Iranian Journal of Military Medicine
Autumn 2012, Volume 14, Issue 3
Pages: 226-235

مجله طب نظامی
دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحات :۲۳۵-۲۲۶

استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن entC استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از عفونت‌های انسانی و تعیین سکانس آن

رمضانعلی عطایی[۱*] PhD، مهدی کمالی[۳] PhD، رضا رنجبر[۴] PhD، علی کرمی[۴] PhD، محمود قربانی[۲] MSc

[۱]گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۳]تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
[۴]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف این تحقیق استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن انتروتوکسین C استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشد.

روش‌ها: با استفاده از ژن استاندارد موجود در بانک ژن پرایمر طراحی گردید، سپس روش مولکولی PCR جهت تشخیصentC در استافیلوکوکوس آرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی (۳۰۰ سویه جدا شده) set up گردید. محصول PCR تعیین سکانس و با ژن استاندارد مقایسه شد. همچنین، توانایی تولید انتروتوکسین C در تمام سویه‌های ناقل ژن entC نیز با کیت الیزا بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، روش مولکولی PCR با پرایمرهای مختلف به خوبی set up شده است. زیرا، با جفت پرایمر اول قطعه bp۱۰۲ و با جفت پرایمر دوم قطعه bp۱۲۲۳ تکثیر شد. نتایج مقایسه سکانس حاصل از باند bp۱۲۲۳ با ژن استاندارد انطباق ۹۹ درصدی را نشان داد. ترجمه آنها وجود تنها اختلاف در جایگاه ۲۱۸ یعنی آلانین به جای والین بود. همچنین، نتایج توکسین‌زایی سویه‌های ناقل ژن entC با آزمون الیزا حاکی از آن بود که ۳۷ درصد سویه‌های جدا شده از نمونه های بالینی حاوی entC می‌باشند.

نتیجه گیری: علاوه بر سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس کواگولاز مثبت سویه‌های کواگولاز منفی نیز انتروتوکسین‌های سوپر آنتی‌ژن را تولید می‌نمایند. تحقیق حاضر روشی ساده و سریع جهت تأیید توانایی توکسین‌زایی باکتری ارایه و تشخیص سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین C را استاندارد سازی نموده است. زیرا، تشخیص انتروتوکسین‌های سوپرآنتی‌ژن می‌تواند راهنمای با ارزشی جهت درمان مناسب و پیشگیری از عوارض بعدی آنها باشد.

کلیدواژه ها: استاندارد سازی، استافیلوکوس آرئوس، entC و PCR

Standardization of Molecular Diagnostic of the entC Staphylococcus Aureus Isolated from Human Infections and Determine its Sequence

Ataee R. A.[1*] *PhD*, Kamali M.[3] *PhD*, Ranjbar R.[4] *PhD*, Karami A.[4] *PhD*, Ghorbani M.[2] *Msc*

[1]Department of Micribiology, Faculty of Medicine and Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Therapeutic Microbial Toxin Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Nanothechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The aim of this study was to standardize the molecular detection Staphylococcus aureus enterotoxin C gene method.

Methods: Based on gene bank data, the PCR molecular method was set up for detection of entC gene in Staphylococcus aureus isolated from human subjects (300 isolated strains were assayed). The PCR product was sequenced and were compared with the standard gene. By using the ELISA test, ability to produce enterotoxin C of all strains which hair born entC gene were evaluated and analyzed by ELISA kit.

Results: The results showed that the molecular technique of PCR is well set up. Because, the first primer pair amplified a 102bp fragment and the second primer pair were amplified a 1223bp fragment with ease. Multiple Alignment the sequence of 1223bp fragment with the reference gene showed 99 percent compliance. They translated form shows only difference in position 218 which the alanine was replace the valine. Using ELISA test the toxigenicity of all strain containing entC gene was shown that the 37% of strains contained the entC gene.

Conclusion: In addition to coagulase positive Staphylococcus aureus strains coagulase negative strains also have ability to produce supperantigenic enterotoxins. This research provides a simple and quick confirmation and identification method of which capable detect enterotoxin C-producing strains and it has been standardized. Because of the diagnosis the supperantigens could represent valuable guide for proper treatment and prevention of complications of them.

Keywords: Standardization, Staphylococcus Aureus, entC and PCR

نویسنده مسئول: رمضانعلی عطایی. تمامی درخواستها باید به نشانی E- Mail: ataee@bmsu.ac.ir ارسال شود.
دریافت مقاله: ۹۰/۸/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۱۵

