JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره اول، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۰: ۳۸-۲۷

بررسی شیوع جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین در نمونه‌های مخازن جمع آوری شیر در شهر ماکو

محمد رضا صادقی[1]*

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو، ماکو، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶ دی ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

بیماری‌های ناشی از مواد غذایی یکی از نگرانی‌های اصلی سازمان غذا و دارو و سازمان بهداشت جهانی محسوب می‌شود. تا به امروز بیش از ۲۵۰ نوع بیماری مرتبط با مواد غذایی توصیف شده و باکتری ها مسئول دو سوم موارد این بیماری‌ها هستند. یکی از شایع ترین بیماری‌های ناشی از مواد غذایی، مسمومیت غذایی باکتریال است که معمولا با مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری‌های توکسین زا مرتبط است. در بین باکتری های عامل مسمومیت غذایی، استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل مسمومیت غذایی در دنیا محسوب می شود. شیر و محصولات لبنی شایع ترین مواد غذایی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیرگاو وگوسفند شهر ماکو انجام شد. در این مطالعه در مجموع ۱۷۸ نمونه شیر شامل۹۲ نمونه شیر گاو و ۸۶ نمونه شیرگوسفند از مخازن جمع آوری شیر نمونه گیری شد. ۷۶ جدایه از نمونه‌های شیر، به ترتیب با روش‌های آگلوتیناسیون لاتکس معکوس (RPLA) و PCR چندگانه از نظر تولید انتروتوکسین و حضور ژن های مرتبط مورد آزمایش قرار گرفتند. به ترتیب از ۴۴ و ۳۲ جدایه از نمونه‌های شیرگاو و گوسفند، ۱۹ (۴۳/۱٪) و ۱۳ (۴۰/۶٪) جدایه تولید کننده انتروتوکسین بودند. SEA، SED و SEC شایع ترین توکسین‌های شناسایی شده در تمامی جدایه‌ها بود. شیوع انتروتوکسین‌های کلاسیک و ژن های مربوطه در هر دو روش RPLA و Multiplex PCR تطابق ۹۱/۱٪ را در تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده نشان می‌دهد. عدم تطابق در دو جدایه sea مثبت که فاقد توانایی تولید SEA بودند، و جدایه ای با توانایی تولید SEA/SEC که فقط دارای ژن sec بود، مشاهده شد. این مطالعه حاکی از شیوع بالای جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیرگاو و گوسفند شهر ماکو می باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، تولید کننده انتروتوکسین، مخازن جمع آوری شیر، ماکو*

* نویسنده مسئول: محمدرضا صادقی

آدرس: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو، ماکو، ایران. تلفن: ۰۴۶۲۳۲۷۹۹۰۰

پست الکترونیک: phdmohammadreza@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل مسمومیت غذایی در انسان، و یکی از مهمترین عوامل سببی تورم پستان در گاوها می باشد (۴ و ۱۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* شیر را از طریق ترشح مستقیم از غدد پستانی دچار تورم بالینی یا بدون علامت استافیلوکوکی و یا از طریق آلودگی با منابع دیگر، آلوده می کند. شیر و محصولات لبنی حاصل از شیر، عمده‌ترین مواد غذایی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند (۱۲). شایع‌ترین انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی شامل انواع SEA، SEB، SEC، SED و SEE می باشد که تحت عنوان انتروتوکسین‌های کلاسیک توصیف شده اند (۷). در دهه ۱۹۷۰ انتروتوکسین های استافیلوکوکی جدیدی تحت عنوان انتروتوکسین‌های غیرکلاسیک شامل SEG، SEH، SEI و SEJ نیز گزارش شده و ژن های مربوطه نیز شناسایی و توصیف شده اند (۳۱). اخیراً ژن های جدیدی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی شامل *sek*، *sel*، *sem*، *sen*، *seo*، *sep*، *seq*، *ser* و *seu* نیز شناخته شده اند (۲۰)، اما نقش انتروتوکسین‌های غیرکلاسیک و ژن های اخیراً شناسایی شده در ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بخوبی مشخص نشده است (۸). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی A، B، C، D، و E، مسئول ۹۵٪ اپیدمی‌های مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بوده و انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی جدیداً توصیف شده ممکن است با ۵٪ موارد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی مرتبط باشند (۶). اما میزان شیوع جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین، و همچنین شایع‌ترین تیپ‌های سرولوژیکی مربوط به انتروتوکسین‌های شناسایی شده در کشورها و مناطق مختلف، در بین مطالعات متعددی که بر روی نمونه‌های شیرگاو و گوسفند صورت گرفته، بسیار متفاوت است (۲۲، ۲۷، ۲۸ و ۲۹). تشخیص مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، براساس علائم بالینی و تشخیص سم در مواد غذایی می‌باشد (۱۷). چندین کیت تجاری بر اساس روش‌های ایمونواسی شامل الایزا، ایمونودیفیوژن، آگلوتیناسیون لاتکس از جمله Staphylococcal Enterotoxin-Reverse Passive latex Agglutination (SET-RPLA)، بصورت روتین برای تشخیص انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار گرفته است. اما این روش‌ها فقط قادر به تشخیص انتروتوکسین‌های کلاسیک A-E بوده و حساسیت پایینی دارند. اما پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکنیک‌های مولکولی و در دسترس بودن اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن های انتروتوکسین، منجر به استفاده معمول از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز Polymerase Chain Reaction (PCR) برای تشخیص انواع انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی شده است (۱۷). شیر سوبسترای خوبی برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و تولید انتروتوکسین می‌باشد. علاوه بر این انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت استافیلوکوکی فعالیت بیولوژیک خود را حتی پس از پاستوریزاسیون حفظ کرده و حتی موارد متعددی از مسمومیت غذایی ناشی از مصرف شیر پاستوریزه شده و شیر خشک بویژه در نوزادان گزارش شده است (۳). با توجه به اهمیت این مسئله در سلامت انسان، انجام مطالعات وسیع، به منظور تخمین شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی خصوصاً شیر و محصولات لبنی ضروری است. با توجه به مطالب مذکور، این مطالعه به منظور بررسی شیوع جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و جدایه‌های تولیدکننده

