Archive of SID

مقایسه تشخیص مولکولی و سرولوژیک *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین از مواد لبنی تهیه شده به روش سنتی

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی*[1]، دکتر مجید ریاضی پور**، دکتر مرتضی ستاری***

*استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، **دانشیار گروه میکروبیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)،
***دانشیار گروه باکتری شناسی- دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۸ تاریخ تایید: ۸۸/٤/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: ***استافیلوکوکوس اورئوس*** **یکی از مهمترین عوامل مسمومیت در مواد غذایی و لبنی است. انتروتوکسین های استافیلوکوکی فاکتور اصلی ایجاد مسمومیت غذایی می باشد که از تیپ‌های مختلفی تشکیل شده‌اند. مهمترین آنها انتروتوکسین های تیپ A (SEA) و B (SEB) می باشد. هدف از این مطالعه تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده انتروتوکسین تیپ A و B به روش مولکولی و سرولوژیک از مواد لبنی سنتی می باشد.**

روش بررسی: **در این تحقیق توصیفی – تحلیلی آزمایشگاهی با رعایت شرایط استریل از ۱۰۰ نمونه مواد لبنی تهیه شده به روش سنتی در سطح شهر تهران نمونه برداری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها با استفاده از روش های متداول باکتری شناسی کشت داده شده و *استافیلوکوکوس اورئوس ها* شناسایی شدند. ژن های SEA و SEB در *استافیلوکوکوس اورئوس های* جدا شده، به روش PCR شناسایی شد. قدرت انتروتوکسین زایی سویه های دارای این ژن ها، به روش کشت در کیسه دیالیز بررسی شد و بوسیله آزمایش سرولوژیک ایمنودیفیوژن منفرد شعاعی (SRID) تایید گردید. داده ها با استفاده از آزمون آماری کای اسکوئر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.**

یافته ها: **۳۲٪ از مواد غذایی از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند (خامه ۱۸٪، پنیر ۱۰٪ و شیر ٤٪). نتایج آزمایش PCR نشان داد که از میان استافیلوکوک های جدا شده، ۱۵/٦٪ دارای ژن SEA، ۹/۳٪ دارای ژن SEB و ٦/۲٪ آنها دارای هردو ژن SEA و SEB هستند (P<۰/۰۵). بررسی قدرت انتروتوکسین زایی سویه های دارای این ژن ها نشان داد که به ترتیب ۸۰٪ و ۳۳٪ ژن های SEA وSEB بیان شدند.**

نتیجه گیری: **بر اساس یافته های ما پیشنهاد می شود که ژن های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق PCR که یک روش اختصاصی، حساس، سریع و ارزان می باشد جایگزین روش های سنتی گردد.**

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، مواد غذائی لبنی.

مقدمه:

جنس استافیلوکوکوس‌ها متعلق به خانواده میکروکوکاسه هستند. این باکتری ها، گرم مثبت، بی‌حرکت، فاقد اسپور، هوازی و بیهوازی اختیاری‌اند (۱). اعضاء این جنس دارای بیش از ۲۰ گونه می‌باشد که در زیستگاه های مختلف پراکنده‌اند. برخی از آنها در پوست، غدد پوستی، غشاهای مخاطی جانوران وجود دارند و به فرآورده‌های حیوانی مثل پنیر، شیر، گوشت و منابع محیطی مثل خاک و شن و گرد و غبار، هوا و آب های طبیعی منتقل می شوند (۲).

برخی از گونه‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند. *استافیلوکوکوس اورئوس* از جملهٔ گونه های شاخصی است که علاوه بر بیماریزایی برای انسان در فساد مواد غذایی نیز نقش دارد و یکی از چهار عامل شایع و مهم در ایجاد مسمومیت غذایی می باشد (۳).

انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر

[1] نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی- تلفن ۸۸۰۳۹۸۸۳-۰۲۱، E-mail:imanifouladi.a@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مبنای خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی به ۱۸ سروتیپ A تا U (بجز F، S و T) طبقه‌بندی شده‌اند (۴). از نظر مقاومت به شرایط فیزیکی و شیمیایی تقریباً تمام سروتیپ‌های انتروتوکسین در مقابل حرارت و عوامل آنزیمی از جمله تریپسین موجود در دستگاه گوارش مقاومند، بجز C_1 و B که دارای لوپ سیستین بوده و توسط آنزیم گوارشی برش داده می‌شود، اما این برش تاثیری در میزان سمیت و تحریک تولید آنتی‌بادی ندارد (۶،۵،۳).