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس شایعترین ارگانیسم بیماریزای فرصت طلب می‌باشد که در بین ۳۰ درصد افراد به صورت ناقل سالم گزارش شده و بیش از ۵۰ درصد سویه‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی توکسین تولید می‌نمایند [۲،۱]. در سال‌های اخیر به دلایل متعدد، توکسین زایی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. این دلایل عبارتند از: الف) برخی از سویه‌های کواگولاز منفی نیز قادرند انتروتوکسین‌های عامل مسمومیت غذایی را تولید نمایند [۳]، این امر اعتبار آزمون کواگولاز را در نشان دادن بیماریزایی این باکتری‌ها کم رنگ نموده است. ب) همه توکسین‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها دارای فعالیت سوپرآنتی‌ژنی می‌باشند که قادرند اثرات متعددی در میزبان برجای گذارند [۴]. ج) ارتباط آنها با برخی از بیماری‌های غیر گوارشی گزارش شده است [۵،۶]. د) نشان داده شده است، استافیلوکوکوس‌های تولید کننده توکسین سندرم شوک سمی همیشه انتروتوکسین تیپ C را تولید می‌نمایند [۷،۸]. ذ) کاربرد برخی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی به عنوان داروی ضد سرطان [۸-۱۰] و نیز به عنوان تسریع دهنده درمان شکستگی‌ها در مدل حیوانی گزارش شده است [۱۱]. با آن که فراوانی سویه‌های توکسیژن استافیلوکوکوس آرئوس در عفونت‌های انسانی به طور دقیق تعیین نشده است اما گزارشات فراوانی وجود دارد که نشان داده است این باکتری‌ها از فراورده‌های لبنی [۱۲] و عفونت‌های مختلف جدا شده‌اند [۱۳]. تاکنون ۲۰ نوع مختلف آنتی‌ژنیک آنتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرئوس نام گذاری و معرفی شده است [۱۴]. انتروتوکسین تیپ C یکی از ۵ انتروتوکسین شایع می‌باشد که در ایجاد مسمومیت غذایی و سندروم شوک سمی دخالت دارد. نشان داده شده است که SEC(Staphylococcal Enterotoxin C) در افزایش شدت بیماری در عفونت زایی تجربی مدل حیوانی نقش داشته است . این توکسین دارای ۳ بیوتیپ می‌باشد (SEC۲ ،SEC۱ و SEC۳). در هر حال، شهرت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس دخالت آنها در ایجاد مسمومیت غذایی است. البته شواهد موجود حاکی از آن است که مسمومیت غذایی ناشی از تولید انتروتوکسین‌ها در شرایط In vitro می‌باشد. لذا، خوردن غذای آلوده می‌تواند با ایجاد مسمومیت غذایی همراه گردد. این امر نشان دهنده مقاومت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی نسبت به آنزیم‌های گوارشی است. هر چند مکانیسم سوپرآنتی‌ژنی و نیز عملکرد آنها در دستگاه گوارش به طور دقیق مشخص شده است اما مکانیسم اثر آنها در ارگان‌های غیر از دستگاه گوارش نامعلوم است. عقیده بر آن است که ژن رمز کننده انتروتوکسین C (entC) استافیلوکوکوس آرئوس روی پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارد [۱۵]. به همین دلیل امکان انتشار و فراوانی آن دور از انتظار نیست. لذا، بعد از انتروتوکسین تیپ A انتروتوکسین تیپ C به عنوان فراوان ترین عامل مسمومیت غذایی ناشی از مصرف لبنیات معرفی شده است. در هر حال، با آن که ارتباط بین entC و entA مشخص نیست، برخی سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین C به طور هم زمان، سایر انتروتوکسین‌ها و نیز توکسین عامل سندروم شوک سمی را نیز تولید می‌نمایند. به این ترتیب، بروز اپیدمی‌های مسمومیت غذایی شایع است [۱۶]. در هر حال، با توجه به پراکندگی گسترده استافیلوکوکوس‌ها در طبیعت و توانایی تولید انواع مختلف انتروتوکسین همیشه خطر آلودگی انواع مختلف خوراکی‌ها به انتروتوکسین‌ها وجود دارد. حتی آلودگی آبزیان از جمله: میگوها به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی نیز گزارش شده است [۱۷]. نکته قابل توجه آن است که انتروتوکسین‌ها تنها توسط استافیلوکوکوس آرئوس‌های کواگولاز مثبت تولید نمی‌گردد، بلکه در سال‌های اخیر نشان داده شده است که استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین‌ها می‌باشند [۱۹، ۱۸]. نقش انتروتوکسین‌ها در ایجاد بیماری‌های غیر گوارشی نامشخص است اما با این حال، در موارد متعددی حضور ژن انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی در بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک، پسوریازیس و اریتماها مشاهده شده است [۲۰]. این امر حکایت از نقش احتمالی انتروتوکسین‌ها در ایجاد برخی بیماری‌ها دارد. چنانچه در سال ۱۹۹۲ میلادی Malam و همکاران، مرگ‌های ناگهانی اطفال را ناشی از تجمع انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی در کلیه‌ها ذکر نموده‌اند [۲۱]. نکته قابل توجه آن است که بسته به منطقه جغرافیایی در ترادف ژن رمز کننده انتروتوکسین‌ها تنوع وجود دارد [۲۲]. اما معلوم نیست اختلاف در ترادف ژنی باعث تغییر ترادف اسید آمینه‌ای و نیز در آنتی بادی‌های اختصاصی نیز می‌گردد یا نه. در هر حال، تشخیص استافیلوکوکوس آرئوس بیماریزا مبتنی بر تست کواگولاز می‌باشند، از طرفی استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نیز قادر به تولید انتروتوکسین‌های سوپرآنتی‌ژن می‌باشند، لذا، تشخیص توکسین زایی این باکتریها در کنار تست کواگولاز می‌تواند راهنمای مفیدی جهت درمان صحیح و پیش گیری از عوارض بعدی باشد. این امر ضرورت استاندارد سازی روش تشخیص سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین به ویژه به منظور بررسی‌های اپیدمیولوژیک را اجتناب ناپذیر نموده است. افزون براین، بین توانایی تولید انتروتوکسین‌ها و ایجاد مقاومت به متی‌سیلین گزارشاتی وجود دارد [۲۳،۲۴]. اما معلوم نیست ایجاد مقاومت به متی سیلین باعث القای تولید انتروتوکسین‌ها می‌گردد یا برعکس. با توجه به مطالب فوق، هدف این مطالعه، استاندارد سازی روش تشخیص مولکولی ژن انتروتوکسین C استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از نمونه های بالینی می‌باشد.

روش ها

مواد مورد نیاز: مواد ملکولی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت ایرانی سیناژن که ارایه دهنده محصولات فرمنتاز است خریداری گردید. همچنین، محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت آریا وجد ارایه دهنده محصولات مرک آلمان خریداری شد. کیت استخراج محصول PCR (DNA Extraction; Cat. No. K- 3032, Lot No. 10032) از شرکت تکاپوزیست، ارایه دهنده محصولات شرکت Bioneer خریداری گردید. کیت تشخیص آنتروتوکسین‌ها از شرکت روکت اینترنشنال ارایه دهنده محصولات شرکت r-Biopharm خریداری گردید.

روش کار: در این تحقیق تجربی (Experimental) روش تشخیص ژن انتروتوکسین C (entC) در سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از بیماران طراحی و set up گردید. سپس ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بررسی شدند. همچنین، تولید انتروتوکسین C در سویه‌های حاوی ژن entC با (RIDASCREEN SET A,B,C,D,E: Art. No.: R4101) بررسی گردید. همچنین، با روش ایمونوبلات و استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال منواسپسیفیک اختصاصی انتروتوکسین تیپ C (Rb PAb Staphylococcus Enterotoxin C 500 Ug (۱mg/ml), Ab 15897, Abcam) مورد تأیید قرار گرفت.

معیار انتخاب سویه‌های باکتریایی: معیار انتخاب سویه‌های باکتریایی از این قرار بود. باکتری‌های جدا شده از کشت نمونه‌های عفونی با

مشخصات کوکسی گرم مثبت با آرایش خوشه انگوری، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت و توانایی رشد در محیط مانیتول سالت آگار، در این مطالعه وارد شدند. به این ترتیب ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از عفونت‌های سطحی، خون، مدفوع، کشت گلو، ادرار و مایع نخاع جدا سازی و مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور نگهداری آنها ۲۰ درصد گلیسیرول به کشت ۱۸ ساعته آنها افزوده شد و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

کشت باکتری و استخراج ژنوم: استخراج ژنوم با استفاده از روش Salting out با کمی تغییر انجام شد [۲۵]. کلنی هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه به محیط کشت LB تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، ۱ میلی لیتر از آن را در تیوب استریل ۲ میلی لیتری ریخته و به مدت ۱۰دقیقه در۵۰۰۰ x g سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافرSTE وارد و بطور کامل مخلوط گردید. سپس ۱۲۵ میکرولیتر محلول۲ درصد SDS و ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۳ مولار استات سدیم به محلول اضافه و با سر و ته کردن (۱۰ بار) کاملاً مخلوط شد. پس از آن بمدت ۵ دقیقه در 5000 g x سانتریفیوژ شد. در این حالت ژنوم وارد مایع رویی می‌گردد. محلول رویی را به لوله استریل منتقل و بعد از اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (یا اتانول خالص ٪۱۰۰) به آرامی مخلوط و به مدت یک ساعت و گاهی تا یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن محلول سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ x g و دمای ۴ درجه سانتیگراد) شده و محلول رویی دور ریخته شد. سپس رسوب کاملاً خشک گردید. به رسوب خشک شده؛ ۷۵۰ میکرولیتر اتانول سرد ٪۷۰ افزوده و پس از ۱ ساعت قرار دادن آن در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ x g به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد) گردید. مایع رویی را دور ریخته و رسوب بطور کامل خشک گردید. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل اضافه کرده و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت DNAحاصل اندازه گیری شد. یک میکرولیتر از محلول ژنومی حاصل را (به عنوان تمپلت) به تیوپ‌های مخصوص PCR وارد و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در موقع لزوم هر یک از تیوپ‌های حاوی ۱ میکرولیتر تمپلت از فریزر خارج و با تهیه گرادیان از آن جهت انجام PCR استفاده گردید.