Archive of SID

www.SID.ir

انتروتوکسین و توزیع انواع انتروتوکسین‌های کلاسیک و ژن‌های *sea، seb، sec، sed، see، seg، seh، sei* و *sej*، درنمونه‌های شیرگاو وگوسفند شهر ماکو در نظر گرفته شد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه و شناسایی جدایه‌ها

در این مطالعه هشت دامداری در حومه شهر ماکو واقع در استان آذربایجان غربی مورد مطالعه قرار گرفتند. حجم ۱۵۰ میلی لیتر از ۱۷۸ تانک انتقال شیر، مشتمل بر ۹۲ تانک شیرگاو و۸۶ تانک شیرگوسفند، در کیسه‌های پلاستیکی استریل جمع آوری و تحت شرایط سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از رسوب حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۳۵۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه، بر روی محیط بردپارکر(OXOID) حاوی ۵٪ امولسیون Egg yolk tellurite (OXOID) کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد تحت شرایط هوازی،کلونی‌های سیاه با هاله شفاف بر روی محیط برد پارکرآگار به لوله‌های حاوی نوترینت براث انتقال داده شد. پس از انکوباسیون بمدت ۲۴ ساعت تحت همان شرایط، ۲۵ میکرولیتر از هر لوله بر روی محیط مانیتول سالت آگار (OXOID) کشت داده شد. کلونی‌های مانیتول مثبت (زرد رنگ) در مرحله بعد بر روی محیط بلاد آگار خون گوسفند، به منظور رنگ آمیزی گرم، مشاهده واکنش همولیز، تستهای کاتالاز و کوآگولاز (با استفاده از پلاسمای تازه خرگوش با روش Tube test) کشت داده شد. کلونی‌هایی که بعنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفتند، پس از کشت در محیط مایع Brain heart infusion broth (OXOID) حاوی ۱۵٪ گلیسرول در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۹).

تشخیص جدایه‌های انتروتوکسیژنیک با روش SET-RPLA

تعداد ۷۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تعیین هویت اولیه، با استفاده از کیت SET-RPLA ساخت شرکت OXOID (ایالات متحده) (Staphylococcal Enterotoxin Reverse Passive Latex Agglutination) از نظر توانایی تولید انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور تمامی جدایه‌ها در ۱۰ میلی لیتر محیط Brain heart infusion broth (OXOID) کشت داده شدند و انکوباسیون بمدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد همراه با Shaking تحت شرایط هوازی انجام شد. کشت‌های مایع در مرحله بعد از فیلترهای ۰/۴۵میکرومتری (Nalgen labware,NY,USA) عبور داده شد و عصاره‌های بدست آمده با استفاده از کیت SET-RPLA (OXOID) مطابق با توصیه‌های شرکت سازنده برای تشخیص SEA،SEB ،SEC و SED مورد آزمایش قرار گرفتند. این روش بر اساس آگلوتیناسیون ذرات لاتکس حساس شده با آنتی بادی‌های ضدانتروتوکسین می باشد (۱۸).

