

شناسایی ژن های Seh، TSST-1 و Cna و مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی

زهره کرد^۱، کیومرث امینی^{۲*}

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۳

چکیده

مقدمه: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای توکسین های متعدد با عملکردهای متفاوت از جمله پروتئین های متصل شونده به کلاژن (cna)، توکسین TSST-1 و انتروتوکسین Seh می باشد. ادهزین (cna) استافیلوکوکوس اورئوس مسئول اتصال به کلاژن و عمده ترین فاکتور حدت در عفونت های آرتریت و استئومیلیت می باشد. توکسین TSST-1 عامل سندرم شوک سمی و توکسین Seh موجب مسمومیت غذایی می گردند. هدف مطالعه حاضر، بررسی حضور ژن های انتروتوکسین و حدت در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی به روش Multiplex PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۷ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید. آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI با آنتی بیوتیک هایی مختلف انجام گردید. آزمون PCR چندگانه نیز مطابق برنامه انجام شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های ونکومايسين و لینزولید به میزان ۹۷/۱ درصد و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک کلیندامایسین ۲۳/۹ درصد می باشد. فراوانی ژن cna در نمونه های بالینی ۴۱/۷۹ درصد و ژن TSST-1 ۸/۹۵ درصد گزارش گردید، در صورتی که ژن Seh در هیچ یک از نمونه ها شناسایی نگردید.

بحث و نتیجه گیری: به دلیل اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در تولید توکسین های مختلف و مهم ترین عامل مسمومیت، با توجه به افزایش روزافزون مصرف مواد غذایی آماده طبخ خطر جدی سلامت جامعه را تهدید می نماید. نتایج نشان داد که فراوانی ژن های بیماریزای cna و TSST-1 در نمونه های بالینی شایع تر بوده است.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، سندرم شوک سمی، انتروتوکسین، آنتی بیوگرام، PCR چندگانه ای

*نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس بر روی غشاهای مخاطی و پوست پستانداران، مواد غذایی مختلف و محیط اطراف یافت می شود و عامل ایجاد ذات الریه بعد از عفونت های ویروسی، التهاب وریدها؛ مننژیت، عفونت دستگاه ادراری؛ التهاب موضعی استخوان ها، اندوکاردیت، ضایعات سطحی پوست و غیره می باشد (۲). این باکتری دارای توکسین های متعدد بوده که با عملکردهای مختلف بر روی اندام هدف تاثیر می گذارند و به همین دلیل در دهه های گذشته وقوع بیماری های ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی، بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است. به نظر می رسد که اصولاً انتقال افقی ژن های حدت، غالباً به واسطه پلاسمیدها، ترانسپوزون ها، توالی های الحاقی، جزایر بیماری زا و باکتریوفاژها باشد (۱). توکسین های تولید شده توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای فعالیت سوپر آنتی ژنی بوده که اثرات متعددی در میزبان ایجاد می نمایند (۸). اغلب استافیلوکوک هایی که از مبتلایان به سندرم شوک سمی جداسازی شده اند، توکسین (TSST-1) را تولید می کنند. این سم موجب بروز تب، شوک، بثورات پوستی پوسته ریزی دهنده می شود. حضور استافیلوکوکوس اورئوس در شیر مصرفی به علت توانایی ارگانیزم در تولید انتروتوکسین و توکسین سندرم شوک توکسیک (TSST-1) ممکن است تا حدودی برای مصرف کننده خطرناک بوده و موجب مسمومیت غذایی شدید گردد. این سم با ایجاد مقاومت در مقابل فاگوسیتوز قدرت تهاجمی استافیلوکوک را افزایش داده و با حضور در گردش خون، جذب بافت ها شده و علائم بالینی را در بافت های مختلف موجب می شود که شامل تب، کاهش فشارخون اسهال، درد عضلانی و بثورات شبه مخملی است (۹،۱۰). استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم ترین عوامل بیماری زا است که باعث مسمومیت غذایی شده و هر ساله تعدادی به این بیماری مبتلا می شوند، به طوری که به عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم این بیماری ها محسوب می شود (۲). استافیلوکوکوس