پرایمر: در این تحقیق دو جفت پرایمر استفاده شد. یک جفت از آنها با بررسی مقالات متعدد، پرایمری که بیشتر مورد استفاده محققان قرار گرفته شده بود و با ترادف

F1: 5´-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3´ و

R1:5´-AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA-3´

انتخاب گردید[۱۷]. جفت پرایمر دیگر با استفاده از ترادف ژن رفرانس entC که از بانک ژنی به شماره GenBank: AB084256.1 اخذ گردید و با استفاده از نرم افزار Alel ID به عنوان پرایمر اختصاصی با ترادف

F۲: ۵´-GGAATGTTGGATGAAGGAG-۳´

R۲: ۵´-TATGGACACAATGATACTGG-۳´

طراحی گردید. سپس توسط شرکت سیناژن سنتز شدند. طبق آنالیزهای بیوانفورماتیکی جفت پرایمر F۱ و R۱ یک قطعه bp۱۰۲ و جفت پرایمر F۲ و R۲ یک قطعه bp۱۲۲۳ را تکثیر می‌کردند.

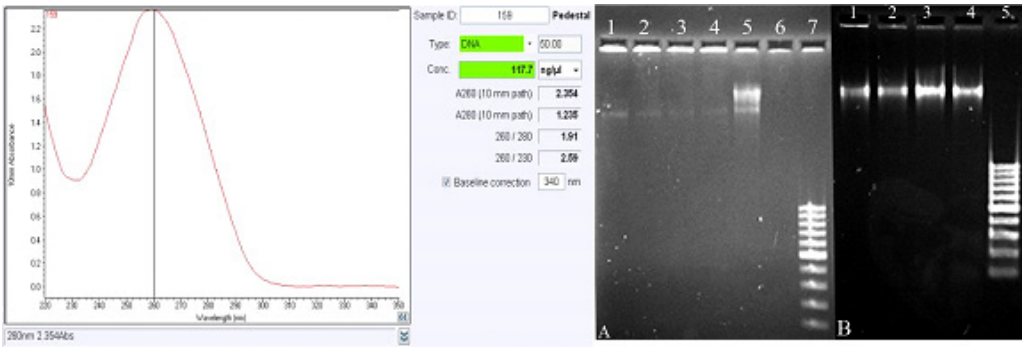
واکنش PCR: واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه bp۱۰۲ طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور بهینه سازی شرایط PCR، گرادیان دمایی (۴۶ الی ۵۶ درجه سانتیگراد)، گرادیان غلظت کلراید منیزیم (۵/۱ – ۸/۰ میلی مولار)، و گرادیان غلظت تمپلت (۱۰ الی ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از ژنوم استخراج شده) بکاربرده شد. این واکنش با دستگاه Thermal Cycler, C1000 ساخت شرکت Bio–RAD انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ تا ۵/۱ درصد الکتروفورز شد. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت تابش نور ماورای بنفش (دستگاه ژل داک) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از کیت استخراج محصول PCR باند مورد نظر تخلیص و جهت تعیین ترادف به شرکت ایرانی نسل امید ارسال گردید.

جدول ۱) شرایط انجام PCR جهت تشخیص ژن کامل entC با ۱۰۲bp در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

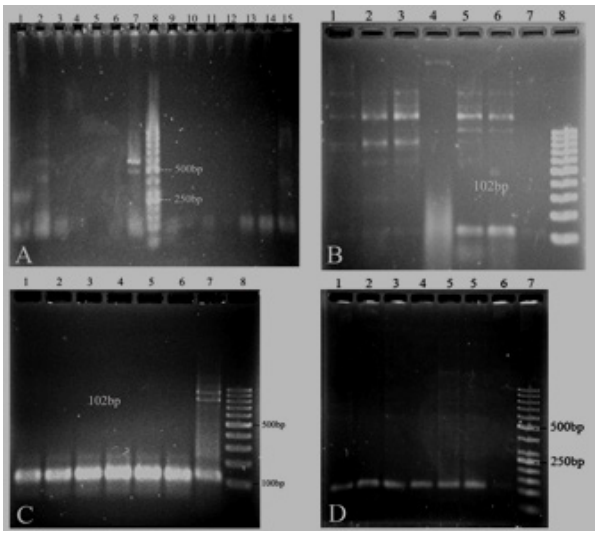
Master Mix		PCR Condition reaction		
Reagents	Reagents	Step	Condition reaction	Time
D.D. Water	18.6µl	Denaturation primal	95 °C	3 min
Template DNA	15 ng/0.5µl			
Buffer 1X	2.5 µl	Denaturation	94 °C	30 sec
MgCl2	1 mM/1µl	Annealing	53 °C	30 sec/ 35 Cycles
dNTP	0.2 mM each/0.7 µl	Elongation	72 °C	5 min
F1- Primer	0.3 mM/1 µl	Final Extension		
R1- Primer	0.3 mM/1µl	Incubation	4 °C	5 min
Taq enzyme	2 unit/0.3µl			
Total	25			

جدول ۲) شرایط انجام PCR جهت تشخیص ژن کامل entC با bp۱۲۲۳ در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

Master Mix		PCR Condition reaction		
Reagents	Reagents	Step	Condition reaction	Time
D.D. Water	16.9µl	Denaturation primal	95 ˚C	4 min
Template DNA	15 ng/1µl			
Buffer 1X	2.5 µl	Denaturation	94 ˚C	40 sec/ 35 Cycles
MgCl2	1 mM/1.5µl	Annealing	60 ˚C	40 sec/ 35 Cycles
dNTP	0.5 mM each/0.7 µl	Elongation	72 ˚C	6sec/ 35 Cycles 10 min/1Cycles
F2- Primer	0.3 mM/1 µl	Final Extension		
R2- Primer	0.3 mM/1µl	Incubation	4 ˚C	5 min
Taq enzyme	2 unit/0.4µl			
Total	25			



شکل ۱) تصویر سمت چپ، اندازه گیری غلظت DNA استخراج شده از استافیلوکوکوس آرئوس را نشان داده است. غلظت‌های ۲-۱۰ تا ۳-۱۰ به عنوان تمپلت استفاده می‌شد. تصویر سمت راست، A) الکتروفورز ۲ تا ۳ میکرولیتر ژنوم استخراج شده از نمونه‌ها با روش Salting out (چاهک‌های ۱ الی ۵ و B) استخراج ژنوم توسط کیت Genomic DNA Extraction شرکت BIONEER (چاهک‌های ۱ الی ۴) نشان داده شده است.