تشخیص ژن‌های انتروتوکسین با استفاده از روش Multiplex-PCR

استخراج DNA مطابق با روش Cremonesi و همکاران (۲۰۰۶) از یک میلی لیتر کشت مایع شبانه Brain heart infusion broth حاوی حدود یک تا سه بیلیون سلول (شمارش در محیط بردپارکر حاوی فیبرینوژن پلاسمای خرگوش) انجام شد (۱۰). مراحل استخراج DNA شامل دو بار شستشو با سالین استریل و

Archive of SID

سانتریفیوژ بمدت ۱۵ دقیقه در g ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد، لیز باکتری با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (گوانیدین تیوسیانات ۳ مولار، ۲۰ میلی مول Tris-HCL، ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر Triton X-100، ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر DL-dithiothreitol)، و ۲۰۰ میکرولیتر Binding solution (محلول ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر Silica در بافر لیز) و انکوباسیون بمدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و سانتریفیوژ بمدت ۳۰ ثانیه در g ۴۵۰۰، شستشوی پلت با بافر شستشو (اتانول ۲۵٪، ایزوپروپانول ۲۵٪، ۱۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCL) و سانتریفیوژ بمدت ۳۰ ثانیه در g ۴۵۰۰، خشک کردن پلت بمدت ۱۰ دقیقه و اضافه کردن Elution buffer (۱۰ میلی مول Tris-HCL و ۱ میلی مول EDTA) و انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ بمدت ۵ دقیقه در g ۴۵۰۰ و انتقال supernatant به میکروتیوپ بود. بطور میانگین ۱۰ میکروگرم DNA از سوسپانسیونی با غلظت 10^8 Cfu/ml بدست آمد. پرایمرهای لازم برای تکثیر اختصاصی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوکی (۹ ژن) شامل *sei, seh, seg, see, sed, sec, seb, sea* و *sej*، در جدول ۱ لیست شده است (۲۱). تکثیر DNA با استفاده از Icycler (Bio-Red, Munich, Germany) و Platinum Taq DNA Polymerase شرکت Invitrogen انجام شد. تکثیر DNA در ۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه با تکثیر نهایی در ۷۲ درجه بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۱). محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگاروز با استفاده از ترنس لومیناتور نمایان شدند. در این مطالعه نتایج روش PCR چندگانه با نتایج مربوط به روش SET-RPLA به منظور شناسایی و تایید انتروتوکسین ها در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

نتایج تشخیص جدایه‌های انتروتوکسیژنیک با روش SET-RPLA

در مجموع ۷۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از کشت ۱۷۸ نمونه شیر شامل ۴۴ جدایه از نمونه‌های شیرگاو و ۳۲ جدایه از نمونه‌های شیرگوسفند بدست آمد. توانایی تولید انواع انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی با استفاده از کیت SET-RPLA ارزیابی شدکه براساس آن ۴۲/۱٪ از کل جدایه‌ها (۳۲ از ۷۶ جدایه) شامل ۴۳/۱٪ جدایه‌های شیرگاو و ۴۰/۶٪ جدایه‌های شیرگوسفند دارای توانایی تولید انتروتوکسین بودند. شیوع و منشا جدایه‌های انتروتوکسیژنیک و تیپ‌های سرولوژیکی انتروتوکسین‌های مربوطه در جدول ۲ درج شده است. نتایج SET-RPLA نشان می‌دهدکه SEA شایع ترین انتروتوکسین شناسایی شده در بین تمامی جدایه‌ها (۲۰ از ۷۶ جدایه، ۲۶/۳٪) می‌باشد. پس از SEA به ترتیب، SED (۱۰ جدایه، ۱۳/۱٪) و SEC (۷ جدایه، ۹/۲٪)، شایع ترین انتروتوکسین های استافیلوکوکی در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. بر طبق نتایج SET-RPLA سه جدایه انتروتوکسین‌های SEA و SED، یک جدایه انتروتوکسین‌های SEC و SED و یک جدایه انتروتوکسین‌های SEA و SEC را بطور همزمان تولید می کردند. در این تست هیچ جدایه تولید کننده SEB شناسایی نشد. بر این اساس، شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* از مجموع ۷۶ جدایه، ۴۲/۱٪ بودکه شامل ۴۳/۱٪

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌های شیرگاو (۱۹ جدایه از ۴۴) و ۴۰/۶٪ جدایه‌های شیرگوسفند (۱۳ جدایه از ۳۲) می‌باشد.