اورئوس دارای نوزده نوع انتروتوکسین و ژن های مرتبط با آن ها می باشد (۳،۴). میزان فراوانی ژن های انتروتوکسین بر حسب این که منشأ باکتری مولد انتروتوکسین حیوان، انسان، عفونت، غذا یا محیط باشد، متفاوت است. این امر در گزارش محققان قابل مشاهده است (۵،۶). انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس از جمله Seh توانایی ایجاد بیماری های مختلفی از جمله مسمومیت غذایی و ایجاد آلرژی و بیماری های خود ایمنی می باشند (۷). انتروتوکسین استافیلوکوک ها مقاوم به حرارت بوده و روش های مختلف پاستوریزاسیون بر روی آن هیچ تاثیری ندارد. عوامل ثانویه آلوده کننده غذا از جمله استافیلوکوک های مولد انتروتوکسین کلونیزه شده در حفره های بینی و دهان کارگران شاغل در کارخانجات تولید محصولات غذایی، به مواد غذایی مانند شیر راه یافته و موجب آلودگی این محصولات می گردند. البته شیر به طور اولیه از گاو مبتلا به ورم پستان نیز می تواند آلوده گردد. مصرف چنین شیرهایی به صورت خام بسیار خطرناک بوده و از همین طریق می توانند سایر فرآورده های لبنی مثل پنیر، خامه، بستنی را آلوده نمایند (۱۰). بافت های غنی از کلاژن مانند استخوان ها و غضروف جایگاه مناسبی برای حضور استافیلوکوکوس اورئوس و ایجاد عفونت های استافیلوکوکی می باشد. پروتئین های متصل شونده به کلاژن (cna) اصلی ترین و مهم ترین آدهزین استافیلوکوکوس اورئوس است که مسئول اتصال محکم به کلاژن بوده و عمده ترین فاکتور حدت در عفونت های آرتریت همراه با سپتی سمی و استئومیلیت می باشد. حضور ژن Cna به عنوان یک آدهزین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مثبت می تواند در ایجاد ضایعات و آسیب های مفصلی و استخوانی در بیمارانی که آلوده به این باکتری هستند در مقایسه با افراد مبتلا ولی Cna منفی نقش مهمی ایفا می نماید (۱۱-۱۳). در تحقیقاتی که سال ۲۰۱۱ انجام گرفت مشخص گردید میزان فراوانی ژن های can، Seh بیشتر از ژن TSST-1 در بین نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین می باشد (۱۶). تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده یکی از راه های مهم در درمان

مناسب و صحیح بیماری های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و جلوگیری از ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها می باشد (۱۴). هدف از انجام این تحقیق شناسایی حضور ژن های انترتوکسین و حدت can, TSST-1, Seh در سویه های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی به روش Multiplex PCR و هم چنین بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های بالینی جداسازی شده بوده است.

مواد و روش ها

جمع آوری و کشت نمونه ها: برای انجام مطالعه حاضر که مطالعه توصیفی-مقطعی می باشد، تعداد ۱۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری، ترشحات چرکی، اسپیراسیون تراشه، و مایع مغزی نخاعی از مراکز درمانی جنوب تهران از مرداد تا مهرماه سال ۱۳۹۲ جمع آوری گردید. این نمونه ها جهت کشت بر روی محیط های بلاد آگار، مانیتول سالت آگار، و کروم آگار استافیلوکوکوس اورئوس به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه قرار داده شد. جهت تعیین هویت گونه های باکتری از آزمون های بیوشیمیایی از جمله تست کوآگولاز، تخمیر مانیتول، تست DNase استفاده شد که در نهایت ۶۷ جدایه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی گردید.

آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: جهت انجام آزمون آنتی بیوگرام از روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به روش کربی بائر و بر طبق دستورالعمل (Clinical and Laboratory Standards CLSI institute) استفاده گردید (۱۵). دیسک های آنتی بیوتیک تجاری جهت انجام این مطالعه شامل آزیترومایسین، کلیندامایسین، لینزولید، اوفلوکساسین، تیکوپلانیل، ونکومایسین، متی سیلین، (دالفرپرستین/کوبینوپرستین) از شرکت هایمدیا (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) تهیه گردید. جهت کنترل کیفی آزمون، از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت باکتری های گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881614) استفاده گردید. برنامه زمانبندی حرارتی آزمون Multiplex-PCR در جدول شماره ۲ و پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول شماره ۱ ذکر شده است (۱۶). مخلوط Master mix مورد استفاده شده جهت انجام واکنش ملکولی در این آزمون، شامل مقادیر زیر می باشد: Master Mix سیناژن (PR8251C) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر ۷/۵ میکرولیتر، پرایمرهای ۰/۵ μ M هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، نمونه DNA ۱ μ g ۳ میکرولیتر، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه ترموسایکلر (TECHNE) انجام شد. جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انتقال و بعد از رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت. داده های آماری با نرم افزار SPSS vol.13 استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته های پژوهش