شکل۲) روند تشخیص و خالص سازی بخشی از ژن entC در سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرئوس جهت تعیین سکانس نشان داده شده است. در تصویر A؛ چاهک‌های ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۱، ۹، ۳، ۲ و ۱ را نگاه کنید. چاهک ۸ استاندارد وزن مولکولیbp ۵۰ است. در تصویر B؛ چاهک‌های ۵ و ۶ قطعه ۱۰۲bp را و چاهک ۸ راهنمای وزن مولکولی bp ۱۰۰است. در تصویر C؛ چاهک‌های ۱ الی ۶ بهینه شده شرایط PCR را نشان می‌دهد و چاهک ۸ راهنمای وزن مولکولی bp ۱۰۰است. تصویر D؛ چاهک‌های ۱ الی ۵ و نیز تکرار ۵، تخلیص قطعه ۱۰۲bp را نشان داده است. چاهک ۷ استاندارد وزن مولکولی ۵۰bp است.

با توجه به اینکه ممکن است، بخش تشکیل دهنده قطعه bp102 با سایر انتروتوکسین‌ها مشترک باشد. لذا، پرایمرهای F2 و R2 که تکثیر کننده ژن entC به طور کامل بود و قطعه bp1223 را تکثیر می‌کرد طراحی و بکار برده شد. در حقیقت واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه bp1223 طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۲ انجام شد. به منظور بهینه سازی شرایط PCR از گرادیان درجه حرارت (۵۳ الی ۹/۶۲ درجه سانتیگراد)، گرادیان غلظت کلراید منیزیم (۲ –۱ میلی مولار)، و گرادیان غلظت تمپلت (۱۰ الی ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از ژنوم اس‌تخراج شده) بکاربرده شد.

تشخیص انتروتوکسین‌زایی: تمام سویه‌هایی که با استفاده از روش مولکولی PCR ناقل ژن انتروتوکسین C تشخیص داده شدند، به محیط کشت BHI– broth تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جهت بررسی وجود انتروتوکسین C با استفاده از کیت الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، به عنوان کنترل کیفی، توکسین‌زایی سویه‌های فاقد ژن entC نیز مورد آزمایش الیزا قرار گرفتند.

به منظور انجام آزمایش الیزا از کیت اختصاصی تشخیص ۵ انتروتوکسین شایع استافیلوکوکوس آرئوس (RIDASCREEN SET A,B,C,D,E: Art. No.: R4101) ساخت شرکت آلمانی r-Bi-opharm طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمون‌های فنوتیپی تمام سویه‌ها، استافیلوکوکوس آرئوس بودن آنها را تأیید کرد. به این ترتیب ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج استخراج ژنوم تک تک سویه‌ها با روش Salting out تغییر یافته قابل مقایسه با نتایج حاصل از کیت‌های تجاری بود. شکل ۱ اندازه گیری غلظت ژنوم استخراج شده از استافیلوکوکوس آرئوس و الکتروفورز آن را نشان می‌دهد.

نتایج روند بهینه سازی تکثیر بخشی از ژن entC در شکل ۲ نشان داده شده است. در تصویر A؛ PCR با گرادیان دمایی (۴۶ الی ۵۶ درجه سانتیگراد) و نیز گرادیان MgCl۲ (۵/۱ – ۸/۰) میلی مولار نشان داده شده است. در شرایط غیر اپتیمم تکثیر entC باندی در ناحیه bp102 ایجاد نمود در تصویر B؛ با ایجاد شرایط حرارتی بهینه (گرادیان حرارتی ۴۷ الی ۵۷ درجه سانتیگراد)، محصول PCR در چاهک ۵ و ۶ یک باند قوی در ناحیه bp102 ایجاد گردید. در تصویر C؛ با استفاده از شرایط بهینه حرارتی (۵۱/۹ درجه سانتیگراد) و غلظت بهینه MgCl۲ (۲ میلی مولار) و نیز غلظت پرایمرها باندهای مورد نظر تقویت و باندهای اضافی حذف گردید. در تصویر D؛ خالص سازی محصول PCR و آماده سازی و ارسال آن جهت تعیین سکانس نشان داده شده است.

نظر به این که تحقیقات گذشته طول ژن انتروتوکسین‌های C را 613bp الی 1095bp جفت باز گزارش کرده‌اند، ممکن است رد یابی قطعه bp102 در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس نتواند نماینده خوبی برای انتروتوکسین C باشد. لذا، با توجه به سکانس موجود در بانک ژن پرایمرهایی طراحی گردید که بتواند یک قطعه ۱۲۲۳bp را که دارای ۱۲۸ باز بیش از سکانس معرفی شده بود را تکثیر نماید (شکل A۳). در هر حال، با ایجاد شرایط بهینه PCR طبق جدول ۲ قطعه 1223bp شد. تصویر B شکل ۳ محصول خالص شده PCR آماده و جهت تعیین سکانس به شرکت مربوطه ارسال گردید.

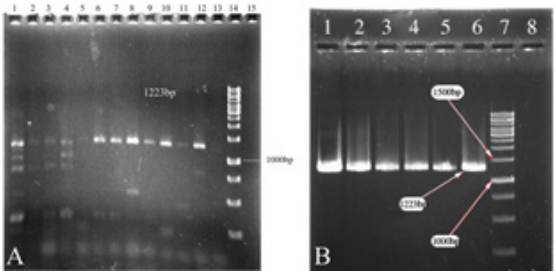
نتایج تعیین سکانس entC: نتیجه مقایسه ترادف ژنی حاصل از این تحقیق با ژن (entC (GenBank: X05815.1 در شکل ۴ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد در باز شماره ۱۰۴ اسید امینه A به جای T، در جایگاه باز شماره ۴۹۲ اسید امینه G به جای A، در جایگاه باز شماره ۶۳۶ اسید امینه G به جای A، در باز شماره ۶۵۹ اسید امینه Cبه جای T، در باز شماره ۹۸۰، اسید امینه T و در باز شماره ۱۰۴۹ اسید امینه G جایگرین شده است. در این تحقیق، از پرایمرهایی استفاده شد که یک قطعه حدود ۱۲۲۳bp را تکثیر نموده است. مقایسه تعیین ترادف محصول PCR نشان دهنده آن است از باز شماره ۹۱ الی باز ۱۰۵۶ انطباق وجود دارد و تنها در ۶ باز اختلاف دیده شده است. این در حالی است که ترجمه ترادف‌های فوق تنها در یک اسید آمینه اختلاف نشان دادند (به شکل ۴ نگاه کنید).