نتایج تکثیر ژن‌های انتروتوکسین با روش PCR چندگانه

در این تحقیق، تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر حضور ژن‌های انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی ۳۲ جدایه تولید کننده انتروتوکسین کلاسیک بر اساس روش PCR چندگانه دارای ژن انتروتوکسین‌های کلاسیک بودند. نتایج مربوط به شیوع تیپ‌های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی و ژن‌های مربوطه که با استفاده از روش‌های SET-RPLA و PCR چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، تطابق ۹۱/۱٪ را نشان می‌دهند. عدم تطابق فقط در دو جدایه *sea* مثبت که از نظر SEA منفی بودند و یک جدایه SEA و SEC مثبت که فقط دارای ژن *sec* بود، دیده شد. ۳۱ جدایه از ۳۴ جدایه (۹۱/۱٪) دارای ژن انتروتوکسین کلاسیک با روش SET-RPLA مورد شناسایی قرارگرفت. در این بررسی ژن های *seb* و *see* در هیچ جدایه‌ای مورد شناسایی قرار نگرفت. نتایج مربوط به شیوع و نوع ژن های مربوط به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در جدایه‌های نمونه‌های شیرگاو و گوسفند در جدول ۳ و الکتروفورز محصولات PCR مربوط به تکثیر اختصاصی ژن‌های انتروتوکسین در شکل۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوکی

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	اندازه امپلیکون	منابع
sea	*sea*-F *sea*-R	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	۱۰۲	Mehrotra et al.2000
seb	*seb*-F *seb*-R	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	۱۶۴	Mehrotra et al.2000
sec	*sec*-F *sec*-R	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	۴۵۱	Mehrotra et al.2000
sed	*sed*-F *sed*-R	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC	۲۷۸	Mehrotra et al.2000
see	*see*-F *see*-R	AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC	۲۰۹	Mehrotra et al.2000
seg	*seg*-F *seg*-R	TGC TAT CGA CAC ACT ACA ACC CCA GAT TCA AAT GCA GAA CC	۷۰۴	MacLauchlin et al. 2000
seh	*seh*-F *seh*-R	CGA AAG CAG AAG ATT TAC ACG GAC CTT TAC TTA TTT CGC TGT C	۴۹۵	MacLauchlin et al. 2000
sei	*sei*-F *sei*-R	GAC AAC AAA ACT GTC GAA ACT G CCA TAT TCT TTG CCT TTA CCA G	۶۳۰	MacLauchlin et al. 2000
sej	*sej*-F *sej*-R	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGC AC	۱۴۲	Mehrotra et al.2000

جدول ۲- شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده با روش SET-RPLA

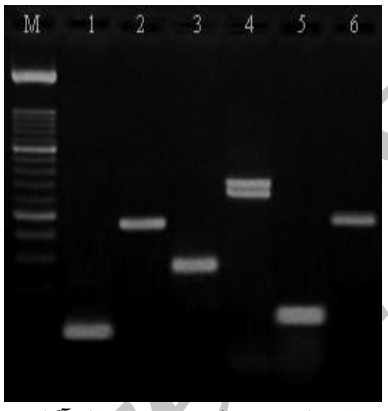
منبع	تعداد نمونه	تعداد ایزوله	ایزوله‌های انتروتوکسیژنیک	SEA n (%)	SEB n (%)	SEC n (%)	SED n (%)	SEA/SEC n (%)	SEA/SED n (%)	SEC/SED n (%)
شیر خام گاو	۹۲	۴۴	۱۹(۴۳/۱)	۹(۲۰/۴)	۰/۰	۳(۶/۸)	۳(۶/۸)	۱(۲/۲۷)	۲(۴/۵)	۱(۲/۲۷)
شیر خام گوسفند	۸۶	۳۲	۱۳(۴۰/۶)	۷(۲۱/۸)	۰/۰	۲(۶/۲۵)	۳(۹/۳۷)	۰/۰	۱(۳/۱۲)	۰/۰
مجموع	۱۷۸	۷۶	۳۲(۴۲/۱)	۱۶(۲۱)	۰/۰	۵(۶/۵۸)	۶(۷/۹)	۱(۱/۳)	۳(۳/۹)	۱(۱/۳)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- توزیع ژن های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

