و همچنین ژن‌های SEA، SEB، SEC که اختصاص به گونه استافیلوکوکوس ارتوس دارند جهت تشخیص آلودگی‌های ناشی از استافیلوکوکوس ارتوس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲).

در مطالعه حاضر روش مولکولی جهت تشخیص باکتری استافیلوکوکوس ارتوس در نمونه‌های شیر غیر پاستوریزه و جمع آوری شده از دامداری‌های حومه استان تهران مورد استفاده قرار گرفته و نتایج حاصل از انجام PCR-Multiplex با روش‌های متداول کشت باکتری مقایسه و ارزیابی شده است.

مواد و روش کار

الف) نمونه‌گیری: با همکاری آزمایشگاه‌های دامپزشکی پاستور و وت، تعداد ۶۰ نمونه شیر غیر پاستوریزه که به صورت مستقیم از گاوداری‌های شیری یا از مخازن تانک ذخیره شیر در کارخانه‌ها تهیه شده بود، در کمتر از دو ساعت در مجاورت یخ جهت آزمایش‌های میکروبی به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌گیری در فواصل معین سال و با رعایت شرایط صحیح نمونه‌گیری انجام گردید.

کشت باکتری و غنی‌سازی: جهت تشخیص ملکولی نمونه‌های تهیه شده، قبل از انجام PCR نمونه‌ها بر روی محیط آگوست برین هارت (Merck) brain heart infusion broth غنی‌سازی گردید. به این نحوه امیلی لیتر از هر نمونه شیر به صورت مجزا در محیط BHI broth انتقال و به

مقدمه

گزارش‌های متعددی از بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به پاتوژن‌های غذایی وجود دارد. این پاتوژن‌ها سبب ایجاد عفونت‌های باکتریایی از جمله سالمونلا، استافیلوکوکوس ارتوس، شیگلا، لیستریا مونوسیتونز می‌شوند. از میان باکتری‌های پاتوژن غذایی، استافیلوکوک طلائی از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد. باکتری استافیلوکوکوس، کوکسی گرم مثبت است که عفونت‌های متنوعی را در انسان و دام ایجاد می‌کند. به علت مقاومت سویه‌های بیماری‌زای انسانی به آنتی بیوتیک‌های رایج، تشخیص سریع عوامل پاتوژن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۱، ۷). امروزه از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس به عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به موقع عفونت‌های میکروبی استفاده می‌گردد (۸، ۹).

با توجه به شایع بودن آلودگی نمونه‌های لبنی به انواع گونه‌های استافیلوکوکوس و همچنین راندمان پایین روش‌های متداول مانند آزمایش الایزا و کشت میکروبی، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس جایگزین متدهای مذکور کم‌کم به‌سزایی در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن می‌نماید. ژن 23S rRNA که در تمامی گونه‌های استافیلوکوکوس حفاظت شده می‌باشد و نمایانگر کنترل DNA استافیلوکوک‌ها از سایر باکتری‌های پاتوژن



جدول ۳- توالی پرایمرها، اندازه محصولات PCR در تکثیر ژن های استافیلوکوکوی ارئوس.

Primer Name	Oligonucleotide sequence (30-50)	Amplification size(bp)	Target gene	Reference
23S1200-F 23S1698-R	TTT-GG-TCC-TTG-TCC-GGA-TGT-AGC AGA-AT-CTT-CAC-GCT-CTC-TC	499	23S rRNA	Cremonesi et al. (2005),(2)
A1 A2	GGT-TAT-CAA-TGT-GCG-GGT-GG CGG-CAC-TTT-TTC-CTC-TTC-GG	102	sea	da Silva et al. (2005),(2)
B1 B2	GTA-TGG-TGG-TGT-ACC-TGA-GC CCA-AAT-AGT-GAC-GAG-TTA-GG	164	seb	da Silva et al. (2005),(2)
C1 C2	AGA-TGA-AGT-TGA-TGT-GTA-TGG CAC-ACT-TTT-AGA-ATC-AAC-CG	451	sec	da Silva et al. (2005),(2)

رطوبت گیر برای ۳۰ دقیقه قرار داده و بعد از خشک شدن این پلیت، ۱۰۰ μl آب مقطر دوبار تقطیر شده به آن اضافه گردید.