نتایج آزمون الیزا جهت تأیید تولید انتروتوکسین C: نتایج آزمون الیزا روی تعدادی از سویه‌هایی که دارای ent C و یا فاقد ent C بودند در شکل ۶ نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد، ستونهای ۹ و ۱۰ سویه ای از باکتری را نشان می‌دهد که فقط انتروتوکسین C را تولید نموده است. ستونهای ۱، ۲، ۴ و ۶ سویه‌هایی از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که تنها انتروتوکسین A را تولید نموده است. ستون های ۳ و ۷ سویه هایی را نشان می دهد که هیچ انتروتوکسینی تولید نکرده اند. ستون ۸ سویه ای را نشان داده که مقدار کمی انتروتوکسین B و C و مقدار زیادی انتروتوکسین E را تولید نموده‌است. ستون ۱۱ سویه ای را نشان داده است که مقدار زیادی آنتروتوکسین A ولی مقدار کمی آنتروتوکسین Dو E را تولید نموده است. ستون ۱۲ سویه های را نشان داده است که آنتروتوکسین C و E را تولید نموده است. واکنش PCR با سویه های بررسی شده در ستون های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ وجود ent C را در آنها تأیید کرد. در این تصویر ردیفهای F و G کنترل منفی هستند و ردیف H کنترل مثبت مربوط به استاندارد انتروتوکسین (۲ تا ۱۰ نانوگرم در هر میلی لیتر) موجود در کیت می باشد.

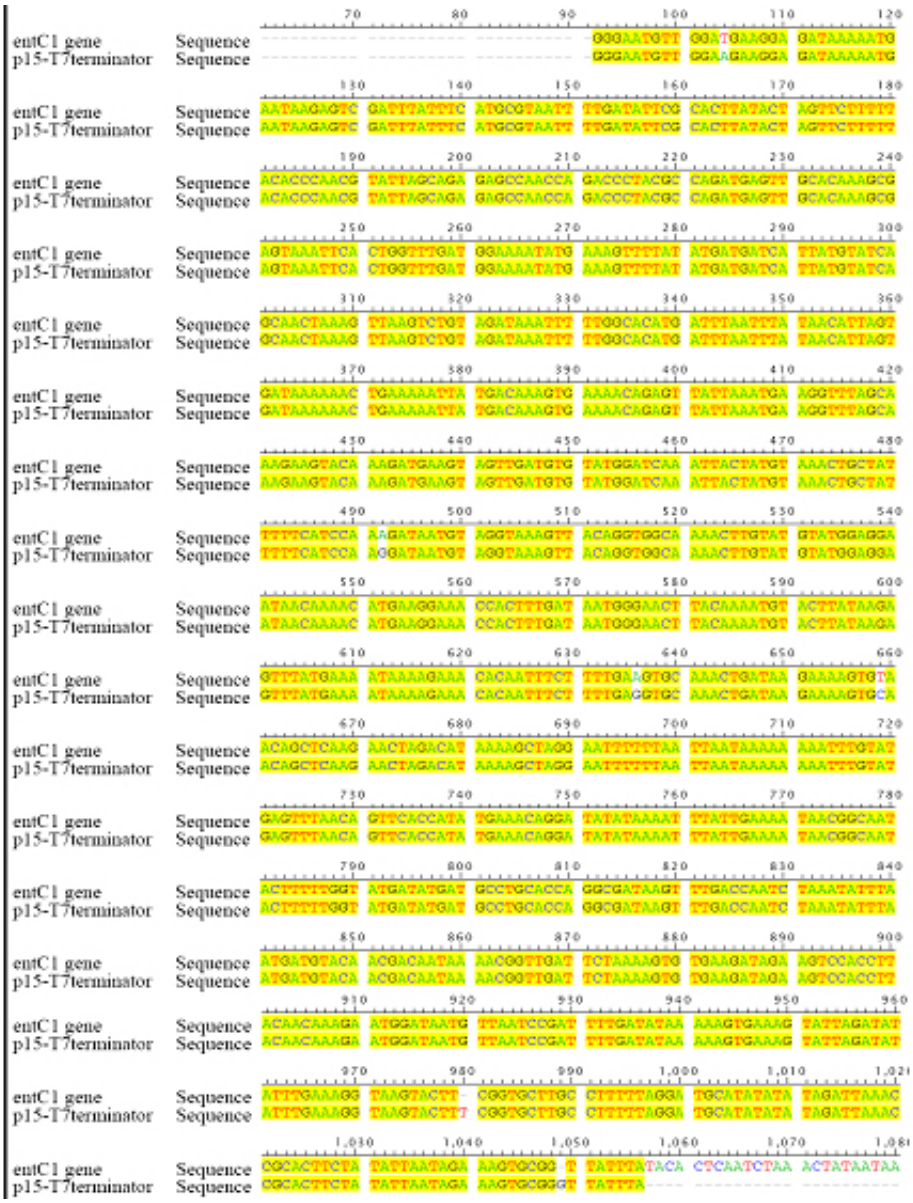
در هر حال، نتایج بررسی ۳۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس با روش مولکولی PCR حاکی از آن بود که ۳۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن entC هستند. اما نتایج آزمون الیزا نشان داد، تنها ۱۱ درصد سویه‌ها فقط ژن entC را به تنهایی دارا می‌باشند و ۲۶ درصد باقی مانده به همراه انتروتوکسین C سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید می‌نمایند. در شکل ۶ ؛ ستون‌های ۳ و ۷ سویه‌ای از استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد که هیچ یک از ۵ انتروتوکسین شایع را تولید نکرده اند. در حالی که ستون‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ سویه‌ای از باکتری را نشان داده شده است که بدون اینکه ناقل ژن entC باشد فقط انتروتوکسین A تولید نموده است. ستون ۱۱ سویه‌ای را نشان داده که علاوه بر انتروتوکسین A سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید کرده است. در هر حال، سویه هایی که حاوی ژن entC بودند تولید انتروتوکسین علاوه بر کیت الایزا با ایمونوبلات نیز تأیید شدند.