منبع	تعداد نمونه	تعداد ایزوله	شیوع ژن های انتروتوکسین‌های کلاسیک								شیوع ژن های انتروتوکسین‌های غیر کلاسیک			
			تعداد سویه‌های دارای ژن	*Sea*	*seb*	*sec*	*sed*	*see*	*sea/sec*	*sea/sed*	*sec/sed*	*seg*	*seh*	*seg/sei*	*fas/Bas*
شیر خام گاو	۹۲	۴۴	۳۳	۱۱	۰	۴	۳	۰	۰	۲	۱	۹	۱	۰	۰
شیر خام گوسفند	۸۶	۳۲	۲۲	۷	۰	۲	۳	۰	۰	۱	۰	۴	۳	۱	۱
مجموع	۱۷۸	۷۶	۵۵	۱۸	۰	۶	۶	۰	۰	۳	۱	۱۳	۴	۱	۰



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن های انتروتوکسین بر روی ژل آگاروز. چاهکM: 100 bp DNA ladde ؛ چاهک‌های ۱-۳: جدایه‌های مثبت برای ژن های *sea* *sec* و*sed*؛ چاهک ٤: جدایه مثبت برای هردو ژن *seg* و *sei*؛ چاهک های ٥-٦: جدایه‌های مثبت برای ژن های *seh* و *sej*

بحث

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی یکی از شایع ترین بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی است که بعلت شیوع گسترده *استافیلوکوکوس اورئوس* و توانایی بسیاری از سویه‌های آن در سنتز انتروتوکسین‌های مختلف می باشد. آلودگی محصولات لبنی با *استافیلوکوکوس اورئوس* نتیجه ای از حضور این باکتری در مواد اولیه خام بویژه شیر است (۵ و ۲۳). اهمیت این مسئله بویژه در کشورهایی با تولید انبوه محصولات لبنی از جمله پنیر و سایر محصولات لبنی، بسیار بالاست (۳۰). در آذربایجان، پنیر گوسفند یک محصول بومی و سنتی محسوب می‌شود که عمدتاً از شیر پاستوریزه نشده تهیه شده و در نتیجه بعنوان منبع مهمی برای مسمومیت غذایی استافیلوکوکی محسوب می‌شود. در این مطالعه فراوانی کلی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بررسی شده نسبتاً بالا (۴۲/۷٪) بود که شامل ۴۷/۸٪ در نمونه‌های شیر گاو و ۳۷/۲٪ در نمونه‌های شیر گوسفند می باشد. این میزان آلودگی بطور قابل توجهی بالاتر از آلودگی نمونه‌های شیرگاو (۱۶٪) و گوسفند (۱۰٪) استان فارس می باشد که اخیراً توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده است (۲۲). همچنین در این مطالعه شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیرگاو شهر اصفهان ۲۳/۴٪ گزارش شده است که پایین تر از میزان شیوع آن در شهر ماکو می باشد (۲۲). میزان شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر گاو و گوسفند شهر ماکو نسبت به