سروتیپ‌های SEA (Staphylococcal Enterotoxin Type A) و SEB (Staphylococcal Enterotoxin Type B) عامل اصلی گاستروانتریت می‌باشند. علاوه بر این SEB به صورت آئروسل نیز قابل انتقال است و در ایجاد بیماری های ریوی نیز نقش دارد (۷). SEA در برخی از مناطق عامل بیش از ۵۰ درصد کل مسمومیت های غذایی است، در بریتانیا و ایالات متحده آمریکا SEA و SEB عامل بیش از ۶۹ درصد مسمومیت غذایی می‌باشد (۸).

استافیلوکوکوس اورئوس در ۲۰ تا ۳۰ درصد جمعیت انسانی بصورت پایدار و در ۶۰ درصد افراد بصورت متناوب مستقر می شود و فقط ۲۰ درصد افراد فاقد این باکتری هستند. افرادی که در تهیه مواد غذایی فعالیت دارند در صورت عدم رعایت مسایل بهداشتی باکتری را به غذا انتقال می‌دهند و اگر تعداد 10^5 باکتری در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد، باکتری فرصت رشد و تولید انتروتوکسین می یابد (۸،۳). بدلیل مقاومت انتروتوکسین به حرارت امکان ایجاد مسمومیت غذایی بعد از حرارت دهی نیز وجود دارد زیرا توکسین فعال باقی مانده و منجر به گاستروانتریت می گردد. این امر معمولاً منجر به اپیدمی در یک جمع (دانشگاه، مدرسه، پادگان و غیره) می‌شود. در میان انتروتوکسین‌های باکتریایی SEB از اهمیت بیشتری برخوردار است. این توکسین مثل سایر سروتیپ‌ها از طریق گوارشی جذب می‌شود و گاستریت ایجاد می کند، ولی بر خلاف سایرین از طریق تنفسی و به صورت آئروسل هم قابل انتقال است (۹،۷).

در تحقیقات مختلف مشخص گردیده است که ۸۰-۱۵ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* که از منابع مختلف جدا می شود قادر به تولید انتروتوکسین می باشد (۱۲،۱۱،۱۰). روش های مختلفی برای تشخیص قدرت انتروتوکسین زایی باکتری ها وجود دارد. روش های فنوتیپی از قبیل آگلوتیناسیون، اخترلونی و SRID (Single Radial Immuno Diffusion) به تنهایی از اعتبار کافی برخوردار نیستند، زیرا اولاً سروتیپ های مختلف انتروتوکسین دارای شباهت آنتی ژنیکی هستند و واکنش متقاطع ایجاد می کنند (۱۳)، ثانیاً فقط برای سروتیپ های A تا E کیت های سرولوژیک تجاری در دسترس می باشد. لذا روش های ژنوتیپی از قبیل PCR، Real time PCR و استفاده از پروب به منظور تشخیص ژن های مسئول تولید انتروتوکسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار مفید هستند (۱۴). از آنجایی که وجود ژن به تنهایی دلیل بر تولید انتروتوکسین نیست، ضروری است بعد از اثبات وجود ژن در باکتری میزان بیان ژن نیز مشخص گردد (۱۴). هدف از این تحقیق، ارزیابی دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در شناسایی SEA، SEB و همچنین بررسی میزان آلودگی محصولات لبنی سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده SEA و SEB با استفاده از این دو روش می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی آزمایشگاهی با مراجعه به مراکز توزیع مواد لبنی سنتی در سطح شهر تهران و در شرایط استریل تعداد ۱۰۰ نمونه مختلف (شیر، خامه و پنیر) و از هر کدام به میزان صد گرم نمونه برداری شد (۱۵). نمونه‌ها با توجه به جامد یا مایع بودن توسط سرم فیزیولوژی به میزان ۱ درصد رقیق شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یک میلی لیتر از آن را به محیط کوک میت (Cook meet) (شرکت سیگما) حاوی ۹ درصد نمک در لوله در پیچ‌دار اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷Ø انکوبه گذاری شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از این محیط بر روی محیط‌های برد پارکر (Berd parker) و نوترین آگار (Nutrient Agar) (از شرکت سیگما) کشت و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه گذاری گردید. در نمونه‌هایی که باکتری رشد کرده بود، کلنی‌ها شمارش شد، پس از رویت کلنی های سیاه رنگ با هاله شفاف در محیط برد پارکر تست هایی از قبیل: لام مستقیم، کاتالاز، کوآگولاز و DNase- همولیز انجام شد. تشخیص گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* قطعی گردید (۱۷،۱۶).