ج) تشخیص مولکولی به کمک ژن های 23S rRNA و sea_b_c با استفاده از مقالات موجود در این زمینه (۲،۸) چهار جفت پرایمر به شرح ذیل از طریق شرکت سیناژن تهیه گردید.

۲) دستگاه ترمال سایکلر به صورت زیر برنامه ریزی شد: در سیکل اول در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سیکل اصلی دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد سیکل های اصلی ۳۰ بار تکرار شد) و سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود.

پس از طی روند واکنش زنجیره ای پلی مرار، مقدار ۷/۵ μl از قطعات تکثیر یافته از محصول PCR با افزودن ۲ μl از Loading Buffer به ژل آگارز ۱/۵ درصد انتقال یافت و نتایج حاصله با استفاده از لامپ ماوراء بنفش به صورت باند مشخص گردید.

الکتروفورز DNA در ژل آگارز: بعد از تهیه ژل ۱/۵ درصد و انجام الکتروفورز، ابتدا ژل در تانک حاوی اتیدیوم بروماید ۱۰ mg/ml به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۳ دقیقه به تانک آب مقطر دوبار تقطیر انتقال یافت، آنگاه به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل گردید که نتایج آن در تصویر نشان داده شده است.

د) اندازه گیری میزان دقت آزمایش: جذب نوری باکتری استاندارد استافیلوکوکوس (RTCC 2411) که از گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اخذ شده بود، بعد از دو بار کشت ۱۸ ساعته باکتری مورد نظر، جذب نوری کشت ۱۸ ساعته دوم در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد که معادل ۰/۰۲ بود. همزمان با کشت سطحی در محیط بردپارکر (Baird Parker Agar) شمارش انجام گرفت که نتیجه

مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. سپس حجم ۱/۵ ml از کشت حاصله را به داخل میکروتیوب انتقال داده و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی که حاوی محیط کشت Trypticase soy broth agar (TSB, Merck) بوده است، سلولهای باکتری رسوب یافته جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

ب) استخراج DNA ژنومیک باکتری: میزان ۳۰ μl از SDS ده درصد به میکروتیوب حاوی سلول های باکتری رسوب یافته افزوده شد. سپس میکروتیوب را به درون هاون چینی اتوکلاو شده تخلیه نموده و از ۱۹۶- درجه سانتیگراد را به ۲ برابر حجم معادل آن در هاون ریخته و بعد از تشکیل کریستال های یخ در هاون، دیواره سلولی باکتری (تحت تأثیر ضربات مکانیکی) به راحتی شکسته شده و بدون استفاده از هرگونه آنزیمی که جهت سوش های مختلف مصرف می گردد لیز سلولی انجام و DNA قابل استخراج بوده است (۹). سپس محتوای هاون را به درون میکروتیوب انتقال داده و بعد از افزودن فنل کلروفرم و سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی، فنل را برداشته و دور ریخته شد سپس هم حجم فنل دور ریخته شده، کلروفرم ایزوآمیل الکل ۱ به ۲۴ افزوده و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. آنگاه حجم ۲۰ μl آنزیم RNase جهت لیز RNA اضافه گردید. در نهایت ۷/۵ μl کلروفرم سدیم جهت رسوب کلاف DNA اضافه نموده و با اضافه نمودن ۶۰۰ μl ایزوپروپانل الکل و باقی ماندن در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه و سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و تخلیه مایع رویی و باقی ماندن رسوب کف میکروتیوب، اقدام به شستشو با الکل اتانل ۷۰ درصد گردید و این عمل دو بار تکرار گردید.

سپس سانتریفیوژ نهایی با دور ۹۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و در نهایت الکل رویی را تخلیه و میکروتیوب را به صورت وارونه و در بازه روی کاغذ

جدول ۲- برنامه مورد استفاده دستگاه جهت انجام PCR.