Archive of SID
www.SID.ir

استان فارس و اصفهان می تواند بعلت شیوع بالای تورم پستان بدون علامت درگاو وگوسفندان شهر ماکو باشد. بر طبق نتایج این تحقیق شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیرگاو شهر ماکو پایین تر از شیوع آن در نمونه‌های شیرگاو کشور نروژ (۷۵٪) می باشد که توسط Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است (۱۲). در این مطالعه تولید انتروتوکسین در ۴۰/۶٪ جدایه‌های شیر خام گوسفند با شیوع بالای SEA (۲۱/۸٪) مشاهده شد. نتایج متفاوتی توسط Morandi و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر شیوع ٪۵۳ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر خام گوسفند، با شیوع ۱۰۰٪ SEC گزارش شده است (۱۶). اما Adwan و همکاران (۲۰۰۵) گزارشی مبنی بر شیوع ۴۴/۲ ٪ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک (۲۳ جدایه از ۵۲ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*) را در نمونه‌های شیر خام گوسفند با شیوع بالای SEB (۶۰/۹٪) ارائه داده اندکه از لحاظ شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک در نمونه‌های شیر گوسفند با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱). در تحقیق دیگری که توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) در استان فارس انجام شد، میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک در نمونه‌های شیر گوسفند ٪۷۵ با شیوع ٪۱۰۰ SEC، گزارش شده است که نشان دهنده شیوع بالای سروتیپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی تیپ C در بین جدایه‌های شیر گوسفند استان فارس نسبت به ماکو می‌باشد (۲۲). در تحقیق حاضر میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیرگاو ۴۳/۱٪، با شیوع SEA به میزان ۲۰/۴٪ بدست آمد. مقایسه این نتایج با یافته های حاصله در تحقیق رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر شیوع ٪۷۵ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک با شیوع ۵۰٪ SEA، نشان دهنده شیوع بالای جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین و همچنین شیوع بالای SEA در نمونه‌های شیرگاو استان فارس نسبت به شهر ماکو می‌باشد. همچنین میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر گاو در این مطالعه بطور قابل توجهی پایین تر از نتایج ارائه شده توسط Morandi و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر ۳۹ جدایه تولید کننده انتروتوکسین از ۷۱ جدایه شیرگاو(٪۵۵) و با شیوع بالای SEA می‌باشد (۱۶). بر اساس مطالعات قبلی، شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های مواد غذایی مختلف مثل شیر، محصولات تهیه شده از شیر، گوشت و تخم مرغ در کشورهایی مثل برزیل، آمریکا، سوئد، کره جنوبی، هلند، اسلوواکی، چین، فرانسه، سوئیس و ژاپن بسیار متفاوت بوده و از ۴/۷٪ تا ۷۷/۴٪ متغیر است (۲۹و۲۷،۲۸،۲۶،۲۴،۱۹،۱۱). این شیوع برای نمونه‌های شیر نیز در بین مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد. در ایران نیز گزارش‌های متفاوت و محدودی از شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی مختلف وجود دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از متفاوت بودن منابع آلودگی درمناطق مختلف، منشا اکولوژیکی سویه‌ها، حساسیت روش‌های تشخیصی، ژنهای مورد مطالعه و تعداد نمونه باشد. برطبق نتایج این تحقیق، انتروتوکسین‌های SEA ، SEC و SED، شایع ترین توکسین‌های شناسایی شده در جدایه‌های شیر خام می‌باشند که با نتایج مربوط به مطالعاتBalaban و همکاران (۲۰۰۰) و رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد (۲۲و۴). بنابراین نتایج این مطالعه حاکی از حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر خام گاو وگوسفند شهرماکو بوده و

Archive of SID

www.SID.ir

تاکید کننده خطر بالقوه مسمومیت غذایی در مصرف کنندگان محصولات لبنی بویژه در غیاب روش‌های بهداشتی و ممانعت‌کننده از تولید انتروتوکسین می‌باشد. در این مطالعه ارزیابی تولید انتروتوکسین‌هایI,H,G و J بعلت نبود روش‌های ایمونواسی تجاری برای انتروتوکسین‌های غیرکلاسیک انجام نشد. اما در روش PCR ژن های مربوطه شناسایی شد. دراین مطالعه ارتباط نزدیکی بین منشا جدایه‌های انتروتوکسیژنیک و نوع انتروتوکسین تولید شده دیده نشد. طوری که شیوع SEA در بین جدایه‌های شیرگاو وگوسفند تفاوت قابل توجهی نشان نمی‌دهد. این در حالی است که در مطالعات مشابه، SEA در بین جدایه‌های شیرگوسفند وSEC در جدایه‌های شیرگاو، شیوع بیشتری نشان می‌دهند (۲، ۱۸ و ۲۵).