این تحقیق که بر روی ۶۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت. میزان حساسیت سویه های مختلف به آنتی بیوتیک های مورد استفاده در جدول شماره ۳ ذکر شده است. مطابق نتایج بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک ونکومایسین و لینزولید به میزان ۹۷/۱ درصد و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک کلیندامایسین ۲۳/۹ درصد فراوانی گزارش شده است. هم چنین سویه ای که به همه آنتی بیوتیک ها حساس و یا مقاوم باشد مشاهده نگردید. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه در بین نمونه های جمع آوری شده بیشتر از میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها می باشد. نتایج Multiplex-PCR نشان داد که ژن (TSST-1)، در ۶ نمونه (۸/۹ درصد) و ژن Cna در ۲۸ نمونه به میزان ۴۱/۷ درصد گزارش شده، در صورتی که ژن seh در هیچ یک از جدایه ها شناسایی نگردید (نمودار شماره ۱). نتایج آزمون Multiplex-PCR بر روی ژل آگارز در شکل شماره ۱ بر اساس

شناسایی ژن های مورد نظر با طول باند ذکر شده است.

جدول شماره ۱. ترادف پرایمرهای تحقیق حاضر به روش Multiplex-PCR (۱۶).

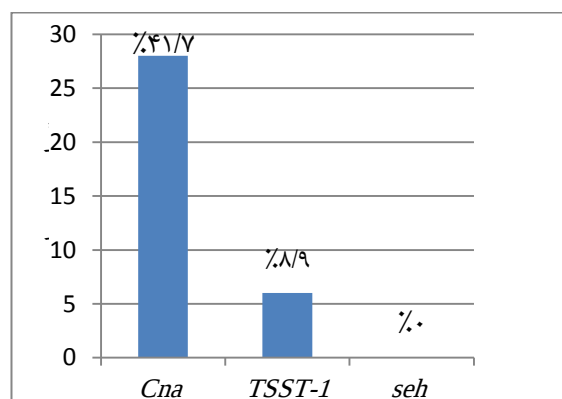
پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	طول محصول PCR (bp)
Cna-1	ACACCAGACGGTGCAACAATTA	۸۱۵
Cna-2	AGCATTACCGTTTGCATCTGTTA	
Seh-F	ATTCACATCATATGCGAAAGCAG	۵۵۵
Seh-R	ATGTCGAATGCGTAATCTCTAG	
TSST-F	TGATATGTGGATCCGTCAT	۳۸۷
TSST-R	AAACACAGATGGCAGCAT	

جدول شماره ۲. برنامه حرارتی برای انجام واکنش Multiplex-PCR

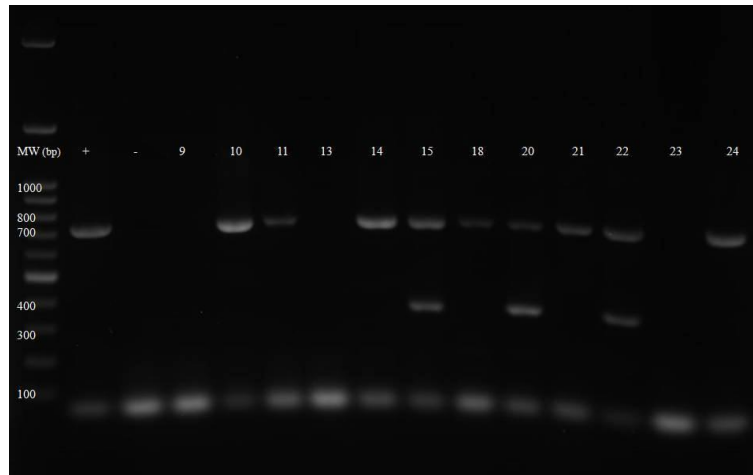
مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه	۹۴	۴	۱
واسرشت سازی	۹۴	۲	
الحاق	۵۸	۱	۳۱
بسط	۷۲	۲	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