توسعه و تکثیر	اتصال و الحاق	دنا تورا سبون	پروفایل حرارتی
_____	_____	۵ min - ۹۴ درجه سانتیگراد	سیکل اول
۱ min - ۷۲ درجه سانتیگراد	۱ min - ۵۶ درجه سانتیگراد	۲ min - ۹۴ درجه سانتیگراد	سیکل های اصلی
۷ min - ۷۲ درجه سانتیگراد	_____	_____	سیکل آخر





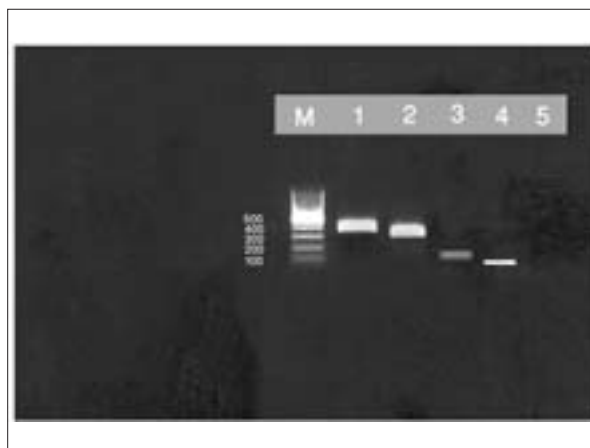
تصویر ۲- واکنش زنجیره ای پلی مرز حاصل از رقت سازی سلول باکتری. ستون M سایز مارکر 100bp DNA ladder plus ستون شماره ۱ غلظت ۱۰^۵ - ستون شماره ۲ غلظت ۱۰^۴ - ستون ۳ غلظت ۱۰^۳ - ستون شماره ۴ غلظت ۱۰^۲ - ستون شماره ۵ غلظت ۱۰^۱ - ستون شماره ۶ غلظت ۱۰^۰.



تصویر ۳- نتایج multiplex PCR در نمونه های شیر غیر پاستوریزه. ستون M سایز مارکر (DNA Ladder Plus 100 bp) و ستون ۱ نمونه شیر شماره ۱ که حاوی باندهای sea و seb؛ ستون ۲ مربوط به نمونه شیر دوم حاوی باندهای sea، seb و sec؛ ستون ۳ حاوی باند seb؛ ستون ۴ مربوط به نمونه شیر چهارم می باشد و باندهای seb و sec رؤیت می شود. باند مربوط به ژن 23S rRNA در تمامی نمونه ها و از جمله به صورت بسیار ضعیف در ستون ۵ که مربوط به نمونه شیر پنجم است دیده می شود. ستون ۶ کنترل منفی و ستون ۷ سایز مارکر می باشد که جهت سهولت و تفکیک باندها منظور گردیده است.

لوله هایی که تشکیل لخته در آنها مشکوک بود به مدت ۱۸ الی ۴۸ ساعت دیگر گرمخانه گذاری شدند و بعد از بازدید مجدد، ۴ نمونه مثبت مشاهده شد. (و آنتی بیوگرام باکتری های جدا شده: استاندارد نیم مک فارلند تهیه و کدورت باکتری با این استاندارد سنجیده شد. سپس با استفاده از سوآپ سه مرتبه با چرخش ۶۰ درجه روی محیط مولر هیلتون آگار، کشت متراکم تهیه گردید و در نهایت دیسک های آنتی بیوتیک را روی محیط گذاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان گرمخانه گذاری هاله های ممانعت از رشد آنتی بیوتیک مشاهده گردید.

ی) شمارش نمونه های شیر خام به روش کشت سطحی: ابتدا رقت های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۲} از شیر خام با استفاده از رقیق کننده رینگر تهیه گردید، سپس ۱/.



تصویر ۱- در این تصویر، سایز مارکر (DNA Ladder Plus 100Ps) شرکت سیناژن که به ترتیب حاوی باندهای ۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰-۵۰۰ جفت بازی در سمت چپ تصویر مشاهده می شود. ستون ۱، باند حاصل از محصول ۴۹۹bp واکنش زنجیره ای پلی مرز (23S rRNA)، ستون ۲ باند ۴۵۱bp مربوط به (sec)، ردیف ۳ باند ۱۶۴bp مربوط به (seb) و در ردیف ۵ نیز باند محصول ۱۰۲bp مربوط به ژن (sea) می باشد.

معادل با ۱۰^۷ cfu/ml بدست آمد. با انجام رقت سازی به روش Serial dilution رقت های ۱ تا ۱۰^۶ را تهیه نموده سپس استخراج DNA و PCR انجام گردید. کشت میکروبی نمونه های شیر مورد آزمایش به روی محیط برد پارکر به صورت همزمان انجام شد تا مقایسه ای بین دقت روش ملکولی با PCR صورت پذیرد.