در این مطالعه ۵۵ جدایه از ۷۶ جدایه (۷۲/۳٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر خام دارای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی بودندکه شامل ۳۳ جدایه شیرگاو و ۲۲ جدایه شیرگوسفند می‌باشد. ژن های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی در تمامی جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین بجز یک جدایه SEA/SEC مثبت که فقط دارای ژن *sec* بود، تشخیص داده شد. ژن های مربوط به انتروتوکسین‌های غیرکلاسیک به تعداد یک ژن یا ترکیبی از دو ژن مختلف مورد شناسایی قرار گرفت. اما با توجه به اینکه تمامی روش‌های ایمونواسی که بصورت تجاری در دسترس هستند، صرفاً برای تشخیص انتروتوکسین‌های کلاسیک طراحی شده اند، امکان بررسی توانایی تولید آنها در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود نداشت. حضور ژن-های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی در تمامی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش PCR مورد تایید قرار گرفت. دلیل اصلی عدم تطابق مشاهده شده بین نتایج SET-RPLA و PCR در مورد سه جدایه ممکن است حساسیت پایین روش SET-RPLA، تغییر پذیری توالی ژن های انتروتوکسین، احتمال وجود انتروتوکسین‌های ناشناخته با واکنش سرولوژیک متقاطع در روش‌های ایمونولوژیک و عدم وجود ارتباط قطعی بین حضور ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی و بیان آن و یا بیان انتروتوکسین در سطوح بسیار پایین باشد (۱۴). جدایه‌هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* که دارای سطوح معینی از واکنش متقاطع ایمونولوژیک با SEA هستند، اما هیچ ژنی بر اساس روش PCR در آنها شناسایی نشده، توسطJorgensen و همکاران (۲۰۰۵) و همچنین MacLauchlin و همکاران (۲۰۰۰) در محصولات لبنی گزارش شده اند (۱۲ و ۱۵). در این مطالعه ژن *see* و *seb* در هیچیک از جدایه‌ها تشخیص داده نشدکه از این نظر با نتایج مطالعات Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) و Morandi و همکاران (۲۰۰۷) هم خوانی دارد (۱۲ و ۱۶).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بعنوان یک مسئله مهم در بهداشت و سلامت جامعه مطرح است. مدل‌های متعددی به منظور پیش بینی الگوی رشد و تولید انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* در صنایع غذایی مورد مطالعه قرار گرفته اند. فاکتورهای متعددی بر رشد و تولید انتروتوکسین در این باکتری تاثیرگذار بوده و به همین دلیل شناسایی و ارزیابی این فاکتورها نیاز به مطالعات بیشتر را توجیه می‌کند. نگهداری مناسب مواد غذایی عامل مهمی در جلوگیری از مسمومیت غذایی است. مطالعه عوامل موثر بر میانکنش بین *استافیلوکوکوس اورئوس* و مواد غذایی و همچنین شناسایی انتروتوکسین‌ها و سویه‌های انتروتوکسیژنیک

Archive of SID

www.SID.ir

نوظهور تا حدود زیادی ما را در زمینه پیشگیری از مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی یاری خواهد نمود. همچنین روش‌های جدید و حساس تری باید در زمینه تشخیص انتروتوکسین‌ها و سویه‌های توکسین زا در مواد غذایی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. نتایج این مطالعه و مقایسه آنها با نتایج مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورها نشان دهنده خطر بالای مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در مصرف کنندگان محصولات لبنی شهر ماکو و توزیع جغرافیایی غیر همسان جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایران و سایر کشورها می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو که هزینه این تحقیق را از محل طرح مصوب تامین نمودند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Adwan, G., Abusafieh, D., Aref, R. (2005). Prevalence of microorganism associated with intramammary infection in cows and small ruminants in the north of Palestine. *Journal of Slamic Univrsity of Gaza* **13**: 165-73.
2. Aragon-Alegro, L.C., Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Júnior, A.F., Rall, R., Rall, V.L.M. (2007). Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control* **18**: 630-4.
3.
4. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection* **130**: 33-40.
5. Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylocccal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* **61:** 1-10.
6. Belickova, E., Tkacikova, L., Naas, H.T., Vargova, M., Ondrasovic, M., Ondrasovicova, O., Obstitenikova, D., Toth, L. (2001). Staphylococci plate counts in foods of milk origin. *Veterinary medicine* **46**: 24-7.
7. Bergdoll, M.S., Easton, C.S.F., Adlam, C. (1983). Staphylococci and Staphylococcal infections. *London Academic Press*: 559-98.
8. Bergdoll, M.S., Robbins, R.N., Weiss, K., Borja, C.R., Huang, Y., Chu, F.S. (1973). The staphylococcal enterotoxins: similarities. *Contributions to Microbiology and Immunology* **1**: 390-6.
9. Boerema, J.A., Clemens, R., Brightwell, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **107**: 192-201.
10. Cenci-Goca, B.T., Karama, M., Rossitto, P.V., Morgante, R.A., Cullor, J.S. (2003). Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic cows. *Journal of Food Protection* **66**: 1693-6.
11. Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M. (2006). Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *Journal of Dairy Science* **89**: 163-9.
12. Silva, E.R., Carmo, L.S., Silva, N. (2005). Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology* **106**: 103-7.
13. Jorgensen, H.J., Mork, T., Rorvik, L.M. (2005).The occurrence of *staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* **88**: 3810-7.
14. Khan, M.A., Kim, C.H., Kakoma, I., Morin, E., Hansen, R.D., Hurley, W.L. (1998). Detection of *staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. *American Journal of Veterinary Research* **59**: 807-13.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Loncarevic, S., Jørgensen. H.J., Løvseth, A., Mathisen, T., Rørvik, L.M. (2005). Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 344-50.
16. McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G. (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* **63**: 479-88.
17. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* **124**: 66-72.
18. Sanchez, G., Rodriguez, R., Olvera, P.R., Mota, L. (2003). Development of two multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Journal of Food Protection* **66**: 1055-62.
19. Normanno, T.G., Salandra, A., Dambrosio, N.C., Quaglia, M., Corrente, A., Parisi, G., Santagada, A. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **115**: 290-6.
20. Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y. (2002). Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 857-62.
21. Orwin, P.M., Fitzgerald, J.R., Leung, D.Y., Gutierrez, J.A., Bohach, G.A., Schlievert, P.M. (2003). Characterization of *S. aureus* enterotoxin L. *Infection and Immunity* **71**: 2916-9.
22. Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Guster, K. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* **118**: 186-93.
23. Rahimi, E., Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv* **83**: 23-30.
24. Rodriguez, E., Arques, J.L., Gaya, P., Tomillo, J., Nunez, M., Medina, M. (2000). Behavior of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin producing starter cultures. *Milchwissenschaft* **55**: 633-5.
25. Rosec, J.P., Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* **77**: 61-70.
26. Sharma, N.K., Rees, C.E., Dodd, C.E. (2000). Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 1347-53.
27. Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A.A. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology* **78**: 373-82.
28. Stephan, R., Buehler, K., Lutz, C. (2002). Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* isolates from bulk-tank milk samples in Switzerland. *Milchwissenschaft* **57**: 502-4.
29. Stephan, R., Dura, U., Untermann, F. (1999). Resistance situation and enterotoxin production capacity of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz Arch Tierheilkd* **141**: 287-90.
30. Tsen, H.Y., Yu, G.K., Wang, K.C., Wang, S.J., Chang, M.Y., Lin, L.Y. (1998). Comparison of enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibility for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiology* **15**: 33-41.
31. Vernozy, C., Meyrand, A., Mazuy, Ch., Delignette, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Richard, I. (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening raw goat's milk lactic cheeses. *Journal of Dairy Research* **65**: 273-81.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Zschock, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamman, H.P., Lammler, Ch. (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* positive *staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **108**: 243-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 1, 2015