بحث

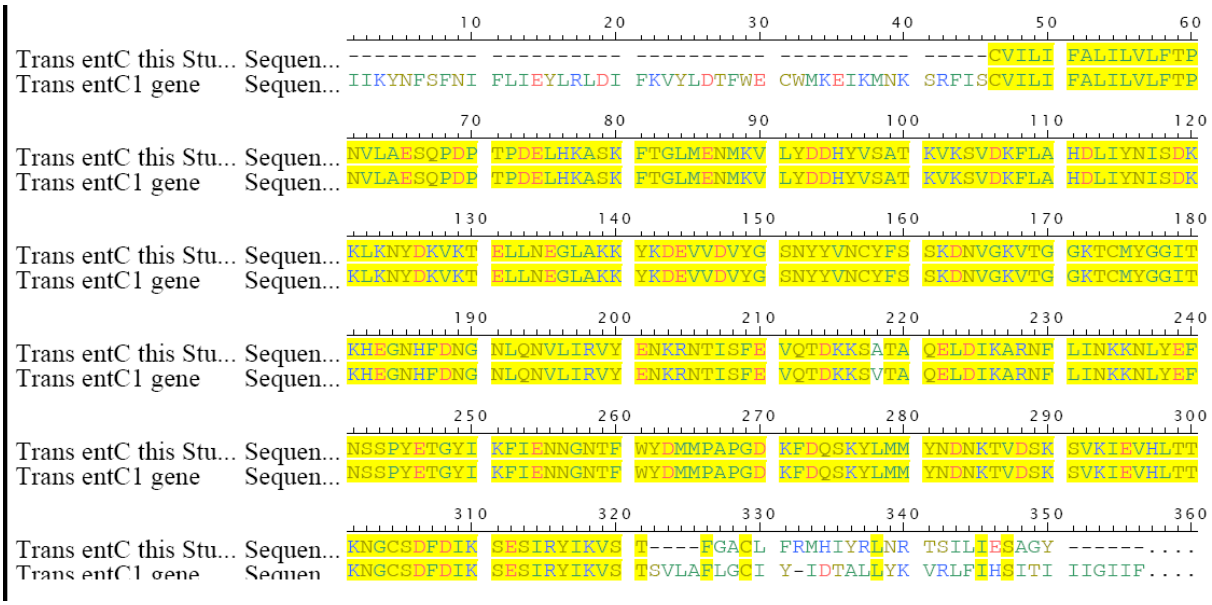
در این تحقیق تجربی با استفاده از روش مولکولی PCR ژن entC در ۳۷ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس شناسایی و توانایی آنها در تولید انتروتوکسین C در سطح حساسیت کیت RICASCREEN SET A, B, C, D, E (۰/۲نانوگرم در میلی لیتر) و نیز ایمونوبلات مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت (به شکل ۶ نگاه کنید). تنها ۱۱ درصد کل سویه‌هایی که ناقل entC بودند انتروتوکسین تیپ C را به تنهایی تولید کردند. در حالیکه سایر سویه‌ها به همراه انتروتوکسین C، سایر انتروتوکسین‌ها را نیز تولید می‌کردند. علت این امر به طور دقیق



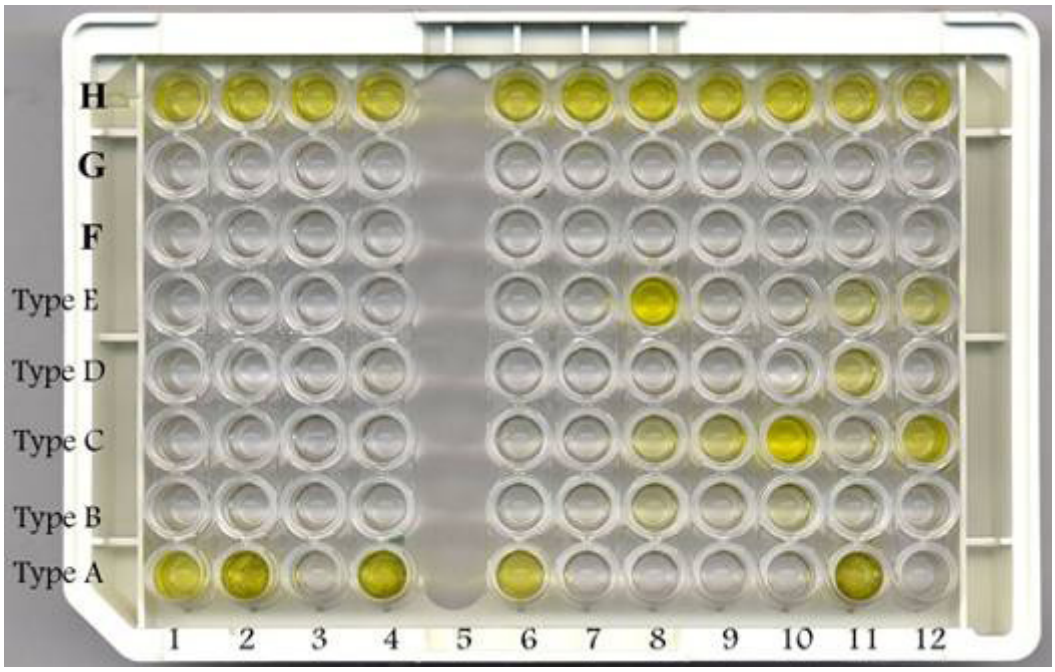
شکل ۳) شرایط بهینه سازی شده تشخیص ژن کامل entC در سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرئوس نشان داده شده است. در تصویر A؛ چاهک‌های ۱ الی ۱۲ قطعه تکثیر شده ۱۲۲۳bp را نشان داده است. چاهک ۱۴ راهنمای وزن مولکولی ۱kb است. تصویر B؛ چاهک‌های ۱ الی ۶ تسویه محصول PCR و آماده سازی آن جهت تعیین سکانس را نشان داده است. چاهک ۷ راهنمای وزن مولکولی ۱kb است.



شکل ۴) مقایسه سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس ژن استاندارد استافیلوکوکوس آرئوس موجود در بانک ژنی با کد X۰۵۸۱۵,۱ نشان داده شده است.



شکل۵) چنانچه مقایسه ترادف آمینواسیدی سکانس حاصل از این تحقیق با ترجمه سکانس ژن استاندارد entC۱ حاکی از آن است که ترادف اسید آمینه‌ای سکانس حاصل از این تحقیق از اسید آمینه ۴۶ الی ۳۲۱ تنها یک اختلاف در جایگاه اسید آمینه ۲۱۸ وجود دارد. در حقیقت در ژن تکثیر شده در این تحقیق اسید آمینه والین جایگزین اسید آمینه آلانین شده است.



شکل ۶) نتیجه واکنش الیزا توسط پلیت از قبل تهیه شده موجود در کیت RICASCREEN SET A,B,C,C,E ساخت شرکت آلمانی r-Biopharm نشان داده شده است. آزمون الیزا طبق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام و تصویر پلیت حاصل اسکن شده است. تصویر فوق نشان دهنده سطح زیرین پلیت می‌باشد.

در خصوص تشخیص تیپ های مختلف انتروتوکسین C تحقیقات متعددی انجام شده است. برخی از تحقیقات تولید و خالص سازی انتروتوکسین را مد نظر قرار داده و بسته به روش تخلیص اوزان مولکولی مختلفی برای آن گزارش کرده اند.

مشخص نیست و نمی‌توان نشان داد چرا یک سویه باکتریایی قادر است بیش ازیک انتروتوکسین را تولید نماید. در هر حال، توانایی تولید چند انتروتوکسین توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. چنانکه در سال ۲۰۰۹ میلادی Ifesan و همکاران نشان دادند، برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس بیش از یک انتروتوکسین تولید می‌نمایند [۲۶]. امروزه به منظور شناخت دقیق مکانیسم و نقش انتروتوکسینها و تعیین گیرنده‌های اختصاصی آن تحقیقات فراوانی انجام شده یا در حال انجام است. شاید یکی از دلایل تحقیقات گسترده در خصوص تشخیص و تعیین نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرئوس [۲۷] تحریک تولید انواع مختلف سایتوکاین‌ها از جمله: IL-۱ و TNF-α باشد [۲۸]. با توجه به این که؛ این سموم در ایجاد بیماری‌های مختلف دخالت دارند. از طرفی تشخیص آنها نیاز مند وجود سویه استاندارد بوده ولی خرید سویه استاندارد میسر نیست. به علاوه ممکن است با ویژگی های اکولوژیک این منطقه سازگاری نداشته باشد.