ه) کشت میکروبی: در این بخش هر یک از نمونه های شیر را، با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و بعد از جدا شدن رسوب و خامه شیر مذکور، مقداری از خامه را با آنس برداشته و باقی مانده 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 دار برده و بعد از ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به بازدید پلیت ها پرداخته شد و پرگنه های استافیلوکوکوس به رنگ سفید و زرد (با لبه های کاملاً گرد پرگنه ها) مشاهده گردید. حال جهت بررسی کوگلاز مثبت بودن نمونه ها از پلاسماي خرگوش (Sclavo Diagnostic_Coagulase Siena: (62021/08/01)) استفاده شد بدین نحو که: از نمونه هایی که پرگنه های سفید و زرد رنگ در آنها دیده شد به ۳/ میلی لیتر محیط BHI (آبگوشت مغز و قلب) منتقل نموده و سپس بوسیله آنس از سوسپانسیون فوق برداشته و در محیط TSA (آگار شیب دار تریپتیک سویا) کشت گردید (هر دو کشت جامد و مایع را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد گذارده) در نهایت ۵/ میلی لیتر پلاسماي خرگوش را به کشت مایع افزوده و کاملاً مخلوط و سپس در حرارت ۳۷ درجه نگهداری کرده، تا فاصله زمانی ۶ ساعت از نظر تشکیل لخته مورد بررسی قرار گیرد. فقط لوله هایی که کاملاً منعقد شده بودند +۴ و کوگلاز مثبت محسوب گردیدند و لوله هایی که انعقاد در آنها ناقص بود (+۱ تا +۳) مشکوک قلمداد شدند که این لوله ها از لحاظ تست های بیوشیمیایی مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند.



جدول ۳- نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نمونه‌های مثبت. (Resistant :R) - (Sensitive :S).

نمونه‌ها	اگزاسیلین	ریفامپین	جنتامیسین	تتراسایکلین	انکومایسین	آمپیسیلین	اریزومایسین	سپروفلوکساسین
نمونه شماره ۱	S	R	S	S	S	S	S	S
نمونه شماره ۲	R	S	S	S	S	I	S	S
نمونه شماره ۳	R	S	S	R	S	S	R	S
نمونه شماره ۴	R	S	S	R	S	S	R	S

جدول ۳- شمارش میکروبی نمونه‌های شیر آزمایش شده.

Total	Negative	Positive	Culture/multiplex PCR
5	1=b	4=a	Positive
55	55=d	0=c	Negative
60	60	4	Total

این در حالی است که در نتایج حاصل از کشت تنها ۴ نمونه قابل تشخیص بوده است. و یکی از نمونه‌هایی که توسط کشت منفی تشخیص داده شده بود در آزمایش PCR مثبت نشان داده شد. با توجه به حساسیت PCR در مقایسه با روش کشت، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این نمونه به دلیل تعداد کم پاتوژن و عدم توانایی در تکثیر به روش کشت سلولی فقط در نتایج PCR multiplex (تصویر ۳) مشاهده می‌گردد.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام: نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام بیانگر آن می‌باشد که سپروفلوکساسین، ریفامپین، جنتامیسین، وانکومایسین و حتی آمپی سیلین بهترین آنتی بیوتیک‌های انتخابی در درمان اورام پستانی ناشی از استافیلوکوکوس طلائی می‌باشد.

شمارش نمونه‌های شیر خام به روش کشت سطحی: بعد از انجام شمارش، کمترین میزان آلودگی مربوط به نمونه شماره ۵ است که باند ضعیفی در تصویر حاصل گردیده بود، و همچنین بیشترین میزان آلودگی هم مربوط به نمونه شماره ۴ می‌باشد.