به منظور بررسی قدرت انتروتوکسین زایی باکتری های جدا شده، از روش کشت در کیسه دیالیز (Sac culture) استفاده شد (۱۸). میزان کل پروتیین تولید شده به روش براد فورد اندازه گیری شد و با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAEG باند پروتیینی اثبات گردید. به منظور تایید وجود انتروتوکسین در متابولیت خام، پس از تغلیظ آن، از آنتی توکسین استاندارد و روش SRID استفاده شد و تیپ های SEA و SEB شناسایی گردیدند (۲۰،۱۹،۹).

جهت بررسی اثرات بیولوژیک سم از موش به عنوان حیوان آزمایشگاهی حساس نسبت به انتروتوکسین استفاده شد. در این آزمایش فعالیت بیولوژیک سم به روش Read & Mounch در سه گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی و گروه آزمایش بررسی شد. طبق پروتکل شرکت سازنده، سم استاندارد در PBS استریل حل شده و با تزریق ۲µgr /Mice (دوز کشنده موش) در داخل پریتوئن ۵ سر موش به عنوان گروه کنترل مثبت، تزریق انتروتوکسین استانداردی که با آنتی توکسین خنثی شده بود در داخل پریتوئن ۵ سر موش به عنوان گروه کنترل منفی و تزریق ۳ml محلول حاوی انتروتوکسین تولید شده (که شوک حرارتی دیده بود) در داخل پریتوئن ۵ سر موش به عنوان گروه آزمایش بررسی شدند (۲۳،۲۲،۲۱).

به موازات غربالگری سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین زا به روش فنوتیپی(تولید انتروتوکسین در کیسه دیالیز)، وجود ژن SEA و SEB به روش PCR نیز ردیابی شد. ابتدا با استفاده از لیزواستافین سلول های باکتریایی لیز شده و به روش فنل- کلروفرم DNA آن تخلیص شد (۲۴). پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده شامل یک پرایمر آغازگر F (Forward) و دو توالی معکوس R (Reverse) از شرکت سیناژن تهیه گردید (جدول شماره ۱) (۲۴).

PCR در حجم نهایی 50 µl و با برنامه سیکل حرارتی واکنش PCR برای ژن ها به صورت واسرشته سازی اولیه (Denaturation) در ۹۴ ºC به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه و سپس در ۳۵ سیکل PCR به ترتیب واسرشته سازی ۹۴ºC به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۵۰ºC به مدت ۳۰ ثانیه و طویل سازی (Extension) ۷۲ºC به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت و در نهایت یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ºC درجه سانتیگراد انجام شد.

در این تحقیق با استفاده از آزمون Chi-square میزان آلودگی محصولات لبنی و فراوانی ژن های انتروتوکسین A و B استافیلوکوکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

بررسی نتایج میزان آلودگی نمونه‌های لبنی به *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد بیشترین آلودگی در خامه (۱۸٪)، سپس در پنیر (۱۰٪) و کمترین آلودگی در شیر (۴٪) می باشد. در مجموع ۳۲ درصد نمونه‌ها آلوده بودند. تعداد باکتری ها بر حسب باکتری در

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱:خصوصیات پرایمرها مورد استفاده در واکنش PCR

نام و اندازه پرایمر	توالی آغازگر	طول محصول (bp)
SE-U(20bp)	F:5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3'	-
SEA (18bp)	R:5'-ATTAACCGAAGGTTCTGT-3'	270
SEB (18bp)	R:5'-ATAGTGACGAGTTAGGTA-3'	165

میلی لیتر (CFU/ML) در نمونه های آلوده متفاوت بود (جدول شماره ۲).