لذا، طراحی روش‌های استاندارد جهت تشخیص سریع سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین از اهمیت بسزایی برخوردار است. زیرا، تشخیص دقیق و درمان مناسب می‌تواند از عوارض بعدی این انتروتوکسین های سوپرآنتی‌ژن پیشگیری نماید. افزون بر این، در سال‌های اخیر با ظهور استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و ارتباط آن با افزایش پتانسیل توکسینزایی نگرانی‌هایی را ایجاد کرده است [۳۰ و ۲۹]. زیرا، تنوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌ها ضرورت پرداختن به توسعه روش‌های تشخیصی نوین و درمان مبتنی بر آن را اجتناب ناپذیر نموده است [۳۲ و ۳۱]. برخی از کشورها برای هریک از سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین روش‌های استاندارد طراحی و معیارهای لازم برای تشخیص سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین را در نمونه‌های مختلف مواد غذایی یا نمونه‌های بالینی ارایه داده اند. مثلاً مرکز نگهداری باکتری‌ها در امریکا (ATCC) برای تمام گروه‌های باکتریایی روش استاندار تعیین نموده است. به همین ترتیب، در سال ۱۹۹۳ میلادی Marr و همکاران ویژگی های تیپ های مختلف انتروتوکسین C را بررسی و برای هر یک از آنها تعداد ۲۴۰ اسید آمینه گزارش نمود. آنها نشان دادند ترادف ۱۰ اسید آمینه ابتدایی انتروتوکسین های آنها ESQPDPTPDE و ۱۰ اسید امینه انتهایی IEVHLTTKNG می‌باشد [۳۳]. در حقیقت سکانس ژن آنها حدود ۷۲۰ جفت باز را شامل می شد. برخی محققین دیگر قطعه ۸۲۰ جفت بازی را گزارش کرده اند. تحقیقات دیگری نیز وجود دارد که بخش هایی از توکسین را جهت تشخیص انتخاب کرده اند. مثلاً برخی پرایمری را طراحی نمونه که یک قطعه ۱۰۲ جفت بازی را تکثیر می نماید و یا پرایمری که قطعه ۲۸۳ جفت باز را تکثیر می کند. در تحقیقی دیگر پرایمری طراحی شده است که قطعه ۴۹۰ جفت بازی را تکثیر می نماید. چنانچه ملاحظه می گردد هیچ یک از قطعات گزارش شده نمی تواند نماینده قابل اعتمادی برای نشان دادن یکی از تیپ های انتروتوکسین C باشد

در این تحقیق با طراحی پرایمر تکثیر کننده یک قطعه ۱۲۲۳ جفت باز اقدام به ردیابی و استاندارد سازی تشخیص ژن انتروتوکسین C گردید. در حقیقت، از ابتدای سیگنال پپتید و ۲۵۰ جفت باز بعداز ژن مد نظر قرار گرفت. به این ترتیب قطعه ۱۲۲۳ جفت بازی تکثیر گردید. چنانچه در شکل ۴ نشان داده شده است از باز شماره ۹۲ الی ۱۰۵۷ در دستگاه سکانسینگ قابل خوانش بوده است. با آنکه مقایسه آن با ژن فرانس تنها در ۴ باز اختلاف را نشان می دهد اما ترجمه آن نشان داد که ۱۰ اسید آمینه اول آن از شماره ۶۵ شروع و تا ۳۰۴ ادامه یافته و تنها در یک اسید آمینه اختلاف وجود دارد. یعنی چنانچه در شکل ۵ نشان داده شده است در جایگاه ۲۰۸ اسید آمینه آلانین به جای والین قرار گرفته است. این امر حکایت از یک سکانس جدید و بومی این منطقه می باشد.

در هر حال به دلیل اهمیت بیماریزایی انتروتوکسین های استافیلوکوکوس آرئوس تحقیق در زمینه استاندارد سازی روش های نوین تشخیصی همچنان ادامه دارد. چنانکه، در سال ۲۰۰۷ میلادی فیشر و همکاران به منظور تشخیص انتروتوکسین های A و B با استفاده از سویه های استاندارد ATCC روش کمی real-time immuno-PCR طراحی و نشان دادند با این روش می توان به وجود این انتروتوکسین ها پی برد [۳۴]. موفقیت روش آنها در دسترس بودن سویه های استاندارد ATCC بوده است. به همین ترتیب در سال ۲۰۰۸ میلادی وراس و همکارانش نیز با طراحی پرایمر تکثیر کننده قطعه bp283 اقدام به شناسایی انتروتوکسین C نمودند [۳].

با توجه به اینکه دست یابی به سویه های استاندارد موجود جهانی با محدویت هایی همراه است. از طرفی ممکن است تغییرات جغرافیایی بر پایداری ویژگی‌های تعریف شده در نمونه استاندارد خارجی با شرایط منطقه‌ای سازگار نباشد. لذا، تعیین استانداردهای لازم برای تشخیص سویه‌های بومی استافیلوکوکوس آرئوس تولید کننده انتروتوکسین‌ها از جمله: انتروتوکسین C اجتناب ناپذیر است؛ زیرا، بروز تغییرات ژنتیکی در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس آرئوس گزارش شده است [۳۵]. از این رو، در این تحقیق، با استفاده از الگوی ژن رفرانس و طراحی پرایمر مناسب روشی جهت تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس تولید کننده انتروتوکسین C۱ طراحی و ارایه شده است. زیرا، تنها اتکا به کواگولاز مثبت بودن استافیلوکوکوس‌ها در نمونه‌های بالینی کافی نیست. چنانکه در شکل ۶ نشان داده شده است علی رغم وجود ژن entC توانایی سویه‌ها در تولید انتروتوکسین متفاوت است. لذا، این سوال مطرح می گردد که آیا باکتری که بیش از یک انتروتوکسین تولید نموده قدرت بیماری زایی و شدت آن یکسان است و آیا با درمان ثابت پاسخ یکسان وجود دارد؟ همچنین، برخی از سویه‌های کواگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های غذایی انواع مختلف انتروتوکسین‌ها را تولید نموده اند. با آنکه در گزارشات مختلف فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس تولید کننده انتروتوکسین متفاوت (۵/۳ تا ۸۸ درصد) گزارش شده است [۳۶-۳۹]، اما در کشور ما بدلیل نبود سویه استاندارد آمار دقیقی از بروز عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌های آرئوس تولید کننده انتروتوکسین C در دست نیست. در این تحقیق با استاندارد سازی روش تشخیص سویه تولید کننده انتروتوکسین C۱ زمینه بررسی‌های دقیق اپیدمیولوژیک در نمونه‌های بالینی و نیز در آلودگی‌های غذایی فراهم شده است. به این ترتیب به منظور انجام تحقیقات بیشتر سویه استاندارد شده در این تحقیق، آماده تحویل به سایر محققین می‌باشد.