محاسبه ضریب توافق یا: Kappa

$$Kappa = OP - EP / 1 - EP$$

$$OP (\text{Observation Proportion}) = a + d / \text{Number of Samples}$$

$$4 + 55 / 60 = 0.983 \longrightarrow OP = 0.983$$

$$EP (\text{Expected Proportion}) = (a + b/n) \cdot (a + c/n) + (c + d/n) \cdot (b + d/n)$$

$$EP = (5/60 \cdot 4/60) + (55/60 \cdot 56/60) = 0.855 \longrightarrow EP = 0.855$$

$$Kappa = 0.983 - 0.855 / 1 - 0.855 = 0.128 / 0.145 \longrightarrow Kappa = 0.83$$

(Perfect agreement result)

بحث

باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان یکی از پاتوژن‌های آلوده کننده انسان، حیوان و محیط زیست مطرح می‌باشد. روش‌های متعددی برای جداسازی این باکتری از موجود زنده و یا در مواد غذایی بکار گرفته شده است. استفاده از روش‌های ملکولی می‌تواند جایگزین دیگر روش‌ها گردد. از حساس‌ترین مرحله در انجام روش PCR استخراج DNA باکتری است. در

جدول ۳- شمارش میکروبی نمونه‌های شیر آزمایش شده.

شمارش میکروبی	نمونه‌های شیر
6×10^1 cfu/ml	نمونه ۱
2×10^2 cfu/ml	نمونه ۲
1×10^2 cfu/ml	نمونه ۳
$1/6 \times 10^2$ cfu/ml	نمونه ۴
—	نمونه ۵

میلی لیتر از اصل نمونه (شیر خام) و نیز رقت‌های تهیه شده به سطح دو پلیت حاوی محیط BP منتقل گردید و با استفاده از میله شیشه‌ای خمیده در سطح محیط پخش شد. آنگاه پلیت‌های کشت داده شده در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و سرانجام مورد شمارش قرار گرفتند.

نتایج

با انجام PCR multiplex بر روی سوش استاندارد استافیلوکوکوس ارئوس با استفاده از پرایمرهای ژن sec, seb, sea و 23S rRNA اختصاصی بودن پرایمرها در استافیلوکوکوس ارئوس مورد تأیید قرار گرفت، که نتایج آن در جهت شناسایی انواع استافیلوکوکوس‌ها در نمونه‌های لبنی اخذ شده مورد استفاده قرار گرفت. همچنین با توجه به نتایج شکل شماره ۱ باندهای ۴۵۱، ۱۶۴، ۱۰۲ bp و ۴۹۹ به ترتیب برای ژن‌های sec, seb, sea و 23S rRNA مشاهده گردید.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت تست، نشانگر آن است که دقت واکنش به میزان 10^1 باکتری می‌باشد که در تصویر ۲ این امر قابل مشاهده است. همچنین می‌توان رقت‌های 10^1 تا 10^6 را در تصویر مشاهده نمود، و این امر بیانگر آن است که دقت تست به نحوی است که حتی با وجود تنها 10^1 باکتری قابل مشاهده می‌باشد. می‌توان از این آزمایش به آسانی جهت تشخیص و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس استفاده نمود.

کشت میکروبی بر روی محیط برد پارکر انجام شد و نتایج حاصل از کشت نشان داد که تارقت 10^1 باکتری در محیط کشت قابل تشخیص می‌باشد که در مقایسه با روش ملکولی که تا 10^1 باکتری را تفکیک می‌نماید اختلاف قابل توجهی داراست.

multiplex PCR نمونه‌های مثبت: بعد از انجام آزمایش ملکولی بر روی نمونه‌های شیر آلوده جمع آوری شده تعداد ۵ نمونه مثبت حاصل گردید. و



همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در سال ۲۰۰۱ روش PCR کارایی بالایی برای ورم پستان استافیلوکوکوسی 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 باکتریایی جداسازی شود در حالی که PCR چنین محدودیتی ندارد و قابلیت تشخیص تعداد کم پاتوژن در نمونه را داراست (۱۱). در تحقیق حاضر علی رغم اینکه کارایی بالای روش PCR نسبت به کشت میکروبی و روش های دیگر جهت تشخیص و شناسایی مشخص شده است، ولیکن در واکنش های زنجیره ای پلی مرز مشکلاتی نیز وجود دارد که در سایر تحقیقات هم به نوعی شاهد آن بوده ایم، زمانی که میزان میکروارگانیسم در نمونه کمتر از ۱۰ cfu/ml باشد، اثبات حضور آن توسط این روش تشخیص مولکولی، می تواند بسیار مشکل باشد که این مسئله غالباً به از دست رفتن بسیاری از این ارگانیسم ها در زمان سانتریفوژ مربوط می شود. به هر حال بایستی به این نکته توجه داشت که از نظر تئوری واکنش های زنجیره ای پلی مرز توانایی تشخیص حتی یک ژنوم انفرادی را نیز در یک نمونه دارا است. لذا حساسیت بسیار بالایی برای این روش در مقایسه با دیگر روش های آزمایشگاهی قائل هستند. مخصوصاً استفاده از این روش در مواردی که انجام روش های میکروبی شناسی محدودیت های جدی دارد، برای بهبود تشخیص و شناسایی عامل بیماری کاربرد مهمی دارد.