نتایج مربوط به توانایی تولید انتروتوکسین بـــه روش فنوتیپی نشان داد که ۱۵/۶ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جـــدا شـــده از مـــواد لبنی انتروتوکسین زا بودند، که به تفکیک ۱۲/۵ درصد مربـــوط به تولید SEA و ۳/۱ درصد مربوط به SEB است، ولی هیـــچ سویه‌ای قادر به تولید هر دو نوع انتروتوکسین بطور همزمان نبود (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از بررسی میزان آلودگی مواد لبنی به استافیلوکوکوس اورئوس

نوع نمونه	تعداد نمونه	$>10^5$	10^4-10^5	10^3-10^4	10^2-10^3	10^1-10^2	جمع نمونه آلوده
خامه	۳۵	۰	٪۲	٪٤	٪٦	٪٦	٪۱۸
پنیر	۳۵	۰	۰	٪۲	٪۳	٪۵	٪۱۰
شیر	۳۰	۰	۰	۰	٪۱	٪۳	٪٤
جمع	۱۰۰	۰	٪۲	٪٦	٪۱۰	٪۱٤	٪۳۲

تعداد باکتری بر حسب CFU/ML *(تعداد باکتری در میلی لیتر) می باشد.*

در بررسی فعالیت بیولوژیک مربوط به انتروتوکسین تولیدی مشخص شد که تمام موش های گروه کنترل مثبت و گروه آزمایش مردند ولی در گروه کنترل منفی، موش ها از بین نرفتند. هدف از این آزمایش ارزیابی کیفی انتروتوکسین تولیدی می باشد.

بررسی ژنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئـــوس* جدا شـــده از مواد لبنی نشـــان داد که ۳۱/۱ درصد کل سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد لبنی، یکی از دو ژن SEA و SEB یا هر دو را دارا می‌باشند که ۱۵/۶، ۹/۳ و ۶/۲ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب دارای ژن‌های SEA، SEB و SEB+SEA بودند (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۱، نمودار شمـــاره ۱).

www.SID.ir

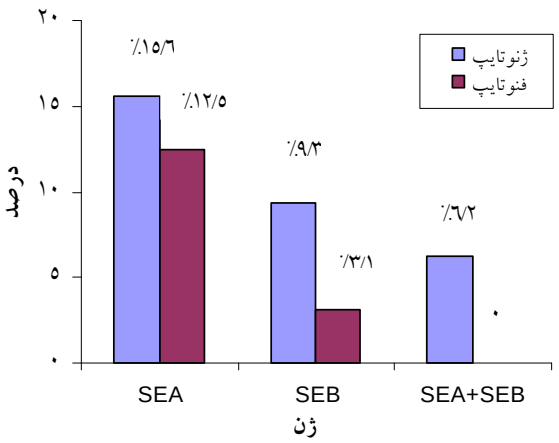
Archive of SID

SEA ۲۷۰

SEB ۱۶۵

تصویر شماره ۲: نتایج PCR مربوط به سویه های دارای ژن های انتروتوکسین تیپ A و B:

- *باند شماره۱ سویه جدا شده از مواد لبنی و مربوط به ژن انتروتوکسین تیپ A*
- *باند شماره ۲ سویه استاندارد مربوط به ژن ژن انتروتوکسین تیپ A*
- *باند شماره ۳ سویه استاندارد مربوط به ژن انتروتوکسین تیپ B*
- *باند شماره ٤ سویه جداشده از مواد لبنی مربوط به ژن انتروتوکسین تیپ B*



نمودار شماره ۱: فراوانی ژن های SEA و SEB و میزان بیان آنها در استافیلوکوک اورئوس های جدا شده از نمونه های لبنی به روش ژنوتیپی و فنوتیپی
Staphylococcal Enterotoxin Type A=SEA
Staphylococcal Enterotoxin Type B=SEB

بحث:

استافیلوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبتی هستند که به طور وسیعی در طبیعت وجود دارند. هر چند اغلب گونه‌های شناخته شده این باکتری ساپروفیت و غیر بیماریزا هستند، ولی تعدادی از آنها برای انسان و حیوان بیماریزا هستند. وجود این باکتری در اغذیه و لبنیات در اواخر قرن نوزدهم مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

Bennett در سال ۱۹۱۴ با انجام آزمایشات مختلف و خوردن شیر آلوده به استافیلوکوک علایم و آثار مسمومیت غذایی ناشی از آن را نشان داد (۲۳).