جدول شماره ۳. میزان حساسیت سویه های جداسازی شده به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی بیوتیک ها	مقاوم (%) تعداد	نیمه حساس (%) تعداد	حساس (%) تعداد
کلیندامایسین	۲۳/۹ (۱۶)	-	۷۶/۱ (۵۱)
ونکوماایسین	۲/۹ (۲)	-	۹۷/۱ (۶۵)
تیکوپلانتین	۴/۵ (۳)	-	۹۵/۵ (۶۴)
لینزولید	۲/۹ (۲)	-	۹۷/۱ (۶۵)
افلوکساسین	-	۱۴ (۲۰/۹)	۵۳ (۷۹/۱)
آزیترومایسین	۲۰/۹ (۱۴)	-	۷۹/۱ (۵۳)
متی سیلین	۲۰/۹ (۱۴)	-	۷۹/۱ (۵۳)
دالفوپریستین / کونوپریستین	۴/۵ (۳)	-	۹۵/۵ (۶۴)



نمودار شماره ۱. توزیع فراوانی ژن های مورد مطالعه بر حسب تعداد و درصد



شکل شماره ۱. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز
نتایج M-PCR از سمت چپ به ترتیب: ستون مارکر ۱۰۰ bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با دو باند مربوط به دو پرایمر *cna* و *TSST-1*

بحث و نتیجه گیری

مطابق نتایج به دست آمده در این تحقیق مشخص گردید که میزان حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده بیشتر از میزان مقاومت بوده که بالطبع در میزان بروز ژن های حدت تاثیر گذار می باشد. این امر می تواند موید این مطلب باشد که اولاً سرانه مصرف آنتی بیوتیک نسبت به سایر نقاط کمتر بوده، ثانیاً میزان بروز عفونت های بیمارستانی با توجه به رعایت استانداردهای بهداشتی در جهت ایجاد سویه های مقاوم کمتر می باشد. در مطالعه ای که طی سال های ۸۷-۱۳۸۶ با روش دیسک دیفیوژن انجام شد مشخص گردید که (۷۹ درصد) نمونه ها استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین می باشند (۱۸). با توجه به مطالعات انجام شده درباره مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس محققین بر این باورند که استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی از مهم ترین عوامل بیماریزای بیمارستانی در سریلانکا محسوب می شود (۱۷). در صورتی که در مطالعه حاضر میزان حساسیت به متی سیلین از میزان مقاومت به آن بیشتر بوده است. در تحقیق سال ۲۰۰۹ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از طریق انتشار دیسک و PCR مشخص گردید که سویه های مقاوم به متی سیلین این باکتری بیشترین عامل مرگ و میر در بیمارستان

ها و مراکز درمانی است. لذا درمان و شناسایی سریع سویه های مقاوم به متی سیلین دارای اهمیت می باشد (۱۹). این نتایج با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت کمتری داشت، زیرا در مطالعه حاضر، افراد مقاوم به آنتی بیوتیک متی سلین و آزیترامایسین حدود ۲۰/۹ درصد و مقاومت به کلیندامایسین حدود ۲۳/۹ درصد مشاهده شد. هم چنین در مطالعه حاضر کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها به آنتی بیوتیک ونکومایسین و لینزولید ۲/۹ درصد (بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی) گزارش شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که با توجه به الگوی به دست آمده تنها ۲ سویه نسبت به ونکومایسین از خود مقاومت نشان داده و مشخص گردید که این آنتی بیوتیک هنوز کارایی لازم برای درمان عفونت های حاصل از سویه های MRSA مقاوم به متی سیلین را دارا بوده، ولی نبودن کارایی این آنتی بیوتیک یک علامت هشدار، برای یافتن آنتی بیوتیک های جدید و کارآمدتر می باشد. از مجموع ۶۷ نمونه بالینی، تعداد نمونه های حاوی ژن *cna* و ژن *TSST-1* به نسبت شایع تر بوده و در هیچ کدام از نمونه های بالینی، ژن *seh* مشاهده نگردید. با توجه به شایع بودن این ژن ها استفاده از واکسن های حاوی پروتئین های سطحی تخلیص شده موثر در اتصال استافیلوکوکوس اورئوس در انسان می تواند محافظت کننده باشد. این واکسن ها