تقدیر و تشکر: این طرح با بودجه پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات کاربرد درمانی توکسین‌های میکروبی طراحی و انجام شده است. بدین لحاظ نویسندگان از حمایت و پشتیبانی‌های استاد محترم دکتر مصطفی قانعی تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از دکتر محمد جواد سلطانپور و دکتر محمد رهبر جهت واگذاری سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بیمار تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular typing of nasal carriage isolates of Staphylococcus aureus from an Irish university student population based on toxin gene PCR, agr locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. J MeC Microbiol. 2008;57: 348-358.

2- Mandell L Gerlac, Bennett E John, Dolin Raphael. Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Churchill livingstone.2010;2:2543.

3- Veras JF, Do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA . A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int J Infect dis. 2008;12: 410-415.

4- Schlievert PM, Case LC: Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol. 2007;391:113-126.

5- Suenaga T, Suzuki H, Shibuta S, Takeuchi T, Yoshikawa N: Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki disease. J PeCiatr. 2009;155:266-270.

6- Van ZT, Vaneechoutte M, Holtappels G, Gevaert P, van CP, Bachert C: Detection of enterotoxin DNA in Staphylococcus aureus strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients. Am J Rhinol .2008;22:223-227.

7- Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC: [Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes]. Korean J Lab MeC. 2007;27: 118-123.

8- Crass BA, Berg Coll MS: Toxin involvement in toxic shock syndrome. J Infect Cis. 1986;153:918-926.

9- Wang X, Xu M, Zhang H, Liu J, Li X, Zhang. Enhancement of superantigen activity and antitumor response of staphylococcal enterotoxin C2 by site-directed mutagenesis. Cancer Immunol Immunother. 2009, 58:677-686.

10- Xu M, Wang X, Cai Y, Zhang H, Yang H, Liu C et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity and low toxicity. Cancer Immunol Immunother. 2011;60:705-713.

11- Wan XC, Liu CP, Li M, Hong D, Li DM, Chen HX. Staphylococcal enterotoxin C injection in combination with ascorbic acid promotes the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2008;373:488-492.

12- Cui JC, Zhang BJ, Lin YC, Wang QK, Qian AD, Nakane A: Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against Staphylococcus aureus-induced bovine mastitis. Vet Immunol Immunopathol. 2010;135:64-70.

13- Zaraket H, Otsuka T, Saito K, Dohmae S, Takano T, Hi guchi W. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission. Microbiol Immunol. 2007;51:171-176.

14- Collery MM, Smyth DS, Tumilty JJ, Twohig JM, Smyth CJ. Associations between enterotoxin gene cluster types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. 2009;58:13-25.

15- Bayles KW, IanColo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin C. J Bacteriol. 1989;171:4799-4806.

16- Giezendanner N, Meyer B, Gort M, Muller P, Zweifel C. Raw milk-associated Staphylococcus aureus intoxication in children. Schweiz Arch TierheilkC. 2009;151:329-331.

17- Beckers HJ, Van Leusden FM, Tips PD. Growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus in shrimp. J Hyg (Lond).1985;95:685-693.

18- Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Izadi M, Hosseini SMJ, Ataee MH. Bacterial meningitis: a new risk factor. JRMS. 2011; 16:207-210.

19- Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Gotz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. Int J FooC Microbiol. 2008;127:246-251.

20- Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. J Am Acad Dermatol. 2005;53:67-72.

21- Malam JE, Carrick GF, Telford DR, Morris JA. Staphylococcal toxins and sudden infant death syndrome. J Clin Pathol. 1992;45:716-721.

22- Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and USA. Vet Microbiol. 2002; 85: 61-67.

23- Limbago B, Fosheim GE, Schoonover V, Crane CE, Nadle J, Petit S. Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected in 2005 and 2006 from patients with invasive disease: a population-based analysis. J Clin Microbiol. 2009;47:1344-1351.

24- Gould IM, Girvan EK, Browning RA, MacKenzie FM, Edwards GF. Report of a hospital neonatal unit outbreak of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Epidemiol Infect. 2009;137:1242-1248.

25- Sombrok Joseph, and Rufell W David. Molecular Cloning. Coldspring New York. 3rd ed. 2001; Vol 1: 6.4.

26- Ifesan BO, Voravuthikunchai SP: Effect of Eleutherine Americana Merr. extract on enzymatic activity and enterotoxin production of Staphylococcus aureus in broth and cooked pork. Foodborne Pathog Dis. 2009;6:699-704.

27- Seishima M, Kato G, Shibuya Y, Matsukawa S: Cytokine profile during the clinical course of toxic shock syndrome. Clin Exp Dermatol. 2009;34:632-635.

28- Hu DL, Cui JC, Omoe K, Sashinami H, Yokomizo Y, Shinagawa K: A mutant of staphylococcal enterotoxin C devoid of bacterial superantigenic activity elicits a Th2 im

mune response for protection against Staphylococcus aureus infection. Infect Immun. 2005;73:174-180.
29- Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML, Leung DY: Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2010;125:39-49.
30- Strandberg KL, Rotschafer JH, Vetter SM, Buonpane RA, Kranz DM, Schlievert PM: Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. J Infect Dis. 2010;202:1690-1697.
31- Varshney AK, Wang X, Cook E, Dutta K, Scharff MD, Goger MJ. Generation, characterization, and epitope mapping of neutralizing and protective monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. J Biol Chem. 2011;286:9737-9747.
32- Hallin M, De MR, Denis O, Lefort A, El GF, Butaye P et al. Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant Staphylococcus aureus strains. Infect Genet Evol. 2011; 11: 290-299.
33- Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Lupher M, Davis WC, Boha GA Characterization of Novel Type C Staphylococcal Enterotoxins:Biological and Evolutionary Implications.Infection and Immunity. 1993;61(10):4254-4262.
34- Fischer A, von Eiff C, Kuczius T, Omoe K, Peters G and Becker K. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. J Mol Med. 2007;85:461–469.
35- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. 2006; 367:731-739.
36- Humphreys H, Keane CT, Hone R, Pomeroy H, Russell RJ, Arbuthnott JP. Enterotoxin production by Staphylococcus aureus isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. J Med Microbiol. 1989; 28: 163-172.
37- Normanno G, Corrente M, La SG, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol. 2007;117:219-222.
38- Gonano M, Hein I, Zangerl P, Rammelmayr A, Wagner M. Phenotypic and molecular characterization of Staphylococcus aureus strains of veterinary, dairy and human origin. Epidemiol Infect. 2009;137:688-699.
39- Peeva T, Gogov I. Presence of enterotoxin D in Staphylococcus aureus strains isolated from food products. Vet Med Nauki. 1983;20:67-71.