طبق گزارش Casman و همکاران میزان تنوع در قدرت انتروتوکسین زایی سویه‌های استافیلوکوکی جدا شده از منابع کلینیکی حدود ۴۷ درصد و در مورد سویه‌های غیر کلینیکی حدود ۳۱ درصد گزارش گردید (۲۲). در مطالعه حاضر نیز ۳۲ درصد نمونه های غیر کلینیکی دارای ژن های SEA و SEB بود، اما ۱۵/۶ درصد آنها انتروتوکسین زا بودند و بقیه علی رغم داشتن ژن مسئول انتروتوکسین قادر به تولیدآن نبودند. نکته قابل توجه اینکه اولاً در تحقیق ما نمونه های مورد استفاده در مقایسه با نمونه های Casman و همکاران از تنوع کمتری بر خوردار است و از طرف دیگر Casman و همکاران مطالعه ای بر روی تشخیص ژن های انتروتوکسین (ژنوتیپی) انجام ندادند (۲۲).

Gilmour نشان داد که حدود ۳۵ درصد از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر بزهای سالم و حدود ۸۳-۷۰/۴ درصد از سویه‌ها جدا شده از شیر بزها و گوسفندان مبتلا به ورم پستان، توانایی تولید انتروتوکسین دارند (۱۷). اختلاف در نتایج این

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه با تحقیق حاضر احتمالاً مربوط به این نکته است که در این تحقیق فقط محصولات لبنی با منشاء شیر گاوی مد نظر بود و از طرف دیگر سلامت یا آلودگی حیوان تولید کننده شیر مشخص نیست.

طبق بررسی های دیگر Gilmour ۶-۳/۹ درصد از سویه‌های جدا شده از شیر گاوهای طبیعی قدرت تولید انتروتوکسین داشتند (۱۷). که با نتایج حاضر اختلاف دارد، زیرا در مطالعه Gilmour فقط مطالعه فنوتیپی انجام شده است، از طرفی تیپ های انتروتوکسین مشخص نشده و احتمالاً منابع تولید مواد لبنی، روش های آماده سازی و مسایل بهداشتی نیز متفاوت بوده است.

از مشکلات مهم *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد مسمومیت غذایی ناشی از تولید انتروتوکسین است (۲۵). در نتایج ما مشخص شد که ۳۲ درصد کل مواد لبنی به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده اند که با مطالعه Casman و همکاران مطابقت دارد (۲۲). البته میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* موجود در مواد غذایی با عوامل زیادی از قبیل تعداد پرسنل ناقل باکتری دخیل در آماده سازی مواد غذایی، سطح بهداشتی کارخانجات مواد غذایی، سیستم حمل و نقل، میزان آلودگی حیوان، در ارتباط است و لازم است در هر منطقه بطور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. ضروری است که مواد لبنی که در شرایط استریل تهیه شده نیز مورد بررسی و مقایسه با مواد لبنی سنتی قرار گیرد و باید در یک مطالعه وسیع تر بررسی شود. در این مطالعه پس از جدا سازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه لبنی، ژن تولید کننده انتروتوکسین به روش PCR ردیابی شد. نتایج نشان می دهد که ۳۱/۱ درصد (n=۱۰) از سویه ها دارای یکی از دو ژن SEA، SEB یا هر دو ژن می باشند.

همانطوری که در نتایج مشخص است، میزان تشخیص انتروتوکسین به روش ژنوتیپی در مقایسه با روش فنوتیپی بیشتر بوده است. اگر در چنین مواردی که سویه ها تنها با روش مولکولی مثبت بودند را مد نظر قرار بدهیم. این یافته ها ممکن است حساسیت کمتر روش فنوتیپی (کیت ایمنوا سی) را مشخص کند و یا بیانگر این حقیقت باشد که تشخیص انتروتوکسین ضرورتاً نشان دهنده تولید توکسین و فعالیت بیولوژیکی آن نیست (خصوصاً در مورد SEB) (۱۵).

درصد بالایی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن انتروتوکسین خصوصاً SEA، از نظر تشخیص فنوتیپی می باشد و نتایج آزمایش PCR ارتباط خوبی را با نتایج ایمنواسی نشان داد که مطابق با یافته های قبلی ما و دیگران است (۲۸،۲۷،۲۶) اما در مورد SEB تفاوت بیشتری بین تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی وجود دارد که می تواند دلایل متعددی داشته باشد از جمله : ۱- در مطالعات سایرین مشخص شده که در بهترین شرایط ۵۰-۴۰ درصد سویه‌های دارای ژن SEB قادر به تولید انتروتوکسین هستند و نتایج ما نیز این نکته را تقریباً (۳۰٪) تایید می‌کند (۲۹). لذا بیان ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* تا حدود زیادی به عواملی چون منشاء و نوع سویه باکتریایی و محیط میزبانی باکتری بستگی دارد و میزبان نقش مهمی را در ایجاد تطابق بین باکتری با محیط اطرافش بازی می‌کند، مثلاً درصد بالایی از سویه ها که از گاو جدا شدند SEA و SED را تولید می‌کنند (۳۰،۱۵)، در حالی که سویه های جدا شده از بز و گوسفند SEC را تولید می کنند (۳۰) و سویه های جدا شده از پوست و زخم انسانی بیشتر SEB را تولید می کنند (۳۱).