می توانند اتصال باکتری را مهار کرده و در نتیجه بیگانه خواری باکتری متصل نشده را افزایش دهند (۱۲). ژن cna در استقرار بافتی در شرایط پاتولوژیکی گوناگون مثل کراتیت چشم، استئومیلیت، آرتريت سپتیک و عفونت های استافیلوکوکی موثر هستند. هم چنین حضور ژن Cna به عنوان یک آدهزین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس Cna مثبت می تواند در ایجاد ضایعات و آسیب های مفصلی و استخوانی در بیمارانی که آلوده به این باکتری هستند در مقایسه با افراد مبتلا ولی Cna منفی نقش مهمی ایفا نمایند (۱۲، ۲۳). ژن Seh از انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه در این تحقیق است که باعث مسمومیت غذایی شده و در انسان تهوع، استفراغ به ندرت اسهال و درد های شکمی و عضلانی ایجاد می کند. با مطالعاتی که توسط محققان مختلف در مورد عدم بروز این ژن صورت گرفته نشان دهنده اختلاف در پراکندگی ژن های موثر در تولید انتروتوکسین در بین جدایه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس می باشد، که این امر احتمالاً از تفاوت های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشأ اکولوژیکی سویه های جدا شده ناشی می شود. هم چنین الگوی عفونت استافیلوکوکوس اورئوس اغلب از جامعه ای به جامعه دیگر متفاوت است و این الگو می تواند به تفاوت های بین سویه ای، تفاوت در منبع نمونه، ویژگی های جغرافیایی، خصوصیات میزبان و بافت مربوط بستگی داشته باشد (۲۰). در مطالعه شناسایی ژن های حدت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (cna، seh، PVL، TSST-1) در سال ۲۰۱۱ میزان فراوانی ژن cna (۵۱/۵۹ درصد)، ژن seh (۲۱/۸۲ درصد)، PVL (۱۰/۲۳ درصد) و TSST-1 (۶/۸۲ درصد) گزارش گردید (۱۶). این اختلافات در میزان شیوع ژن cna می تواند ناشی از مقاومت های جغرافیایی و شرایط محیطی باشد (۱۱). در ایران سال ۲۰۰۷، طی مطالعه ای مشخص گردید که ۴۵ درصد جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از

بیماران پوستی توانایی تولید انتروتوکسین را دارا بودند (۲۱). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت های زخم، ۷۴ درصد نمونه ها حاوی ژن انتروتوکسین بودند (۲۲). یکی از نکات قابل توجه پژوهش حاضر این است که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات متعددی در سطح جهان هم خوانی دارد، اما با نتایج بعضی از مطالعات انجام یافته دیگر، متفاوت می باشد که تفاوت در میزان شیوع می تواند مربوط به موارد تفاوت در جمعیت مورد مطالعه، تفاوت در نحوه نمونه برداری و روش کشت، تفاوت در نوع نمونه های بالینی، تفاوت در میزان نمونه مورد بررسی، تفاوت در محل نمونه گیری، تفاوت در منشأ نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس باشد. در سایر مطالعات ثابت شده است که فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده انتروتوکسین بر اساس منشأ انسانی، حیوانی، مواد غذایی، نوع عفونت و محیط اطراف متفاوت است (۲۳، ۲۴). با توجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد مسمومیت غذایی و نقش توکسین های متنوع تولید شده توسط این جرم در ایجاد بیماری در انسان و عدم وجود اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود ژن های توکسین زا و حدت این مطالعه انجام گرفت. از این رو انجام مطالعات جامع و کامل در ارتباط با قابلیت ژنتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس به لحاظ داشتن پروتئین های سطحی امری ضروری به نظر می رسد و این فاکتورهای ویروالانس در سویه های مهاجم بیشتر یافت می شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد به ویژه مهندس ابوالفضل مقدم و رامین خاکی جوان و دکتر علی رضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق همکاری داشتند تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Razavilar V. Microbial Pathogenes in Food and Epidemiology of Food Borne Intoxication. 1th ed. Tehran University Publication 2003. P.5-30. (Persian)
2. Adwan G, Abushanab B, Adwan K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk in the North of Palestine. Turk J Biol 2005;29:229-32.
3. Ertas N GZ, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int J Food Microbiol 2010;15:74-7.
4. Nowroozi J GG, Pakzad P, Razavipour R. [Isolation and detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A-E and TSSst-1 genes from different sources by PCR method]. J Qom Uni Med Sci 2012;6:22-6 (Persian).
5. Salarisharif A, Sattari M, Moradi M, Shahrokhahad R. [Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin genes A and B in clinical samples of the patients referring to the medical centers of Kerman and Rafsanjan cities by PCR technique]. J Rafsanjan Uni Med Sci 2012 15;11:128-36 (Persian).
6. Barati BSM, Bahmani M Kh. Isolation and detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus type A by multiplex PCR. Mil Med J 2006;8:119-28.
7. Naomi BAR. Review Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000;61:1-10.
8. Schlievert PMCL. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol 2007;391:113-26.
9. Ahani N, Alipoureskandani M. [Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Schizothorax zarudnyi using PCR method]. Zahedan J Res Med Sci 2014;16:29-31. (Persian)
10. Ahari H, Shahbazzadeh D, Misaghi A. Selective amplification of SEA SEB and SEC genes by multiplex PCR for rapid detection of Staphylococcus aureus. Pakistan J Nutr 2009;8:1224-8.
11. Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski L, Wiberg K, Lindberg M, et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding a Staphylococcus aureus collagen adhesin. J Biol Chem 1992;267:4766-72.
12. Montanaro L, Renata Arciola C, Baldassarri L, Borsetti E. Presence and expression of collagen adhesin gene and slime production in Staphylococcus aureus strains from orthopaedic prosthesis infections. Biomaterials 1999;20:1945-9.
13. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant Staphylococci. J Clin Microbiol 2006;44:1141-4.
14. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Sci Busi Med 2008;6:23-7.
15. Forster H, Marotta JS, Heseltine K, Milner R, Jani S. Bactericidal activity of antimicrobial coated polyurethane sleeves for external fixation pins. J Orthop Res 2004;22:671-7.
16. Sapri HF, Sani NAM, Noordin A, Neoh HM, Hussin S. Virulence gene typing of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) isolates in Universiti Kebangsaan Malaysia medical centre. Asia Pac J Mol Med 2011;4:1-4.
17. Gunawardena ND, Thevanesam V, Kanakaratne N, Abeysekera D, Ekanayake A, Perera N. Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in Staphylococcus aureus. Sri Lankan J Infect Dis 2012;2:18-29.
18. Razinbahrām SM, Thaghavi N, Haghighi M, Forumand M. [Determine the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection Imam Hussein hospital in the years 1386- 87]. Pajohandeh Med J 2009;5:263-7. (Persian)
19. Najarpeerayeh S, Azimian A, Mostafae M, Siadat SD. [Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion method, determination of MIC and PCR for mecA gene]. Modares J Med Sci Pathobiol 2009;12:61-9 (Persian)
20. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol Cell Probes 2005;19:299-305.