در پایان بر اساس ضریب توافق بدست آمده می توان مطرح نمود که نتیجه حاصله (۰/۸۳) جوابی ایده آل می باشد. بنابراین می توان از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز به جای روش مرسوم کشت استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر تقی زهرانی صالحی و جناب آقای دکتر سعید بکائی (اعضای هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) و جناب آقای دکتر وحید خلیج (عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران) که در آغاز و انجام مراحل این آزمایش، از رهنمودهای خویش ما را بهره مند نمودند کمال سپاس را دارد. همچنین از آزمایشگاه دامپزشکی وت خانم دکتر شبنم شاملو و آزمایشگاه دامپزشکی پاستور (جناب آقای دکتر نریمان شیخی) که در انجام کشت میکروبی و زحمات فراوانی را تحمل نمودند کمال تشکر را دارد. از زحمات پرسنل بخش بیوتکنولوژی و میکروبی شناسی انستیتو پاستور ایران به خصوص سرکار خانم دکتر ملیحه طالبی و سرکار خانم سمیه عنایتی قدردانی می نماید.

این مطالعه برای اولین بار با استفاده از روش نیتروژن مایع جهت استخراج DNA استفاده گردید. (این روش قبلاً در قارچ اسپرژیلوس به کار رفته است) (۹).

با توجه به نتایج حاصله که در تصویر ۱ مشاهده می شود باند مربوط به پرایمر seb ضعیف بوده که احتمالاً مربوط به حساسیت کم ژن مربوطه در شرایط کاربردی آزمایش 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 قدرت ۴۰۰ UV می توان این باند را بهتر روئیت نمود (نتایج در اینجا ذکر نشده است). در مجموع وجود استافیلوکوکوس با پرایمر 23S rRNA و تائید گونه ارئوس با سه پرایمر اختصاصی مربوطه انجام گرفت، همچنین روش مطلوب استخراج DNA حاصله در این آزمایش، برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که در صورت عدم دسترسی به آنزیم های اختصاصی می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

یکی از نتایج دیگر تحقیق این بود که یک نمونه شیر در کشت از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس ارئوس مثبت اعلام نگردیده بود ولی نتیجه حاصل از PCR آن مثبت شد. در مورد نمونه مذکور پس از انجام PCR و الکتروفورز آن باند ضعیفی حاصل گردید که تصویر این باند آورده نشده است. دقت حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز در تشخیص آلودگی های اورام پستانی بسیار حائز اهمیت بوده و در بعضی موارد به علت کم بودن تعداد پاتوژن در کشت میکروبی قابل مشاهده نباشد با استفاده از روش ملکولی در مدت زمان کمتر از چند ساعت به آسانی می توان تشخیص دقیق داد.

نتایج حاصل از تحقیقات از چند جنبه مشکلات مربوط به شناسایی استافیلوکوکوس را از طریق کشت میکروبی نشان می دهد که مهمترین آن عبارتند از:

تعداد موارد شناسایی شده توسط کشت میکروبی محدودیت بیشتری در شناسایی آلودگی شیر و سایر لبنیات دارد و همچنین طولانی شدن زمان انکوباسیون جهت مشاهده پرگنه های این باکتری غالباً باعث افزایش احتمال آلودگی های ثانویه آزمایشگاهی و حتی خشک شدن و نا کارآمد شدن محیط کشت قبل از حصول نتیجه لازم می شود که احتمالاً در ثبت نتایج واقعی تاثیر خواهد گذاشت (۴،۵) و از طرفی دیگر مهمترین مزیت این روش بر روش های کشت میکروبی در آن است که در کشت آزمایشگاهی گونه های مختلف استافیلوکوکوس ممکن است باعث بوجود آمدن حالات مختلف شود که احتمالاً مربوط به عوامل رشد متفاوت هر کدام از آنها باشد که به امر جداسازی میکروبی آنها با یک روش واحد خدشه وارد می نماید. و همچنین برای ایجاد جواب مثبت از طریق PCR وجود حدود ۱۰ cfu/۵۰ ml از باکتری در نمونه غالباً کافی به نظر می رسد در حالی که در روش های کلینیکی همچون الایزا و کشت میکروبی که در حال حاضر در اکثریت آزمایشگاه های ایران مورد استفاده قرار می گیرد، 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 (۱۰).