این یافته ها ممکن است حساسیت کمتر روش فنوتیپی (ایمنوا سی و سنجش حساسیت بیولوژیک) را مشخص کند. به هر حال تکنیک های بنا شده بر پایه DNA قادرند ژن‌های مربوط به انتروتوکسین را تشخیص بدهند، اما نمی توانند مشخص کنند که این ژن بیان می شود یا خیر و یا اینکه چقدر بیان می شوند؟ ارتباط بین حضور ژن در باکتری و میزان بیان آن را می‌توان با انجام تست‌های حساس سرولوژیک و ایمنولوژیک و Si RNA مشخص کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه انتروتوکسین‌های تیپ A و B مقاوم به حرارت می باشند، لذا مواد غذایی آلوده به این دو تیپ انتروتوکسین حتی با حرارت دادن، مسمومیت زا هستند و در مدت کوتاهی باعث گاستروانتریت می گردند. تشخیص ژن های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق PCR یک روش اختصاصی، حساس، سریع و ارزان می باشد که می تواند جایگزین روش های سنتی سنجش ایمنولوژیکی گردد.

توصیه می شود که در آزمایشگاه های کنترل کیفی مواد غذایی از روش مولکولی جهت غربالگری محصولات غذایی اعم از لبنی و غیر لبنی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی:

از آقای دکتر محمد حسین کلانتر معتمدی بخاطر ویراستاری متن خلاصه انگلیسی مقاله تشکر می نماییم.

منابع:

1. Gilbert RJ, Humphrey TJ. Food-borne bacterial gastroenteritis. In: Hausler WJ, Sussman M. (editors). Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Hodder Arnold Pub. 1998. p: 577-600.

2. Le Loir YL, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar; 2(1): 63-76.

3. Paciorek ML, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyg B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. Int J Food Microbiol. 2007 Jul; 117(3): 319-23.

4. Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp. 2005 Jan-Feb; 53: 13-27.

5. Chang HC, Bergdoll MS. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. Biochemistry. 1979 May; 18(10): 1937-42.

6. Brehm RD, Tranter HS, Hambleton P, Melling J. Large-scale purification of staphylococcal enterotoxins A, B, and C2 by dye ligand affinity chromatography. Appl Environ Microbial. 1990 Apr; 56(4): 1067-72.

7. Mattix ME, Hunt RE, Wilhelmsen CL, Johnson AJ, Baze WB. Aerosolized staphylococcal enterotoxin B-induced pulmonary lesions in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Toxicol Pathol. 1995 May-Jun; 23(3): 262-8.

8. Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection. 2005 Feb; 33(1): 3-8.

9. Imani Fooladi A, Sattari M, Ranjbar R. [Biological effects of type B staphylococcal enterotoxin. Kowsar Med J. 2004; 9(2): 12-21.]Persian

10. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol Lett. 2005 May; 246(2): 191-8.

11. Fueyo JM, Mendoza MC, Alvarez MA, Martin MC. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. FEMS Microbiol Lett. 2005 Feb; 243(2): 447-54.

12. Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanowska J, et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. Lett Appl Microbiol. 2006 Apr; 42(2): 315-20.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Edwin C, Tatini SR, Maheswaran SK. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C1, D, and E. Appl Environ Microbiol. 1986 Dec; 52(6): 1253-7.

14. Van Belkum A, Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today and tomorrow. Curr Opin Pharmacol. 2003 Oct; 3(5): 497-501.

15. Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Vet Microbiol. 2007 Sep; 124(1-2): 66-72.

16. Martin MC, Fueyo JM, Gonzales-Hevia JM, Mendoza MC. Genetic procedure for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. Int J Food Microbiol. 2004 Aug; 94(3): 279-86.