21. Imanifooladi A, Sattari M, Peerayeh SN, Hassan Z, Hossainidoust S. Detection the *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from skin infections in hospitalized patients. *Pakistan J Biol Sci*20007;10:502-5.
22. Anvari S, Sattari M, Forozandehemoghadam M, Najarpeerayeh S, Imanefouladi A. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. *Res J Biol Sci* 2008;3:826-29.
23. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Voneiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol*2003;41:1434-9.
24. Mehrotra M, Wang, G, Johnson, WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliativetoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*2000;38:1032-5.
25. Vandenberg MF, Yzerman, EP, Vanbelkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol*1999;37:3133-40.

Determining Genes *Seh*, TSST-1, *Can* and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains isolated from Clinical Specimens

Kord Z¹, AminiK^{*2}

(Received: September 6, 2015)

Accepted: October 25, 2015)

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a toxin variety of different functions. Collagen-binding protein (*cna*) is adhesion *Staphylococcus aureus* responsible for binding to collagen and the major virulence factor in arthritis and osteomyelitis an infection. *Staphylococcus aureus* is a major cause of food poisoning in the world. These toxins cause toxic shock syndrome, food poisoning that genes TSST-1, *Seh* are responsible for these effects. The purpose of this study was to investigate the presence of virulence genes in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples by Multiplex PCR and antibiotic resistance.

Materials & methods: In this cross-sectional study, a total of 67 samples were isolated of *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial susceptibility testing was carried out by disk diffusion method according to CLSI guidelines with different

antibiotics. Multiplex PCR test was performed in accordance with protocol.

Findings: The results showed that the susceptibility to vancomycin and linezolid antibiotic 97.1% and maximum resistance to the antibiotic clindamycin 23.9%. Frequency *Can* gene and TSST-1 gene was reported in clinical samples 41.79%, 8.95%, respectively. As well as, *Seh* gene was not detected in any of the samples.

Discussion & conclusions: Because of the importance of *Staphylococcus aureus* in the production of various toxins poisoning, due to the increasing use of food ready to cook serious danger threatening public health. The results showed that the prevalence is common of pathogenic genes *cna* and TSST-1 in clinical samples.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Toxic shock syndrome, Enterotoxin, Antibigram, Multiplex-PCR

1. Dept of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

* Corresponding Author Email: kamini@iau-saveh.ac.ir