References

1. Bergdoll, M. S. (1990) Staphylococcal food poisoning. In: Diver D.O. (Ed.), Foodborne Diseases. Academic Press, San Diego, USA. pp. 85-106.
2. Da Silva, E. R., Do Carom, L.S., Da Silva, N. (2005) 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. Fader, R. C., Hals, P. J., Koo, F. C. (1987) Staphylococcal toxins: screening of burn wound isolates and evidence for alpha-haemolysin production in the burn wound. Burns Incl. Therm. Inj. 13: 462-468.
5. Da Silva, E. R., Boechat, J. U. D., Dias Martins, J.C., Barbosa Ferreira, W. P., Pimenta Siqueira, A., Da Silva, N. (2004) Hemolysin production by *Staphylococcus* species isolated from mastitic goat milk. Small Rumin. Res. 55: 45-49.
6. Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C. H. (2001) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in North-east Switzerland. Vet. Microbiol. 78: 373-375.
7. Jorgensen, H.J., Mork, T., Hogasen, H.R., Rorvik, L.M. (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol. 99: 158-166.
8. Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B. (2005) Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes. 19: 299-305.
9. Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., Itoh, K. (2003) Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. J. Biosci. Bioeng. 96: 337-343.
10. Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W. M. (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.
11. Robbins, R., Gould, S., Bergdoll, M. (1974) Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol. 28: 947-950.



DETECTION AND ANTIBIOGRAM OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN NON PASTEURIZED MILK SAMPLES FROM TEHRAN PROVINCE RESTRICTS AND COMPARE TO BACTERIAL CULTURE

Ahari, H.¹, Shahbazzadeh, D.^{2*}, Misaghi, A.³, Pourshafie, M.⁴

¹Research and Development Section, Pars Nano Nasb Company and Member of University of Tehran Since and Technokogy Fark.

²Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran-Iran.

³Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

⁴Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran -Iran.

(Received 31 August 2007 , Accepted 28 February 2008)

Abstract:

Staphylococcus spp., is a common bacteria in cattle mastitis. Detection of the low number of bacteria requires a sensitive method. We used multiplex polymerase chain reaction (m-PCR) assay to detect the genes encoding SEA, SEB, SEC toxins, that are specific in *S. aureus* bacteria. The gene of 23S rRNA that is conserved in all *Staphylococcus spp.*, also was used. Due to the stiffness and low effective enzyme activity such as lysozyme, proteinase k, and mutilysine on bacterial cell wall, it was lysed with liquid nitrogen, and multiplex PCR was performed after DNA extraction. The obtained results in molecular method were compared with traditional cell culture. The total number of 48 samples of non pasteurized milk was collected in Tehran province restricts from dairy cattle housing, and 4 positive samples were detected by PCR and microbial cell culture methods. The result of antibiogram showed that Ciprofloxacin, Gentamycin and Rephampine are the best choice of antibiotic for treatment of *Staphylococcus spp.*, mastitis infectious. The accuracy of the test was monitored by using O/N cell culture serial dilution (1 to 10⁶) of *Staphylococcus spp.*, bacteria (OD₆₀₀=0.02:10⁷ cell). It showed that the sensitivity of PCR is 10 bacteria per ml of cells within few hours, meanwhile in bacterial blood agar cell culture; the number of 100 cells was detected after 48 hours. The result indicates that a molecular technique is more sensitive and rapid compared to traditional bacterial culture method.

Key words: *Staphylococcus aureus*, PCR, 23S rRNA, SEA, SEB, SEC.

*Corresponding author's email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir, Tel:021-66480780, Fax:021- 66933222