17. Gilmour A. Staphylococci in milk and milk product. J Appl Bacteriology. 1990; 1065-475.

18. Schantz EJ, Roessler WG, Woodburn MJ, Lynch JM, Jacoby HM, Silverman SJ, et al. Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry. 1972 Feb; 11(3): 360-6.

19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prin ciple of protein – dye binding. Anal Bio Chem. 1976 May; 72: 248-54.

20. Abbar M. Selected biological properties of enterotoxigenic staphylococci isolated from milk. J Food Protect. 1986; 49(11): 871-3.

21. Casman EP, Bennett RW. Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. J Bacteriol. 1963 Jul; 86: 18-23.

22. Casman EP, Bennett RW, Dorsey AE, Issa JA. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J Bacteriol. 1967 Dec; 94(6): 1875-82.

23. Bennett RW. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. J Food Sci. 1986; 51: 1337-39.

24. Sharma NK, Rees CE, Dodd CE. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. Appl Environ Microbiol. 2000 Apr; 66(4): 1347-53.

25. Bradley GS, Teresa K. Staphylococcal enterotoxins: a puring expreience in review Part I. Clin Microbiol News Let. 2005; 27(23): 179-85.

26. Anvari SH, Sattari M, Forozandehe-Moghadam M, Najar Peerayeh SH, Imanee-Fouladi AA. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. Res J Biol Sci. 2008; 3(8): 826-29.

27. McLauchlin J, Narayanan GL, Mithani V, O'Neill G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J Food Prot. 2000 Apr; 63(4): 479-88.

28. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rovik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J Appl Microbiol. 2005; 99(1): 158-67.

29. Najera-Sanchez G, Maldonado-Rodriguez R, Ruiz Olvera P, de la Garza LM. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. J Food Prot. 2003 Jun; 66(6): 1055-62.

30. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int J Food Microbiol. 2005 Jan; 98(1): 73-9.

31. Imanifooladi AA, Sattari M, Najar Peerayeh SH, Hassan ZM, Hossainidoust SR. Detection the *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from skin infection in hospitalized patients. Pak J Bio Sci. 2007 Feb; 10(3): 502-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Shahrekord University
of
Medical Sciences

Received: *9/Dec/2008* *Accepted: 16/Jul/2009*

Molecular and serological detection of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus from traditionally dairy products

Imani-Fooladi AA (PhD)*[1], Riazipour M (PhD)**, Sattari M (PhD)***

**Assistant professor, Molecular Biology Dept., Research Center of Baqiyatallah Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran, **Associated professor, Microbiology Dept., Baqiyatallah Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran, ***Associated professor, Bacteriology Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

Background and aim: *Staphylococcus aureus* is one of the most causes of food poisoning (FP) in dairy products. The main etiologic agent of FP is staphylococcal enterotoxins (SE). There are different types of SE, but type A (SEA) and type B (SEB) are the most important types. Because traditional dairy products are still produced and sold without a permit from the Ministry of Health, this study was conducted to evaluate molecular and serological detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* SEA and SEB from traditionally dairy products.

Method: In the current study, 100 samples of dairy products, which were produced by traditional methods, were transported to the laboratory under sterile conditions and were assessed. Samples were cultured and identified by routine bacteriological methods. The isolated bacteria were evaluated by PCR tests for diagnosis of the gene encoding of SEA and SEB. Subsequently, the ability of above mentioned strains to produce enterotoxin were examined by Sac's culture method and were confirmed by SRID. Data were analyzed using chi-square test.

Results: The results indicated that 32% of dairy products were contaminated by *Staphylococcus aureus* (18% cream, 10% cheese, 4% milk). The PCR results showed that 15.6% of *Staphylococcus aureus* isolates possessed the SEA gene, 9.3% had the SEB gene and 6.2% possessed both genes. The ability of enterotoxin production indicated that 80% of SEA and 33% of SEB genes were expressed.

Conclusion: Enterotoxins SEA and SEB are heat stable; therefore heating has no effect on dairy products contaminated by entertoxins and gastritis may occur in a short period of time. As PCR is a rapid, sensitive, specific and inexpensive method, we suggest that it can be replaced to traditionally assays for detecting SE.

[1]Corresponding author:
Molecular Biology Dept., Research Center of Molecular Biology Baqiyatallah Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran
Tel: 021-88039883
E-mail:

Keywords: **Dairy products, Enterotoxin,** Staphylococcus aureus

www.SID.ir