The prevalence of Enterotoxigenic Isolates of *Staphylococcus aureus* in Bovine and Sheep Bulk Tank Milk Samples of Maku

***Sadeghi, M.R.*[1*]**

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Agriculture and Food Science Engineering, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran

Received date: 6 January 2014 *Acceptance date: 10 May 2014*

Abstract: *Food-borne diseases are one of the major concerns of food and drug administration (FDA) and world health organization (WHO). Up to the present day, more than 250 types of food-borne diseases have been described and bacteria are responsible for two-third of them. Bacterial food poisoning is one of the most common food-associated diseases that are usually related to the consumption of contaminated foods with toxigenic bacteria. Among the bacterial agents responsible for food poisoning, staphylococcus aureus is the most common food poisoning agent worldwide. Milk and dairy products are the most common foods associated to staphylococcal food poisonings. Therefore, this study was considered to investigate the prevalence of enterotoxigenic isolates of Staphylococcus aureus in bovine and sheep bulk tank milk samples of Maku city. In this study, a total of 178 milk samples including bovine (n=92) and sheep (n=86) milk samples were collected. A total of 76 isolates from milk samples was examined for the production of staphylococcal enterotoxins and associated genes using Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) and Multiplex PCR(Polymerase Chain Reaction) respectively. Out of 44 and 32 isolaes from bovine and sheep bulk tank milk samples 19 (43.1%) and 13 (40.6%) were enterotoxin producers respectively. SEA, SED and SEC were the most common toxins detected in all isolates. The prevalence of classical enterotoxins and related genes are shown by SET-RPLA and m-PCR corresponded in 91.1% of all S.aureus isolates, analyzed by both methods. Non-correspondence was observed in two sea positive isolates that were SEA negative, and in one isolates that were SEA and SEC positive only genes for sec were detected. This study indicated a high incidence of enterotoxigenic isolates of staphylococcus aureus in bovine and sheep bulk tank milk samples in Maku city.*

Keywords: *Staphylococcus aureus, Enterotoxigenic, Bulk-tank milk, Maku*

[*]*Corresponding author: Sadeghi, M.R.*
Address: Department of Microbiology, Faculty of Agriculture and Food Science Engineering, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran. Tel: 04623279900.
Email: phdmohammadreza@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir